

# 細胞分泌タンパク質の糖鎖

GlycoStation™

Technical Information

# 2

## がん細胞の細胞培養上清を用いて

共同研究：北海道情報大学 中林秀和先生

Glycotechnica

## 正常肝細胞 NKNT-3 とそのがん化した細胞 NKNT-3/3-9-2 の比較

細胞から分泌されるタンパク質のほとんどは糖鎖付加され、その糖鎖構造は細胞の種類や状態によって異なります。たとえば、腫瘍マーカーとしても糖鎖の変化は良く知られています。

ここでは、SV40 large T-antigen によって不死化した成人肝細胞株 NKNT-3 およびそのがん化した細胞 NKNT-3/3-9-2 の培地をレクチンマイクロアレイで解析し、分泌タンパク質の網羅的糖鎖パターンを比較しました。

### ◆ 分泌タンパク質を同濃度反応させたレクチンマイクロアレイ比較

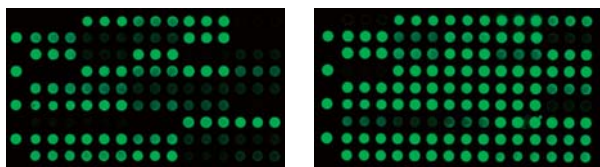


Fig. 1 細胞培養上清 NKNT-3 と NKNT-3/3-9-2 のレクチンマイクロアレイ画像

NKNT-3 と NKNT-3/3-9-2 の分泌タンパク質を同濃度でレクチンマイクロアレイに反応させ、比較しました。

結果は、NKNT-3/3-9-2 の 45 種レクチンのシグナルは NKNT-3 に比べ全体的に極めて高く、糖鎖発現のレベルが高いことが推測されました。(Fig. 1)

### ◆ 糖鎖プロファイリングパターン

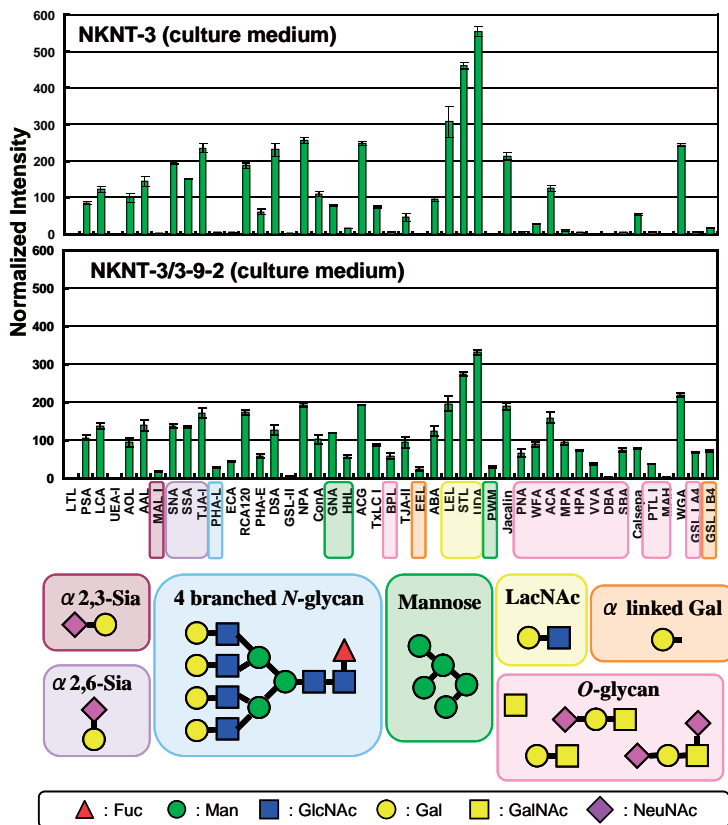


Fig. 2 糖鎖プロファイリング比較と糖鎖の違い

レクチンマイクロアレイにより得られたシグナルの比較解析を行いました。ここでは、各レクチンの輝度値を、レクチン 45 種のスポットの輝度値の平均が 100 になるように計算することによって規格化しました (Fig.2)。正常肝細胞 NKNT-3 とがん化した細胞 NKNT-3/3-9-2 では、糖鎖プロファイリングパターンが全体的に全く異なっていることが分かります。

$\alpha$ 2,3-シアル酸認識 (MAL I), 4 本鎖の複合型 N 結合型認識 (PHA(L)),  $\alpha$ -ガラクトース認識 (EEL, GSL I B4), ハイマンノースの N 結合型糖鎖認識 (GNA, HHL, PWM), O 結合型糖鎖認識 (BPL, PNA, WFA, MPA, HPA, VVA, SBA, PTL I, MAH, GSL I A4) で、レクチンマイクロアレイのシグナルは増加しています。その一方で、N-アセチルラクタミン認識 (LEL, STL, UDA)、 $\alpha$ 2,6 シアル酸認識 (SNA, TJA I) ではシグナルは減少しています。

正常肝細胞と比べてがん化した細胞 NKNT-3/3-9-2 では、上記のようにあらゆる糖鎖に変化が見られることがレクチンマイクロアレイにより検出できました。

## 各種腫瘍由来細胞株間の糖鎖プロファイリング比較

ここでは、肝癌、肝芽腫、卵黄嚢腫瘍、胃癌、乳癌といった各種腫瘍由来細胞株の細胞培養上清をレクチンマイクロアレイを用いて、分泌タンパク質の網羅的糖鎖パターン比較を行った結果を示します。

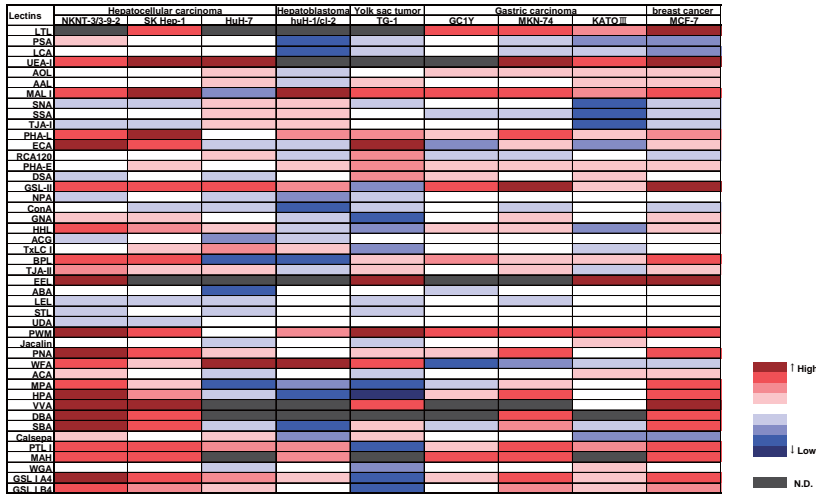


Fig. 3 ヒト腫瘍細胞株間の糖鎖発現率の違い

NKNT-3 をコントロールとしてレクチンマイクロアレイのシグナルを比較し、発現レベルの増加(赤)と減少(青)で表しました (Fig.3)。糖鎖プロファイリングパターンが細胞間で異なっていることが明らかに示されました。細胞が糖鎖の顔と言われているのと同様に、細胞の分泌タンパク質の糖鎖を網羅的に解析してもまた、指紋認証的にパターンの違いを検出することができました。

## - 測定方法 -

### 1. 細胞培養上清サンプルの濃縮と Buffer 交換

- 1-1. 細胞培養上清液 10ml<sup>1)</sup> を回収し -80℃ に凍結保存します。
- 1-2. 1-1 を融解して限外ろ過フィルター<sup>2)</sup> にアブライシ、4,000×g, 4℃ で遠心して、およそ 500μl 以下に濃縮します。
- 1-3. 1-2 に PBS<sup>3)</sup> を加えて 14.5ml 加えて、4,000×g, 4℃ でおよそ 500μl 以下になるまで遠心します (濃縮・Buffer 交換)。
- 1-4. 1-3 を再度行います。
- 1-5. 1-4 に PBS を加えて 14.5ml 加えて、4,000×g, 4℃ でおよそ 250μl 以下になるまで遠心して、サンプルを回収します。
- 1-6. PBS を加えて 500μl に調製します。

### 2. 蛍光標識

- 2-1. Micro BCA Protein Assay Reagent Kit<sup>4)</sup> を用いてタンパク定量します (反応時間 2h)。
- 2-2. PBS で、サンプル 50μg/ml, 20μl を調製し、これを Cy3 Mono-Reactive dye 100μg labeling<sup>5)</sup> に混合します。

- 2-3. 2-2 を室温、暗所で 1h 反応させます。

- 2-4. ゲルろ過カラム<sup>6)</sup> に TBS<sup>7)</sup> 300μl をアブライシ、1,500×g, 1min, 4℃ 遠心します (カラム洗浄)。
- 2-5. 2-4 を 2 回繰り返します。
- 2-6. 2-5 のゲルろ過カラムに 2-3 全量と TBS 25μl をアブライシして、1,500×g, 2min, 4℃ で遠心してゲルろ過を行い、未反応の Cy3 を除きます。

### 3. レクチンマイクロアレイの測定

- 3-1. サンプルを Probing Solution<sup>8)</sup> でアブライシする濃度に希釈します。
- 3-2. LecChip™<sup>9)</sup> を Probing Solution で 3 回洗浄後、サンプルをアブライシします (100μl/well)。
- 3-3. 20℃ で LecChip を O.N. 反応させます。
- 3-4. サンプルをアブライシしたままの状態 で LecChip を GlycoStation™ Reader 1200<sup>10)</sup> で測定します。
- 3-5. Array-Pro Analyzer<sup>11)</sup>、GlycoStation™ Tools<sup>12)</sup> で解析します。

## Note

- 1) 細胞培養上清液は、無血清培養を行ったものもしくは回収前に無血清培地に切り換えたものを用います。
- 2) Amicon Ultra-15, Ultracel-5K (Millipore, #UFC900596)
- 3) PBS(-) pH7.3
- 4) Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, #23235)
- 5) Cy3 Mono-Reactive dye pack (GE, #PA23011) を 100μg labeling ずつ分けたものを用いる。
- 6) Zeba Desalt Spin Columns, 0.5ml (Thermo, #89883)
- 7) TBS pH7.5
- 8) Probing Solution (Glycotechnica)
- 9) LecChip™ (Glycotechnica)
- 10) GlycoStation™ Reader 1200 (Glycotechnica)
- 11) Array-Pro Analyzer ver.4.5 (MEDIA CYBERNETICS)
- 12) GlycoStation™ Tools (Glycotechnica)