

# 生細胞表面の糖鎖

GlycoStation™

Technical Information

# 3

Glycotechnica

## 細胞を破碎せず、細胞表面のグリコームを測定

### CHO 細胞と Lec1 変異細胞の生細胞グリコームプロファイリング

ゲノム、プロテオームと同様に、生体が持つ糖鎖の全体像はグリコームと呼ばれています。そして細胞はその種類や分化度、変異によって、細胞表面に発現しているグリコームが変わることが知られています。

当社のシステムでは、細胞から分画したタンパク質を蛍光標識して糖鎖解析を行うのが通常ですが、細胞内に取り込まれると代謝的に蛍光を発する試薬（CMRA 試薬）で標識した生細胞をそのまま測定に用いることで、生細胞の細胞表面に発現している糖鎖を解析することも出来ます。この測定法は生細胞表面に発現している糖タンパク質、糖脂質を含んだグリコームプロファイリングのための画期的な手法であるといえます。（Fig.1）

ここでは、レクチンマイクロアレイを用いた CHO 細胞とその GlcNAc 転移酵素 I ノックアウトである Lec1 変異細胞の糖鎖プロファイリングについて示します。2 種の生細胞に CMRA 試薬を取り込ませることで蛍光標識を行い、レクチンマイクロアレイを用いてそのシグナルの違いを明瞭に検出することができました。

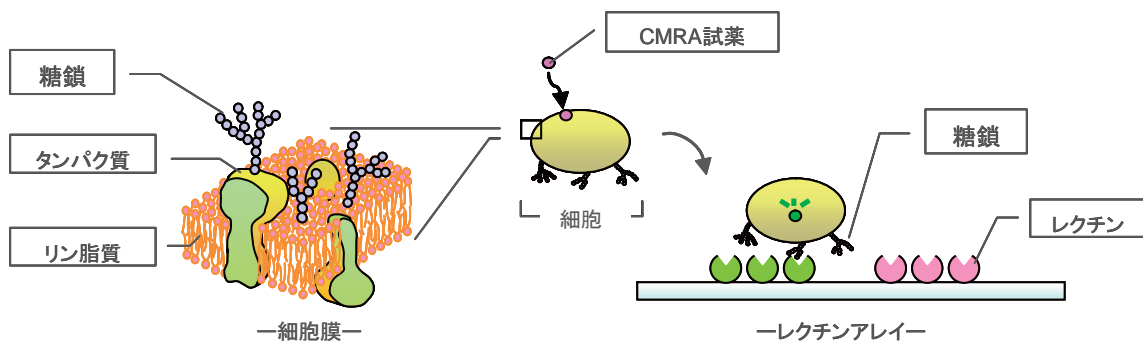


Fig. 1 生細胞グリコームプロファイリング

### ◆ レクチンアレイ画像と細胞の結合の様子

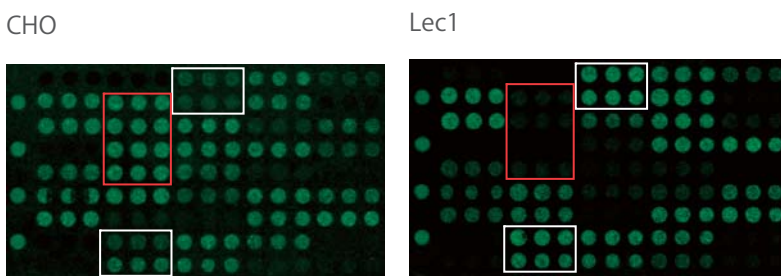


Fig. 2 蛍光測定画像

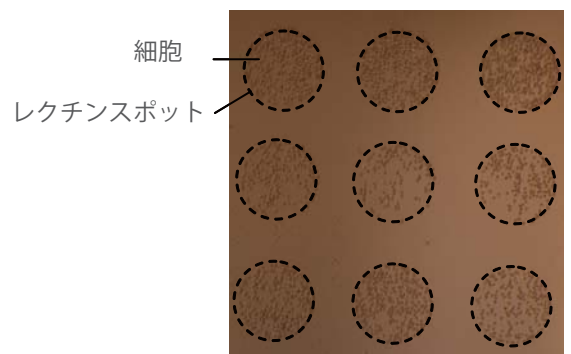


Fig. 3 顕微鏡写真

GlcNAc 転移酵素 I (GlcNAc-transferase-I) は、複合型糖鎖合成のコア構造の 1-3 アームへの GlcNAc 残基の結合に働きます。したがって、GlcNAc-TI が欠損している Lec1 変異細胞では、複合型糖鎖の合成が進まなくなり、ハイマンノース型糖鎖の発現率が上がるといった N 結合型糖鎖合成の変化が予測されます。

実際に測定を行なったところ、蛍光測定画像（Fig.2）に明らかなシグナルパターンの違いが確認されました。また、細胞を壊さずに測定するため、レクチンスポットに結合した細胞の様子は顕微鏡でも観察が可能です。（Fig.3）

## ◆ レクチンシグナルの特徴的な差異

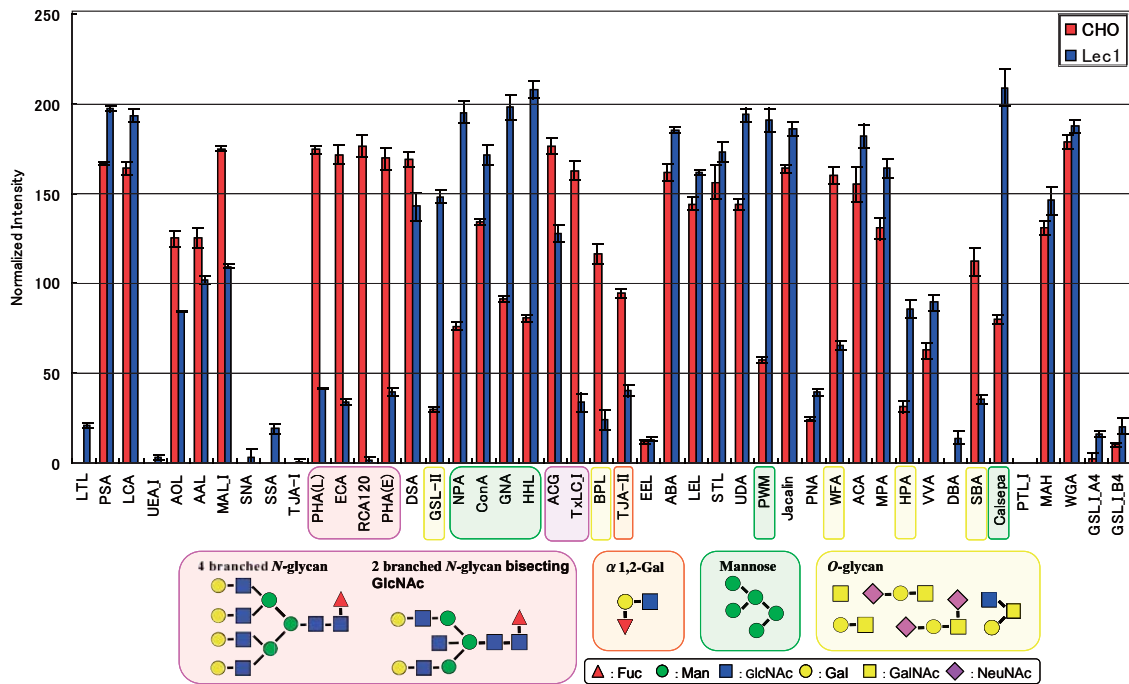


Fig.4 CHO と Lec1 のシグナル比較

前述の蛍光測定画像を数値化して解析を行ったところ、主に N 結合型糖鎖認識レクチンのシグナルに明確な差異が確認されました。Lec1 変異細胞において、分岐した複合型 N 結合型糖鎖認識レクチン (PHA(L), PHA(E), ACG, TxLC I)、ガラクトース認識レクチン (ECA, RCA120) のシグナルは減少し、その一方、ハイマンノース型の N 結合型糖鎖認識レクチン (NPA, ConA, GNA, HHL, PWM, Calsepa) のシグナルは増加しています。Lec1 変異細胞における O 結合型認識レクチンのシグナル差異は、複合型の N 結合型糖鎖の欠如によって O 結合型糖鎖や糖脂質が細胞表面へ露出され、細胞表面の糖鎖の全体像が変化したためであると推測されます。以上の結果は Lec1 変異細胞が糖転移酵素 GlcNAc-TI の欠損であることと合致しています。(Fig.4)

## - 測定方法 -

## 1. 細胞サンプルの回収と分画

1-1.  $3 \times 10^6$  個<sup>1)</sup>の細胞を測り取り、無血清培地で洗浄します。

## 2. 蛍光標識

2-1.  $3 \times 10^6$  個の細胞を 300  $\mu$ l の無血清培地で懸濁したところに、1mM の CellTracker™<sup>2)</sup> を 3  $\mu$ l 加えます。

2-2. 遮光・攪拌しながら 37°C で 15min 反応させます。

2-3. 反応後、1%BSA/PBS で細胞を洗浄し、細胞が染色されていることを確認します。

## 3. レクチンマイクロアレイの測定

3-1. 染色した細胞を、1%BSA/PBS で目的の細胞数になるよう希釈します。

3-2. LecChip™<sup>3)</sup> を Probing Solution<sup>4)</sup> で 3 回洗浄後、サンプルをアプライします (100  $\mu$ l / well)。

3-3. 4°C で 30min 反応させます。

3-4. PBS で満たした 50ml チューブに反応後の LecChip™ を入れ、反応槽側を下にして 30min 静置させることでレクチンと結合していない細胞をアレイから外します。

3-5. PBS がに入った状態で LecChip™ を GlycoStation™ Reader 1200<sup>5)</sup> で測定します。

3-6. Array-Pro™ Analyzer<sup>6)</sup>、GlycoStation™ Tools<sup>7)</sup> で解析します。

## Note

- 1) 1 回以上継代した細胞を用いる。
- 2) CellTracker™ Orange CMRA (Invitrogen, Cat#:C34551) DMSO で 1mM に調製したものを終濃度 10mM で使用する。
- 3) LecChip™ (Glycotechnica)
- 4) Probing Solution (Glycotechnica)
- 5) GlycoStation™ Reader 1200 (Glycotechnica)
- 6) Array-Pro™ Analyzer ver.4.5 (MEDIA CYBERNETICS)
- 7) GlycoStation™ Tools (Glycotechnica)