

## 末端に官能基を有する糖鎖プライマーへの細胞による糖鎖伸長

Saccharide Chain Elongation on Glycoside Primers Having Terminal Functional Groups by Cellular Enzymes

畑中研一\* 小林雅樹\* 粕谷マリアカルメリタ\*

Kenich HATANAKA, Masaki KOBAYASHI and Ma KASUYA

## 1. はじめに

本研究は、各種の動物細胞、植物細胞を糖鎖生産工場として利用するという発想により、「糖鎖プライマー」を細胞に与え、糖鎖を付加・分泌させる方法を用い、多岐にわたる糖鎖ライブラリーを構築し、糖質ポリマーを合成しようとするものである。糖鎖に疎水性の基を付けた「糖鎖プライマー」を細胞に与えると、細胞に取り込まれて糖鎖が付加された上で細胞外に分泌される。細胞はその由来によって細胞特異的な構造の糖鎖を合成しているため、糖鎖プライマーを与える細胞を選択することにより、様々な糖鎖を合成して細胞外に分泌させることができる。さらに、優れた機能を有した糖鎖を素材とした機能性糖鎖高分子を製作することを最終目標とし、二重結合を有する糖鎖プライマーの合成と細胞による糖鎖伸長について報告する。

## 2. 二重結合を有する糖鎖プライマーの合成

これまでの研究において、糖鎖プライマーのアグリコンである一本鎖のアルキル部分の長さを変えることによって、細胞内への取り込み効率や細胞内での糖鎖伸長効率、さらに細胞外への分泌率が大きく変化することが明らかになっている。その際アルキル鎖の長さを8, 12, 16と変化させると、これらの工程を最も効率良く進行させることができるのがn-ドデシルβ-D-ラクトシドのようなアルキル鎖の炭素数が12のものであった。これらの知見を考慮し、官能基を末端に導入してもn-ドデシルβ-D-グリコシドとほぼ同様な親水・疎水のバランスが保つことができるようなアグリコンを設計した。そこで末端にビニル基を持つ10-ウンデセン-1-オールをグリコシル化し末端にビニル基を持つラクトシドを合成することにした。末端にビニル基があることで実際に重合性官能基としても利用できるが、n-ペンテニルグリコシドで報告されているように、末端への様々な官能基の導入がチオールとのラジカル反応により、目的に合わせて官能基を変えることが可能だと考えられる。このことから幅広い利用が期待される。また、末

端に重合性官能基を導入したものを糖鎖プライマーとして用いることを検討した。親水・疎水のバランスを考慮し、あまりかさ高くないように重合性官能基としてまずアクリル基を採用した。

本研究の糖鎖プライマーの合成においては、工程をできるだけ減らし簡便な方法で合成することを目的としたため、まず糖鎖プライマーの糖鎖部分になるラクトースの水酸基をアセチル基で保護し、長鎖アルコールとのグリコシル化反応を経て、最後脱アセチル化をすることで合成を進めることにした。グリコシル化の方法には様々な方法があるが、その多くはアノマー位に活性基を導入し、グリコシル化を行う。本研究ではより簡便に糖鎖プライマー合成を行うためにアノマー位の活性化を行わずにアセチル化糖を直接グリコシル化することのできる、Lewis酸触媒を用いたグリコシル化の手法を採用した。そのLewis酸触媒としてはTMSOTf, SnCl<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>Oが一般的である。今回はその中から糖鎖間の結合の保持を考慮し酸性が比較的弱く、比較的安価なSnCl<sub>4</sub>とBF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>Oを採用し糖鎖プライマー合成に利用した。

糖鎖高分子の合成を目的とした糖鎖プライマーとして、末端に二重結合を持つ10-ウンデセニルラクトシドを合成した。このプライマーはLewis酸触媒を用いることで、3段階の反応で簡便に合成できる。全体スキームを図1に示

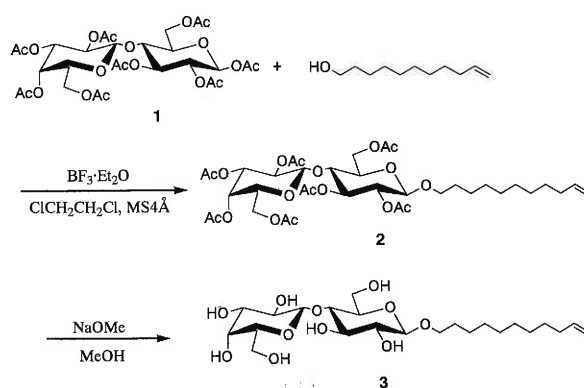


図1

\*東京大学生産技術研究所 物質・環境系部門

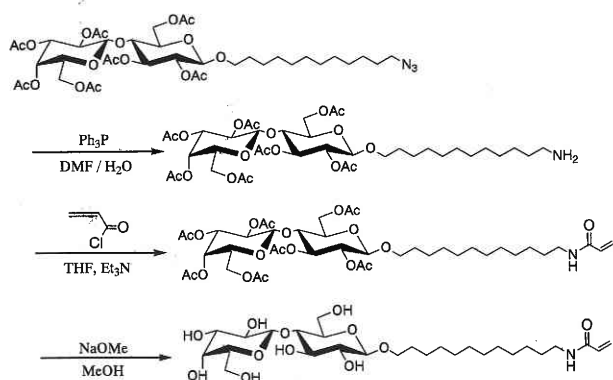


図 2

す。

合成は化合物 1 を用いて、 $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  を触媒として 1,2-ジクロロエタン中、 $50^\circ\text{C}$  で、10-ウンデセン-1-オールとグリコシル化反応し、化合物 2 を得た (収率: 31%)。脱アセチル化はナトリウムメトキシドを用いて行い、化合物 3 を得た (収率: 97%)。

次に、末端にアクリル基を有する糖鎖プライマーを合成した (図 2)。末端にアジド基を持つ糖鎖プライマーのアセチル化体を出発物質として、還元剤としてトリフェニルホスフィンを用いた。DMF/水の混合溶媒中、トリフェニルホスフィンを触媒としてアジド基を還元した。ニンヒドリン試薬でアミノ基の生成を確認後そのままアクリル酸クロリドと反応させることでアミド化し、末端にアクリル基を導入した (2段階で収率 38%)。

### 3. 糖鎖プライマー上への糖鎖伸長反応 (実験)

糖鎖プライマーを各々秤量し、DMSO (dimethyl sulfoxide, 細胞凍結用 (HYBRI-MAX), Sigma) に溶解し、100 mM DMSO ストック溶液を調製した。この溶液をメンブレンフィルター (DIMEX-13, MILLIPORE) により滅菌し、 $-30^\circ\text{C}$  で凍結保存した。使用の際は、糖鎖プライマーを細胞に投与する直前に所定濃度になるように培地に加え、十分攪拌してから用いた。

ダルベッコ変法イーグル MEM 培地 (DMEM) は ICL 社、PBS (-) は日水製薬、ストレプトマイシン、ペニシリン G カリウムは明治製菓、ウシ胎児血清 (FBS, Lot No: US 167209)、ウマ血清 (HS, Lot No: 36 P 1042)、DMEM/F-12 培地 (without phenol red)、Trypsin (1:250) は GIBCO BRL、炭酸水素ナトリウムは nacal tesque、 $\gamma$ -インシュリン (human)、トランスフェリン (Holo, bovine) 及び二酸化セレンは和光純薬、プラスチック製培養容器は岩城硝子社製およびファルコン社製のものを購入した。

B 16 細胞 (マウスメラノーマ細胞株) は理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター、ジーンバンク細胞開

発銀行より入手した。B 16 細胞の培養には DMEM 培地 (ストレプトマイシン 0.1 g/L, ペニシリン G カリウム 10 万 unit/L を含み、炭酸水素ナトリウムを 3.7 g/L 加えて pH 7.1~7.4 に調製した) を  $0.22 \mu\text{m}$  フィルター (Millex GV, MILLIPORE) でろ過滅菌し、ウシ胎児血清を 10% 加えた培養液を使用した。細胞は  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ -95% air 下で無菌恒温槽 (日立 CH-16 M 型) 内で培養した。全ての実験において培養細胞は、継代数 13~30 のものを使用した。細胞に継代する際には、ディッシュ内を単層で一層覆った状態のものを PBS (-) 溶液で洗浄し、0.05% trypsin/PBS (-) 溶液で細胞をディッシュより剥がし、10% FBS 含有 D-MEM 培地により trypsin を不活性化し、1000 rpm で 5 分間遠心分離することで上清を除去し、細胞を回収した。この細胞を培地に懸濁させて希釈して播種した。

PC 12 細胞 (ラット副腎髄質褐色細胞腫細胞株) は三菱化学生命科学研究所 天野 博士より供与していただいたものを用いた。PC 12 細胞の培養には DMEM 培地 (ストレプトマイシン 0.1 g/L, ペニシリン G カリウム 10 万 unit/L を含み、炭酸水素ナトリウムを 3.7 g/L 加えて pH 7.1~7.4 に調製した) を  $0.22 \mu\text{m}$  フィルター (Millex GV, MILLIPORE) でろ過滅菌し、FBS を 10%、HS を 5% 加えた培養液を使用した。細胞は  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ -95% air 下で無菌恒温槽 (日立 CH-16 M 型) 内で培養した。全ての実験において培養細胞は、継代数 24~30 のものを使用した。細胞に継代する際には、ディッシュ内を単層で一層覆った状態のものをピペッティングより細胞をディッシュから剥がし、1000 rpm で 5 分間遠心分離することで上清を除去し、細胞を回収した。この細胞を培地に懸濁させて希釈して播種した。

糖鎖プライマーの投与実験の際には、それぞれの培養細胞はトリパンプルー (関東化学) による染色により細胞数を計測し、100 mm $\phi$  ディッシュ (岩城硝子) に B 16 細胞は  $2.0 \times 10^6$  cells, PC 12 細胞では  $3.0 \times 10^6$  cells の細胞数で播種した。一晚培養して細胞を接着させた後、細胞表面を DMEM/F-12 培地 (トランスフェリン 50 mg/L,  $\gamma$ -インシュリン 5 mg/L, 二酸化セレン 30 nmol/L を含む) で二回洗浄し、培地を所定濃度の糖鎖プライマーを含むものに替えた。

細胞増殖を検討する方法として本研究ではトリパンプルーによる色素排他法と MTT 法を用いた。トリパンプルーによる色素排他法では、トリパンプルーが死細胞のような膜に障害のある細胞には速やかに侵入して核が青く染色されるのに対して、膜に障害のない生細胞には侵入しないことを利用して細胞の生死を区別し数える方法である。

24 穴カルチャープレートに 10% FBS 含有 D-MEM 培地に懸濁した細胞を  $7.3 \times 10^4$  cells/500  $\mu\text{L}$ /well で添加し一晚培養した。培養後、培地を所定濃度の糖鎖プライマーを含む DMEM/F-12 培地 500  $\mu\text{L}$ /well と交換し、さらに三日

## 研究速報

間培養した。三日後、PBS (-) 500  $\mu$ L/well で洗浄し、0.05% trypsin/EDTA/PBS (-) 溶液 400  $\mu$ L で細胞をプレートから剥離した。細胞懸濁液を 10% FBS 含有 DMEM 培地 400  $\mu$ L の入ったエッペンチューブに入れ trypsin を不活性化し、1000 rpm で 5 分間遠心分離することで上清を除去し細胞を回収した。この細胞を 100  $\mu$ L の 10% FBS 含有 DMEM 培地に懸濁させ、さらに 0.5% トリパンプルー/PBS (-) 水溶液 100  $\mu$ L を加えて染色し、血球計算盤を用いて顕微鏡で細胞数を計数した。

また、MTT 法により糖鎖プライマーの細胞に対する毒性を調べるのに、同仁化学研究所の Cell Counting Kit (WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2 H-tetrazolium, monosodium salt), 1-Methoxy PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate)) を用いた。この Cell Counting Kit は MTT assay を改良したもので、発色基質が水溶性のため MTT assay より再現性が高く、操作も簡便な方法である。この方法の原理は、生細胞のミトコンドリア内の酸化還元酵素により生成した NADH が 1-methoxy PMS を還元して PMS 還元型が生成し、それが WST-1 を水溶性のホルマザンに変えることによる。このホルマザンの生成量と生細胞数が相関することから細胞数の測定に用いられている。本実験ではあらかじめ血球計算盤で数えた培養細胞の数と吸光度との間に相関関係があることを確認して上で行った。

WST-1 16.6 mg を 4.5 mL の PBS (-) に溶解したものを調製し、また別に 1-methoxy PMS 7 mg を精製水 10 mL に溶解したものを調製した。この WST-1 の PBS (-) 溶液 4.5 mL に 1-methoxy PMS 水溶液 0.5 mL を使用直前に混合し、Cell Counting Kit 試薬とした。

96 穴カルチャープレート (岩城硝子) に 10% FBS 含有 DMEM 培地を 100  $\mu$ L 加えて一晩インキュベートした後、DMEM/F-12 培地で二度洗浄した。そこに DMEM/F-12 培地に懸濁した細胞を  $1.2 \times 10^4$  cells/50  $\mu$ L/well で播種し、5 時間培養して細胞を接着させた。細胞接着後、所定の 2 倍量に調製した糖鎖プライマーを含む DMEM/F-12 培地を 50  $\mu$ L/well で添加して培養を開始した。培養終了の 90 分前に Cell Counting Kit 試薬を 10  $\mu$ L/well で添加し、マイクロプレートリーダー (MTP-120, コロナ電気) を用いて吸光度を測定した (測定波長: 450 nm, 対照波長: 690 nm)。

続いて細胞画分と培地画分の分離を行った。糖鎖プライマーを投与した細胞を所定時間培養した後、氷上で反応を止めた。培養上清を回収した後、PBS (-) で洗浄しながらセルスクレイパーを用いて細胞剥離した。この細胞懸濁液を遠心チューブに集め、1000 rpm で 5 分間遠心分離した。この上清を培地画分として回収した。沈殿は 500  $\mu$ L PBS (-) に再び懸濁し、50  $\mu$ L をタンパク定量として分取した。この細胞懸濁液を再び 1000 rpm で 5 分間遠心分

離し、沈殿は細胞画分、上清は培地画分として回収した。

さらに、細胞画分からの脂質成分の抽出を行った。細胞画分にクロロホルム:メタノール = 2:1 (v/v) を 1 mL 加えて 30 分間超音波照射した。その後、15000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を別に回収して窒素気流下で溶媒を蒸発させた。残渣には クロロホルム:2-プロパノール:水 = 7:11:2 (v/v/v) を 1 mL 加えて、さらに 30 分間超音波照射した。その後、15000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を先述の抽出液と混合して、窒素気流下で蒸発させた。

また、培地画分については Sep-Pak C 18 (Waters) を用いて糖脂質の抽出を行った。Sep-Pak C 18 にメタノール 10 mL を通すことでカラムを活性化し、水 10 mL を通しカラムを平衡化した。次に培地画分をゆっくりカラムに二度通し脂質成分を吸着させた後、水 10 mL を通しカラムを洗浄した。その後水 2 mL, クロロホルム:メタノール = 2:1 (v/v) 5 mL をゆっくり流し、糖脂質をカラムから溶出した。この溶出液を窒素気流下で蒸発させた。

回収した細胞の 1/10 を 200  $\mu$ L の PBS (-) /2.5% SDS で溶解させた。96 穴マイクロプレート (岩城硝子) にこの細胞懸濁液を 1 穴あたり 5  $\mu$ L ずつ分注した。これに Reagent A+S (Reagent A: Reagent S = 50:1 (v/v)) 25  $\mu$ L, Reagent B 200  $\mu$ L を加えて室温で 15 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (MTP-120, コロナ電気) を用いて測定波長 690 nm での吸光度を測定した。標準物質として BSA を用いた。希釈した BSA の吸光度により検量線を作製し、試料中のタンパク質量を算出した。

細胞画分、培地画分より抽出した糖脂質は HPTLC プレート (層厚 0.2 mm, サイズ 10  $\times$  20 cm, Silica Gel 60, Merck) に展開することで分析した。展開溶媒にはシアル酸などの酸性糖を含む酸性糖脂質を発現している B 16 細胞の場合は、クロロホルム:メタノール:0.2% CaCl<sub>2</sub> aq. = 5:4:1 (v/v/v) を、中性糖脂質を多く発現している PC 12 細胞の場合には、クロロホルム:メタノール:水 = 60:35:8 (v/v/v) を用いた。

染色試薬として、B 16 細胞の場合には HPTLC でのガングリオシドの定量によく用いられるレゾルシノール-塩酸試薬でシアル酸含有糖脂質を染色した。先述の溶媒で展開し溶媒を十分に乾燥した後、この試薬を HPTLC プレートに噴霧し、清浄なガラス板で挟み、シリカゲル面を下にして 95°C で 30 分間加熱し染色した。青紫色に染色されたバンドは、デンストメーター (CS 9000, 島津製作所) を用いて測定波長 580 nm でスキャンし定量した。レゾルシノール-塩酸試薬は、200 mg のレゾルシノール (Resorcinol, nacalai tesque) を水 10 mL に溶解させ、塩酸 80 mL と 0.1 M 硫酸銅水溶液 0.25 mL を加えて、水で総量 100 mL とし調製した。

PC 12 細胞の場合には、HPTLC プレート上の糖脂質をオルシノール-硫酸試薬で染色した。展開溶媒を十分に乾

乾燥させた後、この試薬を HPTLC プレートに噴霧し、ホットプレート (サンヨーホットプレート HPS-50, 三洋電機) 上で 100°C で 5 分間加熱し染色した。赤紫色に染色されたバンドは、デンストメーター (CS 9000, 島津製作所) を用いて測定波長 540 nm でスキャンし定量した。オルシノール-硫酸試薬は 2N 硫酸 100 mL にオルシノール (Orcinol monohydrate, Sigma) を 2 g 溶解して調製した。

HPTLC プレートで糖脂質を分離した後、プリムリン試薬を十分に噴霧し、365 nm の UV を当てて糖脂質を視覚化して赤鉛筆で印を付けた。この HPTLC プレートをプロッティング溶媒 (2-プロパノール:メタノール:0.2% 塩化カルシウム水溶液 = 40:7:20 (v/v/v)) に 20 秒間浸した後、ガラスファイバーフィルター (AC-5972, ATTO) の上にシリカゲル面を上にして置いた。更にその上に PVDF 膜 (クリアプロット・P 膜, AC-6665, ATTO), PTFE 膜 (AC-5973, ATTO), ガラスファイバーフィルターを順に置き TLC サーマルプロッター (ATTO) で糖脂質を PVDF 膜にプロッティングした (180°C, 30 秒)。PVDF 膜を水で洗浄後、目的部分を切り取った。この膜からクロロホルム:メタノール = 2:1 (v/v) で二回糖脂質を抽出し、溶媒を窒素気流下で蒸発させ糖脂質を単離した。プリムリン試薬は、0.1 g プリムリンを水 100 mL に溶解し保存液として調製した。この保存液 1 mL を 100 mL のアセトン-水 (4:1, v/v) の混合液に希釈しこれを噴霧試薬として用いた。

MALDI-TOFMS 用のサンプル調製には 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB, Aldrich) をマトリックスとして用いた。0.64 M 2,5-Dihydroxybenzoic acid の 10% エタノール水溶液 (v/v) 2  $\mu$ L に、10 ~ 100 pmol の試料のクロロホルム:メタノール = 1:1 (v/v) 溶液 1  $\mu$ L を加えよく攪拌した。このうち 1  $\mu$ L をサンプルプレート上に展開し、風乾させたものを用いた。マススペクトル測定は Voyager-DE™ Biospectrometry™ Workstation (Perceptive Biosystems 製) を用いて行った。すべてのサンプルは、紫外光である窒素レーザー光 ( $\lambda = 337$  nm) でイオン化した。中性糖脂質は positive mode で、酸性糖脂質は negative mode で測定した。Positive mode, negative mode どちらも、Accelerating Voltage は 20 kV, Pulse Delay Time は 100 nsec. で測定を行った。キャリアレーションは positive mode では、DHB monomer;  $[M+H]^+$  = 155.0433 と ヒト Angiotensin I (Novabiochem);  $[M+H]^+$  = 1296.6853, negative mode では、DHB monomer;  $[M+H]^+$  = 153.0277 と ヒト Angiotensin I (Novabiochem);  $[M-H]^-$  = 1294.6697 を標準とした。

#### 4. 糖鎖プライマー上への糖鎖伸長反応 (結果と考察)

それぞれのプライマーを濃度 50  $\mu$ M の糖鎖プライマーを投与した後、三日間培養したときのトリパンブルーによる色素排他法で評価した結果、コントロールと比較して、末端にビニル基を持つラクトシド、末端にアクリル基を持

つラクトシド全てで細胞増殖への影響は見られなかった。また cell counting kit を用いた MTT 法によりそれぞれの糖鎖プライマーの細胞増殖への影響を経時的に評価した結果、どの糖鎖プライマーもコントロールと比較して細胞毒性を示していないことがわかった。培養時間 72 時間まで大きい影響はないと考えられるが、以下の研究では 48 時間を主に採用した。

B 16 メラノーマ細胞を用いて、末端に官能基を持つ合成糖鎖プライマーが実際に細胞内に取り込まれて糖鎖伸長反応を受けるかどうかを HPTLC から評価した。末端にビニル基を持つラクトシドを投与したものの、末端にアクリル基を持つラクトシドを投与したものをコントロールと比較すると、それぞれのラクトシドと同じ位置に新たなバンドを確認することができた。このことから、これらの糖鎖プライマーは細胞内に取り込まれていることがわかった。しかしながら末端にビニル基を持つラクトシドと末端にアクリル基を持つラクトシドは従来型の n-ドデシルラクトシドと比較すると、バンドが薄く細胞への取り込みが悪いことが示唆された。

一方、培地画分の HPTLC では、末端にビニル基を持つラクトシドを投与したものでは、プライマー以外に下方に一つ新たなバンドが現れたのを確認できた。このことからビニル基を持つラクトシドは細胞内で糖鎖伸長を受け、その生成物は細胞外に放出されていることがわかった。この新規バンドはレゾルシノール-塩酸試薬により染色を受けることからシアル酸が伸長されたことを強く示唆した。これに対して、末端にアクリル基を持つラクトシドを投与したものでは生成物が確認されず、アクリル基を持つラクトシドのすぐ下方に不純物と思われるバンドが観察された。

HPTLC の結果から末端にビニル基を持つ糖鎖プライマーを B 16 細胞に投与したところ、細胞によって糖鎖伸長された生成物が確認された。実際にどのような糖鎖が伸長されたか、新規バンドの糖鎖構造を類推するために、MALDI-TOFMS により質量分析を行った。糖鎖プライマーはいずれも positive mode, 生成物はシアル酸を含むことが予想されるため、negative mode で測定した。

末端にビニル基を持つラクトシドと B 16 細胞内で糖鎖伸長された生成物のマススペクトルを図 3 に示す。ラクトシドを含むサンプルでは、ラクトシドに  $Na^+$  が付加したものの理論分子量 (517.57) とほぼ一致する分子量 (517.94) にピークを確認できた。一方生成物を含むサンプルでは、ピークが 785.01 に確認された。この値は糖鎖プライマーにシアル酸が一つ伸長した化合物の分子量 ( $[M-H]^- = 784.34$ ) とほぼ一致することから、生成物は糖鎖プライマーに 1 つシアル酸が付加した化合物であることが推定できる (図 4)。末端にビニル基を持つラクトシドの糖鎖伸長反応の効率が悪いのは細胞内にあまり取り込まれていないためと考えられる。

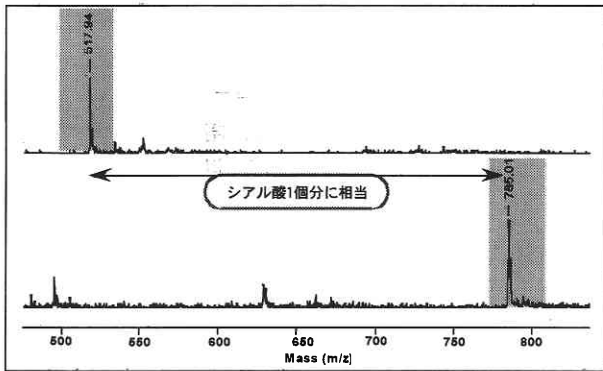


図3

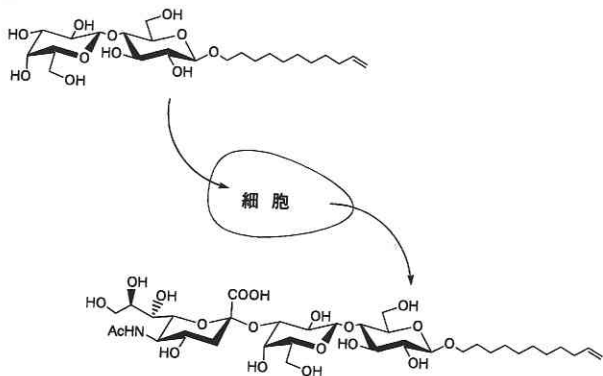


図4

末端にビニル基を持つラクトシドはB 16細胞において細胞内で糖鎖伸長され、シアル酸を1つ伸長されている可能性を示した。これらのラクトシドが他の細胞においても糖鎖プライマーとして機能するかどうかを評価するために、PC 12細胞に投与しても糖鎖伸長されるかどうかを検討した。

そのHPTLCの結果より、末端にビニル基を持つラクトシドはPC 12細胞においても細胞に取り込まれていることがわかった。また、培地画分のHPTLCでは、末端にビニル基を持つラクトシドを投与したものについてプライマー以外に2つ新たなバンドが下の方に現れたのを確認できたことから、ビニル基を持つラクトシドは細胞内で糖鎖伸長を受け、その生成物は細胞外に放出されていることがわかった。TLCのRf値からそれぞれのバンドの違いは糖残基一つ分と予想される。過去のアルキルラクトシドの知見を考慮すると、糖鎖はガラクトースであると推察される。以上のことから末端にビニル基を持つラクトシドはB 16細胞だけでなく、PC 12細胞においても糖鎖伸長されることがわかり、糖鎖プライマーとして十分機能することがわかった。

謝 辞

本研究は所内展開研究（研究代表者：畑中研一）の一部として行われました。ここに謝意を表します。

(2004年3月22日受理)