

博士論文

ヒト人工多能性幹細胞由来シアロ糖タンパク質  
ポドカリキシンのグライコムクス研究  
(Glycomic study of podocalyxin, a sialoglycoprotein  
from human induced pluripotent stem cells)

2019年3月

立命館大学大学院薬学研究科

薬学専攻博士課程

永井裕子

立命館大学審査博士論文

ヒト人工多能性幹細胞由来シアロ糖タンパク質

ポドカリキシンのグライコムクス研究

(Glycomic study of podocalyxin, a sialoglycoprotein  
from human induced pluripotent stem cells)

2019年3月

March 2019

立命館大学薬学研究科

薬学専攻博士課程

Doctoral Program in Pharmacy  
Graduate School of Pharmacy  
Ritsumeikan University

永井 裕子

NAGAI Yuko

研究指導教員: 豊田 英尚 教授

Supervisor: Professor TOYODA Hidenao



# 目次

略語表 .....	3
緒言 .....	5
本論 .....	8
第 1 章 蛍光ポストカラム HPLC を用いたシアル酸分析法の確立 .....	8
第 1 節 標準品を用いたシアル酸分析法の確立 .....	12
第 2 節 生体試料への応用 .....	15
第 3 節 考察 .....	18
第 4 節 実験の部 .....	18
第 2 章 ケラタン硫酸認識抗体(R-10G)が認識する糖鎖構造の解析 .....	20
第 1 節 ケラタン硫酸の構造 .....	21
第 2 節 合成オリゴ糖を用いた ELISA による R-10G 抗体認識構造の解析 .....	23
第 3 節 考察 .....	25
第 4 節 実験の部 .....	27
第 3 章 ヒト iPS 細胞(201B7 株)からの R-10G 抗原タンパク質の精製 .....	28
第 1 節 ヒト iPS 細胞抽出液を用いた解析 .....	29
第 2 節 R-10G アフィニティークロマトグラフィーによる精製 .....	31
第 3 節 Tic 株細胞由来 R-10G 精製画分との比較 .....	33
第 4 節 考察 .....	35
第 5 節 実験の部 .....	37
第 4 章 ヒト iPS 細胞(201B7 株)より得られた最終精製 R-10G 抗原タンパク質 (R-10G 結合性ポドカリキシン)の解析 .....	40
第 1 節 再アフィニティークロマトグラフィーによる R-10G 抗原タンパク質 の最終精製 .....	41



第2節	Western blot による糖鎖エピトープの解析 .....	43
第3節	LC/MS/MS による R-10G 抗原タンパク質の同定 .....	45
第4節	Blue Native-PAGE による解析 .....	47
第5節	糖鎖分解酵素を用いた解析 .....	49
第6節	考察 .....	51
第7節	実験の部 .....	54
第5章	蛍光ポストカラム HPLC を用いた新規ケラタン硫酸分析法の確立	58
第1節	標準品を用いたケラタン硫酸の分析法の確立 .....	59
第2節	生体試料への応用 .....	62
第3節	考察 .....	64
第4節	実験の部 .....	65
第6章	ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンの糖鎖分析 .....	67
第1節	蛍光ポストカラム HPLC による糖組成分析 .....	68
第2節	考察 .....	73
第3節	実験の部 .....	75
総括	.....	78
謝辞	.....	81
参考文献	.....	82
論文目録	.....	95

## 略語表

2-CA:	2-cyanoacetamide
6S:	6- <i>O</i> -sulfate
CMP:	cytidine monophosphate
DMB:	1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene
EC cells:	embryonal carcinoma cells
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
ES cells:	embryonic stem cells
FBS:	fetal bovine serum
GAG:	glycosaminoglycan
Gal:	galactose
GalN:	galactosamine
GalNAc:	<i>N</i> -acetyl-galactosamine
GCTM2:	germ cell tumor monoclonal 2
GCTM343:	germ cell tumor monoclonal 343
GlcN:	glucosamine
GlcNAc:	<i>N</i> -acetyl-glucosamine
HILIC:	hydrophilic interaction chromatography

HPLC:	high-performance liquid chromatography
iPS cells:	induced pluripotent stem cells
KDN:	2-keto-3-deoxy-glycero-galacto-nonulosonic acid
L2:	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S)
L4:	Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S)
LC/MS/MS:	liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MEF	mouse embryonic fibroblast
Neu5Ac:	<i>N</i> -acetylneuraminic acid
Neu5Gc:	<i>N</i> -glycolylneuraminic acid
RIPA:	radioimmunoprecipitation assay
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSEA-3:	stage specific embryonic antigen-3
SSEA-4:	stage specific embryonic antigen-4
TRA-1-60:	tumor rejection antigen-1-60
TRA-1-81:	tumor rejection antigen-1-81
Tris:	tris(hydroxymethyl)aminomethane
UDP:	uridine diphosphate

## 緒言

生物の生体内に存在するタンパク質は遺伝子情報を基に翻訳された後、糖鎖修飾やリン酸化、脂質修飾といった翻訳後修飾を経て、完全な分子として機能する[1]。これらの翻訳後修飾は直接遺伝子情報に制御されないため、タンパク質機能の解析には、遺伝子情報から得られる一次情報のみならず、翻訳後修飾の情報も重要である。特に糖鎖修飾はヒト生体内で発現するタンパク質のほとんどに起きていると言われており、その構造を解明することは様々な生命現象を明らかにする上で必須であると考えられる。

ヒト生体内でタンパク質に結合する糖鎖は結合様式により *N*-結合型糖鎖、*O*-結合型糖鎖、*C*-結合型糖鎖の 3 種類に分類することができる[2]。一般に *N*-結合型糖鎖はアスパラギン残基と、*O*-結合型糖鎖はセリン残基もしくはスレオニン残基と、*C*-結合型糖鎖はトリプトファン残基と結合している。特に *O*-結合型糖鎖は構造が多様でありヒト生体内にはムチン型糖鎖、グリコサミノグリカン (GAG) など 7 種類の *O*-結合型糖鎖が存在する[3]。GAG はアミノ糖とウロン酸の二糖繰り返し構造からなる直鎖状の糖鎖である。構成する二糖の構造によりコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸に分類することができる。生体内でヒアルロン酸以外の GAG はコアタンパク質と共有結合しプロテオグリカンとして存在している。発生生物学分野ではコンドロイチンが胚細胞における細胞分裂の制御をしているとの報告[4]やヘパラン硫酸が胚性幹細胞(ES 細胞)の自己複製能力や多能性に関するとの報告[5]もあり注目されている。近年ではケラタン硫酸もヒト人工多

能性幹細胞(iPS 細胞)および ES 細胞の多能性に関与することが示唆されている [6-8]。

iPS 細胞は山中らによって初めて作製された人工多能性幹細胞である[10, 11]。ES 細胞とは異なり、受精卵を用いることなく体細胞から作製することができるため、倫理的問題や移植時の拒絶反応の問題を解消することのできる画期的な細胞である。しかし実用化には依然として問題があり、その 1 つに再生組織における未分化細胞の検出・除去の必要性があることが挙げられる。当研究室では本学総合科学技術研究機構糖鎖工学研究センターとの共同研究により未分化幹細胞マーカー抗体 R-10G 抗体、R-17F 抗体を開発した[7, 11, 12]。これら 2 つのマーカー抗体はいずれもポドカリキシン上の糖鎖を認識しており、R-10G 抗体はケラタン硫酸様糖鎖を認識することを明らかにしている。興味深いことに、R-10G 抗体のみならず、既知の未分化幹細胞マーカー抗体である TRA-1-60、TRA-1-81 抗体もポドカリキシン上のケラタン硫酸様糖鎖を認識していることから[13, 14]、ヒト iPS 細胞に発現するポドカリキシン及びケラタン硫酸様糖鎖が未分化状態の維持や多能性に関与している可能性が示唆されている。

ポドカリキシンはラットの腎糸球体上皮細胞で最初に発見されたシアル酸に富む複合糖質であり、糸球体ろ過に必要なスリット構造を作るなど重要な腎機能を担っている[15-17]。最近、iPS 細胞を認識する多くの未分化マーカーのエピトープが細胞表面のポドカリキシンに結合している糖鎖であることが示され[7, 12, 13, 18, 19]、その構造と機能が注目されている。ヒトのポドカリキシンはコアタンパク質の分子サイズが 55 kDa の複合糖質であるが、ヒト胚性が

ん細胞(EC細胞)にも存在していることが報告されている[20]。存在部位に応じて様々な分子量が報告されており、結合している糖鎖の相違に起因すると考えられている。ヒト iPS 細胞では分子サイズが 250 kDa 以上の高分子として存在し、多様な糖鎖が結合していると予想されている[7]。このように、ヒト iPS 細胞が未分化状態を維持するための重要な因子としてポドカリキシンに関心が集まっており、ポドカリキシンの特殊な糖鎖構造の解明は再生医療分野における重要な研究テーマである。そこで本研究では、ヒト iPS 細胞が産生するポドカリキシン上の糖鎖構造解析を通じて iPS 細胞の特性である無限増殖性および未分化状態維持のメカニズムの分子基盤解明を試みた。

## 本論

### 第1章 蛍光ポストカラム HPLC を用いたシアル酸分析法の確立

本章では蛍光ポストカラム HPLC を用いたシアル酸分析法を確立した。哺乳動物ではシアル酸として主に *N*-アセチルノイラミン酸(Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸(Neu5Gc)が産生されている[21]。HILIC モードでこれらを分離後、2-シアノアセトアミド(2-CA)を誘導体化試薬とした蛍光ポストカラム HPLC を検討して、生体に含まれるシアル酸の分析法を確立し、血清試料へ応用した。本分析法によりプレラベル法で問題とされていた試料の長期保存、煩雑な作業の簡略化が可能となった。

シアル酸は C9 を基本骨格とした単糖であり、糖脂質や糖タンパク質などの複合糖質や *N*-結合型糖鎖、*O*-結合型糖鎖、ケラタン硫酸の非還元末端に存在することが知られている(Fig. 1-1)。自然界では 50 種類以上の構造が存在するが、主要なシアル酸は Neu5Ac、Neu5Gc、デアミノノイラミン酸(KDN)の 3 種類であり、その他のシアル酸はこれら 3 構造に類似した構造をとっている[22]。KDN は一部の魚類や両生類などで確認されているが、哺乳類に存在するシアル酸はほとんど全て Neu5Ac および Neu5Gc である[21, 23-27]。組織ごとに Neu5Ac、Neu5Gc の存在量が異なるだけでなく、年齢や種によって生成量が異なることが知られている[28-31]。Neu5Gc は、Neu5Ac と UDP-GlcNAc から合成された CMP-Neu5Ac が酵素によりヒドロキシル化され UDP-Neu5Gc になることで生成されるが、ヒトではヒドロキシラーゼ遺伝子の産物が活性を持っていない

め、ヒトの正常細胞は Neu5Gc を生成することができない[32-34]。

シアル酸は生体内で細胞間相互作用や細胞接着などに関与していると考えられている[35, 36]。また口腔がん[37]、大腸がん[38, 39]、胃がん[40]、前立腺がん[41]といったがんで血中のシアル酸量が上昇すること、化学療法を行うと血中シアル酸量が減少すること[42]などが明らかとなっている。がん細胞で生成量が増える物質は糖鎖だけではなく、タンパク質も変化する。その1つとしてポドカリキシンが挙げられる。予後不良な大腸がん、胃がん、白血病をはじめとするがん細胞でポドカリキシンの発現が上昇することから、がん細胞とポドカリキシンの関連性に注目が集まっている[43-45]。ポドカリキシンは腎糸球体足細胞で発見されたシアロ糖タンパク質であり[15]、シアル酸を多数結合することで負電荷を帯び、足細胞のスリット構造の形成や糸球体ろ過機構に関与している[16, 17, 20, 46]。がん細胞や腎細胞だけでなくヒト iPS 細胞でもポドカリキシンを発現していることが明らかとなっている[7, 13, 18, 47]。しかしがん細胞やヒト iPS 細胞中で発現するポドカリキシンの役割や機能の解明は未だに十分に行われていない。したがってポドカリキシンの糖鎖解析は再生医療における非常に重要なテーマである。

これまでに報告されているシアル酸の分析法には、チオバルビツール酸やレゾルシノールを用いた化学的比色法[48, 49]や酵素による検出法[50]、シナピン酸やフェルラ酸などを用いた MALDI-TOF-MS[51-54]などがあるが、いずれの方法にも感度や精度、簡便性において利点と欠点があり一般的な定量法とは言えない。1,2-ジアミノ-4,5-メチレンジオキシベンゼン二塩酸塩(DMB)を用いた



プレラベル法[29]は微量分析が可能な方法として知られる一方で、誘導体化や試薬の除去といった煩雑な操作を行う必要がある。また最大の問題点としてDMB 試薬は分解されやすく、標識後のシアル酸は数週間で蛍光性を失ってしまう。本章では 2-CA を用いた蛍光ポストカラム法によるシアル酸分析の開発を試みた。ポストカラム法は試料を注入するだけで分離・誘導体化・検出を自動的に行うことができるため、プレラベル法で問題であった誘導体化や試薬の除去の操作の必要性がなく、DMB による標識で問題とされる試料の保存が可能となる。また 2-CA は糖に対する選択性が高く(Fig. 1-2)、夾雑物との反応性が低いことから生体試料の分析に適切であると考えられた[55]。

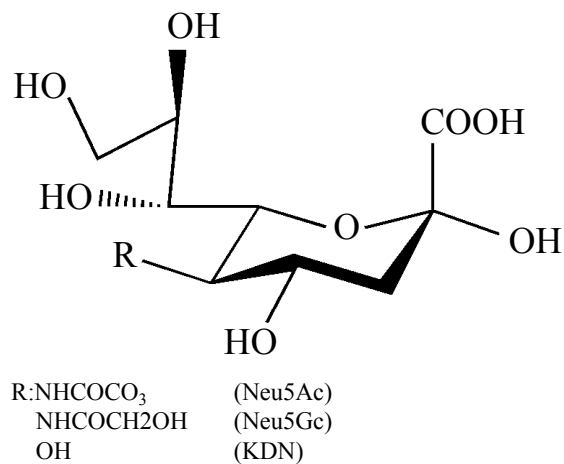


Fig. 1-1. Structure of neuraminic acids.

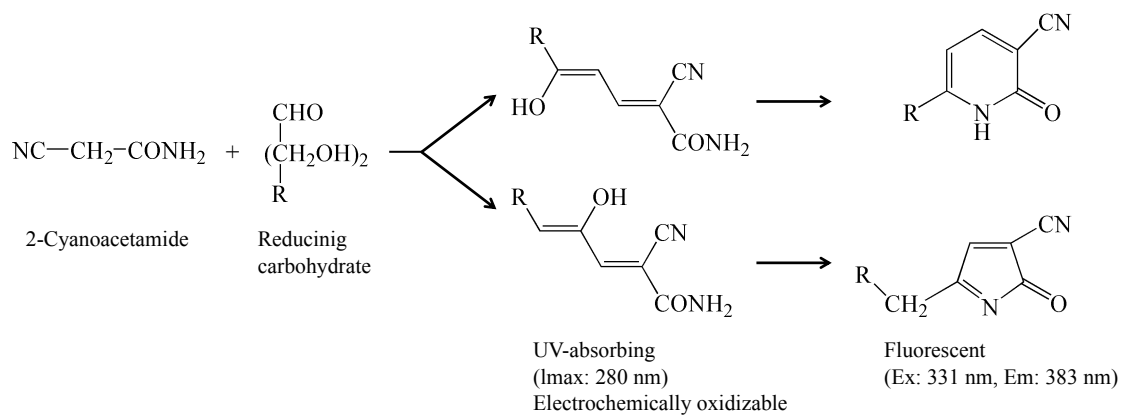


Fig. 1-2. Reaction of reducing carbohydrate with 2-CA.

## 第1節 標準品を用いたシアル酸分析法の確立

カラムにアミド系カラムである InertSustain Amide (2.1 mm I.D. x 250 mm)を用いて様々な分離条件を検討した。アセトニトリル - H<sub>2</sub>O - 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0) - 3.0 M 塩化アンモニウム (100:24:1:1)を溶離液として Neu5Ac と Neu5Gc 分離後、強塩基性条件下にて 2-CA により蛍光標識を行うことで高感度な分析を可能とした(Fig. 1-3)。検出限界はそれぞれ Neu5Ac 1.5 pmol、Neu5Gc 1.7 pmol (S/N=3)と良好であり、注入量 10 pmol- 5 nmol の範囲で良好な直線性を得ることができた。また 2-CA による誘導体化率を最適化するために NaOH 濃度の検討を行った結果を Fig.1-4 に示した。その結果、NaOH の終濃度が 250 mM の時、誘導体化率が最も高いことが分かった。

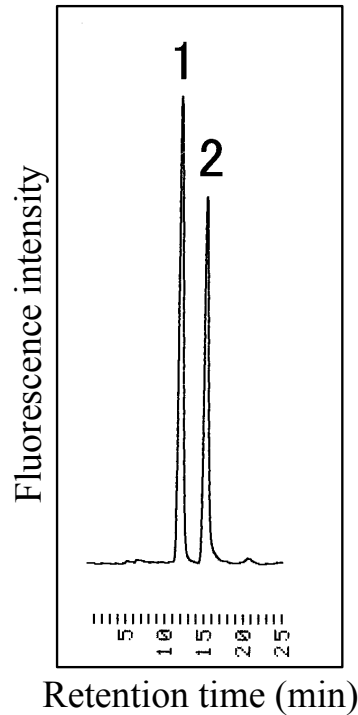


Fig. 1-3. Typical chromatogram of standard sialic acids. Injection volume: 5  $\mu$ L (200 ng of each sugar). Peaks: 1, Neu5Ac; 2, Neu5Gc. Column, InertSustain Amide (2.1 mm I.D. x 250 mm) at 60  $^{\circ}$ C; eluent, acetonitrile - H<sub>2</sub>O - 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 2.0) - 3.0 M ammonium chloride (100:24:1:1) [flow rate, 0.40 mL/min.]; reagent A, H<sub>2</sub>O; reagent B, 1%(w/v) 2-CA; reagent C, 1.0 M sodium hydroxide [flow rate, 0.40 mL/min]; reaction temperature, 120  $^{\circ}$ C; excitation, 331 nm; emission, 383 nm. Other conditions are described in Materials and Methods. Figure taken from [61].

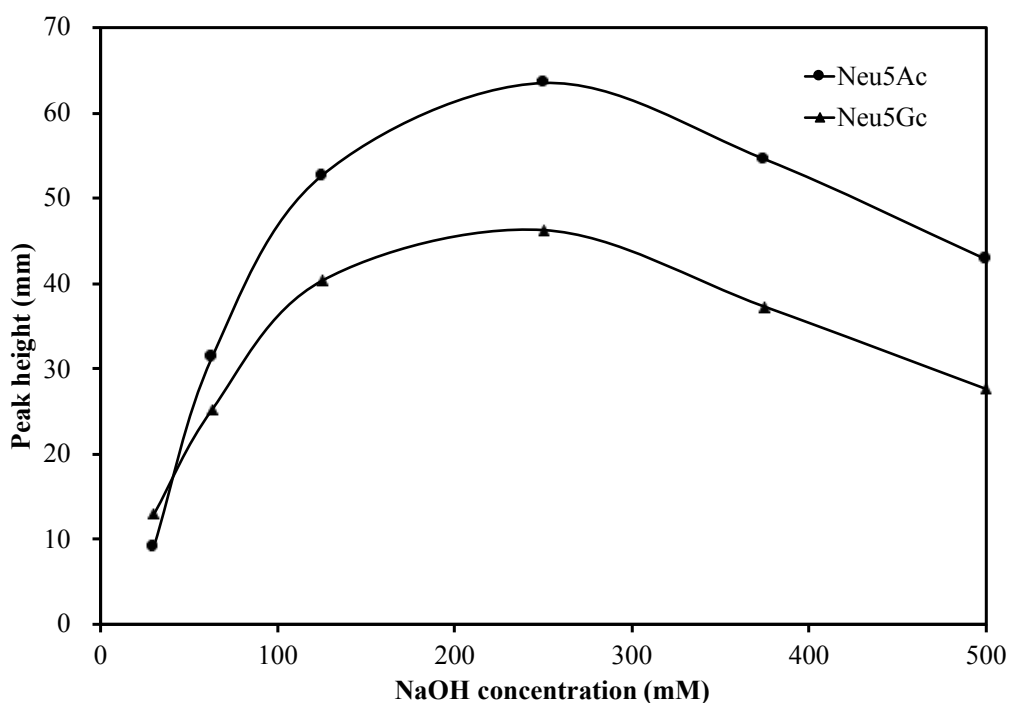


Fig. 1-4. Effect of the sodium hydroxide concentration in the reagent mixture. Injection volume: 5  $\mu$ L (200 ng of each sugar). Figure taken from [61].

## 第2節 生体試料への応用

生体試料からシアル酸を遊離させるための手法としては、従来から硫酸や塩酸、トリフルオロ酢酸による酸性条件下による加水分解を行う方法[29, 30, 56-58]、シアル酸分解酵素を用いる方法[59, 60]が用いられている。本章では揮発性の強酸である塩酸を用い、生体試料からシアル酸を遊離させた(Fig. 1-5)。シアル酸の回収率を向上させるために加水分解反応時間の検討を行ったところ、反応時間を2時間とした時が最も回収率が高かった(Fig.1-6)。この条件下で、ウシ胎児血清(FBS)、ウシ新生仔血清、成ウシ血清の3種類の週齢の異なるウシ血清を加水分解後、生じたシアル酸の分析を行った(Fig. 1-7 および Table 1-1)。ウシ血清では週齢を重ねるごとにシアル酸含有量が減り、Neu5Gcの割合が高まるという結果を得た。この結果は Sherblom らの報告と一致した[30]。

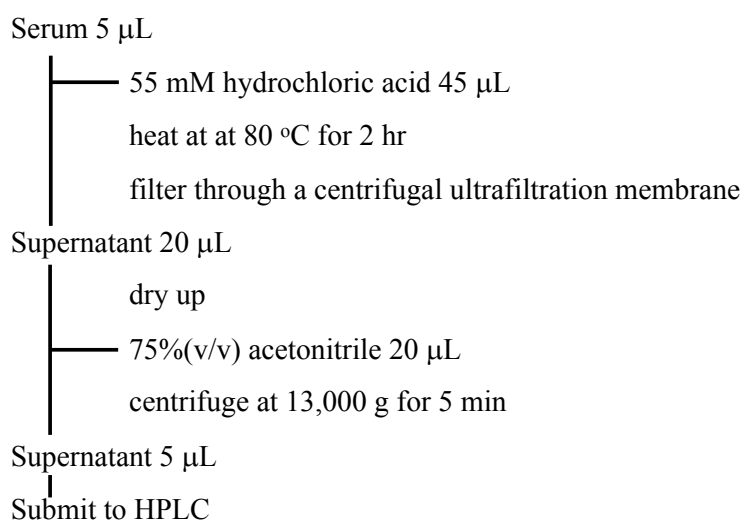


Fig. 1-5. Procedure for hydrolysis of serum.

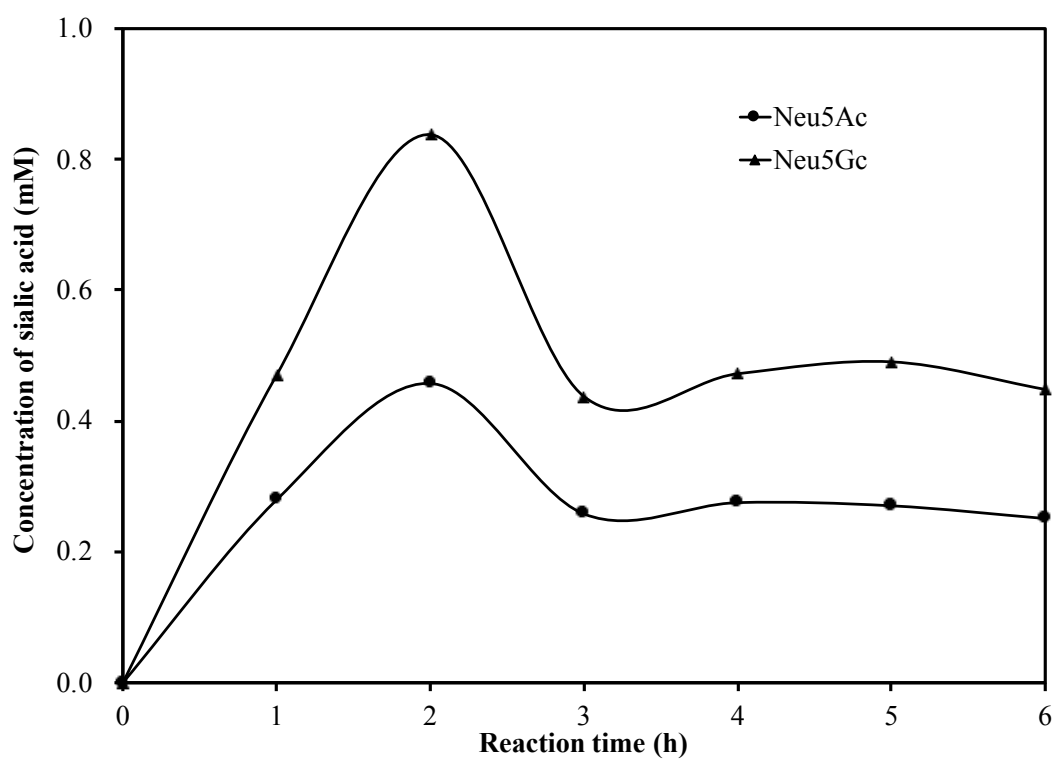


Fig. 1-6. Effect of hydrolysis time on the amount of Neu5Ac and Neu5Gc from adult bovine serum. Portions (5  $\mu$ L) of the serum samples were treated and analyzed by the post-column HPLC. Figure taken from [61].

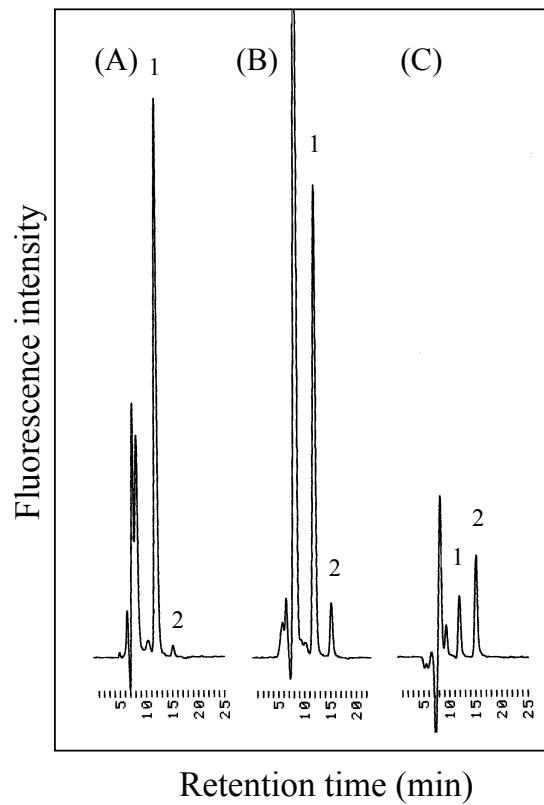


Fig. 1-7. Aged-related changes in bovine serum sialic acids. (A), FBS; (B), newborn calf serum; (C), adult bovine serum. Peaks: 1, Neu5Ac; 2, Neu5Gc. Figure taken from [61].

Table 1-1. Concentration of sialic acids in bovine sera. Table taken from [61].

Serum	Neu5Ac ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Neu5Gc ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Neu5Gc/Neu5Ac
Fetal	$4.93 \pm 0.38^a$	$0.13 \pm 0.01$	0.03
Newborn	$3.32 \pm 0.44$	$0.47 \pm 0.08$	0.14
Adult	$0.58 \pm 0.04$	$1.06 \pm 0.09$	1.83

a. Mean $\pm$ SD (n=3)



### 第3節 考察

本章で確立したポストカラム HPLC 分析法を用いて、生体試料中のシアル酸を高感度かつ選択的に検出することができた。この分析法を用い、ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来ポドカリキシンのシアル酸の組成分析・定量分析を行い第 6 章に示した。

### 第4節 実験の部

#### 実験材料

Neu5Ac、Neu5Gc は東京化成工業より購入した。2-CA、アセトニトリル、各種血清はシグマアルドリッチより HPLC grade を購入した。リン酸、リン酸二水素ナトリウム、塩化アンモニウム、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬より特級試薬を購入した。限外ろ過膜は Pall Life Science より NANOSEP 3K OMEGA(分画分子量 3K、容量 500  $\mu$ L)を購入した。InertSustain Amide Column (2.1 mm i.d. x 250 mm)は GL サイエンスより購入した。

#### HPLC 装置

溶離液送液ポンプ(PU-4180)、反応液送液ポンプ(PU-2089i Plus)、蛍光検出器(FP-2025 Plus)は日本分光製、データ処理装置(D-2500)は日立製作所製、Sample loop (7725i, Sample loop 20  $\mu$ L)は Reodyne 社製、カラムヒーター(Thermo Minder SDmini)、ドライ反応槽(DTU-1C)は Taitec 社製を用いた。

## HPLC 分析

シアル酸分析は蛍光ポストカラム検出法を用いた HILIC により行った[61]。試料の分離は InertSustain Amide Column (2.1 mm i.d. x 250 mm)を用い、流速 0.40 mL/min、カラム温度 60 °C、溶媒はアセトニトリル - H<sub>2</sub>O - 0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液(pH 2.0) - 3.0 M 塩化アンモニウム (100:24:1:1)で溶出を行った。ポストカラム試薬は流速 0.40 mL/min で A, H<sub>2</sub>O; B, 1%(w/v) 2-CA; C, 1.0 M NaOH を用い、A, 25%; B, 50%; C, 25%の一定濃度で送液した。混合液は反応コイル(0.5 mm i.d. x 7 m)を通過中にドライ反応槽で 120 °C で加熱反応し、冷却コイル(0.25 mm i.d. x 3 m)で冷却した。反応液は励起波長 331 nm、蛍光波長 383 nm で蛍光検出した。サンプルは 75%(v/v)アセトニトリルに溶解し、5 µL を HPLC にて分析した。

## 血清サンプルの酸加水分解

胎児牛、新生仔牛、成牛の血清各 5 µL を 55 mM 塩酸 45 µL 中で 80 °C、2 時間加水分解した。加水分解したサンプルを限外ろ過膜にて精製し、ろ液 20 µL を凍結乾燥後、75%(v/v)アセトニトリル 20 µL に溶解し、遠心(13,000 g、5 min)後上清 5 µL を HPLC にて分析した。

## 第2章 ケラタン硫酸認識抗体(R-10G)が認識する糖鎖構造の解析

ヒト iPS/ES 細胞は眼科[62]や循環器領域[63-65]をはじめとした再生医療や医薬品開発において重要な役割を果たすと期待されている細胞である。しかしながらヒト iPS 細胞の実用化には依然として問題がある。再生医療分野で最も問題視されているのがヒト iPS 細胞のがん化のリスクである。従来からヒト iPS/ES 細胞研究では未分化幹細胞マーカー抗体として SSEA-3[66-68]、SSEA-4[68]、TRA-1-60[69]、TRA-1-81[69]、GCMT2[70, 71]、GCTM343[70]などが頻用されているが、これらの多くは EC 細胞を免疫原とし作製されており、ヒト iPS 細胞だけでなく EC 細胞も認識するため、現状ではヒト iPS 細胞とがん細胞の判別は非常に困難である。その問題を解決すべく、申請者の所属する研究室と本学総合科学技術研究機構糖鎖工学研究室との共同研究により、新たに R-10G[7, 12]、R-17F[11, 18]の2種のマーカー抗体が開発され、世界的に注目されている。これらの抗体は従来の未分化幹細胞マーカーとは異なり、ヒト iPS 細胞(Tic 株)を免疫原とし、未分化状態のヒト iPS/ES 細胞を認識するが EC 細胞は認識しないという画期的な未分化幹細胞マーカー抗体である。この内、R-10G 抗体は低硫酸ケラタン硫酸を認識することが明らかにされ[7]、その詳細なエピソード構造や、同様にケラタン硫酸認識抗体と報告されている TRA-1-60、TRA-1-81 抗体などとの糖鎖認識の異同についても不明である。そこで本研究では化学的に合成した7種類のケラタン硫酸様オリゴ糖をプローブとし R-10G 抗体の結合特異性を詳細に解析した。

## 第1節 ケラタン硫酸の構造

ケラタン硫酸は細胞外マトリックスに存在する GAG の一種である。他の GAG とは異なり、ケラタン硫酸はウロン酸を含まず、Gal と GlcNAc の二糖繰り返し構造を基本としている(Fig.2-1)[72]。この基本構造はポリ-N-アセチルラクトサミンと同様であるが、糖鎖中の GlcNAc はほとんど全ての場合 6 位が硫酸化され、Gal は 6-O-硫酸化を受ける場合と受けない場合がある[72-75]。発現している組織によりケラタン硫酸の硫酸化の程度は異なり、構成二糖あたり約 0.4~1.5 程度であることが報告されている[76]。ケラタン硫酸は角膜で最初に発見され、ヒトでは椎間板髄核から初めて精製された物質である[72, 77]。哺乳類組織中では角膜、髄核だけでなく脳、軟骨など様々な組織中に存在が確認されており[78-84]、ヒト iPS/ES 細胞でもケラタン硫酸様糖鎖の存在が確認されている。

ケラタン硫酸認識抗体として R-10G[7]、TRA-1-60[14]、TRA-1-81[14]、5D4[85] 抗体が報告されているが、R-10G 抗体は硫酸化の程度が低いケラタン硫酸を認識し、5D4 抗体は硫酸化の程度が高いケラタン硫酸を認識することが知られている [7, 86]。Natunen らは TRA-1-60/81 抗体の最小エピトープ構造は O-結合型糖鎖に含まれる Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1 であると報告している [87]。しかしながら、これらの抗体が認識するケラタン硫酸の正確な構造は十分に解析されていない。そこで本章では合成オリゴ糖を用いてケラタン硫酸認識抗体の認識構造を解析した。

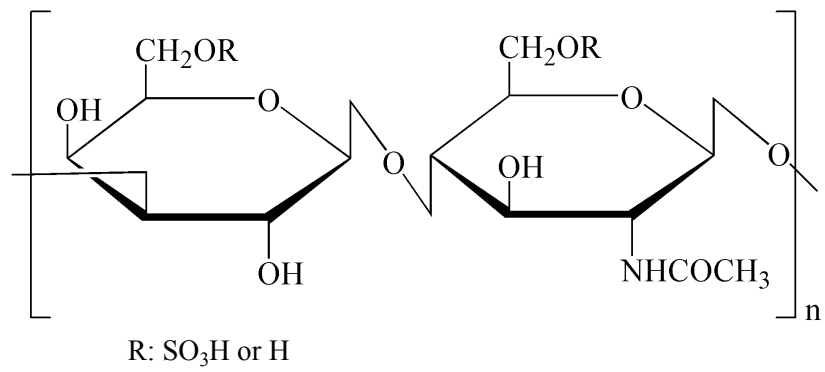


Fig. 2-1. Structure of keratan sulfate.

## 第2節 合成オリゴ糖を用いた ELISA による R-10G 抗体認識構造の解析

Table 2-1 に示した 7 種類の合成オリゴ糖と R-10G、TRA-1-60、TRA-1-81 および 5D4 抗体を用いて解析をした。Fig. 2-2 のようにビオチン化した合成オリゴ糖を、アビジンプレートにそれぞれ固定化し、各種の抗体を 0~200 ng/well 添加することで、抗体の結合特異性を調べた(Fig. 2-3)。Fig. 2-3a より R-10G 抗体は KS2 に最も強い反応性を示し、KS5 には弱い反応性を示した。Fig. 2-3c, d より TRA-1-60/81 抗体は KS4 に最も強い反応性を示し、KS5 に弱い反応性を示した。Fig. 2-3b より 5D4 抗体は KS3 にのみ反応性を示した。

これらの解析から R-10G 抗体は KS2(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1) というケラタン硫酸の 4 糖構造を最小エピトープ構造とすることが明らかとなった。また TRA-1-60/81 抗体の最小エピトープ構造は KS4(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1)、5D4 抗体は KS3(Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1) を最小エピトープ構造とすることが明らかとなった。

Table 2-1. Synthetic oligosaccharides.  
Table taken from [12].

Code	Trivial name	Structure of oligosaccharide
KS1	Dimeric <i>N</i> -acetylglucosamine (type 2 - type 2, 0S)	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1
KS2	Keratan sulfate (type 2 - type 2, 2S)	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1
KS3	Highly sulfated keratan sulfate (type 2 - type 2, 4S)	Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3 Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1
KS4	Dimeric <i>N</i> -acetylglucosamine (type 1 - type 2, 0S)	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1
KS5	Keratan sulfate (type 1 - type 2, 2S)	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1
KS6	Dimeric <i>N</i> -acetylglucosamine (type 1 - type 1, 0S)	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1
KS7	Keratan sulfate (type 1 - type 1, 2S)	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3 Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1

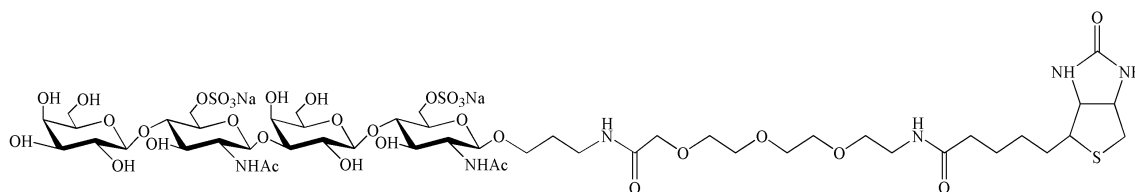


Fig. 2-2. The whole structure of the biotinylated KS2 oligosaccharide probe. Figure taken from [12].

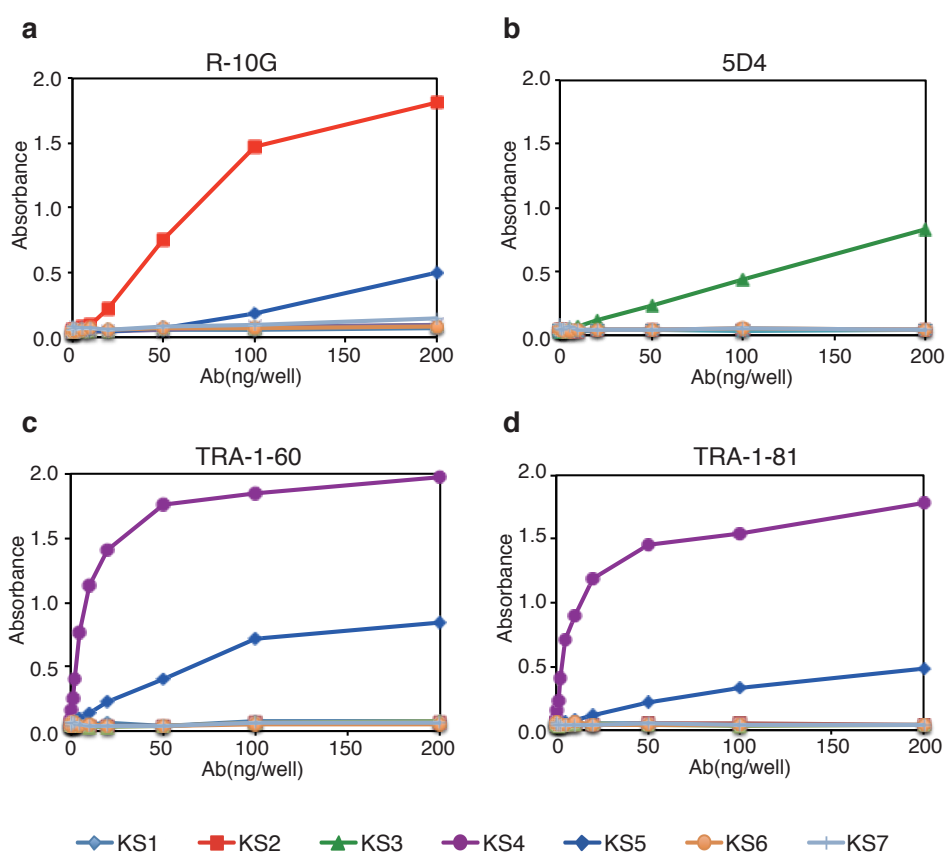


Fig. 2-3. The binding specificity of antibodies studied using synthetic oligosaccharides. To avidin-coated wells, biotinylated KSs (20 pmol/100  $\mu$ L/well) were added, followed by incubation with antibodies (0~200 ng), and the amounts of the primary antibodies bound to the KSs were determined by incubation with HRP-labeled second antibodies as described in Materials and Methods. a, R-10G; b, 5D4; c, TRA-1-60; d, TRA-1-81. Data taken from [12].

### 第3節 考察

本章ではケラタン硫酸認識抗体である R-10G、TRA-1-60、TRA-1-81、5D4 抗体について、合成オリゴ糖を用いた ELISA により結合特異性を解析した。

本研究により R-10G 抗体は Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 というケラタン硫酸の基本 4 糖構造を最小エピトープとしていることが示された。一方でポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造である Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1 を認識しなかったことから GlcNAc における C6 の硫酸化がエピトープとして必須の構造であることが示された。また高硫酸ケラタン硫酸構造である Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 を認識しなかったことから、Gal における C6 の硫酸基は R-10G 抗体による認識を阻害していることが示唆された。

TRA-1-60/81 抗体はケラタン硫酸やポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造中に含まれる Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1 を基本骨格としたオリゴ糖は認識せず、Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1 を基本骨格としたオリゴ糖を認識することが明らかとなった。TRA-1-60/81 抗体はケラタン硫酸を認識するとされているが[84]、本研究により Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1 という珍しいポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造を最小エピトープとすることが明らかとなった。この結果は Natunen らの報告と一致した[87]。

5D4 抗体は Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 という硫酸化の程度が高いケラタン硫酸を認識することが示された。この結果は Mehmet



らの報告と一致した[86]。

## 第4節 実験の部

### 実験材料

KS1(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1), KS2(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1), KS3(Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1), KS4(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1), KS5(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1), KS6(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1), KS7(Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc(6S) $\beta$ 1)は東京化成工業より提供された。

R-10G 抗体は文献 7 に記載した方法に従い作製した。TRA-1-60 抗体および TRA-1-81 抗体は R&D Systems より購入した。5D4 抗体は生化学工業より購入した。HRP 標識二次抗体として使用した anti-mouse 抗体は Agilent Technology より購入した。

アビジンコートしたプレートは住友ベークライトより購入した。

### ELISA 分析

アビジンコートしたプレートに 1 well あたり 20 pmol のビオチン化された合成オリゴ糖 100  $\mu$ L を添加し反応後、種々の抗体を用いて反応させたのちに HRP 標識二次抗体を添加し、peroxidase color development kit T (住友ベークライト製)を用いて発光させ、Wallac 1420 ARVOsx multilabel counter (PerkinElmer 製)にて検出した[12]。

### 第3章 ヒト iPS 細胞(201B7 株)からの R-10G 抗原タンパク質の 精製

3章ではヒト iPS 細胞研究で標準的に広く利用されている 201B7 株細胞について R-10G 抗体アフィニティクロマトグラフィーにより R-10G 抗原タンパク質を精製し、その性質を解析した。

既存の未分化幹細胞マーカー抗体である TRA-1-60/81 抗体[13]、R-10G 抗体[7]、R-17F 抗体[12]、未分化幹細胞マーカー植物レクチン rBC2LCN[47, 88]はいずれもヒト iPS/ES 細胞膜の主要な膜貫通タンパク質であるポドカリキシン分子上に結合する糖鎖を認識することも知られている。またポドカリキシンはアミノ酸配列より算出される分子サイズは 55 kDa であるが、ヒト腎糸球体足細胞上では多数のムチン型糖鎖を含み 140 kDa のシアロタンパク質として存在する[15]。一方で、ヒト iPS 細胞で発現するポドカリキシンの分子サイズは 250 kDa 以上であることから[7, 12, 13, 47]、ヒト iPS 細胞上で発現するポドカリキシンはより高度な糖鎖修飾を受けており、ポドカリキシン上の糖鎖解析を行うことでヒト iPS 細胞のがん化の解明や、未分化状態維持への糖鎖の寄与の解明の手がかりが得られることが期待できる。

これらの背景のもと、本研究では現在ヒト iPS 細胞研究で標準的に使用されている 201B7 株細胞を用い、R-10G 抗原糖鎖が結合するポドカリキシンの単離・精製及び糖鎖解析を行った。

## 第1節 ヒト iPS 細胞抽出液を用いた解析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)を MEF (mouse embryonic fibroblast)の存在下、無血清培地で培養した。数日後、Fig. 3-1 に示したような未分化状態の細胞のコロニーが得られたので、これを回収した。-80 °C に凍結保存した細胞を氷水中で溶解後、RIPA buffer にて可溶化し、不純物を遠心除去したのち、上清を SDS-PAGE にかけた。GelCode Blue 染色および Western blot を行い(Fig.3-2)、タンパク質プロファイルおよび抗体との反応性を調べた。Western blot では R-10G 抗体、R-17F 抗体、TRA-1-60 抗体、抗ポドカリキシン抗体の 4 種類の抗体を用いた。なお、すでに報告されている Tic 株細胞についても同様の実験を行い、201B7 株細胞の結果と比較して Fig. 3-3 に示した。CBB 染色によるタンパク質検出では Tic 株細胞、201B7 株細胞ともに 25 kDa 近辺より 250 kDa 以上まで広範囲にバンドを示した(Lane 1, 2)。また R-10G 抗体が認識するバンドは 250 kDa 近傍およびそれ以上の高分子領域に見られた (Lane 3, 4)。これらの結果は Tic 株細胞を用いた Kawabe らの報告[7]と同様であった。また R-17F 抗体、TRA-1-60 抗体、抗ポドカリキシン抗体も同様に 250 kDa 近傍にバンドを示した(Lane 5-7)。これらの結果は、201B7 株細胞は Tic 株細胞と同様にポドカリキシンを発現しており、そのポドカリキシン上には R-10G エピトープ、R-17F エピトープ、TRA-1-60 エピトープが結合していることを示唆していた。

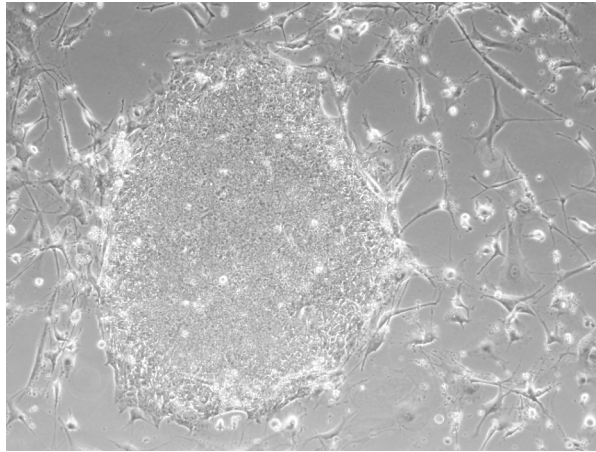


Fig. 3-1. Undifferentiated human iPS (201B7) colonies after 5 days of passaging on feeder cells.

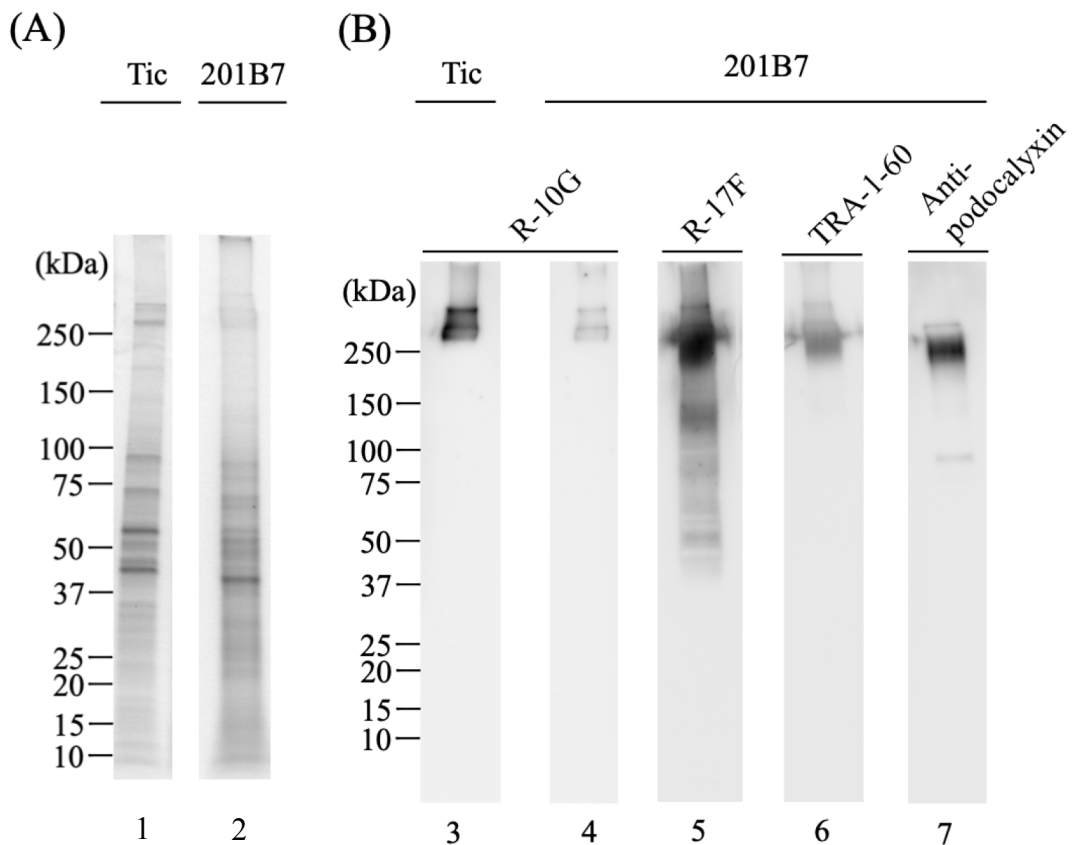


Fig. 3-2. SDS-PAGE and Western blot of cell lysates with various antibodies. Tic and 201B7 cell lysates in the complete RIPA buffer (6  $\mu$ g protein) were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under reducing conditions. (A) GelCode blue staining of SDS-PAGE of the Tic and 201B7 cell lysates. (B) Western blot with 4 antibodies (R-10G, R-17F, TRA-1-60 and anti-podocalyxin antibody).

## 第2節 R-10G アフィニティクロマトグラフィーによる精製

次にヒト iPS 細胞(201B7 株)RIPA Buffer 抽出液より、R-10G 抗原の精製を試みた。方法はすでに報告されている Tic 株細胞より R-10G 抗原を精製した方法に従った[7]。すなわち、可溶化したヒト iPS 細胞(201B7 株)を R-10G 抗体固定化 Sepharose 4B カラムにかけ、カラムに結合したタンパク質を塩基性緩衝液 (pH 11.5)により溶出した。溶出液を SDS-PAGE に続いて R-10G 抗体、R-17F 抗体、抗ポドカリキシン抗体を用いた Western blot を行い解析した(Fig. 3-3)。R-10G 抗原タンパク質は非結合画分には溶出せず、塩基性緩衝液(pH 11.5)を用いた溶出画分に溶出された(Fig. 3-3 A)。以下、可溶化した細胞を R-10G アフィニティクロマトグラフィーにて一度精製することで得られた画分を精製画分とした。R-10G 抗原は全て精製画分に回収され、250 kDa 近傍に 1 本のブロードなバンドを示した。一方 R-17F 抗原およびポドカリキシンは非結合画分、精製画分の両方に存在していた(Fig. 3-3 B, C)。非結合画分に検出されたポドカリキシンは約 250 kDa のバンドの他に 80 kDa あたりに弱いバンドが検出された。同様に R-17F 抗体により非結合画分に検出されたバンドは 250 kDa 以上のバンドが最も強度が強かったが 37 kDa から 250 kDa にわたりスメアなバンドが観察された。R-17F エピトープはヒト iPS 細胞の糖脂質およびポドカリキシン上に存在することが知られており[18]、250 kDa 近傍のバンドはポドカリキシンであると考えられる。これらの結果はヒト iPS 細胞(201B7 株)由来のポドカリキシンは高度な糖鎖修飾を受けており、その修飾は多様であることを示している。

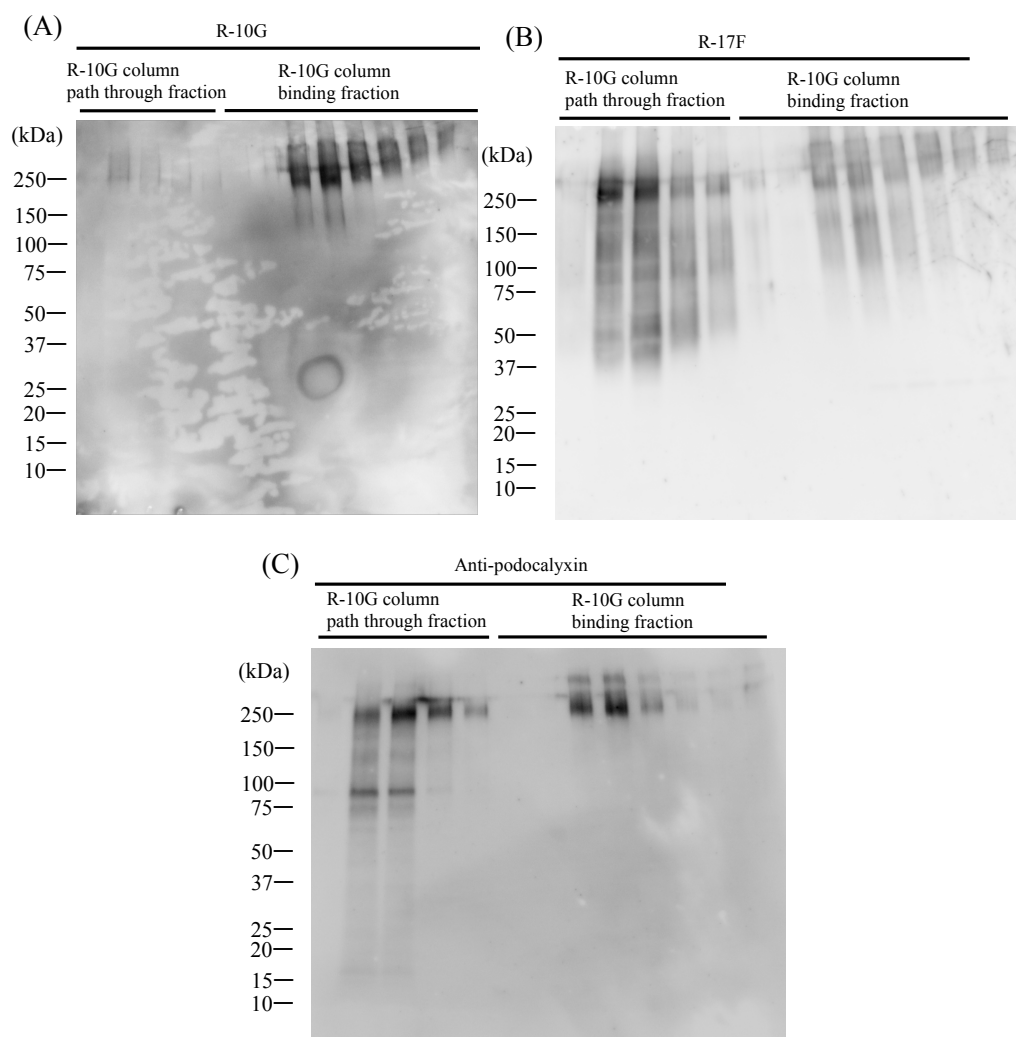


Fig. 3-3. Western blot of R-10G column path through fractions (7.5  $\mu$ L) and binding fractions (2.6  $\mu$ L) with various antibodies. These samples were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under reducing conditions, followed by Western blot with R-10G (A), R-17F (B) and anti-podocalyxin antibody (C).

### 第3節 Tic 株細胞由来 R-10G 精製画分との比較

本節では Tic 株細胞由来 R-10G 抗原精製画分と 201B7 株細胞由来 R-10G 抗原精製画分について、SDS-PAGE に続いて R-10G 抗体、抗ポドカリキシン抗体を用いた Western blot を行い両者の性質を比較した(Fig. 3-4)。抗ポドカリキシン抗体を用いてポドカリキシンについて比較を行ったところ(Fig. 3-4 A)、lane 2 の Tic 株細胞抽出液 2.0  $\mu\text{g}$  タンパク質由来の R-10G 抗原タンパク質と lane 4 の 201B7 株細胞抽出液 2.0  $\mu\text{g}$  タンパク質由来の R-10G 抗原タンパク質が示したバンド強度がほぼ同程度であった。この結果から Tic 株細胞、201B7 株細胞では、R-10G エピトープが結合するポドカリキシンの分子数がほぼ同程度であることが示された。一方で R-10G 抗体を用いて R-10G エピトープ糖鎖について比較を行ったところ(Fig. 3-4 B)、lane 6 の Tic 株細胞抽出液 0.20  $\mu\text{g}$  タンパク質由来の R-10G 抗原タンパク質と lane 7 の 201B7 株細胞抽出液 2.0  $\mu\text{g}$  タンパク質由来の R-10G 抗原タンパク質が示したバンド強度がほぼ同程度であった。この結果は Tic 株細胞の R-10G エピトープの量は 201B7 株細胞の R-10G エピトープの量の約 10 倍であることを示唆している。以上の結果より、R-10G エピトープが結合するポドカリキシンの発現量は Tic 株細胞と 201B7 株細胞間で同程度であるが、そのポドカリキシン 1 分子あたりに結合する R-10G エピトープ数は Tic 株細胞の約 1/10 倍であると推定された。

次に両株細胞より得られた精製画分の純度を調べるために銀染色(タンパク質染色)を行った。両株細胞で共に 250 kDa 付近に強いバンドが見られたものの、低分子領域に多数の夾雑タンパク質が確認された(Fig. 3-4 C)。これらの結



果は、R-10G アフィニティークロマトグラフィーにより抗原タンパク質は高度に精製されたが、精製の度合いは十分とは言えず、更なる精製が必要であることを示していた。

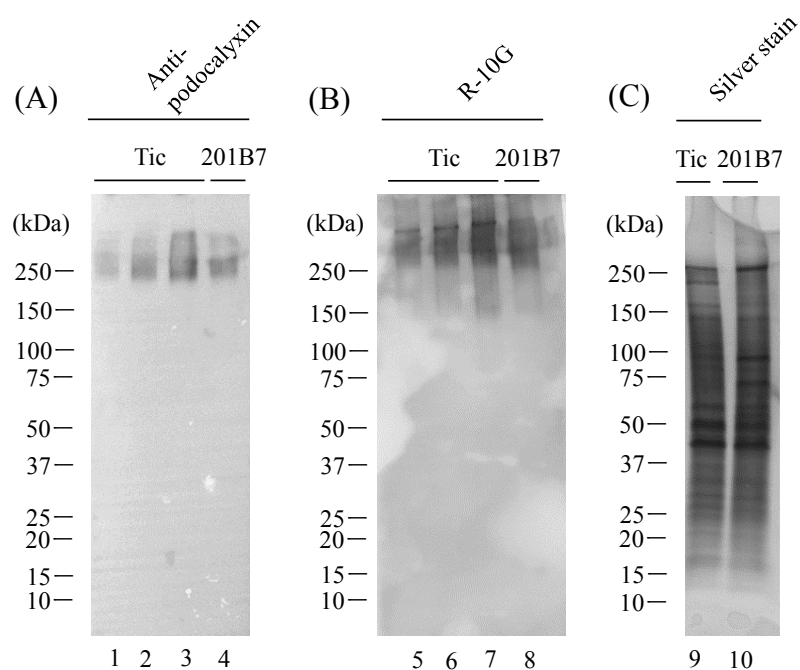


Fig. 3-4. Western blot and silver stain of R-10G antigen proteins isolated from of Tic and 201B7 cells.

The isolated R-10G antigens of Tic and 201B7 cells were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under reducing conditions. (A, B) Western blot of the isolated R-10G antigen from Tic cells (1.0  $\mu$ L (lane 1, 5), 2.0  $\mu$ L (lane 2, 6) and 4.0  $\mu$ L (lane 3, 7) of the R-10G affinity column eluate obtained from 1.2 mg cells lysate protein) and 201B7 cells (2.6  $\mu$ L (lane 4, 8) of the R-10G affinity column eluate obtained from 0.9 mg cells lysate protein) with anti-podocalyxin antibody (A) and R-10G (B). (C) Silver stain of SDS-PAGE of the isolated R-10G binding proteins of Tic cells (12  $\mu$ L (lane 9) of the R-10G affinity column eluate obtained from 1.2 mg cells lysate protein) and 201B7 cells (12  $\mu$ L (lane 10) of the R-10G affinity column eluate obtained from 0.9 mg cells lysate protein).

#### 第4節 考察

本章ではR-10GアフィニティークロマトグラフィーによりヒトiPS細胞(201B7株)よりR-10G抗原を精製した。R-10G精製抗原はTic株細胞の場合と同様にR-10G抗体と結合するだけでなく、R-17F抗体および抗ポドカリキシン抗体とも結合した。このことから201B7株細胞にR-10Gエピトープ、R-17Fエピトープを持つポドカリキシンが存在することが示された。細胞免疫染色などにより201B7株細胞がR-10Gエピトープを持つポドカリキシンを発現することが示唆されていたが[7, 18]、実際にR-10Gアフィニティークロマトグラフィーにて精製を行った研究は本研究が初めてである。

ヒトiPS細胞(201B7株)に発現しているポドカリキシンは約250 kDa以上の巨大分子であり、R-10Gエピトープ、R-17Fエピトープも同様に250 kDa近辺に存在する(Fig. 3-3)。一方、全てのポドカリキシンにR-10Gエピトープを含むわけではなく、一部のポドカリキシンはR-17Fエピトープのみを含むことも明らかとなった(Fig. 3-3)。すなわちポドカリキシンは非常に高度な糖鎖修飾を受けている一方で、その糖鎖構造は多様であることが示された。

R-10Gアフィニティークロマトグラフィーを一度行って得られた精製抗原画分について比較すると、Tic株細胞抽出液は201B7株細胞と比較してポドカリキシン1分子あたりに含まれるR-10Gエピトープはほぼ数分の一と少なくなることから、株種による修飾糖鎖の不均一性、多様性が示された。R-10G抗体は硫酸化の程度が低いケラタン硫酸様糖鎖をエピトープとすることが知られ

ており[12]、201B7株細胞に含まれるR-10Gエピトープの構造に興味を持たれた。またR-10Gアフィニティクロマトグラフィーを一度行って得られた精製画分の低分子領域に多数の夾雑タンパク質が確認されたため、更なる精製が必要だと考えられた。

## 第5節 実験の部

### 細胞

MEF はマイトマイシン C 処理が施されたマウス胎児線維芽細胞を Millipore より購入した。ヒト iPS 細胞は京都大学 iPS 細胞研究所山中伸弥博士により樹立された 201B7 株細胞 (HPS0063, CiRA, 京都大学)および国立成育医療センター梅澤明弘博士により樹立された Tic 株細胞 (JCRB1331, JCRB 細胞バンク)を用いた。

### 細胞培養

10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High glucose 培地にて 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下で 1 日間培養した MEF 上にヒト iPS 細胞(201B7 株もしくは Tic 株)を播種し iPS 細胞培養培地にて 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下で培養した。iPS 細胞培養培地は KnockOut DMEM/F12 (Thermo Fisher 製) 400 mL、MEM nonessential amino acid solution (Thermo Fisher 製) 4.0 mL、L-グルタミン (Thermo Fisher 製) 5.0 mL、KnockOut 血清代用品 (Thermo Fisher 製) 100 mL、55 mM 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク製) 0.925 mL を混和させ、培地 1 mL あたり basic-FGF (Sigma-Aldrich 製)を 10 ng 添加し作製した。回収の際には hESF9 培地[89]にて 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下で 1 日間培養を行った後に 0.1% EDTA/PBS を用い回収を行った。

## 実験材料

Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS)、Tris、塩酸、NaCl は富士フィルム和光純薬より特級試薬を購入した。RIPA buffer, protease inhibitor cocktail, PMSF, オルソバナジン酸ナトリウムは Santa Cruz Biotechnology より RIPA Lysis Buffer System を購入した。R-10G Sepharose 4B column は BrCN-activated Sepharose 4B (GE ヘルスケア)に R-10G 抗体をカップリングさせることで作製した。ジエチルアミン、Nonidet P-40 はナカライテスクより購入した。

R-10G 抗体、R-17F 抗体は各々文献 7 および文献 11 に記載した方法に従い作製した。TRA-1-60 抗体および anti-PODXL 抗体は R&D Systems より購入した。HRP 標識二次抗体として使用した anti-mouse Ig 抗体、anti-goat Ig 抗体はそれぞれ Agilent Technology、R&D Systems より購入した。

## 細胞抽出液の作製

培養したヒト iPS 細胞を回収し、D-PBS で洗浄した。次に complete RIPA buffer (PIRA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% デオキシコール酸, 0.1% SDS, 0.004% アジ化ナトリウム溶液)に protease inhibitor cocktail, 2 mM PMSF, 1 mM オルソバナジン酸ナトリウムが混和された溶液)を  $2 \times 10^6$  cells あたり 100  $\mu$ L 加え 30 分間、氷上で静置後、1 分間 sonication 後 20,000 rpm、10 min、4 °C で遠心分離し、上清を回収した。

### R-10G アフィニティークロマトグラフィーによる精製

上清を R-10G Sepharose 4B column にかけることで精製を行った。洗浄液として complete RIPA buffer を、溶出液として 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 M ジエチルアミン-塩酸緩衝液 (pH 11.5)を用いた。非結合画分は 400  $\mu$ L、精製画分は 200  $\mu$ L ずつ回収した。溶出画分の回収時には直ちに 1 M Tris-HCl (pH 6.8)を 40  $\mu$ L 加えることで溶液を中性にした。

### イムノブロット

4-15% gradient SDS-PAGE gel (Bio-Rad 製)を用い、還元条件下にて泳動後、PVDF 膜 (Merck Millipore 製)に転写した。種々の抗体を用いて反応させたのちに HRP 標識二次抗体を添加し、Immunostar Zeta (富士フィルム和光純薬製)を用いて化学発光させ、Las 4000 mini (GE ヘルスケア製)にて検出した。

## 第4章 ヒト iPS 細胞(201B7 株)より得られた最終精製 R-10G 抗原タンパク質(R-10G 結合性ポドカリキシン)の解析

前章に記したように、ヒト iPS 細胞(201B7 株)に含まれる R-10G 抗原の解析を行うために、ヒト iPS 細胞を可溶化し、R-10G 抗体カラムにて精製を行ったところ、精製画分にほとんど全ての R-10G 抗原を回収することができた。しかしながら、本精製画分にはなお、夾雑タンパク質が多数含まれていた。そこで R-10G 精製画分を再度 R-10G アフィニティクロマトグラフィーにかけ精製したところ、非常に高純度の R-10G 抗原タンパク質標品を得ることに成功した。本章では、この最終精製標品の精製とその性質について記す。なお、以後、本標品を“R-10G 結合性ポドカリキシン”と呼ぶ。

第1節 再アフィニティクロマトグラフィーによる R-10G 抗原タンパク質  
の最終精製

ヒト iPS 細胞(201B7 株)抽出液(5.4 mg タンパク質を含有)から精製した R-10G 精製画分を pH 7.4 に調製することで得た試料 1.8 mL を 0.40 mL の R-10G Sepharose 4B column にかき、カラムに結合したタンパク質を塩基性緩衝液(pH 11.5)により溶出した。SDS-PAGE に続いて R-10G 抗体を用いた Western blot で解析したところ、R-10G 結合タンパク質は抗体カラム非結合画分には溶出せず、塩基性緩衝液(pH 11.5)を用いた最終精製画分に全て回収された(Fig. 4-1)。



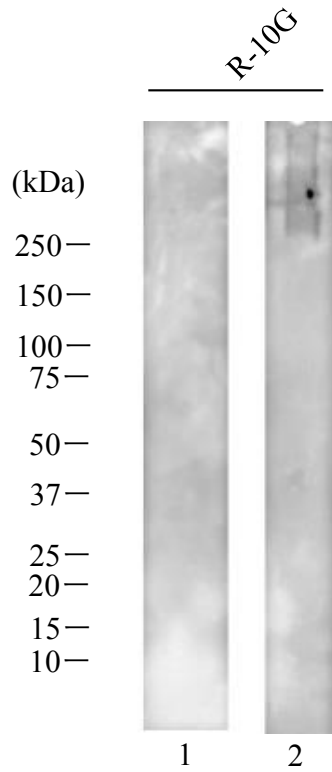


Fig. 4-1. Monitoring of the 2nd R-10G-affinity chromatography by Western blot with R-10G.

The R-10G column path through fraction (lane 1: 7.5  $\mu$ L/400  $\mu$ L (total volume of the path through fraction)) and the eluate fraction (lane 2: 0.54  $\mu$ L/240  $\mu$ L (total volume of the eluate fraction), 170 pg R-10G antigen protein) after 2nd R-10G-affinity chromatography were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under reducing conditions followed by Western blot with R-10G.

## 第2節 Western blot による糖鎖エピトープの解析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)に存在する R-10G 抗原タンパク質のほとんど全てが R-10G 最終精製画分に回収されていたので、次にその純度を調べるために SDS-PAGE 後のゲルについて銀染色を行った(Fig. 4-2)。第3章 Fig. 3-4(C)に示したように1度の R-10G カラムクロマトグラフィーで得た精製画分では 250 kDa 以外に多量の夾雑タンパク質のバンドがみられたのに対し、最終精製画分ではこれらの低分子夾雑タンパク質のほとんどが消失し、R-10G 抗原タンパク質は高純度に精製されたことが示された。次に R-10G 最終精製画分についてエピトープ解析を行うために、SDS-PAGE に続いて R-10G、R-17F、TRA-1-60、抗ポドカリキシン抗体を用いた Western blot を行った(Fig. 4-3)。各抗体は全て共通して 250 kDa 近傍の1本のバンドを示した。このことからヒト iPS 細胞(201B7 株)より得られた精製 R-10G 抗原タンパク質は R-10G エピトープを持つだけでなく、R-17F エピトープ、TRA-1-60 エピトープを持つポドカリキシンであると考えられた。

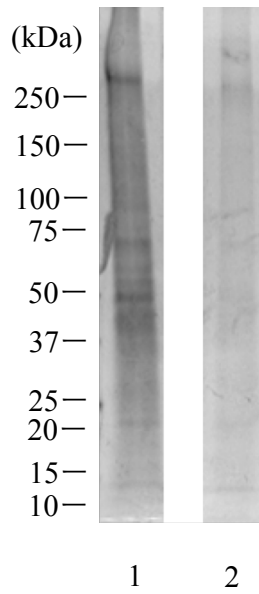


Fig. 4-2. Monitoring of the 2nd R-10G-affinity chromatography by SDS-PAGE. The R-10G column path through fraction (lane 1: 12  $\mu$ L/400  $\mu$ L) and binding fraction (lane 1: 12  $\mu$ L/240  $\mu$ L, 76 pg R-10G antigen protein) after 2nd R-10G-affinity chromatography were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under non-reducing conditions followed by silver stain.

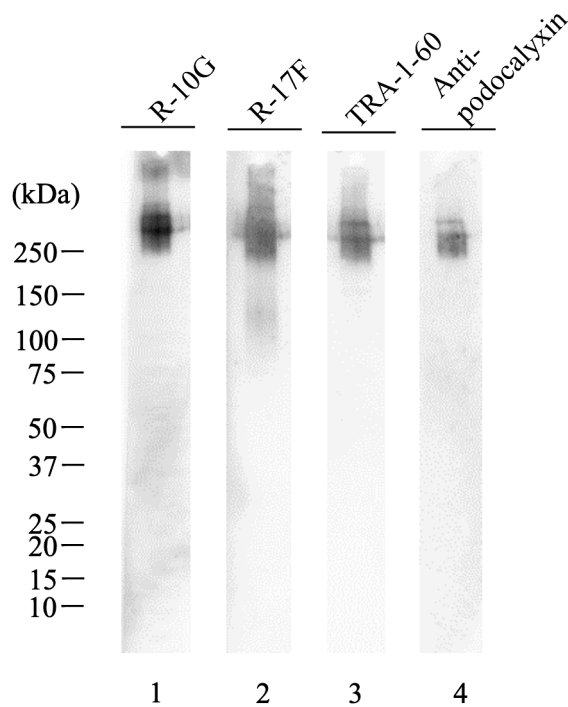


Fig. 4-3. Western blot of the re-isolated R-10G proteins (25 pg R-10G antigen protein) with R-10G, R-17F, TRA-1-60 and anti-podocalyxin antibody after SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under non-reducing conditions.

### 第3節 LC/MS/MSによるR-10G抗原タンパク質の同定

本節では、ヒト iPS 細胞(201B7 株)より得られた最終精製 R-10G 抗原について LC/MS/MS 解析を行いタンパク質の同定を試みた。得られた最終精製画分について SDS-PAGE 後に R-10G 抗体、R-17F 抗体による Western blot および SYPRO Ruby ゲル染色を行った(Fig. 4-4 A)。R-10G 抗体、R-17F 抗体、SYPRO Ruby 染色でそれぞれ 250 kDa 近傍にバンドが確認された。そこで R-10G 抗体、R-17F 抗体、SYPRO Ruby 染色にて共通のバンドとして検出されたバンド a、R-10G 抗体、R-17F 抗体にて共通に検出されたバンド b、R-17F 抗体で検出されたバンド c の 3 種類のバンドについて *in-gel* トリプシン消化を行い、生じたペプチドについて横浜市立大学川崎ナナ研究室にて LC/MS/MS 分析によりタンパク質の同定を行った。バンド a-c の 3 画分中で共通して検出されたタンパク質はポドカリキシンのみであった。さらに、ポドカリキシンはバンド a、b 中では最も一致率が高く、c 中では 2 番目に一致率が高いタンパク質であった。バンド a, b, c で検出されたポドカリキシンのアミノ酸配列を Fig. 4-4 B に示した。ポドカリキシンはアミノ酸配列より推定される分子サイズは 55 kDa であるが、腎細胞では 140 kDa として存在する[90]。これはポドカリキシンの高度に糖鎖修飾を受けているためであると考えられる。腎臓で発現するポドカリキシンは多数の O-結合型糖鎖の修飾を受け、その非還元末端にはシアル酸が結合しているシアロ糖タンパク質として存在する[15]。一方で、本研究で精製した R-10G 抗原タンパク質であるポドカリキシンは 250 kDa 以上の分子として挙動しており、いっそう糖鎖修飾を受けていると考えられた。また腎臓中で発現するポドカリ

キシンと分子量が大きく異なることから、ヒト iPS 細胞中では腎臓で見られない特徴的な糖鎖構造が存在すると考えられた。

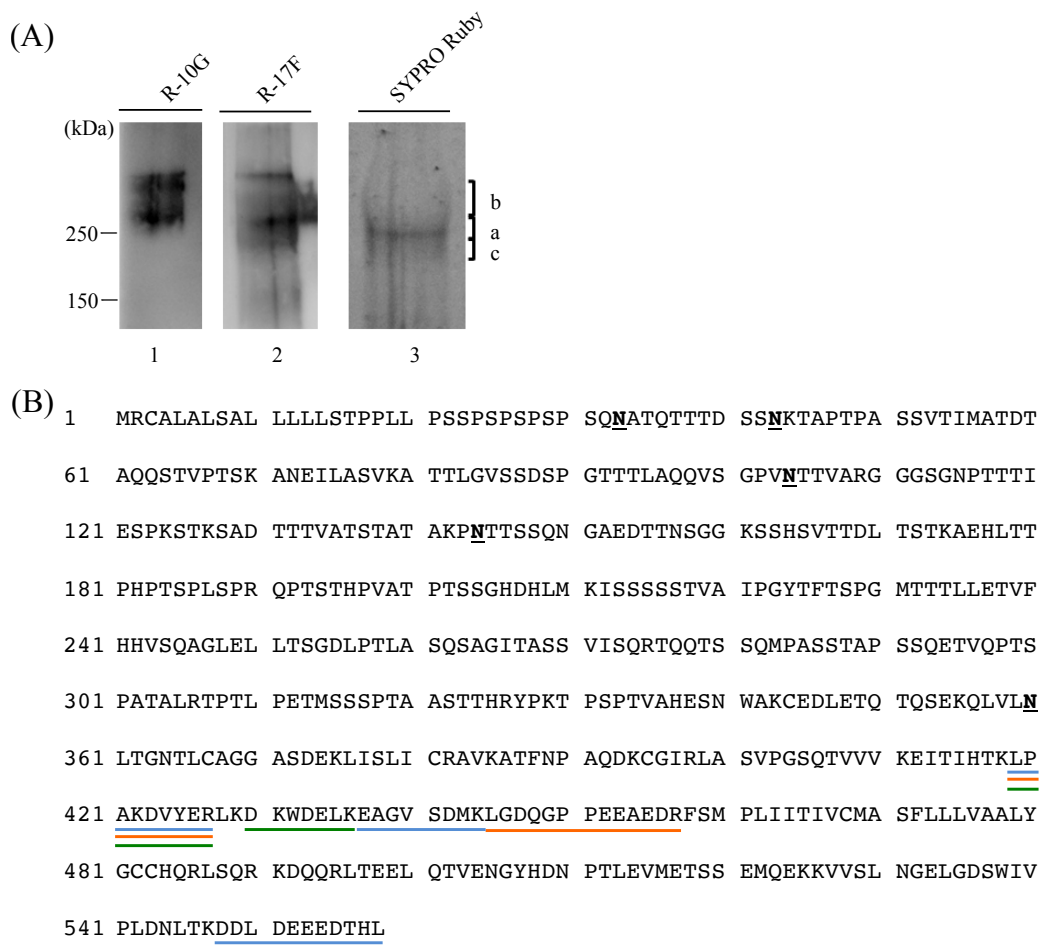


Fig. 4-4. Isolation and identification of the antigen protein carrying the R-10G epitope. (A) Western blot with R-10G and SYPRO Ruby stain of the re-isolated R-10G (lane 1-2: 1.7 ng R-10G antigen protein; lane 3: 5.0 ng R-10G antigen protein) were resolved by SDS-PAGE on a 4-15% gradient gel under reducing conditions. The protein bands a, b and c were excised from the gel. (B) Identification of the R-10G antigen protein by LC/MS/MS. The identified peptides in band a are shown in blue line within the complete human podocalyxin sequence. Those in band b are shown in orange line. Those in band c are shown in green line.

#### 第4節 Blue Native-PAGE による解析

本章で得られた R-10G 抗原タンパク質は SDS-PAGE 上で分子量が約 250 kDa として挙動するポドカリキシンであることが分かった。しかし、SDS-PAGE で本試料のような巨大分子を分離・分析することは困難である。そこで次により高分子の分析に適した Blue Native-PAGE を用い検討した。SDS-PAGE では SDS をタンパク質に結合させることにより均一に負電荷を帯びさせ分離を行う手法であるのに対し、Blue Native-PAGE ではクマシーブルー(CBB) G-250 存在下で分離を行う。CBB G-250 は SDS と比較すると負電荷が弱く、タンパク質の高次構造や電荷を損なうことなく分離を行うことができる[91-93]。また SDS-PAGE では SDS が糖タンパク質と結合しにくい問題点があったが、Blue Native-PAGE では 1000 kDa 以上の高分子の解析も可能であり糖タンパク質の解析にも用いられている。そこで Blue Native-PAGE により、201B7 株細胞由来 R-10G 最終精製画分及び Tic 株細胞由来 R-10G 精製画分について分析を行った。銀染色及び R-10G 抗体、R-17F 抗体を用いた Western blot により解析を行った結果を Fig. 4-5 に示した。R-10G 抗体による検出では Tic 株細胞、201B7 株細胞で共に 720 kDa から 1236 kDa の領域にスミアなバンドが示された(lane 1, 2)。R-17F 抗体による検出では Tic 株細胞は 242 kDa から 1236 kDa にスミアなバンドとして示され、201B7 株細胞では 480 kDa から 1236 kDa にバンドが示された(lane 3, 4)。銀染色では Tic 株細胞で 720 kDa 以下に夾雑タンパク質が確認された(lane 5, 6)。201B7 株細胞の最終精製画分ではこれらの夾雑タンパク質はほとんど見られなかった。これらの結果から SDS-PAGE では約 250 kDa 以上として

観察されていた R-10G 結合性ポドカリキシンは、720 kDa から 1048 kDa 以上の分子サイズである可能性が示された。また夾雑タンパク質は 720 kDa 以下の比較的 low molecular weight 領域に存在することが分かった。この結果からも R-10G 抗原タンパク質であるポドカリキシンは多量の糖鎖を含む糖タンパク質であることが示された。SDS-PAGE での解析によると正常の体細胞及びがん細胞中で発現するポドカリキシンは約 140-200 kDa との報告もあり [90, 94]、詳細な糖鎖構造解析が必要であると考えられた。

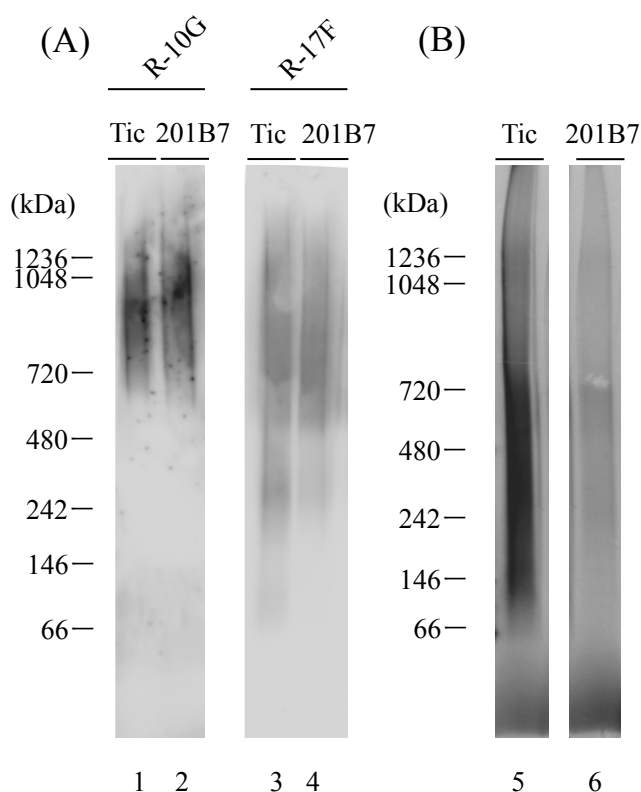


Fig. 4-5. Blue Native-PAGE and Western blot with R-10G and R-17F. The isolated podocalyxin from Tic cells (lane 1: 10.2  $\mu$ L/240  $\mu$ L, lane 3: 0.2  $\mu$ L/240  $\mu$ L and lane 5: 2.0  $\mu$ L/240  $\mu$ L(=total volume of the eluate fraction)) and the isolated podocalyxin from 201B7 cells (lane 2: 260 pg R-10G antigen protein, lanes 4 and 6: 72 pg R-10G antigen protein) were resolved by Blue Native-PAGE on a 3-12% gradient gel under non-reducing conditions. (A) Silver staining of Blue Native-PAGE of the isolated podocalyxin from Tic and 201B7 cells. (B) Western blot with R-10G and R-17F.

## 第5節 糖鎖分解酵素を用いた解析

単離された R-10G 抗原タンパク質は高度に糖鎖修飾を受けたポドカリキシンであり、その構造はヒト iPS 細胞特有であると考えられた。そこで修飾糖鎖の性質を調べることを目的に、糖鎖分解酵素を用いて消化を行い酵素消化前後の抗体との結合性の変化および分子量の変化を観察した。糖鎖分解酵素は、コンドロイチナーゼ ABC、ヘパリナーゼ mix、ケラタナーゼ、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ケラタナーゼ II、PNGase F、ノイラミニダーゼ、 $\alpha$ 1-3/4 フコシダーゼ、 $\alpha$ 1-2 フコシダーゼ、の 9 種類の酵素を使用した。サンプルは限外ろ過膜を用いて適当な溶媒に置換したのち、酵素消化を行った(Fig. 4-6)。なおエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼとケラタナーゼ II については 201B7 株細胞と Tic 株細胞より精製した R-10G 抗原の比較を行った(Fig. 4-6 B, C)。Fig. 4-6A に示す酵素処理においてはケラタナーゼの場合を除き、バンドの減弱やバンド位置のシフトは確認されなかった。これらの結果は、201B7 株細胞上の R-10G 抗原タンパク質(ポドカリキシン)の R-10G エピトープはコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などの GAG は関与せず、ケラタン硫酸の関与を示唆していた。また、N-結合型糖鎖は関与せず、全て O-結合型糖鎖より成ることを示している。更に非還元末端糖残基としてシアル酸、フコースも関与しないことを示している。一方、201B7 株細胞、Tic 株細胞共にエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化によりバンドが消失した(Fig. 4-6 B)。ケラタナーゼ II 消化により 201B7 株細胞ではバンドの変化はほとんど確認されなかったが、Tic 株細胞では高分子領域のバンドが消失し、バンドが低分子にシフトする傾向が確認された(Fig. 4-6 C)。



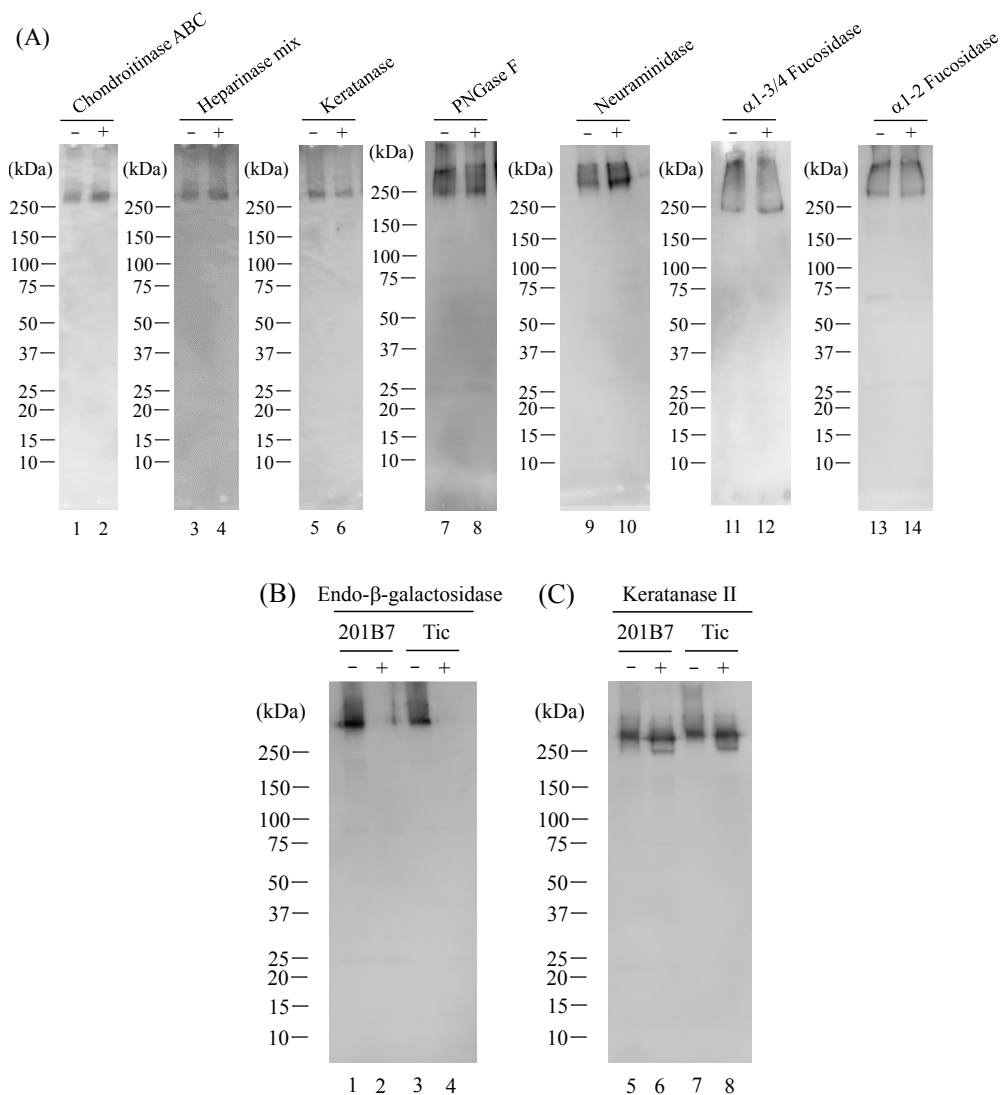


Fig. 4-6. Characterization of podocalyxin by various glycosidase digestions and Western blot.

The isolated podocalyxin from 201B7 cells (90  $\mu$ g R-10G antigen protein) and Tic cells (2.0  $\mu$ L (out of 240  $\mu$ L total eluate)), which had been incubated with and without predigestions with various glycosidases, were subjected to SDS-PAGE on a 4-15% gradient SDS-polyacrylamide gel under non-reducing conditions except for PNGase F digestion as described in Materials and Methods, followed by Western blot with R-10G.

(A) The isolated podocalyxin was digested with chondroitinase ABC (lane 2), heparinase mix (lane 4), keratanase (lane 6), PNGase F (lane 8), neuraminidase (lane 10),  $\alpha$ 1-3/4 fucosidase (lane 12) or  $\alpha$ 1-2 fucosidase (lane 14) and the digests were analyzed by Western blot with R-10G. Lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13: No enzyme added. (B, C) Isolated podocalyxins from 201B7 cells (lane 1, 2, 5, 6) and Tic cells (lane 3, 4, 7, 8) were digested with endo- $\beta$ -galactosidase (B; lane 2, 4) or keratanase II (C; lane 6, 8) and the digests were analyzed by Western blot with R-10G. Lane 1, 3, 5 and 7: No enzyme added.

## 第6節 考察

ポドカリキシンはムチン型糖鎖を多く含んだ糖鎖に富んだ糖タンパク質であるが、ヒト iPS 細胞中ではさらに、R-10G 抗体、R-17F 抗体、TRA-1-60/81 抗体、レクチン rBC2LCN が認識するエピトープを有している。TRA-1-60/81 抗体などはヒト iPS/ES 細胞とがん細胞(EC 細胞)を共に認識する抗体である。一方で R-10G 抗体、R-17F 抗体はヒト iPS/ES 細胞のみを認識し、がん細胞は認識しない。これらのことからポドカリキシン上の糖鎖解析を行うことでヒト iPS 細胞の実用化で最も問題とされる未分化幹細胞のがん細胞との判別やヒト iPS 細胞の未分化状態への糖鎖の関与を解明する手がかりが得られると期待される。本研究ではヒト iPS 細胞標準株である 201B7 株細胞で発現する R-10G 抗原タンパク質であるポドカリキシンを単離し、エピトープの性質を初めて明らかにした。

ヒト iPS 細胞(201B7 株)懸濁液を R-10G アフィニティクロマトグラフィーにて 2 回精製することにより高純度に精製された R-10G 抗原タンパク質を単離することができた。本標品は R-10G エピトープを持つだけでなく、R-17F エピトープ、TRA-1-60 エピトープを持つポドカリキシンであった(Fig. 4-3, 4)。ポドカリキシンはヒト iPS 細胞膜上で発現し、558 個のアミノ酸から成る主要な 1 回膜貫通型タンパク質である。461-483 が膜貫通領域であるが[90]、細胞外ドメインは高度に糖鎖により修飾されている。

Blue Native-PAGE を用いて精製 R-10G 抗原タンパク質について解析を行っ

たところ、本 R-10G 抗原タンパク質は R-10G 抗体および R-17F 抗体により 1000 kDa 付近を中心にして 720 kDa から 1236 kDa に渡る広い範囲にバンドを示した(Fig. 4-5)。これは SDS-PAGE で推定された分子量とは大きく異なった。LC/MS/MS 解析により R-10G 抗原タンパク質はポドカリキシンであると同定されたことから、R-10G 結合性ポドカリキシンはヒト iPS 細胞上で 720 kDa 以上の巨大分子として存在していることが明らかとなった。ポドカリキシンはアミノ酸配列から算出される分子量は 55 kDa であるため、分子の 90%以上が糖鎖の修飾を受けている可能性がある。ポドカリキシンと同様に高度な O-結合型糖鎖による修飾を受けているムチンは糖鎖の質量が分子量の 80%程度との報告もあることから[95]、他の糖タンパク質と比較してもヒト iPS 細胞上で発現するポドカリキシンは非常に高度な糖鎖修飾を受けていることになる。本ポドカリキシンは R-10G エピトープだけでなく R-17F エピトープ、TRA-1-60 エピトープ、rBC2LCN レクチン認識部位の結合部位も存在することから、ポドカリキシン上の糖鎖構造解析の重要性が指摘されている。

なお、R-10G の最小エピトープ構造は Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 であり、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびケラタナーゼ II はこの構造を認識し分解することが知られている[12]。201B7 株細胞由来ポドカリキシンをエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼで消化すると R-10G 結合性のバンドは完全に消失した。Tic 株細胞由来のポドカリキシンについても同様の結果が得られている。一方、ケラタナーゼ II で消化すると、Tic 株細胞由来のポドカリキシンは R-10G 結合性が減弱するとともに、そのバンドの分子サイズにも減少が

見られ、本抗原には上記の最小エピトープ構造が含まれることが分かる。ところが 201B7 株細胞由来の R-10G 結合性ポドカリキシンをケラタナーゼ II で消化しても R-10G 結合性にはほとんど変化が見られない。以上の結果は 201B7 株細胞の R-10G 結合性ポドカリキシンの構造にはエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼで切断されるがケラタナーゼ II で消化されない非硫酸化構造、例えば Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1 構造が含まれている可能性を示している。これらの推論は第 6 章における研究へと発展した。

## 第7節 実験の部

### 実験材料

D-PBS、Tris、塩酸、Complete RIPA buffer、R-10G Sepharose 4B column、ジエチルアミン、Nonidet P-40、R-10G 抗体、R-17F 抗体、TRA-1-60 抗体、anti-PODXL 抗体、anti-mouse Ig 抗体、anti-goat Ig 抗体は第3章と同様の材料を用いた。

酢酸は富士フィルム和光純薬より特級試薬を購入した。SYPRO Ruby 染色試薬は Thermo Fischer より購入した。

PNGaseF (from *Flavobacterium meningosepticum*, recombinant from *Escherichia coli*)は Roche Diagnostic GmbH より、neuraminidase (*Arthribacter ureafaciens*)はナカライテスクより、 $\alpha$ 1-3/4fucosidase は TaKaRa Bio より、 $\alpha$ 1-2fucosidase は New England Biolabs より、chondroitinase ABC (*Proteus vulgaris*)、heparinase、heparitinase I、II が混和されている heparinase mix、keratanase (*Pseudomonas* sp.)、keratanase II (*Bacillus* sp.)、endo- $\beta$ -galactosidase (*Escherichia freundii*)は生化学工業より購入した。

酵素消化実験の際に使用した限外ろ過膜は Merck Millipore より Centrifugal Filter Units Amicon Ultra0.5 mL 10K を購入した。

### 再アフィニティクロマトグラフィーによる R-10G 抗原タンパク質の精製

第3章と同様に  $5.2 \times 10^7$  cells 由来ヒト iPS 細胞を可溶化し、R-10G アフィニティカラムにかけ、精製画分は 200  $\mu$ L ずつ回収した。R-10G 精製画分 1800

$\mu\text{L}$  に対し 1 M Tris-HCl (pH 6.8) を 180  $\mu\text{L}$  加え pH を 7.4 にした後に再度 R-10G Sepharose 4B column にかけることで精製を行った。洗浄液として 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % Nonidet P-40 (pH 11.5) を、溶出液として 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 M ジエチルアミン-塩酸緩衝液 (pH 11.5) を用いた。非結合画分は 400  $\mu\text{L}$ 、精製画分は 200  $\mu\text{L}$  ずつ回収した。溶出画分の回収時には直ちに 1 M Tris-HCl (pH 6.8) を 40  $\mu\text{L}$  加えることで溶液を中性にした。

#### SDS-PAGE におけるイムノブロット

第 3 章と同様の操作を行った。

#### Blue Native-PAGE におけるイムノブロット

3-12% gradient Bis/Tris gel (Thermo fisher 製) を用い泳動後、PVDF 膜 (Merck Millipore 製) に転写をした。種々の抗体を用いて反応させたのちに HRP 標識二次抗体及び Immunostar Zeta (富士フィルム和光純薬製) を用いて化学発光させ、Las 4000 mini (GE ヘルスケア製) にて検出した。

#### 酵素消化

ヒト iPS 細胞 (201B7 株) 由来 R-10G 最終精製画分を限外ろ過膜にて溶媒置換し酵素消化を行った。コンドロイチナーゼ ABC 消化では 1 mIU のコンドロイチナーゼ ABC を 10  $\mu\text{L}$  の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 中、37 °C で 18 時間作用させた。ヘパリナーゼ mix 消化では 6 mIU のヘパリナーゼ mix を 8.5  $\mu\text{L}$  の 3

mM 酢酸カルシウム含有 30 mM 酢酸緩衝液(pH 7.0)中、37 °C で 18 時間作用させた。ケラタナーゼ消化では 8.5 mIU のケラタナーゼを 12.5  $\mu$ L の 25 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.4)中、37 °C で 18 時間作用させた。ケラタナーゼ II 消化では 2.4 mIU のケラタナーゼ II を 12  $\mu$ L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.8)中、37 °C で 18 時間作用させた。エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化では、1.2 mIU のエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを 12  $\mu$ L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中、37 °C で 24 時間作用させた。PNGase F 消化では 12.5  $\mu$ L の 2.5% SDS、0.2 M 2-メルカプトエタノール、0.2 M Tris-HCl 緩衝液(pH 8.2)にて 37 °C で 5 分間加熱後、0.6 IU の PNGase F を 9.6  $\mu$ L の 2 mM EDTA、1.3% オクチルグリコシド、0.03% PMSF 中、37 °C で 18 時間作用させた。ノイラミニダーゼ消化では 1.5 mIU のノイラミニダーゼを 12  $\mu$ L の 0.25 M 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5)中、37 °C で 18 時間作用させた。 $\alpha$ 1-3/4 フコシダーゼ消化では 7.2 mIU の $\alpha$ 1-3/4 フコシダーゼを 12  $\mu$ L の 480 mM 硫酸アンモニウム含有 54 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)中、37 °C で 18 時間作用させた。 $\alpha$ 1-2 フコシダーゼ消化では 0.4 mIU の $\alpha$ 1-2 フコシダーゼを 12  $\mu$ L の 100 mM 塩化ナトリウム、0.01% BSA 含有 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中、37 °C で 18 時間作用させた。各種酵素消化後 100 °C で 3 分間加熱して反応を止め、反応液を SDS-PAGE にて分析した。

なお、Tic 株細胞由来 R-10G 精製画分についても同様の実験を行った。

## LC/MS/MS 分析

201B7 株細胞由来 R-10G 最終精製画分を SDS-PAGE 後、R-10G および R-17F 抗体による Western blot および SYPRO Ruby 染色を行い、免疫染色とタンパク質染色の両者が陽性を示す 3 本のバンドを切り出し *in-gel* トリプシン消化し、LC/MS/MS にて分析した。L-column 2 (150 x 0.075 mm, Chemicals Evaluation and Research Institute) を装着した HPLC (Paradigm MS4 HPLC system, Michrom BioResources) でゲルから溶出されたペプチド断片を分離し、HPLC と連結した Orbitrap Elite Mass Spectrometer で質量分析を行った。データ解析は SEQUEST algorithm (Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific)) 及び UniProt データベースを用いて行い、タンパク質を同定した。なお、LC/MS/MS 分析実験および、そのデータ解析は横浜市立大学川崎ナナ研究室において行われた。



## 第5章 蛍光ポストカラム HPLC を用いた新規ケラタン硫酸 分析法の確立

5章では蛍光ポストカラム HPLC を用いた新規のケラタン硫酸分析法を確立した。

従来から用いられているケラタン硫酸組成分析ではケラターナーゼやケラターナーゼ II 消化により生じたオリゴ糖について組成分析が行われていた。しかし第4章に記したように、ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンに存在しているケラタン硫酸様糖鎖は一般的なケラタン硫酸より硫酸化の程度が極端に低く、ケラターナーゼ II による消化に抵抗性を示した。そこで硫酸基の有無にかかわらず、ポリラクトサミン構造を分解するエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた新規のケラタン硫酸分析法を検討した。

## 第1節 標準品を用いたケラタン硫酸の分析法の確立

ケラタン硫酸の分析法としてはケラタン硫酸認識抗体を用いた ELISA 法[96-100]、比色定量法である Elson-Morgan 法[101]、DMMB 法[102, 103]が知られているが、選択性が乏しい点や感度が低い点が問題として挙げられる。近年、これらの問題を解決する方法として 2-CA を用いた蛍光ポストカラム HPLC 法[104]や LC/MS/MS 法[105]が報告された。しかしこれらの分析法はそれぞれケラタン硫酸分解酵素であるケラタナーゼ、ケラタナーゼ II を用いて酵素消化を行っている。これらの酵素は GlcNAc の 6 位の水素基の硫酸化を要求することから(Fig. 5-1)、硫酸化の程度が少ないケラタン硫酸に対して十分に反応しないため、新規分析法の開発が必要であると考えられた。本章ではエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いた、新規のケラタン硫酸組成分析法の確立を試みた。エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼは Gal 残基が 6-O-硫酸化されていないことを条件として、ポリ-N-アセチルラクトサミン骨格に作用して $\beta$ 1-4 ガラクトシド結合を切断することから(Fig. 5-1)、ケラタン硫酸やポリ-N-アセチルラクトサミンの分解が可能となる。そこでエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素消化で生じたオリゴ糖を分離定量する蛍光ポストカラム HPLC 法を検討した。

ケラタン硫酸やポリ-N-アセチルラクトサミンをケラタナーゼ II やエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼで消化して得られるオリゴ糖を一斉分析するために、様々な分離モードを検討した。本法では、ポリマー系のゲルろ過カラムとシリカ系のゲルろ過カラムをタンデムに結合し、緩衝液の濃度、pH、有機溶媒濃度を検討して、対象とするオリゴ糖の一斉分析を可能とした。

硫酸化の低いケラタン硫酸及びポリ-*N*-アセチルラクトサミンを酵素消化した際には、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物として GlcNAc $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal、ケラタナーゼ II 消化物として Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S)、Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S)を生じる。そこでエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物の標準品として GlcNAc $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal、Gal の 4 種類の合成糖鎖標準品を用いた。GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal はポリ-*N*-アセチルラクトサミンの消化が不十分な際に生じるため、消化不十分でないことを確認する目的で使用した。ケラタナーゼ II 消化物の標準品としては Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2)、Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L4)の 2 種類の合成糖鎖標準品を用いた。

エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物の標準品をゲルろ過クロマトグラフィーで分離後、強塩基性条件下で 2-CA による蛍光誘導体化を行い検出した(Fig. 5-2A)。同様にケラタナーゼ II 消化物の標準品について分離定量後、塩基性条件下にて 2-CA により蛍光標識を行うことで検出をした(Fig. 5-2B)。それぞれ検出限界は、GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal: 1.2 pmol、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal: 0.80 pmol、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal: 1.5 pmol、Gal: 6.8 pmol (S/N=3)であった。

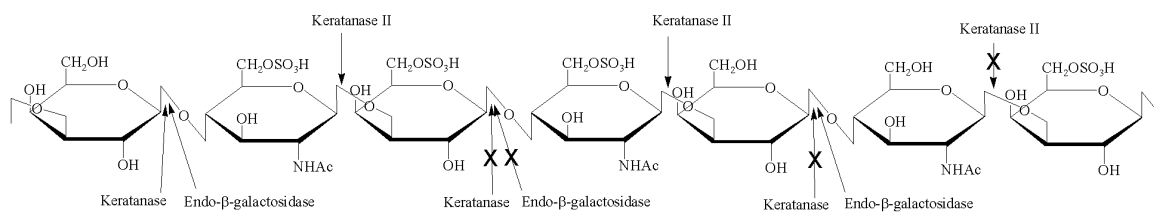


Fig. 5-1. Structural requirements of keratan sulfate-degrading enzymes. Schematic presentation of the specificities of keratanase, keratanase II and endo- $\beta$ -galactosidase with regard to the effect of sulfate modification of the structural repeating units of keratan sulfate. The arrows marked with X indicate that the enzyme does not work.

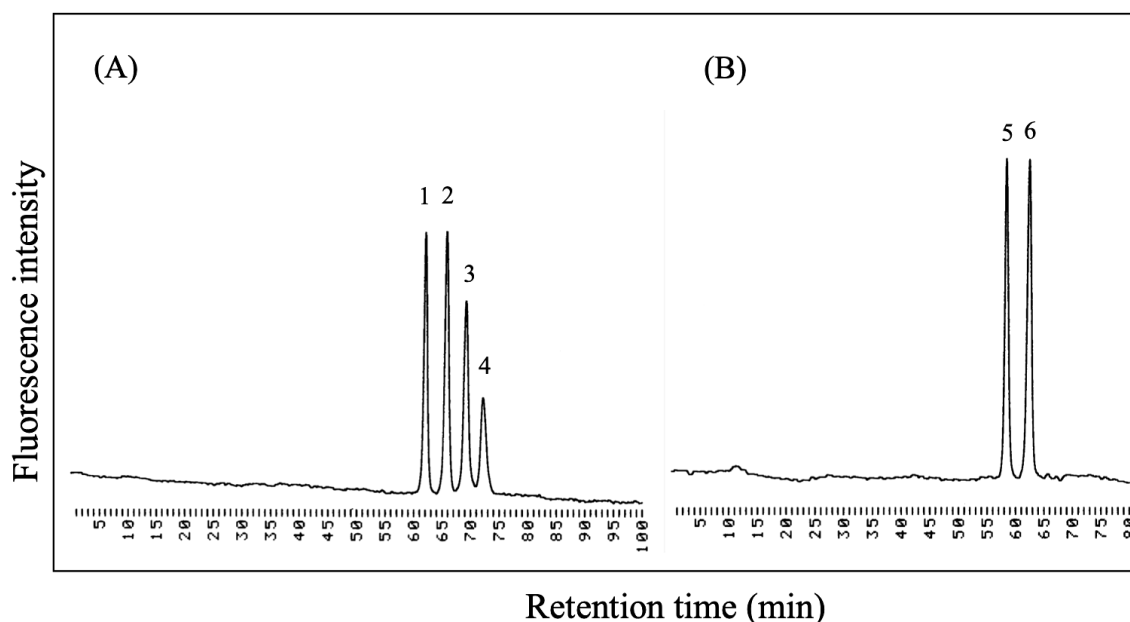


Fig. 5-2. Typical chromatograms of standard oligosaccharides from keratan sulfate. Injection column: 5  $\mu$ L (10 ng of each sugar). A, oligosaccharides derived from endo- $\beta$ -galactosidase digest; B, oligosaccharides derived from keratanase II digest. Peaks: 1, GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal; 2, GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal; 3, GlcNAc $\beta$ 1-3Gal; 4, Gal; 5, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2); 6, Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L4).

## 第2節 生体試料への応用

角膜由来ケラタン硫酸標品をエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ及びケラタナーゼ II で消化後(Fig. 5-3)、生じたオリゴ糖を分析した(Fig. 5-4A, B)。エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化では、GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal (peak 1)が大部分を占め、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal (peak 3)がわずかに検出された(Fig. 5-4A)。この結果は Melrose らのエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物の解析と一致した[102]。ケラタナーゼ II 消化では、Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2) (peak 5)、Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L4) (peak 6)の2種類のピークが検出された(Fig. 5-4B)。この結果は Oguma ら[105]及び Kawabe ら[7]のケラタナーゼ II 消化物の解析と一致した。

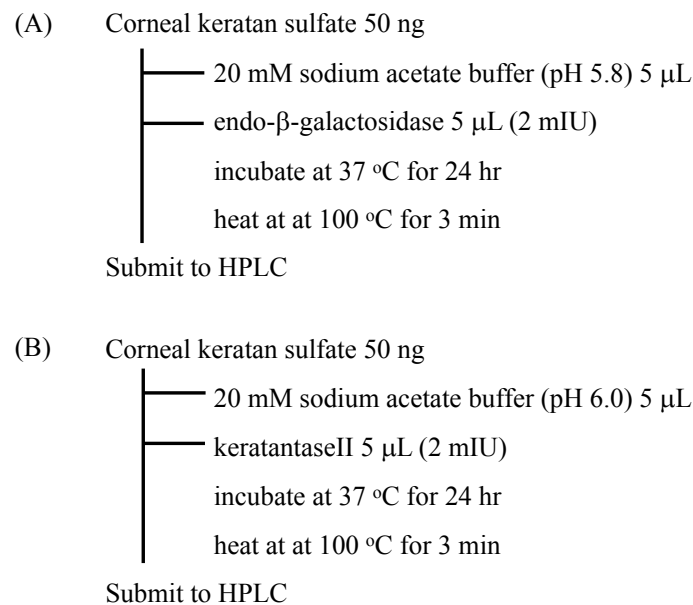


Fig. 5-3. Procedure for enzymatic digestion of corneal keratan sulfate. A, endo- $\beta$ -galactosidase digestion; B, keratanase II digestion.

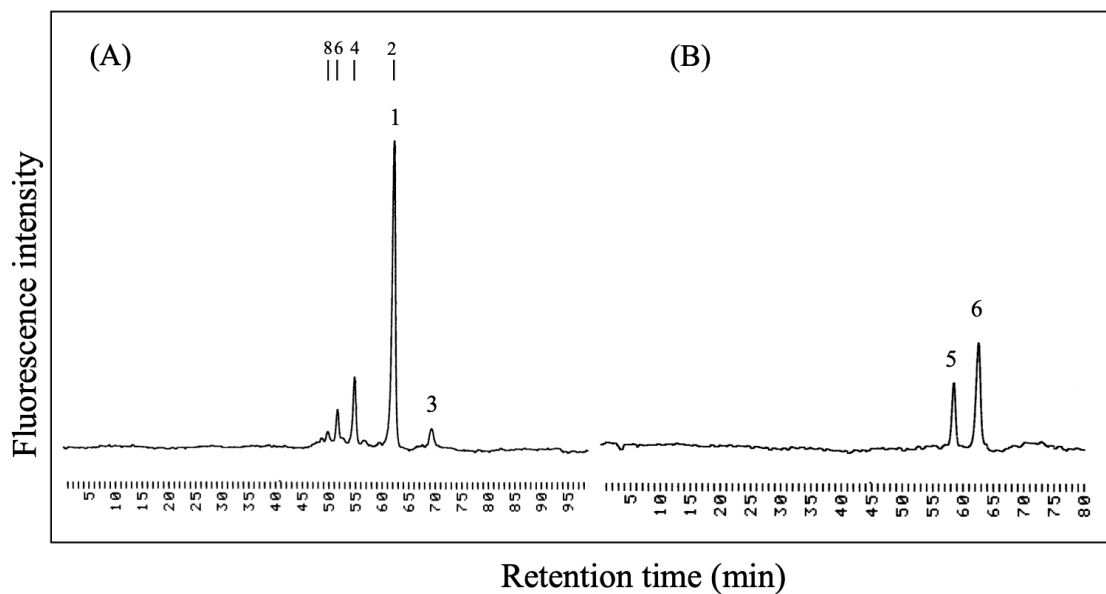


Fig. 5-4. Chromatograms of oligosaccharides from corneal keratan sulfate. A, endo- $\beta$ -galactosidase digestion; B, keratanase II digestion. Peaks: 1, GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal; 3, GlcNAc $\beta$ 1-3Gal; 5, Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L4); 6, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2). Number 8, 6, 4, 2 above the reducing carbohydrates peaks indicate elution position of the respective glucose oligomers.

### 第3節 考察

本章で確立したポストカラム HPLC を用いて、角膜由来ケラタン硫酸の組成分析を高感度かつ選択的に行うことができた。この分析法を用い、ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンのケラタン硫酸様糖鎖の組成分析・定量分析を行い第6章に示した。

## 第4節 実験の部

### 実験材料

GlcNAc $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal、Gal、L2、Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L4)は東京化成工業より提供された。2-CA、アセトニトリルはシグマアルドリッチより HPLC grade を購入した。水酸化ナトリウム、酢酸は富士フィルム和光純薬より特級試薬を購入した。ウシ角膜由来ケラタン硫酸標準品、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ(*Escherichica freundii*)、ケラタナーゼ II(*Bacillus sp.*)は生化学工業より購入した。

### HPLC 装置

溶離液送液ポンプ(PU-4180)、蛍光検出器(FP-4025)は日本分光製、反応液送液ポンプ(LC-20AD)は島津製作所製、データ処理装置(D-2500)は日立製作所製、Sample loop(7725i, Sample loop 20  $\mu$ L)は Reodyne 社製、ドライ反応槽(DB-5)は島村製作所製を用いた。

### HPLC 分析

エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物の分析は蛍光ポストカラム検出法を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。試料の分離にはポリマー系ゲルろ過カラムとシリカ系ゲルろ過カラムを連結し、流速 0.35 mL/min、カラム温度室温で分離を行った。ポストカラム試薬は流速 0.10 mL/min で A, 1%(w/v) 2-CA; B, 1.0 M NaOH を使い、A, 50%; B, 50%の一定濃度で送液した。混合液は反



応コイル(0.25 mm i.d. x 10 m)を通過中にドライ反応槽で 120 °C で加熱反応し、冷却コイル(0.25 mm i.d. x 3 m)で冷却した。反応液は励起波長 331 nm、蛍光波長 383 nm で蛍光検出した。サンプルは水溶液 5  $\mu$ L を HPLC にて分析した。

#### ケラタン硫酸のエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化

角膜由来ケラタン硫酸 100 ng に対し、2 mIU のエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを 10  $\mu$ L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.8)中、37 °C で 24 時間作用させた。100 °C で 3 分間加熱して反応を止め、凍結乾燥後、消化液 5  $\mu$ L を HPLC にて分析した。

#### ケラタン硫酸のケラターゼ II 消化

角膜由来ケラタン硫酸 50 ng に対し、2 mIU のケラターゼ II を 10  $\mu$ L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中、37 °C で 24 時間作用させた。100 °C で 3 分間加熱して反応を止め、凍結乾燥後、消化液 5  $\mu$ L を HPLC にて分析した。

## 第6章 ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンの糖鎖分析

6章ではヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンの糖鎖分析を行った。アミノ糖、シアル酸、ケラタン硫酸の分析を行ったところ高度の糖鎖修飾を受けているだけでなく、特殊な構造のケラタン硫酸様糖鎖の構造を解析することができた。

ヒト iPS 細胞の多能性と糖鎖に関する研究が注目を集めている。ヒト iPS 細胞中に存在しているシアル酸は多能性と未分化能に関連しているとの報告や [106]、未分化幹細胞マーカーがポドカリキシンの上に存在するとの報告はあるものの [7, 12, 18, 47]、ヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンの糖鎖解析を行った研究はいまだにない。本章では R-10G 抗体を結合させたアフィニティカラムによって精製したポドカリキシンの糖鎖を用いてシアル酸、アミノ糖、ケラタン硫酸の分析を行った。

## 第1節 蛍光ポストカラム HPLC による糖組成分析

第3章、第4章で行った酵素消化を用いた解析により、ヒト iPS 細胞由来 R-10G 結合性ポドカリキシンは硫酸化の程度が低い特徴的なケラタン硫酸様糖鎖の修飾を受けていることが示された。しかし抗体を用いた検出では、一部の糖鎖を半定量的に検出することしかできず、糖組成分析や定量的な分析を行うことができない。そこで本研究では 2-CA を用いた蛍光ポストカラム HPLC 法によりポドカリキシンのアミノ糖、シアル酸、ケラタン硫酸について糖組成分析を行った。測定は2回のアフィニティークロマトグラフィーで単離した R-10G 結合性ポドカリキシン画分を、限外ろ過膜を用いて溶媒置換後に行った。

アミノ糖分析は古くからホウ酸 buffer を溶離液とした分離が知られている。本研究ではホウ酸 buffer を溶離液として蛍光ポストカラム HPLC によりアミノ糖分析を行った。Fig. 6-1 に示すように GlcN、GalN が良好に分離した。タンパク質 1 ng あたりの GlcN、GalN はそれぞれ  $15.7 \times 10^{-12}$  mol、 $3.92 \times 10^{-12}$  mol であり、試料中の GlcN/GalN 比は 4.00 であった。

シアル酸は1章で確立した HILIC による蛍光ポストカラム HPLC により分析した。Fig. 6-2 に示すように Neu5Ac のみが検出された。タンパク質 1 ng あたりの Neu5Ac は  $3.98 \times 10^{-12}$  mol であり、試料中の GlcNAc/Neu5Ac 比は 3.95 であった。

ケラタン硫酸分析には本研究の5章で確立した新規の蛍光ポストカラム HPLC を用いた。ヒト iPS 細胞由来 R-10G 結合性ポドカリキシンのエンド- $\beta$ -ガ

ラクタシダーゼ消化物について分析を行ったところ、Fig. 6-3 に示すように GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal が検出された。タンパク質 1 ng あたりの GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal、GlcNAc $\beta$ 1-3Gal はそれぞれ  $1.18 \times 10^{-12}$  mol、 $0.443 \times 10^{-12}$  mol であり、試料中の GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal/GlcNAc $\beta$ 1-3Gal 比は 2.67 であった。またケラターゼ II 消化物について分析を行ったところ、Fig. 6-4 に示すように Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2)のみが検出された。タンパク質 1 ng あたりの Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2)は  $0.388 \times 10^{-12}$  mol であった。これらの結果から、R-10G エピトープが結合するポドカリキシンのケラタン硫酸の硫酸化の程度が低く、ケラタン硫酸様糖鎖全体の約 27%がポリ-N-アセチルラクトサミン様構造をとると考えられた。エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼはポリ-N-アセチルラクトサミン様構造を認識・切断するがケラターゼ II はポリ-N-アセチルラクトサミン様構造を認識しないことからエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化物について解析を行った。

ヒト iPS 細胞由来ポドカリキシンのアミノ糖、シアル酸、ケラタン硫酸の分析結果を解析し、Table 6-1 にまとめた。

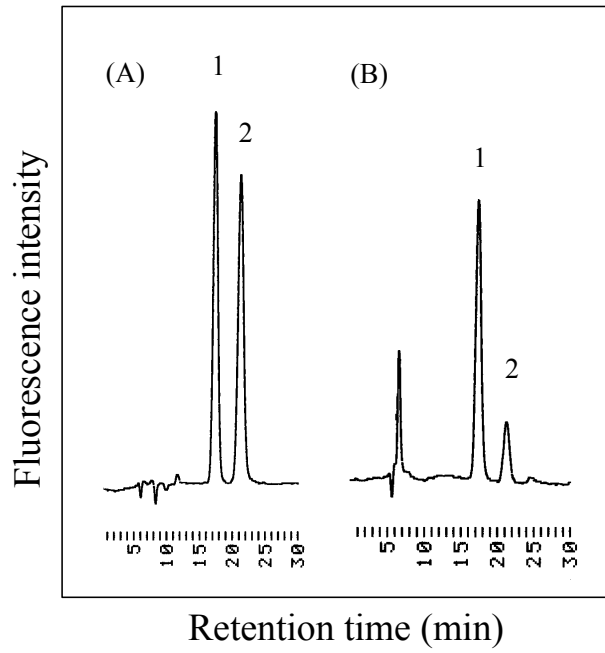


Fig. 6-1. Determination of amino sugars.  
 A, standard (200 pmol of each sugar); B, podocalyxin. Peaks: 1, GlcN; 2, GalN.

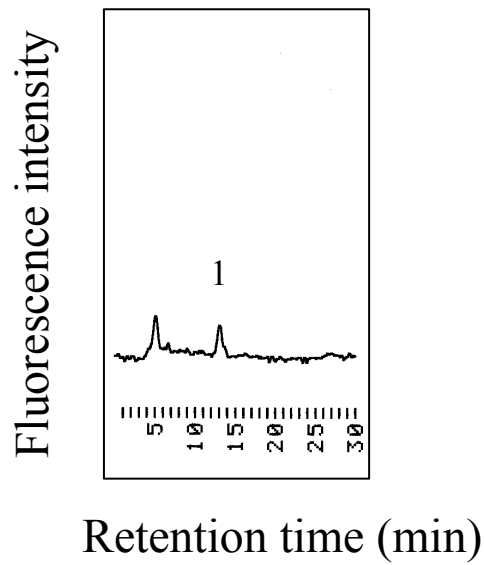


Fig. 6-2. Determination of sialic acids in podocalyxin.  
 Peak: 1, Neu5Ac. See Fig. 1-3.

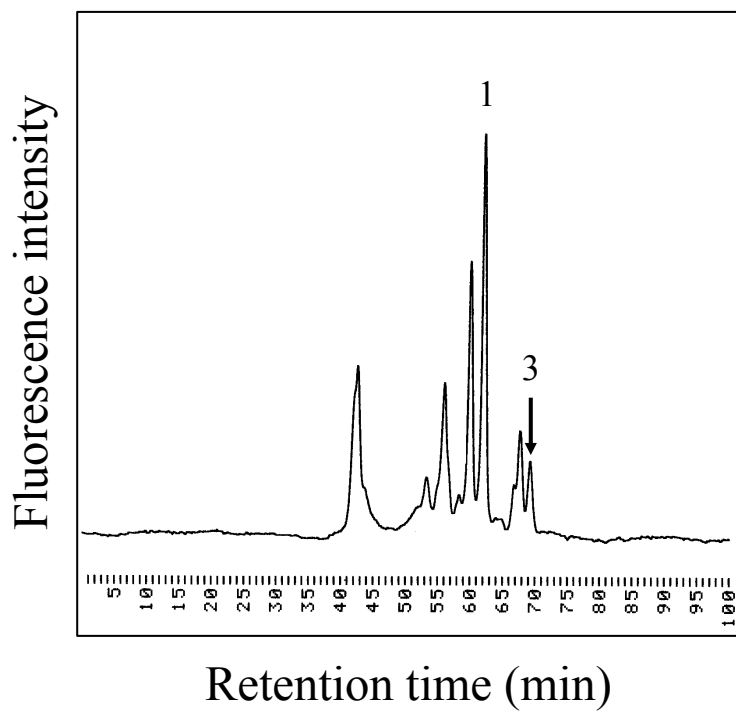


Fig. 6-3. Analysis of oligosaccharides from podocalyxin with endo- $\beta$ -galactosidase digestion.  
Peaks: 1, GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal; 3, GlcNAc $\beta$ 1-3Gal. See Fig. 5-4 A.

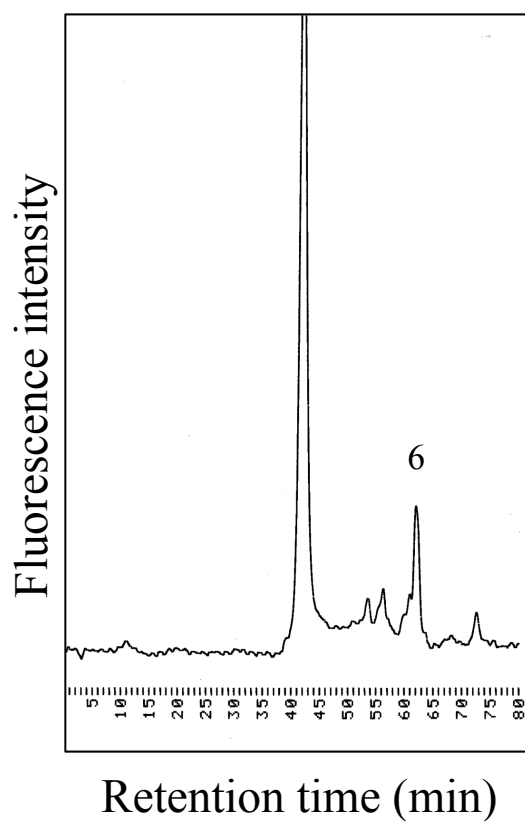


Fig. 6-4. Analysis of oligosaccharides from podocalyxin with keratanase II digestion. Peak: 6, Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) (L2). See Fig. 5-4 B.

Table 6-1. Compositional analysis of podocalyxin from human iPS cells.

	Molar ratio	Method
GalN <sup>a)</sup>	1.00	[101]
GlcN	4.00	[101]
Neu5Ac	1.01	This doctoral dissertation
GlcNAc $\beta$ 1-3Gal	0.11	This doctoral dissertation
GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal	0.30	This doctoral dissertation
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S)	0.10	This doctoral dissertation

a) Amount of GlcNAc is defined to be 1.00.

## 第2節 考察

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンについて HPLC を用いた糖鎖組成分析を行ったところ、GlcNAc を多数含むことが明らかとなった(Table 6-1)。この GlcNAc のうちケラタン硫酸及びポリ-N-アセチルラクトサミン由来 GlcNAc は約 10%程度であった。そのため GlcNAc の多くは N-型糖鎖由来もしくは O-型糖鎖由来であると考えられた。ポドカリキシンにはアミノ酸配列上から推定される N-型糖鎖結合可能部位が 5 箇所あり、腎糸球体足細胞ではムチン型糖鎖が多数結合している。ヒト iPS 細胞由来 R-10G 結合性ポドカリキシンは非常に高度な糖鎖修飾を受けていることから、N-型糖鎖由来の GlcNAc のみならずムチン型糖鎖由来 GlcNAc が存在する可能性が考えられた。一般に哺乳動物に存在するムチン型糖鎖には Tn 抗原(GalNac-O-Ser/Thr)に Gal が $\beta$ 1-3 結合したコア 1 構造、GlcNAc が $\beta$ 1-3 結合したコア 3 構造が知られている。腎糸球体足細胞上でポドカリキシンはコア 1 構造をとると考えられている[107]が、ヒト iPS 細胞由来 R-10G 結合性ポドカリキシンからは多数の GlcNAc が検出されたことからコア 3 構造の O-結合型糖鎖が多数存在する可能性も示唆された。

エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素消化物について分析を行ったところ、ケラタン硫酸様糖鎖としてポリ-N-アセチルラクトサミン構造が 27%程度存在したことから、これまで報告されているケラタン硫酸に比べて硫酸化度が低い特殊な構造であることが示された。第 5 章でのグリコシダーゼを用いた Western blot による解析結果では、エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼ消化ではバンドが消失したの



に対し、ケラターゼ II 消化には抵抗性を示した(Fig. 4-6B)。これらのことから R-10G 結合性ポドカリキシン上に結合するケラタン硫酸様糖鎖中にはポリ-N-アセチルラクトサミンが構成糖鎖として存在すると考えられた。角膜由来のケラタン硫酸では、タンパク質結合部位付近では Gal、GlcNAc は硫酸化されておらず、中間部では GlcNAc のみが硫酸化され、末端では Gal、GlcNAc がともに硫酸化された構造をとるとの報告はあるが[108]、ヒト iPS 細胞におけるポドカリキシンのケラタン硫酸についての報告は本研究が初めてである。

本研究ではヒト iPS 細胞における R-10G 結合性ポドカリキシンについて糖鎖解析を行うことで、多能性や未分化状態維持に関する新たな知見を得ることができた。細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンが分化誘導シグナル伝達に関与していることはよく知られている。ヒト iPS 細胞はポドカリキシンを高発現していることを大きな特徴としているが、ポドカリキシンに低硫酸化した特殊な構造のケラタン硫酸が結合していることで、細胞表面におけるヘパラン硫酸鎖を介した分化誘導機能が妨害され、未分化状態を維持しているのかもしれない。

### 第3節 実験の部

#### 実験材料

Tris、塩酸、リン酸、リン酸二水素ナトリウム、塩化アンモニウム、水酸化ナトリウム、酢酸、ホウ酸は富士フィルム和光純薬より特級試薬を購入した。2-CA、アセトニトリルはシグマアルドリッチより HPLC grade を購入した。

keratanase II (*Bacillus* sp.)、endo- $\beta$ -galactosidase (*Escherichia freundii*)は生化学工業より購入した。

ケラタン硫酸組成分析及びシアル酸分析の際に使用した限外ろ過膜は Merck Millipore より Ultrafree-Mc BIO-MAX-10 を購入した。

InertSustain Amide Column (2.1 mm i.d. x 250 mm)は GL サイエンスより購入した。TSKgel SCX (6.0 mm i.d. x 150 mm)は東ソーより購入した。

#### シアル酸・ケラタン硫酸分析における HPLC 装置、条件

第1章、第5章と同様の装置、条件にて分析した。

#### アミノ糖分析における HPLC 装置

蛍光検出器(FP-4025)は日本分光製、反応液送液ポンプ、溶離液送液ポンプ(PU-2089i Plus)は島津製作所製、データ処理装置(D-2500)は日立製作所製、Sample loop(7725i, Sample loop 20  $\mu$ L)は Reodyne 社製、カラムヒーター(Thermo Minder SDmini)、ドライ反応槽(DTU-1C)は Taitec 社製を用いた。

### アミノ糖分析における HPLC 分析

アミノ糖分析は蛍光ポストカラム検出法を用いた逆相イオン交換クロマトグラフィーにより行った。試料の分離は TSKgel SCX (6.0 mm i.d. x 150 mm) を用い、流速 0.35 mL/min、カラム温度 70 °C、溶媒は 0.35 M ホウ酸緩衝液(pH 7.7) で分離を行った。ポストカラム試薬は流速 0.60 ml/min で A, 1%(w/v) 2-CA; B, 1.0 M NaOH を用い、A, 50%; B, 50%の一定濃度で送液した。混合液は反応コイル(0.25 mm i.d. x 7 m)を通過中にドライ反応槽で 120 °C で加熱反応し、冷却コイル(0.25 mm i.d. x 3 m)で冷却した。反応液は励起波長 331 nm、蛍光波長 383 nm で蛍光検出した。サンプルは水溶液 20  $\mu$ L を HPLC にて分析した。

### アミノ糖分析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 最終精製画分 480  $\mu$ L を限外ろ過膜にて溶媒置換後凍結乾燥し H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ L に溶解した。サンプル 12.5  $\mu$ L を凍結乾燥し、6 M 塩酸中 50  $\mu$ L で 97 °C、2.5 時間加水分解した。ロータリーエバポレーター後、H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ L に溶解し、水溶液 20  $\mu$ L を HPLC にて分析した。

### 酸加水分解とシアル酸分析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 最終精製画分 480  $\mu$ L を限外ろ過膜にて溶媒置換後凍結乾燥し H<sub>2</sub>O 100  $\mu$ L に溶解した。サンプル 5  $\mu$ L を凍結乾燥し、50 mM 塩酸 50  $\mu$ L 中で 80 °C、1 時間加水分解した。加水分解したサンプルを 40  $\mu$ L を凍結乾燥後、75%(v/v) アセトニトリル 7.5  $\mu$ L に溶解し、遠心(13,000 g、5 min)後上清 5  $\mu$ L を 1 章にて確立した HPLC 条件にて分析した。

### エンド-β-ガラクトシダーゼ消化とケラタン硫酸分析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 最終精製画分 480 μL を限外ろ過膜にて溶媒置換後凍結乾燥し H<sub>2</sub>O100 μL に溶解した。サンプル 25 μL を凍結乾燥し、2 mIU のエンド-β-ガラクトシダーゼを 10 μL の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.8)中、37 °C で 24 時間作用させた。100 °C で 3 分間加熱して反応を止め、凍結乾燥後、消化液 5 μL を 5 章にて確立した HPLC 条件にて分析した。

### ケラターゼ II 消化とケラタン硫酸分析

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 最終精製画分 480 μL を限外ろ過膜にて溶媒置換後凍結乾燥し H<sub>2</sub>O100 μL に溶解した。サンプル 12.5 μL を凍結乾燥し、2 mIU のケラターゼ II を 10 μL の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中、37 °C で 24 時間作用させた。100 °C で 3 分間加熱して反応を止め、凍結乾燥後、消化液 5 μL を 5 章にて確立した HPLC 条件にて分析した。

## 総括

### 1. 蛍光ポストカラム HPLC を用いたシアル酸分析法の確立

2-CA を誘導体化試薬とし、生体試料由来シアル酸の高感度な分析法を確立した。シアル酸を誘導体化試薬で標識する操作・誘導体化試薬を除去する操作が不要な点、試料処理の方法が簡便な点から様々な生体試料への応用が可能と考えられた。

### 2. ケラタン硫酸認識抗体(R-10G)が認識する糖鎖構造の解析

R-10G、TRA-1-60/81、5D4 抗体の 4 種類の抗体の基質特異性について解析した。R-10G 抗体は Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 というケラタン硫酸を最小エピトープとし、TRA-1-60/81 抗体は Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1 というポリ-N-アセチルラクトサミンを最小エピトープとし、5D4 抗体は Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1-3Gal(6S) $\beta$ 1-4GlcNAc(6S) $\beta$ 1 という硫酸化の程度が高いケラタン硫酸を最小エピトープとしていることが明らかとなった。

### 3. ヒト iPS 細胞(201B7 株)からの R-10G 抗原タンパク質の精製

ヒト iPS 細胞(201B7 株)由来 R-10G 抗原タンパク質について解析を行ったところ、分子量約 250 kDa のポドカリキシンであると考えられた。ポドカリキシン 1 分子に含まれる R-10G エピトープの数がヒト iPS 細胞株間で異なると推定されたことから、微細糖鎖構造の違いの存在が明らかとなった。

#### 4. ヒト iPS 細胞(201B7株)より得られた最終精製 R-10G 抗原タンパク質(R-10G 結合性ポドカリキシン)の解析

再アフィニティクロマトグラフィーを行い、高純度の R-10G 抗原タンパク質を単離し、ポドカリキシンと同定した。この R-10G 結合性ポドカリキシンはケラタン硫酸様糖鎖の修飾を受けていることが明らかとなった。このケラタン硫酸様糖鎖は角膜などで見られるケラタン硫酸と比べて硫酸化の程度が非常に低く、ヒト iPS 細胞特有の特徴を持つと考えられた。また Blue Native-PAGE の結果から、ヒト iPS 細胞由来の R-10G 結合性ポドカリキシンは、720 kDa から 1236 kDa の巨大分子であることが明らかとなった。

#### 5. 蛍光ポストカラム HPLC を用いた新規ケラタン硫酸分析法の確立

エンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いたケラタン硫酸の組成分析法を確立した。従来はケラターナーゼ及びケラターナーゼ II を用いてケラタン硫酸由来オリゴ糖を分析していたが、本研究ではエンド- $\beta$ -ガラクトシダーゼを用いることでポリ-N-アセチルラクトサミンのみならず、ヒト iPS 細胞で見られる硫酸化の程度が低いケラタン硫酸の組成分析を可能とした。

#### 6. ヒト iPS 細胞(201B7株)由来 R-10G 結合性ポドカリキシンの糖鎖分析

ヒト iPS 細胞由来 R-10G 結合性ポドカリキシンのアミノ糖分析、シアル酸分析、ケラタン硫酸分析を行った。本ポドカリキシンは腎組織中の場合と同様にムチン型糖鎖を有しているという特徴のみならず、ケラタン硫酸様糖鎖を有していることを明らかにした。このケラタン硫酸様糖鎖は構成糖鎖としてポリ-

*N*-アセチルラクトサミン構造が存在する極めて特殊な構造であることが示された。また、これらの特殊な糖鎖構造がヒト iPS 細胞の未分化状態の維持に大きく寄与していることが予想された。

## 謝辞

終わりに臨み、本論文の作成に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました立命館大学薬学部豊田英尚教授に深く感謝いたします。また本研究に様々なご助力をいただきました豊田亜希子博士、小嶋絢博士をはじめとする立命館大学薬学部生体分析化学研究室の皆様には感謝いたします。なお本研究の一部は立命館大学糖鎖工学研究室において実施いたしました。その際、多くの御指導、御鞭撻を賜りました立命館大学糖鎖工学研究室川寄敏祐先生、川寄伸子先生、中尾広美研究員に心から感謝の意を表します。

また本研究に際し、共同研究等の種々のご助力をいただきました横浜市立大学創薬再生科学研究室川崎ナナ教授、東京化成工業株式会社に感謝いたします。



## 参考文献

1. Seet, BT., Dikic, I., Zhou, MM. and Pawson, T., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7(7)**, 473-483 (2006).
2. Hofsteenge, J., Müller, DR., de Beer, T., Löffler, A., Richter, WJ. and Vliegenthart, JF., *Biochemistry*, **33(46)**, 13524-13530 (1994).
3. Wopereis, S., Lefeber, DJ., Morava, E. and Wevers, RA., *Clin. Chem.*, **52(4)**, 574-600 (2006).
4. Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, KH., Dejima, K., Gengyo-ando, K., Mitani, S., Sugahara, K. and Nomura, K., *Nature*, **423(6938)**, 443-448 (2003).
5. Sasaki, N., Okishio, K., Ui-tei, K., Saigo, K., Kinoshita-toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Hitoshi. S., Ikenaka, K. and Nishihara, S., *J. Biol. Chem.*, **283(6)**, 3594-3606 (2008).
6. Toyoda, H., Nagai, Y., Kojima, A. and Kinoshita-Toyoda, A., *Glycoconj. J.*, **34(2)**, 139-145 (2017).
7. Kawabe, K., Tateyama, D., Toyoda, H., Kawasaki, N., Hashii, N., Nakao, H., Matsumoto, S., Nonaka, M., Matsumura, H., Hirose, Y., Morita, A., Katayama, M., Sakuma, M., Kawasaki, N., Furue, MK. and Kawasaki, T., *Glycobiology*, **23(3)**, 322-336 (2013).

8. Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, PW., Beighton, G., Bello, PA., Benvenisty, N., Berry, LS., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, KG., Choo, AB., Churchill, GA., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, JS., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, RA., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, PJ., Hamilton, RS., Hampl, A., Healy, LE., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, MP., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, JL., Jones, M., Kee, K., King, BL., Knowles, BB., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, BS., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, RD., Michalska, AE., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, SL., Moore, HD., Mummery, CL., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, CM., Oh, SK., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, KY., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, MF., Piekarczyk, MS., Pera, RA., Reubinoff, BE., Robins, AJ., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, TC., Semb, H., Sherrer, ES., Siemen, H., Stacey, GN., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, TA., Young, LA. and Zhang, W., *Nat. Biotechnol.*, **25(7)**, 803-816 (2007).
9. Takahashi, K. and Yamanaka, S., *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
10. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S., *Cell*, **131(5)**, 861-872 (2007).
11. Matsumoto, S., Nakao, H., Kawabe, K., Nonaka, M., Toyoda, H., Takishima, Y., Kawabata, K., Yamaguchi, T., Furue, MK., Taki, T., Okumura, T., Yamazaki, Y.,

- Nakaya, S., Kawasaki, N. and Kawasaki, T., *J. Biol. Chem.*, **290(33)**, 20071-20085 (2015).
12. Nakao, H., Nagai, Y., Kojima, A., Toyoda, H., Kawasaki, N. and Kawasaki, T., *Glycoconj. J.*, **34(6)**, 789-795 (2017).
  13. Schopperle, WM. and DeWolf, WC., *Stem Cells*, **25(3)**, 723-730 (2007).
  14. Badcock, G., Pigott, C., Goepel, J. and Andrews, PW., *Cancer Res.*, **59(18)**, 4715-4719 (1999).
  15. Kerjaschki, D., Sharkey, DJ. and Farquhar, MG., *J. Cell. Biol.*, **98(4)**, 1591-1596 (1984).
  16. Doyonnas, R., Kershaw, DB., Duhme, C., Merkens, H., Chelliah, S., Graf, T. and McNagny, KM., *J. Exp. Med.*, **194(1)**, 13-27 (2001).
  17. Kang, HG., Lee, M., Lee, KB., Hughes, M., Kwon, BS., Lee, S., McNagny, KM., Ahn, YH., Ko, JM., Ha, IS., Choi, M. and Cheong, HI., *Exp. Mol. Med.*, 49(12) e414 (2017)
  18. Nakao, H., Matsumoto, S., Nagai, Y., Kojima, A., Toyoda, H., Hashii, N., Takakura, D., Kawasaki, N., Yamaguchi, T., Kawabata, K., Kawasaki, N. and Kawasaki, T., *Glycoconj. J.*, **34(6)**, 779-787 (2017).
  19. Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K.,

- Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M. and Hirabayashi, J., *Sci. Rep.*, **4**, 4069 (2014).
20. Nielsen, JS. and McNagny, KM., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20(8)**, 1669-1676 (2009).
21. Warren, L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **10** 153-157 (1963).
22. Angata, T. and Varki, A., *Chem. Rev.*, **102(2)**, 439-469 (2002).
23. Iwasaki, M., Inoue, S. and Troy, FA., *J. Biol. Chem.*, **265(25)**, 2596-2602 (1990).
24. Strecker, G., Wieruszeski, JM., Michalski, JC., Alonso, C., Boilly, B. and Montreuil, J., *FEBS Lett.*, **298(1)**, 39-43 (1992).
25. Strecker, G., Wieruszeski, JM., Michalski, JC., Alonso, C., Leroy, Y., Boilly, B. and Montreuil, J., *Eur. J. Biochem.*, **207(3)**, 995-1002 (1992).
26. Plancke, Y., Wieruszeski, JM., Alonso, C., Boilly, B. and Strecker, G., *Eur. J. Biochem.*, **231(2)**, 434-439 (1995).
27. Kimura, M., Hama, Y., Sumi, T., Asakawa, M., Rao, BN., Horne, AP., Li, SC., Li, YT. and Nakagawa, H., *J. Biol. Chem.*, **269**, 32138-32143 (1994).
28. Morimoto, N., Nakano, M., Kinoshita, M., Kawabata, A., Morita, M., Oda, Y., Kuroda, R. and Kakehi, K., *Anal. Biochem.*, **73(22)**, 5422-5428 (2001).
29. Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Nakamura, M. and Ohkura, Y., *Anal. Biochem.*, **164(1)**, 138-145 (1987).

30. Sherblom, AP., Bharathan, S., Hall, PJ., Smagula, RM., Moody, CE. and Anderson, GW., *Int. J. Biochem.*, **20(10)**, 1177-1183(1988).
31. Ji, S., Wang, F., Chen, Y., Yang, C., Zhang, P., Zhang, X., Troy, FA 2nd. and Wang, B., *Glycoconj J.*, **34(1)**, 21-30 (2017).
32. Hinderlich, S., Stäsche, R., Zeitler, R. and Reutter, W., *J. Biol. Chem.*, **272(39)**, 24313-24318 (1997).
33. Irie, A., Koyama, S., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Suzuki, A., *J. Biol. Chem.*, **273(25)**, 15866-15871 (1998).
34. Schauer, R., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351(7)**, 783-791 (1970).
35. Schauer, R., *Trends Biochem. Sci.*, **10(9)**, 357-360 (1985).
36. Paulson, JC., *Trends Biochem. Sci.*, **14(7)**, 272-276 (1989).
37. Rajpura, KB., Patel, PS., Chawda, JG. and Shah, RM., *J Oral Pathol. Med.*, **34(5)**, 263-267 (2005).
38. Sebzda, T., Saleh, Y., Gburek, J., Warwas, M., Andrzejak, R., Siewinski, M. and Rudnicki, J., *J. Exp. Ther. Oncol.*, **5(3)**, 223-229 (2006).
39. Feijoo, C., Páez de la Cadena M., Rodríguez-Berrocal, FJ. and Martínez-Zorzano, VS., *Cancer Lett.*, **112(2)**, 155-160 (1997).
40. Cebi, A., Mert, H. and Mert, N., *Med. Sci. Discov.*, **3(1)**, 22-27 (2016).

41. Laganà, A., Pardo-Martínez, B., Marino, A., Fago, G. and Bizzarri, M., *Clin. Chim. Acta.*, **243(2)**, 165-179 (1995).
42. Celen, O., Yildirim, E., Ozen, N. and Sonmez, C., *Neoplasma*, **53(4)**, 347-351 (2006).
43. Laitinen, A., Böckelman, C., Hagström, J., Kokkola, A., Fermér, C., Nilsson, O. and Haglund, C., *PLoS One*, **10(12)**, e0145079 (2015).
44. Kaprio, T., Fermér, C., Hagström, J., Mustonen, H., Böckelman, C., Nilsson, O. and Haglund, C., *BMC Cancer*, **14**, 494 (2014).
45. Kelley, TW., Huntsman, D., McNagny, KM., Roskelley, CD. and Hsi, ED., *Am. J. Clin. Pathol.*, **124(1)**, 134-142 (2005).
46. Schnabel, E., Dekan, G., Miettinen, A. and Farquhar, MG., *Eur. J. Cell Biol.*, **48(2)**, 313-326 (1989).
47. Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J., *Stem Cells Transl. Med.*, **2(4)**, 265-273 (2013).
48. Warren, L., *J. Biol. Chem.*, **234(8)**, 1971-1975 (1959).
49. Jourdian, GW., Dean, L. and Roseman, S., *J. Biol. Chem.*, **246(2)**, 430-435 (1971).

50. Brunetti, P., Swanson, A and Roseman, S., *Methods Enzymol.*, **6**, 465-473 (1963).
51. Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, RC. and Chait, BT., *Anal. Chem.*, **63(24)**, 1193A-1203A (1991).
52. Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Vallverdu, A., Guzman, NA. and Barbosa, J., *Anal. Chem.*, **75**, 5220–5229 (2003).
53. Zhou, GH., Luo, GA., Zhou, Y., Zhou, KY., Zhang, XD. and Huang, LQ., *Electrophoresis*, **19(13)**, 2348–2355 (1998).
54. Sottani, C., Fiorentino, M. and Minoia, C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11(8)**, 907–913 (1997).
55. Honda, S., Matsuda, Y., Takahashi, M., Kakehi, K., and Ganno, S., *Anal. Chem.*, **52(7)**, 1079-1082 (1980).
56. Hikita, T., Tadano-Aritomi, K., Iida-Tanaka, N., Toyoda, H., Suzuki, A., Toida, T., Imanari, T., Abe, T., Yanagawa, Y. and Ishizuka, I., *Anal. Biochem.*, **281(2)**, 193-201 (2000).
57. Kobayashi, K., Akiyama, Y., Kawaguchi, K., Tanabe, S. and Imanari, T., *Anal. Sci.*, **1(1)**, 81-84(1985).
58. Makatsori, E., Karamanos, NK., Anastassiou, ED., Hjerpe, A. and Tsegenidis, T., *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **21(19)**, 3031-3045 (1998).

59. Chemmalil, L., Suravajjala, S., See, K., Jordan, E., Furtado, M., Sun, C. and Hosselet, S., *J. Pharm. Sci.*, **104(1)**, 15-24 (2015).
60. Crook, M., *Clin. Biochem.*, **26(1)**, 31-38 (1993).
61. Nagai, Y., Sakakibara, I. and Toyoda, H., *Anal. Sci.*, doi: 10.2116/analsci.18P500 (2018).
62. Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., Go, M.J., Shinohara, C., Hata, K.I., Sawada, M., Yamamoto, M., Ohta, S., Ohara, Y., Yoshida, K., Kuwahara, J., Kitano, Y., Amano, N., Umekage, M., Kitaoka, F., Tanaka, A., Okada, C., Takasu, N., Ogawa, S., Yamanaka, S. and Takahashi, M., *N. Engl. J. Med.*, **376(11)**, 1038-1046 (2017).
63. Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T. and Sawa, Y., *Circulation*, **126(11 Suppl. 1)**, S29-37 (2012).
64. Iseoka, H., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Masuda, S., Yajima, S., Ito, E., Sougawa, N., Takeda, M., Harada, A., Lee, J.K. and Sawa, Y., *Tissue Eng. Part A*, **24(3-4)**, 287-300 (2018).
65. Higuchi, T., Miyagawa, S., Pearson, J.T., Fukushima, S., Saito, A., Tsuchimochi,



- H., Sonobe, T., Fujii, Y., Yagi, N., Astolfo, A., Shirai, M. and Sawa, Y., *Cell Transplant.*, **24(12)**, 2479-2489 (2015).
66. Shevinsky, LH., Knowles, BB., Damjanov, I. and Solter, D., *Cell*, **30(3)**, 697-705 (1982).
67. Kannagi, R., Levery, SB., Ishigami, F., Hakomori, S., Shevinsky, LH., Knowles, BB. and Solter, D., *J. Biol. Chem.*, **258(14)**, 8934-8942 (1983).
68. Kannagi, R., Cochran, NA., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, PW., Knowles, BB. and Solter, D., *EMBO J.*, **2(12)**, 2355-2361 (1983).
69. Andrews, PW., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D. and Avner, P., *Hybridoma*, **3(4)**, 347-361 (1984).
70. Pera, MF., Blasco-Lafita, MJ., Cooper, S., Mason, M., Mills, J. and Monaghan, P., *Differentiation*, **39(2)**, 139-149 (1988).
71. Cooper, S., Pera, MF., Bennett, W. and Finch, JT., *Biochem. J.*, **286(Pt 3)**, 959-966 (1992).
72. Meyer, K., Linker, A., Davison, EA., and Weissman, B., *J. Biol. Chem.*, **205(2)**, 611-616 (1953).
73. Funderburgh, JL., *IUBMB Life*, **54(4)**, 187-194 (2002).
74. Funderburgh, JL., *Glycobiology*, **10(10)**, 951-958 (2000).

75. Pomin, VH., Piquet, AA., Pereira, MS. and Mourão, PA., *Carbohydr. Polym.*, **90(2)**, 839-846 (2012).
76. Stuhlsatz, HW., Hirtzel, F., Keller, R., Cosma, S. and Greiling, H., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362(7)**, 841-852 (1981).
77. Antonopoulos, CA., Fransson, LA., Gardell, S. and Heinegard, D., *Acta. Chem. Scand.*, **23**, 2616-2620 (1969).
78. Eronen, I., Mononen, T. and Mononen, I., *Biochim. Biophys. Acta.*, **843(1-2)**, 155-158 (1985).
79. Krusius, T., Finne, J., Margolis, RK. and Margolis, RU., *J. Biol. Chem.*, **261(18)**, 8237-8242 (1986).
80. Margolis, RK. and Margolis, RU., *Experientia.*, **49(5)**, 429-446 (1993).
81. Seno, N., Meyer, K., Andweson, B. and Hoffman, P., *J. Biol. Chem.*, **240**, 1005-1010 (1965).
82. Bhavanandan, VP. and Meyer, K., *J. Biol. Chem.*, **243(5)**, 1052-1059 (1968).
83. Choi, HU. and Meyer, K., *Biochem. J.*, **151(3)**, 543-553 (1975).
84. Caterson, B., Christner, JE. and Baker, JR., *J. Biol. Chem.*, **285(14)**, 8848-8854 (1983).
85. Heinegård, D. and Axelsson, I., *J. Biol. Chem.*, 252(2) 1971-1979 (1977).

86. Mehmet, H., Scudder, P., Tang, PW., Hounsell, EF., Caterson, B. and Feizi, T., *Eur. J. Biochem.*, **157(2)**, 385-391 (1986).
87. Natunen, S., Satomaa, T., Pitkänen, V., Salo, H., Mikkola, M., Natunen, J., Otonkoski, T. and Valmu, L., *Glycobiology*, **21(9)**, 1125-1130 (2011).
88. Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M., *J. Biol. Chem.*, **286(23)**, 20345-20353 (2011).
89. Furue, MK., Na, J., Jackson, JP., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Hata, R., Moore, HD., Sato, JD. and Andrews, PW., *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105(36)**, 13409-13414 (2008).
90. Kershaw, DB., Beck, SG., Wharram, BL., Wiggins, JE., Goyal, M., Thomas, PE. and Wiggins, RC., *J. Biol. Chem.*, **272(25)**, 15708-15714 (1997).
91. Chägger, H. and von Jagow, G., *Anal. Biochem.*, **199(2)**, 223-231 (1991).
92. Schägger, H., *Meth. Cell Biol.*, **65**, 231-244 (2001).
93. Schägger, H., Cramer, WA. and von Jagow, G., *Anal. Biochem.*, **217(2)**, 220-230 (1994).
94. Schopperle, WM., Kershaw, DB. and DeWolf, WC., *Biochem. Biophys. Commun.*,

**300(2)**, 285-290 (2003).

95. Linden, SK., Sutton, P., Karlsson, NG., Korolik, V. and McGuckin MA., *Mucosal Immunol.*, **1(3)**, 183-197 (2008).
96. Sorrell, JM. and Caterson, B., *Development*, **106(4)**, 657-663 (1989).
97. Hoadley, ME., Seif, MW. and Aplin, JD., *Biochem. J.*, **266(3)**, 757-763 (1990).
98. Thonar, EJ., Lenz, ME., Klintworth, GK., Caterson, B., Pachman, LM., Glickman, P., Katz, R., Huff, J. and Kuettner, KE., *Arthritis Rheum.*, **28(12)**, 1367-1376 (1985).
99. Sorrell, JM., Mahmoodian, F. and Caterson, B., *Cell Tissue Res.*, **252(3)**, 523-531 (1988).
100. Poole, AR., Webber, C., Reiner, A. and Roughley, PJ., *Biochem. J.*, **260(3)**, 849-856 (1989).
101. Staprans, I. and Felts, JM., *J. Clin. Invest.*, **76(5)**, 1984-1991 (1985).
102. Melrose, J. and Ghosh, P., *Anal. Biochem.*, **170(2)**, 293-300 (1988).
103. Farndale, RW., Buttle, DJ. and Barrett, AJ., *Biochim. Biophys. Acta.*, **883(2)**, 173-177 (1986).
104. Toyoda, H., Demachi, Y., Komoriya, S., Furuya, N., Toida, T. and Imanari, T., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **46(1)**, 97-101 (1998).

105. Oguma, T., Toyoda, H., Toida, T. and Imanari, T., *Anal. Biochem.*, **290(1)**, 68-73 (2001).
106. Alisson-Silva, F., de Carvalho Rodrigues, D., Vairo, L., Asensi, KD., Vasconcelos-dos-Santos, A., Mantuano, NR., Dias, WB., Rondinelli, E., Goldenberg, RC., Urmenyi, TP. and Todeschini, AR., *Glycobiology*, **24(5)**, 458-468 (2014).
107. Tian, E. and Ten Hagen, KG., *Glycoconj. J.*, 26(3) 325-334 (2009).
108. Oeben, M., Keller, R., Stuhlsatz, HW. and Greiling, H., *Biochem. J.*, **248(1)**, 85-93 (1987).

## 論文目録

本学位論文内容は以下の発表論文による。

### 副論文目録

1. Y. Nagai, I. Sakakibara and H. Toyoda: Microdetermination of sialic acids in blood samples by hydrophilic interaction chromatography coupled to post-column derivatization and fluorometric detection., *Anal. Sci.*, doi: 10.2116/analsci.18P500 (2018).
2. H. Nakao, Y. Nagai, A. Kojima, H. Toyoda, N. Kawasaki and T. Kawasaki: Binding specificity of R-10G and TRA-1-60/81, and substrate specificity of keratanase II studied with chemically synthesized oligosaccharides., *Glycoconj. J.*, **34(6)**, 789-795 (2017).

### 参考論文目録

1. H. Nakao, S. Matsumoto, Y. Nagai, A. Kojima, H. Toyoda, N. Hashii, D. Takakura, N. Kawasaki, T. Yamaguchi, K. Kawabata, N. Kawasaki and T. Kawasaki: Characterization of glycoproteins expressing the blood group H type 1 epitope on human induced pluripotent stem (hiPS) cells., *Glycoconj. J.*, **34(6)**, 779-787 (2017).
2. H. Toyoda, Y. Nagai, A. Kojima and A. Kinoshita-Toyoda: Podocalyxin as a major pluripotent marker and novel keratan sulfate proteoglycan in human embryonic and induced pluripotent stem cells., *Glycoconj. J.*, **34(2)**, 139-145 (2017).