

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2021年9月30日(30.09.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/193199 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 14/42 (2006.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/010385

(22) 国際出願日: 2021年3月15日(15.03.2021)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2020-053296 2020年3月24日(24.03.2020) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 舘野 浩章 (TATENO Hiroaki); 〒3058560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内 1丁目9番2号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING SUGAR CHAIN

(54) 発明の名称: 糖鎖を解析する方法

(57) Abstract: A method for analyzing a sugar chain on the surface of a cell, said method comprising contacting the cell with a sugar chain-binding substance that is labeled with a nucleic acid and detecting the nucleic acid labeling the sugar chain-binding substance that binds to the cell, wherein the kind and quantity of the nucleic acid depend on the kind and quantity of the sugar chain on the surface of the cell.

(57) 要約: 細胞の表面の糖鎖を解析する方法であって、前記細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させることと、前記細胞に結合した前記糖鎖結合物質に標識された前記核酸を検出することと、を含み、前記核酸の種類及び量が、前記細胞の表面の糖鎖の種類及び量に対応する、方法。



WO 2021/193199 A1

明 細 書

発明の名称：糖鎖を解析する方法

技術分野

[0001] 本発明は、糖鎖を解析する方法に関する。より詳細には、本発明は、糖鎖を解析する方法、糖鎖を解析するためのキット及び糖鎖結合物質に関する。本願は、2020年3月24日に、日本に出願された特願2020-053296号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 細胞の表面には様々なタンパク質や脂質が存在する。これらの中には糖鎖修飾されているものも多く、細胞の表面は多種多様な糖鎖に覆われていることが知られている。

[0003] 糖鎖は、細胞間相互作用を媒介する等の機能を有しており、また、細胞の種類や状態に応じて変化することが知られている。例えば、糖鎖を細胞の未分化マーカーや癌マーカーとして利用できることが知られている。

[0004] 従来、糖鎖の解析は、レクチンや抗体を用いて細胞等を染色する方法、液体クロマトグラフィー及び質量分析装置を用いる方法、多種類のレクチンを基板上に固定化したレクチンアレイを利用する方法等により行われてきた（例えば、特許文献1を参照。）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2010/131641号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、レクチンや抗体を用いて細胞等を染色する方法では、糖鎖の全体像を把握することが困難な場合がある。また、液体クロマトグラフィー及び質量分析装置を用いる方法は、多大な労力、時間、多くのサンプルを必要とするものである。

[0007] 一方、レクチンアレイを用いる方法によれば、比較的簡便に糖鎖を解析することができる。しかしながら、細胞を破壊して抽出したタンパク質を解析するため、実際の生きた細胞のグリコームを解析することが困難な場合がある。また、500 ng程度のタンパク質を解析に用いる必要があり、1細胞レベルでの糖鎖の解析を行うことができない。このため、特に組織切片の解析が困難である。また、レクチンアレイの作製は、特殊なスポッターを用いて行われるが、ロット間差が生じてしまい、均一なレクチンアレイを作製することが困難な傾向にある。このため、レクチンアレイを用いる方法では、再現性よい解析結果を得ることが困難な場合がある。また、レクチンアレイを用いる糖鎖の解析では、検出に特殊で高価なスキャナーが必要である。このような背景のもと、本発明は、糖鎖を解析する新たな技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 細胞の表面の糖鎖を解析する方法であって、前記細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させることと、前記細胞に結合した前記糖鎖結合物質に標識された前記核酸を検出することと、を含み、前記核酸の種類及び量が、前記細胞の表面の糖鎖の種類及び量に対応する、方法。

[2] 前記糖鎖と共に、前記細胞の表現型又は前記細胞内のRNA情報を更に解析する、請求項1に記載の方法。

[3] 前記細胞に、核酸標識された前記糖鎖結合物質を接触させることが、アルブミンを含む緩衝液中で行われる、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 1細胞レベルで行われる、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記検出が、リアルタイム定量PCR、デジタルPCR又は次世代シーケンサーによるシーケンスにより行われる、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 核酸標識された糖鎖結合物質。

[7] [6]に記載の糖鎖結合物質を含む、細胞の表面の糖鎖を解析するた

めのキット。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、糖鎖を解析する新たな技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実験例1において、精製した各融合タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分離後、クマシーブリリアントブルー（CBB）染色した結果を示す写真である。

[図2]実験例1におけるアガロース電気泳動の結果を示す写真である。

[図3]実験例2において、核酸標識レクチンの調製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。

[図4]実験例3において、核酸標識レクチンの調製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。

[図5]実験例4において、核酸標識レクチンの精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。

[図6]実験例5において、核酸標識レクチンの精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。

[図7A]実験例6におけるリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。

[図7B]実験例6におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図8]実験例7におけるリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。

[図9A]実験例8におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図9B]実験例8におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図9C]実験例8におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図9D]実験例8におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフであ

る。

[図9E]実験例8におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図10]実験例9におけるフローサイトメトリー解析及びリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。

[図11A]実験例10におけるフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。

[図11B]実験例10におけるリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。

[図12]図11A及び図11Bの結果に基づいて、フローサイトメトリー解析の結果を横軸に、リアルタイム定量PCRの結果を縦軸に示したグラフである。

[図13]実験例11におけるリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。

[図14]実験例12の結果を示す図である。

[図15]実験例13の結果を示すグラフである。

[図16]実験例14の結果を示すグラフである。

[図17A]実験例15の結果を示すグラフである。

[図17B]実験例15の結果を示すグラフである。

[図18A]実験例16において、細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAを1細胞レベルで解析した代表的な結果を示すグラフである。

[図18B]実験例16において、細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAを1細胞レベルで解析した代表的な結果を示すグラフである。

[図19A]実験例17において、神経に分化誘導したiPS細胞の糖鎖プロファイルを主成分分析した結果を示すグラフである。

[図19B]は、実験例17において、神経に分化誘導したiPS細胞のマーカー遺伝子の発現量を解析した結果を示すグラフである。

[図20A]実験例17において、ヒトiPS細胞に対するrBC2LCNレクチ

ンの結合量と、27, 686種類の遺伝子群の発現量の相関係数を算出し、数値が大きい順に並べた結果を示すグラフである。

[図20B]実験例17において、各細胞に対するrBC2LCNレクチンの結合量と、各細胞におけるPOU5F1遺伝子の発現量を示す散布図である。

[図20C]実験例17において、各細胞に対するrBC2LCNレクチンの結合量と、各細胞におけるVIM遺伝子の発現量を示す散布図である。

[図21A]実験例17において、各細胞におけるPOU5F1遺伝子の発現量と、39種のレクチンの結合量との相関係数を算出し、高い順に並べた図である。

[図21B]実験例17において、各細胞におけるOTX2遺伝子の発現量と、39種のレクチンの結合量との相関係数を算出し、高い順に並べた図である。

発明を実施するための形態

[0011] [核酸標識された糖鎖結合物質]

1実施形態において、本発明は、核酸標識された糖鎖結合物質を提供する。後述するように、本実施形態の糖鎖結合物質を用いることにより、細胞の表面の糖鎖を簡便に高感度で解析することができる。

[0012] 糖鎖結合物質としては、糖鎖構造を認識して特異的に結合する物質であれば特に限定されず、例えば、レクチン、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。抗体断片としては、F(a b')₂、F a b'、F a b、F v、s c F v等が挙げられる。

[0013] 本明細書では、レクチンは糖鎖に結合する活性を有するタンパク質の総称と定義する。レクチンとしては、特に限定されず、例えば、下記表1～5に記載のレクチンを好適に使用することができる。表1～5中、「N a t u r a l」は天然物由来であることを示し、「E. c o l i」は遺伝子組み換え体であることを示す。また、「E Y L a b.」はE Yラボラトリーズ社を示し、「W a k o」は富士フイルム和光純薬株式会社を示し、「S e i k a g a k u」は生化学工業株式会社を示し、「V e c t o r」はベクターラボラトリーズ社を示し、「J O M」は株式会社Jーオイルミルズを示し、「A

「I S T」は産業技術総合研究所を示す。入手先が「A I S T」であるレクチンは発明者らが調製したものである (Tateno H., et al., Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray, J Biol Chem., 286 (23), 20345-20353, 2011. を参照。)

[0014] また、「S i a」はシアル酸を示し、「G l c N A c」はN-アセチルグルコサミンを示し、「M a n」はマンノースを示し、「G a l」はD-ガラクトースを示し、「G a l N A c」はN-アセチルガラクトサミンを示し、「F u c」はL-フコースを示し、「G l c」はD-グルコースを示し、「L a c N A c」はN-アセチルラクトサミンを示す。

[0015] レクチンとしては、糖鎖修飾されていない大腸菌由来の組み換えレクチンが好ましい。また、網羅的に糖鎖を解析するために、糖鎖を構成する単糖である S i a、G a l、G l c N A c、M a n、F u c、G a l N A c を認識するレクチンを混合して用いることが好ましい。

[0016]

[表1]

番号	レクチン名	レクチンが 由来する種	由来	入手先	特異性
1	LFA	<i>Limax flavus</i>	Natural	EY Lab.	Sia
2	WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	Natural	EY Lab.	(GlcNAc) _n , polySia
3	PVL	<i>Psathyrella velutina</i>	Natural	Wako	Sia, GlcNAc
4	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Natural	Seikagaku	α 2-3Sia
5	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Natural	Vector	α 2-3Sia
6	ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Natural	JOM	α 2-3Sia
7	rACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 2-3Sia
8	rGal8N	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 2-3Sia
9	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Natural	Seikagaku	α 2-6Sia
10	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Natural	Vector	α 2-6Sia
11	TJAI	<i>Trichosanthes japonica</i>	Natural	Vector	α 2-6Sia
12	rPSL1a	<i>Polyporus squamosus</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 2-6Sia
13	PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Natural	Seikagaku	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)
14	DSA	<i>Datura stramonium</i>	Natural	Seikagaku	GlcNAc β 1-6Man (Tetraantenna)
15	TxLcl	<i>Tulipa gesneriana</i>	Natural	JOM	Galactosylated N-glycans up to triantenna
16	ECA	<i>Erythrina crisagalli</i>	Natural	Seikagaku	β Gal
17	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Natural	Vector	β Gal
18	rGal7	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Type1 LacNAc, chondroitin polymer
19	rGal9N	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	GalNAc α 1-4Gal (A), PolyLacNAc
20	rGal9C	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	PolyLacNAc, Branched LacNAc

[0017]

[表2]

番号	レクチン名	レクチンが 由来する種	由来	入手先	特異性
21	rC14	<i>Gallus gallus domesticus</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Branched LacNAc
22	rDiscoidin II	<i>Dictyostelium dicodeum</i>	<i>E.coli</i>	AIST	LacNAc, Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc (Tn)
23	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Natural	Vector	Gal β 1-3GlcNAc(GalNAc), α / β GalNAc
24	rCGL2	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	GalNAc α 1-3Gal (A), PolyLacNAc
25	PHAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Natural	Vector	bisecting GlcNAc
26	GSLII	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Natural	Vector	GlcNAc β 1-4Man
27	rSRL	<i>Sclerotium rolfsii</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Core1,3, agalacto N-glycan
28	UDA	<i>Urtica dioica</i>	Natural	Vector	(GlcNAc) _n
29	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	Natural	Vector	(GlcNAc) _n
30	rF17AG	<i>Escherichia coli</i>	<i>E.coli</i>	AIST	GlcNAc
31	rGRFT	<i>Griffithia sp.</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Man
32	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	Natural	Seikagaku	Man α 1-3Man
33	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	Natural	Vector	M3, Man α 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man, GlcNAc β 1-2Man α 1-3(Man α 1-6)Man
34	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	Natural	Vector	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
35	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	Natural	Vector	Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
36	ASA	<i>Allium sativum</i>	Natural	JOM	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man
37	DBAI	<i>Dioscorea batatas</i>	Natural	JOM	High-man
38	CCA	<i>Castanea crenata</i>	Natural	JOM	Galactosylated N-glycans up to triantenna
39	Heltuba	<i>Helianthus tuberosus</i>	Natural	JOM	Man α 1-3Man
40	rHeltuba	<i>Helianthus tuberosus</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Man α 1-3Man

[0018]

[表3]

番号	レクチン名	レクチンが 由来する種	由来	入手先	特異性
41	ADA	<i>Allomyrina dichtoma</i>	Natural	JOM	α 2-6Sia, Forssman, A, B
42	VVAII	<i>Vicia villosa</i>	Natural	JOM	Man, Agalacto
43	rOrysata	<i>Oryza sativa</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Man α 1-3Man, Highman, biantenna
44	rPALa	<i>Phlebodium aureum</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Man5, biantenna
45	rBanana	<i>Musa acuminata</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Man α 1-2Man α 1-3(6)Man
46	rCalsepa	<i>Calystegia sepium</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Biantenna with bisecting GlcNAc
47	rRSL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1- 3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)
48	rBC2LA	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α Man, High-man
49	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
50	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)
51	rAAL	<i>Aleuria aurantia</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
52	rPAIIL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α Man, α 1-2Fuc (H), α 1- 3Fuc (Lex), α 1-4Fuc (Lea)
53	rRSIIL	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
54	rPTL	<i>Pholiota terrestris</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 1-6Fuc
55	PSA	<i>Pisum sativum</i>	Natural	Seikagaku	α 1-6Fuc up to biantenna
56	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Natural	Vector	α 1-6Fuc up to biantenna
57	rAOL	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α 1-2Fuc (H), α 1-3Fuc (Lex), α 1-3Fuc (Lea)
58	rBC2LCN	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc (GalNAc)
59	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Natural	Seikagaku	Lex, Ley
60	UEAI	<i>Ulex europaeus</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc

[0019]

[表4]

番号	レクチン名	レクチンが 由来する種	由来	入手先	特異性
61	TJAI	<i>Trichosanthes japonica</i>	Natural	Vector	α 1-2Fuc
62	MCA	<i>Momordica charantia</i>	Natural	JOM	α 1-2Fuc
63	GSLI	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Natural	Seikagaku	α GalNAc (A, Tn), α Gal (B)
64	PTLI	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Natural	Tokyo Kasei	α GalNAc (A, Tn)
65	GSLIA4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Natural	EY Lab.	α GalNAc (A, Tn)
66	rGC2	<i>Geodia cydonium</i>	<i>E. coli</i>	AIST	α 1-2Fuc (H), α GalNAc (A), α Gal (B)
67	GSLIB4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	Natural	Vector	α Gal (B)
68	rMOA	<i>Marasmius oreades</i>	<i>E. coli</i>	AIST	α Gal (B)
69	EEL	<i>Euonymus europaeus</i>	Natural	Vector	α Gal (B)
70	rPAIL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	AIST	α , β Gal, α GalNAc (Tn)
71	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Natural	Vector	Polylactosamine, (GlcNAc) _n
72	STL	<i>Solanum tuberosum</i>	Natural	Seikagaku	Polylactosamine, (GlcNAc) _n
73	rGal3C	<i>Homo sapiens</i>	<i>E. coli</i>	AIST	LacNAc, polylactosamine
74	rLSLN	<i>Laetiporus sulphureus</i>	<i>E. coli</i>	AIST	LacNAc, polylactosamine
75	rCGL3	<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>E. coli</i>	AIST	LacDiNAc
76	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T)
77	ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T)
78	HEA	<i>Hericium erinaceum</i>	Natural	JOM	Gal β 1-3GalNAc (T)
79	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Natural	Vector	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc
80	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Natural	Seikagaku	Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc α (Tn)

[0020]

[表5]

番号	レクチン名	レクチンが 由来する種	由来	入手先	特異性
81	MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Natural	Seikagaku	Gal β 1-3GalNAc (T), GalNAc α (Tn)
82	HPA	<i>Helix pomatia</i>	Natural	Seikagaku	α GalNAc (A, Tn)
83	VVA	<i>Vicia villosa</i>	Natural	Vector	α, β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
84	DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	Natural	Vector	α, β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
85	SBA	<i>Glycine max</i>	Natural	EY Lab.	α, β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
86	rPPL	<i>Pleurocybella porrigens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α, β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
87	rCNL	<i>Clitocybe nebularis</i>	<i>E.coli</i>	AIST	α, β GalNAc (A, Tn, LacDiNAc)
88	rXCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Core1,3, agalacto N-glycan
89	VVA I	<i>Vicia villosa</i>	Natural	JOM	GalNAc β 1-3(4)Gal
90	WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	Natural	Vector	Terminal GalNAc, LacDiNAc
91	rABA	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Gal β 1-3GalNAc (T), GlcNAc
92	rDiscoidin I	<i>Dictyostelium Discodeum</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Gal
93	DBAIII	<i>Dioscorea batatas</i>	Natural	JOM	Maltose
94	rMalectin	<i>Homo sapiens</i>	<i>E.coli</i>	AIST	Glc α 1-2Glc
95	CSA	<i>Oncorhynchus keta</i>	Natural	JOM	Rhamnose, Gal α 1-4Gal
96	FLAG- EW29Ch-E20K	<i>Lumbricus terrestris</i>	<i>E.coli</i>	AIST	6-sulfo-Gal

[0021] 糖鎖結合物質を標識する核酸は、例えば環状核酸であってもよく、例えば1本鎖核酸断片であってもよく、例えば2本鎖核酸断片であってもよい。環状核酸としては、例えばプラスミドDNA等が挙げられる。また、糖鎖結合物質を標識する核酸は、DNAであってもRNAであってもよいが、安定性の観点からはDNAであることが好ましい。

[0022] 特定の種類の糖鎖結合物質には特定の種類の核酸を標識することが好ましい。例えば、糖鎖結合物質の種類とこれを標識する核酸の塩基配列を対応させることにより、糖鎖結合物質をコード化することが可能となる。したがって、糖鎖結合物質を標識する核酸の塩基配列は、天然に存在しない塩基配列であることが好ましい。糖鎖結合物質を標識する核酸に特異的な塩基配列を

検出することにより、それに対応する糖鎖結合物質の存在を検出することができる。

[0023] また、糖鎖結合物質に結合した核酸をPCR等により増幅することにより、糖鎖結合物質の存在を示すシグナルを増幅することができる。これにより、例えば検出感度を高めることができる。

[0024] 糖鎖結合物質を標識する核酸が、1本鎖核酸断片又は2本鎖核酸断片である場合、その長さは、糖鎖の結合に影響を及ぼさず、対応する糖鎖結合物質を示す情報を保持することができる限り特に限定されず、例えば数十塩基（又は塩基対）から数十キロ塩基（又は塩基対）であってもよい。また、核酸はプラスミド等の環状DNAであってもよい。

[0025] 後述するように、糖鎖結合物質を標識する核酸は、リアルタイム定量PCRで検出してもよく、デジタルPCRで検出してもよく、次世代シーケンサーによるシーケンスにより検出してもよい。

[0026] したがって、糖鎖結合物質を標識する核酸は、PCR用プライマーがハイブリダイズすることが可能な塩基配列領域を更に有していることが好ましい。また、糖鎖結合物質を標識する核酸を次世代シーケンサーによるシーケンスにより検出する場合、糖鎖結合物質を標識する核酸は、ブリッジPCR、エマルジョンPCR等の次世代シーケンス用の前処理を可能にする塩基配列を更に有していることが好ましい。

[0027] 糖鎖結合物質を標識する核酸の長さは、50～100塩基であることが特に好ましい。このうち、糖鎖結合物質をコード化するための塩基配列が10～30塩基であり、その5'側及び3'側にそれぞれ10～30塩基のアダプター配列を付加することが好ましい。糖鎖結合物質をコード化するための塩基配列は、塩基の偏りがないように選択する。

[0028] また、PCR用プライマーの塩基配列は、上記アダプター配列に相補的な配列に加えて、多種類の細胞を識別するための塩基配列（5～10塩基）、及び、次世代シーケンスにおいて、フローセルにハイブリダイズさせるための塩基配列（20～30塩基）を含むことが好ましい。

[0029] 実施例において後述するように、糖鎖結合物質への核酸の結合は、例えば、糖鎖結合物質に核酸結合ドメインを連結させ、当該核酸結合ドメインに核酸を結合させることにより行ってもよいし、化学リンカーを用いて糖鎖結合物質と核酸を結合させてもよいし、クリック反応を用いて糖鎖結合物質と核酸を結合させてもよい。

[0030] 化学リンカーを利用可能とするために、核酸にはアミノ基、SH基等の官能基を導入してもよい。また、クリック反応を利用可能とするために、核酸にアジド基、アルキン基等を導入してもよい。これらの基の導入は、核酸の化学合成等により行うことができる。

[0031] また、糖鎖結合物質と核酸との間には、スペーサーが存在していてもよい。スペーサーは、特に限定されず、例えば、ポリエチレングリコール鎖、ポリアクリルアミド鎖、ポリエステル鎖、ポリウレタン鎖、これらのコポリマー等が挙げられる。スペーサーは化学リンカーに由来するものであってもよい。

[0032] また、スペーサーは切断可能な基を含んでいてもよい。例えば、実施例において後述するように、スペーサーが、光照射により切断可能な基を含んでいる場合、核酸標識された糖鎖結合物質に光を照射することにより、糖鎖結合物質から核酸を切り離して回収すること等が可能になる。

[0033] [糖鎖を解析する方法]

1 実施形態において、本発明は、細胞の表面の糖鎖を解析する方法であって、前記細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させることと、前記細胞に結合した前記糖鎖結合物質に標識された前記核酸を検出することと、を含み、前記核酸の種類及び量が、前記細胞の表面の糖鎖の種類及び量に対応する方法を提供する。

[0034] 細胞としては、特に限定されず、微生物（ウイルス、細菌、真菌）、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞等が挙げられる。また、試料として組織切片等を用いることもできる。細胞や組織切片は、細胞が生きた状態であってもよく、固定されていてもよい。

- [0035] 本実施形態の方法では、まず、解析対象の細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させる。核酸標識された糖鎖結合物質としては上述したものをを用いることができる。
- [0036] 核酸標識された糖鎖結合物質は1種類を単独で細胞に接触させてもよいし、2種類以上を混合して細胞に接触させてもよい。多種類の核酸標識された糖鎖結合物質を同時に細胞に接触させることにより、細胞の表面の糖鎖構造を網羅的に解析することが可能になる。
- [0037] 細胞と核酸標識された糖鎖結合物質との接触は、培地中、生理食塩水中、緩衝液中等の溶液中で、細胞と核酸標識された糖鎖結合物質を混合すること等により行うことができる。
- [0038] 中でも、細胞と核酸標識された糖鎖結合物質との接触を、アルブミンを含む緩衝液中で行うことが好ましい。実施例において後述するように、細胞と核酸標識された糖鎖結合物質との接触を、アルブミンを含む緩衝液中で行うことにより、検出シグナルを格段に増強させることができる。
- [0039] 緩衝液としては、トリス緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水等が挙げられる。リン酸緩衝生理食塩水の組成としては、例えば、 NaCl 137 mmol/L、 KCl 2.7 mmol/L、 Na_2HPO_4 10 mmol/L、 KH_2PO_4 1.76 mmol/Lが挙げられる。また、リン酸緩衝生理食塩水のpHは7.4程度に調整されていることが好ましい。
- [0040] アルブミンとしては、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン等を用いることができる。アルブミンは組換え体であってもよい。緩衝液中のアルブミンの濃度は0.1～10質量%程度が好ましい。
- [0041] 解析対象の細胞に接触させる、核酸標識された糖鎖結合物質の量は、細胞1個に対して、核酸標識された糖鎖結合物質1種類あたり、1分子以上を接触させればよく、細胞の表面に存在する糖鎖を飽和させることができる量であることが好ましい。
- [0042] また、解析対象の細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させる時間は、糖鎖結合物質が解析対象の細胞の表面の糖鎖に結合するのに十分な時間

であれば特に限定されず、例えば10分間～24時間程度であってもよく、例えば10分間～8時間程度であってもよく、例えば10分間～3時間程度であってもよく、例えば1時間程度であってもよい。また、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させる温度は、糖鎖結合物質が解析対象の細胞の表面の糖鎖に結合する温度であれば特に限定されず、例えば4～37℃程度であってよい。

[0043] 解析対象の細胞に核酸標識された糖鎖結合物質を接触させた結果、糖鎖結合物質が解析対象の細胞の表面の糖鎖に結合する。ここで、未反応の糖鎖結合物質を除去することが好ましい。未反応の糖鎖結合物質の除去は、例えば、緩衝液を加えて細胞を遠心して上清を除去する操作を1～数回繰り返すことにより行うことができる。

[0044] 続いて、細胞に結合した糖鎖結合物質に標識された核酸を検出する。ここで、核酸の検出は、核酸標識された糖鎖結合物質が細胞に結合した状態で行ってもよいし、核酸標識された糖鎖結合物質を細胞から解離させ、更に、核酸標識された糖鎖結合物質を細胞から分離した後に行ってもよいし、核酸標識された糖鎖結合物質から、核酸を切り離して回収した後に行ってもよい。

[0045] 核酸標識された糖鎖結合物質を細胞から解離させる方法としては、例えば、細胞に糖鎖結合物質と競合する糖を反応させる方法、界面活性剤を作用させて糖鎖結合物質と細胞の表面の糖鎖との結合を解離させる方法、pHを変化させて糖鎖結合物質と細胞の表面の糖鎖との結合を解離させる方法、還元剤を作用させて糖鎖結合物質と細胞の表面の糖鎖との結合を解離させる方法等が挙げられる。

[0046] また、上述したように、核酸と糖鎖結合物質との間に切断可能な基を導入していた場合、核酸標識された糖鎖結合物質から、核酸を切り離して回収することができる。例えば、予め核酸と糖鎖結合物質との間に光照射により切断可能な基を導入していた場合、光を照射することにより、核酸標識された糖鎖結合物質から、核酸を切り離すことができる。その後、例えば遠心分離して上清を回収することにより、核酸を回収することができる。

[0047] 細胞に結合した糖鎖結合物質に標識された核酸の検出は、例えば、リアルタイム定量PCRにより行ってもよいし、デジタルPCRにより行ってもよいし、次世代シーケンサーによるシーケンスにより行ってもよい。核酸をPCR等により増幅することにより、検出シグナルを増幅し、検出感度を高めることができる。ここで、検出された核酸の種類及び量が、細胞の表面の糖鎖の種類及び量に対応する。

[0048] ここで、核酸の種類とは、糖鎖結合物質に標識された核酸の塩基配列の種類である。核酸の種類を特定することにより、核酸が標識されていた糖鎖結合物質の種類を特定することができる。したがって、核酸の塩基配列を特定することにより、解析対象の細胞の表面に存在していた糖鎖構造を特定することができる。また、特定の塩基配列を有する核酸の量が、解析対象の細胞に結合した糖鎖結合物質の量に対応する。すなわち、特定の塩基配列を有する核酸の量が、解析対象の細胞の表面に存在する特定の糖鎖構造の量に対応する。これにより、解析対象の細胞の表面に存在する糖鎖構造の種類及び量を定量的に解析することができる。

[0049] リアルタイム定量PCR、デジタルPCR、次世代シーケンスは、汎用的な装置を用いて行うことができる。したがって、これらの装置が既に存在する場合には、糖鎖の解析のために新たに特殊な装置を用意しなくてもよい。

[0050] また、実施例において後述するように、本実施形態の方法は、検出感度が高いため、細胞の表面の糖鎖の解析を1細胞レベルで行うことも可能である。ここで、1細胞レベルで糖鎖を解析するとは、1個の細胞を試料に用いて、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させ、結合した糖鎖結合物質に標識された核酸を検出し、細胞の表面の糖鎖の種類及び量を特定することを意味する。1細胞レベルでの糖鎖の解析は、従来の方法では行うことができなかった。

[0051] また、本実施形態の方法では、細胞の表面から核酸を回収した後も細胞は生存している。このため、細胞表面の糖鎖を解析するとともに、細胞の表現型又は細胞内のRNA情報を同時に解析することができる。

[0052] 細胞の表現型としては、例えば、細胞の形態、増殖能、分化能、浸潤能、腫瘍形成能、マーカータンパク質の発現等が挙げられる。また、細胞内の遺伝子情報又は細胞の表現型も1細胞レベルで解析することが可能である。細胞内のRNA情報としては、例えば、mRNA、microRNA、16S rRNA、ノンコーディングRNA等の、塩基配列情報又は発現量の情報等が挙げられる。

[0053] [キット]

1実施形態において、本発明は、上述した、核酸標識された糖鎖結合物質を含む、細胞の表面の糖鎖を解析するためのキットを提供する。本実施形態のキットを用いることにより、上述した細胞の表面の糖鎖の解析を好適に行うことができる。

[0054] 本実施形態のキットは、核酸標識された糖鎖結合物質を1種類含んでいてもよいし、2種類以上、例えば10種類以上、例えば30種類以上、例えば50種類以上、例えば100種類以上含んでいてもよい。本実施形態のキットが、核酸標識された糖鎖結合物質を多種類含んでいると、細胞の表面に存在する糖鎖構造を網羅的に解析することが容易となるため好ましい。

[0055] 本実施形態のキットは、解析対象の細胞に、核酸標識された前記糖鎖結合物質を接触させる溶媒として、アルブミンを含む緩衝液を更に含んでいてもよい。アルブミンを含む緩衝液については、上述したものと同様である。実施例において後述するように、細胞と核酸標識された糖鎖結合物質との接触を、アルブミンを含む緩衝液中で行うことにより、バックグラウンドを抑制させることができる。

[0056] また、本実施形態のキットは、糖鎖結合物質に結合した核酸を検出するためのプライマーを更に含んでいてもよい。当該プライマーを用いたリアルタイム定量PCR、デジタルPCR、次世代シーケンス等により、糖鎖結合物質に結合した核酸を検出することができる。

実施例

[0057] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施

例に限定されるものではない。

[0058] [レクチン]

下記表 6 に示すレクチンを使用した。また、各レクチンを核酸標識する場合には、下記表 6 に示す配列番号の塩基配列からなる核酸で標識した。表 6 中、「S e i k a g a k u」は生化学工業株式会社を示し、「V e c t o r」はベクターラボラトリーズ社を示し、「A I S T」は産業技術総合研究所を示し、「W a k o」は富士フイルム和光純薬株式会社を示し、「J O M」は株式会社 Jーオイルミルズを示す。また、「リアルタイム P C R 用」は、後述する実験例においてリアルタイム P C R 解析に用いた塩基配列の配列番号であることを示し、「次世代シーケンス用」は、後述する実験例において次世代シーケンスに用いた塩基配列の配列番号であることを示す。

[0059]

[表6]

レクチン名	レクチンのアミノ酸配列の配列番号	入手先	標識した核酸の塩基配列の配列番号	
			リアルタイムPCR用	次世代シーケンス用
SNA	—	Seikagaku	16	17
ConA	—	Vector	23	24
GSLII	—	Vector	18	19
rBC2LCN	1	AIST	8	9
rAAL	20	AIST	21	22
rABA	10	AIST	11	12
rLSLN	13	AIST	14	15
rPSL1a	—	AIST	25	26
rDiscoidinI	—	AIST	27	28
rF17AG	—	AIST	29	30
rPVL	—	Wako	31	32
rCGL2	—	AIST	33	34
rPAIL	—	AIST	35	36
rPPL	—	AIST	37	38
rRSII	—	AIST	39	40
rCNL	—	AIST	41	42
WFA	—	Vector	43	44
HPA	—	Seikagaku	45	46
SSA	—	Vector	47	48
rOryzata	—	AIST	49	50
rPALa	—	AIST	51	52
rDiscoidinII	—	AIST	53	54
CSA	—	JOM	55	56
rGRFT	—	AIST	57	58
rSRL	—	AIST	59	60
rAOL	—	AIST	—	61
rBanana	—	AIST	—	62
rBC2LA	—	AIST	—	63
rC14	—	AIST	—	64
rCalsepa	—	AIST	—	65
rGal3C	—	AIST	—	66
rGC2	—	AIST	—	67
rMalectin	—	AIST	—	68
rMOA	—	AIST	—	69
rPTL	—	AIST	—	70
rRSL	—	AIST	—	71
TJAI	—	Vector	—	72
TJAI	—	Vector	—	73
UEAI	—	Vector	—	74

[0060] [実験例 1]

(核酸標識レクチンの調製 1)

核酸標識レクチンの調製を試みた。まず、レクチンと核酸結合ドメインとの融合タンパク質を調製した。レクチンとして、BC2LCNレクチンを使用した。BC2LCNレクチンのアミノ酸配列を配列番号1に示す。

[0061] また、核酸結合ドメインとして、アルギニン残基が4個連続したペプチド（配列番号2、以下、「R4」という。）、アルギニン残基が5個連続したペプチド（配列番号3、以下、「R5」という。）、アルギニン残基が6個連続したペプチド（配列番号4、以下、「R6」という。）、アルギニン残基が7個連続したペプチド（配列番号5、以下、「R7」という。）、アルギニン残基が10個連続したペプチド（配列番号6、以下、「R10」という。）、及び、ミトコンドリア転写因子A（TFAM）のHMG Box Aドメイン（配列番号7、以下、「TFAM」という。）を使用した。なお、アルギニンは塩基性であり、リン酸部分を持つ核酸と結合しやすいことが知られている。

[0062] まず、各核酸結合ドメインをC末端側に結合させた、組換えBC2LCNレクチン（以下、「rBC2LCN」という。）の融合タンパク質を大腸菌で発現させて精製した。各融合タンパク質のN末端側にはFLAGタグを導入した。

[0063] 図1は、精製した各融合タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分離後、クマシーブリリアントブルー（CBB）染色した結果を示す写真である。

[0064] 図1中、「M」は分子量マーカーを示し、「FLAG-rBC2LCN」は核酸結合ドメインを有しない融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-R4」は「R4」を連結した融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-R5」は「R5」を連結した融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-R6」は「R6」を連結した融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-R7」は「R7」を連結した融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-R10」は「R10」を連結した融合タンパク質を示し、「FLAG-rBC2LCN-TFAM」は「TFAM」を連結した融合タンパク質を示す。

[0065] 続いて、精製した各融合タンパク質とプラスミドDNA（pCR2.1）との結合性を解析した。具体的には、プラスミドDNA（pCR2.1）

1 μ g と、1、2、3、4、5 μ g の各融合タンパク質を混合し、アガロース電気泳動に供した。

[0066] 図2は、アガロース電気泳動の結果を示す写真である。図2中、「M」は分子量マーカーを示し、「rBC2LCN」は核酸結合ドメインを有しない融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-R4」は「R4」を連結した融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-R5」は「R5」を連結した融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-R6」は「R6」を連結した融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-R7」は「R7」を連結した融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-R10」は「R10」を連結した融合タンパク質を示し、「rBC2LCN-TFAM」は「TFAM」を連結した融合タンパク質を示す。

[0067] その結果、アルギニン残基5個以上又はTFAMを融合させた融合タンパク質は、プラスミドDNAと結合することが明らかとなった。したがって、レクチンと核酸結合ドメインとの融合タンパク質に、核酸を混合することにより、核酸標識レクチンを調製することができることが明らかとなった。

[0068] [実験例2]

(核酸標識レクチンの調製2)

市販のキット (Protein-oligo conjugation kit、カタログ番号「S-9011-1」、Solulink社) を用いて、核酸標識レクチンの調製を試みた。

[0069] このキットでは、まず、5'末端又は3'末端がアミノ基修飾されたオリゴヌクレオチドのアミノ基に、N-スクシンイミジル-4-ホルミルベンズアミド (以下、「S-4FB」という。) を結合させて4-ホルミルベンズアミド (4FB) 化オリゴヌクレオチド (「4FB-オリゴヌクレオチド」) を調製する。

[0070] また、タンパク質に、スクシンイミジル-4-ヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン (以下、「S-HyNic」という。) を結合させてヒドラジノニコチネートアセトンヒドラゾン (HyNic) 化タンパク質 (「H

y N i c ータンパク質」) を調製する。

[0071] 続いて、上記4 F B ーオリゴヌクレオチドと上記H y N i c ータンパク質を混合すると、両者が共有結合し、核酸標識タンパク質を得ることができる。

[0072] 本実験例では、キットの説明書にしたがって、r B C 2 L C Nにオリゴヌクレオチドを結合させ、核酸標識レクチンを調製した。レクチンとして、r B C 2 L C Nを使用した。また、核酸として、配列番号8に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用した。

[0073] 図3は、核酸標識レクチンの調製の各過程の試料をS D S ーP A G Eに供し、銀染色した結果を示す写真である。図3中、「4 F B ーo l i g o」は4 F B 化したオリゴヌクレオチドを表し、「H y N i c ーr B C 2 L C N」はH y N i c 化したr B C 2 L C Nを表し、「C r u d e c o m p l e x」は未精製の反応物を表し、「P u r i f i e d c o m p l e x (c o n c)」は精製し濃縮した反応物を表す。また、「*」はオリゴヌクレオチドが結合したr B C 2 L C Nを示し、矢印はオリゴヌクレオチドが結合していないr B C 2 L C Nを示す。

[0074] その結果、最終産物(P u r i f i e d c o m p l e x (c o n c))において、オリゴヌクレオチドが結合して分子量が大きくなったr B C 2 L C Nが検出された。この結果から、市販のキットを使用することにより、核酸標識レクチンを調製することができることが明らかとなった。

[0075] [実験例3]

(核酸標識レクチンの調製3)

アジド基とアルキン基とのクリック反応を利用して、核酸標識レクチンの調製を試みた。具体的には、まず、r B C 2 L C Nに、15倍、30倍及び50倍モル濃度のジベンゾシクロオクチンーNーヒドロキシスクシンイミジルエステル(N H S ーD B C O)を、それぞれ室温で1時間反応させ、D B C O化した。続いて、D B C O化した各r B C 2 L C Nに、10倍モル濃度のアジド化オリゴヌクレオチド(配列番号8)を混合し、4℃で一晩反応さ

せた。オリゴヌクレオチドは5'末端をアジド化修飾した。

[0076] 図4は、各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。図4中、「DBCO-rBC2LCN」はDBCO化したrBC2LCNを表し、「15×」、「30×」、「50×」は、それぞれ15倍、30倍、50倍モル濃度のNHS-DBCOを反応させた結果であることを表し、「Crude complex」は未精製の反応物を表す。また、「*」はオリゴヌクレオチドが結合したrBC2LCNを示し、矢印はオリゴヌクレオチドが結合していないrBC2LCNを示す。

[0077] その結果、オリゴヌクレオチドが結合して分子量が大きくなったrBC2LCNが検出された。この結果から、クリック反応により、効率よく核酸標識レクチンを調製することができることが明らかとなった。

[0078] [実験例4]

(核酸標識レクチンの調製4)

アジド基とアルキン基とのクリック反応を利用して、核酸標識レクチンを調製した。具体的には、まず、rBC2LCNに2倍モル濃度のジベンゾシクロオクチン-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS-DBCO)を室温で1時間反応させ、DBCO化した。続いて、DBCO化したrBC2LCNに、10倍モル濃度のアジド化オリゴヌクレオチド(配列番号8)を混合して4℃で一晩反応させ、核酸標識レクチンを得た。オリゴヌクレオチドは5'末端をアジド化修飾した。続いて、フコースセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで核酸標識レクチンを精製した。

[0079] 図5は、核酸標識レクチンの精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。図5中、「DBCO-rBC2LCN」はDBCO化したrBC2LCNを表し、「Crude complex」は未精製の核酸標識レクチンを表す。また、「Through」は、アフィニティークラムを通過した試料を表し、「Wash1」、「Wash2」、「Wash3」は、それぞれ洗浄1回目、2回目、3回目の洗浄液を表し、「Elute1」、「Elute2」、「Elute3」は、それぞれ

溶出1回目、2回目、3回目の溶出液を表す。また、「*」はオリゴヌクレオチドが結合した $rBC2LCN$ を示し、矢印はオリゴヌクレオチドが結合していない $rBC2LCN$ を示す。

[0080] その結果、オリゴヌクレオチドが結合して分子量が大きくなった $rBC2LCN$ が検出された。この結果から、クリック反応により、核酸標識レクチンが調製されたことが確認された。

[0081] 続いて、 $rBC2LCN$ と同様の方法により、 $ABAL$ レクチンの組換え体（ $rABA$ ）、 $LSLN$ レクチンの組換え体（ $rLSLN$ ）、 SNA レクチン（カタログ番号「L-1300」、Vector社）、 $GSLII$ レクチン（カタログ番号「L-1210」、Vector社）、 AAL レクチンの組換え体（ $rAAL$ ）、コンカナバリンA（ConA、カタログ番号「300036」、生化学工業社）に、上記表6に示すオリゴヌクレオチドを結合させた核酸標識レクチンをそれぞれ調製した。

[0082] 各レクチンは、各レクチンが結合する糖をそれぞれ固定化したセファロースビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。具体的には、 $rABA$ の精製にはN-アセチルグルコサミンを固定化したセファロースビーズを使用し、 $rLSLN$ の精製にはガラクトースを固定化したセファロースビーズを使用し、 SNA の精製にはラクトースを固定化したセファロースビーズを使用し、 $GSLII$ の精製にはN-アセチルグルコサミンを固定化したセファロースビーズを使用し、 $rAAL$ の精製にはフコースを固定化したセファロースビーズを使用し、ConAの精製にはマンノースを固定化したセファロースビーズを使用した。

[0083] 精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果、 $rABA$ 、 $rLSLN$ 、 SNA 、 $GSLII$ 、 $rAAL$ 、ConAのそれぞれを核酸標識できたことが確認された。

[0084] [実験例5]

（核酸標識レクチンの調製5）

アジド基とアルキン基とのクリック反応を利用して、光照射により核酸を

遊離させることが可能な核酸標識レクチンを調製した。具体的には、まず、 $rBC2LCN$ に16倍モル濃度の $NHS-PC-DBCO$ エステル（カタログ番号「1160」、クリックケミストリーツールズ社）を室温で1時間反応させ、 $PC-DBCO$ 化した。

[0085] 続いて、 $PC-DBCO$ 化した $rBC2LCN$ に、10倍モル濃度のアジド化オリゴヌクレオチド（配列番号8）を混合して4℃で一晩反応させ、核酸標識レクチンを得た。オリゴヌクレオチドは5'末端をアジド化修飾した。続いて、フコースセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーで核酸標識レクチンを精製した。

[0086] 図6は、核酸標識レクチンの精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果を示す写真である。図5中、「 $PC-DBCO-rBC2LCN$ 」は $PC-DBCO$ 化した $rBC2LCN$ を表し、「Through」は、アフィニティークラムを通過した試料を表し、「Wash1」、「Wash2」、「Wash3」は、それぞれ洗浄1回目、2回目、3回目の洗浄液を表し、「Elute1」、「Elute2」、「Elute3」は、それぞれ溶出1回目、2回目、3回目の溶出液を表す。また、「*」はオリゴヌクレオチドが結合した $rBC2LCN$ を示し、矢印はオリゴヌクレオチドが結合していない $rBC2LCN$ を示す。

[0087] その結果、オリゴヌクレオチドが結合して分子量が大きくなった $rBC2LCN$ が検出された。この結果から、クリック反応により、光照射により核酸を遊離させることが可能な核酸標識レクチンが調製されたことが確認された。

[0088] 続いて、 $rBC2LCN$ と同様の方法により、 $rABA$ 、 $rLSLN$ 、 SNA レクチン（カタログ番号「L-1300」、Vector社）、 $GSLII$ レクチン（カタログ番号「L-1210」、Vector社）、 $rAAL$ 、コンカナバリンA（ConA、カタログ番号「300036」、生化学工業社）に、上記表6に示すオリゴヌクレオチドを光照射により開裂可能に結合させた核酸標識レクチンをそれぞれ調製した。

[0089] 各レクチンは、各レクチンが結合する糖をそれぞれ固定化したセファロースビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製の各過程の試料をSDS-PAGEに供し、銀染色した結果、rABA、rLSLN、SNA、GSLII、rAAL、ConAのそれぞれに、各オリゴヌクレオチドを光照射により開裂可能に結合できたことが確認された。

[0090] [実験例6]

(核酸標識レクチンと細胞との反応条件の検討)

核酸標識レクチンと細胞との反応条件を検討した。具体的には、以下の方法1及び方法2の条件で核酸標識レクチンと細胞とを反応させ、比較した。

[0091] 《方法1》

核酸標識レクチンとして、実験例4と同様にして調製した、核酸標識rBC2LCNレクチンを使用した。また、細胞として、いずれもヒト膵臓癌由来細胞である、MIA PaCa-2細胞、BxPC-3細胞及びCapan-1細胞を用いた。

[0092] まず、 1×10^5 個の各細胞を、ウシ血清アルブミン(BSA)を1質量%含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(以下、「BSA-PBS」という場合がある。) $100 \mu\text{L}$ にそれぞれ懸濁した。続いて、 100 ng の核酸標識rBC2LCNレクチンを、各細胞懸濁液に添加し、 4°C で1時間反応させた。続いて、各細胞を 1 mL のBSA-PBSで3回洗浄後、 $200 \mu\text{L}$ のBSA-PBSに懸濁した。

[0093] 続いて、 1×10^4 個の生きた細胞を新しいチューブにとり、遠心して上清を除き、 0.2 M フコース $100 \mu\text{L}$ を加えて 4°C で30分間反応させ、核酸標識rBC2LCNレクチンを細胞から遊離させた。続いて、 15000 rpm で10分間遠心して、上清を回収し、リアルタイム定量PCRでrBC2LCNレクチンに結合したオリゴヌクレオチドを定量した。

[0094] また、比較のために、R-フィコエリスリン標識したrBC2LCNレクチンで各細胞を染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

[0095] 《方法2》

方法2では、核酸標識レクチン及び細胞の反応を、BSA-PBS中ではなく、OptiMEM培地中で行った点において、方法1と主に異なっていた。

[0096] 核酸標識レクチン及び細胞として、方法1と同様のものを使用した。まず、 1×10^5 個の各細胞を、OptiMEM培地（サーモフィッシュサイエントフィック社） $100 \mu\text{L}$ にそれぞれ懸濁した。続いて、 100 ng の核酸標識rBC2LCNレクチンを、各細胞懸濁液に添加し、 4°C で1時間反応させた。続いて、各細胞を 1 mL のBSA-PBSで3回洗浄後、 $200 \mu\text{L}$ のPBSに懸濁した。

[0097] 続いて、 1×10^4 個の生きた細胞を新しいチューブにとり、遠心して上清を除き、 0.2 M フコース $100 \mu\text{L}$ を加えて 4°C で30分間反応させ、核酸標識rBC2LCNレクチンを細胞から遊離させた。

[0098] 続いて、 15000 rpm で10分間遠心して、上清を回収し、リアルタイム定量PCRでrBC2LCNレクチンに結合したオリゴヌクレオチドを定量した。

[0099] 図7Aは、リアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。図7A中、「BSA-PBS」は方法1の結果であることを示し、「OptiMEM」は方法2の結果であることを示す。その結果、方法1を使用する方が高い感度で細胞とレクチンとの結合を検出できることが明らかとなった。

[0100] また、図7Bは、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。その結果、図7Aに示すリアルタイム定量PCRによる解析結果は、フローサイトメトリー解析の結果と一致し、rBC2LCNレクチンはCapa-1細胞に最も高い反応性を示し、BxPC-3細胞にも反応したが、M1APaCa-2細胞には反応しなかったことが明らかとなった。

[0101] [実験例7]

（光照射による核酸の遊離条件の検討）

光照射により核酸を遊離させることが可能な核酸標識レクチンから、核酸を遊離させる条件を検討した。核酸標識レクチンとして、実験例5と同様に

して調製した、核酸標識 rBC2LCNレクチンを使用した。また、細胞として、ヒト膵臓癌由来細胞であるCapan-1細胞を用いた。

[0102] まず、 1×10^5 個の細胞をBSA-PBS 100 μ Lに懸濁した。続いて、100 ngの核酸標識 rBC2LCNレクチンを、細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0103] 続いて、細胞を 1×10^4 個ずつ新しいチューブにとり、紫外線（UV）照射装置（カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社）を用いて、波長365 nmにピーク波長を有する紫外線を15 Wで5分間、10分間又は15分間照射してオリゴヌクレオチドを遊離させた。続いて、15000 rpmで10分間遠心して上清を回収し、リアルタイム定量PCRでrBC2LCNレクチンに結合したオリゴヌクレオチドを定量した。

[0104] また、比較のために、紫外線照射せず直ちに遠心して上清を回収した試料、紫外線照射せずに室温で15分間放置後遠心して上清を回収した試料、及び0.2 Mフコース100 μ Lを加えて4℃で15分間反応させ、核酸標識 rBC2LCNレクチンを細胞から遊離させた後、遠心して上清を回収した試料についても、リアルタイム定量PCRでrBC2LCNレクチンに結合したオリゴヌクレオチドを定量した。

[0105] 図8は、リアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。図8中、「照射なし0分」は、紫外線照射せずに15000 rpmで10分間遠心して上清を回収した試料の結果であることを表し、「照射なし15分」は、紫外線照射せずに室温で15分間放置後、15000 rpmで10分間遠心して上清を回収した試料の結果であることを表し、「対照15分」は、0.2 Mフコース100 μ Lを加えて4℃で15分間反応させ、核酸標識 rBC2LCNレクチンを細胞から遊離させた後、15000 rpmで10分間遠心して上清を回収した試料の結果であることを表す。

[0106] その結果、紫外線を15分照射した場合に、最も多くのオリゴヌクレオチドを遊離させることができることが明らかとなった。

[0107] [実験例 8]

(核酸標識レクチンの反応性の検討 1)

核酸標識していない通常のレクチン及び核酸標識レクチンの反応性に違いが認められるか否かについて検討した。

[0108] 具体的には、通常のレクチン（非標識レクチン）及び核酸標識レクチンを、それぞれフルオレセインイソチオシアネート（FITC）で標識して細胞に反応させ、フローサイトメトリー解析を行った。

[0109] 非標識レクチンとしては、GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNAを使用した。また、核酸標識レクチンとしては、実験例 4 と同様にして調製した、上記と同じレクチン（GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA）の核酸標識体を使用した。また、細胞としては、いずれもヒト膵臓癌由来細胞である、SUIT-2 細胞、AsPC-1 細胞、BxPC-3 細胞、MIPaCa-2 細胞及びCapan-1 細胞を使用した。

[0110] まず、各細胞を 1×10^5 個ずつ BSA-PBS $100 \mu\text{L}$ にそれぞれ懸濁してチューブに分注した。続いて、 100 ng の非標識レクチン（GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA）又は核酸標識レクチン（GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA）を、それぞれ各細胞懸濁液に添加し、 4°C で 1 時間反応させた。続いて、各細胞を 1 mL の BSA-PBS で 3 回洗浄後、 $500 \mu\text{L}$ の BSA-PBS に懸濁した。

[0111] 続いて、各細胞をフローサイトメトリー解析し、細胞への各レクチンの結合量を測定し、それぞれのレクチンについて、非標識体と核酸標識体の反応性の相関性について調べた。図 9A～図 9E は、フローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図 9A は SUIT-2 細胞の結果であり、図 9B は AsPC-1 細胞の結果であり、図 9C は BxPC-3 細胞の結果であり、図 9D は MIPaCa-2 細胞の結果であり、図 9E は Capan-1 細胞の結果である。また、図 9A～図 9E 中、横軸は非標識レクチン（G

SLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA)の結合量(平均蛍光強度)を示し、縦軸は核酸標識レクチン(GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA)の結合量(平均蛍光強度)を示す。

[0112] その結果、非標識レクチン及び核酸標識レクチンの各細胞への反応性は、それぞれ高い相関性を示すことが明らかとなった。この結果から、レクチンを核酸標識しても、レクチンの反応性が変化しないことが確認された。

[0113] [実験例9]

(核酸標識レクチンの反応性の検討2)

核酸標識レクチンを細胞と反応させ、その結合量をフローサイトメトリー解析及びリアルタイム定量PCR解析により測定して比較した。

[0114] 核酸標識レクチンとしては、実験例5と同様にして調製した、光照射により核酸を遊離させることが可能な核酸標識レクチン(GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA)を使用した。また、細胞としては、ヒト膵臓癌由来細胞であるCapan-1細胞を使用した。

[0115] まず、細胞を 1×10^5 個ずつBSA-PBS 100 μ Lに懸濁してチューブに分注した。続いて、100 ngの核酸標識レクチン(GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNA)を、各細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、500 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0116] 続いて、各細胞の一部をフローサイトメトリー解析し、残りの一部をリアルタイム定量PCRに供して、細胞へのレクチンの結合量を測定した。リアルタイム定量PCRは次のようにして行った。まず、細胞の一部に紫外線(UV)照射装置(カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社)を用いて、波長365 nmにピーク波長を有する紫外線を15 Wで15分間照射してオリゴヌクレオチドを遊離させた。続いて、15000 rpmで10分間遠心して上清を回収し、リアルタイム定量PCRで遊離したオリゴヌクレオチドを定量した。

[0117] 図10は、フローサイトメトリー解析及びリアルタイム定量PCRの結果

を示すグラフである。図10中、「qPCR」はリアルタイム定量PCRの結果（オリゴヌクレオチド量）を表し、「FACS」はフローサイトメトリー解析の結果（平均蛍光強度）を表す。

[0118] その結果、フローサイトメトリー解析の結果及びリアルタイム定量PCRの結果は高い相関性を示すことが明らかとなった。この結果から、核酸標識レクチンを用いたリアルタイム定量PCRにより、フローサイトメトリー解析と同様の結果を得ることができることが明らかとなった。

[0119] [実験例10]

（核酸標識レクチンの反応性の検討3）

複数のレクチンを細胞に反応させ、その結合をフローサイトメトリー解析及びリアルタイム定量PCRにより解析した。具体的には、それぞれフルオレセインイソチオシアネート（FITC）で標識した、GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNAを、それぞれCapan-1細胞に反応させ、フローサイトメトリー解析を行った。

[0120] まず、Capan-1細胞を 1×10^5 個ずつBSA-PBS 100 μ Lにそれぞれ懸濁してチューブに分注した。続いて、100 ngの各FITC標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。続いて、各細胞をフローサイトメトリー解析し、細胞への各レクチンの結合量を測定した。

[0121] また、実験例5と同様にしてそれぞれ核酸標識した、GSLII、rABA、rBC2LCN、rLSLN、SNAを、それぞれCapan-1細胞に反応させ、結合したレクチンをリアルタイム定量PCRにより測定した。

[0122] 具体的には、まず、Capan-1細胞を 1×10^5 個ずつBSA-PBS 100 μ Lにそれぞれ懸濁してチューブに分注した。続いて、100 ngの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、500 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0123] 続いて、各細胞に紫外線（UV）照射装置（カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社）を用いて、波長365nmにピーク波長を有する紫外線を15Wで15分間照射してオリゴヌクレオチドを遊離させた。続いて、15000rpmで10分間遠心して上清を回収し、リアルタイム定量PCRで遊離したオリゴヌクレオチドをそれぞれ定量した。

[0124] 図11Aはフローサイトメトリー解析の結果を示すグラフである。図11A中、「MFI」は測定された蛍光強度の平均値を示す。また、図11Bはリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。また、図12は、図11A及び図11Bの結果に基づいて、フローサイトメトリー解析の結果を横軸に、リアルタイム定量PCRの結果を縦軸に示したグラフである。

[0125] その結果、フローサイトメトリー解析の結果とリアルタイム定量PCRの結果は高い相関性を示すことが確認された。この結果は、核酸標識レクチンを細胞に反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を検出することにより、細胞へのレクチンの結合を解析できることを更に支持するものである。

[0126] [実験例11]

（核酸標識レクチンの反応性の検討4）

核酸標識レクチンを、段階希釈した細胞と反応させ、その結合量をリアルタイム定量PCR解析により測定した。

[0127] 核酸標識レクチンとしては、実験例5と同様にして調製した、光照射により核酸を遊離させることが可能な核酸標識rBC2LCNレクチンを使用した。また、細胞としては、ヒト膵臓癌由来細胞であるCapan-1細胞を使用した。

[0128] まず、10,000個、1,000個、100個、10個、1個及び0個のCapan-1細胞を、それぞれBSA-PBS 100μLに懸濁してチューブに入れた。続いて、100ngの核酸標識rBC2LCNレクチンを、各細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各細胞を1mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200μLのBSA-PBSに懸濁し

た。

[0129] 続いて、各細胞に紫外線（UV）照射装置（カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社）を用いて、波長365nmにピーク波長を有する紫外線を15Wで15分間照射してオリゴヌクレオチドを遊離させた。続いて、15000rpmで10分間遠心して上清を回収し、リアルタイム定量PCRで遊離したオリゴヌクレオチドをそれぞれ定量した。

[0130] 図13はリアルタイム定量PCRの結果を示すグラフである。図13中、「対照」は、核酸標識rBC2LCNレクチンを添加せずに一連の反応を行った試料の結果である。その結果、核酸標識レクチンを細胞に反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を検出することにより、細胞1個に対しても、レクチンの結合を解析できることが明らかとなった。

[0131] [実験例12]

（核酸標識レクチンの反応性の検討5）

複数種類の核酸標識レクチンの混合物を、100,000個の細胞に反応させ、そのうち10,000個の細胞に結合した核酸を、次世代シーケンサーを用いて解析した。核酸標識レクチンとしては、実験例4と同様にして調製した、核酸標識レクチン（SNA、ConA、GSLII、rBC2LCN、rAAL、rABA、rLSLN、rPSL1a、rDiscoidinI、rF17AG、rPVL、rCGL2、rPAIL、rPPL、rRSSIL、rCNL、WFA、HPA、SSA、rOryzata、rPALa、rDiscoidinII、CSA、rGRFT、rSRL、rAOL、rBanana、rBC2LA、rC14、rCalsepa、rGal3C、rGC2、rMalectin、rMOA、rPTL、rRSL、TJAII、TJAIII、UEAI）及びポドカリキシン（PODXL）抗体（R&Dシステムズ社製）を使用した。また、細胞としては、ヒト膵臓癌由来細胞である、Capan-1細胞、BxPC-3細胞、PANC-1細胞、AsPC1細胞、並びに、CHO細胞及びCHO細胞の変異細胞であるLec1、Lec2、Lec8を用いた。

[0132] まず、各細胞を100,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lにそれぞれ懸濁してチューブに分注した。続いて、50 ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。続いて、細胞数を測定し、そのうち10,000個の細胞を新しいチューブに移した。続いて、遠心して上清を除いた後、100 μ LのPBSに懸濁した。続いて、紫外線(UV)照射装置(カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社)を用いて、波長365 nmにピーク波長を有する紫外線を15 Wで15分間照射してオリゴヌクレオチドを遊離させ、遠心後に上清を回収した。続いて、これをテンプレートとしてPCR反応を行い、次世代シーケンサーで解析した。

[0133] 次世代シーケンサーでのシーケンスを行うにあたり、次のような操作を行った。15 indexプライマー(配列番号75)と17 indexプライマー(配列番号76)でPCRを行い、増幅されたPCR産物を精製、濃縮後、精製度と濃度をDNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置(島津製作所社)で確認した。続いて、各細胞に結合した核酸標識レクチンに標識された核酸の塩基配列を、次世代シーケンサー(製品名「MiSeq」、イルミナ社)を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。また、配列番号75及び76中の「nnnnnnnnnn」(ここで、「n」は「a」、「t」、「g」又は「c」を表す。)は、細胞毎に異なる配列とし、細胞の識別に用いた。

[0134] 図14は、各レクチンに標識された核酸の塩基配列のリード数を用いてクラスタ解析を行った結果を示す図である。

[0135] その結果、10,000個の細胞に核酸標識レクチンを反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を次世代シーケンサーでシーケンスすることにより、細胞へのレクチンの結合を解析できることが明らかとなった。さらに、それぞれの細胞でレクチンとの反応パターンが異なることも明らかとなった。

[0136] [実験例 13]

(核酸標識レクチンの反応性の検討6)

複数種類の核酸標識したレクチンの混合物を、10,000個の細胞及び1個の細胞にそれぞれ反応させ、次世代シーケンサーを用いてその結合を解析した。核酸標識レクチンとしては、実験例4と同様にして調製した、核酸標識レクチン(SNA、ConA、GSLII、rBC2LCN、rAAL、rABA、rLSLN、rPSL1a、rDiscoidinI、rF17AG、rPVL、rCGL2、rPAIL、rPPL、rRSIIL、rCNL、WFA、HPA、SSA、rOryzata、rPALa、rDiscoidinII、CSA、rGRFT、rSRL、rAOL、rBanana、rBC2LA、rC14、rCalsepa、rGal3C、rGC2、rMalectin、rMOA、rPTL、rRSL、TJAI、TJAIL、UEAI)及びポドカリキシン(PODXL)抗体を使用した。また、細胞としては、ヒトiPS細胞株である201B7を用いた。

[0137] まず、ヒトiPS細胞を100,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lに懸濁してチューブに分注した。続いて、0.5ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、細胞を1mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0138] 続いて、細胞を10,000個及び1個分注し、細胞に結合した核酸標識レクチンに標識された核酸の塩基配列を、次世代シーケンサー(製品名「MiSeq」、イルミナ社)を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。

[0139] 図15は、得られたリード数を主成分分析した結果を示すグラフである。図15中、「PC1」はPrinciple component 1(主成分1)を示し、「PC2」はPrinciple component 2(主成分2)を示す。また、グラフ中、黒丸は細胞1個レベルで解析した結果を示し、白丸は細胞10,000個レベルで解析した結果を示す。

[0140] その結果、細胞に核酸標識レクチンの混合物を反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を次世代シーケンサーでシーケンスすることにより、細胞1個レベルで細胞へのレクチンの結合を解析できることが明らかとなった。また、細胞1個レベルでの解析結果は、10,000個の細胞の解析結果と類似しているものの、かなりヘテロな糖鎖を持つ細胞集団であることが明らかとなった。

[0141] [実験例14]

(核酸標識レクチンの反応性の検討7)

複数種類の核酸標識レクチンの混合物を、10,000個の微生物の細胞にそれぞれ反応させ、次世代シーケンサーを用いてその結合を解析した。核酸標識レクチンとしては、実験例4と同様にして調製した、核酸標識レクチン(rBC2LCN、rAAL、rABA、rLSLN、rPSL1a、rDiscoidin1、rF17AG、rPVL、rCGL2、rPAIL、rPPL、rRSIIL、rCNL、WFA、HPA、SSA、rOryzata、rPALa、rDiscoidin11)を使用した。また、微生物としては、大腸菌、デインコッカス・ラディオデュランス、出芽酵母(サッカロマイセス・セレビシエ)を使用した。

[0142] まず、各微生物を1,000,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lにそれぞれ懸濁してチューブに分注した。続いて、0.5ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、各微生物を1mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0143] 続いて、各微生物を100,000個分注し、各微生物に結合した核酸標識レクチンに標識された核酸の塩基配列を、次世代シーケンサー(製品名「MiSeq」、イルミナ社)を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。シーケンスは、各微生物毎に独立して3回ずつ行った。

[0144] 図16は、各レクチンに標識された核酸の塩基配列のリード数をそれぞれ

示すグラフである。図16中、「E. coli」は大腸菌を示し、「D. radii」はデインコッカス・ラディオデュランスを示し、「S. cerev」はサッカロマイセス・セレビシエを示す。

[0145] その結果、微生物の細胞に核酸標識レクチンを反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を次世代シーケンサーでシーケンスすることにより、微生物1個レベルで微生物へのレクチンの結合を解析できることが明らかとなった。

[0146] [実験例15]

(核酸標識レクチンの反応性の検討8)

ヒトiPS細胞201B7株を市販のキット(製品名「STEMdiff SMADi Neural Induction Kit, 2 pack」、カタログ番号「#08582」、ステムセルテクノロジーズ社)を用いて外胚葉に分化させて、4日目及び11日目に細胞を回収した。続いて、複数種類の核酸標識したレクチンをそれぞれ反応させ、次世代シーケンサーを用いてその結合を解析した。

[0147] 核酸標識レクチンとしては、実験例4と同様にして調製した、核酸標識レクチン(SNA、ConA、GSLII、rBC2LCN、rAAL、rABA、rLSLN、rPSL1a、rDiscoidinI、rF17AG、rPVL、rCGL2、rPAIL、rPPL、rRSIIL、rCNL、WFA、HPA、SSA、rOryzata、rPALa、rDiscoidinII、CSA、rGRFT、rSRL、rAOL、rBanana、rBC2LA、rC14、rCalsepa、rGal3C、rGC2、rMalectin、rMOA、rPTL、rRSL、TJAII、TJAII、UEAI)及びポドカリキシン(PODXL)抗体を使用した。

[0148] まず、各細胞を100,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lに懸濁してチューブに分注した。続いて、0.5ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、細胞を1mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁

した。

[0149] 続いて、細胞を10,000個及び1個分注し、細胞に結合した核酸標識レクチンに標識された核酸の塩基配列を、次世代シーケンサー（製品名「MiSeq」、イルミナ社）を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。

[0150] 図17A及び図17Bは、得られたリード数を主成分分析した結果を示すグラフである。図17Aは細胞10,000個レベルで解析した結果を示す（平均値、 $n=3$ ）。また、図17Bは細胞1個レベルで解析した結果を示す（ $n=3$ ）。図17A及び図17B中、「PC1」はPrinciple component 1（主成分1）を示し、「PC2」はPrinciple component 2（主成分2）を示す。また、「Day0」は分化誘導前のiPS細胞の結果であることを示し、「Day4」は分化誘導後4日目のiPS細胞の結果であることを示し、「Day7」は分化誘導後7日目のiPS細胞の結果であることを示す。

[0151] その結果、細胞に核酸標識レクチンの混合物を反応させて、核酸標識レクチンに結合していた核酸を次世代シーケンサーでシーケンスすることにより、細胞1個レベルで細胞へのレクチンの結合を解析できることが明らかとなった。また、細胞1個レベルでの解析結果は、10,000個の細胞の解析結果と類似しているものの、かなりヘテロな糖鎖を持つ細胞集団であることが明らかとなった。

[0152] また、細胞10,000個レベルでの解析結果から、分化誘導後の経過時間により、糖鎖構造が変化していることが明らかとなった。そして、細胞1個レベルでの解析結果から、iPS細胞は比較的均一な細胞集団であるものの、分化誘導後は多様な糖鎖を持つ細胞集団となっていることが明らかとなった。

[0153] この結果は、細胞集団を構成する個々の細胞の糖鎖を細胞1個レベルで解析できることを更に支持するものである。

[0154] [実験例16]

(細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAの1細胞レベルでの解析1)

ヒトiPS細胞201B7株を100,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lに懸濁してチューブに分注した。続いて、0.5 ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4℃で1時間反応させた。続いて、細胞を1 mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0155] 続いて、紫外線(UV)照射装置(カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社)を用いて、波長365 nmにピーク波長を有する紫外線を15 Wで15分間照射して核酸標識レクチンからオリゴヌクレオチドを遊離させ、遠心後に上清を回収した。続いて、これをテンプレートとしてPCR反応を行い、次世代シーケンサーで解析した。

[0156] また、遠心後に沈殿した1細胞の全RNAから、GenNext(R) RamDA-seq(TM) Single Cell Kit(東洋紡株式会社)を用いてcDNAライブラリーを調製した。

[0157] 続いて、Nextera XT DNA Sample Preparation Kit(イルミナ社)を用いてサンプルを処理後、次世代シーケンサー(製品名「MiSeq」、イルミナ社)を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。

[0158] 図18A及び図18Bは、細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAを1細胞レベルで解析した代表的な結果を示すグラフである。図18Aは糖鎖プロファイルの結果であり、図18Bは遺伝子プロファイルの結果である。図18A中、縦軸はシグナル強度(相対値)を示し、横軸はレクチンの種類を示す。また、図18B中、縦軸はTPM(Transcripts Per Million)を示し、横軸は、未分化マーカー、内肺葉マーカー、中胚葉マーカー、外胚葉マーカーの各マーカー遺伝子の遺伝子名を示す。

[0159] その結果、1細胞から、細胞表層の糖鎖情報のみならず、RNA情報を取得できることが明らかとなった。

[0160] [実験例17]

(細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAの1細胞レベルでの解析2)

ヒトiPS細胞201B7株を外胚葉(神経)に分化させて、0日目及び11日目の細胞の表面の糖鎖及び細胞内のRNAを1細胞レベルで解析した。

[0161] 具体的には、まず、ヒトiPS細胞201B7株を、市販のキット(製品名「STEMdiff SMADi Neural Induction Kit, 2 pack」、カタログ番号「#08582」、ステムセルテクノロジーズ社)を用いて外胚葉(神経)に分化させ、0日目及び11日目に細胞を回収した。

[0162] 続いて、回収した各細胞に、複数種類の核酸標識したレクチンをそれぞれ反応させ、次世代シーケンサーを用いてその結合を解析した。核酸標識レクチンとしては、実験例4と同様にして調製した、核酸標識レクチン(SNA、ConA、GSLII、rBC2LCN、rAAL、rABA、rLSLN、rPSL1a、rDiscoidinI、rF17AG、rPVL、rCGL2、rPAIL、rPPL、rRSIIL、rCNL、WFA、HPA、SSA、rOryzata、rPALa、rDiscoidinII、CSA、rGRFT、rSRL、rAOL、rBanana、rBC2LA、rC14、rCalsepa、rGal3C、rGC2、rMalectin、rMOA、rPTL、rRSL、TJAI、TJAIL、UEAI)及びポドカリキシン(PODXL)抗体を使用した。

[0163] 各細胞を100,000個ずつBSA-PBS 100 μ Lに懸濁してチューブに分注した。続いて、0.5ngずつの各核酸標識レクチンを、それぞれ細胞懸濁液に添加し、4 $^{\circ}$ Cで1時間反応させた。続いて、細胞を1mLのBSA-PBSで3回洗浄後、200 μ LのBSA-PBSに懸濁した。

[0164] 続いて、細胞を1個ずつ分注し、紫外線(UV)照射装置(カタログ番号「95-0042-14」、フナコシ株式会社)を用いて、波長365nmにピーク波長を有する紫外線を15Wで15分間照射して核酸標識レクチンからオリゴヌクレオチドを遊離させ、遠心後に上清を回収した。続いて、回

収した上清をテンプレートとしてPCR反応を行い、次世代シーケンサー（製品名「MiSeq」、イルミナ社）を用いてシーケンスし、検出された塩基配列のリード数を集計した。

[0165] また、遠心後に沈殿した1細胞の全RNAから、GenNext (R) RamDA-seq (TM) Single Cell Kit（東洋紡株式会社）を用いてcDNAライブラリーを調製した。

[0166] 続いて、Nextera XT DNA Sample Preparation Kit（イルミナ社）を用いてサンプルを処理後、次世代シーケンサー（製品名「NovaSeq 6000」、イルミナ社）を用いてシーケンスし、FastQC v0.11.7 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いて生データの品質チェックを行った。

[0167] 続いて、Trimmomatic 0.38 (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) でトリミングし、HISAT2 v2.1.0 (<http://daehwankimlab.github.io/hisat2/>) とBowtie2 2.3.5.1 (<https://sourceforge.net/projects/bowtie-bio/files/bowtie2/2.3.5.1/>) を用いてゲノムへのマッピングを行った。さらに、StringTie v1.3.4d (<https://ccb.jhu.edu/software/stringtie/>) を用いてトランスクリプトへのマッピングを行った。

[0168] 図19Aは、得られた糖鎖プロファイルの主成分分析した結果を示すグラフである。その結果、0日目と比較して、分化誘導後11日目の細胞では、糖鎖プロファイルの不均一性が増加していることが明らかとなった。

[0169] 続いて、0日目に近い糖鎖プロファイルを示したDay 11-A3、Day 11-A9の各細胞について、神経分化マーカーOTX2遺伝子と未分化マーカーPOU5F1遺伝子の発現を確認した。

[0170] 図19Bは、各マーカー遺伝子の発現量を解析した結果を示すグラフである。その結果、Day 11-A3、Day 11-A9の各細胞は、神経分化マーカーの発現が低く、未分化マーカーの発現が高いことが明らかとなった。

。すなわち、これらの細胞は、外胚葉（神経）分化誘導後 11 日目においても、分化誘導されず、未分化な細胞の状態であることが明らかとなった。

[0171] 図 20A は、ヒト iPS 細胞に特異的に結合する rBC2LCN レクチンの各細胞に対する結合量と、27,686 種類の遺伝子群の発現量の相関係数を算出し、数値が大きい順に並べた結果を示すグラフである。

[0172] その結果、最も高い正相関を示す遺伝子は未分化マーカー POU5F1 であることが明らかとなった。一方、最も高い負相関を示す遺伝子は神経分化マーカー VIM であることが明らかとなった。

[0173] 図 20B は、rBC2LCN レクチンの各細胞に対する結合量と、未分化マーカー POU5F1 遺伝子の発現量を示す散布図である。図 20C は、rBC2LCN レクチンの各細胞に対する結合量と、神経分化マーカー VIM 遺伝子の発現量を示す散布図である。

[0174] その結果、rBC2LCN レクチンの結合量は、POU5F1 遺伝子の発現量と正の相関を示し、VIM 遺伝子の発現量と負の相関を示すことが明らかとなった。すなわち、rBC2LCN レクチンは、未分化マーカー POU5F1 遺伝子の発現が高く、神経分化マーカー VIM 遺伝子の発現が低い細胞に結合することが明らかとなった。

[0175] 図 21A は、各細胞における未分化マーカー POU5F1 遺伝子の発現量と、39 種のレクチンの結合量との相関係数を算出し、高い順に並べた図である。また、図 21B は、各細胞における神経分化マーカー OTX2 遺伝子の発現量と、39 種のレクチンの結合量との相関係数を算出し、高い順に並べた図である。

[0176] その結果、未分化マーカー POU5F1 遺伝子の発現量と最も高い正の相関係数を示したレクチンは rBC2LCN であることが明らかとなった。また、神経分化マーカー OTX2 遺伝子の発現量と最も高い正の相関係数を示すレクチンは rAAL であることが明らかとなった。すなわち、rAAL は、ヒト iPS 細胞と比べて分化誘導後の神経細胞に優位に高い反応性を示す可能性が考えられた。

[0177] 以上の結果から、本実験例の方法により、不均一で多様な細胞集団に発現する糖鎖と遺伝子を1細胞レベルで同時に計測することができ、更に得られたデータから1細胞レベルで発現する糖鎖と遺伝子の関係性を明らかにすることが示された。

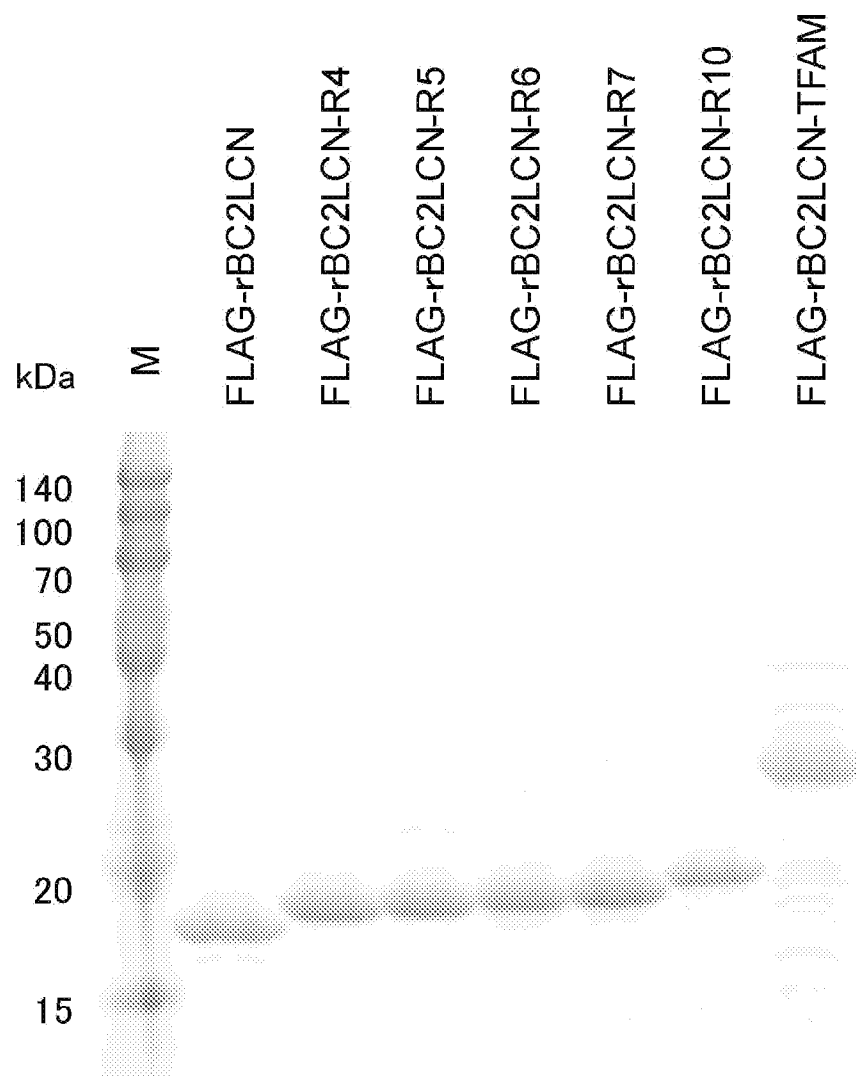
産業上の利用可能性

[0178] 本発明によれば、糖鎖を解析する新たな技術を提供することができる。

請求の範囲

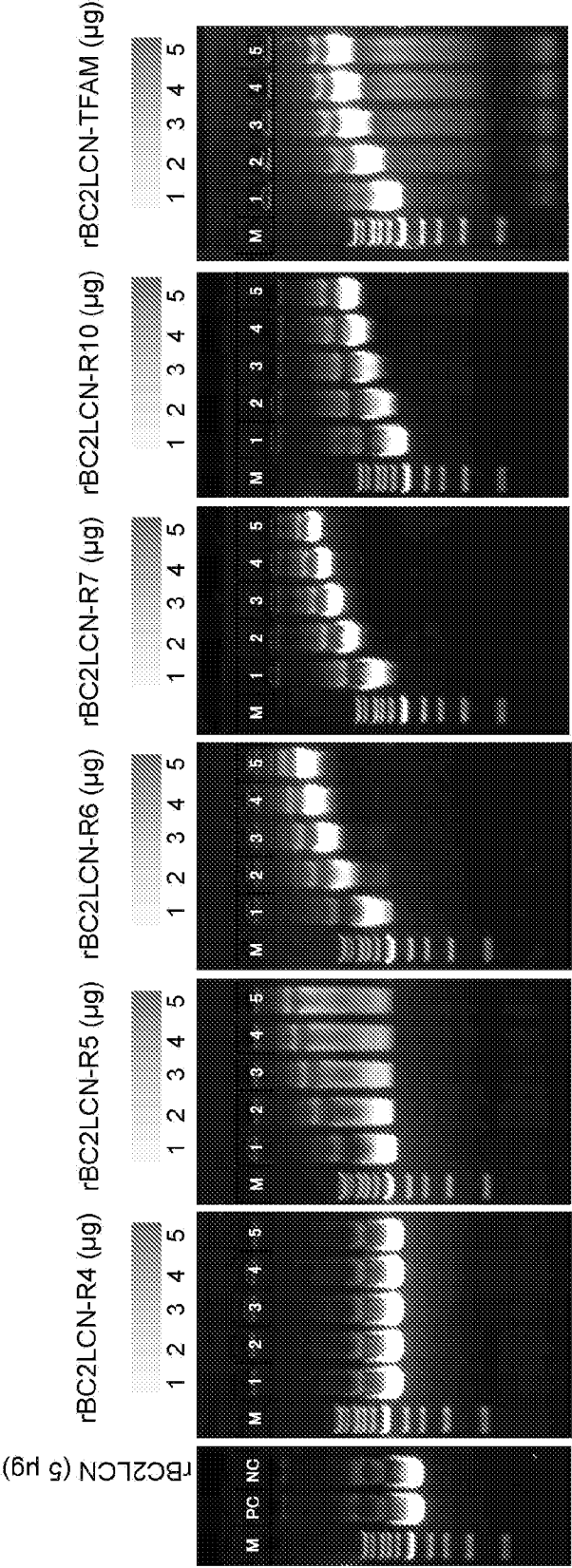
- [請求項1] 細胞の表面の糖鎖を解析する方法であって、
前記細胞に、核酸標識された糖鎖結合物質を接触させることと、
前記細胞に結合した前記糖鎖結合物質に標識された前記核酸を検出することと、を含み、
前記核酸の種類及び量が、前記細胞の表面の糖鎖の種類及び量に対応する、方法。
- [請求項2] 前記糖鎖と共に、前記細胞の表現型又は前記細胞内のRNA情報を更に解析する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記細胞に、核酸標識された前記糖鎖結合物質を接触させることが、アルブミンを含む緩衝液中で行われる、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 1細胞レベルで行われる、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記検出が、リアルタイム定量PCR、デジタルPCR又は次世代シーケンサーによるシーケンスにより行われる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 核酸標識された糖鎖結合物質。
- [請求項7] 請求項6に記載の糖鎖結合物質を含む、細胞の表面の糖鎖を解析するためのキット。

[図1]

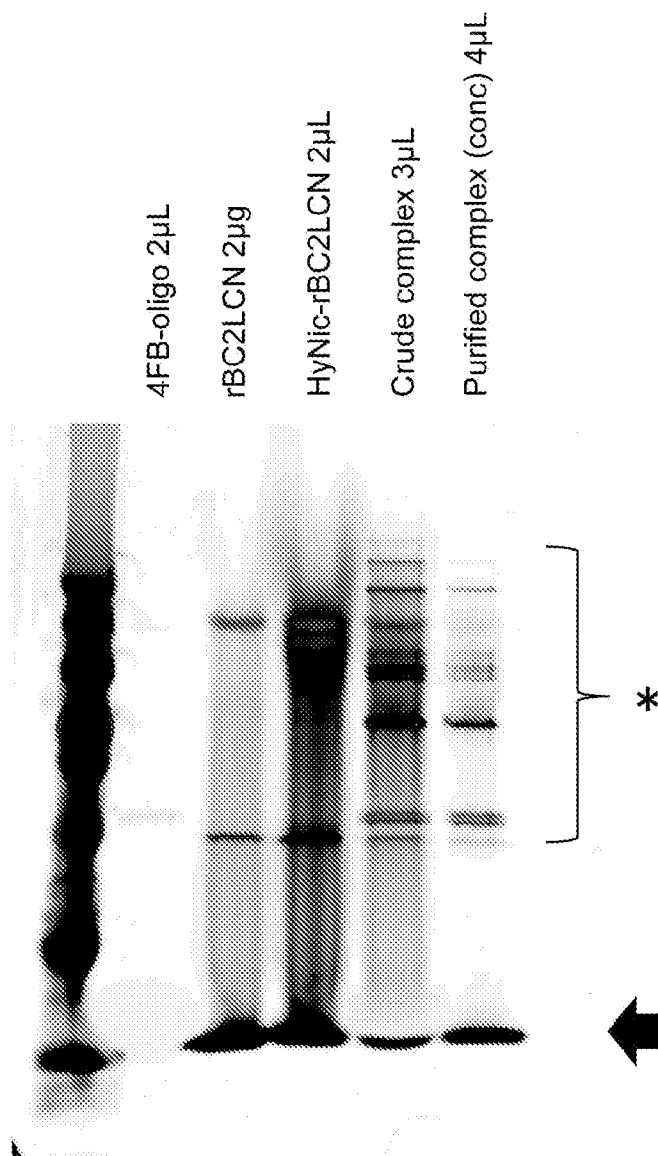


[図2]

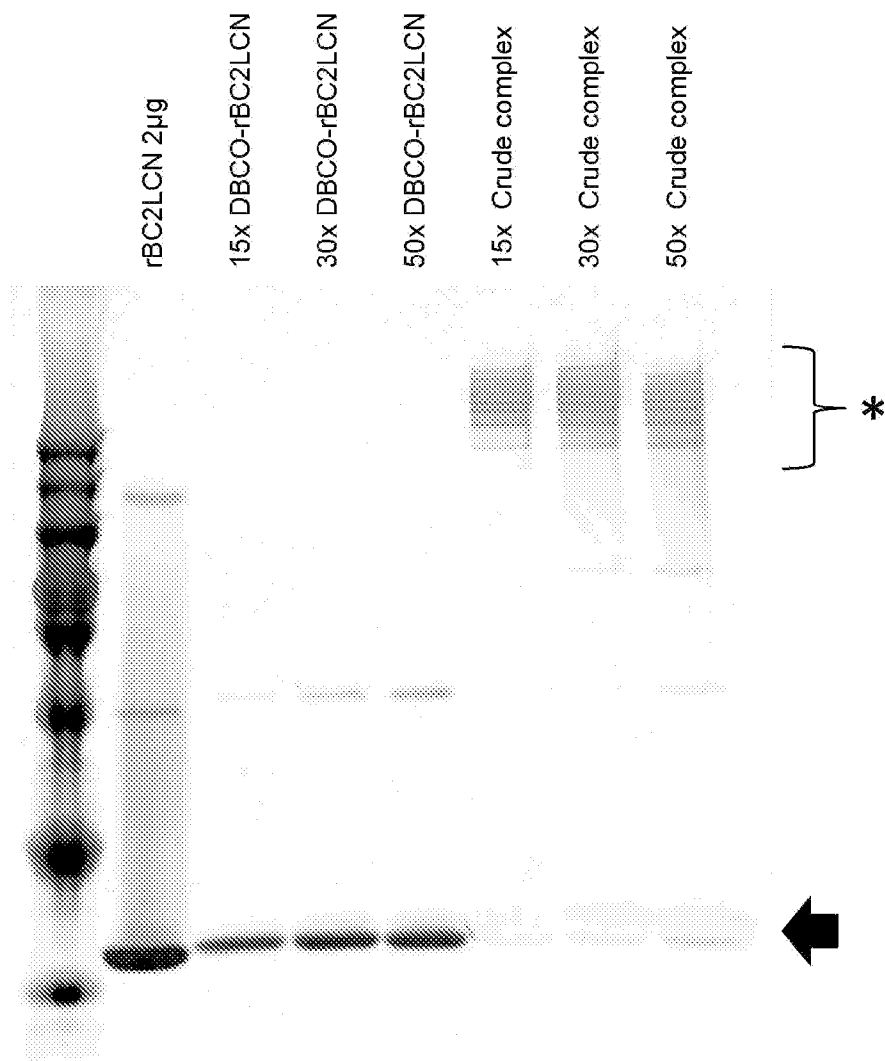
プラスミド 1 μ g



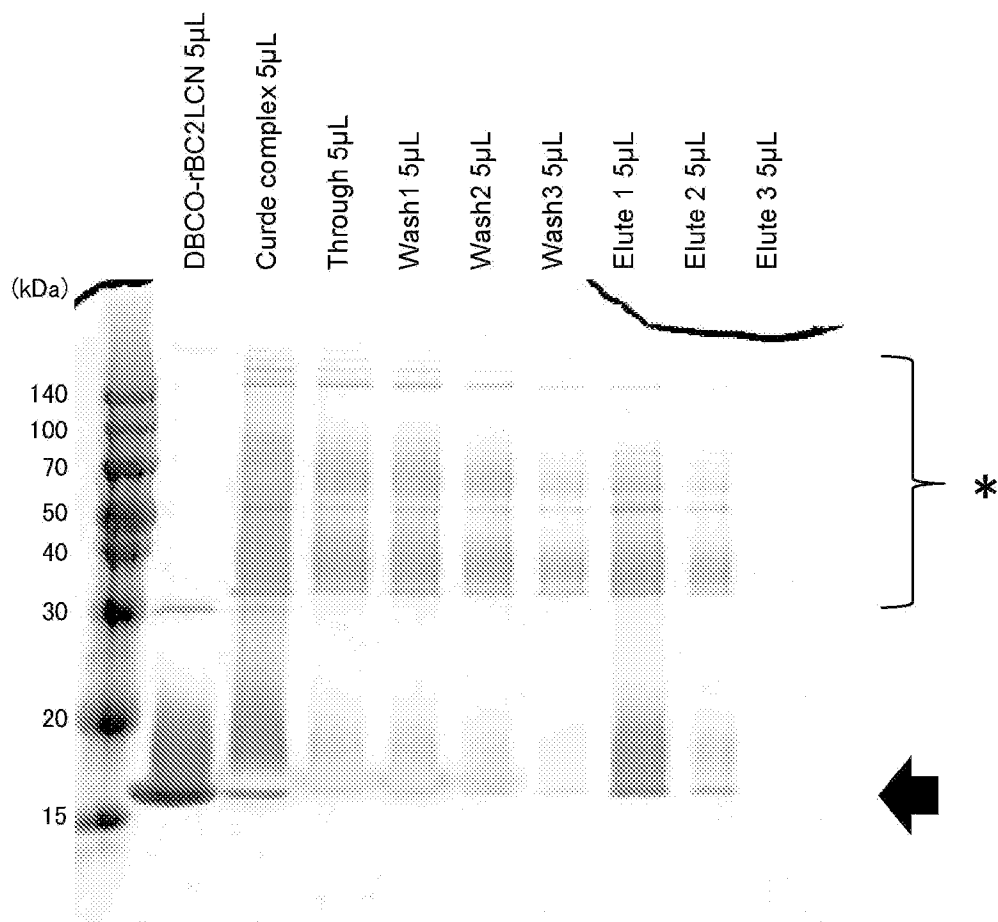
[図3]



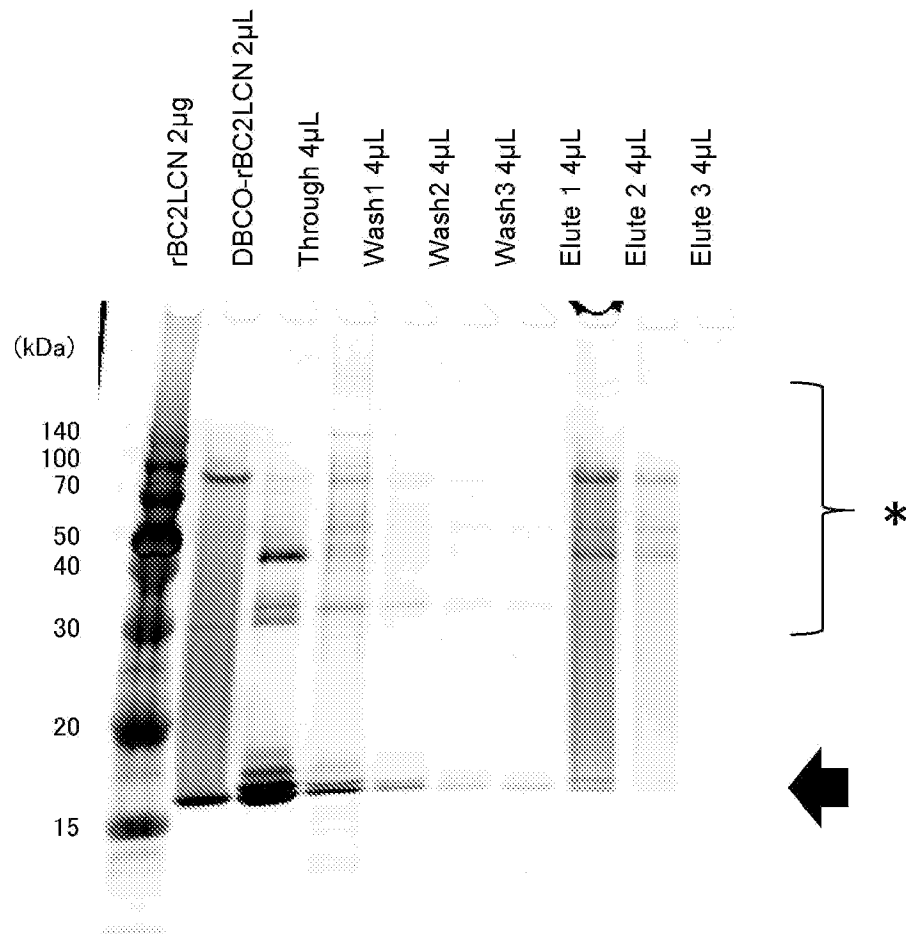
[図4]



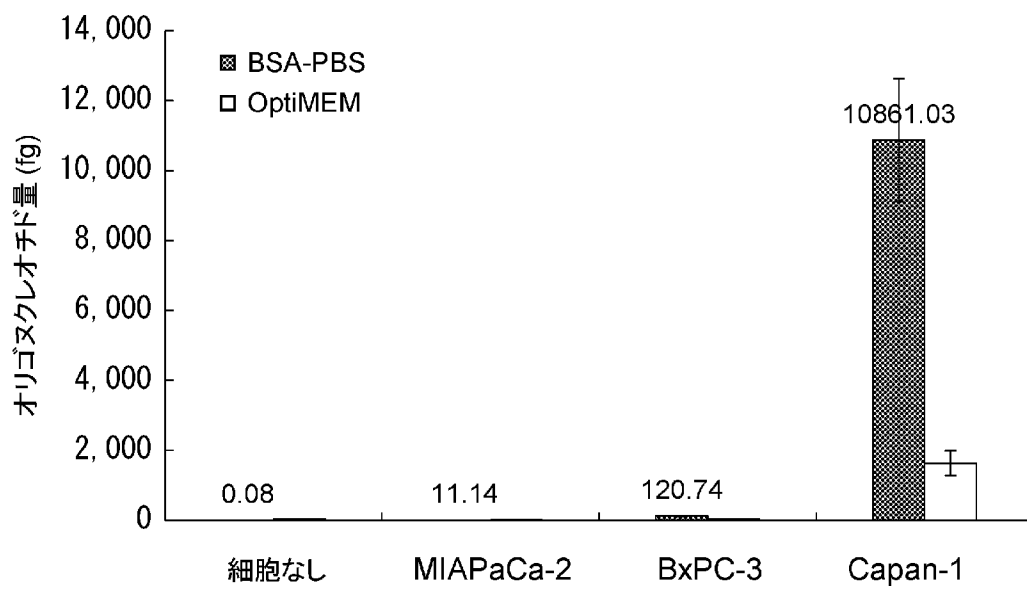
[図5]



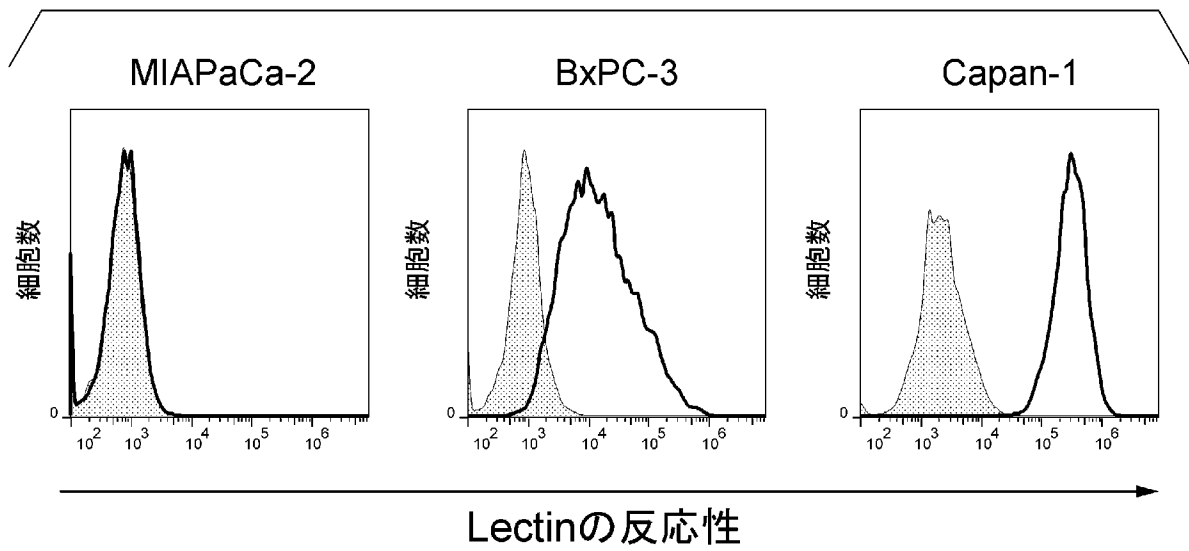
[図6]



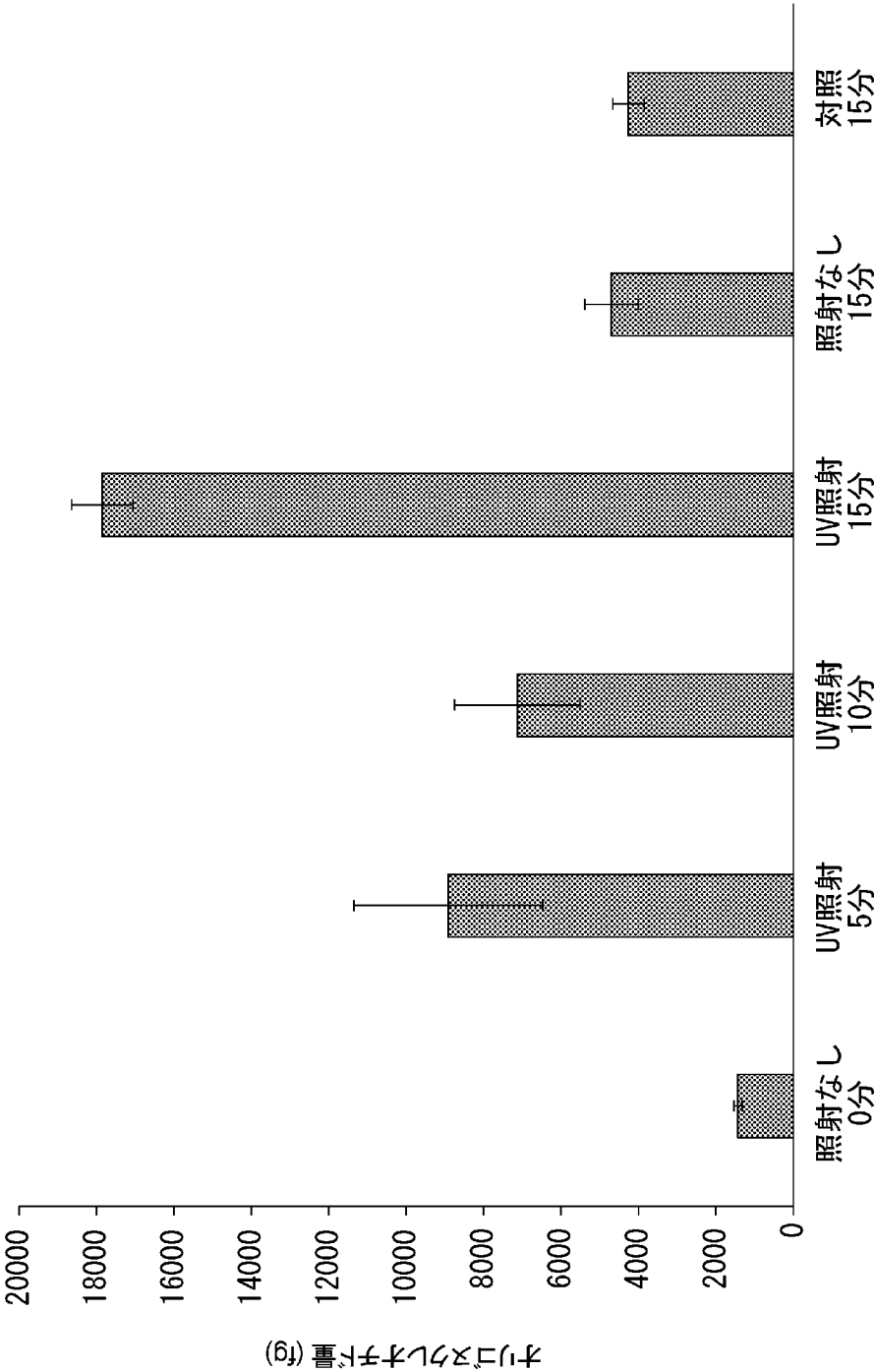
[図7A]



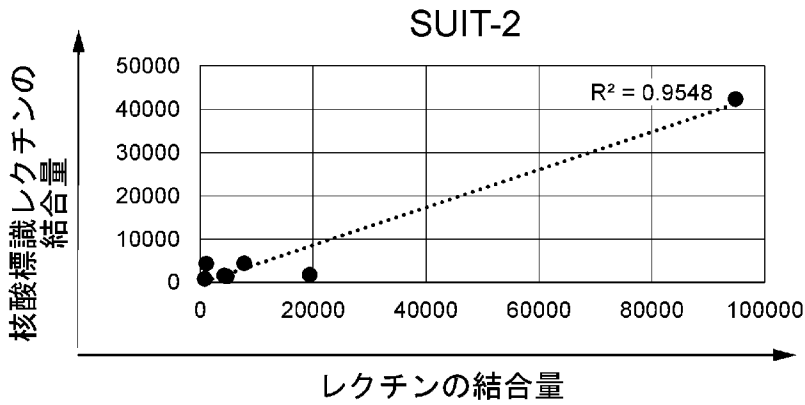
[図7B]



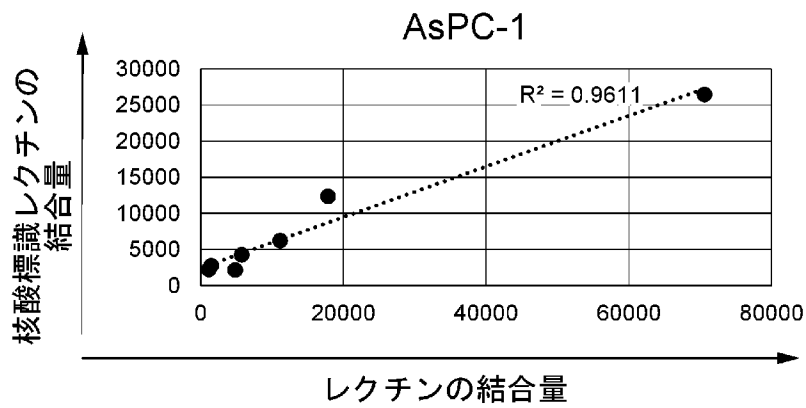
[図8]



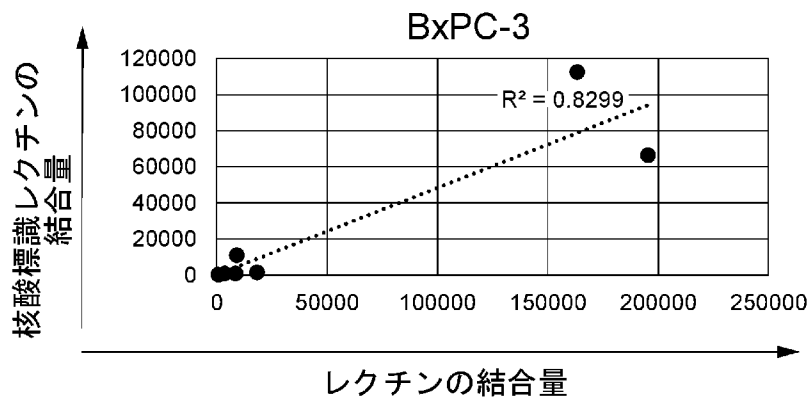
[図9A]



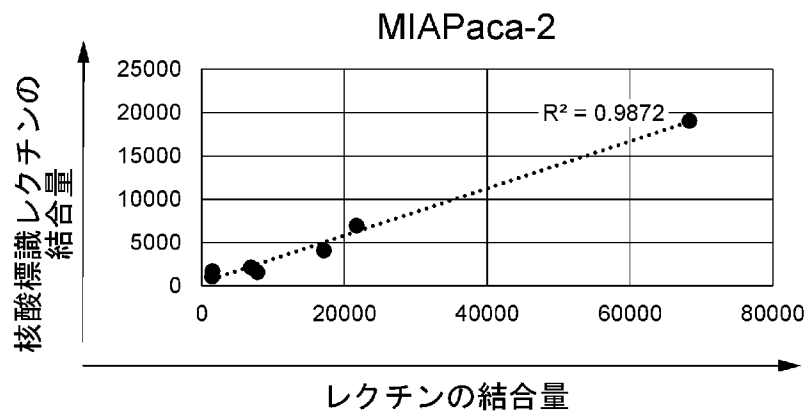
[図9B]



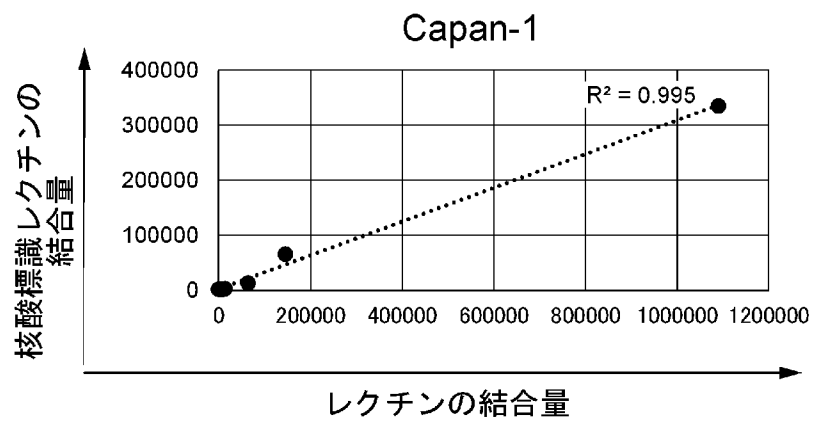
[図9C]



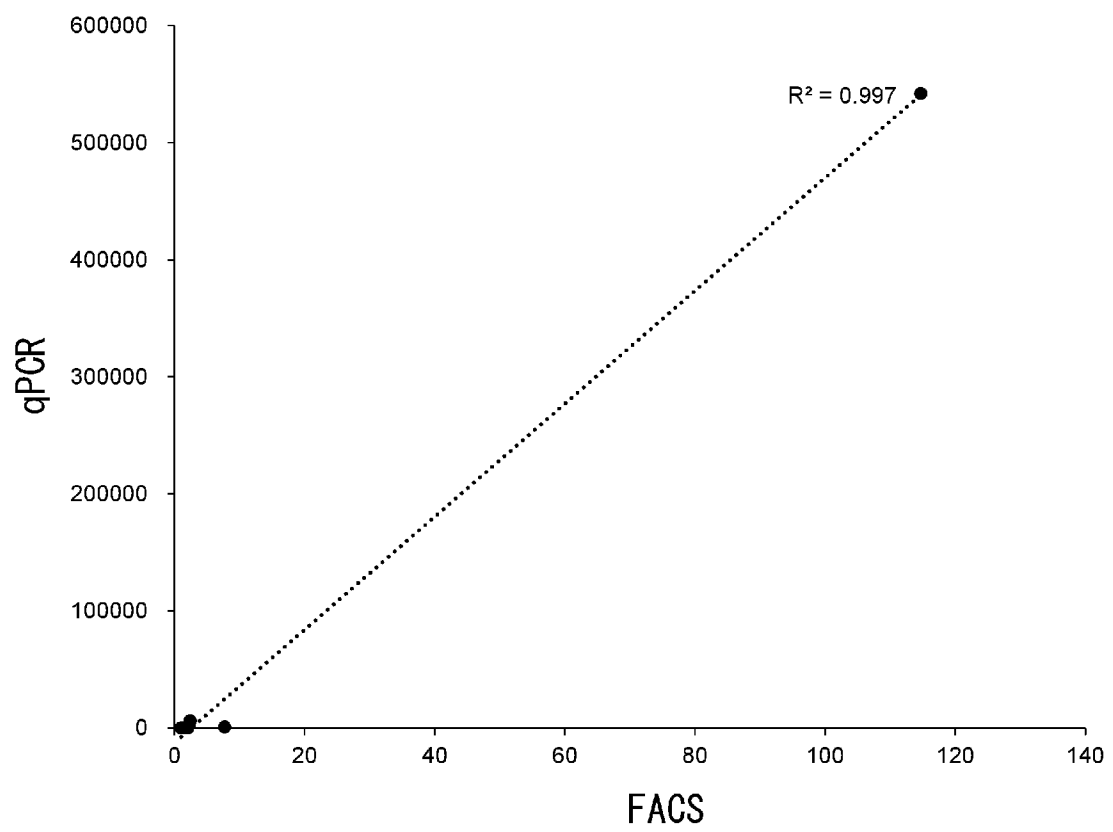
[図9D]



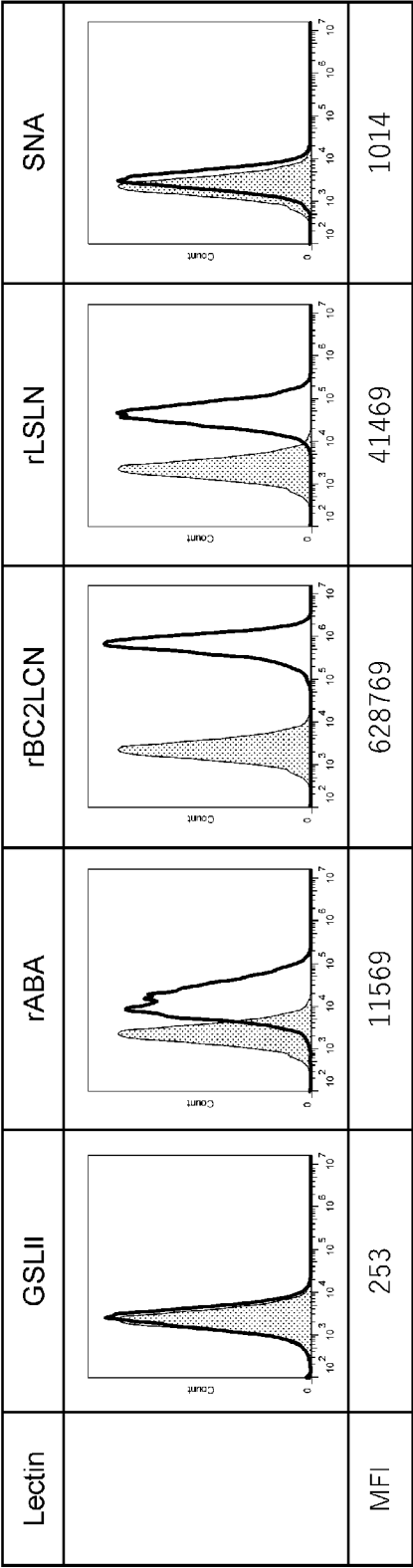
[図9E]



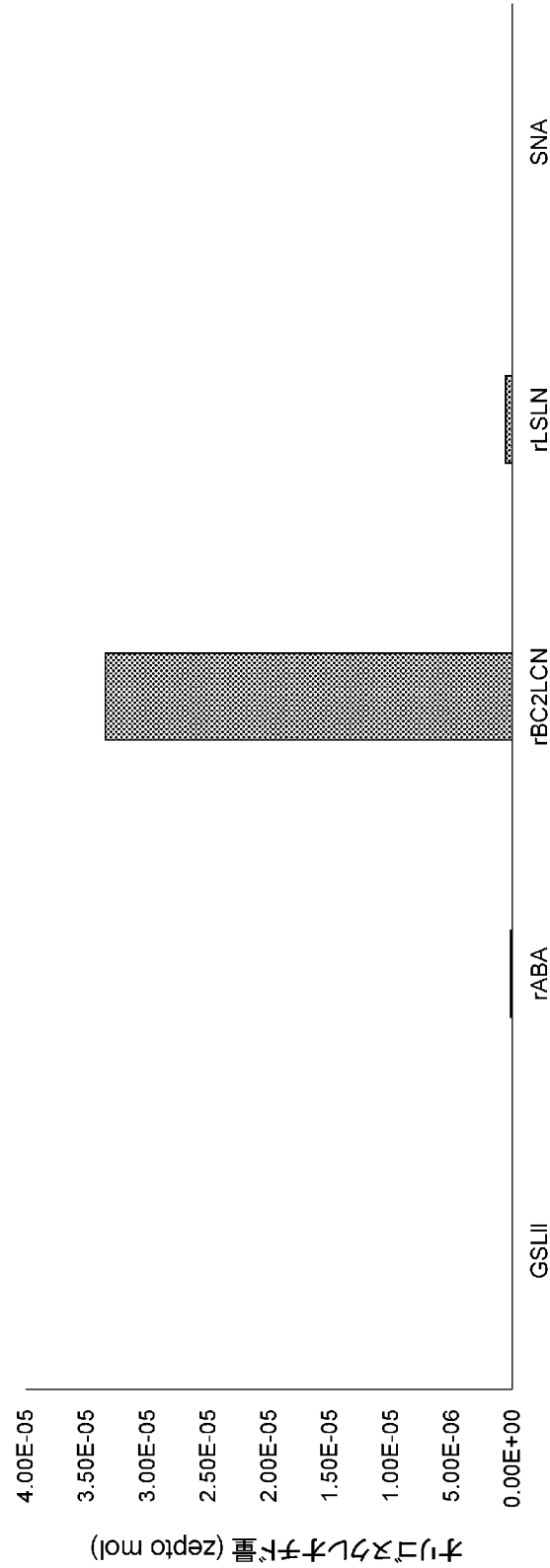
[図10]



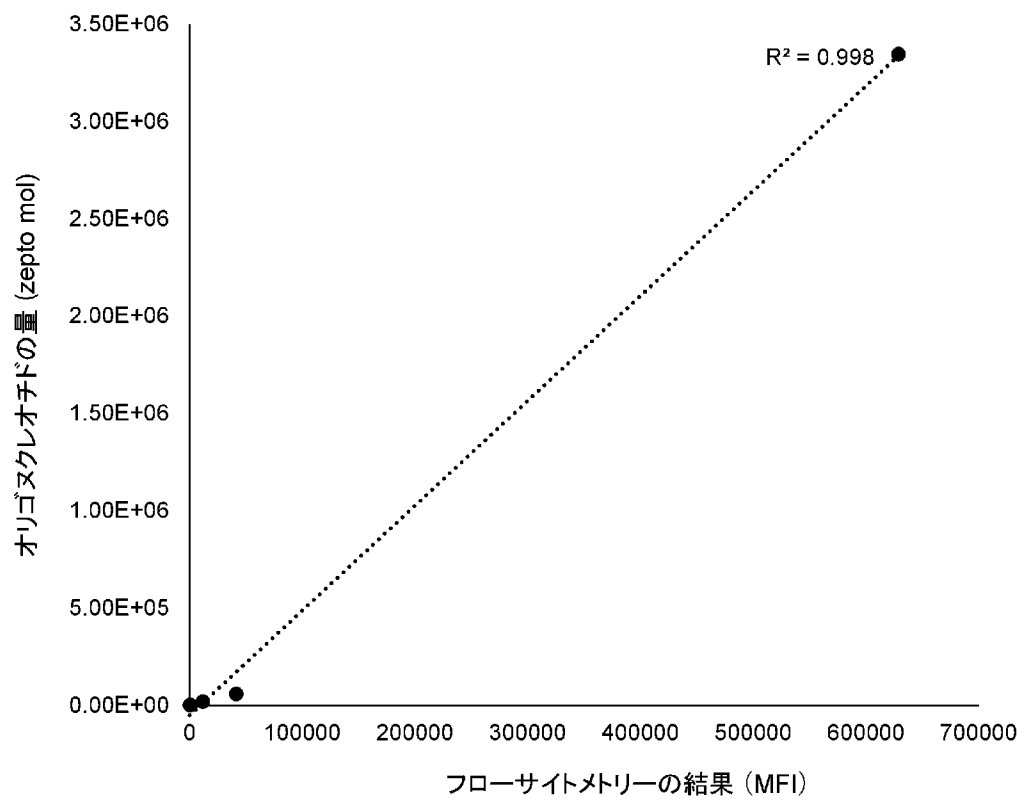
[図11A]



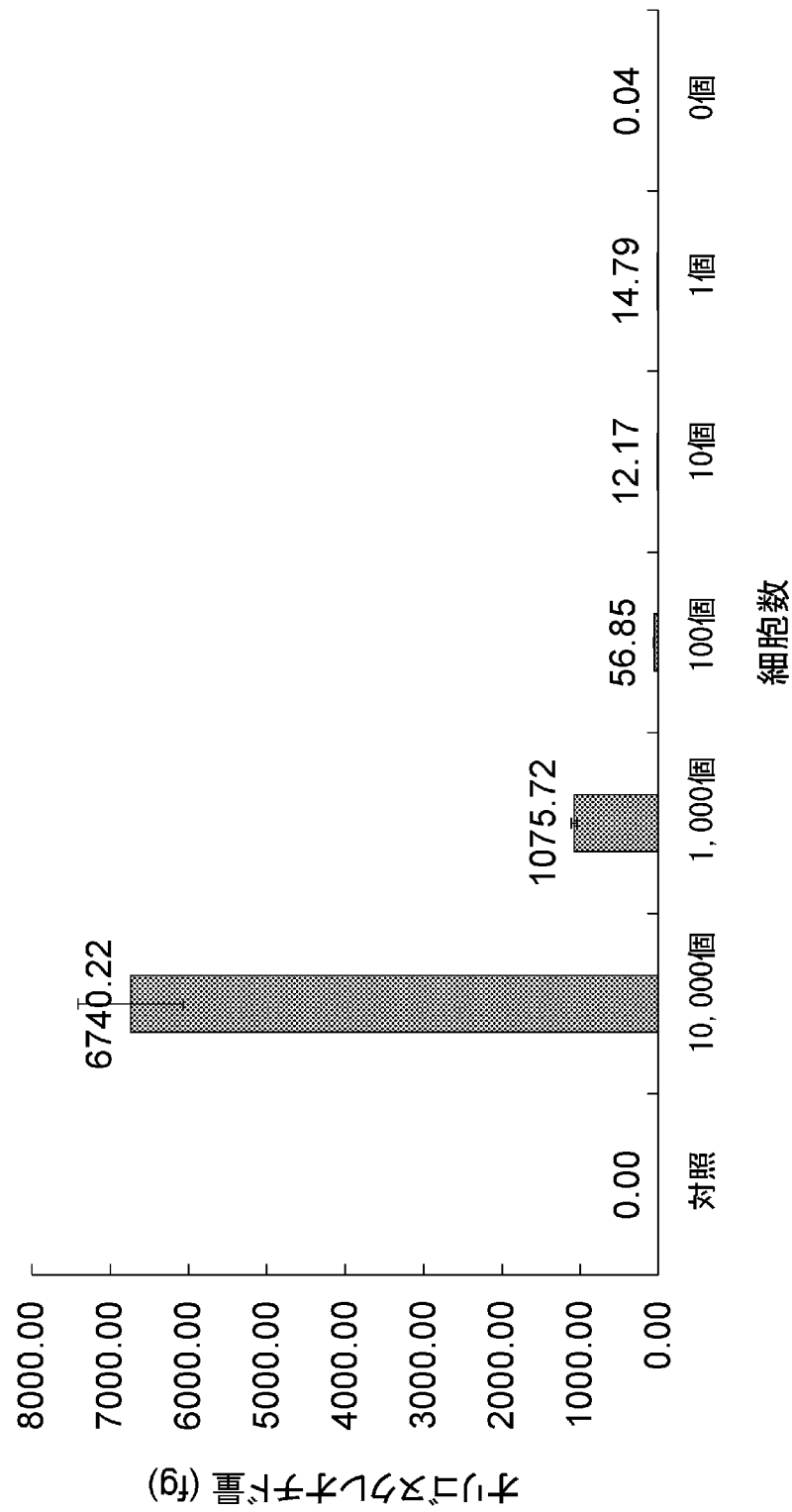
[図11B]



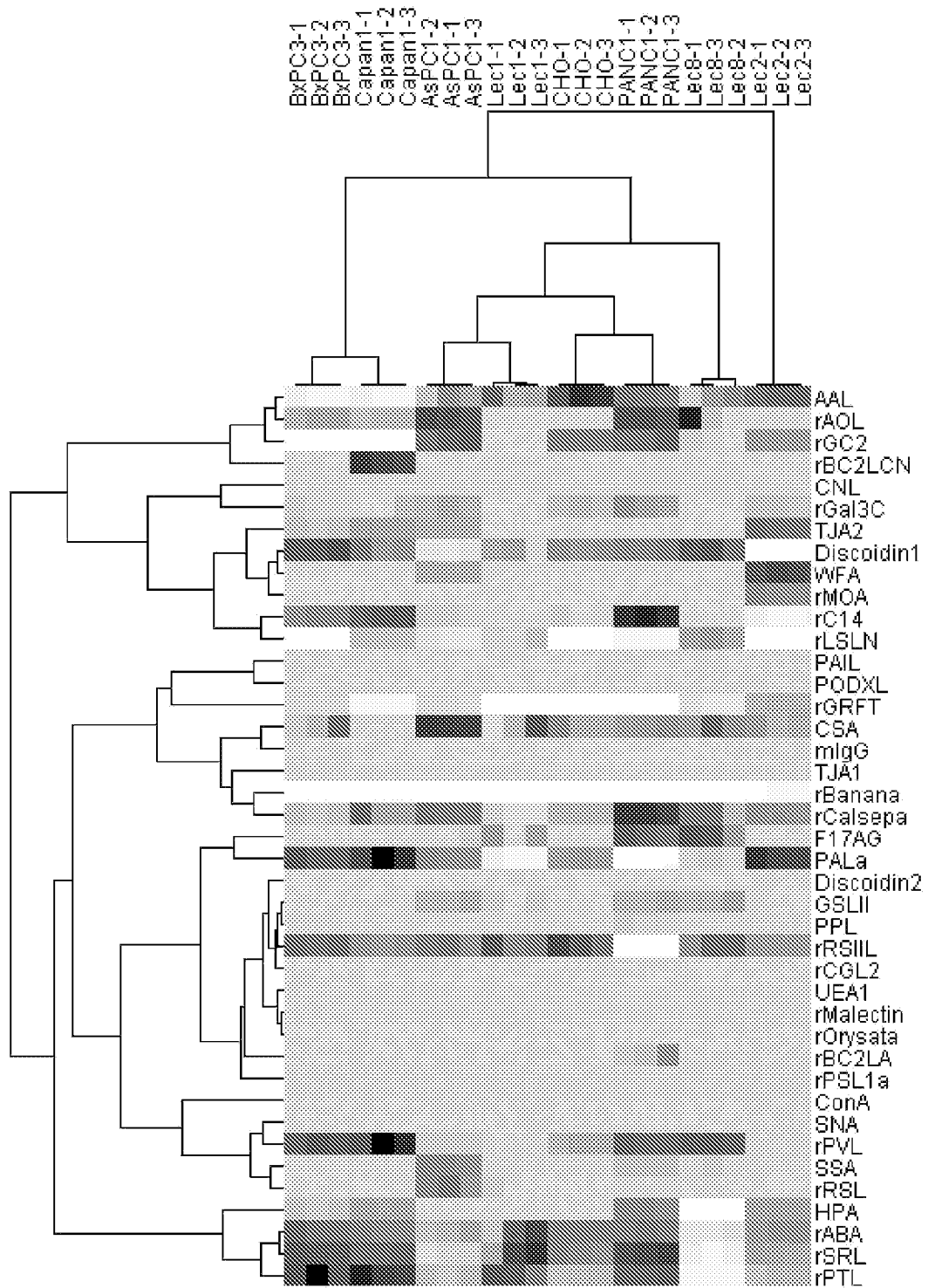
[図12]



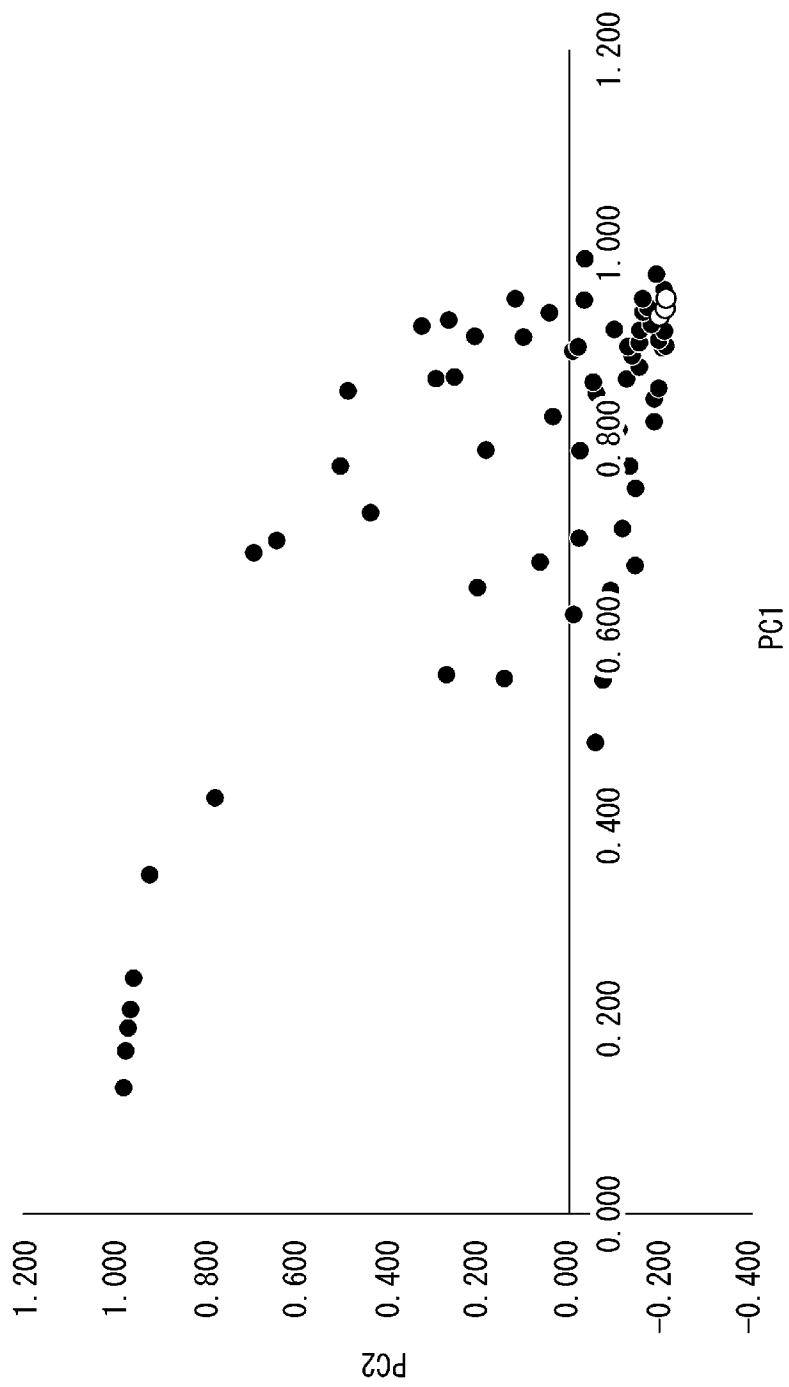
[図13]



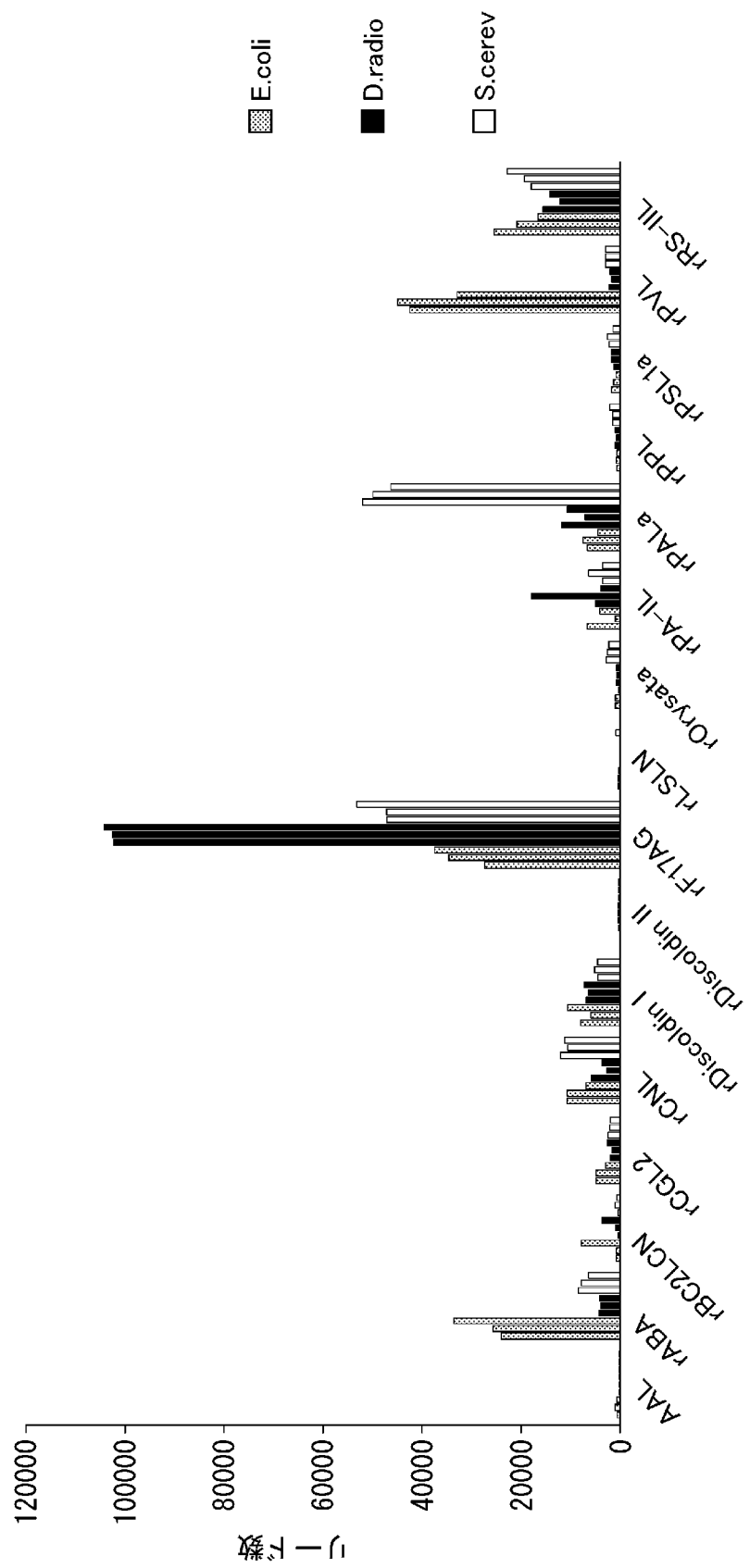
[図14]



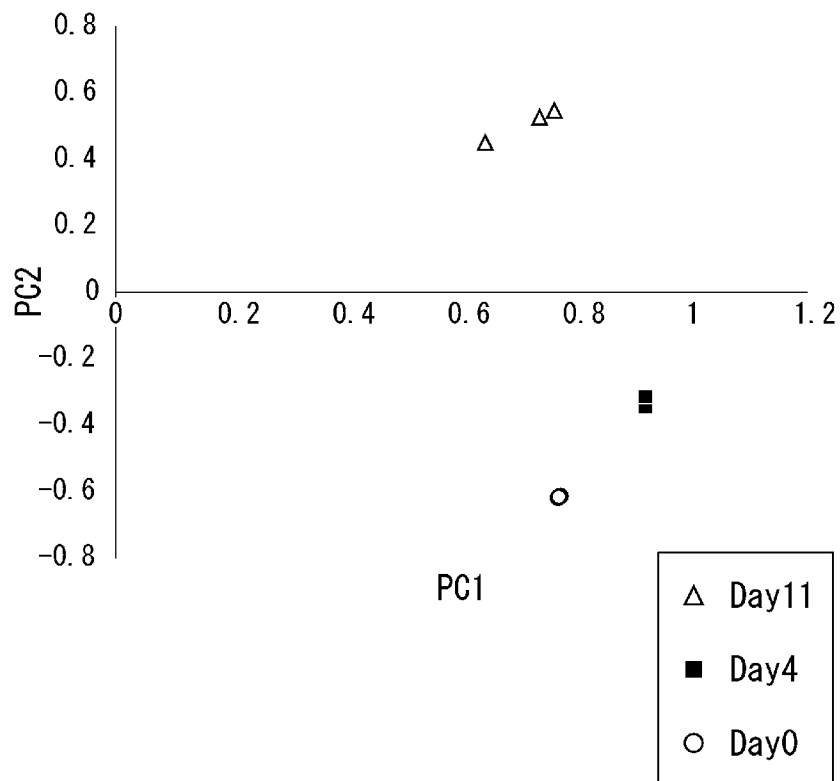
[図15]



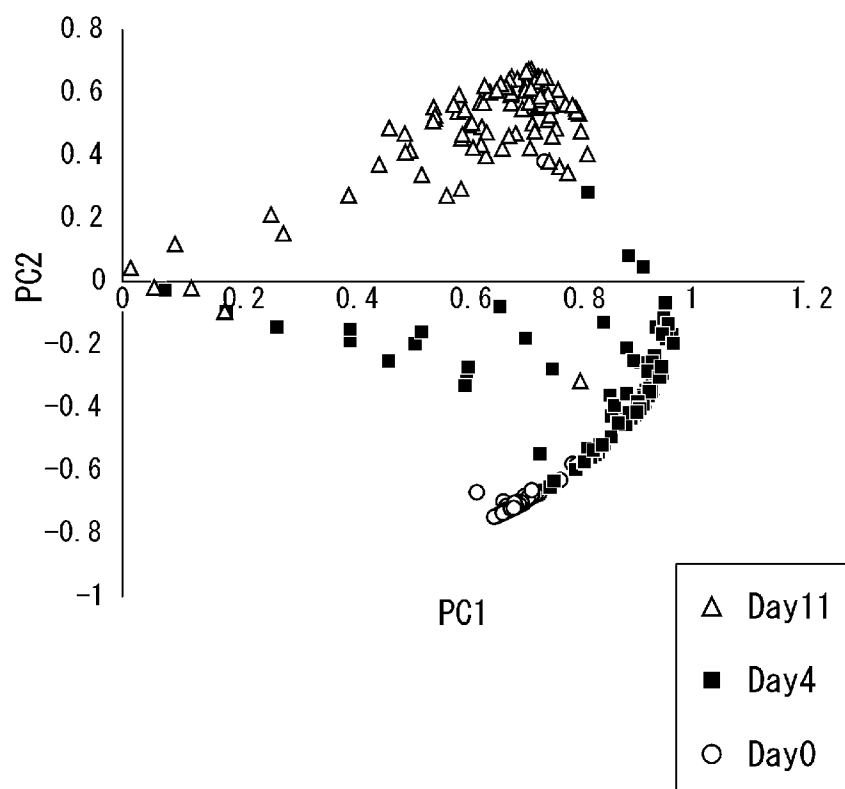
[図16]



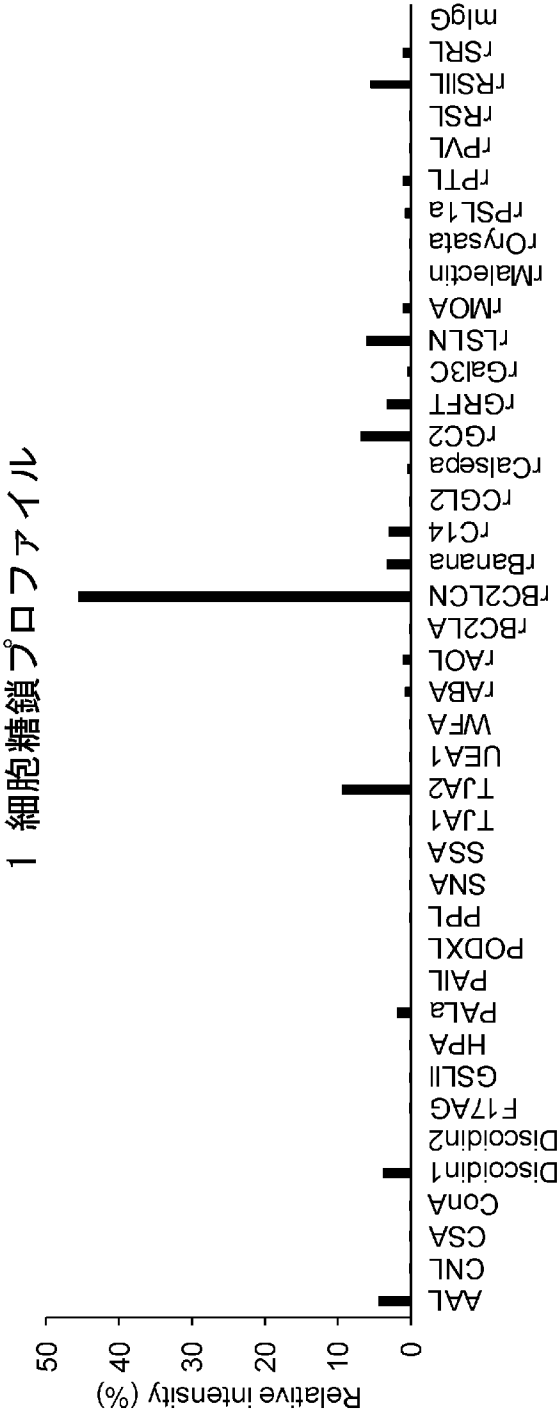
[図17A]



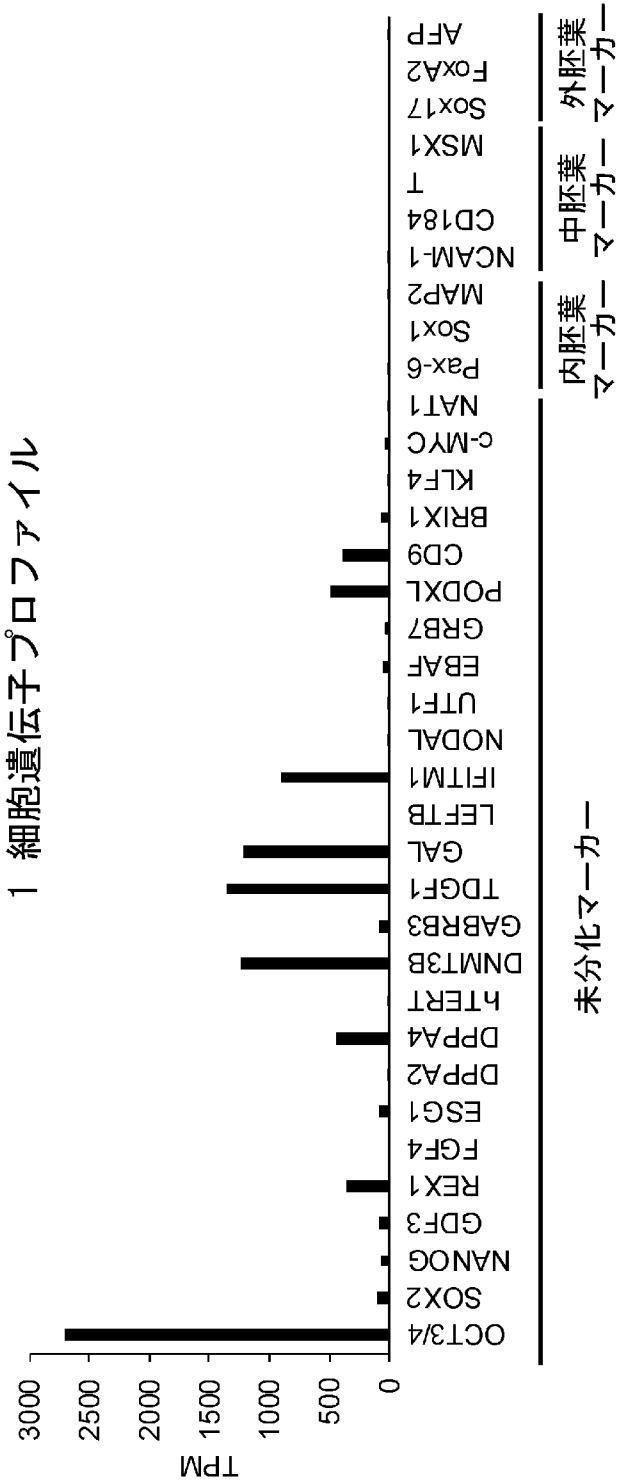
[図17B]



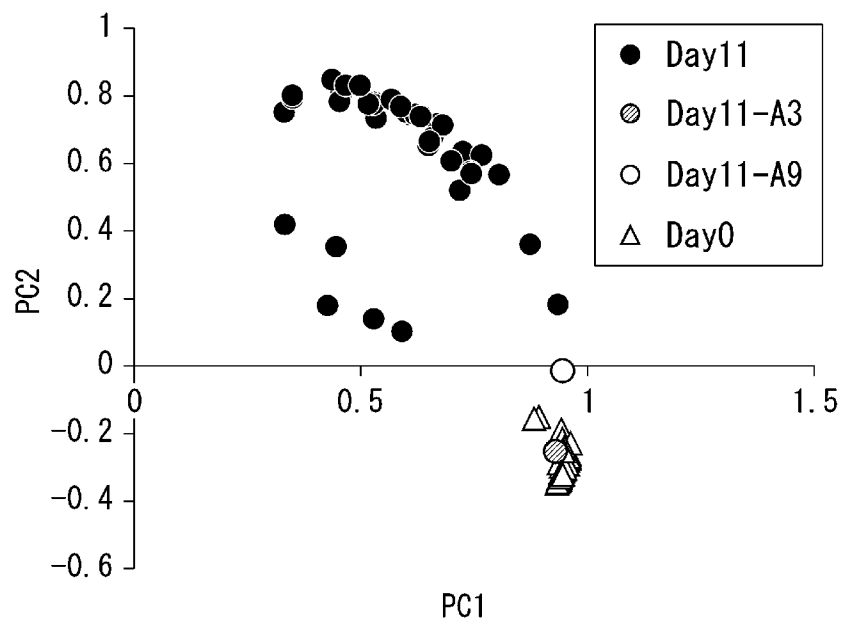
[図18A]



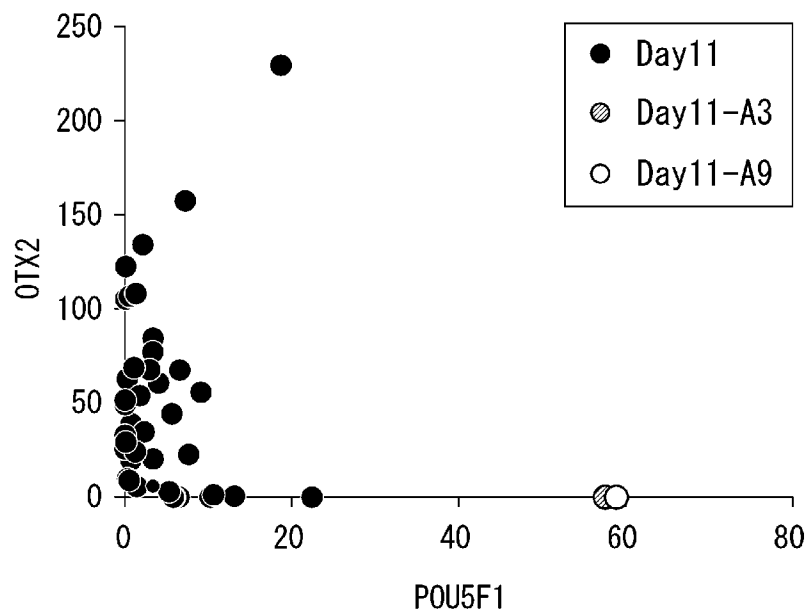
[図18B]



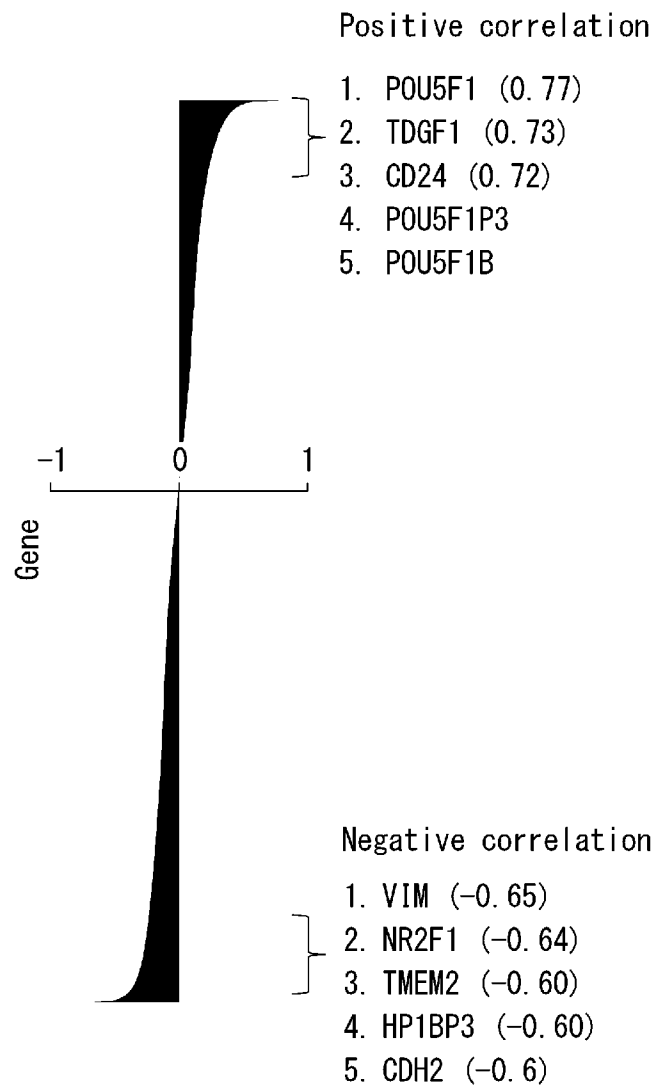
[図19A]



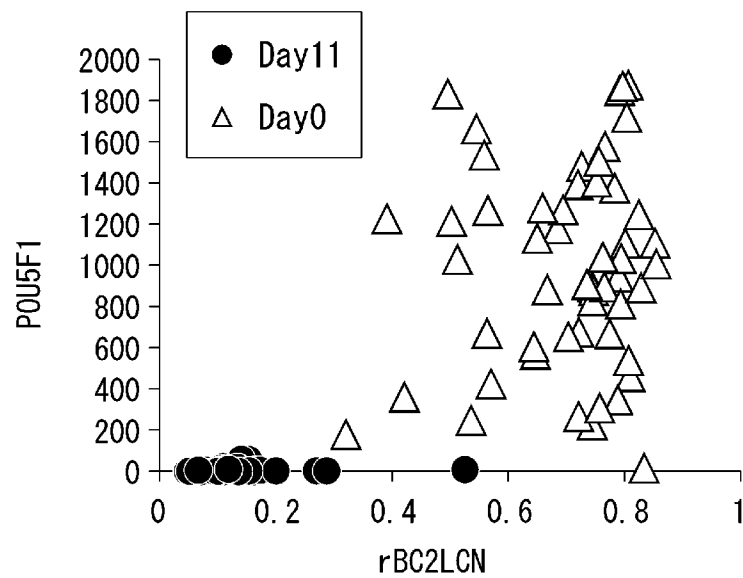
[図19B]



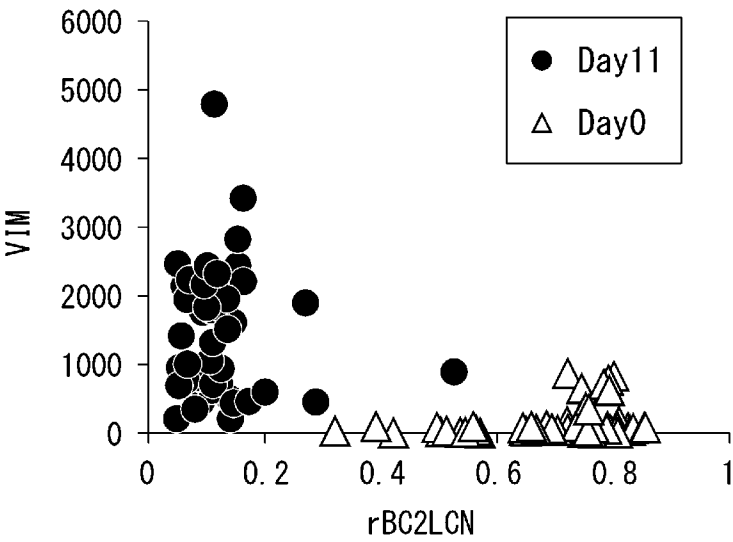
[図20A]



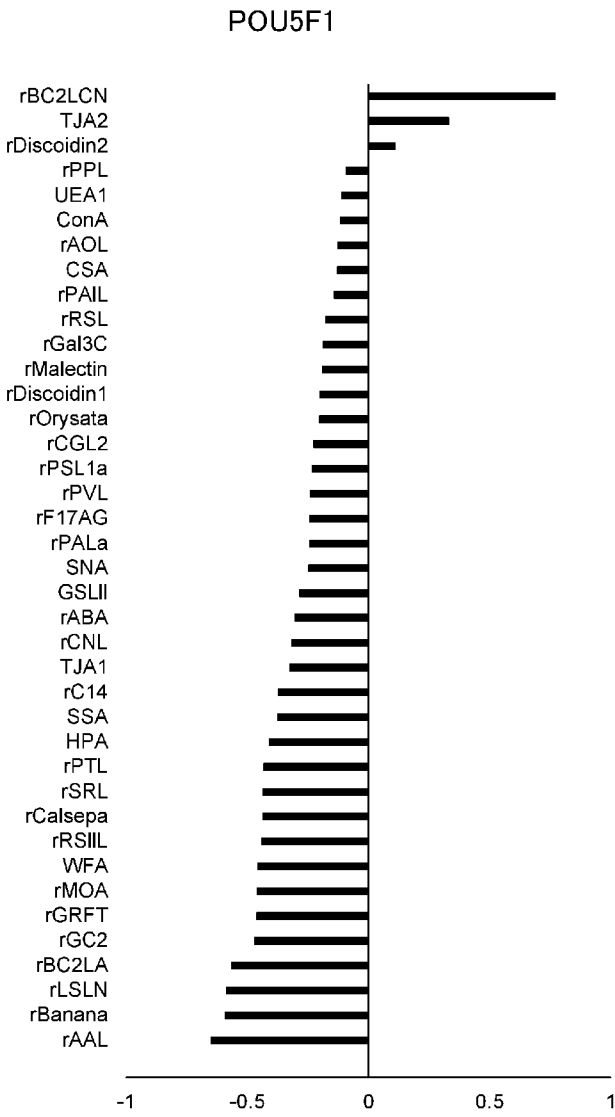
[図20B]



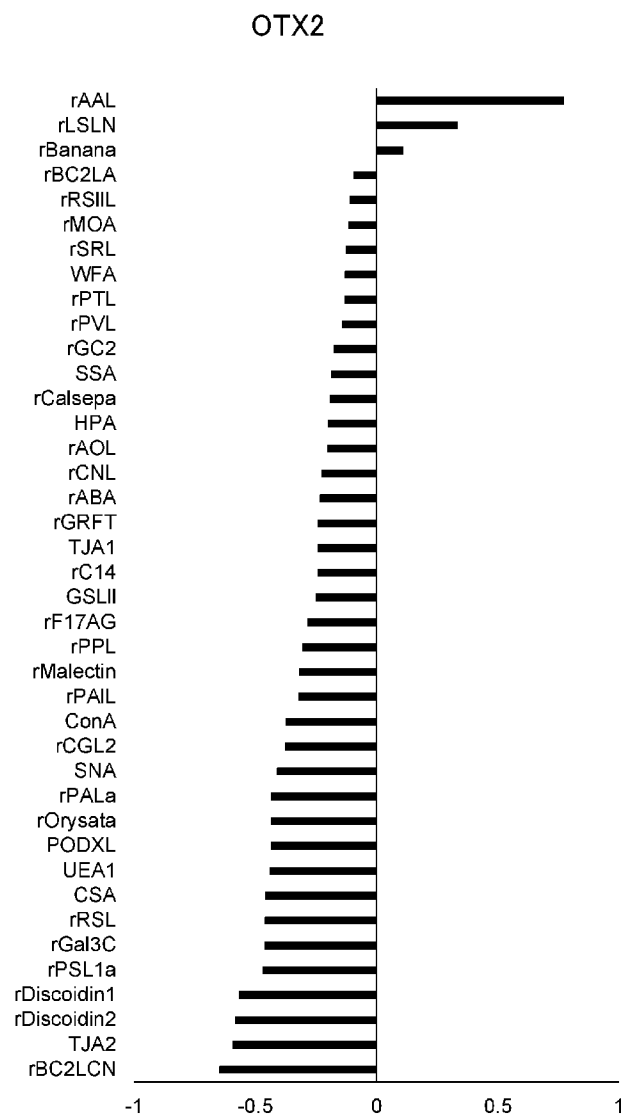
[図20C]



[図21A]



[図21B]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/010385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/42 (2006.01)n; C12Q 1/02 (2006.01)i; C12Q 1/68 (2018.01)i; C12Q 1/6876 (2018.01)n; G01N 33/53 (2006.01)i
FI: C12Q1/02 ZNA; C12Q1/68; G01N33/53 S; G01N33/53 M; C12Q1/6876 Z;
C07K14/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K14/00-19/00; C12Q1/00-1/70; C12N1/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FENG, Y. et al., "Lectin-mediated in situ rolling circle amplification on exosomes for probing cancer-related glycan pattern", Anal. Chim. Acta, 2018, vol. 1039, pp. 108-115, in particular, page 108, abstract, page 109, left column, line 30 to page 109, right column, line 11, page 110, right column, line 9 to page 111, left column, line 28 in particular, page 108, abstract, page 109, left column, line 30 to page 109, right column, line 11, page 110, right column, line 9 to page 111, left column, line 28	6
Y		6-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 May 2021 (10.05.2021)

Date of mailing of the international search report
18 May 2021 (18.05.2021)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/010385

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/061449 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 13 April 2017 (2017-04-13) claims, paragraphs [0001], [0042], [0090], examples	1-2, 4, 6-7
Y	claims, paragraphs [0001], [0042], [0090], examples	1-7
Y	JP 2008-187932 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 August 2008 (2008-08-21) examples	6-7
Y	HIRABAYASHI, J. et al., "Glycomics, Coming of Age!" グリコームの時代が来た!, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000, vol. 12(63), pp. 1-5, in particular, sections B, C	6-7
Y	蛍光標識 rBC2LCN, FUJIFILM [online], 28 January 2019, URL: https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00571.html , [retrieved on 05 October 2021] in particular, section Cell staining 'flow cytometry', non-official translation ("Fluorescence labeling rBC2LCN")	1-7
Y	JP 2009-219388 A (JSR CORPORATION) 01 October 2009 (2009-10-01) examples	1-7
Y	JP 2020-503893 A (BLINK AG) 06 February 2020 (2020-02-06) in particular, embodiment 3	1-7
Y	JP 2017-507656 A (VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC.) 23 March 2017 (2017-03-23) claims	1-7
A	舘野 浩章, 糖鎖プロファイリング技術の開発と再生医療・創薬への応用, バイオサイエンスとインダストリー バイオインダストリー奨励賞受賞業績, 2019, vol. 77(4), pp. 326-327, entire text, non-official translation (TATENO, Hiroaki, "Development of sugar chain profiling technique and application to regenerative medicine and drug development", Bioscience & industry Award-winning achievements of Bioindustry Research Award)	1-7
A	MISEVIC, G. N. et al., "New Nanotechnology Applications in Single Cell Analysis: Why and How?", Expression Profiling in Neuroscience, 2012, vol. 64, pp. 271-281, entire text	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/010385

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/061449 A1	13 Apr. 2017	US 2018/0250360 A1 claims, paragraphs [0001], [0284], [0405], examples (Family: none)	
JP 2008-187932 A	21 Aug. 2008	(Family: none)	
JP 2009-219388 A	01 Oct. 2009	(Family: none)	
JP 2020-503893 A	06 Feb. 2020	WO 2018/122162 A1 in particular, embodiment 3	
JP 2017-507656 A	23 Mar. 2017	WO 2015/128272 A2 claims	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/42(2006.01)n; C12Q 1/02(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12Q 1/6876(2018.01)n; G01N 33/53(2006.01)i FI: C12Q1/02 ZNA; C12Q1/68; G01N33/53 S; G01N33/53 M; C12Q1/6876 Z; C07K14/42		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） C07K14/00-19/00; C12Q1/00-1/70; C12N1/00-15/90		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	FENG, Y. et al., Lectin-mediated in situ rolling circle amplification on exosomes for probing cancer-related glycan pattern, Anal. Chim. Acta, 2018, Vol. 1039, pp. 108-115 特に、第108頁要約、第109頁左欄第30行-同頁右欄第11行、第110頁右欄第9行-第111頁左欄第28行	6
Y	特に、第108頁要約、第109頁左欄第30行-同頁右欄第11行、第110頁右欄第9行-第111頁左欄第28行	6-7
X	W0 2017/061449 A1 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) 13.04.2017 (2017-04-13) 特許請求の範囲、段落0001、0042、0090、実施例	1-2, 4, 6-7
Y	特許請求の範囲、段落0001、0042、0090、実施例	1-7
Y	JP 2008-187932 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 21.08.2008 (2008-08-21) 実施例	6-7
Y	HIRABAYASHI, J. et al., Glycomics, Coming of Age! グリコームの時代が来た!, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2000, Vol. 12(63), pp.1-5 特に、B項、C項	6-7
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.05.2021		国際調査報告の発送日 18.05.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小田 浩代 4N 8377 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	蛍光標識rBC2LCN, FUJIFILM[online], 2019.01.28, URL: https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/00571.html , [retrieved on 5.10.2021] 特に、細胞染色<フローサイトメトリー>の項	1-7
Y	JP 2009-219388 A (J S R株式会社) 01.10.2009 (2009 - 10 - 01) 実施例	1-7
Y	JP 2020-503893 A (プリンク アーゲー) 06.02.2020 (2020 - 02 - 06) 特に、実施形態 3	1-7
Y	JP 2017-507656 A (ヴェンタナ メディカル システムズ, インク.) 23.03.2017 (2017 - 03 - 23) 特許請求の範囲	1-7
A	舘野 浩章, 糖鎖プロファイリング技術の開発と再生医療・創薬への応用, バイオサイエンスとインダストリー バイオインダストリー奨励賞受賞業績, 2019, Vol. 77(4), pp. 326-327 全文	1-7
A	MISEVIC, G. N. et al., New Nanotechnology Applications in Single Cell Analysis: Why and How?, Expression Profiling in Neuroscience, 2012, Vol. 64, pp. 271-281 全文	1-7

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/010385

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2017/061449	A1	13.04.2017	US 2018/0250360 A1 特許請求の範囲、段落 0001、0284、0405、実施例	
JP	2008-187932	A	21.08.2008	(ファミリーなし)	
JP	2009-219388	A	01.10.2009	(ファミリーなし)	
JP	2020-503893	A	06.02.2020	WO 2018/122162 A1 特に、実施形態3	
JP	2017-507656	A	23.03.2017	WO 2015/128272 A2 特許請求の範囲	