

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造 解析と品質等評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 早川 堯夫

分担研究者

- | | |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| (1) 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 | 川崎ナナ, 日向昌司, 日向須美子, 太田美矢子
伊藤さつき |
| (2) キリンビール(株)医薬開発研究所 | 松木 滋, 井上 登 |
| (3) 中外製薬(株)生物技術研究所
創薬資源研究所 | 吉澤 博, 久保寺美典
大枝匡義 |
| (4) 雪印乳業(株)生物科学研究所 | 津田英資, 小林直樹 |
| (5) 持田製薬(株)製剤研究室 | 金森利至 |
| (6) 日本ケミカルリサーチ(株)開発研究所 | 藤田 貢, 泉谷和歌子 |
| (7) エーザイ(株)分析研究所 | 四方 靖 |
| (8) (財)化学及血清療法研究所試作研究部 | 菅原敬信, 中島和幸, 今村隆幸, 米村 宏 |
| (9) 東京大学医科学研究所 | 高崎誠一 |
| (10) 大阪大学大学院理学研究科 | 長谷純宏 |
| (11) 京都大学大学院生命科学研究所 | 佐々木隆造 |
| (12) 近畿大学薬学部 | 本田 進 |
| (13) 近畿大学薬学部 | 掛樋一晃 |

要旨 糖タンパク質及び糖鎖関連物質の特性・品質評価に有用な糖鎖構造及び機能解析技術の開発, 並びに新規糖鎖関連医薬品候補である糖タンパク質及び糖鎖関連物質の機能及び糖鎖の構造と機能の解析を行った。

1. 研究目的

糖タンパク質等における糖鎖には様々な機能が賦与されていることが知られてきている。本研究では、

(1) 糖タンパク質及び糖鎖関連物質の特性・品質評価に有用な糖鎖構造及び機能解析技術の開発

(2) 新規糖鎖関連医薬品候補である糖タンパク質及び糖鎖関連物質の機能及び糖鎖の構造と機能の解析を行うことによって、既に臨床の場に供されている糖鎖関連医薬品の品質確保のための新評価法を確立すること、並びに新しい糖鎖関連医薬品を創製することを目的としている。これまでに(1)に関連して、質量分析法(MS)、標識化と各種 HPLC、キャピラリー電気泳動法(CE)及び表面プラズモン共鳴法(SPR)を用いた糖鎖の構造や機能の解析技術の開発、並びに(2)に関連して、肝再生促進因子フォリスタチン(FS)、血小板産生促進作用を有するトロンボポエチン(TPO)、 α -マンノシダーゼ-II 関連酵素、骨代謝改善薬破骨細胞形成抑制因子(OCIF)、癌転移抑制作用を有する GD1a、抗 DIC 作用を有する尿由来プロテイン C インヒビター(uPCI)、D-アミノ酸異性化酵素、抗凝固作用を有する活性化プロテイン C、抗凝固作用を有する尿由来トロンボモジュリン(uTM)、血栓溶解剤部位特異的変異型組織プラスミノゲンアクチベータ (mft-PA)、炎症性疾患患者血清中に選択的に発現しているシアロ糖タンパク質、エリスロポエチン(EPO)の生理機能、糖鎖構造、及び糖鎖の構造と機能の解析に関する基礎的研究を行い、多くの知見を得てきた。

本年度は、(1) に関する研究として、

- 1) 質量分析法を用いた糖タンパク質の特性・品質評価法、
- 2) 標識法及び各種 HPLC を用いた糖鎖構造解析法、
- 3) CE によるグリコフォーム解析法、
- 4) CE 及び SPR を用いた糖鎖の機能解析法に関する研究を行った。

また、(2)に関する研究として、

- 1) 肝再生促進因子 FS、
- 2) 血小板産生促進因子 TPO、
- 3) α -マンノシダーゼ-II 関連酵素 α マンノシダーゼ IIx(MX)、
- 4) 骨代謝改善薬 OCIF、
- 5) 癌転移抑制作用を有する GD1a、
- 6) 抗 DIC 作用を有する uPCI、
- 7) 抗凝固因子 uTM、
- 8) 血栓溶解剤 mft-PA、
- 9) 多機能性糖タンパク質 EPO に関する生理機能、糖鎖構造、及び糖鎖の構造と機能の解析に関する基礎的研究の継続に加え、新たに 10) 組換え型ヒトロンピン(rTB)の糖鎖構造解析を行った。

2. 研究方法

- (1) 糖タンパク質及び糖鎖関連物質の特性・品質評価に有用な糖鎖構造及び機能解析技術の開発
- 1) *ESI-LC/MS* を用いた糖タンパク質の特性・品質評価法 モデル糖タンパク質として、CHO 細胞及び BHK 細胞産生組換え型ヒト EPO を用いた。
 - 2) 標識法及び各種 *HPLC* 法を用いた糖鎖構造解析法 2-アミノベンズアミド(2AB)化と蛍光検出 HPAEC(HPAEC-FD)分析には、正常マウス及びβガラクトース転移酵素ノックアウトマウス由来血漿糖タンパク質、及び肝細胞から常法により調製した細胞膜糖タンパク質からヒドラジン分解により切り出した糖鎖を用いた。また、ピリジルアミノ(PA)化と2次元糖鎖マッピング法による分析にはタカアミラーゼ A、マウス脳の可溶化タンパク質の LCA 画分、IgY 糖鎖、及び uTM 糖鎖等を用いた。
 - 3) *CE* 及び各種クロマトグラフィーを用いたグリコフォーム解析法 モデル糖タンパク質としてα1-酸性糖タンパク質(AGP)を用い、*CE*、イオン交換クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、及び Cu(II)アフィニティークロマトグラフィーでグリコフォームを分析した。
 - 4) *CE* 及び *SPR* を用いた糖鎖の機能解析法 *SPR* のモデル糖タンパク質としてウシリボヌクレアーゼ B(RNaseB)、ニワトリオバルプミン、及び LCA 等を用いた。
- (2) 新規糖鎖関連医薬品候補である糖タンパク質及び糖鎖関連物質の機能及び糖鎖の構造と機能の解析
- 1) *FS* 糖鎖改変型 FS は、ヒト脳 cDNA を鋳型とした RT-PCR 法で GnT-III 遺伝子をクローニングし、発現ベクター pCI-neo に組み込み、FS 産生 CHO 細胞に導入して作製した。
 - 2) *TPO* 糖鎖はトリプシン消化物から LCA カラム及び *HPLC* で糖ペプチドを単離し、MALDI-TOFMS で特定後、N-グリコシダーゼ F で切り出した。さらに 2AB 標識し、Bio-Gel-P4 を用いて解析した。
 - 3) *MX* 細胞内局在はポリクロナール抗体を用いた免疫染色により確認した。*In vitro* 活性は、Protein-A と MX の推定される触媒ドメインをコードする Protein A-MX 融合タンパク質を COS 細胞で産生させて調べた。*in vivo* 活性は ConA アフィニティークロマトグラフィー及び *HPLC* を用いて、MX を過剰発現させた CHO 細胞と野生型 CHO 細胞の N 結合糖鎖のプロファイリングを行い解析した。
 - 4) *OCIF* 臨床検体中の *OCIF* 濃度は ELISA によって測定した。安定性はマウス脾臓細胞と骨芽細胞様ストローマ細胞株 ST2 の共培養による破骨細胞形成試験法により測定した。
 - 5) *GD1a* FBJ ウイルス誘導マウス骨肉腫細胞由来低転移性 FBJ-S1 及び高転移性 FBJ-LL 細胞、FBJ-LL 細胞に GM2 合成酵素遺伝子導入した GD1a 発現細胞、及び HepG2 細胞を用いた。c-MET のチロシンリン酸化は抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫染色により測定した。
 - 6) *uPCI* N 結合糖鎖結合部位改変型 PCI は、バキュロウイルス発現系で作製した。改変体のヘパリン親和性は HiTrap Heparin カラム、また、トロンビン及び血漿カリクレインに対する阻害活性はそれぞれ合成基質 S-2238 及び S-2366 を用いて測定した。
 - 7) *uTM* 単離した糖鎖を PA 化し、2次元糖鎖マッピングで構造を解析した。標準糖鎖が入手できないものは MALDI-TOFMS 分析を行った。
 - 8) *mft-PA* 糖鎖構造はヒドラジン分解後、2次元糖鎖マッピング法、逐次消化法及び ESIMS 分析により解析した。
 - 9) *EPO* mRNA の定量には RT-real time PCR 法を用いた。血清中 EPO は酵素免疫法により定量した。
 - 10) *rTB* 遺伝子組換え型ヒトトロンビン(rTB)はマウスミエローマ sp/20 細胞を用い、プレトロンビンとして発現させ、エカリンで活性化した。糖鎖構造は、レクチンプロットティング、HPAEC-PAD、PA 化と *HPLC* 及び MALDI-TOFMS 分析により解析した。

3. 結果と考察

(1)糖タンパク質及び糖鎖関連物質の特性・品質評価に有用な糖鎖構造及び機能解析技術の開発

1) *ESI-LC/MS* を用いた糖タンパク質の特性・品質評価法

我々は、*ESI-LC/MS* を用いた糖タンパク質糖鎖の不均一性及び構造解析法を開発し、EPO 等に結合している多数の糖鎖構造解析及び部位特異的糖鎖不均一性解析に応用できることを実証してきた。今年度は、産生細胞の異なる EPO-A, B, 及び C をモデルとして用いて、本分析法の特性・品質評価法としての有用性を評価した。その結果、*LC/MS* とエキソグリコシダーゼ消化法を組み合わせることにより、EPO-A にはジシアロ糖鎖が多く、EPO-B にはアセチル化糖鎖が多いこと、また、EPO-C の糖鎖の一部が硫酸化されていることを見出した。

(Fig. 1). これまでに EPO の糖鎖が硫酸化されているという報告例はなく、本分析法が糖タンパク質特性解析法として有用であることが確認された。また、3種類の EPO の糖鎖構造の違いを簡単に明らかにすることができることから、恒常性評価法及び同等性/同質性評価法として有用であることが実証された。

2) 標識法及び各種 HPLC を用いた糖鎖構造解析法

これまで、2AB 化と HPAEC-FD、並びに PA 化と 2 次元糖鎖マッピングを用いた糖鎖構造解析法について検討を行ってきた。本年度は、HPAEC-FD を用いた未知試料の糖鎖の解析、並びに、昨年引き続き SDS-PAGE で精製した糖タンパク質糖鎖の 2 次元糖鎖マッピングによる解析と、自動化に向けた部分加水分解法を検討した。まず、HPAEC-FD を β -ガラクトース転移酵素-I のノックアウトマウス由来血漿糖タンパク質及び肝細胞膜糖タンパク質の N 結合糖鎖の構造解析に応用し、タイプ 1 鎖(Gal β 1-3)とタイプ 2 鎖(Gal β 1-4)を有する糖鎖の相互分離と解析に有用であることが確認された (Fig.2)。つぎに、SDS-PAGE を用いて分離・精製した糖タンパク質を PVDF 膜に転写し、無水ヒドラジンを作用させて糖鎖を回収し、さらに PA 化後の精製方法を工夫することによって、不純物のピークを除去し、クマシーで染色できる量のタンパク質の糖鎖を 2 次元糖鎖マッピング法により解析できるようになった。この方法を用いて、タカアミラーゼ A やマウス脳可溶性タンパク質の LCA 画分の糖鎖を解析することができた。また、PA 化糖鎖を酸で部分的に加水分解後 2 次元糖鎖マッピングを行い、元の糖鎖の構造を決定する部分加水分解法を用いて、IgY, uTM, 及びパイヤラテックス由来糖タンパク質に結合している未知糖鎖の構造を決定することができた (Fig. 3)。以上のように、標識法と HPLC を用いた分析法によって、構造未知の糖鎖を解析することが可能になった。

3) CE 及び各種クロマトグラフィーを用いたグリコフォーム解析法

平成 10 年度、CE を用いるグリコフォーム分析、並びに 3-アミノ安息香酸(3AB)標識糖鎖の CE による糖鎖構造解析法を報告した。本年度は、AGP をモデルとして、CE 及び各種クロマトグラフィーによるグリコフォーム分析が糖鎖の不均一性を反映しているかどうかを評価した。CE で分離したグリコフォームの分子量を MALDI-TOF で確認することによって、速く泳動される成分ほど分子量が大きく、シアル酸含量が高いことが確認され、CE によるグリコフォーム分析は糖鎖の不均一性を反映していることが示唆された (Fig. 4)。これに対して、イオン交換クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、及び Cu(II)アフィニティークロマトグラフィーによるグリコフォーム分析は、各画分の糖鎖を 3AB 化し、HPLC で糖鎖の不均一性を解析した結果、必ずしも糖鎖の不均一性を反映していないことが明らかになった。以上のことから、医薬品評価において、グリコフォーム解析及び不均一性解析の両方が必要であることが示唆された。

4) CE 及び SPR を用いた糖鎖の機能解析法

物理化学的手段により特定物質との相互作用の強さを測定し数値化する方法として CE 及び SPR を検討してきた。本年度は、まず、CE による結合定数の一斉測定を検討した。CE による RNaseB のグリコフォーム分析の際に、泳動液に LCA レクチンを添加すると各グリコフォームのピークが LCA 濃度に依存して遅延し (Fig. 5)、移動時間の遅延から各グリコフォームに対する結合定数($K_a=8-9 \times 10^6 M^{-1}$)を一斉に測定することができた。RNaseB の糖鎖部分を切り出し、ANTS 標識し、LCA に対する結合定数を測定したところ K_a は $10^4-10^5 M^{-1}$ と算出され、グリコフォームに対する K_a よりも一桁小さいことがわかった。これは、親和性にポリペプチド鎖が関与していることに起因すると思われる。つぎに、SPR において、糖鎖モデルとしてマルトースとメルピオースの混合物を用い、あらかじめ還元的にアミノ化してグリカミン誘導体混合物とし、生体試料中の糖鎖等を特異的に取り出し、ターゲットタンパク質への結合定数を測定する簡単なプロトコールを確立することができた。

(2) 新規糖鎖関連医薬品候補である糖タンパク質及び糖鎖関連物質の機能及び糖鎖の構造と機能の解析

1) FS 糖鎖機能解析を目指した糖鎖改変型 FS の作製

これまでに、FS の糖鎖はアクチンクリアランスに影響を及ぼしていることを示唆する結果を得てきた。FS 糖鎖を改変し、生物活性に及ぼす影響を調べることは、糖鎖の役割をより明確にすることにつながると思われる。GlcNAc 転移酵素 III (GnT-III) は、N 結合糖鎖のコアマンノースへ GlcNAc を転移し bisecting 構造を形成させる酵素である。本年度は、FS 産生細胞に GnT-III 遺伝子を導入することによって、GnT-III を

高発現する FS 産生 CHO 細胞株を取得することに成功した。この細胞が産生する FS の糖鎖構造を解析した結果、bisepting GlcNAc が付加していることが示唆された。糖転移酵素遺伝子を操作した細胞株を樹立し、糖鎖構造を改変した糖タンパク質を生産する手法は、糖鎖構造の生理活性に与える影響を解析することを可能にするにとどまらず、優れた機能を有する糖タンパク質を生産する技術的な基盤となることが期待される。

2) TPO の部位特異的糖鎖構造解析

これまでに、TPO の N 結合型糖鎖は、主に 2 本鎖型及び 4 本鎖型糖鎖であることを明らかにしてきた。今回は、結合部位ごとに糖ペプチドを分離して糖鎖構造の解析を検討した。予測された 6 カ所の結合部位のうち、糖鎖の結合が確認できた 5 カ所について糖ペプチドの MALDI-TOFMS、及び遊離糖鎖の 2AB 標識による分析を行った結果、Asn176、Asn213、Asn234 及び Asn319 の糖鎖は 2 本鎖型の割合が高く、Asn185 の糖鎖は、4 本鎖型の割合が高いことが明らかになった (Fig. 6)。

3) MX の N 結合糖鎖生成における役割について

昨年度は、N 結合糖鎖の生成に関わる α マンノシダーゼ II の代替経路の酵素として α マンノシダーゼ III の存在を推定した。本年度は、 α マンノシダーゼ II の関連酵素である MX の N 結合糖鎖生成における役割を調べた。免疫細胞化学法により、MX はゴルジ体タンパク質であることが示唆された。また、MX の *in vitro* 活性を調べるため、MX の触媒ドメインと Protein A の融合タンパク質を作製し、合成基質 4-UM-Man に対する活性を確認した。高マンノース型糖鎖に対する分解活性は確認できなかったが、MX を過剰発現している CHO 細胞及び野生型 CHO 細胞の N 結合糖鎖のプロファイリングにより MX の *in vivo* 活性を調べた結果、MX は Man₆GlcNAc₂ の Man α 1-6 結合と Man α 1-3 結合を切断することが示唆された (Fig. 7)。

4) OCIF の骨代謝改善薬としての可能性及び安定性に及ぼす糖鎖の役割

これまで、OCIF の骨代謝改善薬としての可能性を探るため、種々の骨代謝関連疾患と OCIF との関わりを検討してきた。今年度は、第一に、ヒト歯根膜線維芽細胞が破骨細胞形成に及ぼす作用、及びステロイド投与と OCIF との関連を検討した。その結果、ヒト歯根膜線維芽細胞が OCIF を生産・分泌しており、破骨細胞の形成と機能を制御していること、及びこの細胞が破骨細胞による吸収から歯を防御している可能性が示唆された。また、ステロイド投与患者の血清 OCIF 濃度は、グルココルチコイド投与によって低下することが明らかになった。以上のことから、OCIF は、骨粗鬆症、癌の高カルシウム血症等の他、歯槽膿漏治療薬やステロイド投与時に惹起される骨吸収の亢進の治療薬としても活用できる可能性が示唆された。第二に、OCIF の熱安定性を調べ、シアロ OCIF の熱安定性はアシアロ OCIF の熱安定性より著明に高いことが明らかになった (Fig. 8)。この結果から、OCIF のシアル酸が OCIF の物理的安定性に寄与していることが明らかになった。

5) GD1a の癌転移抑制機構の解明

我々は FBJ-LL 細胞を用いてスフィンゴ糖脂質であるガングリオシド GD1a が癌の転移過程に関与する現象（細胞運動、細胞接着、腫瘍血管新生を促進する VEGF の分泌）を抑制することを明らかにしてきた。昨年度は、GD1a が HGF により誘導される細胞運動、細胞形態の変化、及びアクチンフィラメントの形成を抑制すること、また、GD1a 高発現細胞では HGF 受容体 c-MET の発現量は変わらないが、HGF 刺激後の c-MET のチロシンリン酸化の程度が低下していることを明らかにした。本年度は、GD1a が HepG2 細胞においても c-MET のチロシンリン酸化を抑制することを確認した。以上のことから、GD1a は HGF により誘導される細胞運動を c-MET のチロシンリン酸化抑制を介して抑制していることが明らかになった。

6) N 結合糖鎖結合部位改変型 uPCI の作製と糖鎖の機能解析

これまで、PCI は凝固因子トロンビン及び血漿カリクレインを阻害し、DIC 治療薬として使用されている低分子量ヘパリンよりも優れた抗 DIC 作用を示すこと、また、N 結合糖鎖は、PCI の酵素阻害活性に関与していることを明らかにしてきた。本年度は、PCI の酵素阻害活性における Asn230、Asn243、及び Asn319 結合糖鎖それぞれの役割を解明するため、7 種類の N 結合糖鎖結合部位改変型 PCI(N230S、N243Q、N319Q、N230S/N243Q、N230S/N319Q、N243Q/N319Q、及び N230S/N243Q/N319Q) を作製し、ヘパリン親和性及び酵素阻害活性を比較した。その結果、いずれの改変型 PCI もヘパリン親和性が野生型より増加していること、また、酵素阻害活性は、Asn230 糖鎖欠損 PCI で増大していることが明らかになった (Table 1)。したがっ

て、Asn230 結合糖鎖を欠損させて作製した改変型ヒト PCI(N230S)は強力な抗 DIC 作用を有することが示唆された。

7) uTM の糖鎖構造解析

これまでに、単離糖鎖の PA 化及び MALDI-TOFMS による分子量及びフラグメンテーションピークの測定は、uTM から単離した新規糖鎖の構造解析に有用であることを示してきた。本年度は、2次元糖鎖マッピングを用いて uTM の全糖鎖の構造解析を行った。標準糖鎖により構造が推定できない糖鎖は、MALDI-TOFMS により推定することが可能であった。また、Negative 測定による分子量測定、及び Positive 測定によるフラグメント測定から硫酸基の存在を推定することができた。uTM の全糖鎖構造は Table 2 に示す通りである。

8) mft-PA 及び t-PA の糖鎖の機能解析

分子内の Cys84 を Ser に変換した t-PA は、Asn117、Asn184 及び Asn448 結合糖鎖のうち、Asn117 の高マンノース型が複合型に変化することによって、血中半減期の大幅な延長に成功した部位特異的変異型 t-PA である(mft-PA)。本年度は、t-PA 及び mft-PA の糖鎖が活性に及ぼす影響をエキソグリコシダーゼ消化によって検討した。その結果、t-PA 及び mft-PA とも糖鎖末端シアル酸が活性抑制に寄与していること、また、mft-PA では Asn117 に付加する糖鎖が活性抑制に寄与しているが、t-PA では Asn184 に付加する糖鎖が活性抑制に寄与していることが明らかになった。さらに、t-PA 及び mft-PA の糖鎖除去は、プラスミン活性化反応における Km 値に影響しないが、kcat を増大させることが確認された (Table 3)。これは、糖鎖を除去することによって、プラスミン-フィブリノーゲン-プラスミン-アクチベータ間の安定性や親和性が増したために触媒活性が上昇したものと考えられる。

9) EPO の発現調節機構の解明

これまで、EPO は腎臓だけでなく脳及び子宮でも発現され、それぞれ赤血球産生、神経細胞死防止及び血管新生に関与していることを明らかにしてきた。本年度は昨年を引き続き各組織における EPO の発現調節機構を明らかにするため、各組織における mRNA 及び血清中の EPO の発現量を調べた。その結果、腎臓では低酸素刺激後急激に増加しその後著しく減衰するが、大脳では低酸素負荷後直ちに増加しそのまま維持されることが明らかになった。また、子宮の EPO mRNA はエストロゲン受容体を介したエストロゲン刺激により一過的に増加すること、さらに卵巣においても EPO mRNA がエストロゲンにより誘導され、低酸素刺激はこれを亢進させることが明らかになった (Table 4)。このような各組織間での EPO 発現制御機構の相違は、EPO の生理作用の相違に起因すると思われる。すなわち、腎臓での低酸素刺激による一過的増加は赤血球産生過多を防ぐためであり、大脳での低酸素刺激による持続的増加は神経細胞死を防ぐため、また、子宮におけるエストロゲン刺激による一過的増加は、性周期に伴う子宮内膜での血管新生に対応したものであると考えられる。

10) rTB の作製と糖鎖構造解析

ウイルス感染等の問題を克服するために rTB の作製を検討し、さらに rTB の糖鎖構造を解析した。SP2/0 細胞を用いて発現させた rTB には、フコシル化糖鎖や GalNAc 含有糖鎖の付加が示唆されたが、主な糖鎖はヒト血漿由来トロンピン(nTB)と同様に複合型 2 本鎖糖鎖であることが示唆された。

4. 結論

(1)糖タンパク質及び糖鎖関連物質の特性・品質評価に有用な糖鎖構造及び機能解析技術として、

- 1) LC/MS は糖タンパク質特性解析法、恒常性評価法、及び同等性/同質性評価法として有用であること
- 2) 2AB 化糖鎖の HPAEC-FD、及び PA 化糖鎖の 2 次元糖鎖マッピングは、未知試料や SDS-PAGE で分離・精製した糖タンパク質糖鎖の構造解析に有用であること
- 3) CE はグリコフォーム解析に有用であること
- 4) CE 及び SPR は糖鎖-タンパク質相互作用解析に有用であることを確認した。また、

(2) 新しい糖鎖関連医薬品の創製をめざし、

- 1) 肝再生促進因子 FS の糖鎖を糖転移酵素遺伝子導入によって改変できること

- 2) 血小板産生促進因子 TPO の5つのN結合糖鎖結合部位に結合している主な糖鎖構造
 - 3) N結合糖鎖生合成過程におけるMXの役割
 - 4) 破骨細胞形成抑制因子 OCIF の新しいタイプの骨代謝異常治療薬としての可能性と糖鎖の役割
 - 5) 癌転移抑制作用を有する GD1a は c-MET のチロシンリン酸化を抑制することにより HGF により誘導される細胞運動を抑制していること
 - 6) N結合糖鎖結合部位改変型 uPCI の抗 DIC 治療薬としての可能性
 - 7) uTM の全糖鎖構造
 - 8) mft-PA 及び t-PA の糖鎖の機能
 - 9) 腎臓, 脳, 子宮及び卵管における EPO mRNA の発現調節機構は各組織によって異なっていること
 - 10) rTB の糖鎖構造
- を明らかにした。

5. 研究業績

- 1) Hayakawa, T.: Specifications For Biotechnological Substances, ICH 5 Proceedings, *The Regulatory Affairs Journal*, in press
- 2) Hayakawa, T.: Perspective an assessing comparability of biotechnology products : a view from Japan, *Dev Biol Stand.*, Basel, Karger, in press
- 3) 早川堯夫: 製品の特性解析・品質規格及び安定性及び Comparability: バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, pp.205-230 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 4) 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質・安全性評価, 早川堯夫, 山崎修道, 延原正弘編, 255-284 (2001), エル・アイ・シー, 東京
- 5) Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T. : Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **910**, 1-11 (2001)
- 6) Kawasaki, N., Ohta, M., Hyuga, S., Hyuga, M. and Hayakawa, T.: Application of liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry to the analysis of site-specific carbohydrate heterogeneity in erythropoietin, *Anal. Biochem.*, **285**, 82-91 (2000)
- 7) Oda, Y., Nakayama, K., Abdul-Rahman, B., Kinoshita, M., Hashimoto, O., Kawasaki, N., Hayakawa, T., Kakehi, K., Tomiya, N., and Lee, Y. C.: *Crocus sativus* lectin recognizes (Man)₃GlcNAc in the N-glycan core structure, *J. Biol. Chem.*, **275**, 26772-26779 (2000)
- 8) Kobayashi, T., Niimi, S., Hashimoto, O., and Hayakawa, T.: Expression of Inhibin β_A , β_B , and Follistatin mRNAs in Carbon Tetrachloride Induced Rat Liver Regeneration Model, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 755-757 (2000)
- 9) Hashimoto, O., Kawasaki, N., Tuchida, K., Shimasaki, K., Hayakawa, T., and Sugino, H.: Difference between follistatin isoforms in the inhibition of activin signalling: Activin neutralizing activity of follistatin isoforms is dependent on their affinity for activin, *Cell. Signal.*, **12**, 565-571 (2000)
- 10) Hyuga, S., Kawasaki, N., Hashimoto, O., Hyuga, M., Ohta, M., Yamagata, S., Yamagata, T., and Hayakawa, T.: Possible Role of Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor and Activin A Produced by the Target Organ in Liver Metastasis, *Cancer Lett.*, **153**, 137-143 (2000)
- 11) Hayakawa, T., Ohta, M., and Kawasaki, N.: Current Analytical Procedures for Glycosylated Proteins, *Pharmaceutica Special Issue, Proceedings Biologicals Beyond 2000*, 87-102 (2000)
- 12) Watanabe, T., Inoue, N., Kutsukake, T., Matsuki, S., Takeuchi, M. : Labeling Conditions Using a 2-Aminobenzamide Reagent for Quantitative Analysis of Sialo-oligosaccharides, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 269-273 (2000)
- 13) Kotake, S., Udagawa, N., Ishiyama, S., Hakoda, M., Mogi, M., Yano, K., Tsuda, E., Takahashi, K., Furuya, T., Kim, K. J., Saito, S., Nishikawa, T., Takahashi, N., Togari, A., Tomatsu, T., Suda, T., and Kamatani, N.: Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes. Possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients, *Arthritis and Rheumatism*, in press
- 14) Wada, N., Maeda, H., Tsuda, E., Yano, K., Nakamuta, H., Tanabe, K., and Akamine, A.: The expression of OPG/OCIF in human periodontal ligament cells, *Journal of Periodontal Research*, in press
- 15) Sasaki, N., Kusano, E., Ando, Y., Yano, K., Tsuda, E., and Asano, Y.: Glucocorticoid decreases circulating Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (OCIF)/Osteoprotegerin (OPG): Possible mechanism of glucocorticoid induced osteoporosis. *Nephrology Dialysis Transplantation, Rapid Communication*, in press
- 16) Izutani, W., Fujita, M., Nishizawa, K., and Koga, J.: Urinary protein C inhibitor as a therapeutic agent to disseminated intravascular coagulation (DIC): a comparison with low molecular weight heparin in rats with lipopolysaccharide-induced DIC, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1046-1050 (2000)
- 17) Yoshitani, N., and Takasaki, S.: Micro-scale synthesis of dextran-based multivalent N-linked oligosaccharide probes, *Anal. Biochem.*, **277**, 127-134 (2000)
- 18) Mori, E., Yoshitani, N., Mori, T., and Takasaki, S.: Calcium ion-independent recognition of sialyl and non-sially N-acetylglucosamine and Lex structures by boar sperm, *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 86-92 (2000)
- 19) Mori, T., Guo, M.W., Sato, E., Baba, T., Takasaki, S. and Mori, E.: Molecular and immunological approaches to mammalian fertilization, *J. Reprod. Immunol.*, **47**, 139-158 (2000)
- 20) Takahashi, S., Sasaki, T., Chiba, Y., Mizuno, M., Ishida, H., Inazu, T., Kotani, N., Takasaki, S., Takeuchi, M., and Endo, T.: Detection of β -1,2-N-acetylglucosamine transfer activity to mannosyl residue on a synthetic peptide: possible relation to mammalian O-mannosyl glycan processing pathway, *Glycobiol.*, in press
- 21) Yoshitani, N., Mori, E., and Takasaki, S.: Detection of carbohydrate recognition molecules on the plasma membrane of boar sperm by dextran-based multivalent oligosaccharide probes. *Glycobiol.*, in press
- 22) Otake, Y., Fujimoto, I., Tanaka, F., Nakagawa, T., Menon, K., Yazawa, S., Hase, S., Wada, H., and Ikenaka, K.: Analysis of

- N*-linked oligosaccharides expressed in human sera from healthy controls and patients with non-small cell lung cancer, *J. Biochem.*, in press
- 23) Makino, Y., Omichi, K., Kuraya, N., Ogawa, H., Nishimura, H., Iwanaga, S., and Hase, S. : Structural analysis of *N*- linked sugar chains of human blood clotting factor IX, *J. Biochem.*, **128**, 175-180 (2000)
 - 24) Makino, Y., Shimazaki, A., Omichi, K., and Hase, S.: Processing pathway deduced from the structures of *N*-glycans in *Carica papaya*, *J. Biochem.*, **127**, 1121-1126 (2000)
 - 25) Sasaki, R., Masuda, S., and Nagao, M. : Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin, *News on Physiol. Sci.*, in press
 - 26) Yasuda, Y., Musha, T., Tanaka, H., Fujita, H., Utsumi, H., Matsuo, T., Masuda, S., Nagao, M., Sasaki, and Nakamura, Y. : Inhibition of erythropoietin signaling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice, *Br. J. Cancer*, in press
 - 27) Chikuma, M., Masuda, S., Kobayashi, T., Nagao, M., and Sasaki, R. : Tissue-specific regulation of erythropoietin production in mouse kidney, brain and uterus, *Am. J. Physiol. Metab.*, **279**, 1242-1248 (2000)
 - 28) Sasaki, R., Masuda, S., and Nagao, M. "Erythropoietin: Multiple physiological functions and regulation of biosynthesis, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 1775-1793 (2000)
 - 29) Kambe, T., Tada-Kambe, J., Kuge, Y., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., and Sasaki, R. :Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonic carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in a hypoxia-response enhancer, *Blood*, **96**, 3265-3271 (2000)
 - 30) Masuda, S., Kobayashi, T., Chikuma, M., Nagao, M., and Sasaki, R. :The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner, *Am. J. Physiol. Metab.*, **278**, E1038- E1044 (2000)
 - 31) Masuda, S., Moon, S-K., Kambe, T., Nagao, M., and Sasaki, R.: A new Biological Strategy for High Productivity of recombinant proteins in animal cells by the use of hypoxia-response enhancer, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 157-164(2000)
 - 32) Honda, S., Okeda, J., Iwanaga, H., Kawakami, S., Taga, A., Suzuki, S., and Imai, K.: Ultramicro analysis of reducing carbohydrates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection as 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole-tagged methyl glycamine derivatives, *Anal. Biochem.*, **286**, 99-111 (2000)
 - 33) Suzuki, S., Tanaka, R., Takada, K., Inoue, N., Yabusako, Y., Honda, A., and Honda, S.: Analysis of sialo-N-glycans in glycoproteins as 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, in press.
 - 34) Taga, A., Suzuki, S., and Honda, S.: Capillary electrophoretic analysis of carbohydrates derivatized by in-capillary condensation with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, *J. Chromatogr. A*, in press
 - 35) Honda, S., and Taga, A.: Studies of carbohydrate-protein interaction by high-performance capillary affinity electrophoresis. Carbohydrate Analysis of Modern Chromatography and Electrophoresis (Special Volume of J. Chromatogr.), ed. by Z. El Rassi, Elsevier, Netherlands, Chapter 16, in press
 - 36) Honda, S.: Monosaccharide analysis by capillary electrophoresis. Capillary Electrophoresis of Oligosaccharides and Complex Carbohydrates (Special Volume of Methods in Molecular Biology), ed. by S. Honda and P. Thibault, Humana Press, Totowa, N.J., Chapter 10, in press
 - 37) Honda, S., and Suzuki, S.: Separation of oligosaccharides by capillary zone electrophoresis using buffer modifiers. Capillary Electrophoresis of Oligosaccharides and Complex Carbohydrates (Special Volume of Methods in Molecular Biology), ed. by S. Honda and P. Thibault, Human Press, Totowa, N.J., Chapter 5, in press
 - 38) Taga, A., and Honda, S.: Affinity capillary electrophoresis of oligosaccharides. Capillary Electrophoresis of Oligosaccharides and Complex Carbohydrates (Special Volume of Methods in Molecular Biology), ed. by S. Honda and P. Thibault, Humana Press, Totowa, N.J., Chapter 9, in press
 - 39) Taga, A., and Honda, S.: Determination of association constant of carbohydrate-protein interaction. Capillary Electrophoresis of Oligosaccharides and Complex Carbohydrates (Special Volume of Methods in Molecular Biology), ed. by S. Honda and P. Thibault, Humana Press, Totowa, N.J., Chapter 16, in press
 - 40) Suzuki, S., Kelley, J. F., Locke, S. J., Thibault, P., and Honda, S.: Derivatization of carbohydrates. Capillary Electrophoresis of Oligosaccharides and Complex Carbohydrates (Special Volume of Methods in Molecular Biology), ed. by S. Honda and P. Thibault, Human Press, Totowa, N.J., Chapter 3, in press
 - 41) Kawai, Y., Takemoto, M., Oda, Y., Kakehi, K., Ohta, Y., Yamaguchi, S. and Miyake, M.: Inhibition of *in vitro* fertilization of mouse gametes by sulfated sialic acid polymers, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 936 – 940 (2000)
 - 42) Kinoshita, M., Inagake, K., Kawabata, A., Kuroda, R., Oda, Y. and Kakehi, K.: Fluorometric determination of mucin-type glycoproteins by the galactose oxidase-peroxidase method, *Anal. Biochem.*, **284**, 87 – 92 (2000)
 - 43) Kawabata, A., Morimoto, N., Oda, Y., Kinoshita, M. and Kakehi, K.: Determination of mucin in salivary glands using sialic acids as the marker by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection, *Anal. Biochem.*, **283**, 119 – 121 (2000)
 - 44) Kawabata, A., Morimoto, N., Nishikawa, H., Kuroda, R., Oda, Y. and Kakehi, K.: Activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2) triggers mucin secretion in the rat sublingual gland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **270**, 298 – 302 (2000)
 - 45) Haginaka, J., Matsunaga, H. and Kakehi, K. : Separation of enantiomers on a chiral stationary phase based on ovoglycoprotein, VIII. Chiral recognition ability of partially and completely deglycosylated ovoglycoprotein, *J. Chromatogr. A*, **745**, 149 - 157 (2000)
 - 46) Iwaki, M., Murakami, E. and Kakehi, K. : Chromatographic and capillary electrophoretic methods for the analysis of nicotinic acid and its metabolites, *J. Chromatogr. B*, **747**, 229 - 240 (2000)

6. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許出願 (特願 2000-195490) , 発明の名称 : 改変型ヒトプロテイン C インヒビター, 発明者 : 藤田 貢, 高橋健一

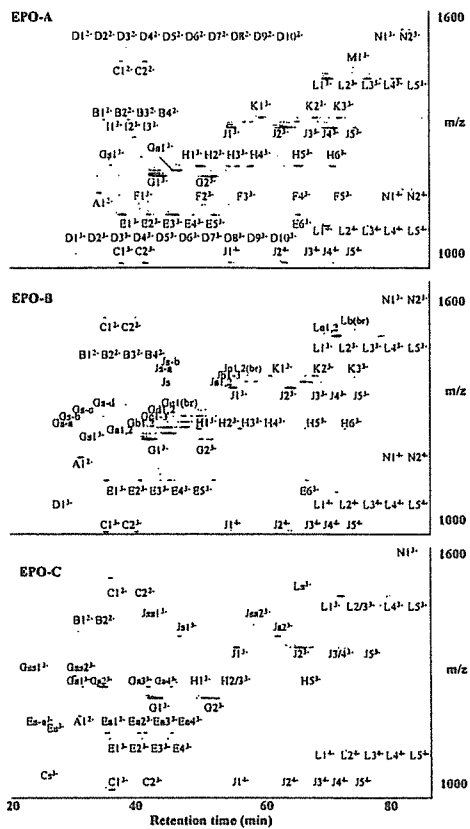


Fig.1. 2D display of LC/MS of reduced oligosaccharides from EPO-A, B, and C. A, BiNA2; B, TriNA2 (BiLac1NA2); C, TriNA3; D, TetraNA2 (BiLac2NA2, TriLac1NA2); E, TetraNA3 (TriLac1NA3); F, TetraLac1NA2 (TriLac2NA2); G, TetraNA4, H, TetraLac1NA3 (TriLac2NA3); I, TetraLac2NA2; J, TetraLacNA4; K, TetraLac2NA3; L, TetraLac2NA4; M, TetraLac3NA3; N, TetraLac3NA4; a, monoacetyl; b, diacetyl; c, triacetyl; d, tetraacetyl; e, pentaacetyl; s, monosulfated; ss, disulfated.

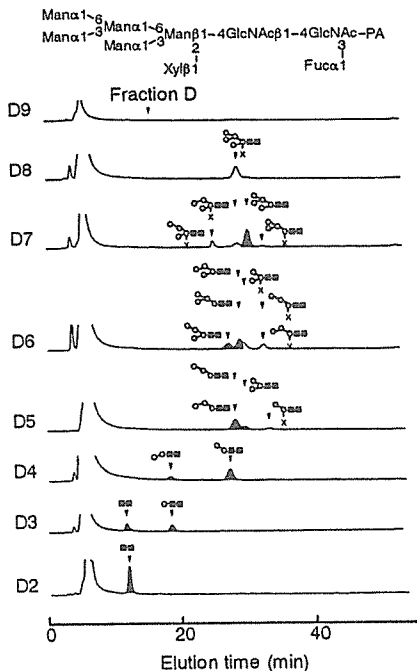
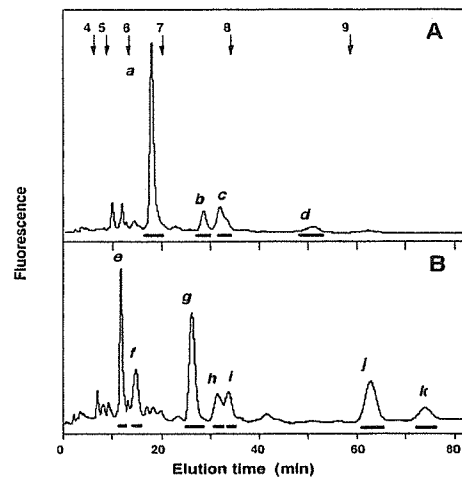


Fig.3. 2D-HPLC analysis of partial acid hydrolysates of $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)(\text{Xyl}\beta 1-2)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-3)\text{GlcNAc-PA}$ obtained from the proteinase inhibitor of inhibitor of *Calica papaya*.



- a Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- b Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ Man
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man
- c (h) Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man
- d Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ Man
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man
- e GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- f Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- g Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ { GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ Man
GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man } Man-R
- h Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- i Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- j Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
- k Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ { GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ Man
Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ { GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man Man-R
GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man } Man-R

Fig.2. HPAEC-FD of 2AB labeled neutral and asialo-N-glycans from plasma glycoproteins from wild-type (A) and Gal-T1 knockout mice (B). Structures of galactosylated N-glycans of plasma glycoproteins from wild-type (peaks a to d) and Gal-T1 knockout mice (peaks g to k).

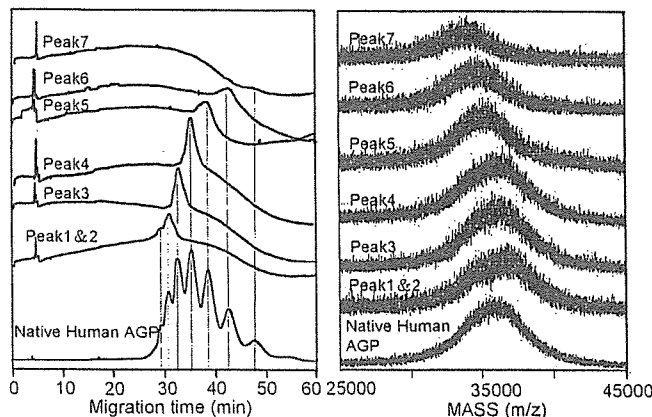


Fig.4. Collection of AGP glycoforms by capillary electrophoresis. A) Capillary electrophoresis of collected peaks. B) MALDI-TOFMS spectra of the collected peaks.

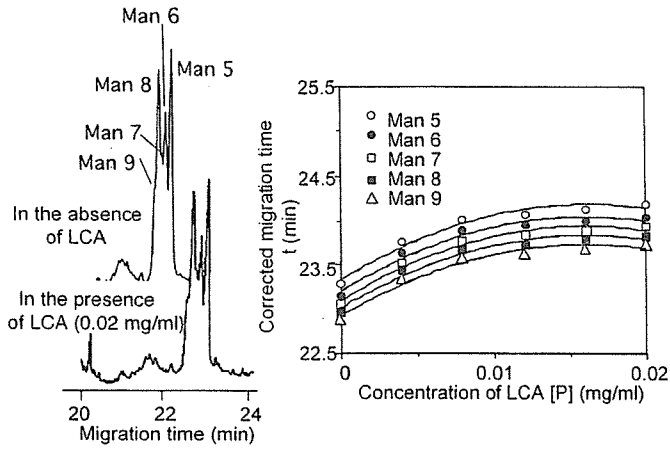


Fig.5. LCA concentration-dependent retardation of the bovine ribonuclease glycoform peaks.

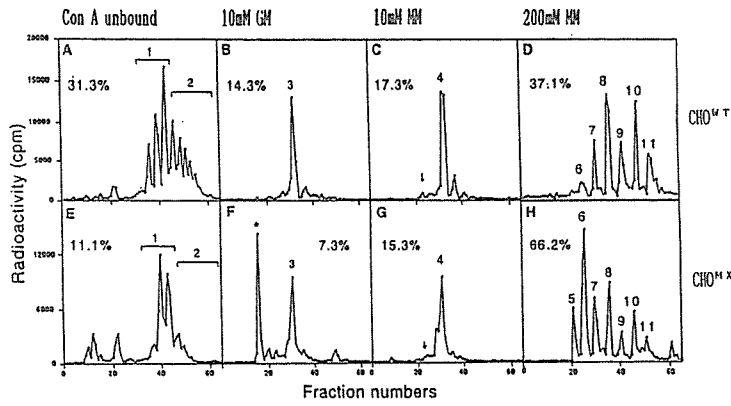


Fig.7. HPLC of N-linked oligosaccharides from CHO^{WT} and CHO^{MX} cells.

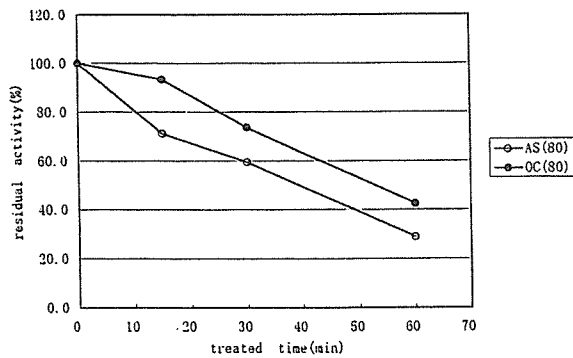


Fig.8. Stability of asialo-OCIF and OCIF.

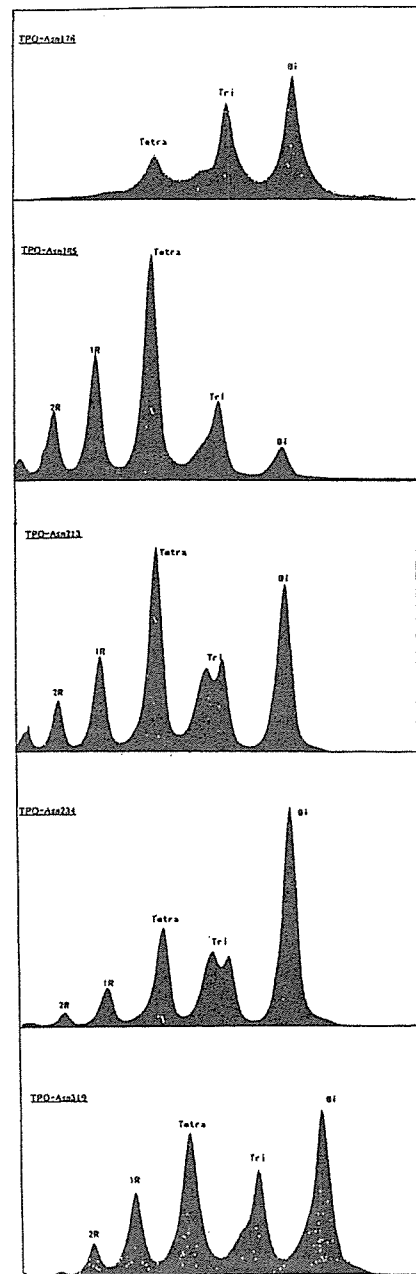


Fig.6. Gel permeation chromatography of the site specific sugar chain structure on TPO.

Table 1 IC₅₀ values of wtPCI and the N-glycosylation site mutants for 10 nM human thrombin and activated protein C in the absence (-) or presence (+) of heparin.

	Attachment sites of N-glycans			Thrombin		APC	
	Asn ²²⁰	Asn ²⁴³	Asn ²¹⁹	(-)	(+)	(-)	(+)
				nM	nM	nM	nM
wtPCI	O	O	O	240	60	1000	74
N230S	X	O	O	116	22	470	37
N243Q	O	X	O	320	70	1200	90
N319Q	O	O	X	188	44	740	54
N230S/N243Q	X	X	O	530	96	1000	110
N230S/N319Q	X	O	X	120	24	340	30

O, N-glycosylation site attached glycan; X, N-glycosylation site eliminated by amino acid replacement using site-directed mutagenesis. The results shown are representative of three independent experiments. APC, activated protein C.

Table 2 Proposed structures for sugar chains of uTM.

Structure	Relative amount ^a			
	mono-sialo	di-sialo	tri-sialo	tetra-sialo
<i>O</i> -linked sugar chain				
(Gal) ^b	(9.2) ^b	(13.7) ^b	(0.0) ^b	(0.0) ^b
Glc	42.8	0.0	0.0	0.0
Galβ1-3GalNAc	2.6	11.4	15.9	0.0
SO ₄ -3GlcAβ1-3Galβ1-3Galβ1-4Xyl	1.9	2.5	0.0	0.0
<i>N</i> -linked sugar chain				
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	11.3	27.7	24.3	0.0
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	2.5	3.7	2.5	0.0
SO ₄ -Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	0.0	3.5	3.9	0.0
Fucα1-2Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-PA	1.9	3.8	0.0	0.0
Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	0.0	2.1	1.4	0.0
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	0.7	2.1	2.3	1.3
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1-3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc	1.0	2.1	1.0	1.0

a: Relative amounts of *O*- and *N*-linked sugar chains are calculated separately. Values are expressed as percentages based on the peak area observed by reversed-phase HPLC. b: Gal was probably by-product from Galβ1-3GalNAc.

Table 4 Possible roles of EPO and tissue-specific regulation of its expression.

Production	Functions	Induction of EPO mRNA by	
		Hypoxia	Estrogen
Kidney	Erythropoietic	yes (Transient)	no
Cerebrum	Neurotrophic	yes (Long term)	no
Cerebellum	?	yes (Long term)	no
Uterus	Angiogenic	yes ¹ (Transient)	yes (Transient)
Oviduct	?	yes (Transient)	yes (Transient)
Testis	?	yes	?

¹ "Transient" in brackets indicates rapid down-regulation of the stimulus-induced increase of EPO mRNA despite presence of stimuli and "Long term" means sustained high levels of EPO mRNA. ² in the presence of estrogen.

Table 3 Specific activity and kinetic parameters chromogenic substrate (S-2251) of oligosaccharide derived from modified t-PA (mft-PA) and recombinant t-PA (t-PA).

誘導体番号	糖鎖の付加	比活性 (U/A ₄₄₀)	Kcat/Km	
			Desafib(+) × 10 ⁻⁴	Desafib(-) × 10 ⁻⁴
⑤	117 (-) 184 (-) 448 (-)	244300	3.23	13.40
③	②+neuraminidase処理	162100	2.15	10.12
⑥	④+neuraminidase処理	155300	2.09	10.03
②	117 (+) 184 (-) 448 (-)	131700	1.88	9.28
①	117 (+) 184 (±) 448 (+)	87300	1.24	7.13
④	117 (+) 184 (±) 448 (+)	85300	1.27	7.16
⑩	117 (-) 184 (-) 448 (-)	714400	16.97	11.20
⑩	117 (-) 184 (-) 448 (+)	692300	15.20	6.96
⑧	117 (+) 184 (-) 448 (-)	592500	16.23	8.29
⑩	⑦+neuraminidase処理	448600	12.43	6.97
⑨	117 (-) 184 (±) 448 (+)	364400	12.57	5.70
⑦	117 (+) 184 (±) 448 (+)	341600	12.37	5.80
⑩	117 (-) 184 (+) 448 (+)	331800	11.60	5.20

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社