

図1. ヒト TNF- α の構造

図中に示されたアミノ酸残基は、point mutation の実験より、TNF- α が三量体化して活性を示す際、あるいはレセプターの結合に必要とされるアミノ酸と考えられている。

MSTESMIRDVELAEEAIPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFG
VIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVVAHVVANPQAEGQLQWLNR
 RANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIV
 SYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR
 PDYLDFAESGQVYFGIHALA**EAAREACCRECCARA**

図2. FAsH 結合性のタグペプチドを融合させたヒト TNF- α の設計

N-末端の下線部分はシグナルペプチドである。したがって N-末端にタグペプチドを付加すると分泌、あるいはその後のシグナルペプチドの切断への影響が考えられた。したがって C-末端に FAsH 結合性タグペプチド (ボールドイタリック) を結合させることとした。

TNF- α : atg agc act gaa agc atg atc cgg gac gtg gag ctg gcc gag gag gcg ctc ccc aag aag
aca ggg ggg ccc cag ggc tcc agg cgg tgc ttg ttc ctc agc ctc ttc tcc ttc ctg atc gtg gca ggc gcc
acc acg ctc ttc tgc ctg ctg cac ttt gga gtg atc ggc ccc cag agg gaa gag ttc ccc agg gac ctc tet
cta atc agc cct ctg gcc cag gca gtc aga tca tct tet cga acc ccg agt gac aag cct gta gcc cat gtt
gta gca aac cct caa gct gag ggg cag ctc cag tgg ctg aac cgc cgg gcc aat gcc ctc ctg gcc aat
ggc gtg gag ctg aga gat aac cag ctg gtg gtg cca tca gag ggc ctg tac ctc atc tac tcc cag gtc
ctc ttc aag ggc caa ggc tgc ccc tcc acc cat gtg ctc ctc acc cac acc atc agc cgc atc gcc gtc tcc
tac cag acc aag gtc aac ctc ctc tct gcc atc aag agc ccc tgc cag agg gag acc cca gag ggg gct
gag gcc aag ccc tgg tat gag ccc atc tat ctg gga ggg gtc ttc cag ctg gag aag ggt gac cga ctc
agc gct gag atc aat cgg ccc gac tat ctc gac ttt gcc gag tct ggg cag gtc tac ttt ggg atc att gcc
ctg tga*ggtacc*

FLAsH: c att gcc ctg gcc gag gcc gcc gcc agg gag gcc tgc tgc agg gag tgc tgc gcc agg gcc
taa agg tac c

図3. TNF- α 遺伝子への FLAsH 結合性タグペプチド DNA の付加

TNF- α の C-末端は特に機能調節に係らないとされているので、TNF- α 配列の 3'末端
近くにある **BsrDI** 部位 (と **KpnI** 部位の間) に FLAsH の配列を挿入することとした。

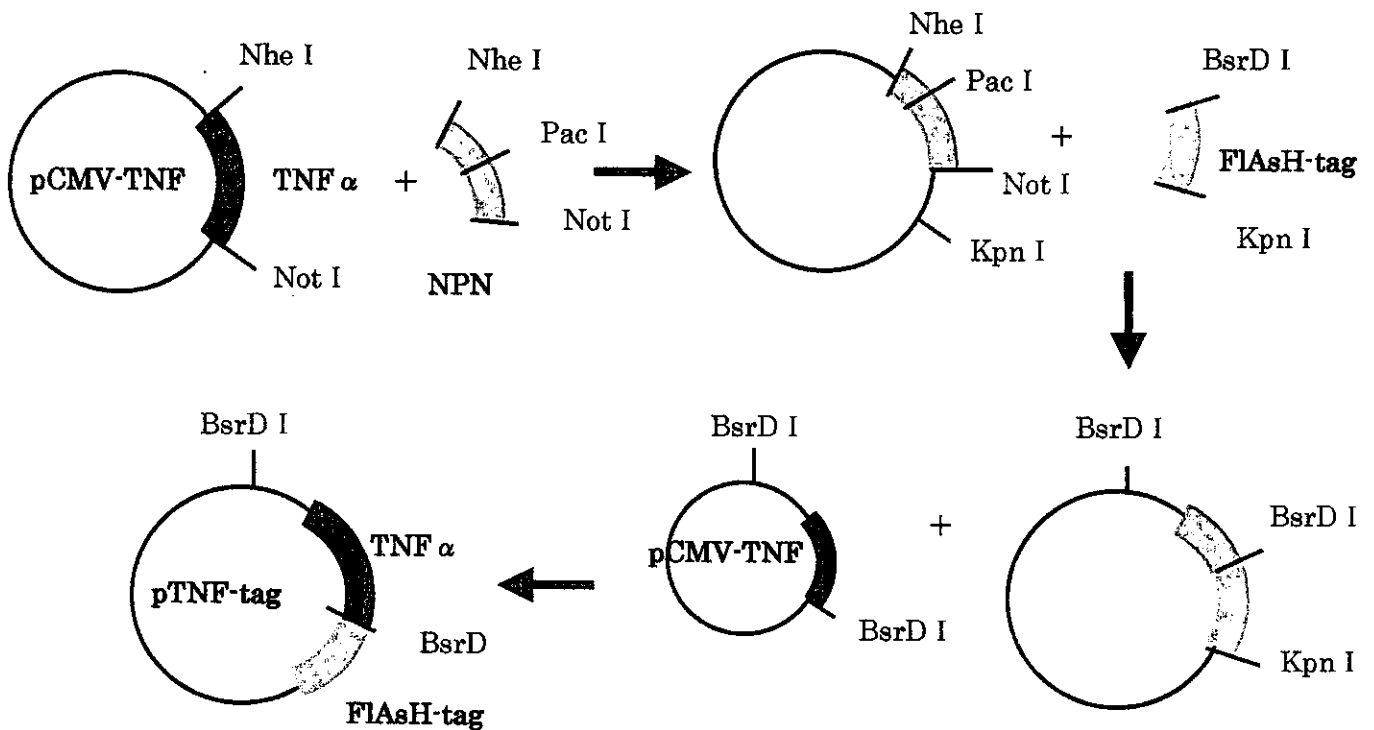


図4. TNF- α -tag 発現用プラスミド pTNF-tag の作成図

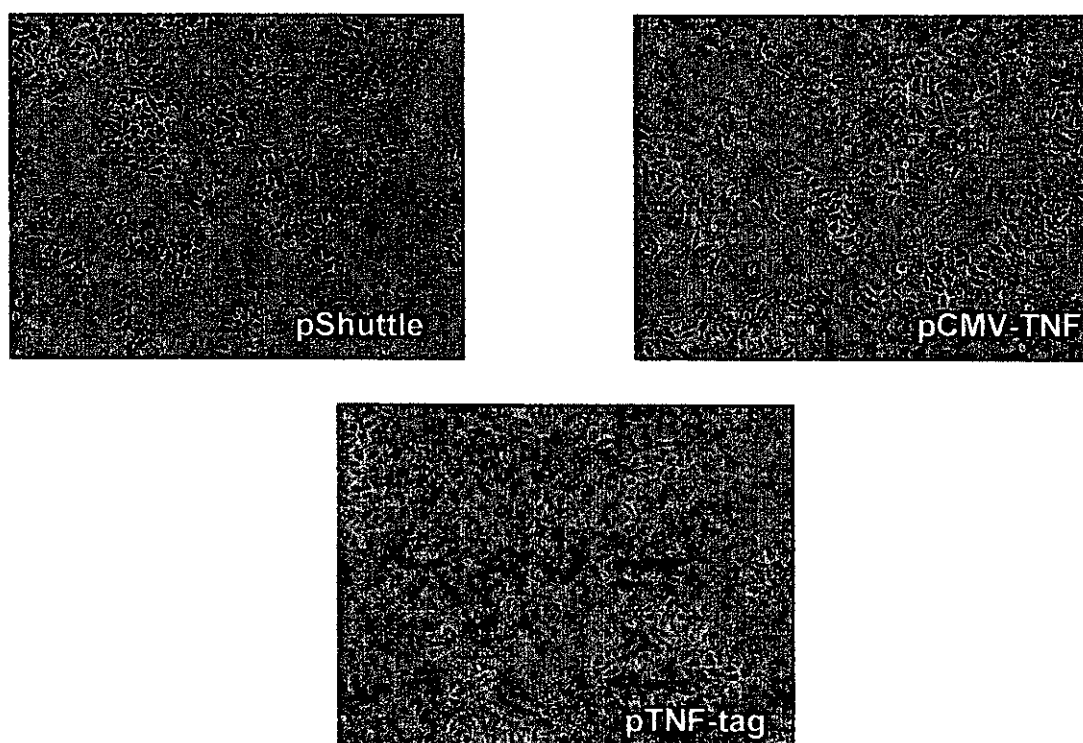


図5. 作製した発現プラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞の位相差顕微鏡像 (トランスフェクト24時間後)
 pTNF-tag を発現させた細胞は死んで浮き上がった細胞が数多く観察された。

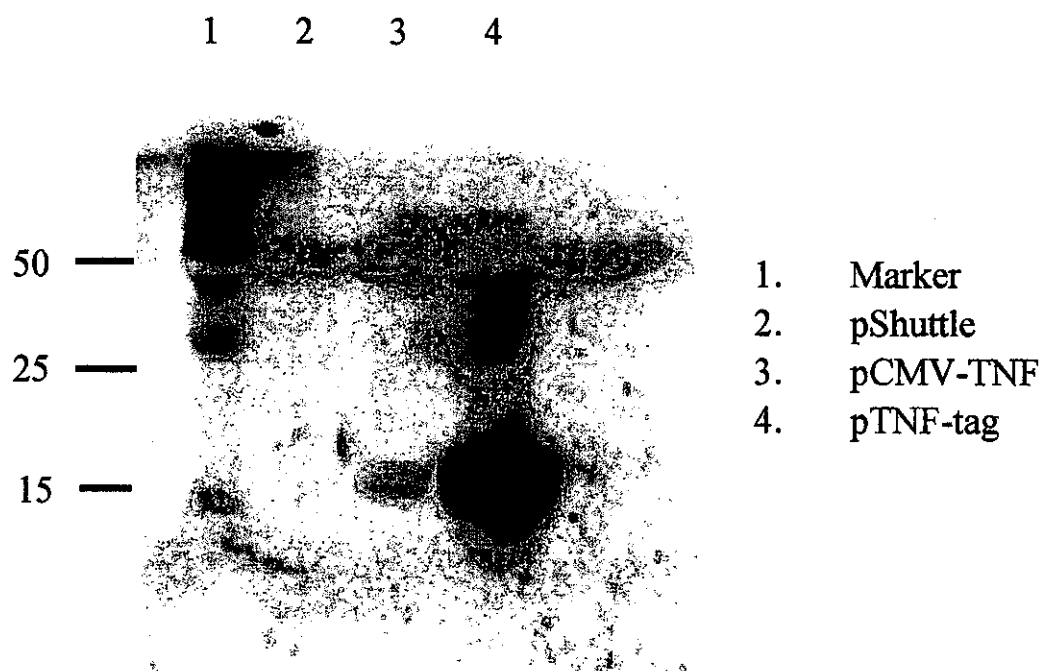


図6. pTNF-tag によって発現したタンパク質の TNF- α 抗体を用いたウェスタンブロットによる確認

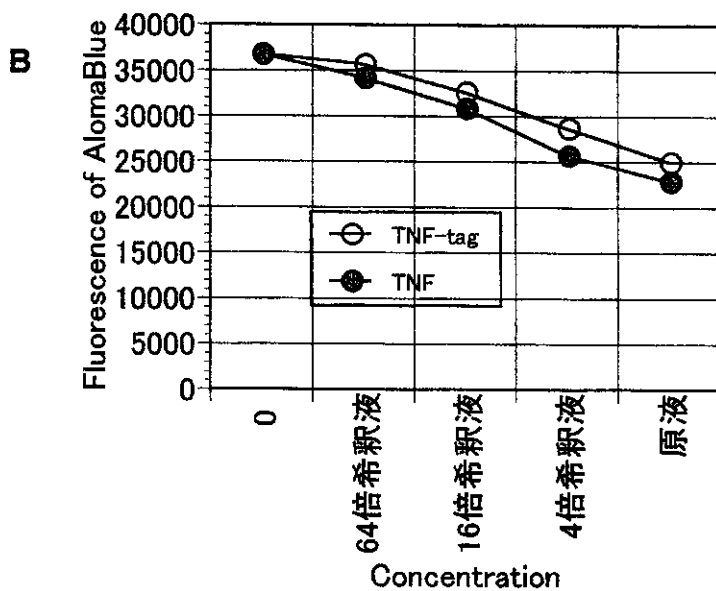
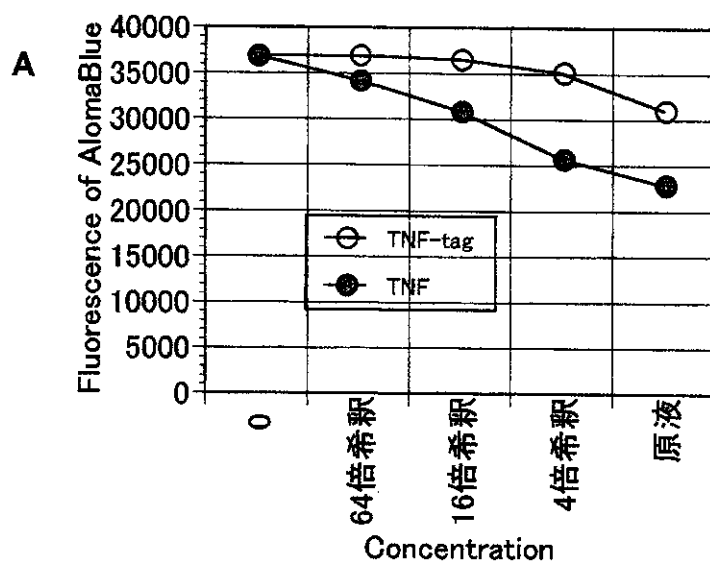


図7. 各プラスミドをトランスフェクトした細胞の培養液上清の L929 マウス細胞に対する細胞壊死作用

A : TNF-tag は pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清。TNF は pCMV-TNF をトランスフェクトした細胞の培養液、B : TNF-tag は pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液上清。TNF は pShuttle をトランスフェクトした細胞の培養液上清に 5ng/ml TNF- α を添加した溶液

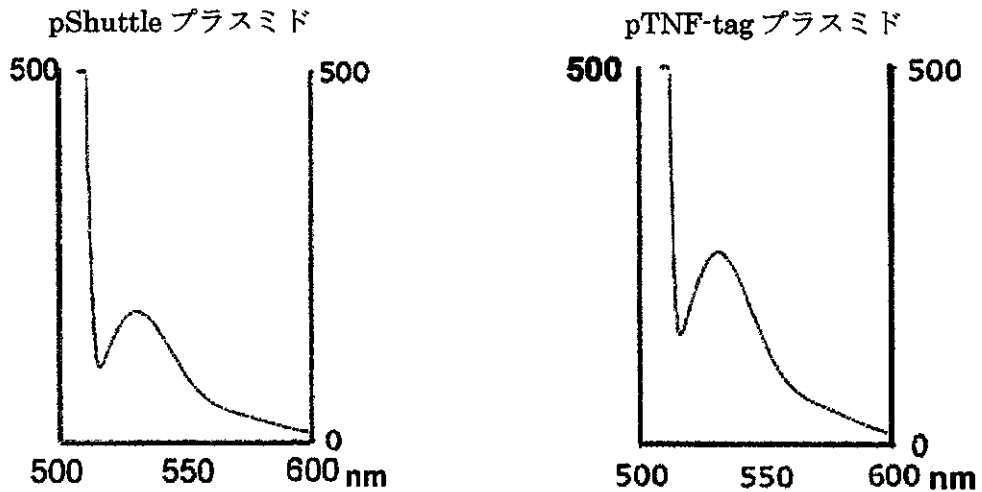


図8. pTNF-tag をトランスフェクトした細胞の培養液の FIAsh による蛍光標識

508nm の励起光で 500-600nm の蛍光スペクトル測定を行った。pTNF-tag プラスミドをトランスフェクトさせた細胞の培養液上清では 538nm 付近にピークを示す蛍光スペクトルが得られたが、pShuttle プラスミドをトランスフェクトさせた細胞の培養液上清においても、同様なスペクトルが得られた。

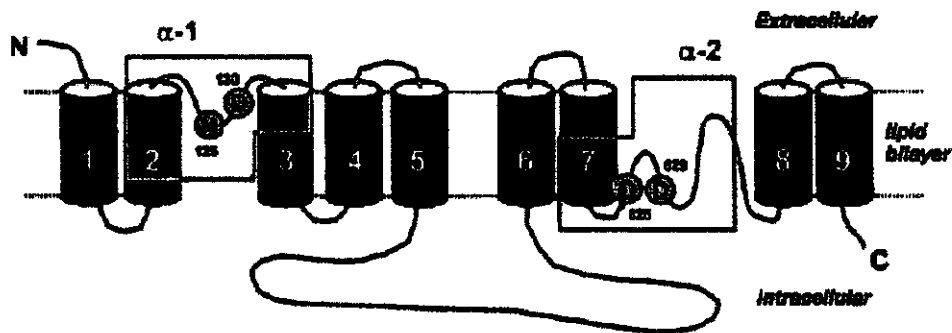


図9. 心筋カルシウムナトリウム交換体 NCX1 の構造

心筋のナトリウムカルシウム交換体は 970 のアミノ酸からなり、形質膜中に存在する 110kDa のタンパク質である。このタンパク質は 9 回貫通型のタンパク質と考えられているが、およそ半分は膜内に存在し、残りの半分 (550 アミノ酸残基) は細胞質に局在する。後者は交換体としての機能とは関係がないとされている。N-末端は細胞外にあり C-末端は細胞質側にある。したがって、NCX への機能への影響が少ないと考えられる C 末端への FIAsh 親和性タグペプチドの導入を試みた。

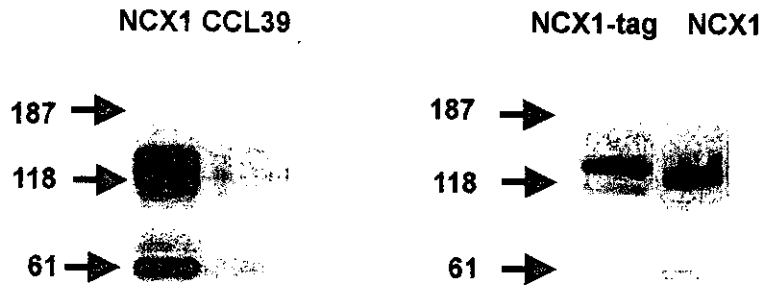


図 1 0 . CCL39 細胞におけるタグ付き NCX1 の発現のウェスタンブロットによる確認

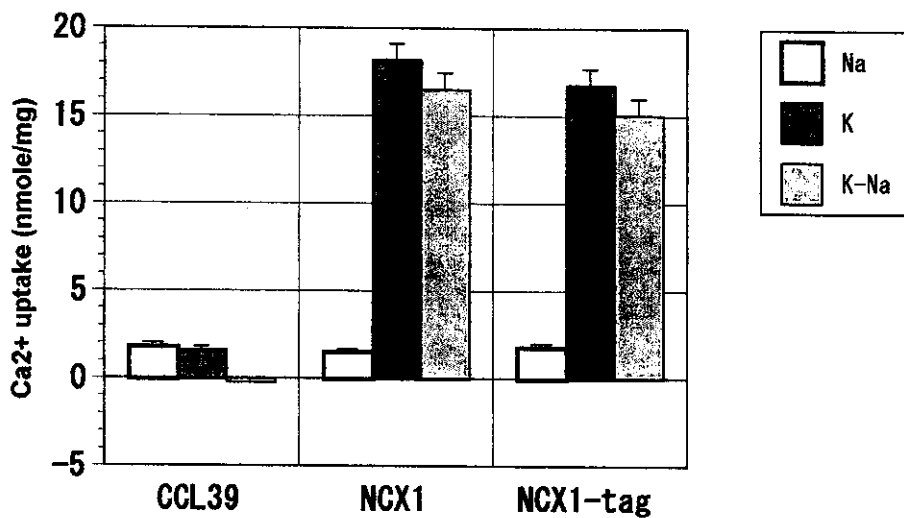
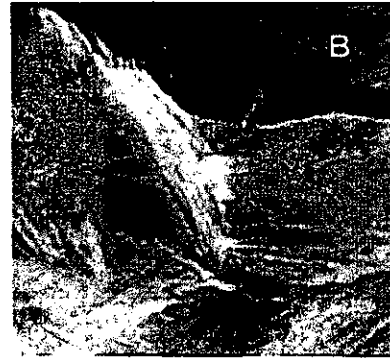


図 1 1 . NCX1 および NCX1-tag を発現させた CCL39 細胞のナトリウムカルシウム交換活性の比較

ナトリウムカルシウム交換活性はカリウム存在下で測定した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みと、ナトリウム存在下で測定した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の取り込みの差で表される。結果は 4 例の計測値の平均値 ± 標準誤差で表している。



NCX1 抗体染色像



FIAsh 染色像

図 1 2. NCX-tag を発現させた CCL39 細胞の NCX1 抗体染色と FIAsh 染色

細胞タンパク質プロファイル評価技術の開発

分担研究者： 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第一室長）

研究要旨 表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイによる細胞培養上清中の目的タンパク質の定量法，及びキャピラリーLC/MSによる目的タンパク質の構造解析法を開発し，両分析法は，細胞治療用医薬品の品質評価法として有用であることを確認した。

協力研究者

日向昌司 （国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部主任研究官）

伊藤さつき（国立医薬品食品衛生研究所
生物薬品部）

A. 研究目的

細胞治療用医薬品の品質・安全性等を確保するためには，細胞治療に用いる細胞の有効成分，及び有害成分を含む発現タンパク質群の恒常性評価技術の開発が不可欠である。本研究は，目的とするタンパク質の発現量，及び特性を迅速かつ正確に評価するための評価技術の開発を目的としている。

目的タンパク質の定量法として，ラジオイムノアッセイ，及びエンザイムイムノアッセイなどが繁用されている。しかし，これらの方法には迅速性や操作性などに問題があることが知られている。これに対して，表面プラズモン共鳴(SPR)イムノアッセイは，特別な前処理を必要とせず，培養上清をそのまま解析に供することが可能な定量法として注目されている定量法である。SPRイムノアッセイでは，抗体を固定化したセンサーチップに目的タンパク質を含む培養上清等を一定量添加し，目的タンパク質がセンサーチップ上に結合することによって生じるSPR屈折角の変化量（レゾナンスユニット）を測定することによって，目的タンパク質を定量することができ

る（図1）。レゾナンスユニットと時間を軸としたセンサーグラムが10分間以内に得られることから迅速性に優れた方法である（図2）。本研究では，組換えフォリスタチン産生細胞をモデル細胞として，SPRイムノアッセイによる培養上清中のフォリスタチン濃度測定を検討した。

目的タンパク質の微量特性解析法として，迅速性，簡便性，感度，及び情報量の多さから，LC/MSが優れていると思われる。我々は，平成12年度において，マイクロボアカラム（内径1mm）を用いたLC/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング，及びプリカーサーイオンスキャン(LC/MS/MS)による糖ペプチド選択的解析法を検討し，モデル糖タンパク質の一次構造，糖鎖結合位置，及び予備的な糖鎖構造の解析に応用できることを示した。本年度は，細胞分泌微量タンパク質の分析に応用することを目的として，キャピラリーカラム（内径0.2mm）を用いたLC/MSの導入による微量化を検討した（図3）。まず，糖鎖部分の恒常性評価を目的として，キャピラリーLC/MSによる糖鎖マッピングの開発を行った。さらに，キャピラリーLC/MS及びLC/MS/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング，及び糖ペプチド選択的解析法の微量化を検討した。モデル糖タンパク質としては，遺伝子組換え型ヒトトロノボモジュリン(rhTM)を用いた（図4）。

B. 研究方法

1. SPR イムノアッセイ

1) 試薬と装置

フォリスタチンは、ヒト組換えフォリスタチン産生 CHO 細胞から精製したものをを用いた。抗ヒトフォリスタチン抗体は、R&D systems より購入した。

HBS-EP buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v), Tween 20), N-hydroxy-succinimide(NHS), N-ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), ethanolamine hydrochloride (pH 8.5), 及び CM5 センサーチップは、BIAcore AB から購入した。

SPR イムノアッセイは、BIAcore2000 (BIAcore AB) を用い、解析はすべて 25°Cで行った。速度論解析は、BIAevaluation Ver.3.1 を用いて行った。センサーグラムを非線形最小二乗法により curve fitting させ、結合速度定数 (k_{ass}) 及び解離速度定数 (k_{diss}) から、KD (k_{diss}/k_{ass}) を算出した。

2) リガンドの固定化

NHS (50 mM) / EDC (200 mM) 溶液 (50/50) で 10 分間活性化させた CM5 センサーチップに 10 mM 酢酸緩衝液 pH5 に溶解した抗ヒトフォリスタチン抗体をインジェクトし、固定化量を 10,000 resonance unit (RU) とした。残存活性基は、ethanolamine (1 M) でブロッキングした。作製したセンサーチップは、フォリスタチンに対する速度論的解析により評価した。

3) 測定条件

ランニング液 : HBS-EP buffer

流速 : 100 μ l/ml

試料量 : 250 μ l

結合量 (RU) : [試料の注入終了 1 分後の RU] - [試料の注入開始 10 秒前の RU]

センサーチップの再生 : 30 μ l の 10 mM HCl-Gly buffer pH 1.5, 1 M NaCl を注入した。

4) 流速の決定

流速 20, 40, 60, 80, 及び 100 μ l/ml において、フォリスタチン溶液 (500 ng/ml) を 2.5 分間注入し、結合量を測定した。

5) 検量線の作成

フォリスタチン溶液の 2 倍希釈系列 (7.8~1,000 ng/ml) をウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地を用いて調製した。3 系列について結合量を測定し、各フォリスタチン濃度における結合量からフォリスタチンを含まない溶液の結合量を差し引いた値によって検量線を作成するとともに、平均値 (Mean), 標準偏差値 (SD), 回収率 (Mean/調製濃度 \times 100), 及び %CV 値 (SD/Mean \times 100) を求めた。

6) 培養上清中の濃度測定

ヒトフォリスタチン遺伝子導入 CHO 細胞株 (CHF2.27 株) を 10 cm 培養ディッシュにコンフルエントまで増殖させた後、6 ml の 2% ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地で 3 日間培養した培養上清を回収した。0.2 μ m フィルターでろ過後、測定に供した。

7) フォリスタチンのバイオアッセイによる定量

フォリスタチンは、アクチビンと複合体 (2:1) を形成することでアクチビンの活性抑制を引き起こすので、アクチビン活性測定系にフォリスタチンを添加し、中和活性をもってフォリスタチン量を求めた。

アクチビン活性は、K562 細胞を用いたレポータージーンアッセイによって測定した。

2. キャピラリー LC/MS

1) 試薬

rhTM は、CHO 細胞で産生させ、精製したものを旭化成工業株式会社より供与された。トリプシンは、シグマ社製を使用した。PNGase F は Roche Diagnostic GmbH 社製を用いた。ギ酸及びヘプタフルオロ酪酸 (Heptafluorobutyric acid, HFBA) は、PIERCE 社製を用いた。PD-10 カラムは、Amersham Pharmacia 社製を使用した。

2) 装置

HPLC : MAGIC 2002 システム (Michrom BioResource 社製)

MS : エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極 MS/MS システム TSQ 7000 (Finnigan 社製)

3) rhTM の糖鎖の調製

脱塩、凍結乾燥した rhTM (100 μ g) を、5unit の PNGaseF を含む 0.1% Triton X-100 及び 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で 37°C で 2 日間消化させた。消化後、タンパク質をエタノール沈殿により除去した。遊離糖鎖を含む上清を乾固させ、水 100 μ l に溶解した後、0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 100 μ l を加え、室温で 2 時間放置した。反応溶液中の過剰の水素化ホウ素ナトリウムを希釈酢酸を用いて分解させ、pH 7.0 に調整した後、ENVI-Carb(Supelco)で脱塩した。

4) rhTM のペプチド、及び糖ペプチドの調製

脱塩、凍結乾燥した rhTM (360 μ g) を 8 M グアニジン塩酸塩、5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl, pH 8.6 を 360 μ l に溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 2.6 μ l を加え、室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 7.56 mg を試料溶解溶液 60 μ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下、室温にて 2 時間放置した。PD-10 カラムを用いて、脱試薬し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

還元カルボキシメチル化した TM (RCM-rhTM, rhTM 換算 120 μ g) を 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 μ l に溶かし、トリプシンを 2.4 μ g 加え、37°C で 1 時間消化した。

5) 糖鎖マッピング

rhTM 0.1 μ g に相当する糖鎖を用いて以下の条件で糖鎖マッピング (GCC-LC/MS) を行った。

HPLC :

カラム : Hypercarb
(Michrom BioResource 社製, 0.2 \times 150

mm)

溶離液 A : 2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B : 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム : B 液 15~45% (0~50 分)

流速 : ポンプ 100 μ l/分, スプリッター 2500/1000

UV 検出波長 : 206 nm

ESI-MS :

測定モード : ポジティブイオンモード

キャピラリー温度 : 175 °C

マルチプライヤー : 1,200 V

ESI 電圧 : 2,000 V

スキャン範囲 : 700-2,400

スキャン回数 : 4 秒

6) ペプチド/糖ペプチドマッピング

RCM-rhTM のトリプシン消化物 0.2 μ g (rhTM 換算量) を用いて以下の条件でペプチドマッピング (LC/MS) を行った。

HPLC :

カラム : MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 0.2 \times 50 mm, 5 μ)

溶離液 A : 0.1% ギ酸及び 0.005% HFBA を含む 2% アセトニトリル水溶液

溶離液 B : 0.1% ギ酸及び 0.005% HFBA を含む 80% アセトニトリル水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5~70% (0~60 分)

70~5% (60~61 分)

5% (61~70 分)

流速 : ポンプ 50 μ l/分, スプリッター 1200/400

UV 検出波長 : 206 nm

ESI-MS :

測定モード : ポジティブイオンモード

キャピラリー温度 : 175 °C

マルチプライヤー：1,200 V

ESI 電圧：1,800 V

スキャン範囲：400-2,400

スキャン回数：4 秒

7) 糖ペプチド選択的解析

RCM-rhTM のトリプシン消化物 0.1 μg (rhTM 換算量) を用いて以下の条件でプリカーサーイオン スキャン (LC/MS/MS) を行った。

HPLC：6)に準ずる

ESI-MS：

測定モード：ポジティブイオンモード

キャピラリー温度：175 °C

マルチプライヤー：1,500 V

ESI 電圧：1,800 V

スキャン範囲：1,000-4,000

スキャン回数：6 秒

Collision energy：-20 eV

Collision Gas：Ar, 2.0 mTorr

倫理面への配慮

本研究では、市販の培養細胞、及び組換えタンパク質を用いること、また、動物を使用しないことから、倫理面への配慮は特に必要としない。

C. 研究結果

1. SPR イムノアッセイを用いた目的タンパク質の定量法の開発

1) フォリスタチンセンサーチップの評価

抗フォリスタチン抗体固定化センサーチップを作製し、フォリスタチンとの結合について速度論的解析を行った結果、解離定数 KD は、 1.72×10^{-9} M と算出された。一般的な抗原抗体間の解離定数は、 10^8 M~ 10^{10} M であることから、抗フォリスタチン抗体がセンサーチップに抗体活性を保持したまま固定化されていることが確認された。また、センサーグラムの curve fitting において、結合様式はマストランスファーに適合したことから、抗フォリスタチン抗体の結合量が充分であることが確認された。

2) 解析条件の検討

検出感度および解析時間を至適化するために、単位時間あたりの結合量と流速の関係について検討した。その結果、流速に比例して結合量の増加が観察され、本研究で用いた装置における結合解析時の最高流速である 100 μl/ml において、最も多くの結合量が観察された。従って、以降の解析は、流速 100 μl/ml で行うこととした (図 5)。また、注入量は、解析用注入法 (KINJECT) の最大試料量である 250 μl とした。この条件の場合、結合時間は 2.5 分間となり、1 試料あたりの解析時間は、センサーチップの再生過程を含め、約 10 分間で済むことになる。これまで報告されている SPR イムノアッセイは、流速 5~20 μl/ml 程度で行なわれているが、高流速による分析は、解析時間あたりの検出感度増加に有効であると思われた。

3) 検量線の作成

2% ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地を用いて調製したフォリスタチンの 2 倍希釈系列溶液 (7.8~1,000 ng/ml) について各結合量を測定し、各フォリスタチン濃度における結合量から 2%ウシ胎児血清含有 Ham's F12 培地の結合量 (43 RU) を差し引いた値についてプロットした結果、各濃度の測定値を基に相関係数 0.997 の検量線が作成された (図 6)。また、定量限界 (CV 値が 20 %以下の最小濃度) は 62.5 ng/ml となり、極めて高い再現性を示すことが確認された。回収率もほぼ 100%であることが明らかになった (表 1)。

4) 培養上清中の濃度測定

SPR イムノアッセイ法を用いて、ヒトフォリスタチン遺伝子を導入した CHO 細胞 (CHF2.27 株) の培養上清中のフォリスタチン濃度の測定を行った。その結果、フォリスタチン量は 748 ng/ml と算出された (表 2)。つぎに、バイオアッセイによって培養上清中のフォリスタチンの含有量を求めた結果、約 600 ng/ml という値が得られ、両分析法はほぼ同じ値を示すことが確認された。以上のことから、SPR イ

ムノアッセイは、細胞治療用細胞が産生する目的タンパク質の定量に有用であることが確認された。

2. キャピラリーLC/MSを用いた目的タンパク質の特性解析法の開発

1) 糖鎖マッピング

我々はこれまで、グラファイトカーボンカラム(内径 2.0mm)を用いた糖鎖マッピング法を開発し、バイオテクノロジー応用医薬品の品質評価に応用できることを示してきた (Kawasaki, N., et al. *Anal. Biochem.* 2000). 本研究では、図4に示すように、内径 0.2 mm のキャピラリーカラムを用いた LC/MS を導入することによって、糖鎖マッピングの微量化を検討した。

モデル糖タンパク質 rhTM から糖鎖を切り出し、糖アルコールに還元した後、キャピラリーLC/MSにより糖鎖マッピングを行った。今回は、感度を高めるため、インターフェースとしてメタルニードルを用いた。その結果、rhTM 100 ng 相当の糖鎖から、図7に示すような糖鎖マップを得ることができた。各ピークの m/z 値を糖鎖の理論値と照合することによって、rhTM に結合している主な糖鎖は図8に示すようなシアル酸結合複合型2本鎖糖鎖で、一部3本鎖糖鎖も含まれていること、また、すべての糖鎖にフコースが結合していることが明らかになった(表3)。

2) ペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド選択的解析

昨年度はマイクロカラム(内径 1.0 mm)を用いた LC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及びプリカーサーイオンスキャン(LC/MS/MS)による糖ペプチド選択的解析法を検討し、目的タンパク質のペプチド鎖、糖鎖結合部位、予備的な糖鎖の構造解析法として有用であることを示した。本年度は、キャピラリーLC/MS、及びLC/MS/MSによるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド特異的解析法の微量化を検討した。モデルとして用いた rhTM の cDNA から予想されるトロンボモジュリンの一次

構造、及びトリプシン消化によって生じるペプチド断片(K1~K23)を図4に示す。

はじめに、トロンボモジュリンのトリプシン消化物 200 ng (トロンボモジュリン換算量) を用いて、キャピラリーLC/MS によるペプチド及び糖ペプチドマッピング検討した。カラムは C18 キャピラリーカラム (内径 0.2 mm), 検出にはエレクトロスプレーイオン化質量分析計を用い、流速約 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ でポジティブイオン測定を行った。図9は得られたペプチド/糖ペプチドマップの UV クロマトグラム(A), 及び TIC クロマトグラム(B)である。マップ上のピークに便宜上 1~14 の番号をつけた。

つぎに、図9のペプチド/糖ペプチドマップの中から糖ペプチドを特定するため、プリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的解析法を検討した。その結果、5つのブロードなピークが検出され(図9C), 図9A及び9Bで検出されたピーク6, 11, 及び12, 並びに新たに検出されたピーク15及び16が糖ペプチドであることが明らかになった。尚、ペプチド/糖ペプチドマッピングにおいてピーク15及び16は、同じ位置に溶出されたペプチドピークの妨害によって検出されなかったが、プリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的検出法によって検出されるようになったものと思われた。

図9上の各ピークのうち、糖鎖の結合していないペプチドに由来すると予想されるピークについて、マスペクトルから得られた分子量の計算値と、cDNA から予想されるペプチドの分子量の理論値を照合した。その結果、表4に示すようにすべてのピークを帰属することができた。また、糖ペプチドと特定されたピーク6, 11, 及び12は、 m/z 値を表3に示した糖鎖の理論値とペプチドの理論値を合計した値と照合させることによって、それぞれ K9, K20, 及び K1 であり、いずれにも、図8に示すシアル酸結合複合型フコシル2または3本鎖糖鎖が主に結合していることが確認された。また、K16にはヘキソース1分子が結合していることが確認された。プリカーサーイオンスキャンで検出されたピーク15及び16は分子量の大きい K21 及び K23 であると思わ

れた。詳細構造は現在解析中である。

D. 考察

1. SPR イムノアッセイを用いた目的タンパク質の定量法の開発

一般に、培養液上清中の目的タンパク質の定量法として、バイオアッセイやイムノアッセイがよく利用されている。バイオアッセイは、動物個体を必要とする場合があること、結果が得られるまでに時間がかかること、また、再現性が悪いことなどの問題点を多く含んでいるが、イムノアッセイには、動物等を必要としないこと、再現性が高く、検出感度が高いことなどの利点が多い。しかし、イムノアッセイには、目的タンパク質の抗体が不可欠で、特に、一般によく知られている ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) は、エピトープを異にする 2 種類のモノクローナル抗体を用いたサンドッチ ELISA、もしくはサンドイッチ ELISA が可能なポリクローナル抗体を準備する必要があるなどの問題点がある。また、毎回、プレートへの抗体あるいは抗原の固定化操作が必要なこと、抗体は使い捨てになるため費用がかさむ、などの問題点も多い。これに対して、SPR イムノアッセイは、ELISA の特異的定量法の利点に加え、簡便かつ迅速なアッセイとして、抗体を適用したが注目されはじめた測定法で、一度センサーチップに固定した抗体は繰り返し使用でき、自動的に解析を行わせることも可能で、極めて高い再現性を有する。しかし、培養上清中のタンパク質を標的とする SPR イムノアッセイの報告は少なく、培養上清を用いた定量の有効性は明確でなかった。そこで、今回は、遺伝子組換えフォリスタチン産生 CHO 細胞をモデル細胞として、培養液上清中のフォリスタチンを定量することによって、SPR イムノアッセイの細胞治療用細胞が発現する目的タンパク質の定量法としての可能性を探った。その結果、SPR イムノアッセイは、組換えフォリスタチン産生細胞の培養上清中フォリスタチンを 10 分間程度で簡単に定量できることが明らかになった。SPR イムノアッセイは、ELISA やバイオアッセイに代わる培養上

清中の目的タンパク質の定量法として有用であることが示された。

2. キャピラリー LC/MS を用いた目的タンパク質の特性解析法の開発

昨年度はマイクロカラム(内径 1 mm)を用いた LC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び LC/MS/MS による糖ペプチド選択的解析法を検討し、目的タンパク質の恒常性評価、糖鎖結合位置、及び予備的な糖鎖構造解析法として有用であることを示した。本年度は、細胞分泌微量タンパク質の分析に応用することを目的として、キャピラリー LC/MS の導入による微量化を検討した。まず、糖鎖部分の恒常性評価に応用することを目的として、キャピラリー LC/MS を用いた糖鎖マッピング法を検討した。その結果、モデルとして用いた rhTM の糖鎖構造を微量で簡単に解析することができた。ペプチド/糖ペプチドマッピングを用いて糖タンパク質を解析する際、糖鎖の不均一性によりペプチド/糖ペプチドマップや糖ペプチドのマスマスペクトルが複雑になり、解析が困難になる場合が多い。従って、糖鎖構造解析法の開発は、糖鎖部分の恒常性を評価するという点からだけでなく、ペプチド/糖ペプチドマッピングの解析を容易にさせるという点からも有用であると思われる。

さらに、キャピラリー LC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び LC/MS/MS による糖ペプチド選択的解析法を検討し、マイクロボアカラムを用いた場合の 10 分の 1 量の rhTM でマイクロ LC/MS で得られたものと同様なペプチド/糖ペプチドマップ、及び糖ペプチドマップが得られることを確認した。今回開発した一連の操作、すなわち、キャピラリー LC/MS による糖鎖マッピング、及びペプチド/糖ペプチドマッピング、並びにプリカーサーイオンスキューンによる糖ペプチド選択的解析法によって、細胞治療用医薬品が分泌する目的タンパク質の特性解析が可能になると期待される。来年度は、実際に、細胞由来タンパク質の構造解析に応用する予定である。

E. 結論

SPR イムノアッセイによる目的タンパク質の定量法, 及びキャピラリーLC/MS による目的タンパク質の構造解析法は, 細胞治療用細胞の品質評価法として有用であることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Usefulness of sugar-mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals* in press.
- 2) Kawasaki, N., Haishima, Y., Ohta, M., Itoh, S., Hyuga, M., Hyuga, S., and Hayakawa, T.: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, 11, 1043-1049 (2001).
- 3) Kawasaki, N., Ohta, M., Itoh, S., and Hayakawa, T.: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, in press
- 4) Kawasaki, N.: Analysis of interactions between carbohydrates and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 13, supplement GT-C04E (2001)
- 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) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: 糖鎖含有タンパク質製剤の品質評価試験法に関する研究(III). 衛研報告, 119, 65-69 (2001)

7) 日向昌司, 川崎ナナ, 日向須美子, 太田美矢子, 伊藤さつき, 早川堯夫: 表面プラズモン共鳴 (SPR) イムノアッセイによるフォリスタチンの迅速定量, 衛研報告, 119, 57-60 (2001)

2. 学会発表

- 1) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦: ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 38 回日本生化学会北海道支部例会 (2001, 7)
- 2) 川崎ナナ, 配島由二, 太田美矢子, 伊藤さつき, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS 及び NMR を用いたエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 3) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS 及び LC/MS/MS を用いた組換え型ヒトフォリスタチンの糖鎖構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 4) 沢井 勇, 斎藤芳郎, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫, 高橋和彦: ヒト selenoprotein P の糖鎖構造解析. 第 74 回日本生化学会大会 (2001, 10)
- 5) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: キャピラリーLC/MS による微量糖タンパク質糖鎖の構造解析. 日本薬学会第 122 年会 (2002, 3)

- 6) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司,
日向須美子, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖ペ
プチドマッピング法による甲状腺刺激ホルモ
ンの部位特異的な糖鎖の不均一性の解析. 日本
薬学会第 122 年会 (2002, 3)

- 7) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 日向昌司,
日向須美子, 早川堯夫: LC/MS を用いたタイ
プの異なる N-結合型糖鎖の一斉分析. 日本薬学
会第 122 年会 (2002, 3)

H. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

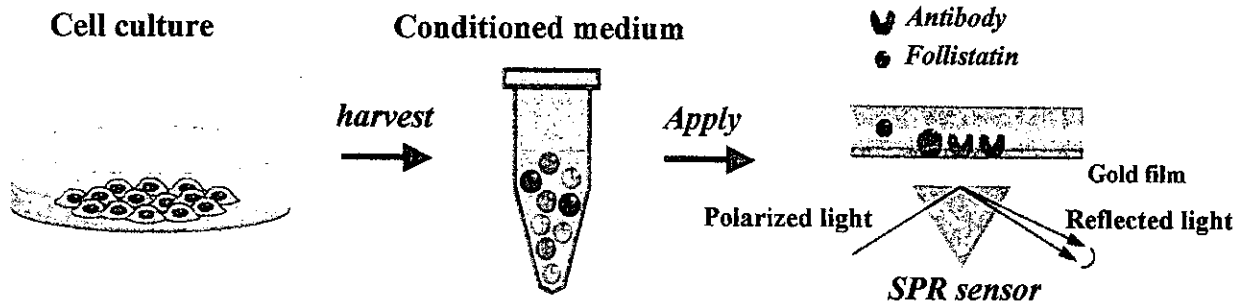


図1 SPRイムノアッセイの概略.
 SPRイムノアッセイに供する試料は、培養上清を前処理や精製をせずに測定することが可能である。本研究では、抗フォリスタチン抗体を固定化したセンサーチップを用いて組換えフォリスタチンの濃度測定法を構築した。

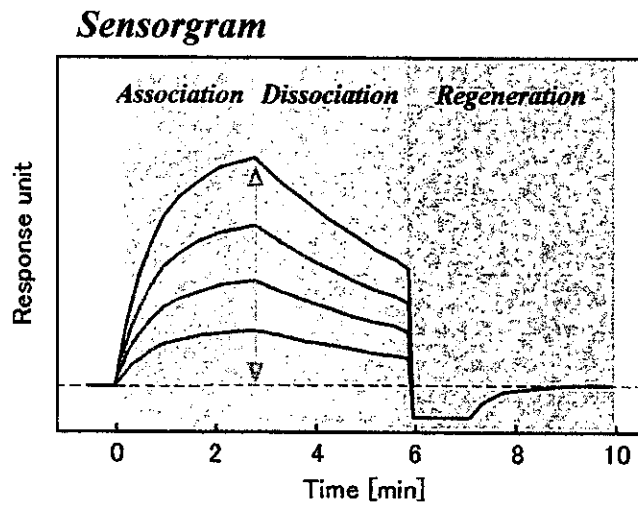


図2 連続希釈した組換えフォリスタチン標品によるセンサーグラム。
 本分析は検体あたり10分間以内に測定することが可能で、結合量(矢印)からフォリスタチンの濃度が求められる。

表1
 フオリスタチン検量線データ
 (2% fetal bovine serum-Ham's F12 medium, n=3)

Follistatin [ng/ml]	Response [RU]	Calculated [ng/ml]	%Recovery	%CV
1,000	191.5 ± 17.6	982.1 ± 95.2	98.2	9.7
500	103.2 ± 6.9	531.8 ± 40.7	106.3	7.7
250	49.6 ± 2.6	258.4 ± 18.7	103.4	7.2
125	22.0 ± 1.1	117.7 ± 11.1	94.2	9.4
62.5	9.4 ± 0.4	53.4 ± 7.5	85.4	14.0
31.3	3.9 ± 0.2	25.4 ± 6.5	81.3	25.6

表2
 バイオアッセイ及びSPR免疫アッセイを用いたフオリスタチン
 産生細胞培養上清中のフオリスタチンの定量.

Measurement	Follistatin [ng/ml]
Bioassay	600
SPR immunoassay	748

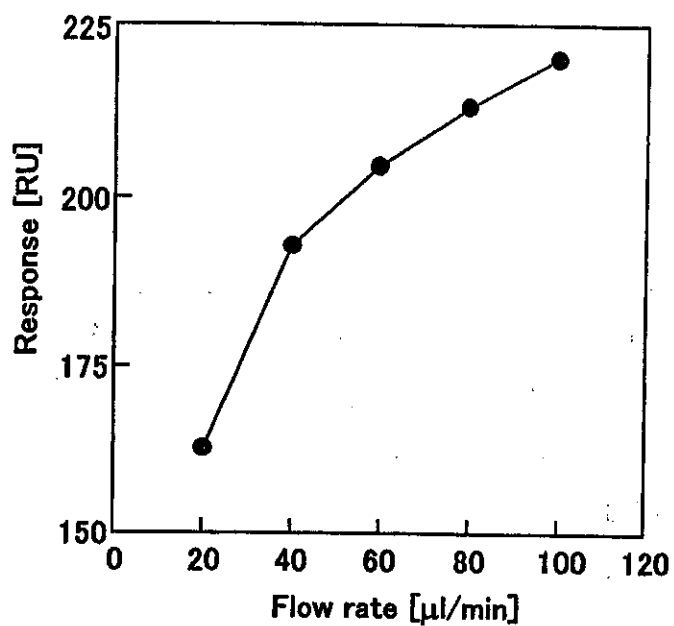


図5 SPRイムノアッセイにおけるアナライトのリガンドへの結合に及ぼす流速の影響

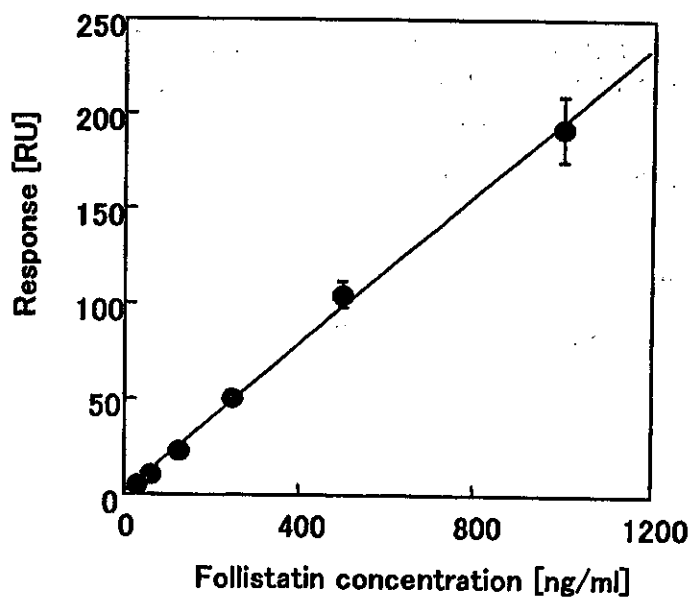


図6 SPRイムノアッセイにおけるフォリスタチン定量の検量線 (mean±SD, n=3, r²=0.998).

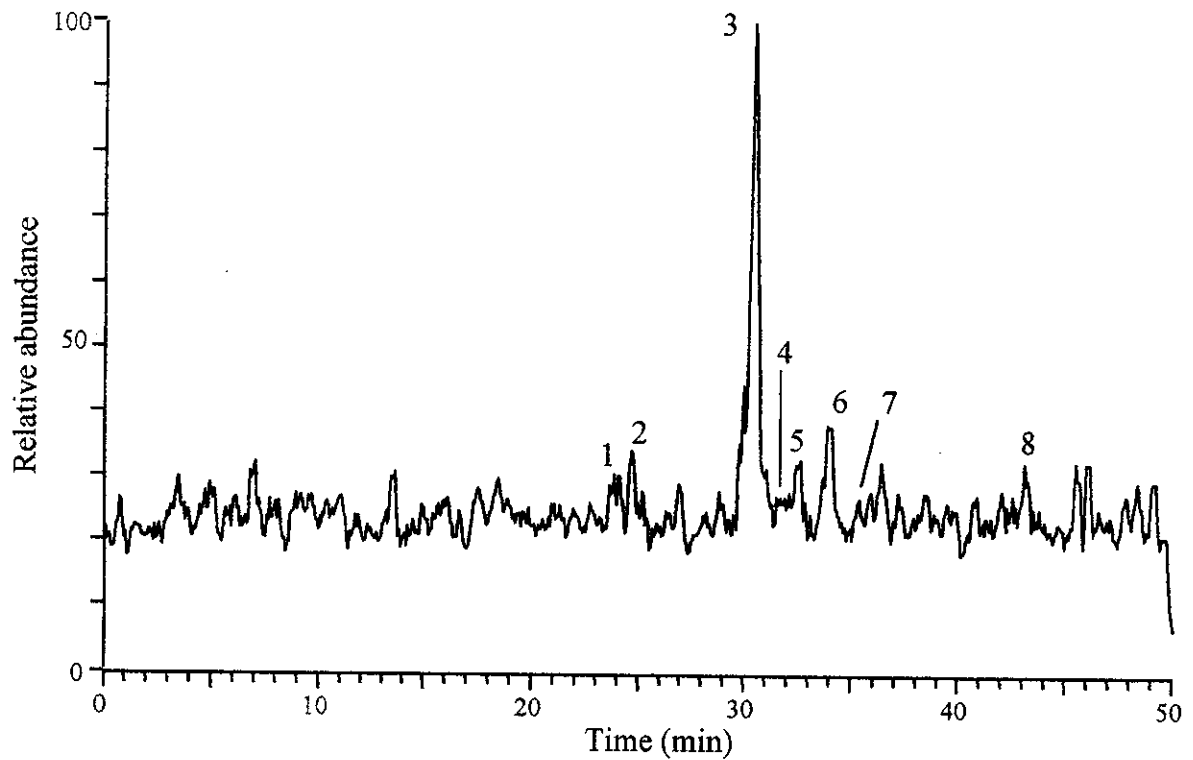


図7 キャピラリーGCC-LC/MSによるrhTMのN結合糖鎖の糖鎖マッピング

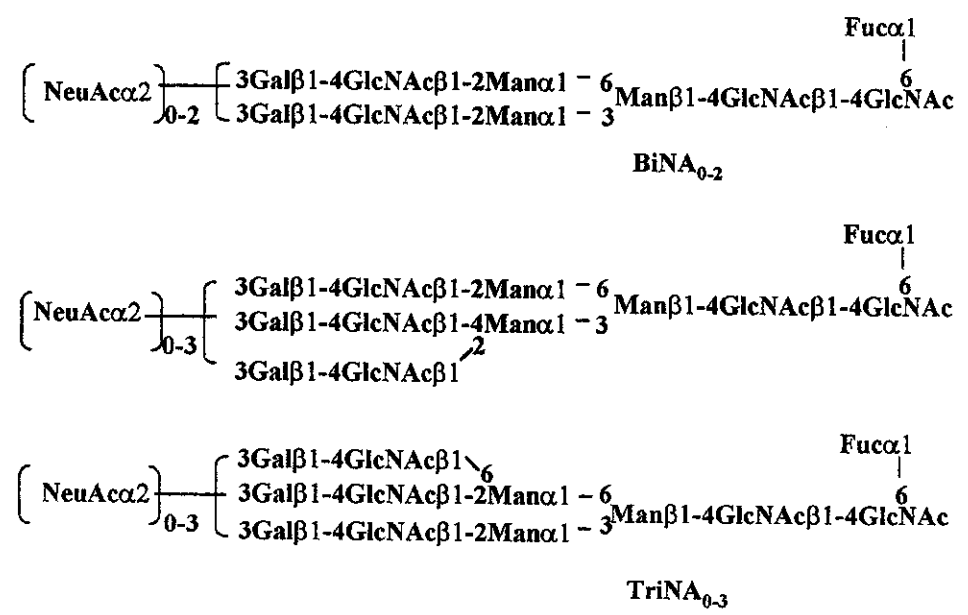


図8 rhTMのN結合糖鎖の構造