

ESI-MS :

装置 : TSQ 7000 (Finnigan 社製)
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

15) 糖ペプチド選択的解析

①ミクロ LC/MS/MS

LC : 14)の①に準ずる.

ESI-MS/MS

測定 : ポジティブモードで
Set mass : 657 (SA-Hex-HexNAc) 又は 366
(Hex-HexNAc)
シーガス : 70 psi
オグジュラリーガス : 10 unit
キャピラリー温度 : 225 °C
ESI 電圧 : 4500 V
マルチプライヤー : 1500 V
スキャン範囲 : 1,000-4,000 (high mass range)
スキャン回数 : 6 秒
衝突ガス : Ar, 2.0 mTorr
衝突エネルギー : -20 V

② CapLC/MS/MS

LC : 14)の②に準ずる

ESI-MS/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

16) 糖鎖プロファイリング

LC :

装置 : MAGIC 2002 システム (Michrom
BioResource 社製)
カラム : Hypercarb (Michrom BioResource 社製,
0.2×150 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 8.5)
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 8.5)
グラジエントプログラム : B 液 7~70% (0~60
分)
流速 : ポンプ 100 µl/分, スプリッター 2500/1000
UV 検出波長 : 206 nm

ESI-MS/MS :

装置 : TSQ 7000 (Finnigan 社製)
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

17) LC/MS/MS による可溶性膜タンパク質の同定

可溶性膜タンパク質画分 (ウシ脳アセトンパウダー
600 mg 相当量) を SDS-PAGE により分離し,
分離されたタンパク質から, ゲル内消化によりペプ
チドを調製し, LC/MS/MS によるシーケンシング
及びデータベース検索を行い, タンパク質の同定を
行った.

LC :

装置 : Ultra-Plus MicroLC System (MicroTech
社製)
カラム : Magic C₁₈ (0.2×50 mm)
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： 5~95% (0~30分)
95% (30~35分)
流速：3 µl/分

ESI-Q/TOFMS：

装置：API QSTAR Pulsar I (Applied Biosystems 社製)
データベース：Mascot (Matrix Science)

18) 可溶性膜タンパク質画分の糖鎖プロファイリング

可溶性膜タンパク質画分 (ウシ脳アセトンパウダー 600 mg 相当量) を電気泳動法により分離し、分離されたタンパク質から、ゲル内消化により、糖鎖を調製し、t-PA と同様に糖鎖プロファイリングを行った。

19) SPR イムノアッセイ装置

SPR イムノアッセイは、BIAcore2000 (BIAcore AB 社製) を用い、測定はすべて 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。

20) 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。

21) 測定条件

ランニング液：HBS-EP buffer

流速：100 µl/ml

試料量：250 µl

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 µl の 10 mM HCl-Gly buffer pH 1.5, 1 M NaCl を注入した。

22) 流速の決定

流速 20, 40, 60, 80, 及び 100 µl/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。

23) 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 ($\text{Mean}/\text{調製濃度} \times 100$)、及び %CV 値 ($\text{SD}/\text{Mean} \times 100$) を求めた。

24) 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 µm フィルターでろ過後、測定に供した。

25) フオ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、アクチピンと複合体 (2:1) を形成することでアクチピンの活性抑制を引き起こすので、アクチピ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。

アクチピン活性は、K562 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイによって測定した。

倫理面への配慮

本研究では、市販の試薬、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. 結果

1. ミクロ LC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

1) ミクロ LC/MS によるトロンボモジュリンのペプチド/糖ペプチドマッピング

cDNA から予想されるトロンボモジュリンの一次構造を図 3 に示す。アミノ酸配列から, Asn29, 97, 98, 364, 391 に N 結合糖鎖が付加している可能性が考えられる。また, トロンボモジュリンの C 末端側には複数の O 結合糖鎖が結合していることが知られている。一つのペプチドに糖鎖結合部位が複数含まれないように, 消化酵素としてトリプシンを選択した。トリプシン消化によって得られることが予想される K1~K23 のペプチド断片は, 図 3 の通りである。

まず, トロンボモジュリンには多数の S-S 結合が存在し, プロテアーゼの作用を受けにくいことから, S-S 結合を還元カルボキシメチル化により切断・保護した。つぎに, トリプシン消化を行ったが, この際, 長時間反応させると, 予想しない分解が進み, クロマトグラムが複雑になり, ピークの帰属が困難となることがわかった。そこで, 反応時間を 1 時間と設定した。

つぎに, 得られたトロンボモジュリンのトリプシン消化物 2 μ g (トロンボモジュリン換算量) を用いてペプチド及び糖ペプチドマッピングを行った。カラムは C18 ミクロカラム, 流速は 50 μ l/min, 検出には ESI-MS を用い, ポジティブイオン測定を行った。図 4A は Total ion current (TIC) クロマトグラムである。得られたピークに便宜上 1~18 の番号をつけ, 各ピークの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, ピーク 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 14, 16, 17, 及び 18 のペプチドをそれぞれペプチド K17, K10, K2, K8, K15, K14, K18, K13,

K12, K11 及び K3 と特定することができた(表 1)。ピーク 12 は分子量の計算値が 3917.0Da であり, K19 より 16Da 大きいことから, K19 の一部アミノ酸が水酸化されていることが示唆された。この結果は, トロンボモジュリンの Asn324 がヒドロキシアスパラギンに置換されているという報告に一致するものである。

2) LC/MS/MS による糖ペプチド選択的マッピング

マスペクトルより得られた分子量から, ピーク 5, 7, 10, 13, 15 及び 20 のペプチドを特定することができなかった。この理由として, ペプチドが翻訳後修飾をうけていることが考えられた。最も可能性が高いのは糖鎖の付加である。糖鎖が結合すると, 糖鎖の構造が未知であることに加え, 付加している糖鎖の不均一性によりマスペクトルが複雑になり, アサインが困難になることが予想される。そこで, たくさんのピークの中から, 糖ペプチドだけを判別することを目的として, LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャンという手法を検討した。プリカーサーイオンスキャンとは, ある特定のフラグメントを持つ親イオンだけを検出するというもので, 今回は N 結合糖鎖の断片である NeuAc-Gal-GlcNAc (m/z 657) と Gal-GlcNAc (m/z 366) を有するペプチドの検出を試みた。その結果, 図 4B 及び 4C に示すように, どちらで設定しても, 4 本のピーク, ピーク 7, 11, 13, 及び 15, が検出され, これらのピークが N 結合糖鎖を持つ糖ペプチドであることがわかった。

図 5 は, ピーク 7, 11, 13, 及び 15 のマスペクトルである。糖鎖の不均一性のために, 複雑なマスペクトルを示しているが, N 結合糖鎖付加配列を有する 4 つのペプチドに一般的な糖鎖の分子量を加算して得られた理論値を各イオンの m/z 値と照合した結果, それぞれ, K9, K20, K1, 及び K21 のペプチドであることが判明した。また, 結合している糖鎖はいずれも表 2 に示すようなフコシル複合型 2 本鎖糖鎖であること, さらに, シアル酸結合数に不均一性があることが明らかになった (表 1)。

3) トロンボモジュリンのO結合糖鎖結合ペプチドの特定

プリカーサーイオンスキャンで検出されないピーク5及び10はN結合糖鎖以外の修飾を受けていることが考えられた。まず、ピーク10は、分子量が4516.5Daと計算され、ペプチドK16(Ser261-Arg297)よりも162Da大きいことから、K16にヘキソースが1個結合したものであることが推定された。そこで、ペプチドの確認及び糖鎖付加位置を決定することを目的として、ピーク10を分取後、さらにキモトリプシンで消化し、再度LC/MSを行い、消化物の分析を行った。その結果、得られた消化物のうち、Cys278-Tyr288のペプチド(分子量1234.3Da)にヘキソース(180.2Da)が結合した分子量(1396.3Da)に一致するピーク(分子量1396.0Da)が得られたことから、ヘキソースの結合位置は、Ser287であることが判明した。

ピーク5は分子量が7785Da前後と計算されること、また、分子量が大きい割には保持時間が短く親水性の高いペプチドであることが推測されることから、まだ特定できていないペプチドK23に複数のO結合糖鎖が結合しているものであることが推定された。O結合糖鎖の構造は糖鎖を切り出し、糖鎖プロファイリングを行うことによって決定できると思われる。

4) フォリスタチンのペプチド/糖ペプチドマッピング

フォリスタチンにはフォリスタチン-315とフォリスタチン-288のアイソフォームが存在する。今回はフォリスタチン-288をモデルタンパク質として用いた。フォリスタチン-288のcDNAから予想される一次構造を図6に示す。Asn95及びAsn259にN結合糖鎖が付加する配列が存在する。

まず、フォリスタチン分子内にもS-S結合が多数存在することが予想されることから、還元カルボキシメチル化した後、プロテアーゼ消化を行った。この際、エンドプロテイナーゼLys-Cは基質特異性に問題があり、予想外の分解が進むためクロマトグラ

ムが複雑になり、アサインが難しくなることがわかった。それに対して、エンドプロテイナーゼAsp-Nは基質特異性が高く、得られるピークの数も少ないので、フォリスタチンのペプチドマッピングに適していることがわかった。エンドプロテイナーゼAsp-Nによって得られると予想されるK1~K15のペプチドは図6に示す通りである。

フォリスタチンのエンドプロテイナーゼAsp-N消化物3µg(フォリスタチン換算量)を用いてペプチド及び糖ペプチドマッピングを行った結果、図7AのTICクロマトグラムが得られた。各ピークのマススペクトルから、表3に示すようにピーク1,2,4,5,6,7,8,11,及び13のペプチドをK4,K14,K11,K6,K8とK10,K1,K7,K9,及びK3と特定することができた。また、ピーク10は、マススペクトルから分子量1608Daと計算され、ペプチドK5の分子量の理論値と一致することから、N結合糖鎖の付加していないK5であることが明らかになった。さらに、ピーク3及び12は、C末端側のペプチドK15(Asp258-Asn288)がGlu280のN末端側で切断された結果生じたAsp258-Leu279(K15①)及びGlu280-Asn288(K15②)であることが判明した。従って、糖鎖が付加していないAsn259が存在することが明らかになった。

5) フォリスタチンの糖ペプチド選択的マッピング

K1~K15すべてのペプチド断片のピークを特定することができたが、Asn95とAsn259に部分的に糖鎖が付加していることも考えられるので、LC/MS/MSのプリカーサーイオンスキャンによって糖ペプチドの有無を確認した。その結果、図7Bに示すように2本のピーク、ピーク7及び9が検出された。これらのピークのマススペクトルを図8に示す。ピーク7の分子量はK5にフコシル複合型2本鎖糖鎖が結合したもので、また、ピーク9の分子量はK15①にフコシル複合型2本鎖糖鎖が付加したものに一致した(表3)。以上のことから、フォリスタチンにはN結合糖鎖結合部位が2カ所(Asn95,259)存在し、どちらにも部分的にフコシル複合型

2本鎖糖鎖が結合し、シアル酸結合数に不均一性があることが明らかになった。また、O結合糖鎖やその他の翻訳後修飾は検出されなかった。我々は、先に、高性能イオン交換クロマトグラフィーパルスドアンペロメトリー検出法(HPAEC-PAD)を用いてフォリスタチンの単糖組成分析を行っているが、本結果はその結果とよく一致するものであった。

2. CapLC/MSを用いた目的タンパク質のペプチド/糖ペプチドマッピング法、及び糖鎖プロファイリング法の開発

1) CapLC/MSを用いたトロンボモジュリンの糖鎖プロファイリング

目的タンパク質の特性解析法の微量化を進めるため、図9に示すような内径0.2 mmのキャピラリーグラフアイトカーボンカラムを用いたLC/MS(CapGCC-LC/MS)の導入を検討した。

糖鎖の割合が高い糖タンパク質をMSで解析する場合、糖鎖構造に関する情報なしに、ペプチド/糖ペプチドマップ上のピークをアサインすることは難しい。そこで、糖鎖プロファイリング法の検討を行った。モデル糖タンパク質トロンボモジュリンから糖鎖を切り出し、アノマーの分離を避けるためNaBH₄を用いて還元し、キャピラリーLC/MSによる糖鎖プロファイリングを行った。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、トロンボモジュリン100 ng相当の糖鎖から、図10に示すような糖鎖プロファイル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、トロンボモジュリンに結合している主な糖鎖は、表2においてFBiNA_{0,2}、FTriNA_{0,3}として示されているようなフコースが結合したシアル酸結合複合型2本鎖糖鎖、及び3本鎖糖鎖であることが明らかになった(表4)。

2) CapLC/MS/MSを用いたトロンボモジュリンのペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖ペプチド選択的解析

つぎに、トロンボモジュリンを用いて、CapLC/MS、及びCapLC/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。

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、CapLC/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ESI-MSを用い、流速約2 μ l/minでポジティブイオン測定を行った。図11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11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11C)、図11A及び11B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る。

図11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5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4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、表2に示すシアル酸結合フコシル複合型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キャンで検出されたピーク15及

び 16 は分子量の大きい K23 及び K21 であると思われた。

3. 電気泳動法を用いた発現タンパク質のプロファイリングと, CapLC/MS を用いたゲル内目的タンパク質の特性解析

1) ゲル内 t-PA の糖鎖プロファイリング

CapLC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング, 及び糖鎖プロファイリングを SDS-PAGE で泳動したモデルタンパク質 t-PA (図 12) に応用した。t-PA を電気泳動した結果, 図 13 のような泳動パターンが得られた。65kDa 付近に検出されたバンドを切り取り, ゲル内アルキル化を行った後, まず, ゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を遊離させ, 糖鎖プロファイリングを行った。図 14 は得られた糖鎖プロファイルである。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, ピーク 1~3 はそれぞれ高マンノース型糖鎖の M5, M6, 及び M7 であることが確認された(表 6, 構造は表 2 参照)。また, ピーク 3~8 (ピーク 3 は共通ピーク) はフコースが結合した複合型シアロ 2 本鎖糖鎖 (FBiNA₀₋₂) であることがわかった。結合量は少ないが, 複合型 3 本鎖糖鎖 (ピーク 3, 7) も検出された(表 6)。

先に我々は, ミクログラフィートカーボンカラムを用いた LC/MS によって t-PA 結合糖鎖のプロファイリングを行い, 報告しているが (Itoh, S., et al., *J. Chromogr. A*, 2002), 今回得られた糖鎖プロファイルは, その際に報告したプロファイルとよく一致していることが確認された。以上のことから, ゲル電気泳動法と CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによって, タンパク質混合物中のある特定のタンパク質の糖鎖構造が解析できることが実証された。

2) ゲル t-PA のペプチド/糖ペプチドマッピング

ゲル内アルキル化された t-PA をゲル内トリプシン消化してペプチド及び糖ペプチドを得(ペプチドの開裂は図 12 参照), C18 カラムを用いた

CapLC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピングを行った(図 15)。ペプチドについては, 親水性が高くアミノ酸残基数の少ない 2 ペプチド (Cys83-Arg89, Ser379-Arg383) を除くすべてのペプチドを検出することができた(表 7)。また, t-PA の Thr61 には, フコースが結合していることが知られているが, フコースが結合したペプチド (Cys56-Lys82) の質量と一致するペプチドが検出された(ピーク 18)。

t-PA には, N-結合型糖鎖の結合可能配列が 4ヶ所存在し, そのうち 3箇所 (Asn117, Asn184, Asn448) に糖鎖が結合した type I と, 2箇所 (Asn117, Asn448) に結合した type II が存在することが知られている。今回, 糖鎖プロファイリングで確認された糖鎖の分子量とペプチドの理論値を基に各ピークをアサインし, ピーク 12 が Asn117 に高マンノース型糖鎖 (M5, M6, M7) が結合した糖ペプチド (Gly102-Arg129) であると同定することができた。この結果, 糖鎖プロファイリングで検出された高マンノース型糖鎖は, Asn117 に結合していることが明らかとなった。Asn184 及び Asn448 に糖鎖が結合した糖ペプチドを確認することはできなかったが, これは糖ペプチドの分子量が大きくてイオン化され難かったこと, あるいは, 糖鎖の不均一性が高く, 一つのピークとして検出され難かったことが原因であると考えられる。このような糖ペプチドの検出には, 前述したプリカーサーイオンスキャンが効果的であると思われるので, 今後検討したいと考えている。尚, type I の Asn184 に糖鎖の結合していないペプチド (Tyr163-Arg189) は, 検出することができた(ピーク 13)。

以上のように, SDS-PAGE と CapLC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピングは, ゲル内タンパク質の一次構造確認, 糖鎖結合部位と糖鎖の不均一性解析, 及び糖鎖以外の翻訳後修飾の解析についても有用であることが示された。

3) 細胞・組織への応用

電気泳動法を用いた細胞・組織が発現するタンパ

ク質のプロファイリングと目的タンパク質の単離、及び CapLC/MS を用いた目的タンパク質の構造解析法の可能性を、ウシ脳を細胞・組織のモデルとして用いて評価した。今回は、膜タンパク質の可溶性画分のプロファイリングと特定タンパク質の構造解析に絞って行った。

細胞・組織中にはハウスキーピングタンパク質が多く存在し、抽出物をそのまま 2D-GE にアプライした場合、それらの妨害により、目的タンパク質及び関連タンパク質のプロファイルを作成できないケースが想定される。また、2D-GE にアプライできるサンプル量も限られていることから、分析前のある程度評価対象タンパク質を絞って、粗精製を行っておく必要があると考える。今回、ウシ脳膜画分を SDS-PAGE で分離するにあたって、脂質を除去した後、界面活性剤で膜を可溶化し、タンパク質画分を回収する簡単な操作を検討した(図 16)。すなわち、ウシ脳アセトンパウダーを脱脂後、非イオン性界面活性剤 Triton X-114 を用いて膜画分の可溶化を行い、さらに Triton X-114 の温度依存性相分離を行うことによって、膜画分 (Triton X-114 可溶性画分) が得られた。この膜画分を PIPLC 消化し、膜タンパク質可溶性部分を遊離させた。

可溶性膜タンパク質画分を SDS-PAGE で分離したところ、数本のバンドが検出された(図 17)。これらのバンドは粗精製を行わずに SDS-PAGE を行った場合は検出されなかったバンドである。分離されたタンパク質を含むゲル片を切り出し、ゲル内アルキル化を行った。さらにゲル内 PNGase F 消化により結合糖鎖を遊離させた後、ゲル内トリプシン消化を行い、ペプチドを調製した。

得られたペプチド混合物について CapLC/MS/MS を用いたアミノ酸配列解析を行った後、データベース検索によるタンパク質同定を行った。その結果、120K に検出されたバンドは NCAM、50K 付近に検出された複数のバンドは LAMP、OBCAM、及び Kilon、また、低分子タンパク質はプリオン、及び Thy-1 と同定された(図 17)。これらは神経組織に発現している膜タンパク質で、神経

網形成等に重要な役割を担っていると考えられているタンパク質群である。なかでも、LAMP、OBCAM、Kilon は、Ig ドメインを 3 個持つ GPI アンカー型タンパク質 IgLON スーパーファミリーと呼ばれるタンパク質で、一次構造の相同性が高いことから、個々に単離するのは難しく、詳細構造は明らかにされていない分子である。今回、粗精製後、SDS-PAGE を行うことによって、神経網形成等に関連する一連のタンパク質のプロファイリングを行い、さらに各タンパク質を回収し、同定することができた。

つぎに、CapLC/MS を用いて、同定されたタンパク質について、特に分子量の約 40% を占める糖鎖の構造解析を行った。ゲル内 PNGase F 消化により遊離された糖鎖を用いて、CapGCC-LC/MS による糖鎖プロファイリングを行った。代表例として、図 18 に、Kilon の糖鎖プロファイルを示す。各ピークの m/z 値をもとに糖鎖構造を解析した結果、主要なピークであるピーク 2 は、主に脳特異的に発現していることが報告されている BA-2 糖鎖であることが示唆された。また、ピーク 7 は高マンノース型糖鎖 (M5) であると推定された(表 8)。その他、高マンノース型糖鎖 (M6, M7、及び M9)、ハイブリッド型、及び複合型糖鎖も検出された。検出された糖鎖の中には、フコースを 2 分子以上含むと推定されるものもあり、非還元末端側にフコース残基を持つことが示唆された。脳には Le^x 構造を有する糖鎖が多く存在することが報告されており、今回の結果はそれらの報告によく一致している。また、硫酸基が結合していると推定される糖鎖も検出された。

以上のように、粗精製後 SDS-PAGE を行うことによって、その細胞・組織に特有のタンパク質群のプロファイリングが可能であること、また、分離ゲルから抽出したペプチド断片、及び糖鎖を CapLC/MS で分析することによって、タンパク質同定、及び詳細構造解析が可能であることが確認された。尚、今回解析した Kilon の糖鎖構造に関する報告はなく、本研究によって初めて明らかにされた。以上のように、我々の方法は、細胞・組織が発現するタンパク質混合物のプロファイリングとその中の

特定のタンパク質の構造解析に応用可能であり、構造未知のタンパク質にも対応できることが実証された。現在、ペプチド/糖ペプチドマッピングによる糖鎖以外の翻訳後修飾の解析を行っている。

4. SPR イムノアッセイを用いた目的タンパク質の定量

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製作し、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 μ l/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 μ l/ml で行うこととした (図 19)。また、注入量は、解析用注入法 (KINJECT) の最大試料量である 250 μ l 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 μ l/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 0.998 の検量線が作成された (図 20)。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 9)。

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 10)。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。

D. 考察

目的タンパク質を発現する治療用細胞を得るために、1)目的タンパク質を発現するように誘導したヒト由来細胞 (胚性幹細胞等)、2)目的タンパク質の構造遺伝子を導入した細胞、及び3)トランスジェニック動物など異種細胞、を用いる方法が検討されている。これらの細胞を細胞治療薬として用いる場合、発現タンパク質群の恒常性評価、及び目的タンパク質、及び関連タンパク質の発現量、一次構造、グリコシル化やプロセッシングなどの翻訳後修飾、S-S 結合、高次構造及び機能が期待するものと同じであるかどうか、特に3)については、糖鎖抗原などの抗原性を有していないかどうかの評価が重要であると思われる。細胞治療用医薬品が産生するタンパク質群のプロファイル作成法、及び迅速かつ正確に詳細な構造・特性を解析するための技術の開発が急務であ

る。

近年、細胞・組織が発現するタンパク質を網羅的に解析するプロテオミクスが注目されている。疾病などに関連するタンパク質を同定するために、2D-GEでタンパク質を分離し、ゲル内消化後、得られたペプチド断片をMSまたはMS/MSで解析し(ペプチドマスフィンガープリント法、またはアミノ酸配列解析法)、データベース検索する方法が用いられている。プロテオミクスの手法は細胞治療用医薬品の評価法としても大いに役立つことが期待される。特に、2D-GEによる発現タンパク質のプロファイリングは、細胞の恒常性評価に有用であると考えられる。

プロテオミクスの手法に対しては、様々な問題も指摘されている。例えば、2D-GEは発現タンパク質のプロファイリングには適しているが、多量に存在するハウスキーピングタンパク質の存在によって、キータンパク質群のプロファイルを把握できない。また、タンパク質は、ペプチド断片や部分配列からデータベース検索によって同定されるため、相同性の高いタンパク質などにおいて、判定を誤るケースがある。さらに、糖鎖に代表される翻訳後修飾の解析は充分には行われていない、などである。プロテオミクスの手法を細胞治療用医薬品の評価に取り入れる際、これらの問題の克服は不可欠である。発現タンパク質群中の有効成分である目的タンパク質やその関連タンパク質、及び安全性を脅かすタンパク質について、プロファイル上のスポットの確認と部分配列からのタンパク質の同定だけでは、その医薬品の品質・有効性・安全性を保証することはできないからである。目的タンパク質群の量的な解析と、翻訳後修飾を含む全体構造を評価することが重要であると考えられる。

そこで、我々は、2D-GEをプロファイリングの手段としてだけでなく、目的タンパク質の単離手段としても位置づけ、単離されたタンパク質の特性解析を行うことを目的とした、CapLC/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピング、及び糖鎖プロファイリングの検討を行った。

本研究において我々は、はじめに、モデルタンパク質として糖鎖含有タンパク質トロンボモジュリン及びフォリスタチンを用いて、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の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性を評価した。

トロンボモジュリンでは、トリプシンによる断片化、LC/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピング、並びにLC/MS/MSの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マッピングの結果、修飾アミノ酸を含む一次構造の確認、分子内に4本存在するN結合糖鎖の構造と各部位における糖鎖の不均一性、1ヘキソースの結合と結合位置、及び複数のO結合糖鎖を有するペプチドの確認を行うことができた。

フォリスタチンについても、エンドプロテイナーゼAsp-N消化とLC/MS及びLC/MS/MSによって、一次構造確認、糖鎖結合部位、糖鎖構造とその不均一性を明らかにし、糖鎖は部分的に結合していることを明らかにすることができた。フォリスタチンの糖鎖構造及び糖鎖結合位置に関してはまだ報告がない。我々の分析法は、構造未知のタンパク質の構造解析にも有用であることが明らかになった。

本分析法は、僅か3~4日で目的タンパク質の構造を確認することができることから、細胞治療薬が発現する目的タンパク質の評価に有用であると思われる。

つづいて、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、マイクロLC/MSよりも微量化が期待できるCapLC/MSの導入を検討した。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、CapLC/MSを用いた糖鎖プロファイリング法を検討した。その結果、モデルとして用いたトロンボモジュリン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

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、CapLC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、及び CapLC/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量のトロンボモジュリンでマイクロ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、CapLC/MSによる糖鎖プロファイリング、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キャ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た。

そこで、本研究において確立した分析法を実際、電気泳動法で分離されたゲル内糖タンパク質の特性解析に応用し、その有用性を評価した。

はじめに、t-PA をモデルタンパク質として用い、SDS-PAGE 後、ゲル内消化を行い、ペプチド断片、および糖鎖を回収し、CapLC/MS を用いた糖鎖プロファイリング、及びペプチド/糖ペプチドマッピングを行った。その結果、電気泳動前の t-PA と同様な糖鎖プロファイル、及びペプチド/糖ペプチドマップが得られることが確認された。

次に、細胞・組織のモデルとしてウシ脳を用い、膜に存在し、神経網形成等に関連する脳特異的タンパク質群のプロファイリングと検出されたタンパク質の構造解析を行った。まず、SDS-PAGE に妨害を及ぼす脂質を除去し、界面活性剤処理によって、ハウスキーピング的に多量に存在するタンパク質を除去した。目的とする膜タンパク質可溶性画分を得て、SDS-PAGE を行い、複数のバンドが得られた。t-PA に準じてゲル内消化を行い、ペプチド断片、および糖鎖を回収した。ペプチド断片を用いた CapLC/MS/MS 及びデータベース検索により、複数のタンパク質が同定された。さらに、糖鎖プロファ

イリングによって、構造未知の糖鎖構造が明らかにされた。以上のように、本分析法は、細胞・組織の複雑なタンパク質混合物から、細胞・組織に特異的なタンパク質のプロファイルを作成し、目的タンパク質の同定と詳細構造の解析に有用な方法であることが示唆された。今後は、様々な事例に対応できるように有用性の拡大を目指していきたいと考えている。

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。

E. 結論

- 1) トロンボモジュリン及びフォリスタチンを用いて、マイクロ LC/MS、及び CapLC/MS によるペプチド/糖ペプチドマッピング、糖鎖プロファイリング、及び LC/MS/MS のプリカーサーイオンスキャンによる糖ペプチド選択的マッピングは、タンパク質の一次構造、修飾アミノ酸、糖鎖結合位置、糖鎖構造、及び部位特異的糖鎖の不均一性の解析に有用であることを確認し、細胞治療用医薬品が産生する目的タンパク質の構造・特性解析法として有用であることが示唆された。
- 2) ゲル電気泳動法と CapLC/MS を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング及び糖鎖プロファイリングは、発現タンパク質のプロファイリングと目的タンパク質の単離、及び目的タンパク質の特性解析法として利用できることを確認し、細胞治療用医薬品の特性解析・品質評価法として有用であることが示唆された。
- 3) SPR イムノアッセイは、培養上清中のタンパク質の定量法として優れていることを確認し、細胞治療用細胞の目的タンパク質発現量の定量法として有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA, and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass

spectrometry. *Anal. Biochem.*, in press

- 2) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, and Takao HAYAKAWA: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, in press
- 3) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography /mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 113-123 (2002)
- 4) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, and Takao HAYAKAWA: Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 235-244 (2002)
- 5) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **968**, 89-100 (2002)
- 6) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry: Application to recombinant human thrombomodulin. *J. Chromatogr. A*, **978**, 141-152 (2002)

- 7) 太田美矢子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 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 (IV) エリスロポエチン製剤 その4. *衛研報告*, **120**, 89-97 (2002)
- 8) Nana KAWASAKI, Yuji HAISHIMA, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, **11**, 1043-1049 (2001)
- 9) Nana KAWASAKI: Analysis of interactions between carbohydrates and proteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **13**, supplement GT-C04E (2001)
- 10) Miyako OHTA, Nana KAWASAKI, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Selective glycopeptide mapping of erythropoietin by on-line high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **910**, 1-11 (2001).
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Sumiko HYUGA, Masashi HYUGA, and Takao HAYAKAWA : 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)
- 14) Yasuo ODA, Katsuyoshi NAKAYAMA, Badarulhisam ABDUL-RAHMAN, Mitsuhiro KINOSHITA, Osamu HASHIMOTO, Nana KAWASAKI, Takao HAYAKAWA, Kazuaki KAKEHI, Noboru TOMIYA, and Yuan C. LEE: Crocus sativus lectin recognizes (Man)₃GlcNAc in the N-glycan core structure, *J. Biol. Chem.* **275**, 26772-26779 (2000)
- 15) Osamu HASHIMOTO, Nana KAWASAKI, Kunihiro TSUTIDA, Shunichi SHIMASAKI, Takao HAYAKAWA, and Hiromu SUGINO: 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)
- 16) Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Osamu HASHIMOTO, Masashi HYUGA, Miyako OHTA, Sadako YAMAGATA, Tatsuya YAMAGATA and Takao HAYAKAWA: 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)
- 17) Takao HAYAKAWA, Miyako OHTA and Nana KAWASAKI: Current Analytical Procedures for Glycosylated Proteins, *Pharmaceutica Special Issue, Proceedings Biologicals Beyond 2000*, 87-102 (2000)
- 18) 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, 山崎修道, 早川堯夫, 延原正弘編, エル・アイ・シー, pp255-284

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 太田美矢子, 袁 進, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MS を用いた N 結合糖鎖のプロファイリング及び糖配列解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎
- 2) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 蜂須賀暁子, 太田美矢子, 袁 進, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: Capillary LC/MS による電気泳動法で分離された糖タンパク質の N 結合型糖鎖解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎
- 3) 蜂須賀暁子, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 治, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAM の各糖鎖結合部位における糖鎖構造解析. 糖鎖解析. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎
- 4) Jin Yuan, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Miyako Ohta, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Monosaccharide composition analysis of glycoproteins by pyridylation and capillary LC/MS. 日本薬学会第 123 年会 (2003, 3) 長崎
- 5) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 袁 進, 太田美矢子, 石井明子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MS による糖タンパク質糖鎖の微量分析法の開発. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 6) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 太田美矢子, 川西 徹, 早川堯夫: nanospray LC/ESI-MS/MS を用いた微量糖タンパク質の構造解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 7) 蜂須賀暁子, 中島 治, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 手島玲子, 早川堯夫, 澤田純一: OBCAM (オピオイド結合性タンパク) の精製と糖鎖構造解析. 第 75 回日本生化学会大会 (2002, 10) 京都
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)

- 15) 川崎ナナ, 太田美矢子, 伊藤さつき, 配島由二, 日向昌司, 日向須美子, 早川堯夫: LC/MS によるエリスロポエチンの硫酸化糖鎖の解析, 日本薬学会第 121 年会 (2001, 3)
- 16) 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: 糖タンパク質性医薬品の同等性・同質性評価法としての LC/MS の有用性, 日本薬学会第 121 年会 (2001, 3)
- 17) 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 を用いた組換え型ヒトトロポモジュリンの糖鎖解析, 日本薬学会第 121 年会 (2001, 3)
- 18) 日向昌司, 川崎ナナ, 太田美矢子, 伊藤さつき, 日向須美子, 早川堯夫: GlcNAc 転移酵素 III 遺伝子導入による組換えフォリスタチンの糖鎖構造の改変, 日本薬学会第 121 年会 (2001, 3)
- 19) 日向須美子, 川崎ナナ, 日向昌司, 太田美矢子, 柴山理恵, 川西 徹, 山形貞子, 山形達也, 早川堯夫: HGF で誘導される高転移性癌細胞の運動能のガングリオシド GD1a による抑制機構, 第 59 回日本癌学会総会 (2000, 10)

Ⅱ. 知的財産権の出願, 登録状況

なし

表 1

図 4 中のピークのアミノ酸残基、糖鎖構造、分子量理論値、及び実測値

Peak No.	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrates	Theoretical mass	Observed mass		
					Positive (low)	Positive (high)	Negative (high)
1	K17	298-304		809.9	809.5	-	-
2	K10	104-106		431.5	431.2	-	-
3	K2	39-45		813.0	812.5	-	-
4	K8	84-88		554.7	554.4	-	-
5	(K23)	(467-498)		1476.5	7781.6	7786.0	7785.3
6	K15	247-260		4084.0	1476.3	1476.0	1476.1
7	K9	89-103	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	3792.7	4083.5	4084.2	4084.2
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	3792.7	3791.9	3793.2	3792.6
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄	3501.4	3502.0	3501.7	
8	K14	220-246		2886.0	2885.8	2886.5	2886.8
9	K18	305-321		2093.1	2092.6	2093.4	2093.4
10	(K16)	(261-297)	Hex	4516.5	4515.7	4517.8	4518.6
11	K20	354-385	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	6204.3	6204.4	6206.2	6204.6
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	5913.0	5913.8	5913.8	5914.6
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄	5621.7	5621.9	5622.4	
12	K19	322-353	-OH	3916.0	3915.7	3917.0	3917.0
13	K6	68-82		1651.9	1651.3		1651.8
	K1	1-38	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	6487.6	6487.4	6489.3	6489.3
				6196.3	6197.5	6199.3	6199.8
				5905.0	5905.5		5907.2
14	K13	183-219		3704.2	3704.4	3704.7	3705.4
15	K21	386-456	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	10597.7		10593.3	10594.4
16	K12	144-182		4113.6	4113.6	4114.7	4115.0
17	K11	107-143		4042.4	4042.8	4043.8	4043.0
18	K3	46-65		1900.1	1899.8	1900.9	1900.0

Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, N-acetylhexosamine; NeuAc, N-acetylneuramic acid

表2 糖鎖の基本構造

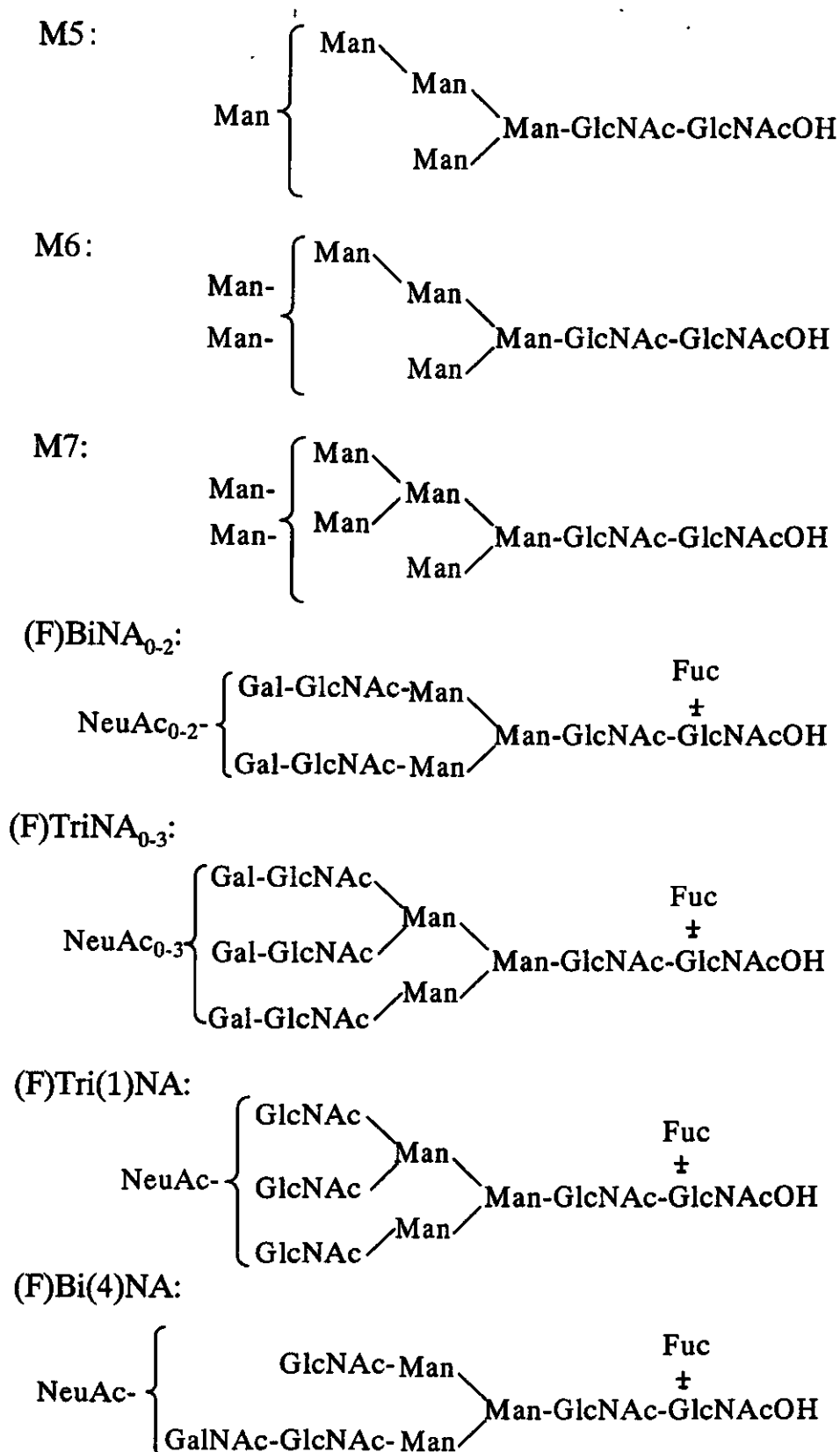


表 3
 図 7 中のピークのアミノ酸残基、糖鎖構造、分子量理論値、及び実測値

Peak No.	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrates	Theoretical mass	Observed mass		
					Positive (low)	Positive (high)	Negative (high)
1	K4	70-91		2666.0	2665.0	2665.9	2666.6
2	K14	251-257		777.8	777.6	-	-
3	K15②	280-288		1018.0	1018.4	1017.3	
4	K11	230-241		1456.6	1455.8	1456.7	1457.4
5	K6	106-140		4378.8	4378.9	4379.0	4379.6
6	K8	153-180		3326.4	3325.4	3326.4	3325.4
	K10	218-229		1467.6	1466.8	1467.7	1466.8
7	K1	1- 39		4728.1	4729.4	4728.7	4728.6
	K5	92-105	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	3960.9	3959.8	3961.8	3962.4
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	3669.6	3668.3	3669.9	3673.6
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄	3378.3	3379.6	3379.4	
8	K7	141-152		1329.4	1328.5	1328.9	1329.0
9	K15①	258-249	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	4702.8	4699.3	4703.0	4703.8
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	4411.4	4410.0	4411.6	4411.2
			[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄	4120.2	4116.0	4120.1	4121.0
10	K5	92-105		1608.7	1608.1	1608.2	1608.3
11	K9	181-217		4165.6	4164.6	4166.3	4165.8
12	K15①	258-279		2350.6	2349.6	2349.7	2351.2
13	K3	43-69		3219.5	3218.9	3220.2	3219.6

Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, N-acetylhexosamine; NeuAc, N-acetylneuramic acid

表 4 図 4 中のピークの糖鎖構造、分子量理論値、及び実測値

Peak No.	Carbohydrate composition ^a	Sugar type ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>	
				M ⁺	M ²⁺
1	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2081.1	1041.5
2	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FucBiNA	2080.9	2080.1	1041.6
3	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.7	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.3	1187.4
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.9
4	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.6
5	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2373.0	1186.9
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FucTriNA ₂ , FucBiLacNA ₂	2737.5		1369.7
6	[Fuc][Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuAc]	FucBi(1)NA	1715.6	1716.5	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.9	1187.8
	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1515.9
7	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₃	FucTriNA ₃	3028.8		1516.4
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FucBiNA ₂	2372.2	2372.2	1187.5

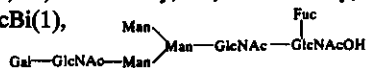
^a Fuc, fucose; Hex, hexose; HexNAc, *N*-acetylhexsamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid.

^b Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, tetraantennary; Lac, *N*-acetyllactosamine; NA, NeuAc; FucBi(1),

表 5 図 11 中のピークのアミノ酸残基、糖鎖構造の帰属と理論値、及び実測値

Peak in Fig.1	Peptide No.	Amino acid residues	Carbohydrate structure ^a	Theoretical mass ^b	Observed <i>m/z</i> value				
					M ⁺	M ²⁺	M ³⁺	M ⁴⁺	M ⁵⁺
1	K17	298-304		809.9	810.6				
2	K10	104-106		431.5	432.3				
	K22	457-466		1090.1	1090.5	546.0			
3	K8	84-88		554.7	555.6				
4	K2	39-45		813.0	813.6	407.4			
5	K15	247-260		1476.5	1476.9	739.2			
6	K9 ^c	89-103	FucBiNA ₂	4084.0		2043.4	1362.3		
			FucBiNA	3792.7		1897.8	1265.2		
			FucBi	3501.4		1751.5	1168.7		
			FucBiLacNA ₃ , FucTriNA ₃	4740.5			1582.1		
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	4449.3			1484.6		
			FucBiLacNA, FucTriNA	4158.0			1387.7		
			FucBi(1)NA	3427.4		1714.6			
7	K18	305-321		2093.1	2093.7	1047.3			
8	K14	220-246		2886.0		1444.1	963.1		
9	K16 ^c	261-297	Hex	4516.5		2259.3	1506.3		
10	K19 ^d	322-353	OH	3916.0		1958.8	1306.2		
	K6	68-82		1651.9	1652.2	826.9			
11	K20 ^c	354-385	FucBiNA ₂	6204.3			2069.7	1552.7	1242.0
			FucBiNA	5913.0			1972.2	1479.3	
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6569.6				1643.7	1315.0
			FucBiLacNA, FucTriNA	6278.3				1570.9	
			FucBi(1)	5256.4				1315.0	
			Bi	5475.6			1826.7		
12	K13	183-219		3704.2			1853.7	1235.9	
	K1 ^c	1-38	FucBiNA ₂	6487.6			2164.4	1623.0	
			FucBiNA	6196.3			2067.0	1550.4	
			FucBiLacNA ₂ , FucTriNA ₂	6852.9			2286.0		
			FucBi(1)NA	5831.0			1945.1		
13	K3	46-65		1900.1	1901.7	951.4			
14	K11	107-143		4042.4		2023.3	1348.9		
	K12	144-182		4113.6		2057.6	1371.5		

^a Fuc, fucose; Hex, glucose; Bi, biantennary; Tri, Triantennary; Tetra, Tetraantennary; NA, *N*-acetylneuramic acid; Lac, *N*-acetyllactosamine; FucBi(1),



^b Average mass value.

^c Glycopeptide.

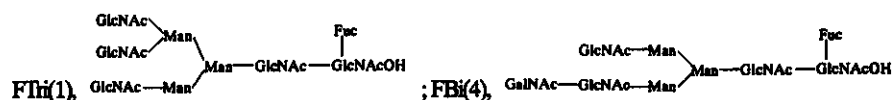
^d Hydroxylated peptide.

表 6 図 14 中の各ピークの糖組成、理論分子量、及び実測値

Peak No.	Carbohydrate composition ^a	Sugar type ^b	Theoretical mass ^c	Observed <i>m/z</i>	
				M ⁺	M ²⁺
1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₂	M6	1399.3	1400.2	
	[Hex] ₇ [HexNAc] ₂	M7	1561.4	1562.1	
2	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	M5	1237.1	1238.2	
3	[Hex] ₅ [HexNAc] ₂	M5	1237.1	1238.1	
	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄	FBi	1789.7		895.9
4	[Fuc][Hex] ₃ [HexNAc] ₅ [NeuAc]	FTri(1)NA, FBi(4)NA	1959.8		980.2
5	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FBiNA	2080.9		1041.1
6	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc]	FBiNA	2080.9		1041.4
7	[Fuc][Hex] ₆ [HexNAc] ₅ [NeuAc] ₂	FTriNA ₂	2737.5		1370.4
8	[Fuc][Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuAc] ₂	FBiNA ₂	2372.2		1187.3

^a Hex, hexose; Fuc, fucose; HexNAc, *N*-acetylhexosamine; NeuAc, *N*-acetylneuramic acid.

^b F, fucose; NA, *N*-acetylneuramic acid; Bi, biantennary; Tri, triantennary.



^c Average mass value.