

Table 11 Glycosylation analysis of ceruloplasmin

Retention time (min)	m/z	Charge	M.W.	Peptide Sequences	M.W.	Oligosaccharide Structures	M.W.
24	1025.17	+4	4096.7	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
24	1366.54	+3	4096.6	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.9
24	1373.88	+3	4118.6	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
24	1061.67	+4	4242.7	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
25	1415.23	+3	4242.7	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1262.24	+4	5045.0	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1682.65	+3	5045.0	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1189.21	+4	4752.8	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1585.27	+3	4752.8	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1225.72	+4	4898.9	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1633.96	+3	4898.9	EHEGAIYPDNITTD _F Q _R	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
27	1093.95	+4	4371.8	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1458.27	+3	4371.8	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1057.43	+4	4225.7	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
27	1409.57	+3	4225.7	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
28	1257.99	+4	5028.0	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1677.01	+3	5028.0	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1221.48	+4	4881.9	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1628.30	+3	4881.9	ELHHLQEQNVSN _A FL _D K	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
33	1347.54	+3	4039.6	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.6
34	1450.24	+3	4347.7	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2239.7
34	1083.68	+4	4330.7	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+NH ₃	2239.7
34	1444.56	+3	4330.7	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1493.28	+3	4476.8	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
34	1089.17	+4	4352.7	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
35	1668.97	+3	5003.9	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3+NH ₃	2895.9
35	1663.29	+3	4986.9	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2895.9
35	1247.72	+4	4986.9	ENLTAPGSDSAV _F FEQ _G T _T R	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
37	1282.48	+3	3844.4	AGLQAF _F QVQ _E C _N K	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
37	1923.24	+2	3844.5	AGLQAF _F QVQ _E C _N K	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
38	1331.17	+3	3990.5	AGLQAF _F QVQ _E C _N K	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
38	1289.81	+3	3866.4	AGLQAF _F QVQ _E C _N K	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7

(A) TIC for the full scan m/z 400-2000

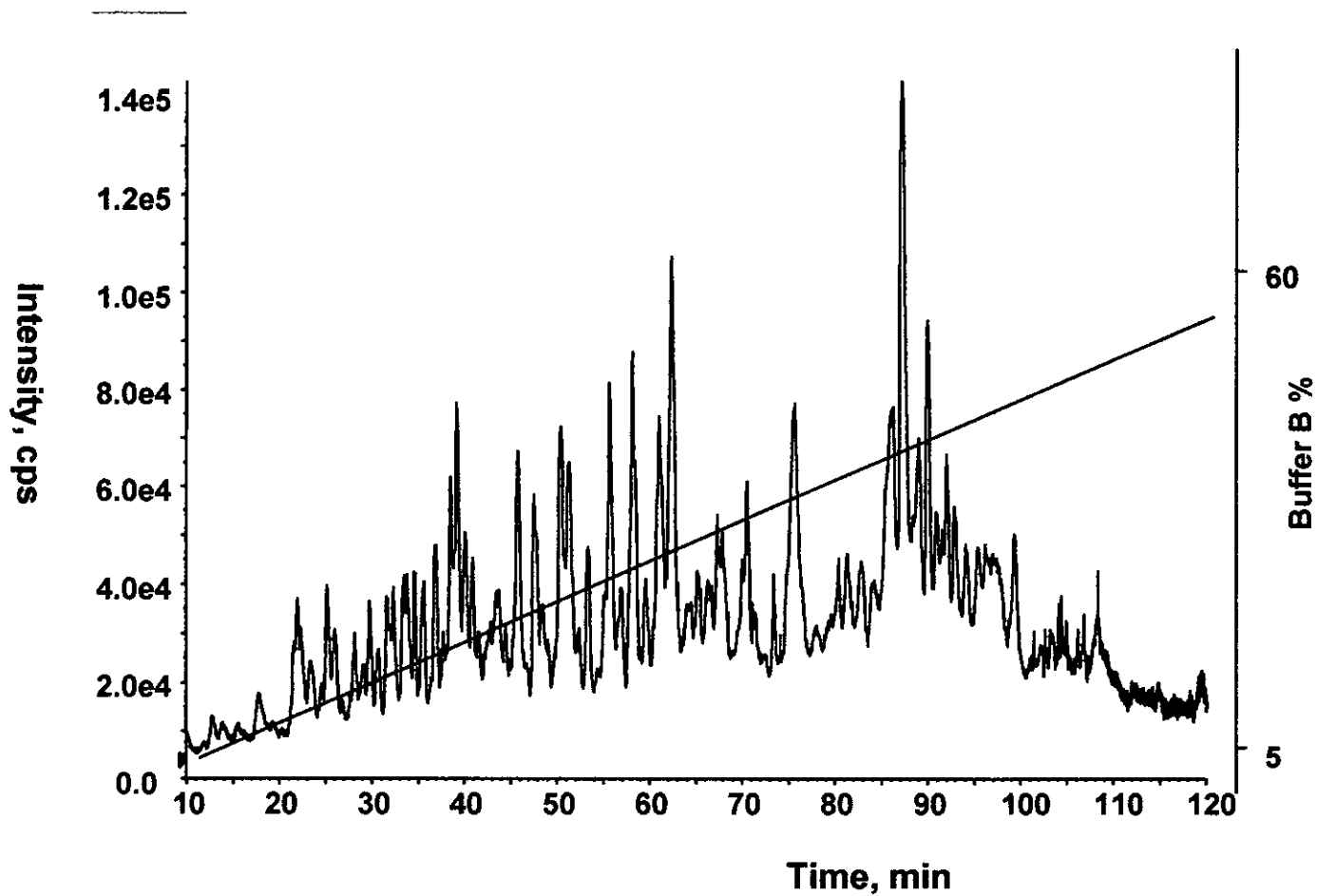


Fig. 17 LC-MS/MS of tryptic digest of human serum

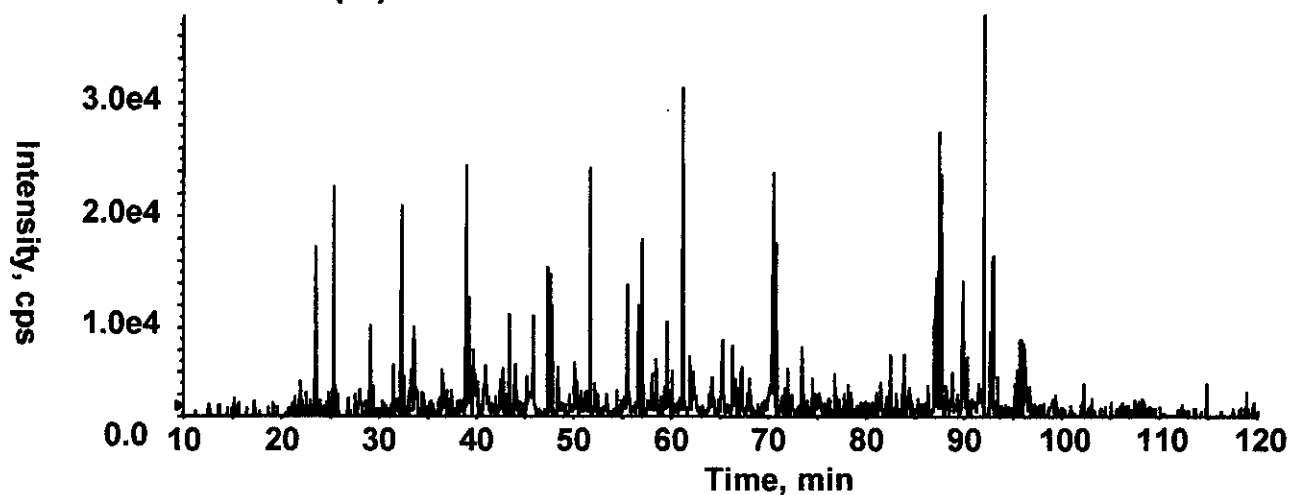
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

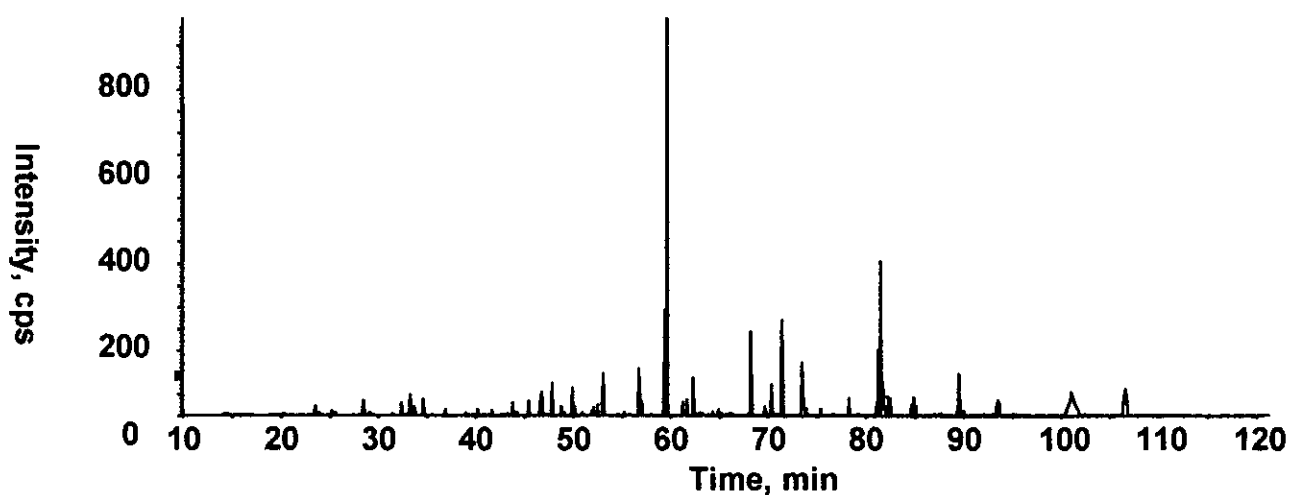
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

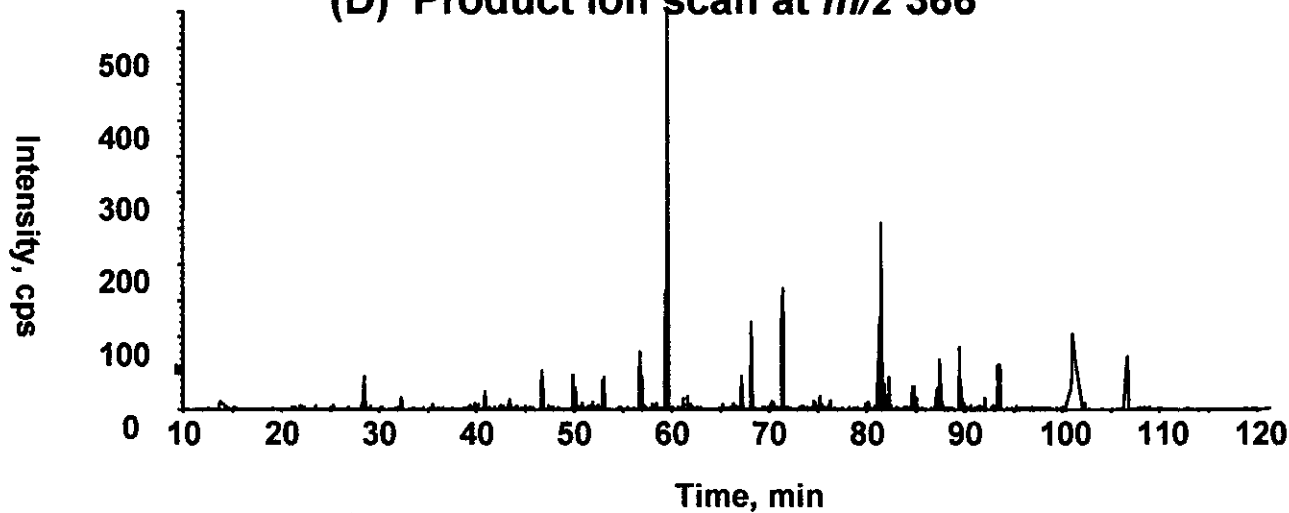
(B) Product ion scan at m/z 100-2000



(C) Product ion scan at m/z 204



(D) Product ion scan at m/z 366



M.W. 4882.8
Peptide 2678.4
CHO 2222.8

Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
M	131.0	132.0	115.0	2679.4	2662.4
V	99.1	231.1	214.1	2548.4	2531.3
S	87.0	318.1	301.1	2449.3	2432.3
H	137.1	455.2	438.2	2362.3	2345.2
H	137.1	592.3	575.2	2225.2	2208.2
N	114.0	706.3	689.3	2088.1	2071.1
L	113.1	819.4	802.4	1974.1	1957.1
T	101.0	920.4	903.4	1861.0	1844.0
T	101.0	1021.5	1004.5	1760.0	1742.9
G	57.0	1078.5	1061.5	1658.9	1641.9
A	71.0	1149.5	1132.5	1601.9	1584.9
T	101.0	1250.6	1233.6	1530.9	1513.8
L	113.1	1363.7	1346.7	1429.8	1412.8
I	113.1	1476.8	1459.7	1316.7	1299.7
N	114.0	1590.8	1573.8	1203.6	1186.6
E	129.0	1719.8	1702.8	1089.6	1072.6
Q	128.1	1847.9	1830.9	960.6	943.5
W	186.1	2034.0	2017.0	832.5	815.5
L	113.1	2147.1	2130.0	646.4	629.4
L	113.1	2260.2	2243.1	533.3	516.3
T	101.0	2361.2	2344.2	420.2	403.2
T	101.0	2462.2	2445.2	319.2	302.2
A	71.0	2533.3	2516.3	218.1	201.1
K	128.1	2661.4	2644.4	147.1	130.1

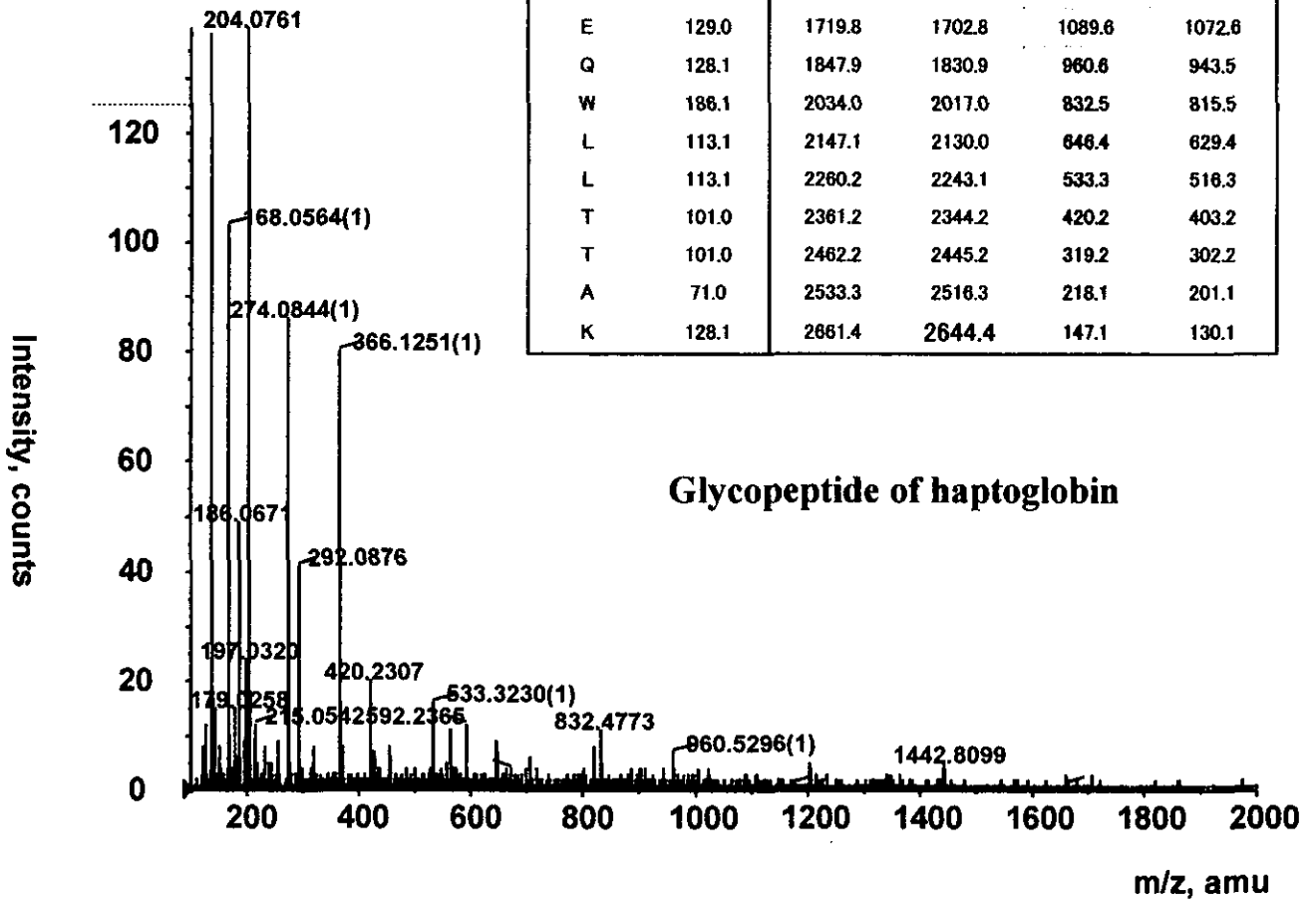


Fig. 18 Product ion spectrum of M⁺(m/z1221.7³⁺) at 26 min

Fig. 9 腎臓由来細胞分画プロトコール

腎臓 (lpr/lpr, +/+), n=3

↓
Cell strainer (70 μ m, BD Biosciences)
遠心 (1000~1200rpm, 5min)

↓
赤血球除去
NH₄Cl-Tris溶液, 3min放置 in ice
洗浄 (PBS \times 3)

83 lpr/lpr 848mg, +/+ 1,219mg

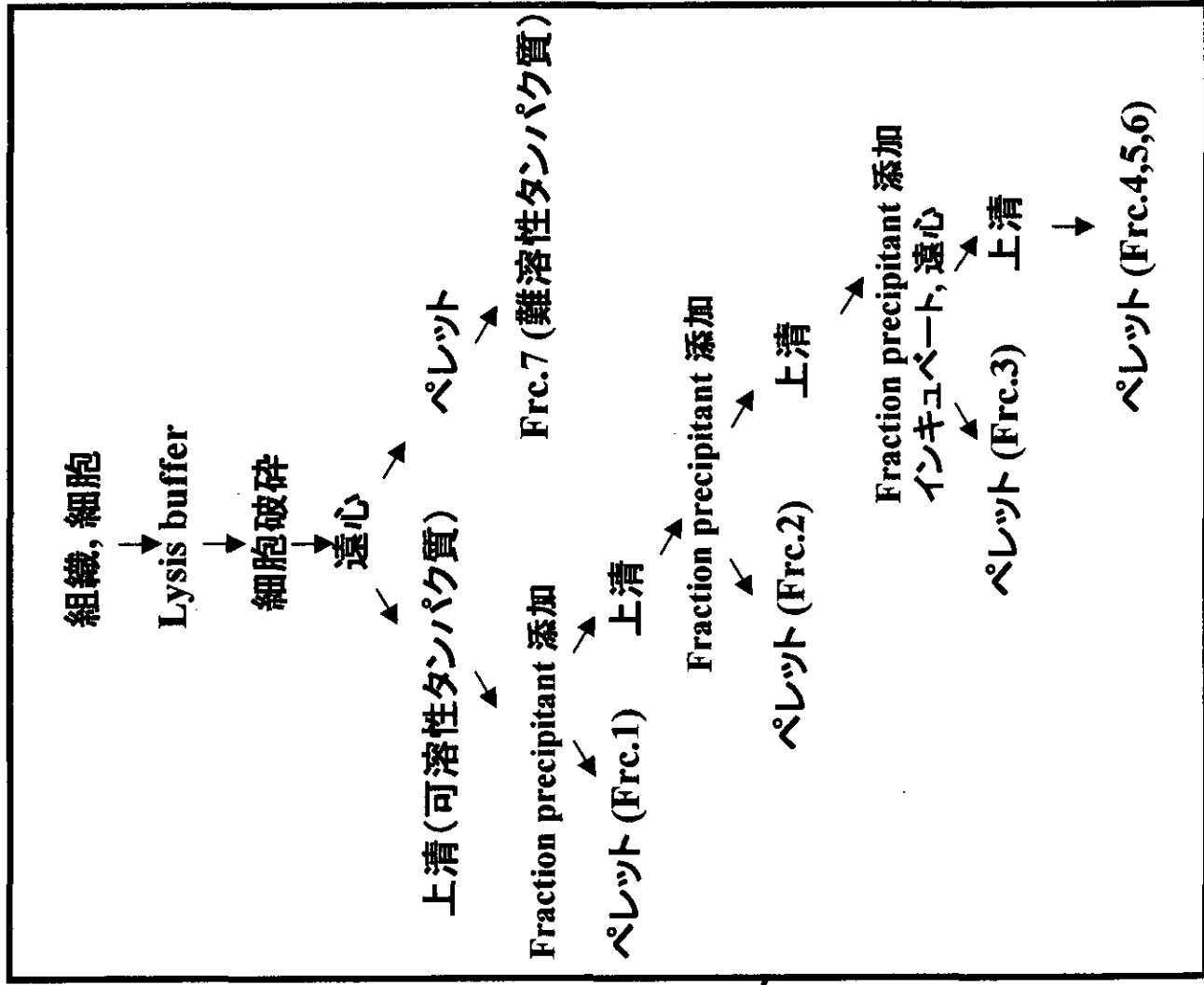
200mg (lpr/lpr, +/+)

↓
二次元電気泳動用サンプル分画キット
(2-D fractionation kit, Amersham)

Frc.2, 3, 6, 7

↓
カルボキシメチル化
糖鎖の切り出し (PNGase F)
還元
脱塩

LC/MS



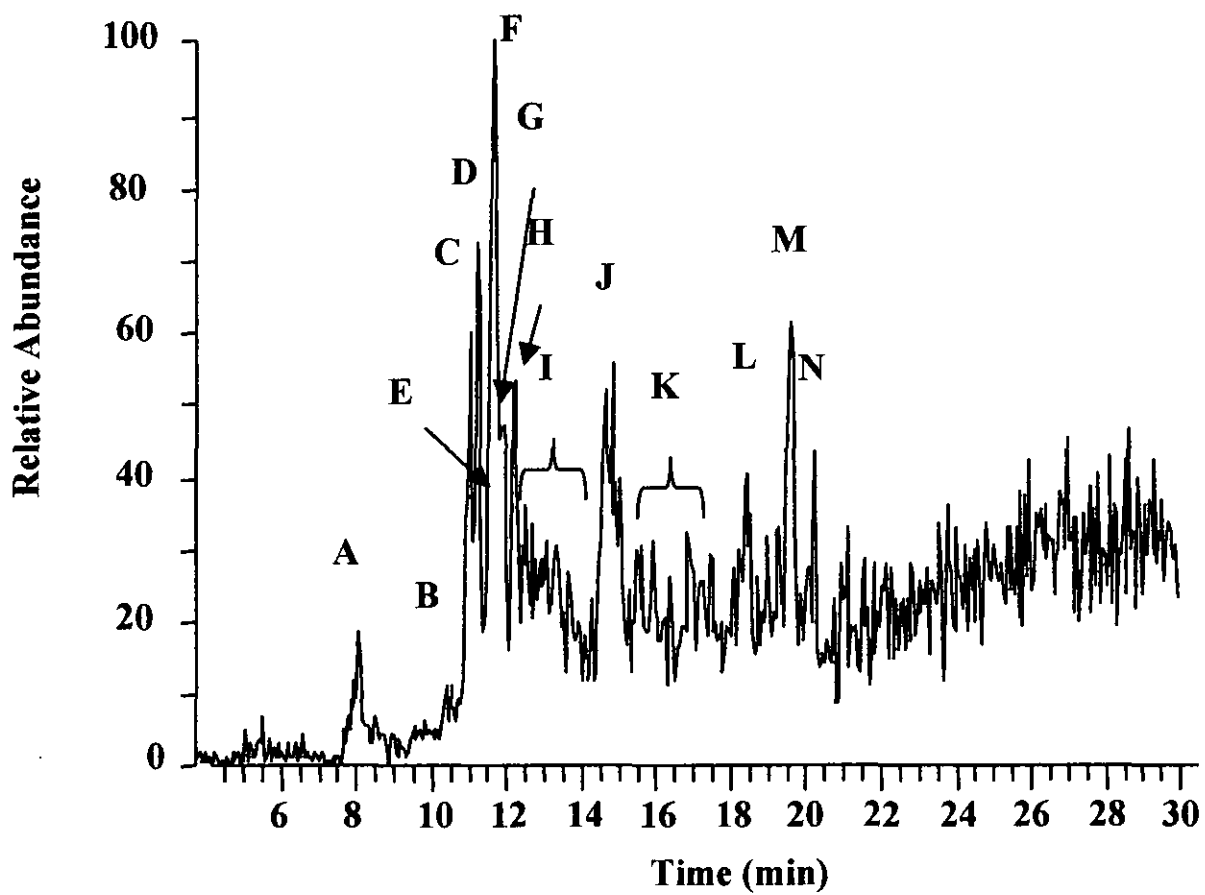


Fig. 20 N-linked oligosaccharide profile of glycoproteins in a mouse kidney

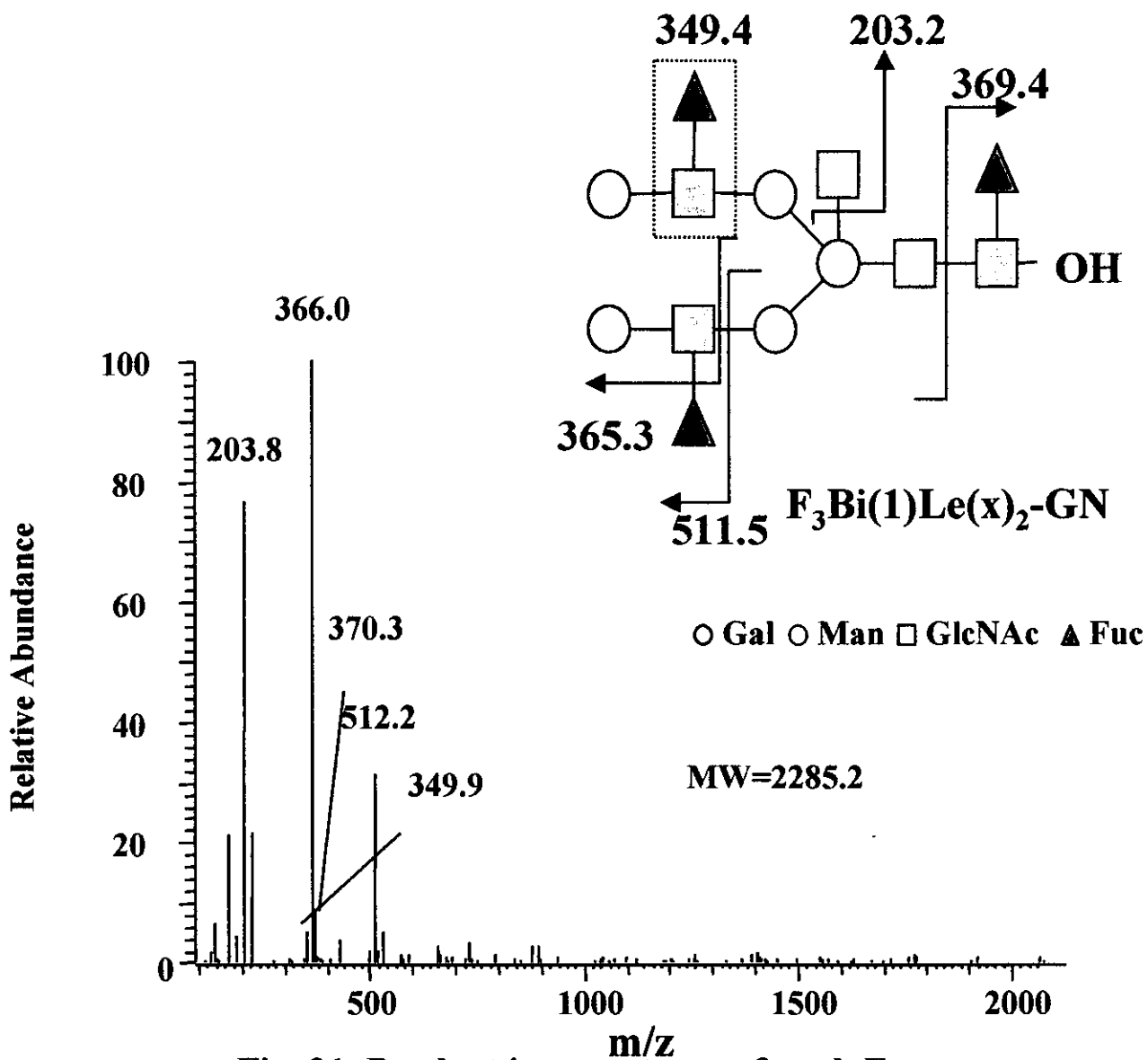
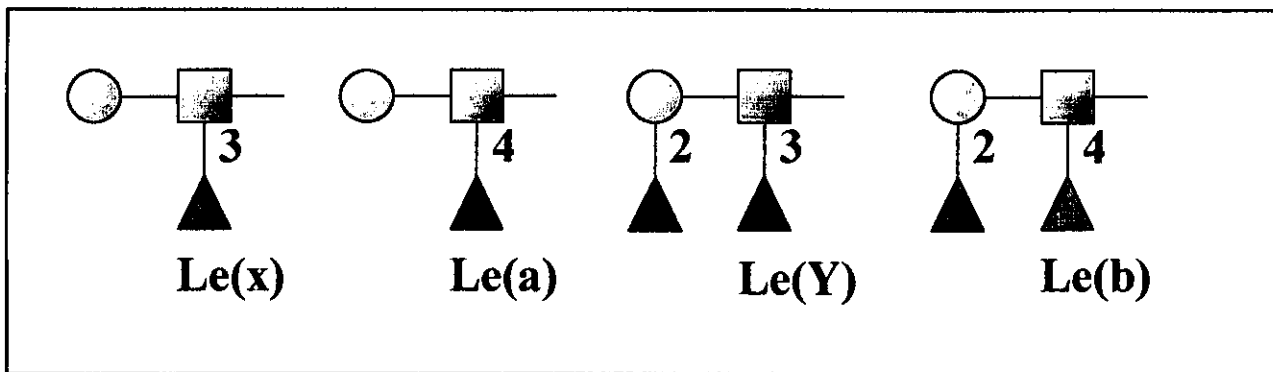


Fig. 21 Product ion spectrum of peak F
Peak F: $F_3Bi(1)Le(x)_2-GN$

Table 3. Carbohydrate compositions and theoretical and calculated masses

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced carbohydrate structure	Theoretical mass	Calculated mass	Charge state	Ovserved m/z		
A	A1	{Fuc} ₁ {Hex} ₄ {HexNAc} ₅ {Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ Ac	Bi(2) FBi(1) Ac	1830.7 1831.7	1831.2	2-	914.6	
	A2	{Fuc} ₂ {Hex} ₅ {HexNAc} ₅ {Fuc} ₂ {Hex} ₆ {HexNAc} ₄ Ac	F ₂ Bi(1)Le(x) ₁ -GN F ₂ Hybrid(1) Ac	2139.0 2140.0				2139.0
B	B1	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄	Bi(1)	1643.5	1643.6	2-	820.8	
C	C1	{Hex} ₈ {HexNAc} ₂	Man ₈ GlcNAc ₂	1723.6	1723.6	2-	860.8	
	C2	{Hex} ₇ {HexNAc} ₂	Man ₇ GlcNAc ₂	1561.4	1724.0	1-	1723.0	
D	D1					2-	779.9	
E	E1	{Hex} ₆ {HexNAc} ₂	Man ₆ GlcNAc ₂	1399.3	1398.7	1-	1397.7	
	E2	{Fuc} ₂ Hex ₄ {HexNAc} ₅ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁ Ac	F ₂ Bi(2)Le(x)-GN Bi(1)NA Ac	1976.9 1976.7	1977.0	2-	987.5	
F	E3	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁ Ac	FBi(1)NA Ac	2122.9	2123.2	2-	1060.6	
	F1	{Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₅	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ -GN	2285.2	2285.6	2-	1141.7	
G	G1	{Fuc} ₂ {Hex} ₄ {HexNAc} ₅ {Fuc} ₂ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ Ac	F ₂ Bi(2) Le(x)-GN Bi(1)NA Ac	1976.9 1977.8	1977.6	2-	987.8	
	H	H1	{Hex} ₆ {HexNAc} ₂	Man ₆ GlcNAc ₂	1399.3	1399.4	1-	1398.4
H	H2	{Hex} ₇ {HexNAc} ₂	Man ₇ GlcNAc ₂	1561.4	1562.2	2-	780.1	
	H3						728.9	
	H4						1023.1	
	I	I1	{Fuc} ₂ {Hex} ₅ {HexNAc} ₅ {Fuc} ₂ {Hex} ₆ {HexNAc} ₄ Ac	F ₂ Bi(1)Le(x) ₁ -GN F ₂ Hybrid(1) Ac	2139.0 2140.0	2139.4	2-	1068.7
I	I2	{Fuc} ₁ {Hex} ₄ {HexNAc} ₅ {Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ Ac	Bi(2) FBi(1) Ac	1830.7 1831.7	1830.8	2-	914.4	
	I3	{Fuc} ₂ {Hex} ₇ {HexNAc} ₄ {Hex} ₇ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁	F ₂ Hybrid(2) Hybrid(2)NA	2260.1 2259.0	2258.2	2-	1128.1	
	I4	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄	FBi(1)	1789.7	1791.0	2-	894.5	
	I5	{Fuc} ₂ {Hex} ₅ {HexNAc} ₃	F ₂ Hybrid(3)	1732.6	1733.0	2-	865.5	
	I6	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₅	FBi(1)-GN	1992.9	1993.6	2-	995.8	
	I7	{Fuc} ₁ {Hex} ₆ {HexNAc} ₃	Hybrid(3)	1748.6	1748.6	2-	873.3	
	J	J1	{Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂	2082.0	2082.0	2-	1324.5
	J2	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁ Ac	FBi(1)NA Ac	2122.9	2123.0	2-	1040.0	
J3	{Fuc} ₁ {Hex} ₄ {HexNAc} ₅ {NeuNAc} ₁ Ac	FBi(2)NA Ac	2163.9	2164.6	2-	1060.5		
J4	{Hex} ₅ {HexNAc} ₂	Man ₅ GlcNAc ₂	1237.1	1237.3	1-	1081.3		
J5	{Fuc} ₃ {Hex} ₄ {HexNAc} ₄	F ₃ Bi(2)Le(x) ₂	1919.8	1919.8	2-	1236.3		
J6	{Fuc} ₁ {Hex} ₇ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁	FHybrid(2)NA	2405.2	2404.8	2-	958.9		
K	K1	{Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁	Bi(1)NA	1934.7	1935.2	2-	1201.4	
	K2	{Fuc} ₁ {Hex} ₃ {HexNAc} ₂	FCore	1059.0	1059.0	1-	966.6	
	K3	{Fuc} ₁ {Hex} ₇ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁ {Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁	FHybrid(2)NA F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ NA	2405.2 2373.2	2405.2	2-	1201.6	
	K4	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₂ {Hex} ₇ {HexNAc} ₆	FBi(1)NA ₂ Tri(1)Lac, Tetra(1)	2372.1 2374.2	2374.5	3-	790.5	
	K5	{Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂	2082.0	2081.4	2-	1186.0	
	K6	{Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄	FBi(1)	1789.7	1790.4	2-	1039.7	
	K7	{Fuc} ₁ {Hex} ₄ {HexNAc} ₄	FBi(3)	1627.5	1828.2	2-	894.2	
	L	L1	{Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ F Bi(1)Le(x)NA	2082.0 2080.9	2081.4	2-	813.1
L	L2	{Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₂	Bi(1)NA ₂	2226.0	2226.0	2-	1039.7	
	L3	{Fuc} ₁ {Hex} ₈ {HexNAc} ₇	FTetra(1)Lac FTri(1)Lac ₂	2885.7 2886.4	2885.7	3-	1112.0	
	M	M1	{Fuc} ₃ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₁ {Fuc} ₁ {Hex} ₅ {HexNAc} ₄ {NeuNAc} ₂ {Hex} ₇ {HexNAc} ₆	F ₃ Bi(1)Le(x) ₂ NA FBi(1)NA ₂ Tri(1)Lac, Tetra(1)	2373.2 2372.1 2374.2	2373.0	3-	960.9
M2	{Fuc} ₁ {Hex} ₆ {HexNAc} ₅ {NeuNAc} ₃ {Fuc} ₃ {Hex} ₆ {HexNAc} ₅ {NeuNAc} ₂	F TriNA ₃ F ₃ TriNA ₂	3028.7 3029.7	3028.5	3-	1442.2		
N	N1	{Fuc} ₃ {Hex} ₇ {HexNAc} ₆ {NeuNAc} ₃	F ₃ TriNA ₃	3686.4	3686.7	3-	790.0	
	N2						1185.6	
							1008.5	
							1227.9	
							920.5	

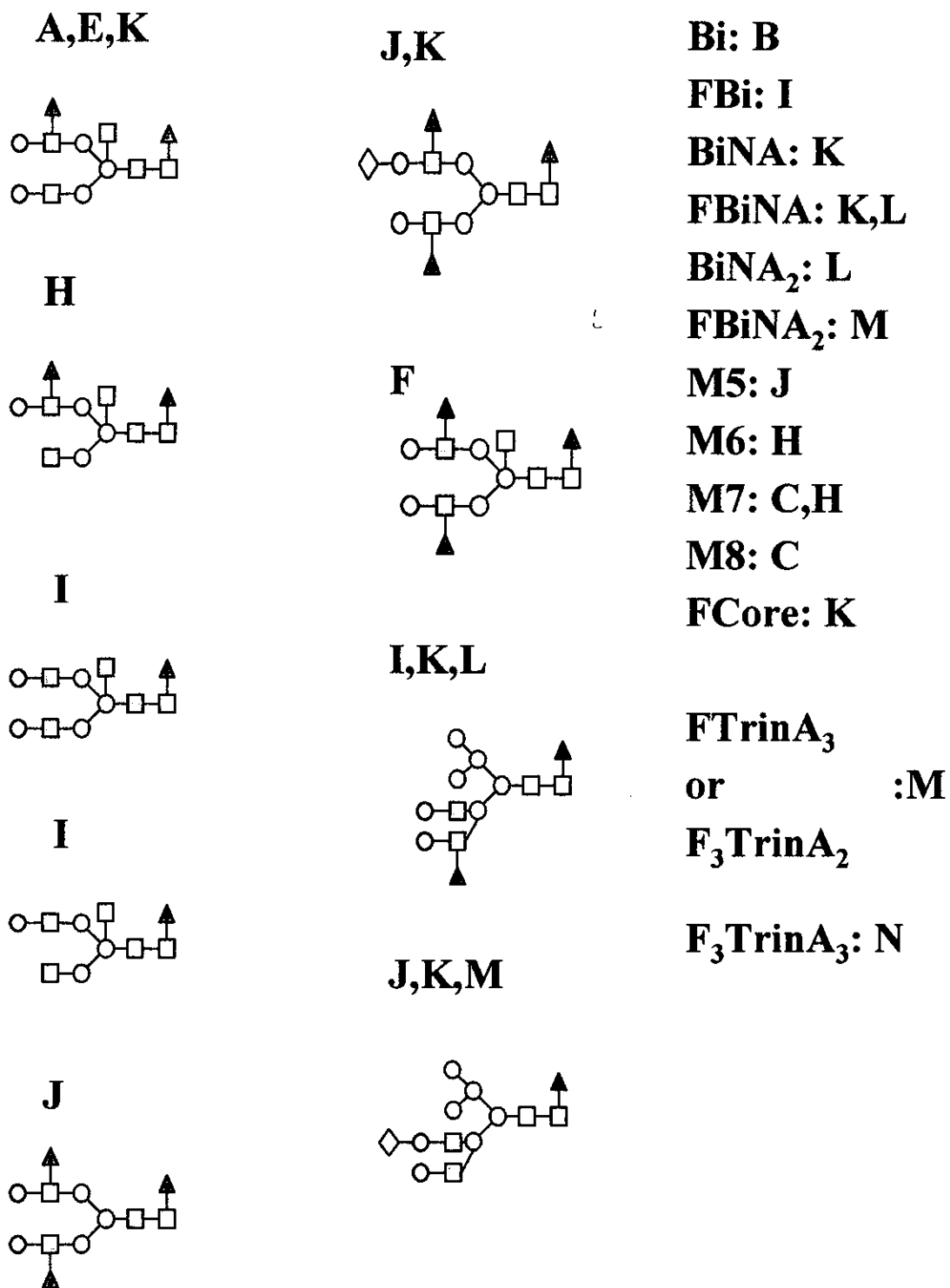


Fig. 12 Deduced oligosaccharide structure of peaks A-N in Fig. 11

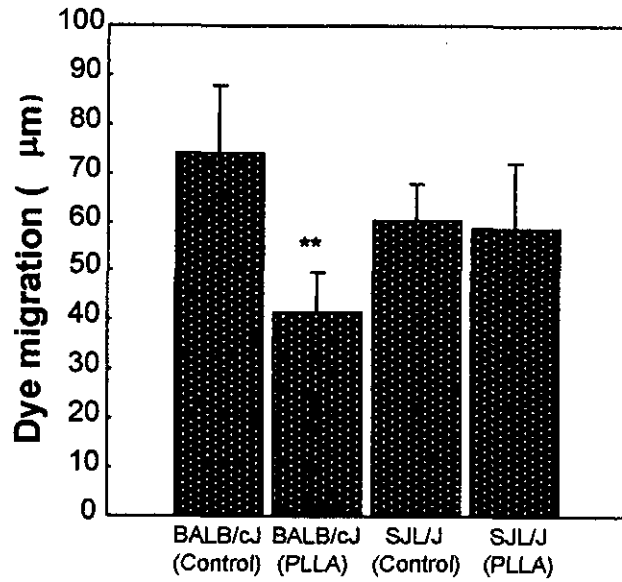


図23 ギャップ結合細胞間連絡機能(GJIC)に対するPLLA埋植の影響

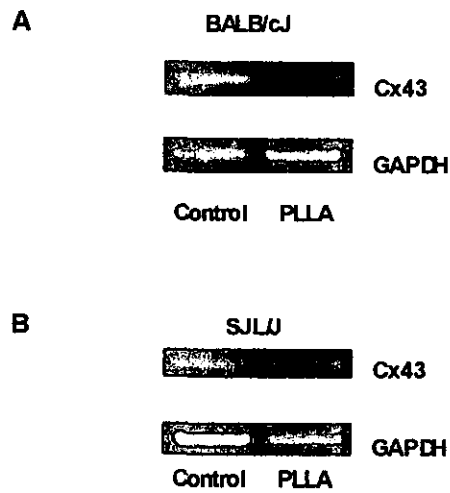


図24 コネキシン43(Cx43)のmRNA発現レベル

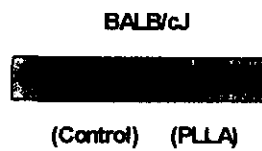


図25 コネキシン43(Cx43)のタンパク質レベル

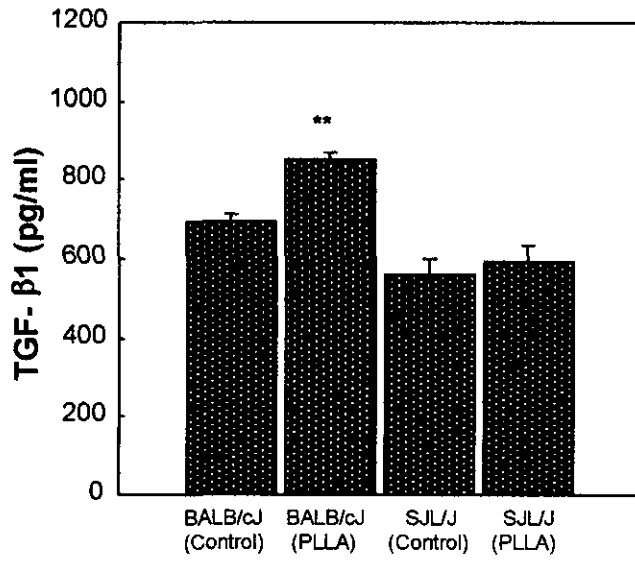


図26 TGF-β分泌に及ぼすPLLA埋植の影響

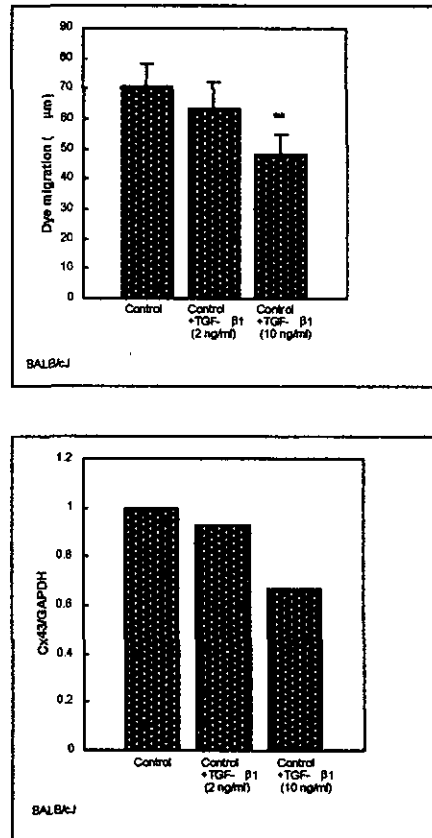


図27 細胞間情報伝達機能(GJIC)とCx43 mRNA発現に及ぼすTGF-βの影響

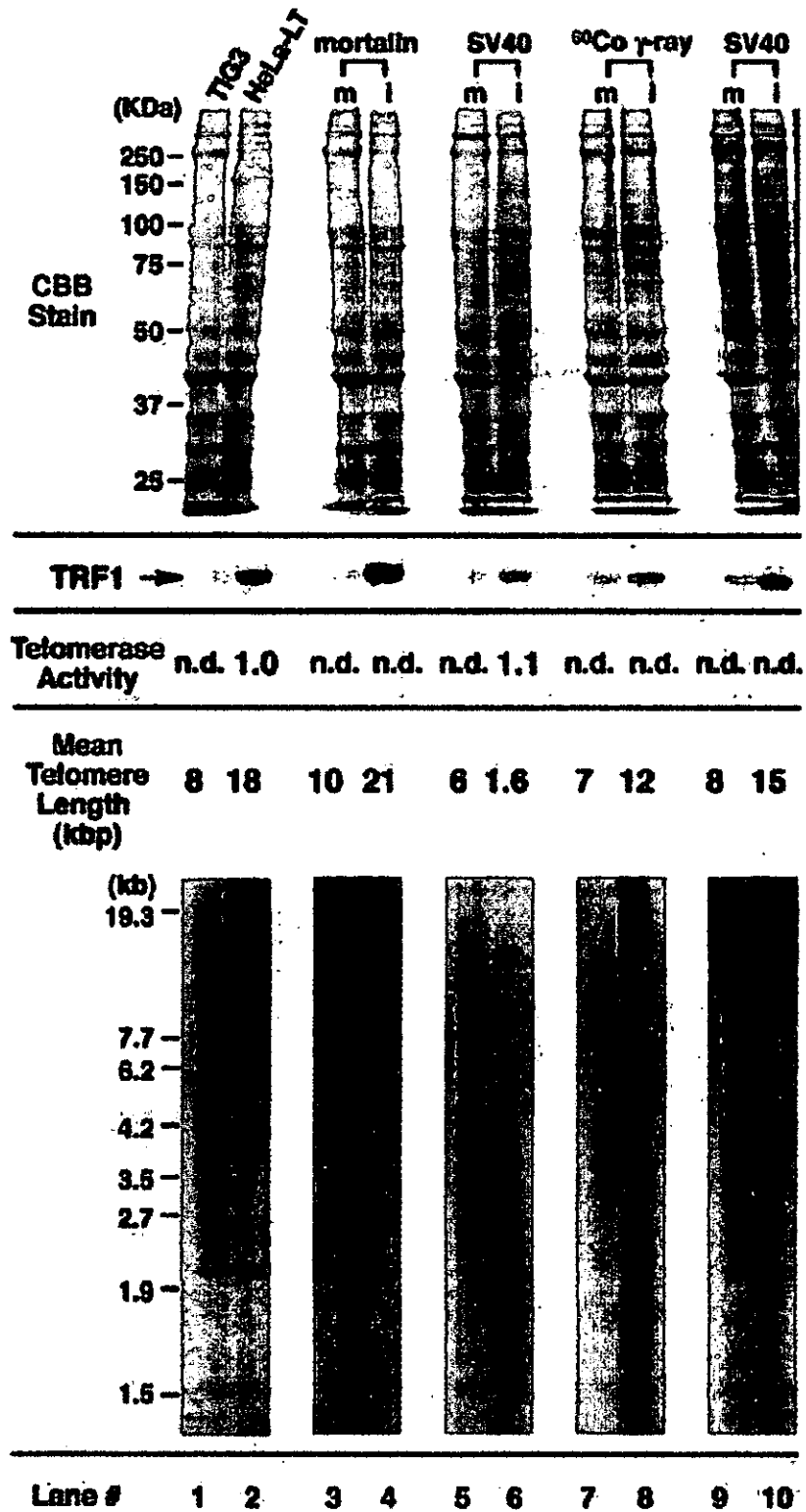


図28. 種々の方法で不死化したヒト繊維芽細胞のTRF1の発現

ヒト初代繊維芽細胞を、モータリン、SV40、⁶⁰Co照射を用いて不死化したときのTRF1の発現を調べた。各細胞のクマジー染色の結果とTRF1のウエスタンブロッティングによる結果 (TRF1) 及びテロメラーゼ活性を示す。mは不死化する前の細胞、lは不死化した細胞を示す。

下段のレーンは、1: TIG3細胞、2: HeLa-LT細胞、3: 正常TIG細胞、4: 不死化したTIG細胞、5: 正常MRC5細胞、6: SV-40感染MRC5細胞、7: 正常KMS6細胞、8: ⁶⁰Co不死化KMS6細胞、9: 正常WI38細胞、10: SV-40感染WI38細胞

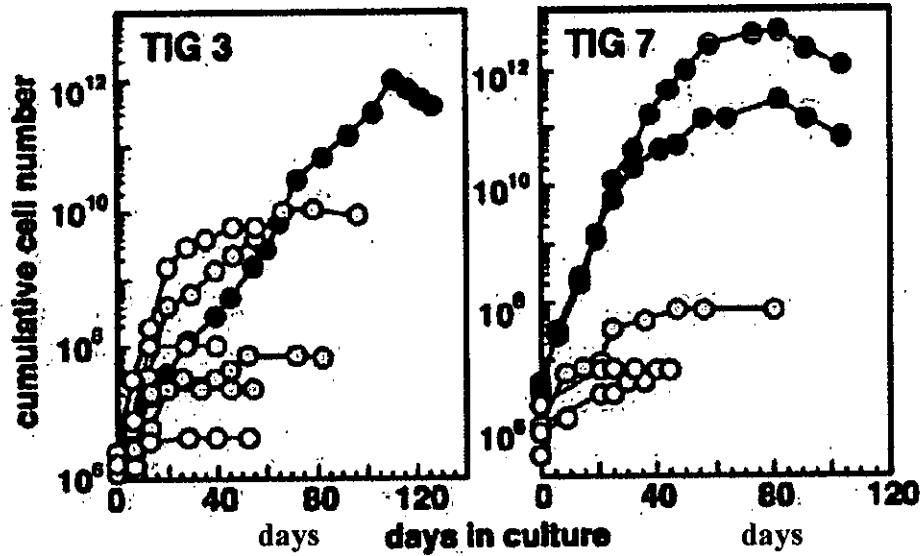
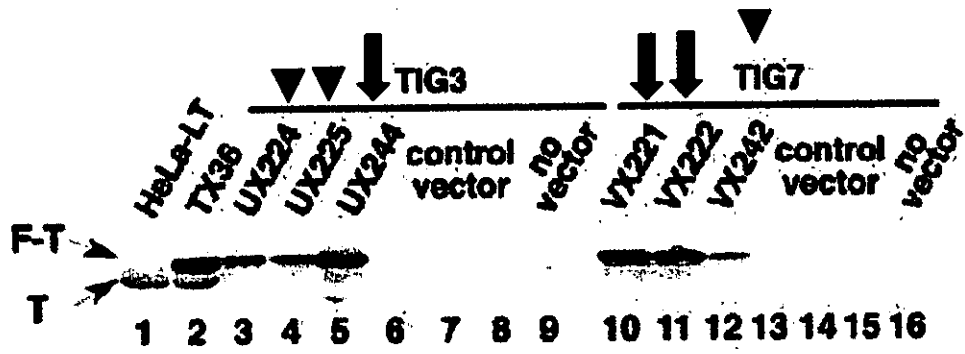


図29 TIG3細胞及びTIG7細胞にTRF1遺伝子をトランスフェクトしたときのTRF1の発現と細胞寿命の関係

TIG3細胞及びTIG7細胞にTRF1遺伝子をトランスフェクトして、いくつかのクローンを分離した。それぞれTRF1を強く発現しているクローン(上段:UX244、VX221、VX222;下段、●)、及び中程度にTRF1を発現しているクローン(上段:U224、U225、VX242;下段、●)、トランスフェクトしていない細胞(上段:コントロールベクター;下段、○)

Cell Viability Assay

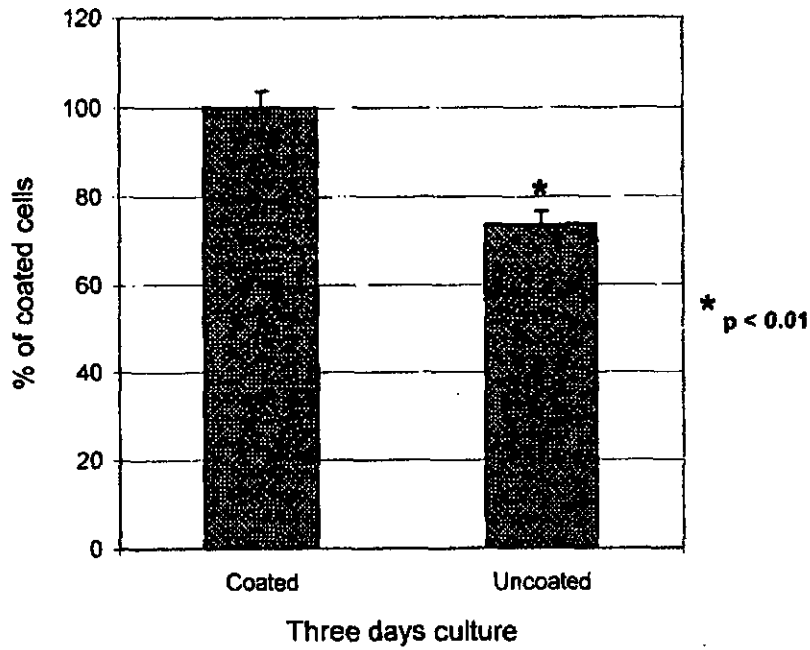


図30 骨髓リンパ球(BML)細胞の生存率

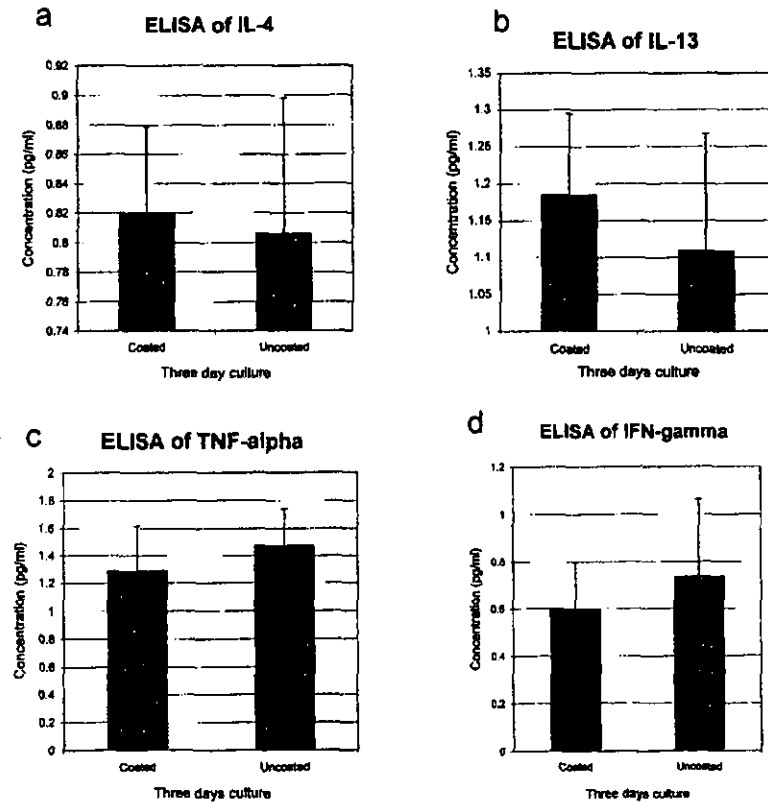


図31 リンパ球細胞中のサイトカイン産生

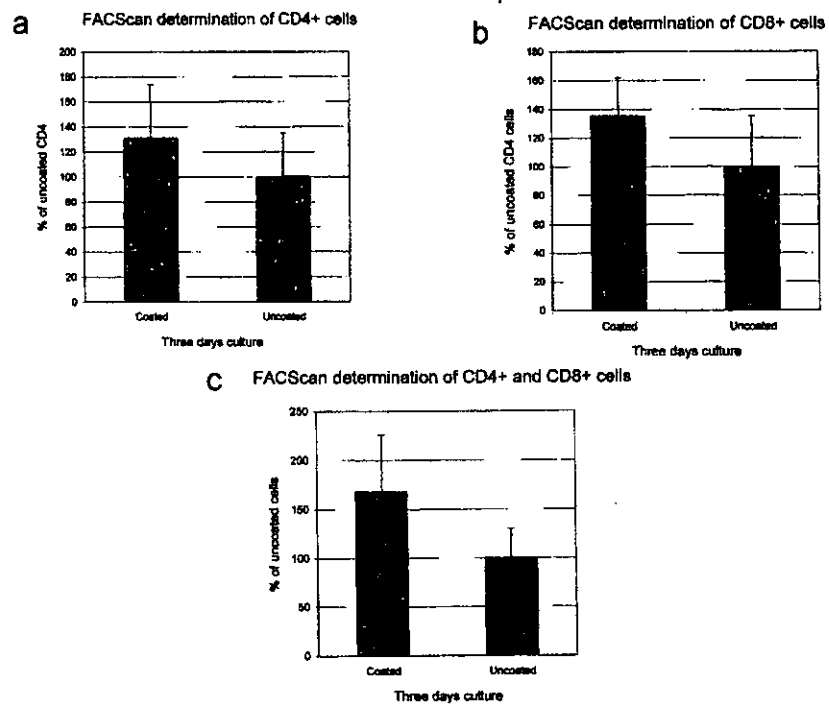


図32 リンパ球細胞中のCD4陽性細胞とCD8陽性細胞の測定

表 1 3. トランスフェリンあるいはアルブミン添加 CHCA から得られた各種ペプチドおよびタンパク質由来シグナルの強度

	ddw		Tf		BSA	
[Angiotensin II] +	27834 ±	10757	17057 ±	5021	19755 ±	11237
[P14R] +	41689 ±	15289	30675 ±	8588	29237 ±	13330
[ACTH 18-39] +	4371 ±	1586	3801 ±	2246	5458 ±	3826
[hANP] +	5158 ±	1323	6889 ±	2879	9523 ±	6384
[human glucagon] +	435 ±	183	674 ±	324	978 ±	566
[insulin B chain] +	367 ±	257	997 ±	251	715 ±	479
[bovine insulin] +	639 ±	100	6266 ±	2736	7498 ±	5331
[human insulin] +	1267 ±	130	13321 ±	5070	12982 ±	6863
[equine cytochrome C] 2+	166 ±	83	5668 ±	1975	3460 ±	1442
[human IGF-I] +	459 ±	81	7667 ±	1808	6263 ±	2872
[equine apomyoglobin] 2+	nd		2249 ±	994	2217 ±	1087
[equine cytochrome C] +	114 ±	43	7629 ±	1804	4006 ±	1981
[BSA] 4+	nd		52 ±	14	2459 ±	604
[equine apomyoglobin] +	nd		1347 ±	700	2090 ±	1316
[BSA] 3+	nd		155 ±	13	3721 ±	1426
[BSA] 2+	nd		114 ±	27	3624 ±	1681
[BSA] +	nd		25 ±	8	634 ±	433

nd: no signal was detected

Each entry is the average of the most intense signal from four samples.

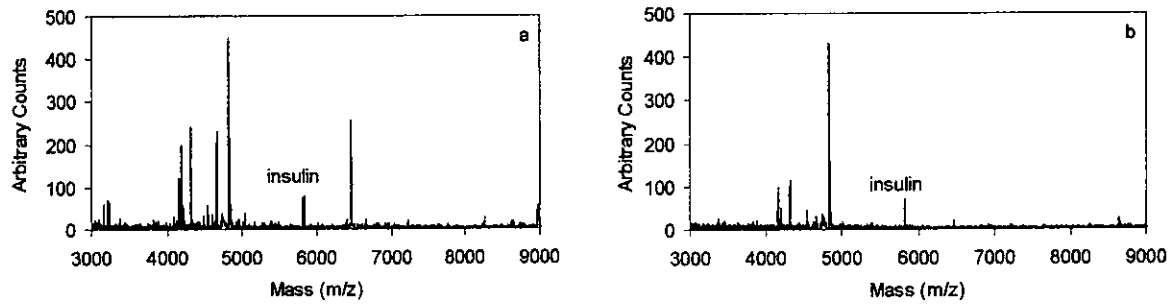


図 3 3. インスリン添加ヒト血清を抗マウス IgG 抗体結合アガロースとインキュベートし、(a) TBS または (b) TBS-T で精製した場合における結合画分のマスペクトル

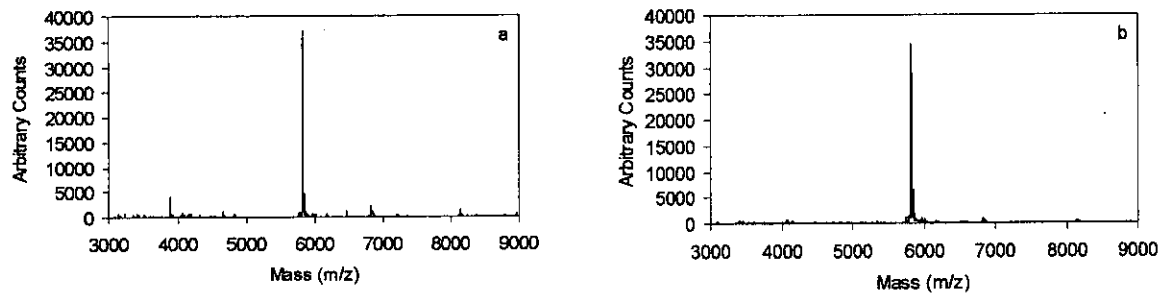


図 3 4. インスリン添加ヒト血清を抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子とインキュベートし、(a) TBS-0.1% BSA または (b) TBS-1% Triton X-100 で精製した場合における結合画分のマスペクトル

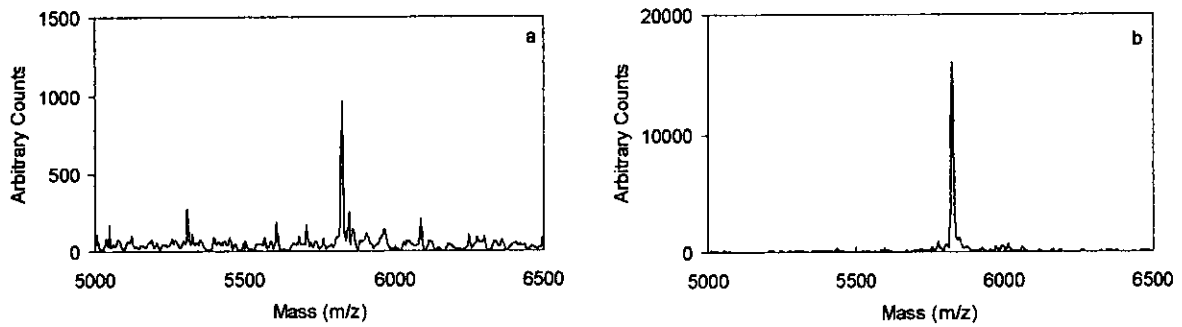


図 3 5 . (a)コントロール CHCA および(b)トランスフェリン添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル

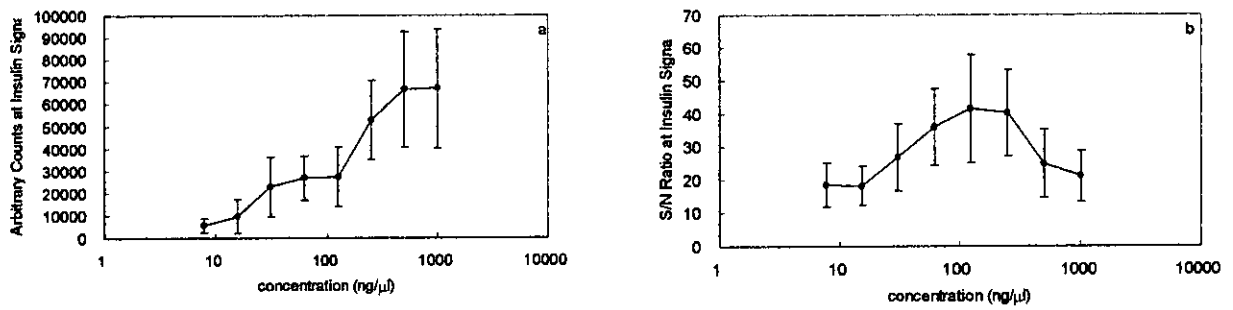


図 3 6 . トランスフェリンを系列希釈して添加した CHCA から得られたインスリンシグナルの(a)強度および(b) S/N 比

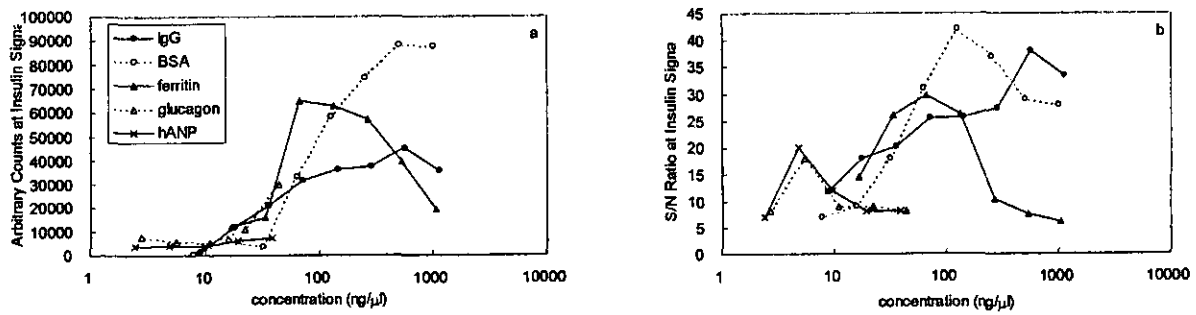


図 37. 各種ペプチド・タンパク質を系列希釈して添加した CHCA から得られたインスリンシグナルの(a)強度および(b) S/N 比

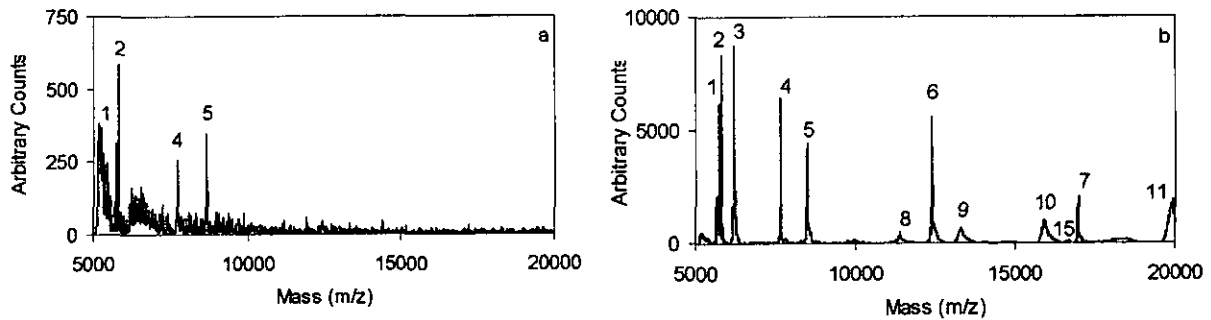


図 38. (a)コントロール CHCA および(b)トランスフェリン添加 CHCA から得られたペプチド・タンパク質混合試料のマススペクトル

Signal No.1, bovine insulin (5,730Da); No.2, [human insulin]⁺ (5,808Da); No.3, [cytochrome C]²⁺; No.4, IGF-I (7,649Da); No.5, [apomyoglobin]²⁺; No.6, [cytochrome C]⁺ (12,362Da); No.7, [apomyoglobin]⁺ (16,952Da); No.8, [Tf]⁷⁺; No.9, [Tf]⁶⁺; No.10, [Tf]⁵⁺; and No.11, [Tf]⁴⁺; and No.15, [BSA]⁴⁺.

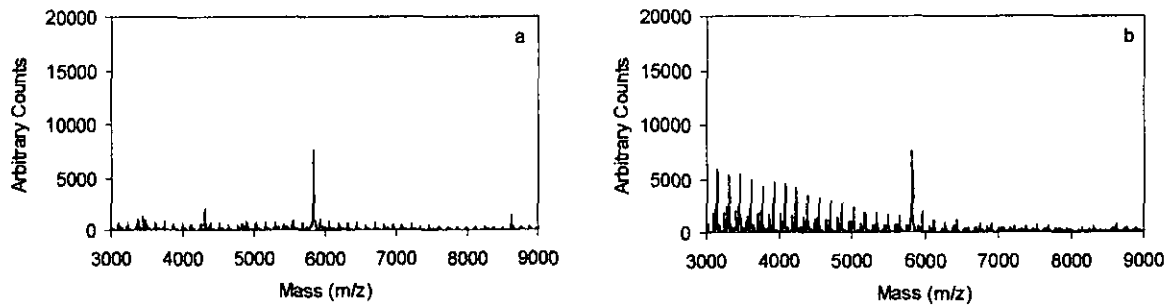


図 3 9 . (a)ポリ-L-リジン(MW 70,000-150,000)添加 CHCA および(b)ポリ-L-アルギニン(MW 70,000-150,000)添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル

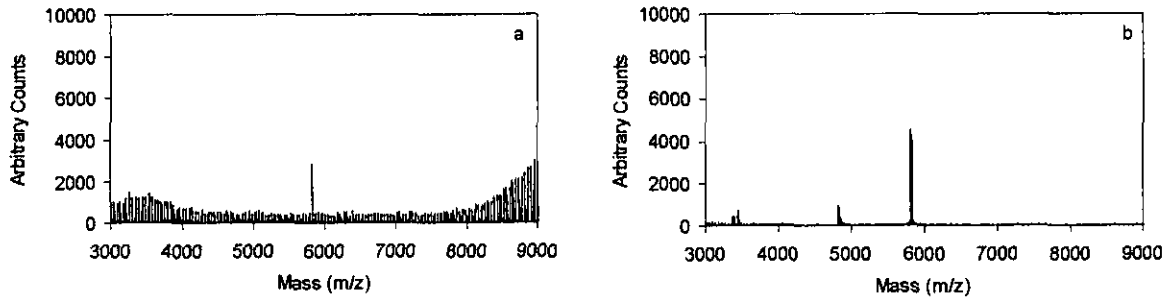


図 4 0 . (a) PEG (average MW 8,000)添加 CHCA および(b) PEG (MW 15,000-25,000)添加 CHCA から得られたヒトインスリンのマススペクトル