

ク質消化物をLC/MS/MSで直接解析する方法に基づく細胞タンパク質プロファイル評価, 及び糖鎖を含む特性解析法の開発を目的に, LC/MS/MSによる糖ペプチド解析を検討した。また, 前年度開発したCapGCC-LC/MSを用いた糖鎖プロファイル評価をゲル内糖タンパク質の糖鎖解析だけでなく, 細胞組織由来タンパク質のNグリカナーゼ消化物に直接応用することによって, 糖鎖プロファイリング法の実行可能性を評価した。

糖タンパク質のモデルとして代表的血清糖タンパク質である α フェトプロテイン, セルロプラスミン, 及び糖タンパク質混合物であるヒト血清を選んだ。 α フェトプロテインはN結合糖鎖結合部位が1箇所存在し(Fig. 1), 肝臓癌患者では糖鎖構造が変化することから診断マーカーの一つとして検討されている分子である。また, セルロプラスミンは7つのPotential Glycosylation Siteが存在し(Fig. 2), 複合型糖鎖が結合していることが報告されているが, 結合位置と部位特異的な糖鎖構造に関しては不明である。糖鎖プロファイル評価のためのモデル組織としては, マウス腎臓を選択した。

B. 研究方法

1) 試薬

α -フェトプロテイン (AFP) は Advanced ImmunoChemical 社より, セルロプラスミン (CP) は Calbiochem 社より, ヒト血清は Sigma Aldrich 社より購入した。トリプシンは, Promega 社製の修飾トリプシンを使用した。ギ酸は, 和光純薬社製を用いた。PD-10 カラムは, Amersham Pharmacia 社製を使用した。

2) 血清のアルブミン除去

20 μ l のヒト血清から Millipore 社のアルブミン除去キットを用いて含有アルブミン量を低減させ, 凍結乾燥を行った。

3) 糖タンパク質の還元カルボキシル化

糖タンパク質サンプル (AFP および CP) 200 μ g またはアルブミン低減ヒト血清 (HS-Alb) 20 μ l 分 (血清換算) 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, 540 μ l に溶解した。2-メルカプトエタノール 4 μ l を加え, 40°C で2時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 11.3 mg を試料溶解溶液 90 μ l に溶かし, 試料溶液に加え, 遮光下 40°C 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。

4) 試料のトリプシン消化

還元カルボキシメチル化した糖タンパク質 (RCM-AFP および RCM-CP) およびアルブミン低減ヒト血清 (RCM-HS-Alb) を 50 mM 重炭酸アンモニウム, 200 μ l に溶かした。試料溶液 100 μ l をとり, 1 μ g/ μ l の修飾トリプシン溶液を 1 μ l 加え, 37°C で糖タンパク質サンプルは 12 時間, アルブミン低減ヒト血清は 24 時間消化した。消化後, 測定まで -20°C に保存し酵素反応を停止させた。

5) ペプチド/糖ペプチドマッピング

糖タンパク質のトリプシン消化産物を用いて以下の条件でLC/MS/MSを行った。

試料は, 0.1%ギ酸水溶液で適度に希釈した。インジェクトしたサンプル量はそれぞれ以下の通りである。

AFP	0.2 μ g (タンパク量換算)
CP	0.2 μ g (m/z 400-2000)
	1.0 μ g (m/z 1000-2000)
	(タンパク量換算)
HS-Alb	0.01 μ l (試料血清換算)

HPLC :

装置 : Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 0.2 \times 50)

mm, 5 μ)

溶離液 A : 0.1% ギ酸を含む 2% アセトニトリル
水溶液

溶離液 B : 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル
水溶液

グラジエントプログラム :

B 液 : 5% (0~10 分)

5~65% (10~40 分)

流速 : ポンプ 2 μ l/min, スプリッター

MS

装置 : ハイブリッド型 LC/MS/MS システム
Qstar Puler i (Applied Biosystem 社)

イオン化 : ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

スプレー電圧 : 2,500 V

スキャン範囲 (m/z) :

検出 : Q/TOF-MS

ペプチドマップ : 400-2,000

糖ペプチドマップ : 700-200

または 1000-2,000

MS/MS : 100-2,000

データ依存的に MS/MS 測定を行った。イオンの価数および大きさにより 50-80 eV のコリジョンエネルギーを与えた。

6) マウス腎臓難溶性タンパク質画分の糖鎖の調製 腎臓由来細胞の調整

18 週齢の MRL/Mp- $+/+$ マウスの腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。腎臓は Cell strainer (70 μ m, BD Biosciences, USA) で濾した後、遠心分離 (1000~1200rpm, 5min) により細胞を分画した。得られた画分を 10 倍量の 135 mM NH₄Cl/17mM Tris-HCl (NH₄Cl-Tris 溶液, pH 7.2) 溶液中室温で 3 分間処理して混在する赤血球を破壊した。反応は NH₄Cl-Tris 溶液の 10 倍量の PBS を加えて停止させた後、遠心分離により破壊した赤血球を除去した。さらに沈殿させた細胞は PBS で 3 回洗浄した。

7) 難溶性タンパク質画分の分画

タンパク質の分画にはサンプル分画キット (2-D Fractionation kit, Amersham Biosciences, USA) を使用し、プロトコールに従い腎臓 100mg 相当の細胞から難溶性タンパク質を分画した。

8) 糖鎖の切り出し

脱塩、乾燥させたサンプルに、8M グアニジン塩酸塩, 5mM EDTA を含む 0.5M Tris-HCl (pH8.6) を 1.0ml を加えて溶解した。さらに、2-メルカプトエタノール 7.2 μ l を加えて室温で 2 時間放置した。

モノヨード酢酸ナトリウム 21mg を試料溶解溶液 167 μ l に溶かし、試料溶液に加え、遮光下、室温で 2 時間放置した。反応終了後、PD-10 カラム (Amersham Biosciences, USA) を用いて脱塩し、得られた試料溶液を凍結乾燥した。

凍結乾燥したサンプルに、PNGase F (15 unit) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.2), 500 μ l を加え、37°C で 96 時間反応させた。反応液はエタノール沈殿によってタンパク質を除去した後、上清を濃縮、凍結乾燥した。得られた糖鎖は 0.5 M 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 500 μ l を加え、室温で 16 時間還元した。反応後、10% (v/v) 酢酸を用いて過剰の試薬を分解させ、Envi-Carb (Supelco, Bellefonte, USA) を用いて脱塩した。

9) 糖鎖プロファイリング

HPLC :

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

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 5~20% (0~15 分)

20~70% (15~35 分)

流速：ポンプ 100 μ l/分,
スプリッター 2500/1000

ESI-MS :

装置：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)

測定モード：ネガティブイオンモード

キャピラリー温度：175 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー：2,000 V

ESI 電圧：1,500 V

スキャン範囲：700-2,000

スキャン回数：3 秒

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 $^{\circ}$ C

マルチプライヤー：2,000 V

ESI 電圧：2,000 V

スキャン範囲：100-2,100

スキャン回数：4 秒

Collision Gas : Ar, 2.0mTorr

Collision energy : -25V

倫理面への配慮

本研究では、市販の動物組織及びヒト血清を使用した。

C. 結果

1. LC/MS/MS による糖ペプチド解析

(1) α フェトプロテイン

α フェトプロテインを還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、ペプチド・糖ペプチド断片とした。 α フェトプロテインには推定 N 結合糖鎖結合部位は一箇所しか存在しないので、酵素消化した場合、得られる糖ペプチドは 1 本となる (Fig. 1)。この糖ペプチドを含む全ペプチド混合物を

LC/MS で分析した結果、Fig. 3A に示すトータルイオンクロマトグラム(TIC)が得られた。このペプチドマップに現れているピークを構成する分子イオンは自動的にデータ依存的な MS/MS 測定に付されている (Fig. 3B)。Fig. 3C は MS/MS の TIC の中から、糖鎖の指標となる m/z 204 のフラグメントイオンだけを選択的に取り出したものである。尚、 m/z 204 は、糖鎖の構成単糖である GlcNAc または GalNAc の B イオンに相当する。この操作によって、ペプチドマップ中の糖ペプチドの位置を特定することが可能となった。

Fig. 4 は糖ペプチドと特定された 2 つのピークのうち、ピーク 1 (m/z 1061.8³⁺) の MS/MS スペクトルの一つを示したものである。低分子量側に糖鎖に由来するイオン、[HexNAc]⁺ (m/z 204)、[HexNAcHex]⁺ (m/z 366)に加えて、[HexNAc-H₂O]⁺ (m/z 186)、[HexNAc-2H₂O]⁺ (m/z 168)等のイオンが生成されているのが確認された。また、[NeuAc]⁺ (m/z 292)、[NeuAc-H₂O]⁺ (m/z 274)が認められることからシアル酸が結合していることが推定された。さらに、高分子量側には糖鎖が完全に切れたペプチドに相当するイオン(m/z 978.5)、及びそのペプチドに[HexNAc]が 1 分子または 2 分子結合した分子のイオン、さらに[Hex]が 1 ~ 3 分子分増えたイオンが認められ、N 結合糖鎖のコア部分の配列に関する情報が MS/MS スペクトル上に現れていることがわかった。ペプチドに相当するイオンの m/z 値から、この糖ペプチドは α フェトプロテインのトリプシン消化によって得られることが予想される VNFTEIQK と推定された。さらに、中分子量領域にはペプチドに由来する b 及び y イオンが検出されていることがわかった。Fig. 4 中の表はペプチド VNFTEIQK が開裂したときに得られることが予想されるフラグメントイオンを示したものである。網掛けした部分は Fig. 4 のプロダクトイオンスペクトル内に存在を確認することができたフラグメントイオンであり、VNFTEIQK 配列を有するペプチドであることが確認された。

糖鎖構造は TOFMS で得られた糖ペプチドの分子量(3182.3Da)からペプチドの理論分子量(977.5Da)

を差し引いて得られた分子量(2222.8Da)を基に、シアル酸が結合した2本鎖糖鎖であることが推定された。さらに、このイオンの近傍イオンのTOFMSデータ及びMS/MSスペクトルを解析した結果、 α フェトプロテインに付加している糖鎖をTable 1のように推定することができた。尚、ピーク2は解析の結果、一部切れ残ったFTKVNFTFIQKペプチドに糖鎖が付加したものであることが確認された。

(2) セルロプラスミン

セルロプラスミンには7箇所の推定N結合糖鎖結合部位が存在する(Fig. 2)。 α フェトプロテインと同様にトリプシン消化し、7箇所の推定N結合糖鎖結合部位を有するペプチドを含む全ペプチドをLC/MSで分析した。その結果、TOFMS TIC (Fig. 5A), MS/MS TIC (Fig. 5B), 及び m/z 204 のマスクロマトグラム (Fig. 5C) が得られ、Fig. 5C 上に4つのピークが検出された。

Fig. 6 はピーク1を構成する一つのイオンのMS/MSスペクトルである。 α フェトプロテイン同様に糖鎖に由来するフラグメントが検出され、 m/z 292のイオンが認められることから、シアル酸結合糖鎖であることが確認された。また、ペプチドのフラグメントイオンから、ペプチド129-146と同定され、分子量4096.6Daからペプチド分子量1891.8Daを引いた値から糖鎖はジシアロ2本鎖糖鎖と推定された。同様に他の3つのピークについても解析を行った結果、ピーク2はAsn1202、ピーク3はAsn397、ピーク4はAsn358を含む糖ペプチドと同定され、N結合糖鎖はセルロプラスミンの7つの推定N結合糖鎖結合部位のうち、138、358、397、及び1202位のAsnに結合していることが明らかになった。また、TOFMSで得られた分子量から各部位に結合している糖鎖の構造はTable 2のように推定された。別途行ったLC/MS/MS測定により、残りの3箇所のN結合糖鎖結合部位を含むペプチドが検出されたことから、227、588、929位Asnには糖鎖が結合していないことが明らかになった。

(3) 血清糖タンパク質

LC/MS/MSによって、糖タンパク質の一次構造及び糖鎖構造に関する情報が一度に得られることが明らかになったので、これを血清糖タンパク質の解析に応用した。血清50 μ lから市販のカートリッジを用いてヒト血清アルブミンを50%程度除去し、トリプシンで消化してペプチド・糖ペプチド断片とした。これを直接LC/MS/MSで測定することによって、TOFMS TIC (Fig. 7A), MS/MS TIC (Fig. 7B) が得られることを確認し、これを血清タンパク質のプロファイルとした。つぎに、確実に糖ペプチドの位置を特定するため m/z 204 のマスクロマトグラム (Fig. 7C) に加えて m/z 366 のマスクロマトグラム (Fig. 7D) を描き、共通ピークが認められた時間を糖ペプチドの溶出時間と特定した。一番大きなピークを構成するイオン (m/z 1221.7³⁺) のMS/MSスペクトルをFig. 8に示した。ペプチドに由来するイオンからハプトグロビンに由来する糖ペプチドであることが同定され、糖鎖構造についてもジシアロ2本鎖糖鎖と推定された。

以上のように、発現タンパク質の消化物をLC/MS/MSで解析することによって、LC/TOFMS部分でプロファイル評価を行うと同時にMS/MS部分で特性解析ができることが明らかとなった。

2. LC/MSによる細胞・組織由来糖タンパク質の糖鎖プロファイリング

Fig. 9に示したプロトコールに従ってマウス腎臓由来細胞を複数のフラクションに分画し、還元アルキル化した後、PNGase Fを作用させてN結合糖鎖を切り出した。NaBH₄で還元した後、カーボン系固相抽出カラムを用いて脱塩し、平成14年度本研究において開発したCapGCC-LC/MSによる糖鎖のプロファイリングを行った。その結果、Fig. 10に示すTICが得られ、組織由来糖タンパク質であっても、精製糖タンパク質の場合と同様に糖鎖プロファイルが得られることが確認された。

糖鎖の溶出位置と分子量から、腎臓由来タンパク

質に付加している糖鎖は比較的サイズの小さいものであることが明らかになった。最も結合量の多い糖鎖（ピーク F）は、分子量 2285.6Da からフコースが 3 分子結合した糖鎖[Fuc]₃[Hex]₅[HexNAc]₅ であることが推定された。この糖組成から推定できる糖鎖として Fig. 11 に示すような Lewis X, Lewis a, Lewis Y, 及び Lewis b を部分構造とする糖鎖が挙げられる。そこで、フコースの位置を MS/MS 分析により調べたところ、Fig. 11 のようなプロダクトイオンスペクトルが得られた。m/z 349.4, 511.5 のイオンが検出され、[Fuc][Gal]に相当するイオンは検出されなかったことから、ピーク F は非還元末端側の GlcNAc にフコースが結合した Lewis X または Lewis a タイプの糖鎖であると推定された。

同様に各ピークの MS スペクトルを解析した結果、腎臓由来糖タンパク質の糖鎖構造として、Table 3 及び Fig. 12 に示す構造が推定された。今回の分析により、腎臓に発現しているタンパク質にはシアル酸が結合していない中性糖鎖が多いこと、また、複合型糖鎖には複数のフコースが結合していることが明らかになった。

今回、糖鎖プロファイル作成に要したサンプル量はマウス腎臓わずか 0.2 個分で、操作に要した日数は一週間程度であった。本分析法は、細胞・組織利用医薬品の糖鎖プロファイル評価法として、充分応用可能であると思われる。

D. 考察

細胞・組織由来タンパク質の約 50%は糖鎖付加を受けているといわれている。糖鎖は細胞表面に多く存在し、細胞接着や認識等の細胞間相互作用に係わっている他、タンパク質の機能を様々な形で調節していることが知られている。また、糖鎖は組織間で異なっていること、発生・加齢や癌等の疾患に関連して変化することが明らかにされていることから、細胞組織利用医薬品において、タンパク質プロファイル評価はもちろん、糖鎖プロファイル評価、並びに糖鎖部分を含む目的タンパク質の特性解析は重要である。

糖タンパク質特性解析法として、各種 HPLC や電気泳動法などが利用されているが、我々はこれまで、MS、特に、LC/MS に着目し、LC/MS を用いた糖タンパク質特性解析法の開発を行ってきた。独自の糖ペプチドプロファイリング法や CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質の構造解析に応用してきた。本年度は、これらの方法をプロテオーム・グライコプロテオーム解析法として発展させることによって、細胞組織利用医薬品の特性・品質解析につなげることを目指した。

現在国内外で、細胞発現タンパク質のトリプシン消化物を多次元 LC/MS/MS で直接分析し、データベース検索を行うことによって、細胞内タンパク質の発現解析を行う大規模プロテオームプロジェクトが進行している。多次元 LC/MS/MS を用いる方法は、操作が煩雑で回収率の悪い 2D-GE に比較して簡便、且つ効果的にタンパク質発現解析ができる点で優れている。しかし、糖タンパク質の場合、糖ペプチドの MS/MS 分析では糖鎖部分が先に開裂するため、一次構造に関する情報が得られにくいことや、糖鎖解析に対応した検索ソフトが確立されていないなどの理由により、ほぼ手つかずの状態で取り残されているのが現状である。

そこで、はじめに我々は LC/MS/MS を用いた糖ペプチド解析を検討した。糖タンパク質のトリプシン消化物の LC/MS/MS における第一の課題は、ペプチド混合物の中からいかに糖ペプチドを特定するか、である。現在、インソースフラグメンテーションやプリカーサーイオンスキャンにより糖鎖に特徴的な分子イオン (m/z 204, 366 など) を確認することで糖ペプチド由来のイオンを判別する方法が用いられているが、それだけで正確な部位特異的な糖鎖構造解析を行うのは難しい。今回我々は、MS/MS スペクトルを解析することで糖ペプチド由来イオンをより正確に選択することに成功した。

糖ペプチドの LC/MS/MS 分析のもう一つの課題は、CID において優先的に糖鎖部分が単糖や二糖にまで壊されてしまい、タンパク質一次構造や糖鎖配列に

関する情報が乏しいため、タンパク質同定や糖鎖構造解析に利用することが難しいといわれていることである。しかし我々は、 α フェトプロテインを用いた MS/MS 分析により、今回用いたコリジョンエネルギーの条件で部分的ではあるが糖鎖の配列が確認できること、また、ペプチドの一次構造情報が得られていることを確認した。実際、LC/MS/MS を用いて、分子量 130K と比較的大きいセルロプラスミンの 4 本の糖ペプチドを特定することができたし、血清のトリプシン消化物のプロダクトイオンスペクトルを詳細に読みとることによって、ペプチドの同定と結合糖鎖の構造を明らかにすることができた。今後、今回用いたシステムよりもスキャン速度が速く、高分解能 MS が測定可能な機器を利用することによって、細胞組織発現糖タンパク質のプロファイル評価、及び目的タンパク質の特性解析につなげていきたいと考えている。

つぎに、CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングをグリコーム解析に応用することを検討した。マウス腎臓から切り出した糖鎖を LC/MS で分析することによって、実行可能なサンプル量で、腎臓に特徴的な糖鎖プロファイルを得ることができた。腎臓発現糖タンパク質糖鎖の構造に関しては、最近、Lewis X 型糖鎖が多いという報告が出されているが、今回、LC/MS 及び LC/MS/MS で解析した結果も、これを指示するものであった。

我々は腎臓の糖鎖プロファイリングとは別に、CHO 細胞膜画分の糖鎖プロファイリングを行っているが、CHO 細胞の糖鎖分布はマウス腎臓とは全く異なるものであった。近年、糖鎖はタンパク質ではなく組織特異的に付加されることによって、組織を特徴づけているのではないかという考え方が提唱されていること、また、糖鎖部分は培養条件の変更の影響を最も受けやすい部分であることから、糖鎖差異を簡単に識別できる CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法は細胞組織利用医薬品の品質を糖鎖の面から評価するのに優れた方法であると思われる。

E. 結論

- 1) 細胞タンパク質のトリプシン消化物を LC/MS/MS で分析することによるタンパク質プロファイル評価と糖鎖修飾を含むタンパク質の特性解析法の開発を行い、 α フェトプロテイン、セルロプラスミンの一次構造、糖鎖結合部位、及び部位特異的糖鎖構造解析と、ヒト血清タンパク質のプロファイリング、及び血清中ハプトグロビンの糖鎖解析に成功した。
- 2) 前年度開発した CapGCC-LC/MS を用いた糖鎖プロファイリング法の細胞組織利用医薬品の糖鎖プロファイル評価法としての実行可能性を探るため、マウス腎臓から N-グリカナーゼで切り出した糖鎖のプロファイリングを行い、腎臓に特徴的な糖鎖プロファイルが得られることを確認した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/ mass spectrometry, J. Electrophoresis, 48, (2004) 印刷中
- 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, 251, HPLC of Peptides and Proteins, Edited by M. I. Aguilar, 263-274 (2003)
- 3) Masashi HYUGA, Sumiko Hyuga, Nana

- KAWASAKI, Miyako Ohta, Satuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* (投稿中)
- 4) Masashi HYUGA, Satuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako Ohta, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, (2004) (投稿中)
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖のプロファイリングと構造解析. 第 53 回電気泳動学会シンポジウム (2003 年, 大阪)
- 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 蜂須賀暁子, 橋井則貴, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動及び LC/MS を用いたグライコーム解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第一回夏期シンポジウム (2003 年, 浜松)
- 3) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 横浜バイオテクノロジー懇談会平成 15 年度第 1 回リカレント講座「マスマスプロトメトリーとプロテオミクスー蛋白質研究の最前線」(2003 年, 横浜)
- 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Jin Yuan, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akiko Ishii, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative oligosaccharide analyses by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 5) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Mawanishi, Takao Hayakawa: Oligosaccharide profiling of cell membrane by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 6) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Analysis of IgLON family protein in rat brain by gel electrophoresis and capillary LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 7) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Jun-ichi Sawada: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragments. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 8) Akiko Ishii-Watabe, Edwin Chang, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, John Cooke: Transcriptional profiling in nicotine-treated human microvascular endothelial cells. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
- 9) 川崎ナナ: 糖鎖関連医薬品の現状と課題. 第 3 回糖鎖科学名古屋拠点研究会(2004 年, 名古屋)
- 10) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の質量分析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
- 11) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫: 糖鎖プロファイリングを用いた差異解析に基づくグライコーム解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
- 12) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動と LC/MS を用いたラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
- 13) 原園 景, 川崎ナナ, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MS による apolipoprotein B100 の部位特異的糖鎖構造解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)

mkwvesifli	fllnftesrt	lhrneygias	ildsyqetae	isladlatif
faqfvqeaty	kevskmvkda	ltaiekptgd	eqssgclenq	lpafleelch
ekeilekygh	sdccsqseeg	rhncflahkk	ptpasiplfq	vpepvtscea
yeedretfmn	kfiyeiarrh	pflyaptill	waarydkiip	scckaenave
cfqtkaatvt	kelresslln	qhacavmknf	gtrtfqaitv	tklsqkftkv
nfteiqklvl	dvahvhehcc	rgdvldclqd	gekimsyics	qqdtlsnkit
eccklttler	gqcihaend	ekpeglspln	nrflgdrdfn	qfssgeknif
lasfvheysr	rhpqlavsvi	lrvakgyqel	lekcfqtenp	lecqdkgeee
lqkyiqesqa	lakrscglfq	klgeyyllqna	flvaytkkap	qltsselmai
trkmaataat	ccqlsedkll	acgegaadii	ighlclirhem	tpvnpgvgqc
ctssyanrrp	cfsslvvdet	yvppafsddk	fifhkdleqa	qgvalqtmkq
eflinlvkqk	pqiteeqlea	viadfsglle	kccqgqegev	cfaeegqli
sktraalgv				

Fig. 1 Amino acid sequence and N-glycosylation sites of alpha-Fetoprotein
n: N-glycosylation site

mkililgfl	flcstpawak	ekhyyigiie	ttwdyasdhg	ekklisvdte
hsniylqngp	drigrlykka	lylqytdetf	rttiekpowl	gflgpiikae
tgdkvyvhlk	nlasrpytfh	shgityykeh	egaiypdntt	dfqraddkvy
pgeqytmll	ateeqspgeg	dgncvtriyh	shidapkdia	sgligpliic
kkdsldkeke	khidrefvvm	fsvvdenfsw	yledniktyc	sepekvdkdn
edfquesrmy	svngytfgsi	pglsmcaedr	vkwyifgmgn	evdvhaaffh
gqaltnknyr	idtinlfpaf	lfdaymvaqn	pgewmlscqn	lnhlkaglqa
ffqvqecnks	sskdnirgkh	vrhyyiaaee	iiwnyapsgi	diftkenlta
pgsdsavffe	qgttriggisy	kklyreytd	asftnrkerg	peeehlgiig
pviwaevgdt	irvtfhnkga	yplsiepigv	rfnknnegty	yspnynpqsr
svppsashva	ptetftyewt	vpkevgptna	dpvclakmyy	savdptkdif
tgligpmkic	kkgsllhangr	qkdvdkefyl	fptvdenies	lllednirmf
ttapdqvdke	dedfquesnkm	hsmngfmygn	qpgltmckgd	svvwyfhsag
neadvhgiyf	sgntylwrge	rrdtanlfpq	tsltlhmwpd	tegtfnvecl
ttdhytggmk	qkytvnqerr	qsedstfylg	ertyyiaave	vewdyspqre
wekelhlhlqe	qnvsnafldk	gefyigskyk	kvvyrqytds	tfrvpverka
eeehlgiigp	qlhadvgdkv	kiifknmatr	pysihahgvq	tesstvtptl
pgetltyvwk	ipersgagte	dsacipwayy	stvdqvkdy	sgligplivc
rrpylkvfnp	rrklefallf	lvdenieswy	lddniktysd	hpekvnkdde
efiesnkmha	ingrmfgnlq	gltmhvgdev	nwyilmgmne	idlhtvhfhg
hsfqykhrgv	yssdvfdifp	gtyqtlemfp	rtpgiwllhc	hvtldhihagm
ettytvlqne	dtksg			

Fig. 2 Amino acid sequence and N-glycosylation sites of ceruloplasmin (CP)

\square : Potential N-glycosylation sites

\square : N-glycosylation sites

(A) TIC for the full scan m/z 700-2000

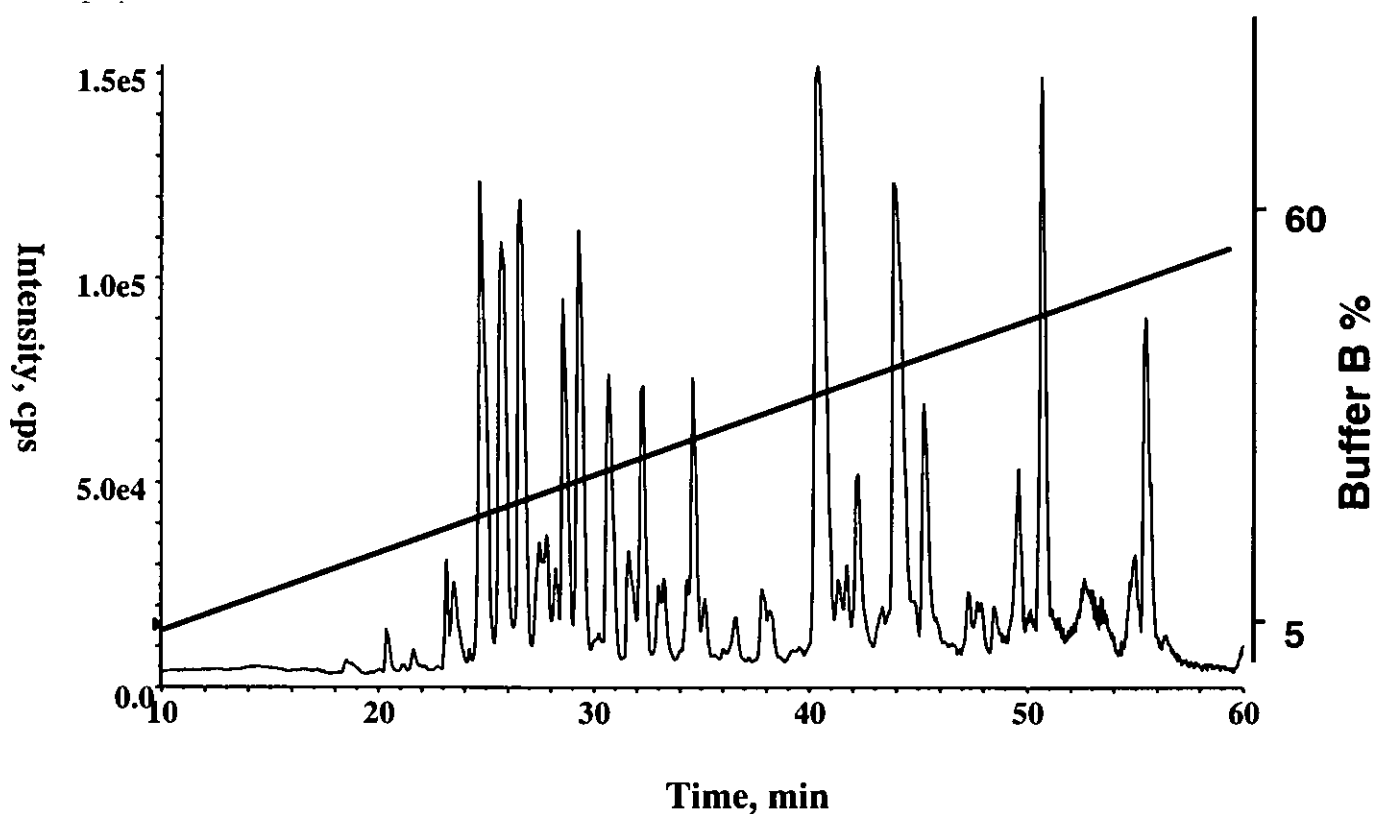


Fig. 3 LC-MS/MS of tryptic digest of α -fetoprotein

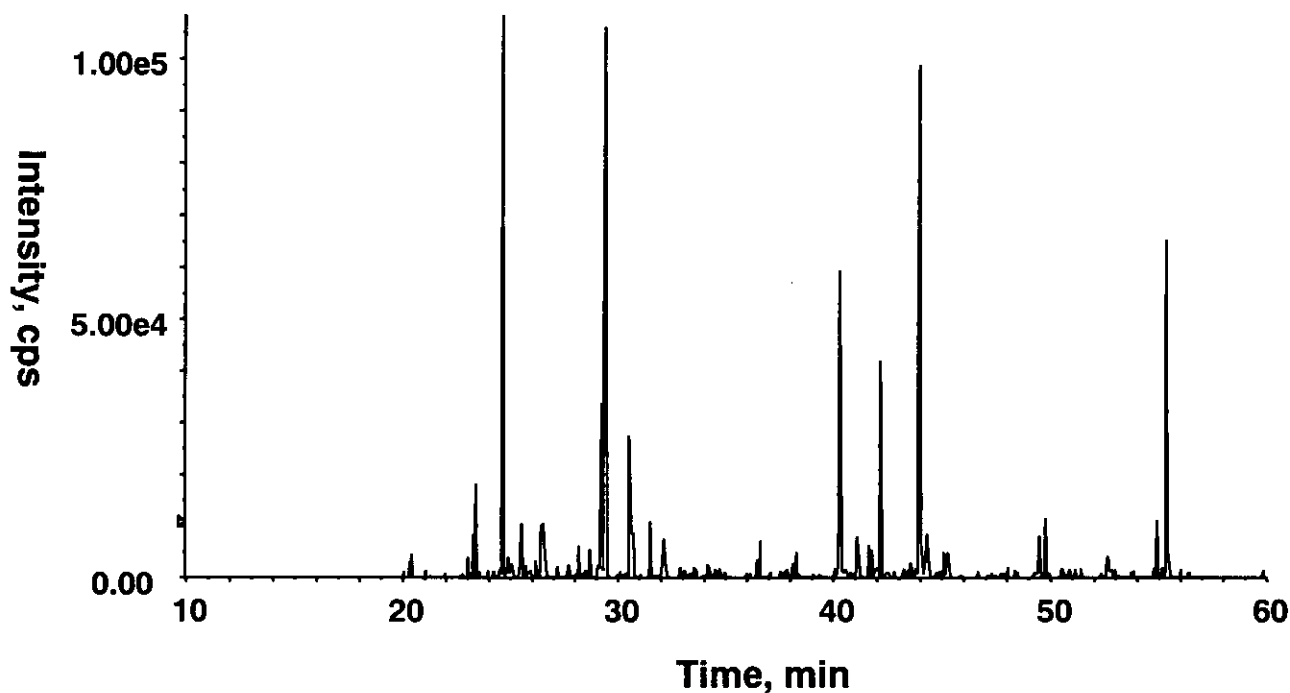
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

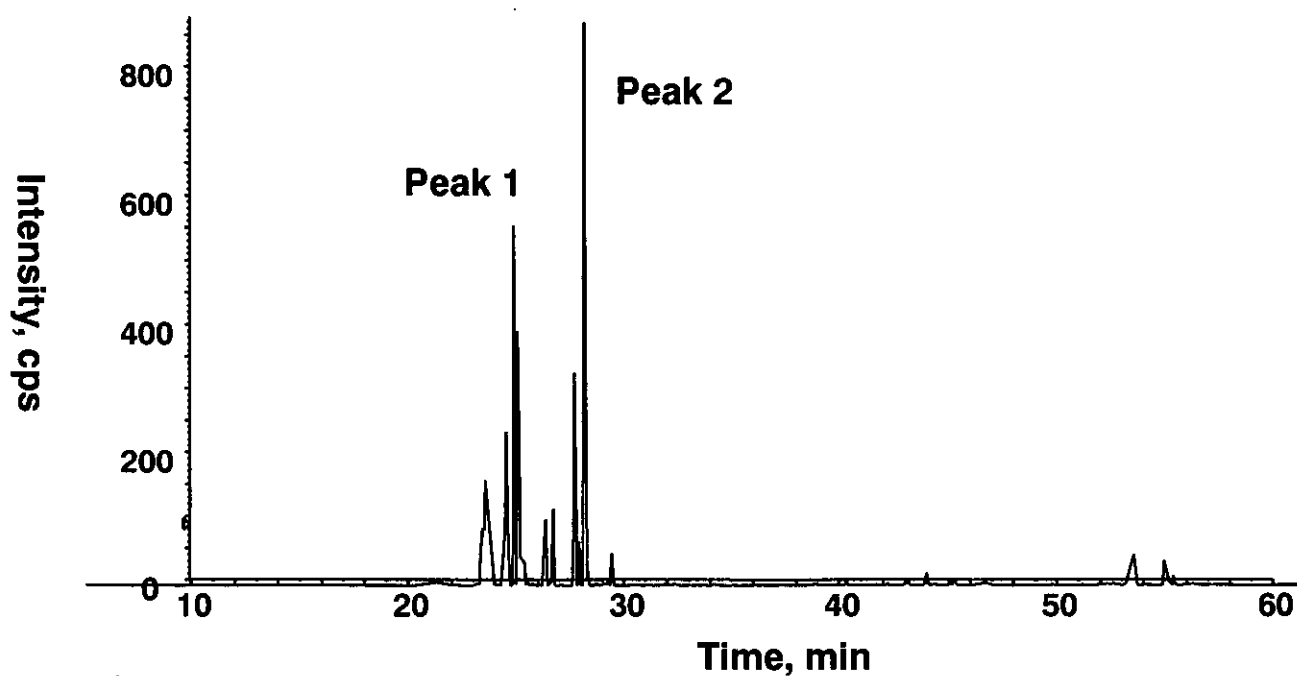
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

(B) TIC for the product ion scan at m/z 100 - 2000



(C) Product ion scan at m/z 204



Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
V	99.07	100.08	83.05	978.53	961.50
N	114.04	214.12	197.09	879.46	862.43
F	147.07	361.19	344.16	765.41	748.39
T	101.05	462.23	445.21	618.35	601.32
E	129.04	591.28	574.25	517.30	500.27
I	113.08	704.36	687.33	388.26	371.23
Q	128.06	832.42	815.39	275.17	258.14
K	128.10	960.51	943.49	147.11	130.09

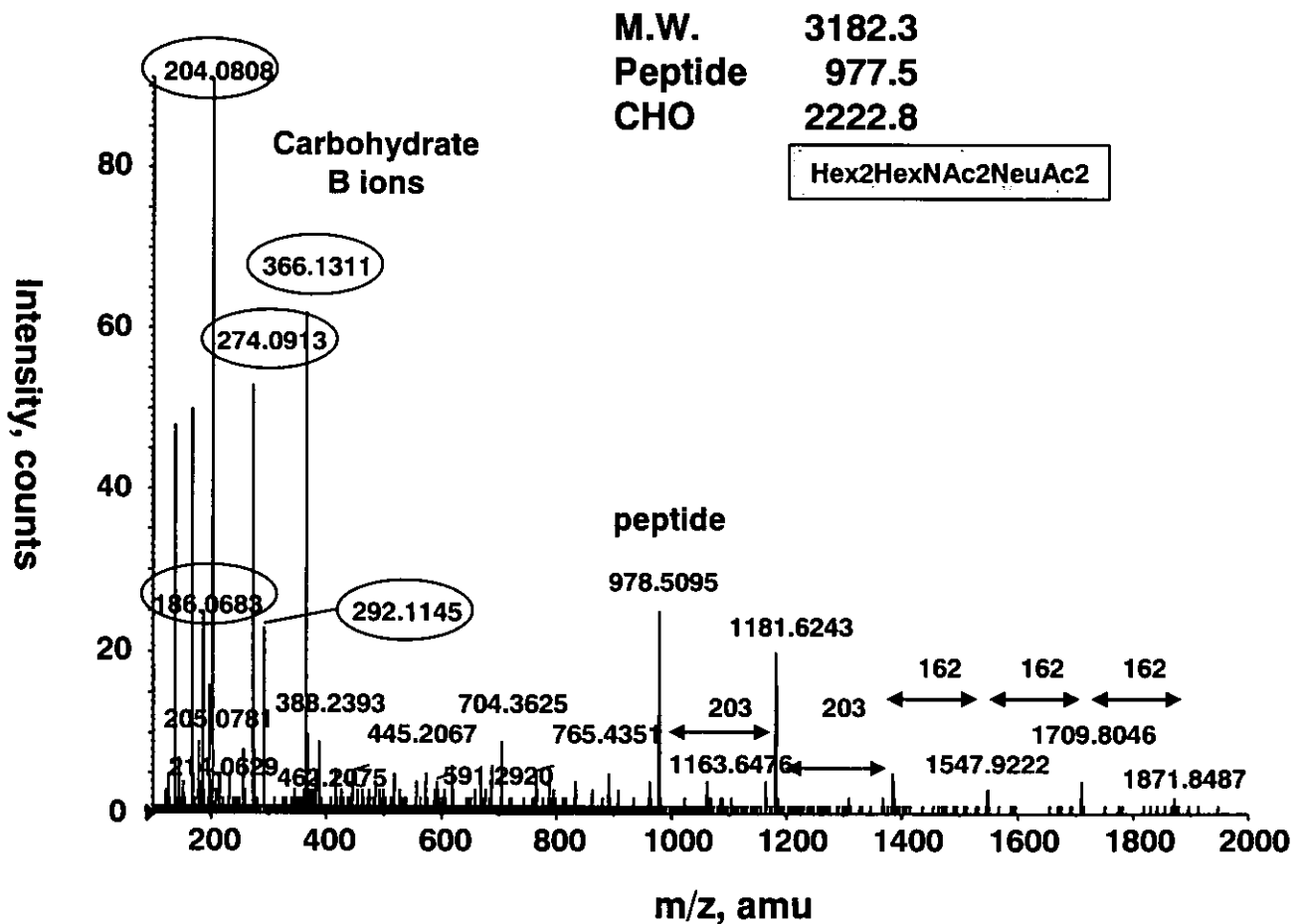


Fig. 4 Product ion spectrum of $M^+(m/z1061.8^{3+})$ at 25 min

Table 1 Glycosylation analysis of alpha-fetoprotein

Retention time (min)	m/z	Charge	M.W.	Peptide Sequences	M.W.	Oligosaccharide Structures	M.W.
23	1013.43	+3	3037.3	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1519.67	+2	3037.3	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1081.29	+3	3240.9	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1621.44	+2	3240.9	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1446.62	+2	2891.2	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.8
23	1118.67	+2	2235.3	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4	1275.9
23	1264.05	2	2526.1	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
	1110.48	3	2526.1	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
24	1665.44	+2	3328.9	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
24	1178.33	+3	3532.0	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.5
24	1061.78	3	3182.3	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
25	1592.17	2	3182.3	K/vnftfeiqk/I	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
27	1236.04	+3	3705.1	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1853.29	+2	3704.6	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1187.17	+3	3558.5	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1780.23	+2	3558.5	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1303.56	+3	3907.7	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.0
28	1138.84	+3	3413.5	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
28	1206.52	+3	3616.6	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2280.9
28	1090.14	+3	3267.4	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.7
28	1322.75	+3	3965.3	K/fttkvnftfeiqk/I	1353.7	[HexNAc]6[Hex]5[Neu5Ac]2	2629.6

(A) TIC for the full scan m/z 1000-2000

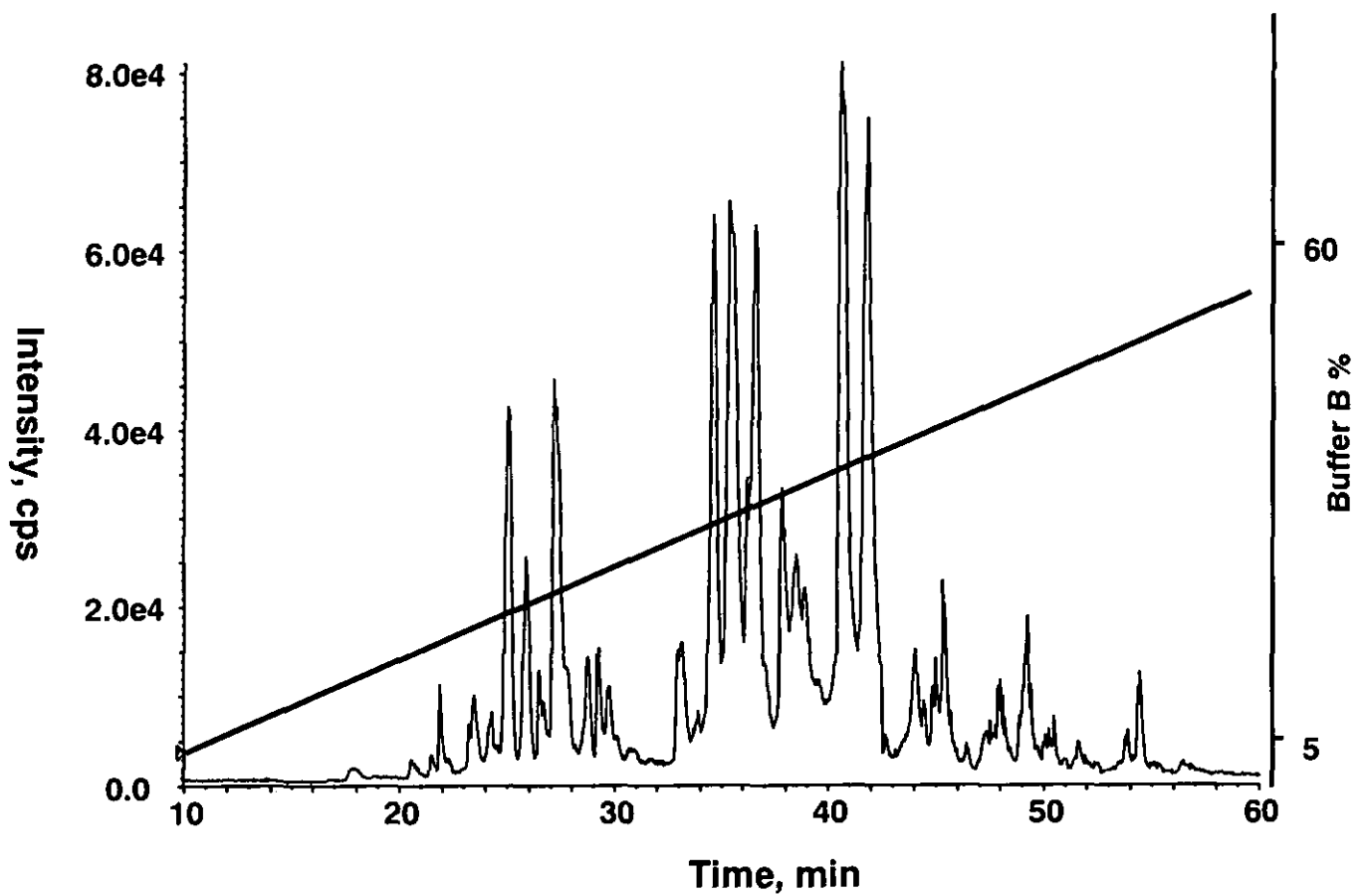


Fig. 5 LC-MS/MS of tryptic digest of ceruloplasmin

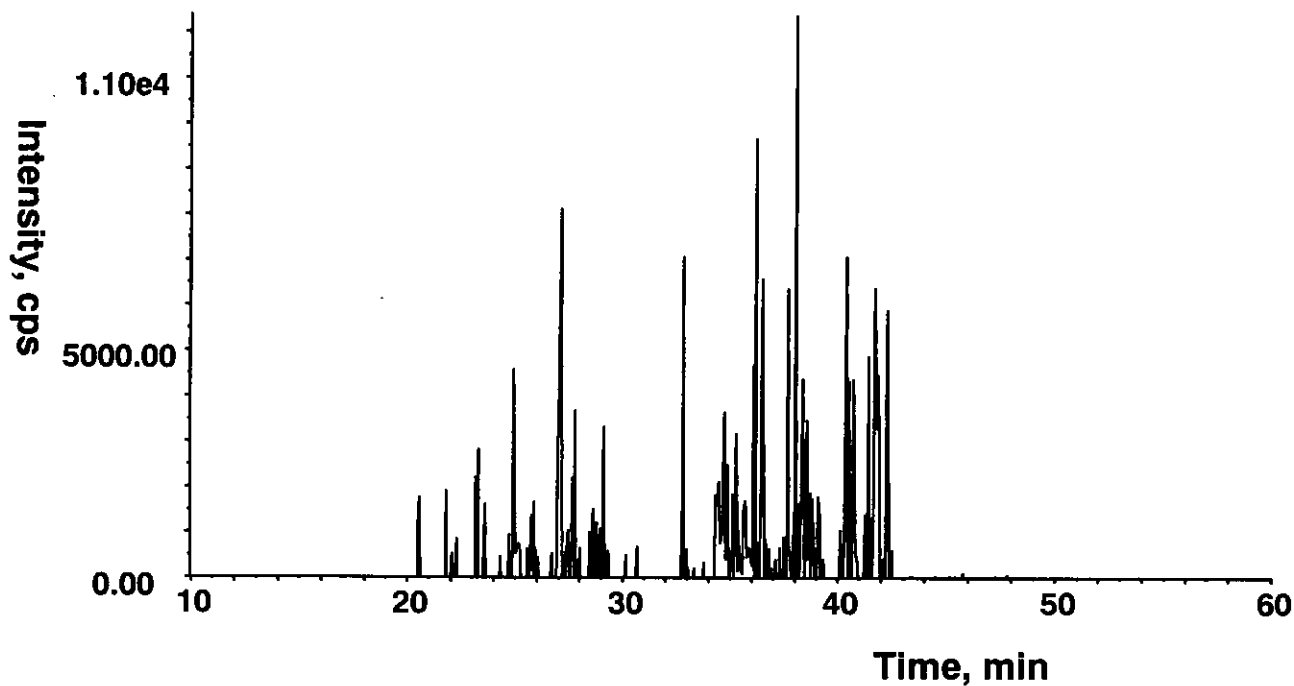
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

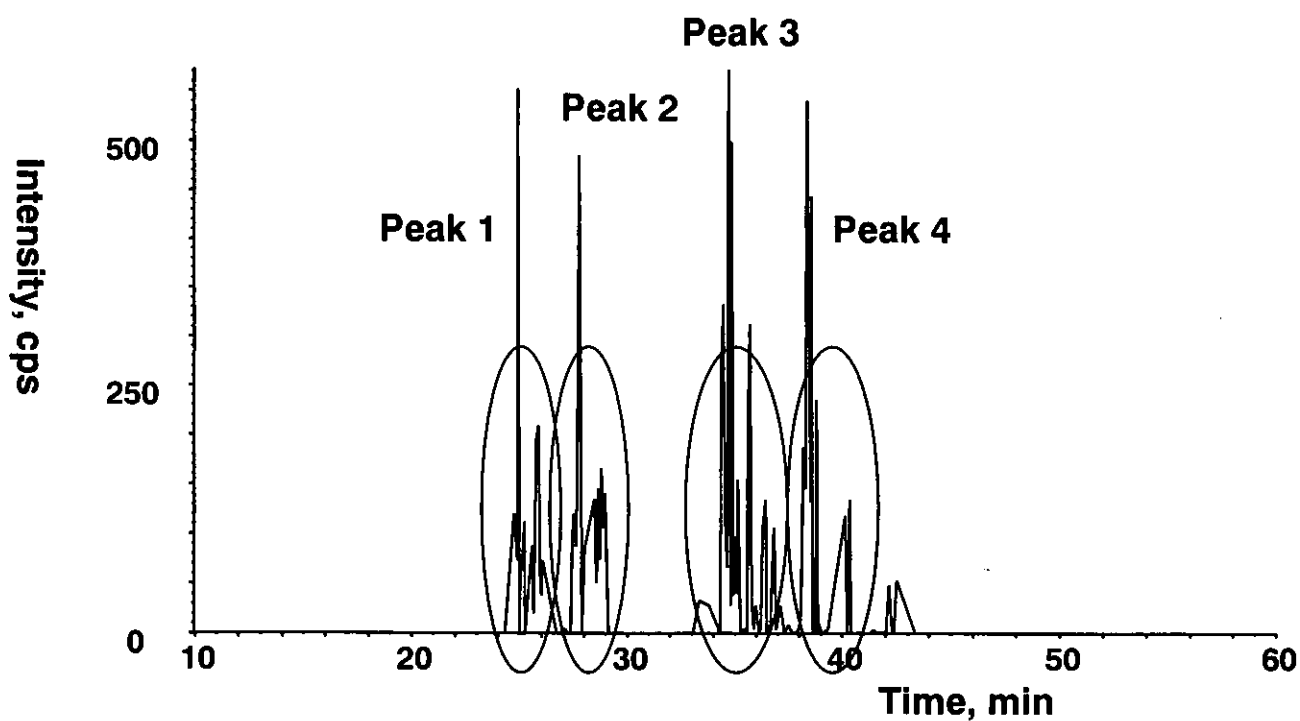
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

(B) TIC for the product ion scan at m/z 100 - 2000



(C) Product ion scan at m/z 204



M.W. 4096.6
Peptide 1891.8
CHO 2222.8

Hex₂HexNAc₂NeuAc₂

Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
E	129.04	130.05	113.02	1892.84	1875.81
H	137.06	267.11	250.08	1763.80	1746.77
E	129.04	396.15	379.12	1626.74	1609.71
G	57.02	453.17	436.15	1497.70	1480.67
A	71.04	524.21	507.18	1440.68	1423.65
I	113.08	637.29	620.27	1369.64	1352.61
Y	163.06	800.36	783.33	1256.55	1239.53
P	97.05	897.41	880.38	1093.49	1076.46
D	115.03	1012.44	995.41	996.44	979.41
N	114.04	1126.48	1109.45	881.41	864.38
T	101.05	1227.53	1210.50	767.37	750.34
T	101.05	1328.58	1311.55	666.32	649.29
D	115.03	1443.60	1426.58	565.27	548.25
F	147.07	1590.67	1573.64	450.25	433.22
Q	128.06	1718.73	1701.70	303.18	286.15
R	156.10	1874.83	1857.80	175.12	158.09

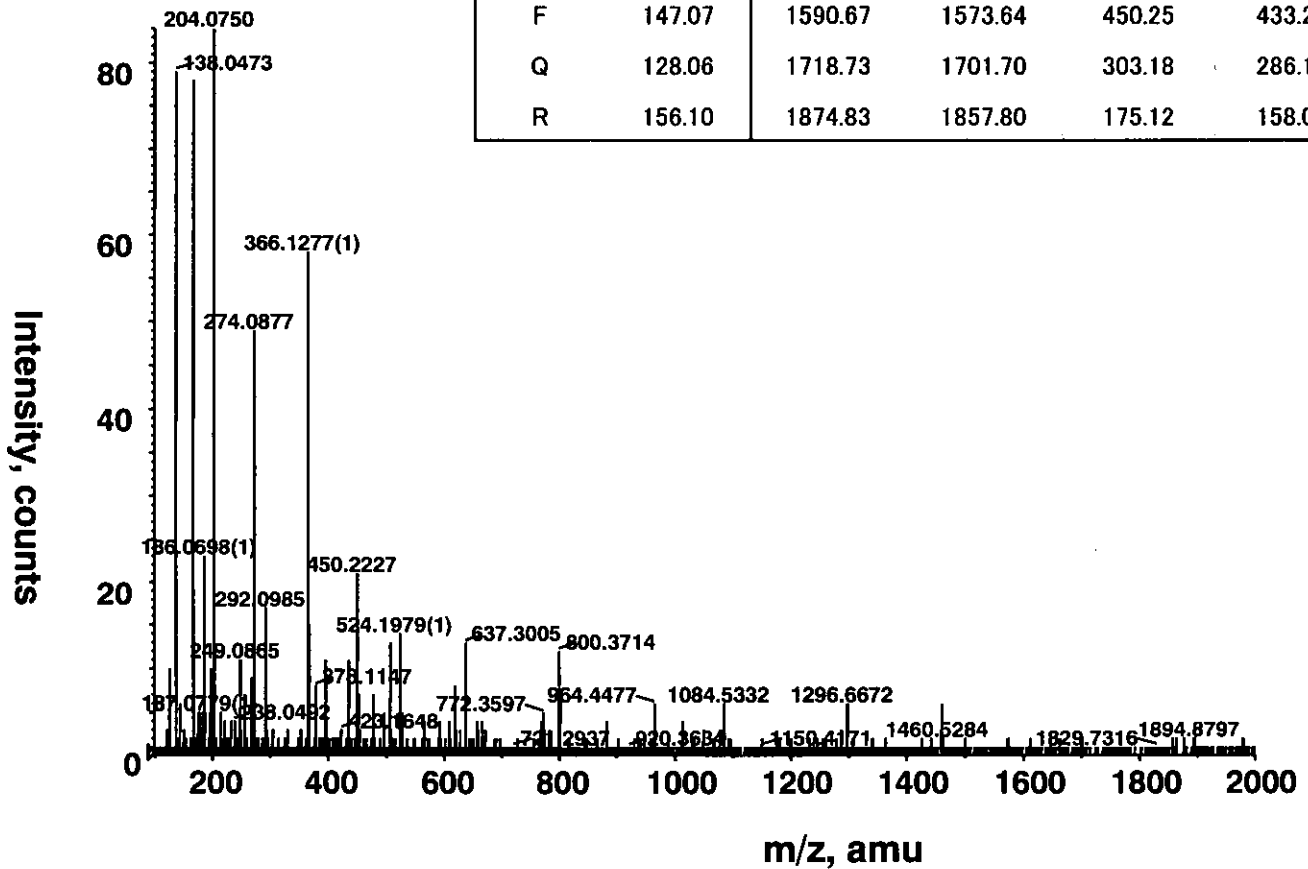


Fig. 6 Product ion spectrum of M⁺(m/z1366.6³⁺) at 25 min

Table 2 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	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
24	1366.54	+3	4096.6	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.9
24	1061.67	+4	4242.7	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
25	1415.23	+3	4242.7	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1262.24	+4	5045.0	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1682.65	+3	5045.0	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1189.21	+4	4752.8	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1585.27	+3	4752.8	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1225.72	+4	4898.9	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1633.96	+3	4898.9	EHEGAIYPDNTTDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
27	1093.95	+4	4371.8	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1458.27	+3	4371.8	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
27	1057.43	+4	4225.7	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1409.57	+3	5028.0	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1257.99	+4	5028.0	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1677.01	+3	5028.0	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1221.48	+4	4881.9	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1628.30	+3	4881.9	ELHHLQEQNVSN AFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
33	1347.54	+3	4039.6	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.6
34	1450.24	+3	4347.7	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+NH3	2239.7
34	1083.68	+4	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1444.56	+3	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1493.28	+3	4476.8	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
34	1089.17	+4	4352.7	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
35	1668.97	+3	5003.9	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3+NH3	2895.9
35	1663.29	+3	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
35	1247.72	+4	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEEQGTTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
37	1282.48	+3	3844.4	AGLQAFFEQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
37	1923.24	+2	3844.5	AGLQAFFEQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
38	1331.17	+3	3990.5	AGLQAFFEQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
38	1289.81	+3	3866.4	AGLQAFFEQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7

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

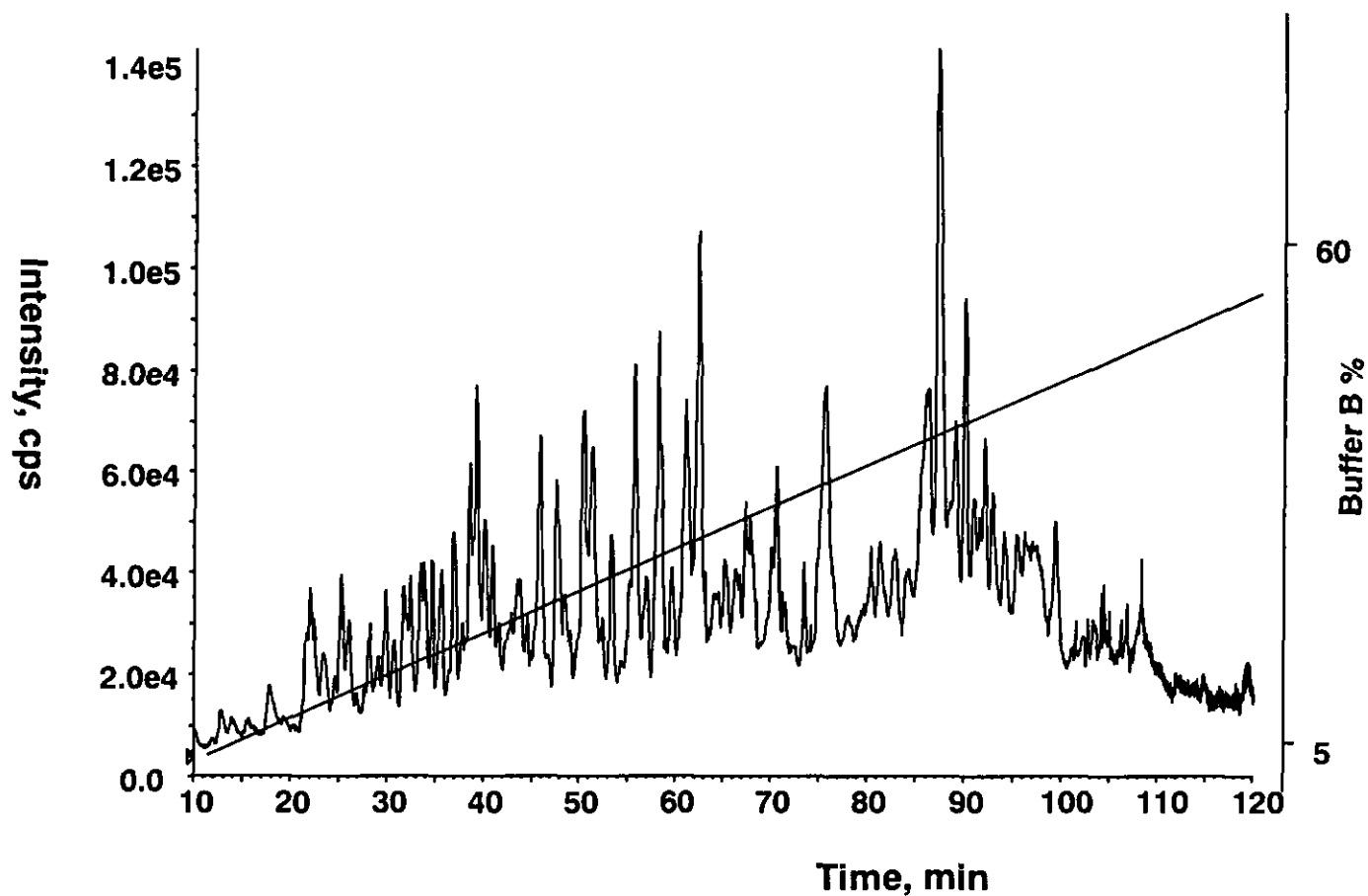


Fig. 7 LC-MS/MS of tryptic digest of human serum

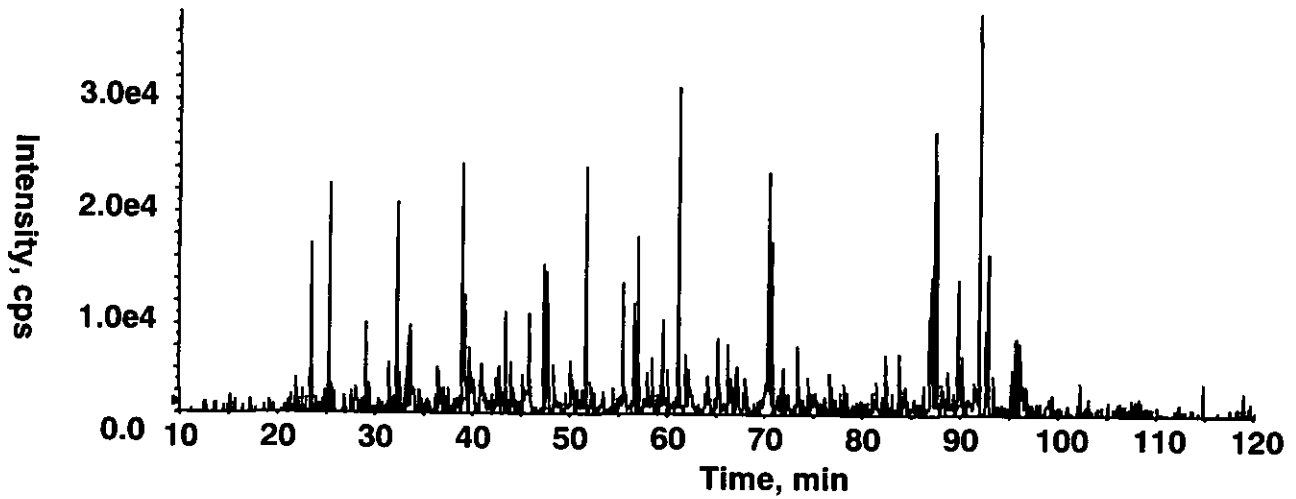
Column Magic C18

3 μ , 0.2*50 mm, 2 μ l/min

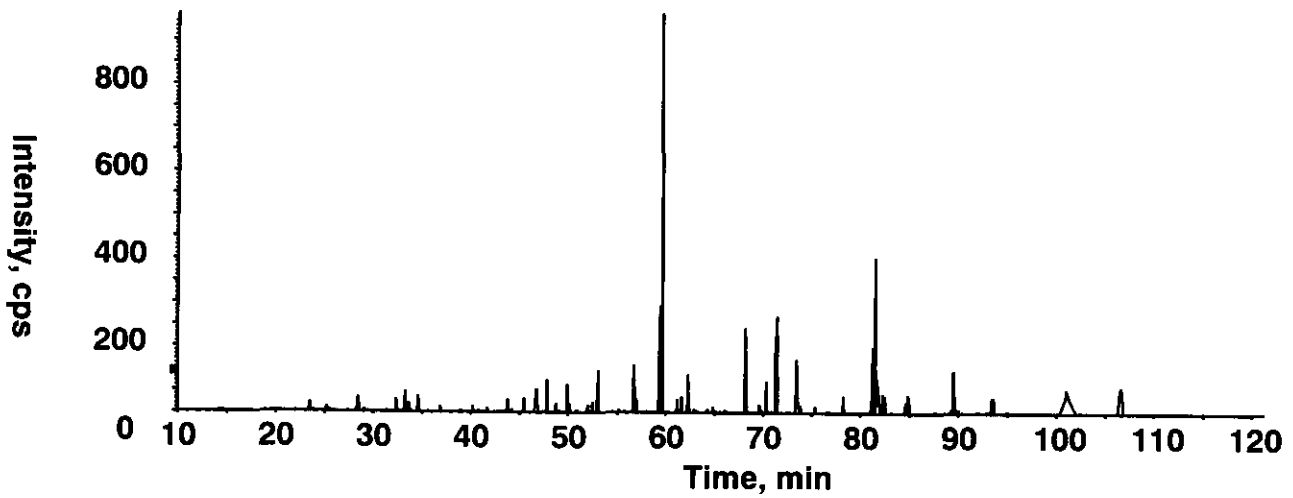
A: 2 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

B: 90 % CH_3CN + 0.1 % formic acid

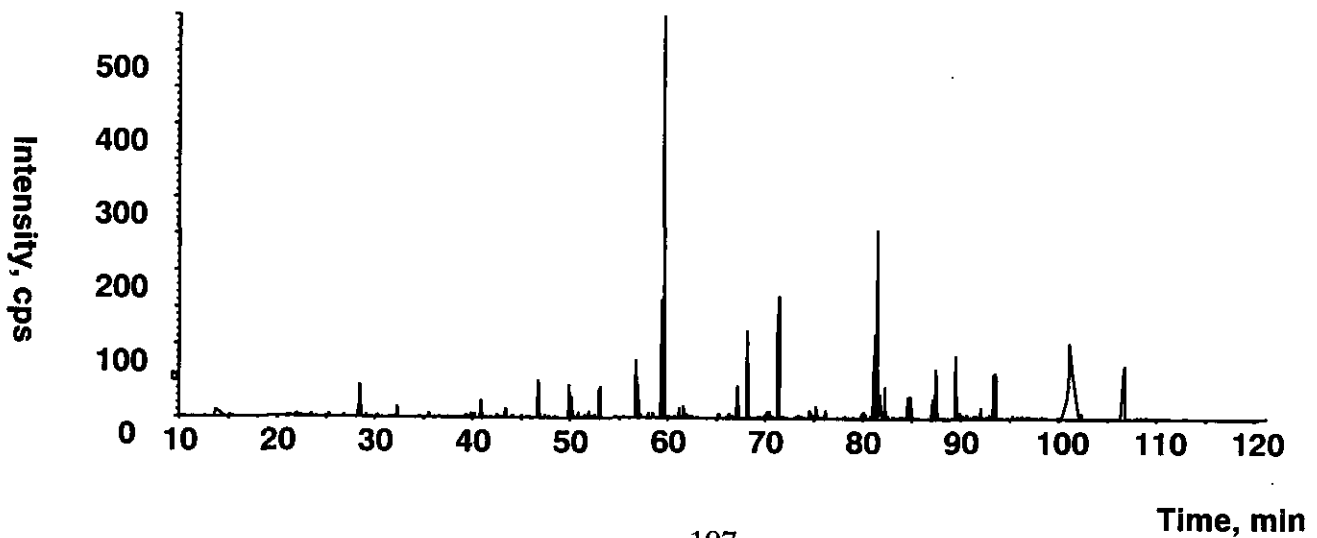
(B) Product ion scan at m/z 100-2000



(C) Product ion scan at m/z 204



(D) Product ion scan at m/z 366



Residue	Mass	b	b-NH3	y	y-NH3
M	131.0	132.0	115.0	2879.4	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

M.W. 4882.8
Peptide 2678.4
CHO 2222.8

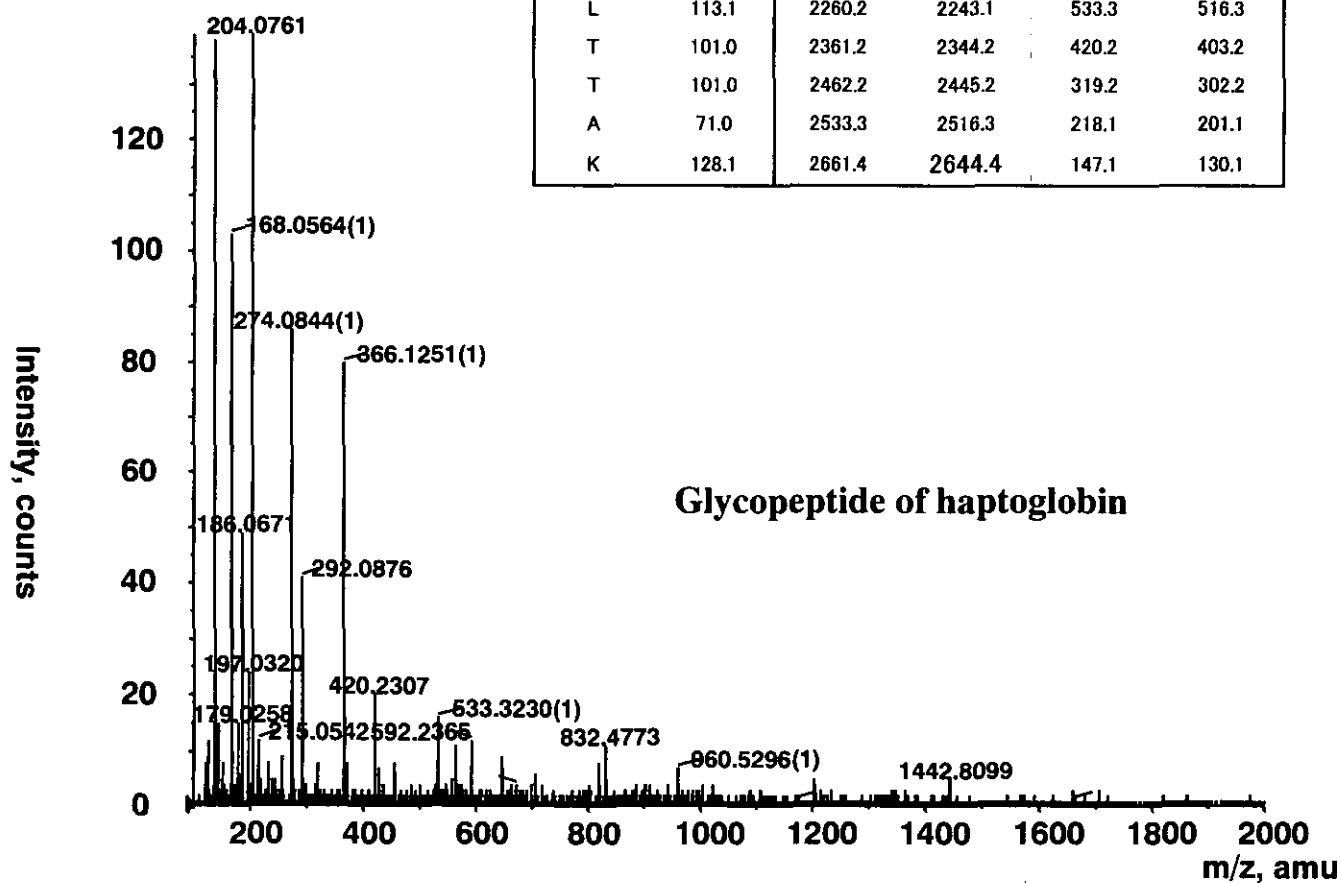


Fig. 8 Product ion spectrum of M⁺(m/z1221.7³⁺) at 26 min