

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）

協力研究者 伊藤さつき（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

研究要旨 我々は、細胞組織タンパク質プロファイル評価、及び目的タンパク質の特性解析を基本とした細胞治療用医薬品の品質評価法を確立するため、2次元電気泳動によるタンパク質プロファイリング、及びそのゲルから回収した目的タンパク質の LC/MS による特性解析を検討してきた。本年度は、目的糖タンパク質をゲルから抽出した後に酵素消化する方法、及びイオントラップ型質量分析法を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を用いることによって、これまで解析が困難であったゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析に成功した。

A. 研究目的

細胞組織利用医薬品の特性・品質解析の一つとして、全発現タンパク質プロファイル評価、並びに、活性本体である目的タンパク質の特性解析が必要と考えられている。我々はこれまで、2次元ゲル電気泳動法 (2D-GE) によるタンパク質のプロファイリング、及びそのゲルから目的タンパク質を回収し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) を用いて特性解析することを検討してきた。その中で、平成 12-14 年度本研究において、2D-GE を用いたラット脳膜由来タンパク質のプロファイル解析、及びゲル内消化と LC/MS によるモデルタンパク質のペプチド・糖ペプチドマッピングに成功している。しかしこのとき、ゲルからの糖ペプチドの回収率が悪く、ゲル内消化法では、微量糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析に応用することは難しいという課題が残った。そこで本年度は、ゲル内消化ではなく、目的タンパク質をゲルから抽出した後に、ペプチドに消化することによって回収率を向上させること、及びリニアイオントラップ型質量分析装置 (liner ITMS) を導入し、糖ペプチドを特異的に解析する方法を利用することによって、ゲル内糖タンパク質の

糖鎖解析が可能になるかどうかを検証した。細胞組織由来タンパク質のモデルとして、ラット脳膜に発現し、分子内に3つの N 結合型糖鎖と1本の GPI 糖鎖を有する Thy-1 を用いた。

B. 研究方法

1) ラット脳膜画分の調製

ラット脳(生後3週齢, 湿重量約 1.4 g) 1匹当たり冷アセトン 40 ml を加え, ポリトロンを用いて 1,000 rpm で氷冷しながら 1 分間均質化した。遠心分離後(1,000 rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 再度, 冷アセトン 30 ml を加え, 同じ操作を繰り返した。遠心後, クロロホルム/メタノール混液(2/1, v/v) 40 ml を加え, ポリトロンを用いて 1,000 rpm で 1 分間均質化後, 室温で 1 時間放置した。遠心分離後(3,000rpm, 室温, 10 分), 上清を除去し, 再度, クロロホルム/メタノール混液 40 ml を加え, 10 秒間均質化後, 室温で 30 分放置した。遠心分離後, 沈殿をメタノールで 2 回洗浄した。洗浄した沈殿に 0.15 M 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA 及び 1 mM PMSF を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.4(均質化用緩衝液) 30 ml を加え, ポリトロンを用いて 1000 rpm で 10 秒間均質

化を行った。ラット脳2匹分をまとめて遠心分離し(10,000×g, 4°C, 20分)。再度沈殿に均質化用緩衝液を加え(ラット脳, 2匹分に対し20 ml), ポリトロンを用いて1,000 rpmで20秒間均質化後, 10% Triton X-114を含む均質化用緩衝液5 mlを加え, 4°Cで一晩攪拌し, 膜画分の可溶化を行った。可溶化溶液を遠心分離後(10,000×g, 4°C, 20分), 上清を37°Cで10分間放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 30°C, 5分), Triton X-114相と水相に分離した。得られた Triton X-114相に均質化用緩衝液を等容量加え洗浄し, 再び37°Cで10分間放置後, 遠心分離した(3,000 rpm, 30°C, 5分)。得られた Triton X-114相に冷アセトン(4倍容加え, -15°Cで一晩放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 4°C, 30分), 膜画分を得た。

2) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の調製

得られた膜画分(ラット脳, 2匹分)を, 50 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.4, 0.4 mlに懸濁し, PIPLC(Molecular Probe)1 unitを加え, 37°Cで約18時間消化した。50 mM トリス塩酸緩衝液, pH7.4, さらに, 全溶液の1/4倍容の10% Triton X-114を加え(最終 Triton X-114濃度, 2%), 0°Cに冷却後, よく攪拌した。反応溶液を37°Cに保温後, 遠心分離し(3,000 rpm, 30°C, 5分), Triton X-114/水相分離を行った。Triton X-114相を除いた後, 水相に10% Triton X-114-トリス塩酸緩衝液 pH 7.4を1/4倍容加えて洗浄した。水相に冷アセトンを4倍容加え, -15°Cで一晩放置後, 遠心分離し(3,000 rpm, 4°C, 60分), 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を得た。

3) 可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分の SDS-PAGE

可溶性 GPI アンカー型タンパク質画分を2-メルカプトエタノール及びヨードアセトアミドを用いて, 還元カルボキシアミドメチル化後, 12.5%ゲル(80×80×1 mm)を用いて, 25 mM トリス塩酸塩, 0.19 M グリシン, 0.1% SDSを含む泳動用緩衝液中, 20 mAで泳動させた。分離された GPI アンカー型タンパク質は, Simply Blue™ SafeStain(Invitrogen)を用い

て検出した。

4) ゲルからのタンパク質の抽出

SDS-PAGE ゲルより, Thy-1を含むバンドを切り取り, 低吸着性チューブに移した。1% SDSを含む20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0(抽出バッファー)を加え, スパーテルを用いて, ゲル片を細かく砕いた後, 一晩, 激しく振とうした。得られた抽出液を Ultrafree-MC(0.22 µm, Millipore Corporation)を用いてろ過し, 得られたろ液に4倍量の冷アセトンを加え, -15°Cで約2時間放置した。15,000 rpmで15分間遠心し, 上清を除いた後, 20 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0及び4倍量の冷アセトンを加え, -15°Cで約2時間放置した。再度, 15,000 rpmで15分間遠心し, 上清を除いた後, 沈殿を風乾した。

5) タンパク質のプロテイナーゼ消化

ゲルより抽出された Thy-1に, 0.1 M トリス塩酸緩衝液, pH 8.0及びトリプシン, 1 µgを加え, 37°Cで一晩消化した。また, 別途, 5 mM トリス塩酸緩衝液, pH 7.5, 及びエンドプロテイナーゼ Asp-N (和光純薬), 0.4 µgを加え, 37°Cで一晩消化した。

6) 糖ペプチドの解析, LC/MSⁿ

抽出された Thy-1 のプロテイナーゼ消化物を用いて, 以下の条件で LC/MSⁿを行った。

HPLC :

装置 : Paradigm MS4(Michrom BioResource 社)

カラム : MAGIC C18(Michrom BioResource 社製, 0.2×50 mm, 3µ)

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%(10~50分)

流速 : 3 µl/min

Liner ITMS :

装置 : LTQ(Thermo Electron 社)

イオン化 : nano-ESI

測定モード : ポジティブイオンモード

キャピラリー温度 : 200°C

キャピラリー電圧 : 2.0 kV

スキャン範囲(m/z) : 300-2,000

MSⁿ, コリジョンエネルギー : 35%

In-source CID, コリジョンエネルギー : 50 V

測定メソッド :

- ① Full MS scan(m/z 300-2000)
- ② In-source CID(m/z 80-500)
- ③ Data-dependent MS²
- ④ Data-dependent MS³
- ⑤ Data-dependent MS⁴

7) データベース検索(糖ペプチドの検出)

Thy-1 のトリプシン消化物について, LC/MSⁿ 分析によりデータ依存的に得られたすべてのプロダクトイオンについて, 検索エンジン TurboSEQUENT(Thermo Electron)を用いてタンパク質同定を行った. 検索に使用するデータベースに, Cys 残基にカルボキシアミドメチル化修飾, また, 可変修飾として, Asn 残基に GlcNAc に相当する 203 Da の分子量増加を加え, 検索を行った.

C. 結果

1. ラット脳 Thy-1 トリプシン消化物の分析

ラット脳の膜画分を Triton X-114 を用いて可溶化した後, Triton X-114 の温度依存性相分離と膜画分の PIPLC 消化を組み合わせた手法を用いて, 可溶性 GPI 結合タンパク質群を得た. この GPI 結合タンパク質群を SDS-PAGE によって分離した(図 1). Thy-1 の分子量に相当する 20~25 kDa のバンドを切り取り, ゲルを細かく砕いた後, 1% SDS を含む緩衝液でタンパク質を抽出した. アセトン沈殿によってタンパク質を回収した後, トリプシン消化を行った. その消化物について, 実験 6)に準じて, liner ITMS

を用いた連続スキャン分析(full mass scan, in-source CID)を用いた full mass scan, 及びデータ依存的 MSⁿ)を行った. 図 2A は, トリプシン消化物の full mass scan で得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC, m/z 300-2,000)である.

1.1. データベース検索

データ依存的 MSⁿ 分析で得られたすべてのプロダクトイオンを用いてデータベース検索を行った結果, このタンパク質は Thy-1 であることが確認された. しかし, 通常の方法では, 糖ペプチドを特定することはできなかった. 検索に使用するデータベースに, 結合糖鎖に関する情報を加えることによって, 糖ペプチドが同定できることが報告されている. そこで, 使用するデータベースに, 可変修飾として, Asn 残基に GlcNAc に相当する 203 Da の分子量増加を加え, 再度検索を行った結果, その結果, 先のペプチド同定の結果に加え, 新たに, 3.41, 3.45, 3.75, 及び 3.96 分に検出されたペプチドは, Asn98 に 203 Da が付加されたペプチド Val89-Lys99 であることが明らかになった. また, 34.23, 及び 34.52 分に検出されたペプチドは, Asn74 に 203 Da が付加されたペプチド Val69-Lys78 と同定された.

1.2. Asn74 結合糖鎖の解析(Val69-Lys76)

図 3 は, データベース検索で Val69-Lys78 と同定された糖ペプチド(m/z 1,512.21²⁺, 検出時間 34.52 分, 測定範囲 m/z 405-2,000)の MS² 及び MS³ プロダクトイオンスペクトルである. 図 3B にデータベース検索で同定された peptide (Val69-Lys78)+GlcNAc(m/z 1,310⁺)をプリカーサーとしてデータ依存的に MS/MS 測定して得られたプロダクトイオンスペクトル (m/z 1,512.21²⁺の MS³ プロダクトイオンスペクトルに相当)を示す. Val69-Lys78 から予想されるフラグメントイオンの理論値と一致する b, 及び y イオンが検出されていることから, 確かに Val69-Lys78 であることが確認された.

このペプチドに結合している糖鎖の単糖組成は, プリカーサーイオンから算出された糖ペプチドの分

分子量 3,022.40 から、ペプチド Val89-Lys99 の理論分子量 1,106.72 を差し引いた値 1,933.79 Da から、dHex₂Hex₃HexNAc₄ と推定された。この糖鎖には、Fuc が 2 分子結合していることが明らかとなった。

Fuc の結合位置を決めるため、このプロダクトイオンスペクトルを精査したところ、dHex₁Hex₁HexNAc₁ 及び dHex₂Hex₂HexNAc₁ に相当する B_{2α}⁺(*m/z* 512⁺)、及び B_{3α}⁺(*m/z* 674⁺) が検出されていることが判った。これらのイオンから、結合する 2 分子の Fuc のうち、少なくとも 1 分子は、ルイス a/x 構造 Gal-(Fuc-)GlcNAc-Man、または、血液型 H 抗原構造 Fuc-Gal-GlcNAc-Man のように、非還元末端側に結合していることが示唆された。本糖ペプチドの 3 価のプリカーサーイオン(*m/z* 1,008³⁺)のプロダクトイオンスペクトル(測定範囲 *m/z* 265-2,000)に、Fuc が結合した二糖の B_{2α}/Y_{5α}⁺(Fuc-GlcNAc⁺, *m/z* 350⁺) が検出されたことから(データ示さず)、この Fuc はガラクトースではなく、ルイス a/x 構造のように GlcNAc に結合していることが判った。また、ペプチドに dHex₁HexNAc₁、dHex₁HexNAc₂、及び dHex₁Hex₁HexNAc₂ が結合した Y_{1α}⁺(*m/z* 1,456⁺)、Y_{2α}⁺(*m/z* 1,660⁺)、及び Y_{3α/3β/3γ}⁺(*m/z* 1,822⁺) が検出されたことから、残りの Fuc は、トリマンノシルコア構造の還元末端側の GlcNAc に結合していることが明らかとなった。

さらに、この糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルには Y_{3γ}²⁺(*m/z* 1,411²⁺) が検出されたことから、非還元末端側に未置換の HexNAc が存在することが明らかになった。この未置換 HexNAc は、Y_{3α/1β/3β}²⁺(*m/z* 940²⁺) が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の Man にβ1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。

以上のことから、34.52 分に検出された *m/z* 1,512.21²⁺ のイオンは、図 3A 中の図に示すようなハイブリッド型糖鎖に由来するイオンであることが明らかとなった。

また、34.52 分に検出された糖ペプチド(*m/z* 1,512.21²⁺, 検出時間)付近のプロダクトイオンスペクトルを調べることによって、糖鎖に特徴的な B イオ

ンを含む糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを複数得ることができた。これらの糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルについて解析を行った結果、Asn74 に結合している糖鎖は、高マンノース型糖鎖 (M5)、部分構造として、コアフコース、bisecting GlcNAc、及びルイス a/x 構造又は H 抗原構造を持つコンプレックス型糖鎖、及びハイブリッド型糖鎖であることが明らかとなった (表 1)。

1.3. Asn98 結合糖鎖の解析(Val89-Lys99)

データベース検索の結果、Asn98 を含むペプチド Val89-Lys99 は 3.41、3.45、3.75、及び 3.96 分に溶出されていることが判った。図 4 は糖ペプチド(*m/z* 1,525.78²⁺, 検出時間 3.47 分)のプロダクトイオンスペクトルである。結合糖鎖の単糖組成は、プリカーサーイオンから計算された糖ペプチドの分子量 3,049.54 から、ペプチド Val89-Lys99 の理論分子量 1,117.54 を差し引くことによって得られた糖鎖分子量 1,950.01 Da から、dHex₁Hex₆HexNAc₄ であると推定された。

プロダクトイオンスペクトルには、dHex、Hex、及び HexNAc の *m/z* 値に相当する間隔で多数の Y イオンが検出された。dHex の結合位置は、ペプチドに dHex₁HexNAc₁、dHex₁HexNAc₂、及び dHex₁Hex₁HexNAc₂ が結合した Y_{1α}⁺(*m/z* 1,467⁺)、Y_{2α}⁺(*m/z* 1,670⁺)、及び Y_{3α/3β/3γ}⁺(*m/z* 1,832⁺) が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の還元末端側の GlcNAc であることが判った。また、Y_{3γ}²⁺(*m/z* 1,423²⁺) が検出されたことから、結合糖鎖に未置換の HexNAc が存在することが判った。この未置換の HexNAc は、Y_{3α/1β/3β}²⁺(*m/z* 945²⁺, 1,890⁺) が検出されたことから、トリマンノシルコア構造の Man にβ1-4 結合する bisecting GlcNAc であることが示唆された。また、Hex₃(*m/z* 487⁺, B_{2β}⁺)、Hex₄HexNAc₁(*m/z* 853⁺, B_{4α}/Y_{3α}⁺)、Hex₂HexNAc₁(*m/z* 528⁺, B_{3α}⁺)、Hex₃HexNAc₁(*m/z* 690⁺, B_{4α}/Y_{3β/3γ}⁺)、Hex₃HexNAc₂(*m/z* 893⁺, B_{4α}/Y_{3β}⁺)、Hex₄HexNAc₂(*m/z* 1055⁺)、Hex₅HexNAc₂(*m/z* 1217⁺)、及び Hex₆HexNAc₂(*m/z* 1380⁺, B_{4α}⁺) が検出されたことから、結合糖鎖の構造

は、図4中の図に示すようなハイブリッド型糖鎖であることが明らかになった。

また、 m/z 1,525.78²⁺の糖ペプチドピーク近傍から、Bイオンを指標に糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選別し、解析した結果、Asn98には、高マンノース型糖鎖、M5, bisecting GlcNAcや、ルイスa/x構造を含むコンプレックス型及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが推定された(表1)。

1.4. Asn23 結合糖鎖の解析(His21-Phe33)

データベース検索によって、Asn24を含む糖ペプチドを同定することはできなかった。そこで、in-source CIDによって生成したオキシニウムマーカージオン、及びCID-MS/MSによる糖鎖のneutral lossを用いて、糖ペプチドの溶出位置を推定した。

図2B及びCは、トリプシン消化物のin-source CIDによって生成したオキシニウムマーカージオン、 m/z 204⁺ (HexNAc⁺)及び m/z 292⁺ (NeuAc⁺)のマスクロマトグラムである。 m/z 204⁺のマスクロマトグラムでは、3.7, 9.7, 19.1, 27.2, 28.4, 34.4, 36.3, 37.8分付近にピークが検出され、この時間に糖ペプチドが溶出していることが推定された。 m/z 292⁺のマスクロマトグラムでは、3.7, 30.0, 36.4, 38.2分にピークが検出され、この時間にシアロ糖鎖を含む糖ペプチドが溶出していることが推定された。また、データ依存的CID-MS/MSによって得られたクロマトグラムから、Hexの2価イオンに相当する81uのニュートラルロスが生じたイオンのマスクロマトグラムを描き出すことによって、糖ペプチドの溶出時間を推定した(図2E)。In-source CIDで得られた m/z 204⁺のマスクロマトグラムと同じ時間にピークが現れたことから、これらの時間に非還元末端側にHexを持つ2価の糖ペプチドが溶出していることが推定された。推定された溶出時間付近のプロダクトイオンスペクトルを調べた結果、ピークT1-7のプロダクトイオンスペクトルに、糖鎖に特徴的なBイオンが検出され、ピークT1-7に糖ペプチドが溶出されていることが確認された。そのうちピークT1及びT6は、データベース検索で同定された糖ペプチドである。そこで、新

たに糖ペプチドと判定された5本の糖ペプチドピークを解析した。

図5Aは、ピークT4に溶出された糖ペプチド(m/z 937.27³⁺, 検出時間26.88分)のプロダクトイオンスペクトルである。糖鎖のBイオンや、ペプチド部分を含むYイオンが検出されていることがわかる。これらのYイオンを高 m/z 側から低 m/z 側へ帰属していった結果、 m/z 898²⁺に検出されたイオンは、ペプチドにGlcNAcが結合したイオンであると推定された。この糖ペプチドのペプチド部分の分子量は、プロダクトイオン m/z 898²⁺からGlcNAcの分子量を差し引くことにより、1,593であると計算された。そこで、Thy-1中に、Asn23, 74, 98を含みアミノ酸残基の合計分子量が1,593になる配列が存在するかどうかを、FindPept tool (<http://us.expasy.org/tools/findpept.html>, ExPASy Proteomics tools, Swiss Institute of Bioinformatics)を用いて検索したところ、このペプチドはAsn23を含むHis21-Phe33であることが示唆された。データ依存的MS³分析で得られた m/z 898²⁺のプロダクトイオンスペクトル上には、Asn23にGlcNAcが結合したペプチドHis21-Phe33の理論フラグメントイオンに一致するイオンが多数検出されたことから、このペプチドは確かにHis21-Phe33であることが確認された。

結合糖鎖の単糖組成は、糖ペプチドの計算分子量2,808.79から、ペプチドHis21-Phe33の理論分子量1,591.74を差し引くことによって得られた糖鎖分子量1,235.04から、Hex₅HexNAc₂と推定された。また、プロダクトイオンスペクトル中の、部分構造Man-GlcNAc、及びMan-Man-GlcNAcに相当するフラグメントイオン(m/z 366⁺, 528⁺)や、多数のYイオンから、この糖鎖は高マンノース型糖鎖Man5と示唆された。また、ピークT4付近のすべての糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを解析した結果、Asn23には、高マンノース型糖鎖M5-7が結合していることが判った。

この糖ペプチドがデータベース検索によって同定されなかったのは、過剰量のトリプシンを用いたために、キモトリプシン様の消化が起こり、得られた

ペプチドがデータベース検索条件と一致しなかったためと考えられる。このような糖ペプチドの場合も、in-source CID, 及び CID-MS/MS による neutral loss から推定された糖ペプチドの溶出時間付近のデータ依存的 MSⁿ プロダクトイオンスペクトルを確認することによって、結合糖鎖構造, 糖鎖結合位置, 及びペプチドのアミノ酸配列について解析できることが確認された。

1.5. ピーク T2, 3, 5, 7 の解析

残りの糖ペプチドピーク T2,3,5,7 についても、ピーク T4 の解析と同様に、糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル中の Y イオンを帰属し、ペプチド部分のアミノ酸配列の推定を行うことによって、結合糖鎖を解析した。その結果、ピーク T2 は、Asn74 を含む糖ペプチド Ala73-Lys78 であり、結合糖鎖は、高マンノース型糖鎖 M5, 及びコンプレックス型糖鎖であることが判った。ピーク T3 は、Asn23 を含む糖ペプチド His23-His31, 及び His21-Glu32, Asn98 を含む糖ペプチド Ser96-Asp106 であり、それぞれ、Asn23 には高マンノース型 M5, 6, 及び Asn98 にはルイス a/x 構造を含む糖鎖が結合していることが判った。ピーク T5 は、高マンノース型 M6 が結合した Asn23 を含む糖ペプチド His21-Phe3 であることが判った。また、ピーク T7 は、Asn74 を含む糖ペプチド Val69-Lys78 であり、結合糖鎖はコアフコースや、ルイス a/x 構造を持つシアロ糖鎖(ハイブリッド型, 及びコンプレックス型糖鎖)であることが判った。

2. ラット脳 Thy-1 の Asp-N 消化物の分析

2.1. GPI 結合ペプチドの検出

Thy-1 のアミノ酸配列から、トリプシン消化では、GPI が結合したペプチドのアミノ酸は Cys 残基のみとなり、カラムに保持されるのが難しいことが予想された。そこで、適当なアミノ酸残基からなる GPI 結合ペプチドを得るために、Asp-N 消化を行い、LC/MSⁿ を行った。

図 6 は Asp-N 消化物の full mass scan で得られた TIC (m/z 300-2,000) である。GPI 結合ペプチドを検

出するために、in-source CID より GPI のコア構造に由来する Man-PO₄-EtN⁺ (m/z 286⁺), 及び PO₄-Inositol-GlcN⁺ (m/z 422⁺) のマスクロマトグラムを描かせたところ、4.2, 及び 4.4 分にピークが検出された (図 6B, C)。検出されたピーク付近のプロダクトイオンスペクトルを調べたところ、4.14, 4.17 (ピーク A1-1), 4.27, 4.31 分(ピーク A1-2)のプロダクトイオンスペクトルに、フラグメントイオン m/z 286⁺, 422⁺ が検出され、これらのスペクトルは、GPI 結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトルであることが確認された。

2.2. GPI 構造の解析

図 7 は、4.31 分(ピーク A1-2)に検出された GPI 結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトルである。プリカーサーイオン(m/z 1,050.89²⁺)から、分子量は 2,099.76 と計算された。GPI コア構造に由来する m/z 286⁺, 及び 422⁺ の他に、PO₄-Man-GlcN⁺(m/z 404⁺), EtN-PO₄-Man-GlcN⁺(m/z 447⁺) 及び EtN-PO₄-(GalNAc)-Man-GlcN⁺(m/z 650⁺) の GPI 構造に由来するイオンが検出され(GlcN; グルコサミン, EtN; エタノールアミン), このペプチドが GPI 結合ペプチドであることが確認された。ペプチド部分を含むフラグメントイオン, [peptide+EtN]⁺(m/z 787⁺), [peptide+EtN-PO₄]⁺(m/z 867⁺), [peptide+EtN-PO₄-Man-Man]⁺(m/z 1,191⁺), [peptide+EtN-PO₄-Man-Man-Man-PO₄-EtN]⁺(m/z 1,476⁺), [peptide+EtN-PO₄-Man-Man-(GlcN)-Man-PO₄-EtN]⁺(m/z 1,637⁺), [peptide+EtN-PO₄-Man-Man-(Ino-PO₄-GlcN)-Man-PO₄-EtN]⁺(m/z 1,897⁺) から、この GPI 結合ペプチドは、Asp106-Cys111 に、図 7 中の図に示す GPI が結合したものであると推定された。また、4.17 分に検出された GPI 結合ペプチド(m/z 1,132²⁺) の側鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、R₁=-Man, R₂=-PO₄-EtNH₂, R₃=-H, R₄=-GalNAc であることが確認された(データ示さず)。これらの 2 つの GPI 構造は、すでに報告されている構造と一致した。4.27 及

び4.14分に検出されたGPI結合ペプチドは、プリカーサーイオン m/z 1,151²⁺, 1,213²⁺から図7中の図に示したGPI構造に、HexNAc, 1分子, 及びHex, 2分子が, それぞれ結合したものであることが推定された。また, プロダクトイオンスペクトルから, 糖ペプチド m/z 1,151²⁺のGPIの側鎖構造は, R₁=-HexNAc, R₂=-PO₄-EtNH₂, R₃=-H, R₄=-HexNAc, 糖ペプチド m/z 1,213²⁺の側鎖構造は, R₁=Hex, R₂=-PO₄-EtNH₂, R₃=-H, R₄=-HexNAc-Hex (または, R₃=-Hex, R₄=-HexNAc)であると推定された(データ示さず)。Thy-1のGPI構造については, これまでに2構造しか報告されておらず, 本分析法により, 新たに2構造が発見されたことになる。

2.3. Asp-Nによって得られたN結合型糖鎖結合ペプチドの解析

つぎに, トリプシン消化物の場合と同様に, Asp-N消化によって得られた糖ペプチドについても, in-source CIDで得られた m/z 204⁺, 及び292⁺のマスキロマトグラム(図6D及びE), CID-MS/MSによるneutral loss 81 uのマスキロマトグラム(図6G)から, 糖ペプチドの溶出時間を推定することができた。推定された糖ペプチドの溶出時間付近のプロダクトイオンスペクトルを調べた結果, ピークA2-7に, 糖鎖のBイオンが検出されたことから, これらは糖ペプチドピークであることが確認された。

ピークA2-7の糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選別し, 結合糖鎖を解析した。その結果, 表1に示すように, Asn23には, トリプシン消化物の解析から結合が確認された高マンノース型糖鎖, M5-7に加え, ルイス a/x 構造, 又はbisecting GlcNAcを含むコンプレックス型, 及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが判った。Asn74には, 高マンノース型糖鎖, M5, コアフコース, bisecting GlcNAc, 又はルイス a/x 構造を持つコンプレックス型糖鎖, 及びコアフコースを持つハイブリッド型糖鎖等が結合していることが判った。また, Asn98には, 高マンノース型糖鎖, M5, ルイス a/x 又はH抗原構造を持つハイブリッド型糖鎖等が結合しており, トリプ

シン消化物の解析から推定された糖鎖構造よりも多様であることが判った。

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。

我々は本研究において, タンパク質プロファイル評価のための2D-GE, 並びにゲルから回収された目的タンパク質の特性解析法の開発を行ってきた。一般に, 電気泳動法で分離されたタンパク質は, ゲル内消化, ペプチド抽出, MS/MS分析, 及び得られたプロダクトイオンを利用したタンパク質データベース検索によって同定されている。糖タンパク質の部位特異的不均一性の解析を行う場合, 各糖鎖結合位置を含む糖ペプチドを等しい回収率で抽出する必要があるが, ゲル内消化後, ペプチド/糖ペプチドを抽出する方法では, 回収率が不十分なうえ, ペプチド/糖ペプチドによって回収率が異なる場合がある。そこで, 本研究では, SDS-PAGEで分離された糖タンパク質をゲルより丸ごと抽出した後, プロテイナーゼ消化を行い, 得られたペプチド/糖ペプチドを分析する方法を検討した。可溶性GPI結合タンパク質は, ラット脳より分画し, SDS-PAGEで分離した。20~25 kDa付近に検出されたバンドを1% SDSを含むトリス塩酸緩衝液中で一晩激しく振とうすることによって, Thy-1を丸ごと抽出することができた。

抽出されたThy-1は, トリプシン, 又はAsp-Nで消化後, LC/MSによるペプチド/糖ペプチド分析に附した。LC/MS/MSを用いたペプチド/糖ペプチドマッピングによって結合糖鎖を解析する場合, 無数のペ

プチドイオンの中から、いかに糖ペプチドのプリカーサーイオンを取り出すか、また、多数のプロダクトイオンスペクトルの中から、いかに糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選び出すかが鍵となる。本研究では、質量分析装置に多段階 MS 測定が可能な IT 型装置を導入し、データベース検索、in-source CID、及び CID-MS/MS による neutral loss を利用することによって、糖ペプチドのスペクトルを見つけ出すことに成功した。

データベース検索を用いる方法では、検索に使用するデータベースに結合糖鎖に関する情報を加えることによって、糖ペプチドが同定できることが報告されている。ITMS による測定では、MS/MS によって peptide に GlcNAc が結合したプロダクトイオンが比較的強く検出され、さらに MS³ では peptide+GlcNAc のペプチド部分の解裂が生じる。そこで、可変修飾として Asn 残基への GlcNAc に相当する 203 Da の分子量増加を加え、MSⁿ で得られたすべてのプロダクトイオンについてデータベース検索を行った結果、糖鎖非結合ペプチドの同定結果に加え、糖ペプチドのアミノ酸配列、糖鎖結合位置、糖ペプチドのプリカーサーイオンの *m/z* 値、及び糖ペプチドの溶出時間に関する情報を得ることができた。この方法は、ペプチド同定結果に基づいたタンパク質検索結果も得ることができ、未同定の糖タンパク質の糖鎖解析にも有用である。

In-source CID を利用する方法では、*m/z* 204⁺(HexNAc⁺)、及び *m/z* 292⁺(NeuAc⁺) のマスクロマトグラムによって、ペプチド/糖ペプチドマップ上の糖ペプチド溶出時間を推定することができた。*m/z* 204⁺ のマスクロマトグラムから、結合糖鎖の種類に関わらず糖ペプチドの溶出位置を推定することができ、また、*m/z* 292⁺ のマスクロマトグラムからは、シアル酸を含む糖ペプチドの溶出位置の推定に有用であることが判った。また、GPI コア構造に由来する *m/z* 286⁺、及び 422⁺ のマスクロマトグラムを利用して GPI 結合ペプチドを検出することができた。このように、In-source CID は、糖鎖構造に由来する適切なオキシニウムイオンを利用することにより、目的

とする糖ペプチドを検出するのに役立つことが確認された。さらに、推定された糖ペプチドの溶出時間付近から糖ペプチドプロダクトイオンスペクトルを選別することによって、糖ペプチドの結合糖鎖構造を明らかにすることができた。

CID-MS/MS を用いた neutral loss を利用する方法では、CID-MS/MS によって生じる糖鎖に相当するプリカーサーイオンとプロダクトイオンの差を用いて、糖ペプチドの検出を行った。Hex の 2 価イオンに相当する 81 u の neutral loss によって生じたプロダクトイオンを検出することによって、還元末端側に未置換の Hex を含む 2 価の糖ペプチドの溶出時間を推定することができた。さらに、推定溶出位置付近のプロダクトイオンスペクトルから糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを選別し、結合糖鎖について解析することができた。Neutral loss 81 u のマスクロマトグラムは、特に高マンノース型糖鎖を含む糖ペプチドの検出に有効であることが判った。また、HexNAc, NeuAc, 及び Fuc を非還元末端側に持つ糖鎖が結合した糖ペプチドについても、適切な neutral loss を設定することによって、検出することができると考えられる。

ここで示した糖ペプチドを検出するための 3 方法は、N-結合型糖鎖を含む糖ペプチドだけでなく、O-結合型糖鎖の検出にも応用可能である。特に、データベース検索を用いる方法は、糖鎖結合位置についての情報が得られるため、O-結合型糖鎖を含む糖ペプチドのように糖鎖結合のための consensus 配列を持たない糖ペプチドを検出するのに有用であると思われる。また、3 方法で得られた結果を合わせることによって、糖ペプチドを見落とすことなく検出し、より完全に解析することが可能になると考えられる。

ラット脳 Thy-1 の部位特異的糖鎖構造は、精製された糖ペプチドから糖鎖を遊離後、ゲルろ過クロマトグラフィー、エキソグリコシダーゼ消化、及びメチル化分析等を行うことによってすでに解析されている。Asn23 には高マンノース型糖鎖(M5、及び M6)、Asn74 にはトリマンノシルコア構造に Fuc が結合したコンプレックス型糖鎖、及び Asn98 には高マンノ

ース型糖鎖(M5), 及びハイブリッド型糖鎖が結合していることが報告されている。最近, 我々は, SDS-PAGE で分離された Thy-1 からゲル内 PNGase F 消化により糖鎖を遊離させ, 還元後, LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いて糖鎖プロファイリングを行うことにより, Thy-1 には報告されている以上に, 非常に多種類の N-結合型糖鎖が結合していることを明らかにしている。本研究では, LC/liner ITMS による連続スキャン分析を用いて, これら N-結合型糖鎖の部位特異的不均一性を解析した。その結果, 各結合位置において, 報告されている構造を含む多種類の糖鎖が結合していることが明らかとなった。各結合位置において, トリプシン又は Asp-N 消化物のどちらかの糖ペプチドを解析することによってのみ確認された糖鎖構造があることから, 部位特異的不均一性について解析する場合, 試料量が許すならば, 複数のプロテナーゼを用いて別々に調製された消化物を用いて分析することが望ましいと考えられる。

GPI 構造は, In-source CID を用いて Asp-N 消化物のペプチド/糖ペプチドマップ上の GPI 結合ペプチドの溶出位置を推定し, そこから選び出したプロダクトイオンスペクトルを用いて明らかにすることができた。すでに報告されている 2 種類の GPI 構造が確認された他に, 新たに 2 種類の GPI 構造を見出した。

以上のように, 電気泳動によって分離された目的糖タンパク質をゲルから抽出した後に酵素消化する方法, 及びイオントラップ型質量分析法を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を用いることによって, これまで解析が困難であったゲル内糖タンパク質の糖鎖解析が可能となることを実証した。

略号 Hex: ヘキソース, HexNAc: N-アセチルヘキソサミン, NeuAc: N-アセチルノイラミン酸, dHex; デオキシヘキソース, Fuc: フコース, EtN: エタノールアミン

E. 結語

目的タンパク質の特性解析を基本とした細胞治療

用医薬品の品質評価法を確立するため, LC/MS による電気泳動ゲル中の糖タンパク質の特性解析を検討し, タンパク質をゲルから抽出した後に酵素消化する方法, 及びイオントラップ型質量分析法を利用した糖特異的検出法を用いることによって, ゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析が可能となることを実証した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUSHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, Submitted.
- 2) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Mashashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells, Submitted.
- 3) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Glycobiology*, in Press.
- 4) Jin YUAN, Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, in Press.

- 5) Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo Urisu, and Jun-ichi SAWADA: Kinetic analysis of peptide digestion of chicken egg white ovomucoid and allergenic potential pepsin fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 136, 23-32 (2005)
- 6) Satoru KAMADA, Chie NOMURA, Mitsuhiro KINOSHITA, Saori NISHIURA, Rika ISHIKAWA, Kazuaki KAKEHI, Nana KAWASAKI, and Takao HAYAKAWA: Profiling analysis of oligosaccharides in antibody pharmaceuticals by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 48, 163-168 (2004)
- 7) Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS. Analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, 48, 163-168 (2004)
- 8) 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, 5-10 (2004)
- 9) Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki 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.* 27, 781-785 (2004)
- 10) Masashi HYUGA, Satsuki 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*, 32, 70-77 (2004)
2. 学会発表
- 1) Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, And Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS. 第2回ヒトプロテオーム学会 (2004. 5)東京
- 2) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 第54回日本電気泳動学会シンポジウム(2004. 6)横浜
- 3) 川崎ナナ: LC/MSによる糖タンパク質の糖鎖解析. シンポジウムゲノムと生物機能 (2004. 7)札幌
- 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuiishi, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative glycome analysis by LC/MS. 1st Workshop for human disease glycomics/proteome initiative of HUPO. (2004. 8) Osaka
- 5) Moroki Terada, Risa Inoue, Naoko Kadowaki, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Toshisuke Kawasaki, Nobuko Kawasaki: Characterization of mannose-binding protein ligands expressed on human colon cancer cells. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 6) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: Identification of glycopeptides on the basis of product ion spectra. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 7) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Profiling of N-glycans in kidney of mice by GCC-LC/MS. 第77回日本生化学会大会 (2004. 10)横浜
- 8) Yayoi Yakehara, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii,

Toru Kawanishi, Koh Nomura, Hiroko Matsushita-Oikawa, and Haruko Ogawa: Characterization of the glycans of bovine erythrocyte membrane glycoprotein. 第77回日本生化学会大会 (2004.10)横浜

- 9) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: N-glycosylation analysis of glycoprotein in polyacrylamide gel by LC/MS. 第77回日本生化学会大会 (2004.10)横浜
- 10) Akira Harazono, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, and Takao Hayakawa: Site-specific N-glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI/MS/MS. Join meeting of the Japanese and American consortia for glycomics. (2004. 11) Hawaii
- 11) 野村和子, 水口惣平, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 出嶋克史, 野村一也: 二次元電気泳動を用いた線虫 Acetyl CoA トランスポーターの解析. 第27回日本分子生物学会年会(2004.12)神戸
- 12) 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: 抗体の LC/MS. バイオロジクスフォーラム第2回学術集会「新しいバイオロジクスの開発動向と規制」(2004. 11)東京
- 13) 川崎ナナ: 糖鎖結合部位と糖鎖の解析. 蛋白質研究所セミナー「翻訳後修飾のプロテオミクス」(2005. 1)大阪
- 14) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: LC/ESI/MS/MS によるヒト Ceruloplasmin の部位特異的糖鎖解析. 日本薬学会第125年会(2005. 3)東京

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

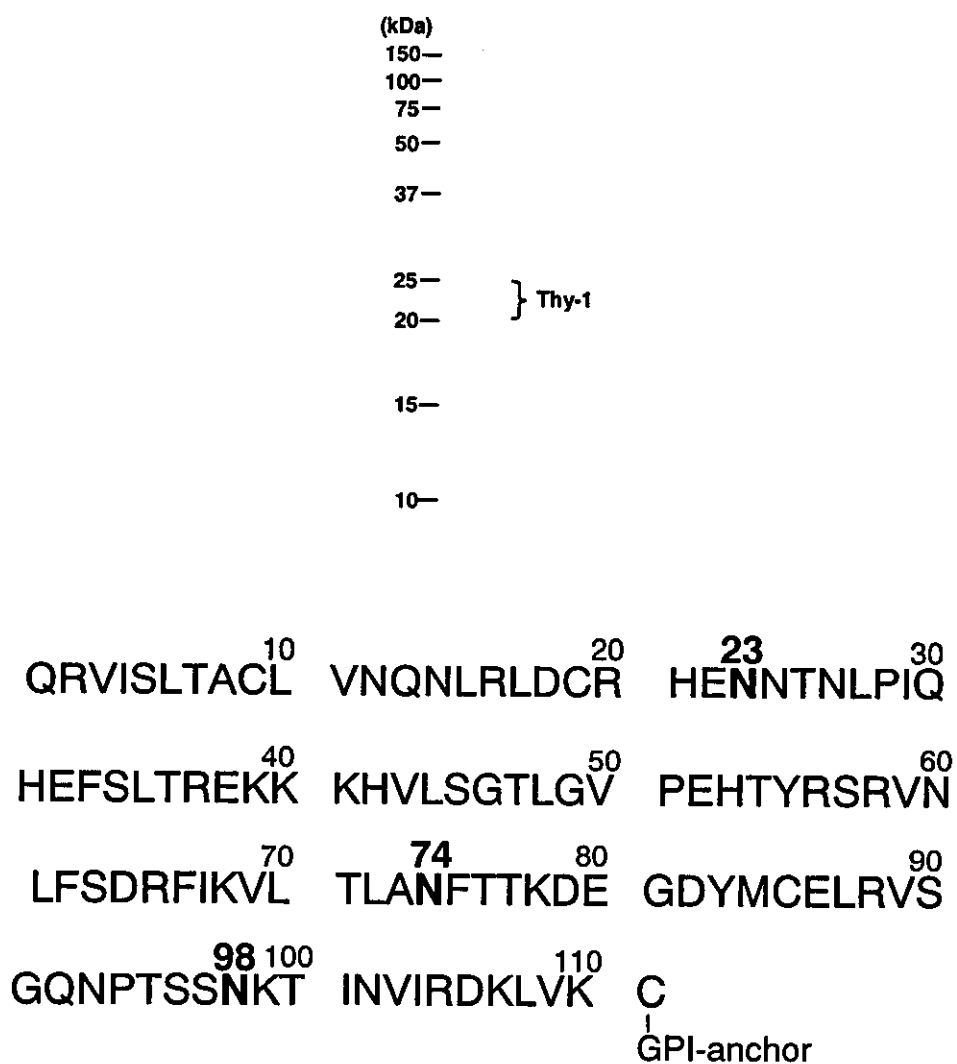


図1 ラット脳可溶性GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE, 及びラットThy-1の amino 酸配列(太字は, N-型糖鎖結合位置を示す)

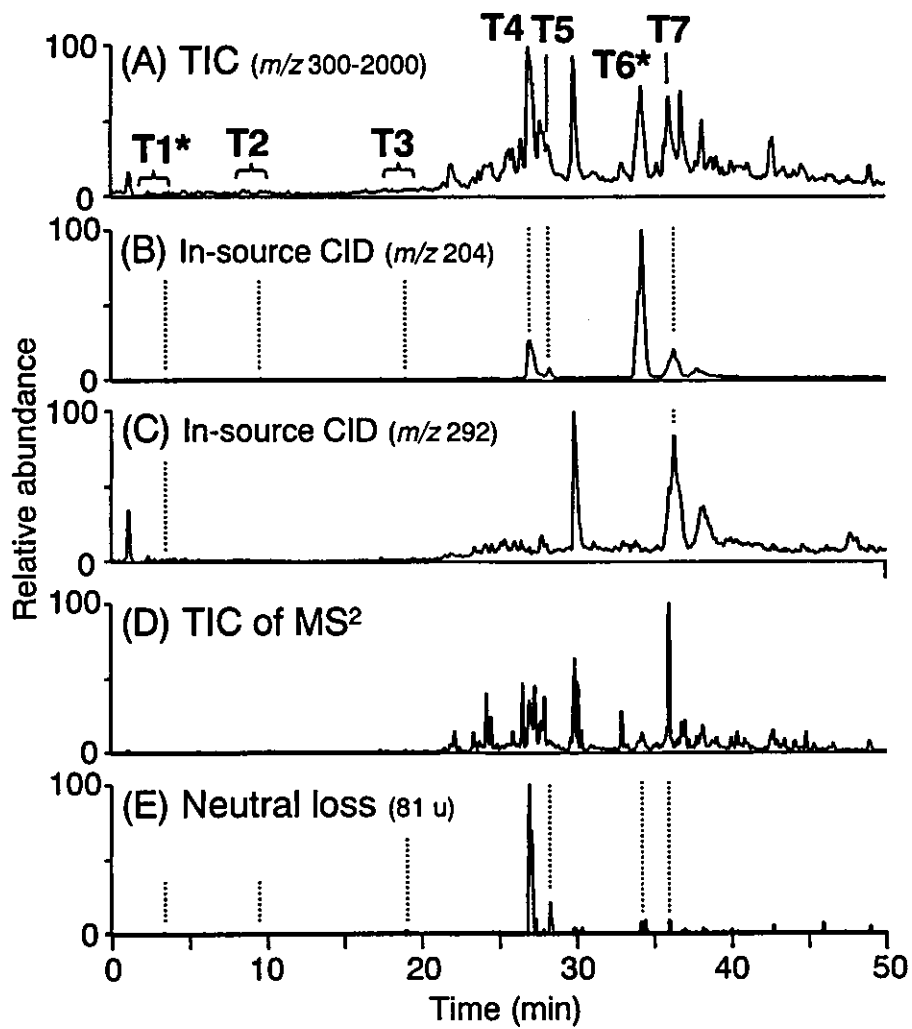


図2 トリプシン消化物のTIC (m/z 300-2,000)(A), in-source CIDによって生じた m/z 204(B), 及び m/z 292(C)イオンのマスクロマトグラム, MS²のTIC(D), MS²によって81 uのneutral lossが生じた結果生成したイオンのマスクロマトグラム(E)

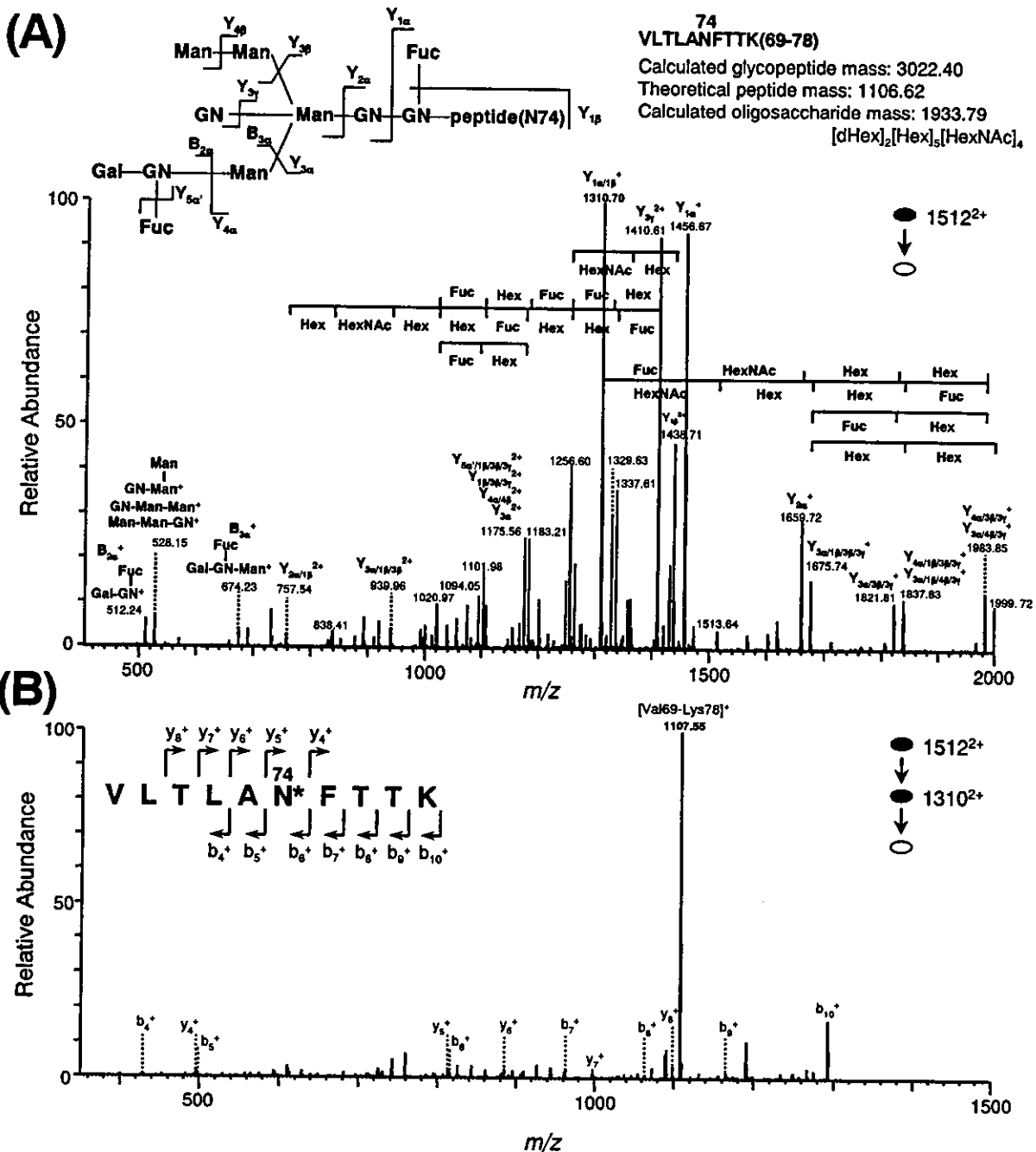


図3 (A)ピークT6中の糖ペプチド(m/z 1512.21²⁺)のプロダクトイオンスペクトル
 図中に、推定された結合糖鎖構造を示す。(B)MS³プロダクトイオンスペクトル
 (C)MS⁴プロダクトイオンスペクトル

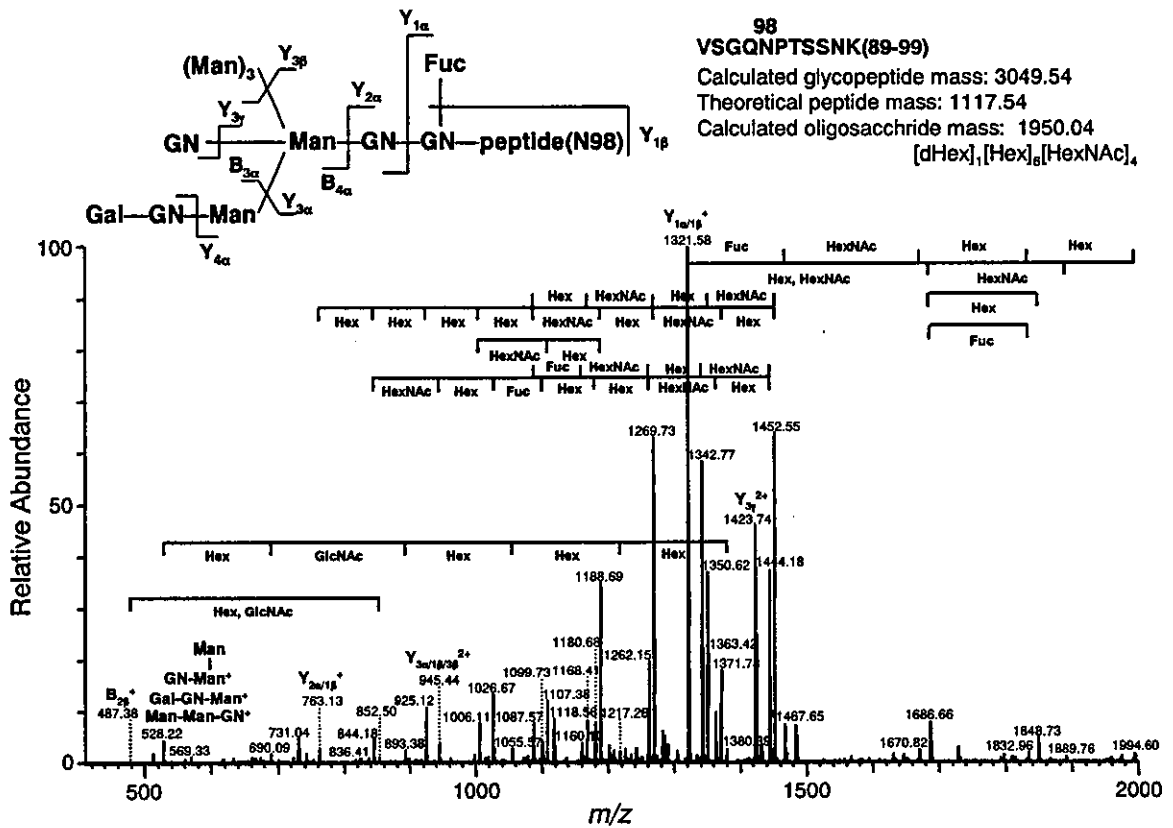


図4 ピークT1中の糖ペプチド(m/z 1525.78²⁺)のプロダクトイオンスペクトル 図中に、推定された結合糖鎖構造を示す。

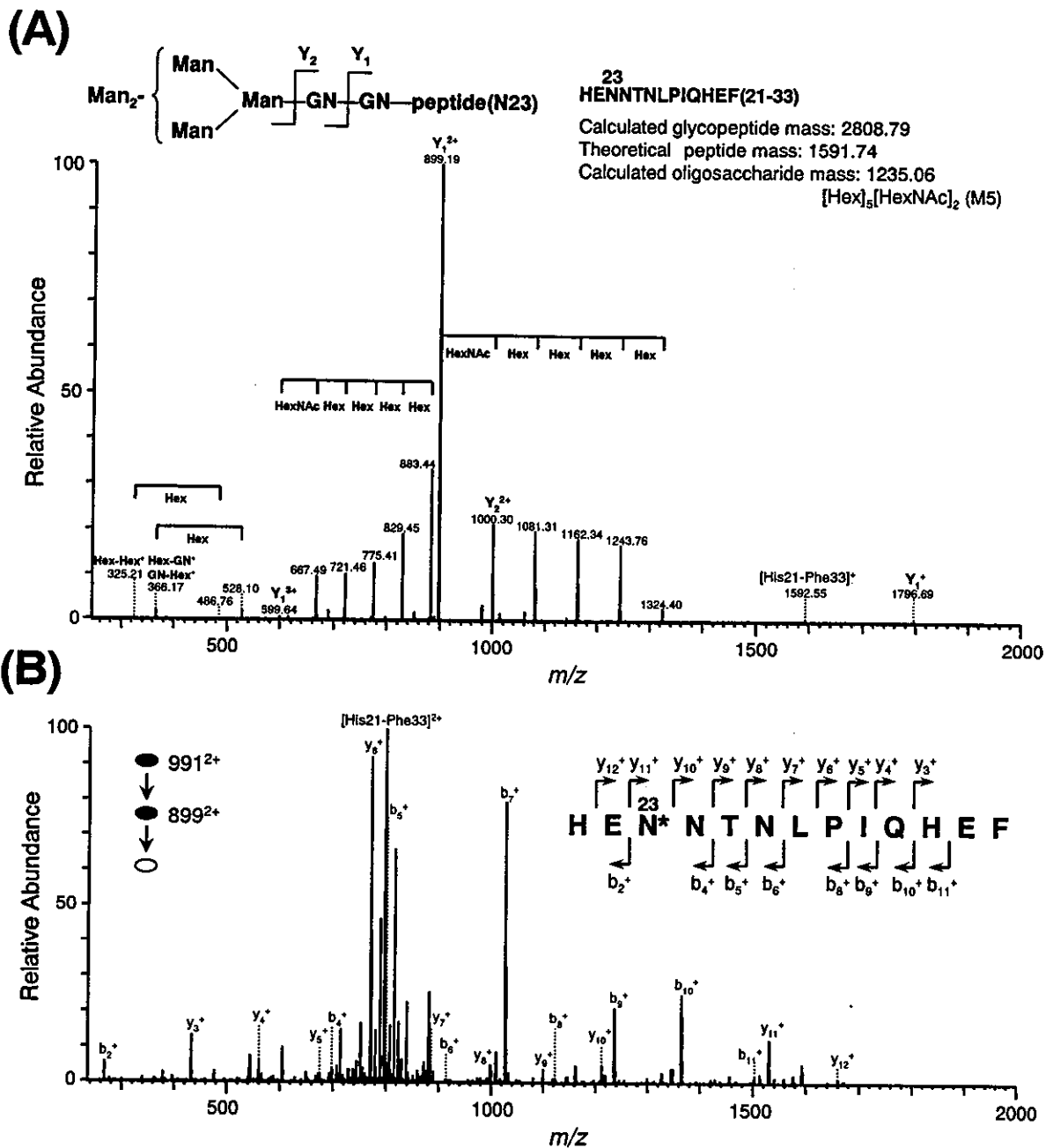


図5 (A)ピークT4中の糖ペプチド(m/z 937.27³⁺)のプロダクトイオンスペクトル (B)MS³プロダクトイオンスペクトル 図中に、推定された結合糖鎖構造を示す。

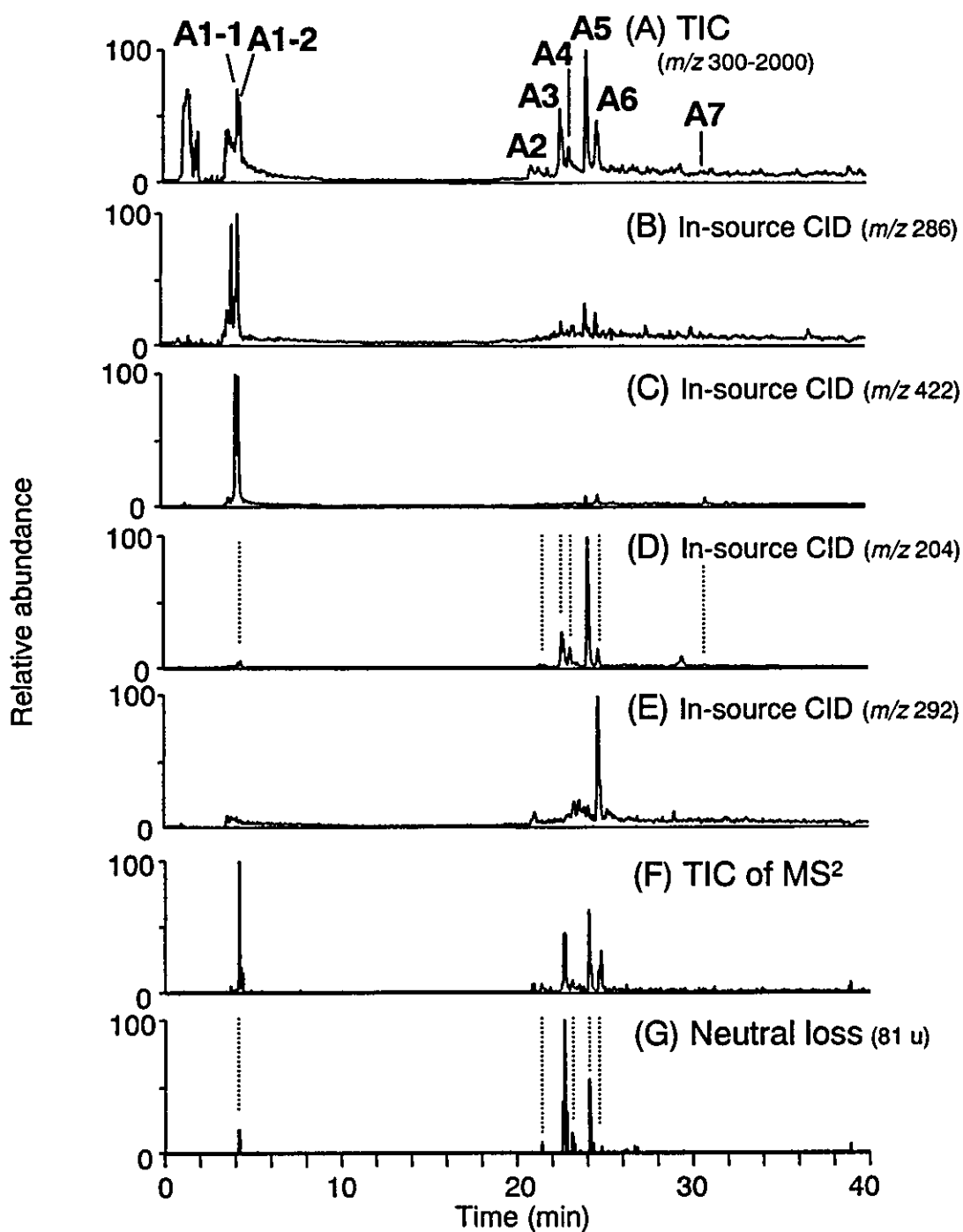


図6 Asp-N消化物のTIC(m/z 300-2,000) (A), in-source CIDによって生じた m/z 204(B), m/z 292(C), m/z 286(D), 及び m/z 422(E)のマスキロマトグラム, MS²のTIC(F), MS²によって81 u のneutral loss の結果生じたイオンのマスキロマトグラム(G)

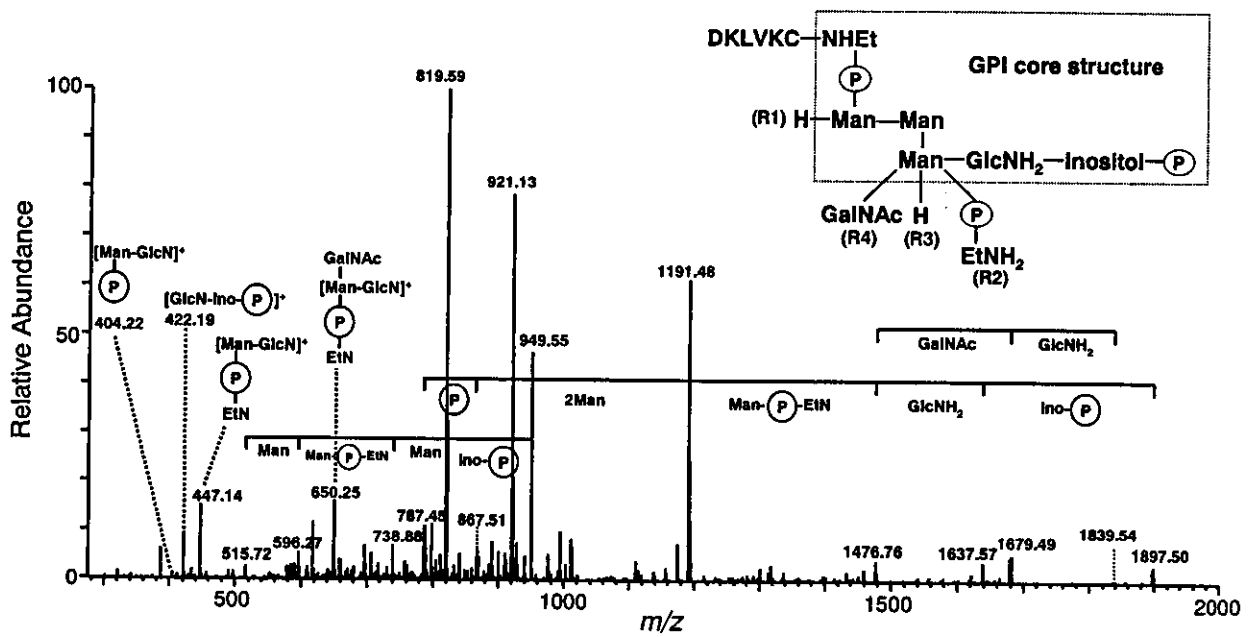


図7 ピークA1-2中のGPI結合ペプチド(m/z 1050.89²⁺)のプロダクトイオンスペクトル 図中に、推定されたGPI構造を示す。

Table 1 Site-specific glycosylation analysis of rat brain Thy-1

Glycosylation site	Carbohydrate composition				Theoretical carbohydrate mass	Tryptsin		Amino acid residue			Asp-N			
	dHex	Hex	HexNAc	NeuAc		Observed m/z	Charge	Peak No.	Theoretical m/z	Observed m/z	Charge	Peak No.	Theoretical m/z	
Asn23	0	5	2	0	1234.43	845.33	3	T3	H21-H31 (1315.83)	845.03	3	A3	E22-H31 (1178.57)	
						837.27	3	T4	H21-F33 (1591.74)	837.06	3	A3	E22-H31 (1178.57)	
						1405.91	2	T4	H21-F33 (1591.74)	1405.99	2	A3	N23-T36 (1626.80)	
							699.49	3	T3	H21-H31 (1315.83)	699.04	3	A3	E22-H31 (1178.57)
						1348.35	2	T3	H21-H31 (1315.83)	1348.06	2	A3	E22-H31 (1178.57)	
						942.16	3	T3	H21-E32 (1444.87)	942.06	3	A5	E22-Q30 (1041.51)	
						991.37	3	T5	H21-F33 (1591.74)	991.06	3	A3		
						1486.40	2	T5	H21-F33 (1591.74)	1489.12	2	A3	N23-T36 (1626.80)	
	0	2	5	0	1519.57					1044.43	3	A3	N23-T36 (1626.80)	
	0	7	2	0	1558.54	996.41	3	T3	H21-E32 (1444.87)	996.07	3	A3	E22-H31 (1626.80)	
	1	3	5	0	1666.62					1361.03	2	A3	F22-H31 (1178.57)	
	1	5	4	0	1786.65					1093.32	3	A3	N23-T36 (1626.80)	
0	5	3	1	1890.66					1133.80	3	A3	N23-T36 (1626.80)		
1	6	4	0	1946.70					1168.51	3	A4	N23-T36 (1626.80)		
1	6	4	0	1946.70					1187.21	3	A3	N23-T36 (1626.80)		
1	2	3	0	1405.52	1078.26	3	T6	V69-F75 (1696.12)	1078.16					
0	5	2	0	1234.43	949.52	2	T2	A73-K78 (680.35)	949.39					
					1162.72	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1162.53	996.71	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
1	3	3	0	1298.47					1195.58	3	A4	F60-D79 (2242.28)		
1	4	3	0	1421.52	1043.45	2	T2	A73-K78 (680.35)	1042.94	1249.75	3	A4	N60-D79 (2342.28)	
1	3	4	0	1462.54	1063.68	2	T2	A73-K78 (680.35)	1063.45					
					1276.61	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1276.58					
0	4	3	1	1598.56					1298.09	3	A4	N60-D79 (2242.28)		
1	5	3	0	1580.57	1124.18	2	T2	A73-K78 (680.35)	1123.96					
					1337.64	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1337.10					
1	3	5	0	1665.62	1165.19	2	T2	A73-K78 (680.35)	1164.99	1272.15	2	A4	T71-K78 (894.48)	
					919.71	3	T6	V69-K78 (1106.82)	919.09	1139.79	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
					1378.19	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1378.12					
0	3	5	0	1723.65					1106.59	3	A4	F66-D79 (1809.91)		
2	5	3	0	1729.63	1197.83	2	T2	A73-K78 (680.35)	1196.89					
2	4	4	0	1779.66	1217.67	2	T2	A73-K78 (680.35)	1217.51					
					1430.71	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1430.64					
1	5	4	0	1786.65	1226.38	2	T2	A73-K78 (680.35)	1225.50					
					960.01	3	T6	V69-K78 (1106.82)	959.43					
					1439.05	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1438.54					
1	4	5	0	1827.68	973.79	3	T6	V69-K78 (1106.82)	973.10					
2	5	4	0	1932.71	1296.76	2	T2	A73-K78 (680.35)	1286.53	1228.16	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
					1008.71	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1008.11					
					1511.98	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1511.87					
1	6	4	0	1944.70	1906.81	2	T2	A73-K78 (680.35)	1906.53	1181.80	3	A4	F68-D79 (1609.81)	
					1013.88	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1013.45					
0	4	5	1	1972.71					1241.91	3	A7	D64-K78 (1786.01)		
2	4	5	0	1973.73	880.04	3	T2	A73-K78 (680.35)	879.70	1241.84	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
					1919.24	2	T2	A73-K78 (680.35)	1919.04	1241.91	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
					1022.43	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1021.79					
					1538.49	2	T6	V69-K78 (1106.82)	1532.49					
1	5	5	0	1969.73					1148.70	3	A4	F68-D79 (1609.81)		
1	6	3	1	2036.72	1043.24	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1042.78					
1	5	4	1	2077.75	1057.08	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1056.45					
2	6	4	0	2094.76	1067.95	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1062.13	1282.43	3	A7	D64-K78 (1786.01)	
1	4	5	1	2118.77	1079.59	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1079.14					
2	5	5	0	2198.79	1075.32	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1075.81					
1	6	4	1	2239.80	1110.97	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1110.48					
3	5	5	0	2281.83	1124.78	3	T6	V69-K78 (1106.82)	1124.49					
1	7	5	0	2313.84	851.76	4	T6	V69-K78 (1106.82)	851.62					
1	4	6	1	2321.85	1138.16	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1137.83					
2	5	6	1	2429.86	1241.13	3	T7	V89-K78 (1106.82)	1240.83					
Asn98	0	8	2	0	1234.43	1168.34	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1167.99				
									912.24	3	A2	E68-K99 (1515.76)		
									1367.31	2	A2	E68-K99 (1515.76)		
									936.28	3	A3	Q92-R105 (1570.84)		
									1021.28	3	A3	E68-N102 (1843.84)		
									1011.53	3	A4	T95-K110 (1815.06)		
									1516.43	2	A4	T95-K110 (1815.06)		
									1144.21	3	A5	E68-R106 (2212.18)		
0	3	4	0	1315.49	1209.79	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1209.92					
0	3	5	0	1519.57	1319.68	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1319.59	1007.10	3	A2	E68-K99 (1515.76)	
									1239.21	3	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1230.88	3	A4	Q81-K99 (2141.95)		
2	3	4	0	1608.60					951.26	3	A4	Q91-N102 (1259.81)		
									1429.22	2	A4	Q91-N102 (1259.81)		
1	4	4	0	1624.60	951.57	3	T3	S99-D106 (1245.87)	951.76					
0	5	4	0	1640.59	1371.84	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1371.07	860.04	4	A5	E68-R105 (2212.18)	
									1278.89	3	A5	E68-R106 (2212.18)		
									1178.27	3	A4	T95-K110 (1815.06)		
0	5	3	1	1728.61					1082.52	3	A2	E68-K99 (1515.76)		
1	6	3	0	1745.62					866.38	4	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1314.72	3	A5	E68-R106 (2212.18)		
									996.54	4	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1328.49	3	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1018.88	4	A6	E68-R106 (2212.18)		
1	5	3	1	1874.87					1022.70	4	A6	E68-R106 (2212.18)		
0	6	3	1	1890.86	1488.18	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1496.10					
2	5	4	0	1832.71	1517.36	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1517.13					
1	6	4	0	1848.70	1525.78	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1525.12	1150.13	3	A2	E68-K99 (1515.76)	
									1269.45	3	A3	E68-N102 (1843.84)		
									1007.27	4	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1382.34	3	A5	E68-R105 (2212.18)		
									1068.07	4	A6	E68-R106 (2212.18)		
1	6	3	1	2036.72					1073.37	4	A6	E68-R106 (2212.18)		
0	6	4	1	2052.74										

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

細胞・組織加工医薬品・医療用具の品質等の確保に関する研究

分担研究者：新見伸吾（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第三室長）

研究要旨

細胞・組織加工医薬品の品質評価法の開発を目的として、2-acetylaminofluorene (2-AAF)/carbon tetrachloride(CCl₄)投与ラット肝臓における oval cell の出現および肝細胞への分化誘導モデルを用い、annexin A3 (AnxA3)について肝幹細胞マーカーとしての有用性について検討を行った。ラットに2-AAFを5日間投与後、CCl₄と2-AAFを同時投与した。2-AAF/CCl₄同時投与の2日後、肝臓の中心静脈域においてアルブミンとAnxA3共陽性で小型の血球様細胞（小型血球様細胞）が顕著に増加した。その後、その小型血球様細胞におけるAnxA3の染色強度は低下し、4日後にはアルブミンのみ陽性となった。一方、門脈域においても2-AAF/CCl₄同時投与の2日後、アルブミンとAnxA3共陽性の小型血球様細胞が巣状壊死部位において局所的に発現したが、中心静脈域と比べるとその出現頻度は低く分布も異なっていた。以上の結果から、2-AAF/CCl₄同時投与2日後、主に中心静脈域においてアルブミンとAnxA3共陽性の小型血球様細胞が顕著に出現し、その後その細胞はアルブミン陽性、AnxA3陰性の細胞へ転換する、すなわち肝細胞へ分化するというシナリオが見出される。したがって、AnxA3は小型血球様細胞が肝細胞に分化誘導される過程の初期のマーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究協力者

有賀豊彦 日本大学生物資源科学部
農芸化学科教授

移植などの工夫にもかかわらず深刻なドナー不足をもたらしている。したがって、肝ドナーの確保や移植法の改良のみならず、肝移植に代わる治療法の開発は急務の課題となっている。

A. 目的

肝疾患による死亡者は年4万人にものぼる。根治療法として肝移植の有用性は明らかであるが、60歳以下の移植適応患者は年間3,500～5,000人と見積もられている。しかも、適応拡大によって移植適応患者数が急激に増加しており、肝移植や生体部分肝

最近、肝移植に代わる次世代の治療法として、肝幹細胞移植による細胞治療が注目されている。これまで、人工肝臓補助装置の作製が試みられているが、実現には程遠い段階である。一方、強い自己複製能を有し肝細胞へ分化誘導される肝幹細胞の存在