

図25. P19由来細胞株の心筋細胞マーカー遺伝子の主成分得点

1% DMSOを含むMEM α 溶液中で培養して心筋細胞分化を誘導したP19由来細胞株における心筋細胞マーカー遺伝子のmRNA発現量データを主成分分析した際の第1主成分および第2主成分の主成分得点。主成分得点とは、求めた主成分から個々の資料の値を見たものである。

表5. 心筋細胞分化と有意な相関のある「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子

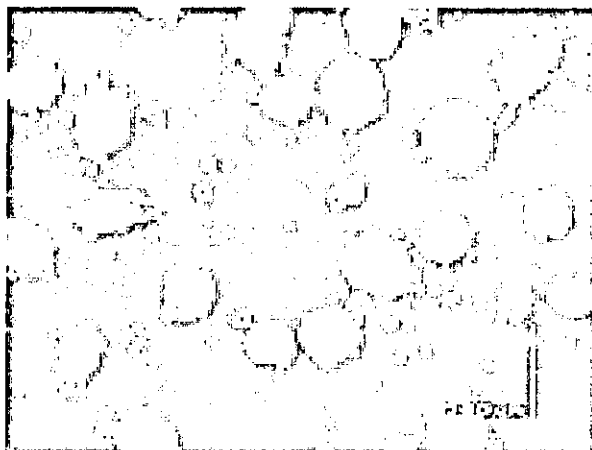
Gene Name	Localization	1st Principal Component		2nd Principal Component		Onset		Colony#	
		r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
CPC1	Soluble Protein	0.824	0.000	0.737	0.000	-0.493	0.006	0.438	0.015
CPC2	Soluble Protein	0.784	0.000	0.746	0.000	-0.542	0.002	0.415	0.022
CPC3	Membrane Protein	0.760	0.000	0.440	0.015	-0.633	0.000	0.645	0.000
CPC4	Membrane Protein	0.760	0.000	0.839	0.000	-0.486	0.006	0.420	0.021
CPC5	Membrane Protein	0.757	0.000	0.466	0.009	-0.688	0.000	0.888	0.000
CPC6	Membrane Protein	-0.720	0.000	-0.524	0.003	0.677	0.000	-0.591	0.001
CPC7	Membrane Protein	0.659	0.000	0.128	0.500	-0.492	0.006	0.600	0.000
CPC2	Soluble Protein	0.652	0.000	0.380	0.036	-0.804	0.000	0.767	0.000
CPC8	Membrane Protein	-0.625	0.000	-0.459	0.011	0.418	0.022	-0.382	0.037
CPC9	Soluble Protein	-0.590	0.001	-0.310	0.095	0.503	0.005	-0.516	0.003
CPC10	Soluble Protein	0.566	0.001	0.234	0.214	-0.615	0.000	0.646	0.000
CPC11	Soluble Protein	0.565	0.001	0.428	0.018	-0.631	0.000	0.586	0.001
CPC12	Membrane Protein	0.556	0.001	0.416	0.022	-0.398	0.029	0.417	0.022
CPC13	Membrane Protein	0.540	0.002	0.305	0.101	-0.430	0.018	0.432	0.017
CPC13	Membrane Protein	0.539	0.002	0.176	0.352	-0.586	0.001	0.682	0.000
CPC14	Soluble Protein	0.537	0.002	0.243	0.195	-0.467	0.009	0.501	0.005
CPC15	Membrane Protein	0.485	0.007	0.001	0.995	-0.673	0.000	0.781	0.000
CPC16	Membrane Protein	0.469	0.009	-0.119	0.532	-0.474	0.008	0.640	0.000
CPC17	Not Predicted	-0.456	0.011	-0.050	0.792	0.767	0.000	-0.831	0.000
CPC18	Membrane Protein	0.453	0.012	-0.063	0.739	-0.369	0.045	0.548	0.002
CPC19	Not Predicted	-0.440	0.015	-0.107	0.575	0.643	0.000	-0.712	0.000
CPC20	Soluble Protein	-0.426	0.019	0.004	0.985	0.421	0.020	-0.540	0.002
CPC21	Membrane Protein	0.397	0.030	-0.020	0.915	-0.581	0.001	0.683	0.000
CPC22	Soluble Protein	-0.392	0.032	-0.284	0.128	0.525	0.003	-0.458	0.011
CPC23	Soluble Protein	-0.392	0.032	0.109	0.566	0.698	0.000	-0.822	0.000
CPC24	Soluble Protein	-0.386	0.035	0.141	0.456	0.462	0.010	-0.603	0.000

分化誘導前の発現量と誘導後の心筋細胞分化の程度に有意な相関の認められたP19由来細胞株中の「心筋細胞分化予測マーカー」候補遺伝子。心筋細胞分化は、分化誘導後の「心筋細胞マーカー遺伝子」の発現の第1主成分、自動能出現までの日数、自動能を有する細胞コロニー数により評価した。黄色は第2主成分とも有意な相関の認められた遺伝子。

r_s : スピアマンの順位相関係数、p: スピアマンの順位相関係数のp-値

図26 P19細胞をレチノイン酸存在下細菌用プレートで1日間培養し、凝集状態の細胞

Control (DMSO 0.1%)



Retinoic acid (1 μM)

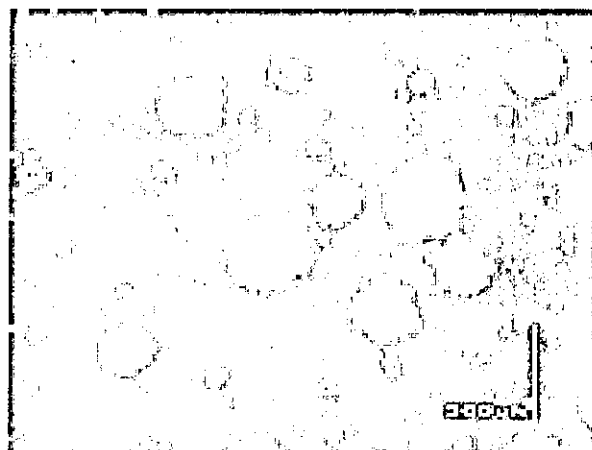
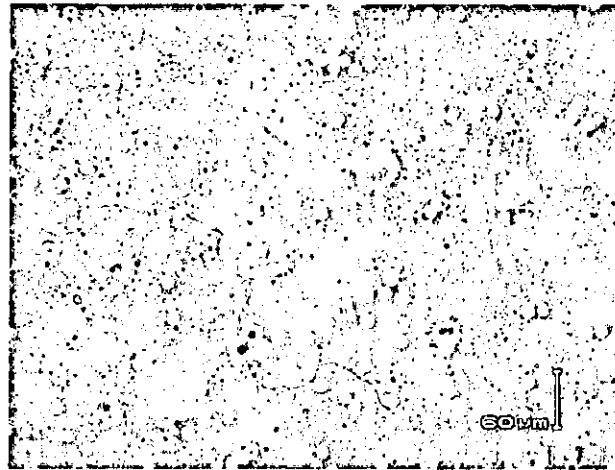


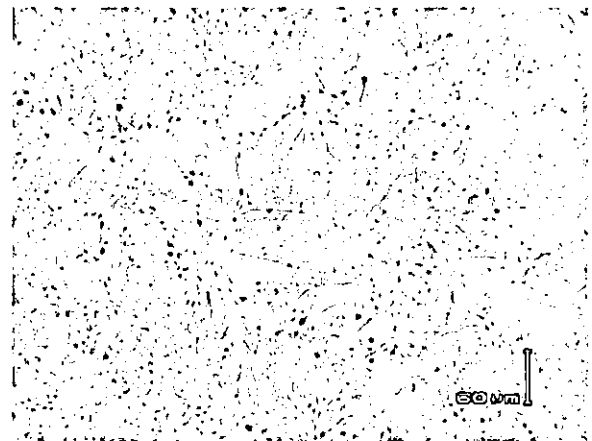
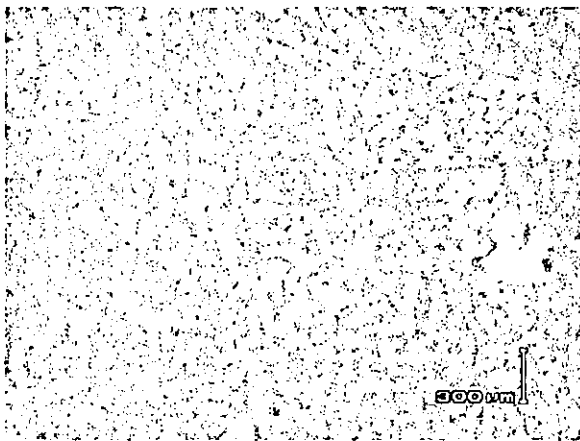
図27 P19細胞をレチノイン酸存在下4日間培養し、分化培地に移し3日目の分化した細胞



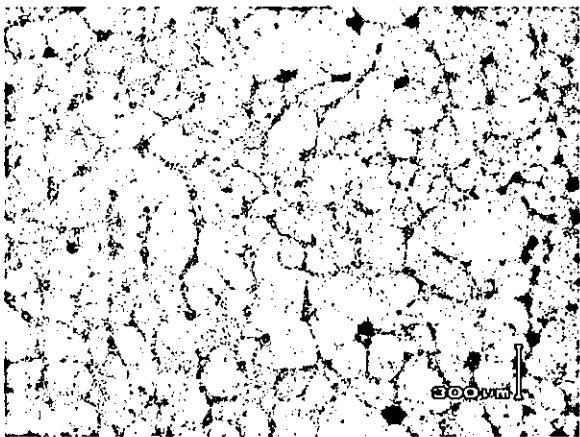
図28 分化誘導後細胞をトリプシンでばらし分化培地で培養した細胞



Control (レチノイン酸を加えないで培養したもの)



1日目 細胞が集まりはじめ、神経突起を伸ばす



3日目 密にネットワークを形成

図29 P19細胞はレチノイン酸でニューロンタイプの神経細胞に分化する

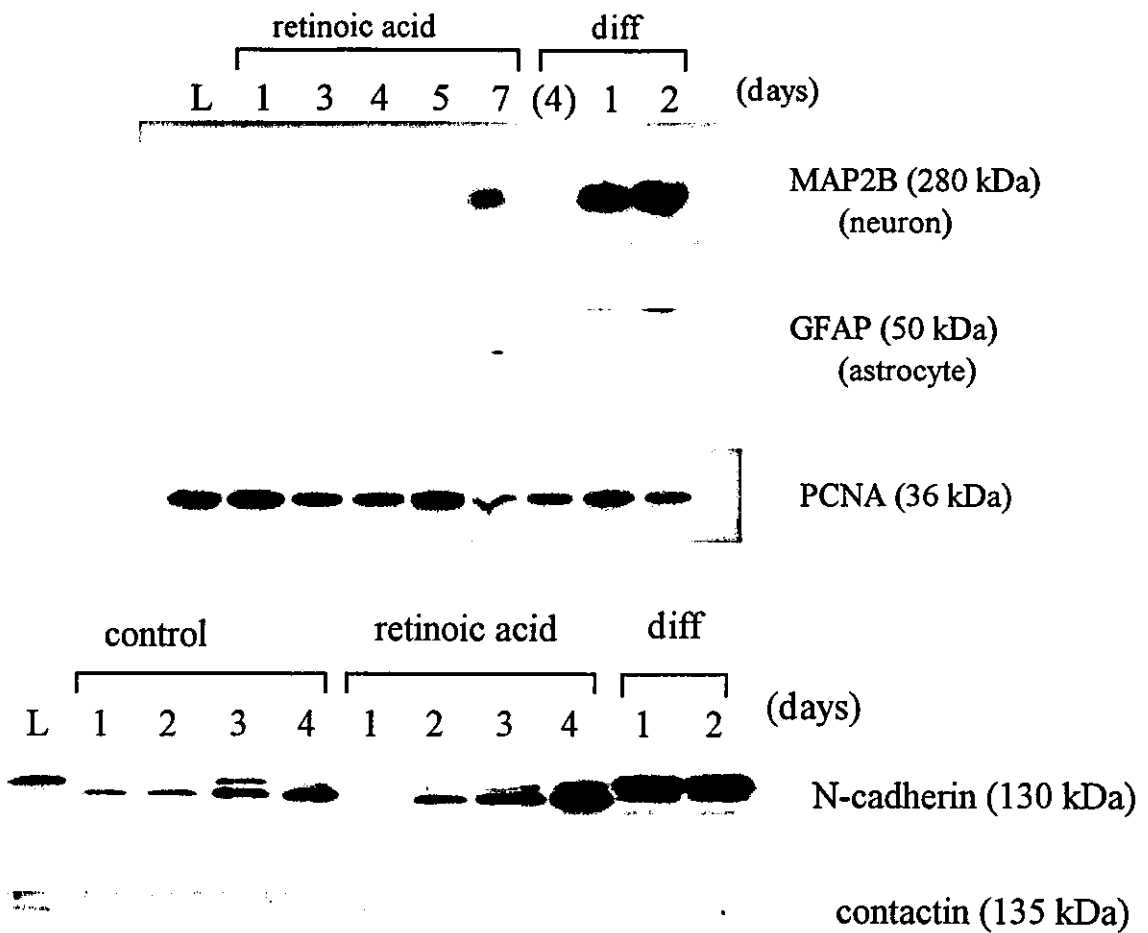


図30 P19細胞の分化誘導時のDNA複製関連因子の挙動

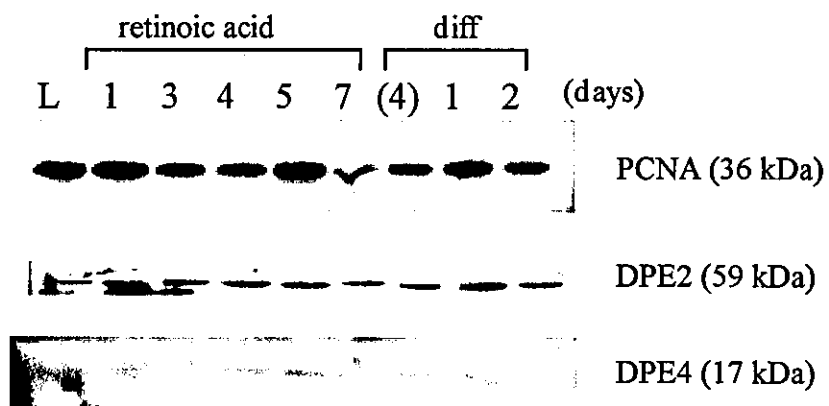


図31 P19細胞の分化誘導時の増殖関連因子の挙動

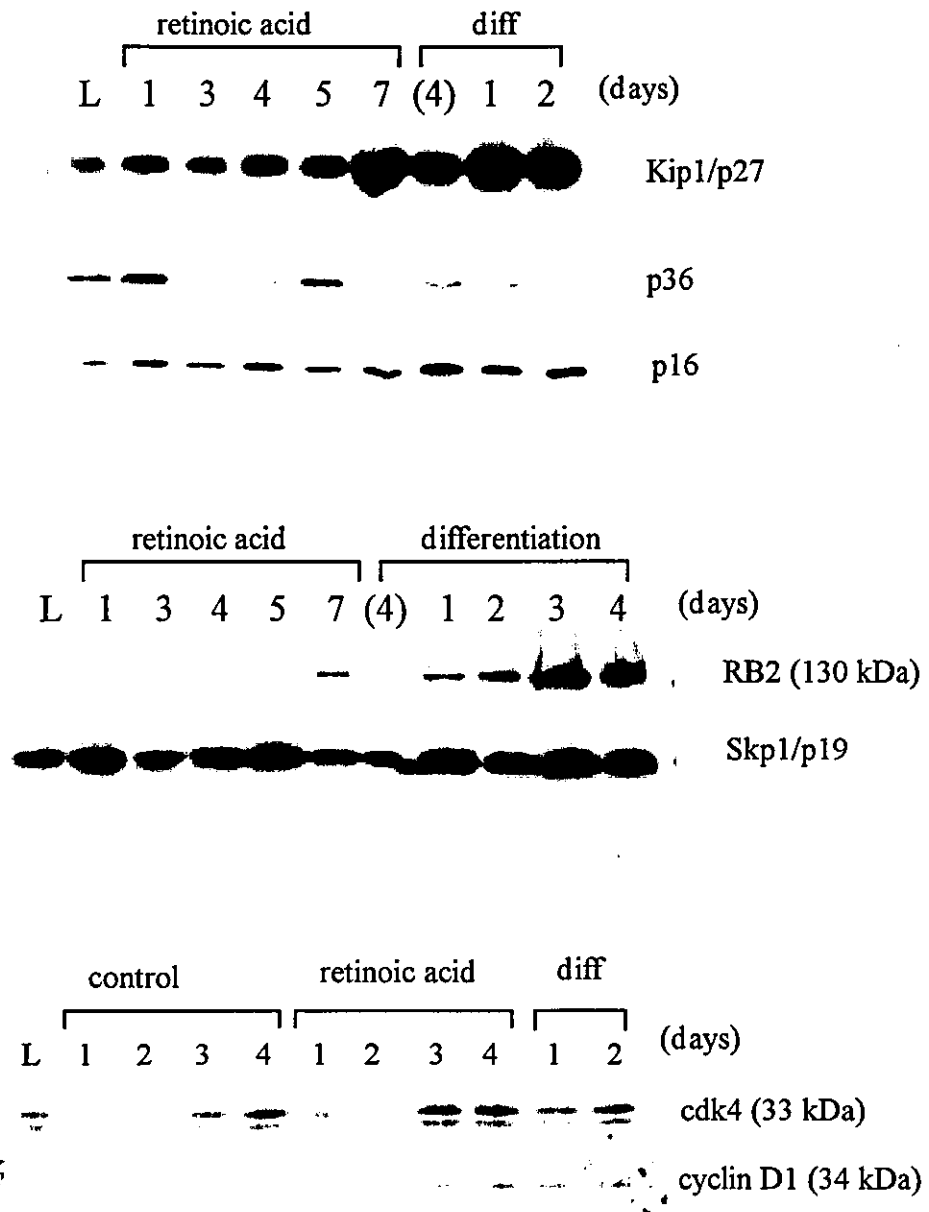
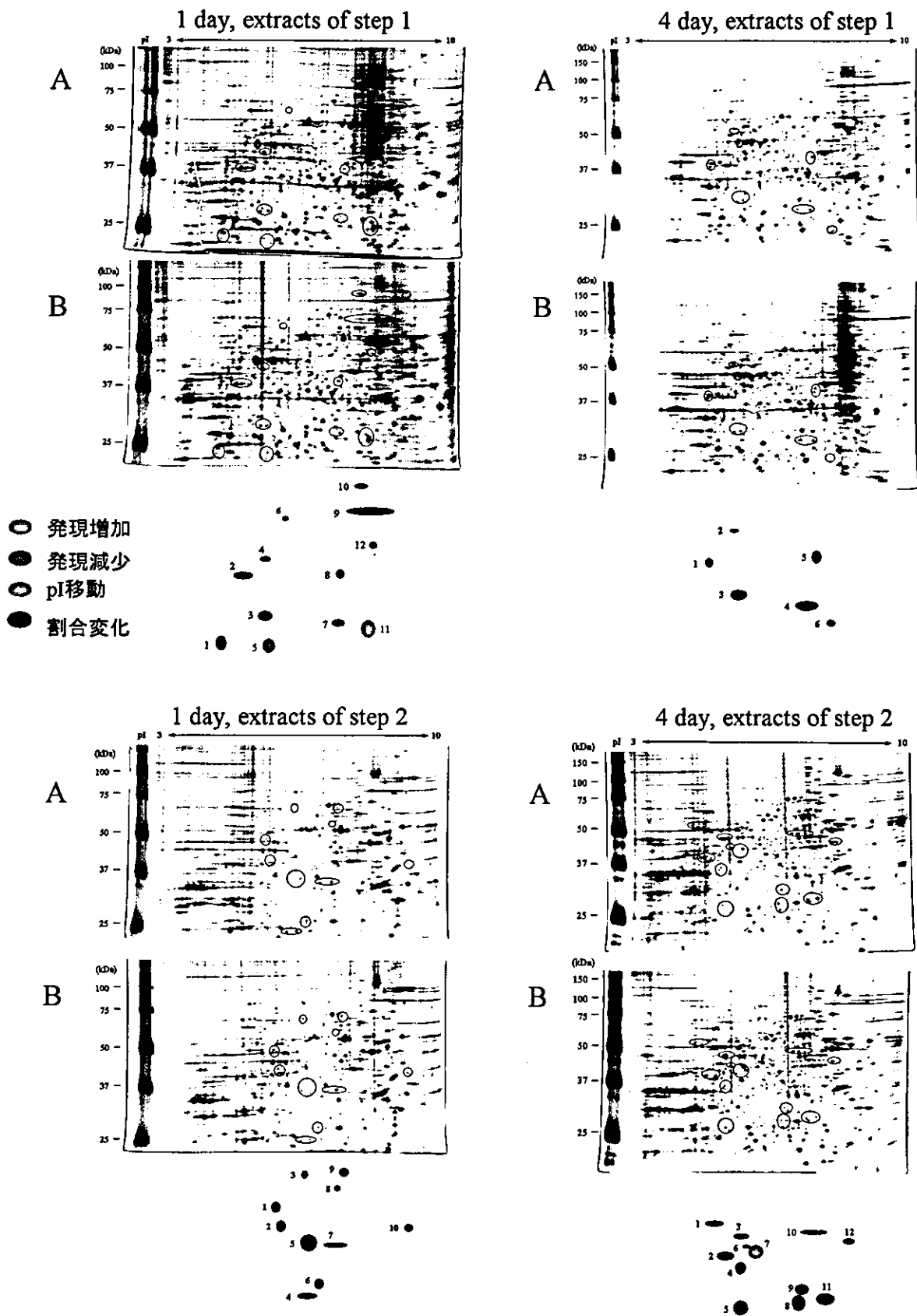


図32 P19細胞の神経細胞分化誘導時のプロテインプロファイル
 (A --- control, B --- + retinoic acid)



細胞治療薬の新規体内動態解析技術の開発研究

分担研究者 川西 徹 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

協力研究者 小林 哲 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官

研究要旨

細胞治療において、治療用細胞で合成される機能性タンパク質の体内動態を解析する方法の開発の一環として、血液中の微量タンパク質を質量分析によって解析する方法の検討を行った。第一に、質量分析イムノアッセイ法（MSIA）で磁性マイクロ粒子を使えば、正常血清からどのようなタンパク質を検出することができるか検討した。その結果、トランスフェリンやリゾチーム、 β_2 -ミクログロブリンなどを検出することができたが、微量タンパクの検出には更なる改善が必要であると考えられた。そこで、熱応答性磁性ナノ粒子を利用したところ、ナノモル濃度レベルの血中インスリンの検出が可能となった。第二に、MALDI-TOF MSの高感度化について検討した。トランスフェリンやBSA等のタンパク質をマトリックス溶液に添加すると、目的とするタンパク質からのシグナルを10倍以上にも増強することが明らかとなった。このシグナル増強は、マトリックスの結晶が小型化したことによるものと考えられた。また、ポリリジンやデキストランなどの各種合成高分子は、それ自身のシグナルを出すことなく目的タンパク質のシグナルを増強すること、さらにこれらの合成高分子は目的タンパク質によって増強する程度がそれぞれ異なることが明らかとなった。これらの成果を組み合わせることで、血液中微量タンパク質のMALDI-TOF MSによる分析が可能になると思われる。

A. 研究目的

細胞治療用細胞の評価においては、機能性タンパクの体内動態解析は、重要な項目の一つである。そこで、近年発展の著しいタンパク質の質量分析法を血中タンパク質解析へ応用するための検討を行った。質量分析としては、現在タンパク質の同定、さらには定量にも汎用されるようになっているマトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を採用した。

血液中のタンパク質を質量分析で解析する場合、主に二つの問題が考えられる。一つは血中に大量に存在するアルブミン等の夾雑物から、いかにして分析を妨害するタンパク質と目的タンパク質を分離し分析するか、ということである。この目的

に適した方法としては、目的タンパク質特異的抗体に結合する分画について質量分析を行う質量分析イムノアッセイ法（Mass Spectrometric Immunoassay (MSIA)）があげられる。MSIAでは特異的抗体と結合した目的タンパク質を分離する方法（BF分離法）として、抗体を結合させたゲル等を遠心分離によって沈降させる免疫沈降法を行うことが多い。しかし近年タンパク質の粗精製に抗体を結合させた磁性マイクロ粒子が有用であることが報告されているので、この磁性マイクロ粒子をMSIAに応用できないか検討した。ついで、目的タンパク質の分離精製を改善するために、抗体を結合するその他の磁性粒子についても検討を加えた。これまで用いてきた磁性マイクロ粒子よりも

粒子サイズが小さい磁性ナノ粒子を使えば、水溶液中での浮遊性が高く、表面積も大きいので、目的タンパク質をより効率的に精製濃縮して検出感度を高めることができると考えられる。通常の磁性ナノ粒子はブラウン運動のために磁石で集めることができないが、温度を変えれば凝集する性質を持ち、磁石で集めることができる熱応答性磁性ナノ粒子が開発されているので、これによって分離の改善に成功した。

血中タンパク質を質量分析する場合の二つめの問題は、血中の微量タンパク質の解析手法として質量分析法の感度は現状では未だ十分ではなく、さらなる高感度化を図る必要がある、ということである。この点については、最近タンパク質をMALDIに用いるマトリックス、 α -cyano 4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 溶液に高分子タンパク質を添加すると、目的とするタンパク質のシグナルが増強される現象を見出した。この現象を利用して感度の上昇法を検討した。

B. 研究方法

1. 試薬：ヒトインスリン、血清、ビオチン標識抗マウス免疫グロブリン G (IgG) 抗体、抗 β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体（クローン BM-63 由来）、CHCA、ヒトトランスフェリン、ウシ血清アルブミン(BSA)、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ポリアルギニン、デキストランおよびポリエチレングリコール（平均分子量 3350 および 8000）は Sigma 社から購入した。抗マウス IgG 抗体結合アガロース、抗インスリンモノクローナル抗体、抗トランスフェリンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗トランスフェリン抗体、抗 β_2 -ミクログロブリンモノクローナル抗体（クローン GJ14 由来）、抗インスリン様成長因子 (IGF)-I モノクローナル抗体、抗 IGF-II モノクローナル抗体、抗フェリチンモノクローナル抗体、ウサギ由来抗フェリチン抗体、抗腫瘍細胞成長因子 (TGF)- β_1 モノクローナル抗体、および抗アクチビン A モノクローナル抗体は CosmoBio 社より

購入した。ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子、抗マウス IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子、および抗ウサギ IgG 抗体結合磁性マイクロ粒子は QIAGEN 社より購入した。ビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子 (Therma-Max) はチッソ(株)よりアビジン処理した状態で供与されたものを用いた。ヒト IgG、ポリビニルピロリドン、およびポリエチレングリコール（分子量 15,000-25,000、300,000-500,000、1,500,000-2,000,000、3,500,000-4,000,000）は和光純薬から、ポリビニルアルコールは Acros 社からそれぞれ購入した。

2. 磁気による BF 分離：10 μ l の抗インスリンモノクローナル抗体溶液 (0.1 mg/ml) を 1.5 ml チューブにとり、90 μ l の抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を添加して攪拌後、室温で 10 分間静置した。チューブに磁石を当てながら上清を除去して、得られた粒子に 90 μ l の 50mM tris buffered saline (TBS, pH7.5) を添加して懸濁し、10 μ l づつとって 0.2 ml チューブに分注した。90 μ l の TBS と 10-90 μ l の試料を添加して混和攪拌後、室温で 30 分間静置した。上清を除去し、粒子を洗浄した後、10 μ l の CHCA 溶液 (10 mg/ml in 50% acetonitrile, 50% 0.1% TFA) を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。なお、熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合には、水浴上で 2 分間の冷却により粒子を凝集させてから上清を除去した。

3. 遠心による BF 分離：抗インスリン抗体溶液に抗マウス IgG 抗体結合アガロース懸濁液を添加して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心後に上清を除去して、得られた沈殿に TBS を添加して懸濁し、チューブに分注した。10 μ l のインスリン添加ヒト血清試料を混和して攪拌後、室温で 30 分間静置した。遠心で上清を除去し、沈殿を洗浄後、CHCA 溶液を添加して結合画分を溶出させ、質量分析の試料とした。

4. 質量分析：分析試料 2 μ l をスチール製ターゲットプレートの各ウェルに滴下し、室温で乾燥後、MALDI-TOF MS 装置 AB4700 (アプライドバイ

オシステム社)にて質量分析を行った。レーザーは neodymium: yttrium aluminum garnet (Nd:YAG; 355nm)を使用し、リニアモードで、ポジティブイオンを検出した。50回のレーザーショットの平均を取ってスペクトルを生成した。得られたスペクトルはデータプロセッサアプリケーション (アプライドバイオシステム社)によってバックグラウンド補正とノイズ低減化をかけてからシグナル強度を得た。このアプリケーションは、検出限界の決定にも用いた。

5. シグナル増強作用の検討: シグナル増強剤として、トランスフェリンその他の高分子をミリQ水 (脱イオン水) に溶解希釈し、2 μ l をとって10 μ l の CHCA 溶液と混合後、さらにインスリン溶液またはその他の試料溶液2 μ l を添加、混合した。このうち2 μ l を質量分析の試料として、シグナル強度を測定した。また、別の2 μ l をカバーガラスに滴下して、室温で乾燥させ、顕微鏡観察の試料とした。

6. 蛍光顕微鏡観察: マトリックス結晶は共焦点レーザー走査顕微鏡 LSM510 (カールツァイス社) でノマルスキー微分干渉像として観察した。また CHCA は蛍光を発するので、アルゴンレーザー (488nm) で励起し、BP505 蛍光フィルターを用いて観察した。結晶の粒径は、LSM ソフトウェア (V2.5, カールツァイス社) で計測した。

C. 研究結果

1. 磁性マイクロ粒子を用いた MSIA による血清中微量タンパク質の検出

1-1. 正常血清についての検討

磁性マイクロ粒子を用いた MSIA によって正常血清からどのようなタンパク質を検出できるか検討した。まず、抗トランスフェリン抗体を用いた場合には、トランスフェリン (80 kDa) の1価イオンや2価イオン ($m/z = 80\ 000, 40\ 000$) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 1A)。血清濃度が高いほどトランスフェリンのシグナルは強い傾向にあったが、夾雑物のア

ルブミンに由来するシグナル ($m/z = 66\ 000, 33\ 000$) 等も強くなるので、ある程度希釈したほうがよいと考えられる。ついで、抗 β_2 -ミクログロブリン抗体を磁性マイクロ粒子に結合させて検討した場合には、 β_2 -ミクログロブリン (11.8 kDa) に相当するシグナルをヒト血清から検出することができた (図 1B)。その他、リゾチームについても相当するシグナルを検出することができたが、IGF-I、IGF-II、フェリチン、TGF- β_1 、アクチビン A、インスリンはトランスフェリン等と同様な条件では検出することができなかった。

1-2. BF 分離に用いる固相の検討

磁性マイクロ粒子よりも浮遊性が高く、表面積も大きい熱応答性磁性ナノ粒子を応用することで MSIA における目的タンパク質の分離を改善できないか、インスリン添加血清10 μ l を試料として検討した。すなわち、アビジン処理したビオチン結合熱応答性磁性ナノ粒子と、ビオチン標識抗インスリンモノクローナル抗体をインキュベートして、抗マウス IgG 抗体結合磁性粒子懸濁液を調製し、ストレプトアビジン結合磁性マイクロ粒子を同様に処理して調製した場合とインスリン検出感度を比較した。

その結果、熱応答性磁性ナノ粒子を用いた場合は1nM のインスリンを検出できた (図 2A)。一方、マイクロ粒子を用いた場合はインスリン以外のタンパク質によるシグナルが多数検出されるためにインスリンシグナルの検出が妨害されてしまい、粗精製法として不十分だった (図 2B)。ちなみに、同様なサンプルを抗 IgG 抗体を結合したゲルを利用して遠心分離する免疫沈降法による粗精製を行い測定した場合は、検出感度は10 nM レベルであった。

2. 高分子化合物添加によるシグナル増強

2-1. タンパク質添加によるマスマスペクトルにおけるインスリンシグナルの増強メカニズムの検討

MALDI-TOF MS を利用した定量法について

内部標準を用いた定量性の検討を進める過程で、内部標準としてウシインスリンをマトリックスに添加しておく、ヒトインスリンのシグナルが増強されることを見出した。そこで各種のタンパクを添加して検討したところ、トランスフェリンや BSA を添加した場合に、とくに強く増強された (図 3)。

トランスフェリンや BSA は、インスリン以外にも、各種目的タンパク質のシグナルを増強し、場合によっては、数十倍のシグナル増強がみられた (表 1)。

MALDI-TOF MS におけるシグナル増強には、マトリックスの結晶構造の変化とリンクする可能性があることが報告されている。そこでマトリックスの CHCA 溶液に系列希釈したトランスフェリンまたは BSA 溶液を添加して乾燥させ、結晶を顕微鏡で観察した。その結果、添加したトランスフェリンなどの濃度に依存して結晶の粒径が小さくなっていることが明らかになった (図 4)。このとき、 $0.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ までのトランスフェリン溶液を添加した場合はインスリンのシグナルもトランスフェリンの濃度に依存して増強され、CHCA に由来する蛍光もほぼすべての結晶に均一に分布した。一方、 $0.25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以上のトランスフェリンを添加した場合にはシグナルは弱くなったが、同時に、蛍光性の不定形な塊と非蛍光性の結晶が増加していたことから、CHCA とトランスフェリン、インスリンの分布が非均一になったためと考えられた。

以上の結果から、トランスフェリンや BSA 添加によるインスリンシグナルの増強は、マトリックス結晶が小さくなり、結晶の表面積が増えることによって、インスリンの脱離イオン化反応が促進されたためと考えられた。

2-2. 合成高分子添加によるトランスフェリンシグナルの増強

適切な量のトランスフェリンや BSA を添加してシグナルを増強することは、微量のタンパクやペプチドを解析するうえで有用だと考えられるが、

そのもの自身によってもシグナルが発生するため、目的タンパク質のマススペクトルを複雑にする等の不利益も考えられる。特に IgG 等の高分子を解析する際には目的タンパク質のシグナルを妨害する可能性が高い。そこで、トランスフェリンを目的タンパク質として、各種合成高分子を CHCA に添加してシグナル増強剤として使えるかどうか検討した。インスリンシグナルと同様にトランスフェリンのシグナルも BSA の添加によって増強されるが、添加した BSA 自体に由来するシグナルも目的タンパク質であるトランスフェリンのシグナルの近くに検出された (図 5B)。一方、デキストラン等の合成高分子の多くは、高分子に由来するシグナルを発生させない条件を容易に設定することができた (図 5C)。

2-3. 各種合成高分子化合物によるタンパク質シグナルの増強

フェリチンや IgG 等のタンパク質を試料として、ポリリジンやデキストランを含む各種の合成高分子を CHCA に添加してシグナルにどのような影響を与えるか検討した。その結果、フェリチンについてはポリリジンやデキストランを含む多くの合成高分子がシグナルを増強した (表 2)。一方、IgG のシグナルを二倍以上増強した合成高分子は、高分子量のポリリジンと低分子量のポリエチレングリコールのみであった。

低分子ペプチドである ACTH フラグメントのシグナルは、BSA またはトランスフェリンの添加では増強されなかったが、ポリリジンやデキストランの添加では増強された (表 3)。一方、インスリンやシトクロム C、アポミオグロビン等は、トランスフェリンや BSA だけでなく、ポリリジンやデキストラン添加によってもシグナル増強を受けたが、ポリビニルアルコールやポリエチレングリコールによってはあまり強いシグナル増強を受けなかった。分析対象物の分子量だけでなく、コンフォメーションや疎水性、電荷などの特性も脱離イオン化においては重要な役割を果たすと考えられており、ポリビニルアルコールやポリエチ

レングリコールを添加した場合には分子量以外の特性がシグナル増強作用に大きな役割を果たすと思われる。

D. 考察

本研究では、まず目的タンパク質の粗精製に磁性マイクロ粒子を利用する MSIA によって、血液中の内在性タンパク質の質量分析による検出を試みた。その結果、比較的高濃度存在するトランスフェリン、リゾチーム、 β_2 ミクログロブリンの検出に成功したが、IGF-I、IGF-II、フェリチン等は検出できなかった。したがって、抗体の力価、あるいは共存するタンパク質の影響はあるものの、一般的にはサブ μ M 程度の濃度が現状の磁性マイクロ粒子を用いた方法で検出可能と考えられた。細胞治療用細胞から分泌される生理活性タンパク質の多くが、生理的条件下では通常 nM オーダー以下の血液中濃度と考えられるので、磁性マイクロ粒子を用いた MSIA では測定困難と思われる。そこで、さらにより大きな表面積を有し、精製濃縮効率の改善が期待される熱応答性磁性ナノ粒子の応用を試みた。その結果、nM オーダーの濃度のインスリンを検出することができた。

この熱応答性磁性ナノ粒子は貴重なサンプルであることから、研究期間中これ以上の検討はできなかったが、測定条件を更に検討し、使用する抗体等をさらに精査、選別すれば、サブ nM という実用的なレベルの感度を実現できる可能性がある。

トランスフェリンあるいは BSA をマトリックス溶液に添加すると MALDI-TOF MS の各種目的タンパク質のシグナルが増強するという現象は、(1)シグナル増強メカニズムがどうであるかという基礎的な興味、(2)高分子タンパク質の質量分析の高感度化技術開発という実用的な興味、の両面から極めて意義深い発見である。

トランスフェリンや BSA 添加によるインスリンシグナル増強のメカニズムについては、マトリックスの結晶形の小型化によって説明可能であった。しかし一方、合成高分子の場合は、トランス

フェリンや BSA ほど明瞭な結果は得られず、結晶形の小型化以外の要因もシグナル増強現象に関わる可能性も考えられ、今後の更なる検討が必要と思われた。

本研究によって天然のタンパク質以外に、様々な合成高分子化合物も目的タンパク質シグナルを増強することが明らかとなった。この増強現象は、高分子化合物の種類の違い、あるいはシグナル増強をうけるタンパク質の違いによって全く異なったものとなる。今現在、この違いを統一的に解釈することが可能な原理を見出すことはできていない。しかし、今後現象の整理をさらに進めることにより、例えば、特定のタンパク質シグナルを増強するようなシグナル増強剤の設計が可能となるだろう。あるいは今現在検出が困難な高分子量のタンパク質のシグナルを増強する高分子化合物が開発できれば、MALDI-TOF MS のタンパク質研究における有用性をさらに大きく広げる技術となるだろう。

E. 結論

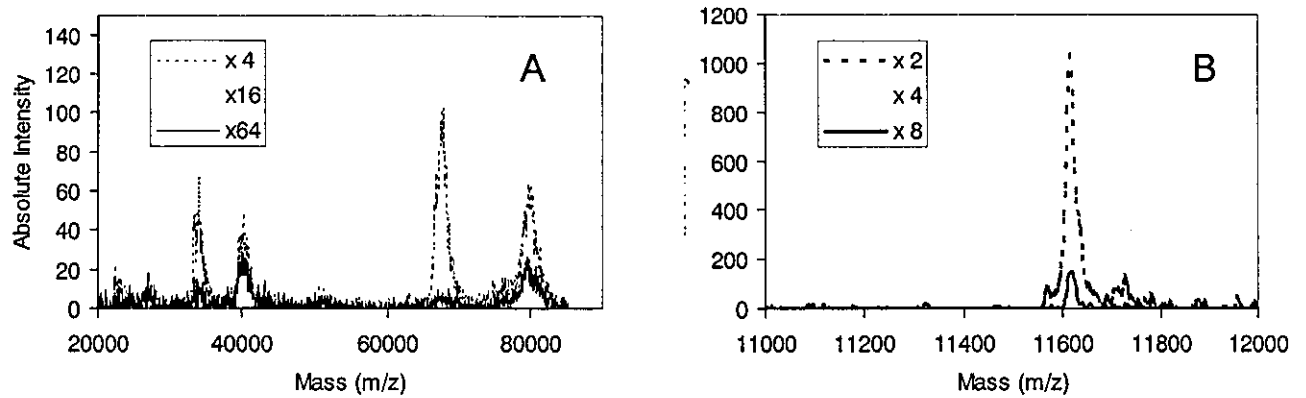
磁性マイクロ粒子を利用した血中のトランスフェリン、リゾチーム、 β_2 ミクログロブリンの MSIA を確立するとともに、熱応答性磁性ナノ粒子を用いることによって血中微量タンパク質の分析が可能であることを示唆する結果を得た。また、各種のタンパク質や合成高分子をマトリックス溶液に添加することにより、MALDI-TOF MS におけるタンパク質シグナルの増強が可能であることを見出した。これらの技術を組み合わせることにより、治療用細胞で生合成された機能性タンパク質の体内動態解析が可能になるものと考えられる。

F. 研究成果

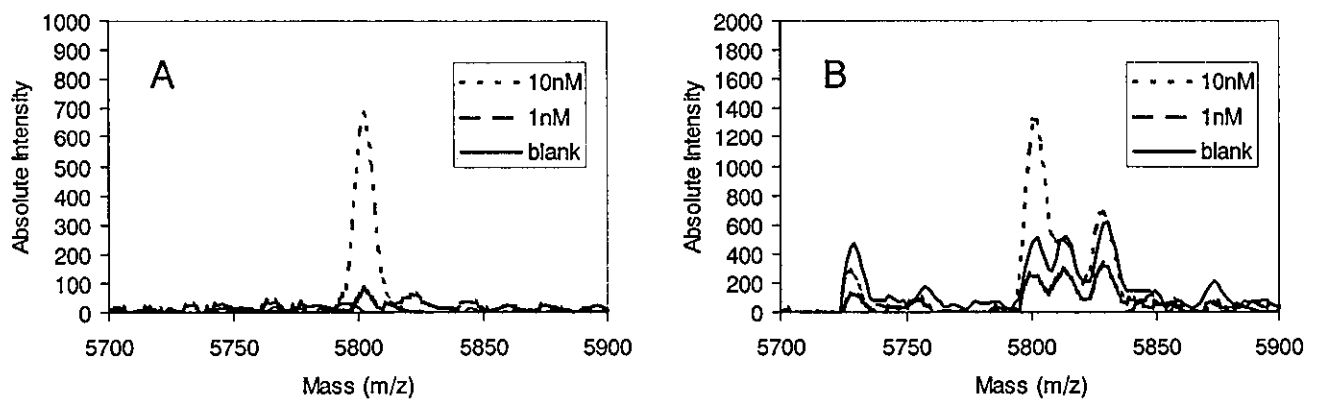
1. 論文発表

- 1) Ishii-watabe, E. Uchida, A. Iwata, R. Nagata, K. Satoh, K. Fan, M. Murata, H. Mizuguchi, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, Detection of Replication-Competent

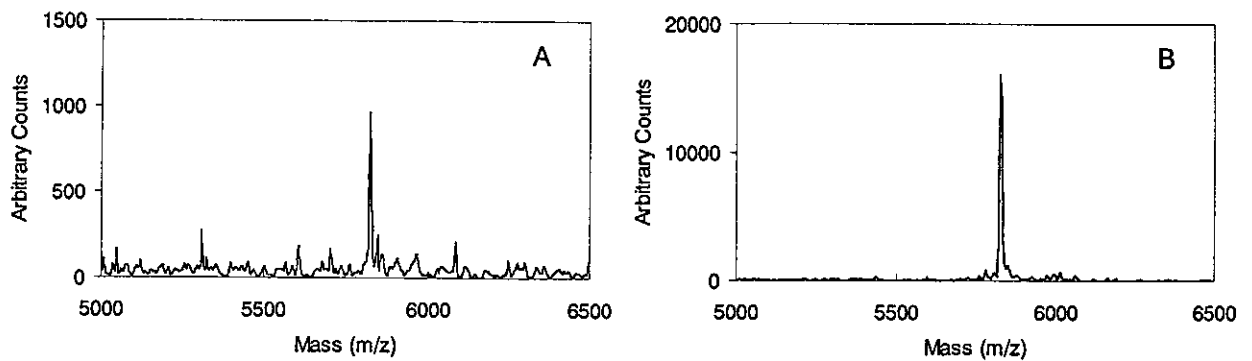
- Adenovirus Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR, *Mol. Therapy*, **8**, 1009-1016 (2003)
- 2) 川西 徹, 松木 滋, 品質に関するトピックの動向 -Q5E: バイオ医薬品のコンパラビリティ-, *医薬品研究*, **34**, 508-512 (2003)
- 3) T. Kobayashi, H. Kawai, T. Suzuki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa, Improved sensitivity of insulin in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry by premixing α -cyano-4-hydroxycinnamic acid with transferrin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1156-1160 (2004)
- 4) N. Kawasaki, N. Hashii, S. Itoh, M. Hyuga, T. Kawanishi, T. Hayakawa: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, **48**, 5-10 (2004) (Japanese)
- 5) S. Itoh, A. Harazono, N. Kawasaki, N. Hashii, Y. Matsuishi, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Glucosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J. Electrophoresis*, **48**, 163-168 (2004) (Japanese)
- 6) K. Takagi, R. Teshima, H. Okunuki, S. Itoh, N. Kawasaki, T. Kawanishi, T. Hayakawa Y. Kohno, A. Urisu, and J. Sawada: Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **136**, 23-32 (2005)
- 7) J. Yuan, N. Hashii, N. Kawasaki, S. Itoh, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Isotope tag method for quantitative analysis of carbohydrates by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, (in press)
- 8) A. Harazono, N. Kawasaki, T. Kawanishi, and T. Hayakawa: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Glycobiology*, (in press)
- 9) T. Kobayashi, H. Kawai, T. Suzuki, T. Hayakawa, and T. Kawanishi, Crystal size reduction: Possible mechanism of signal enhancement of protein in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (Under submission)
2. 学会発表
- 1) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強, 日本薬学会第 124 年会, 大阪 (2004, 3)
- 2) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS, 第 52 回質量分析総合討論会, 名古屋 (2004, 6)
- 3) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 川西 徹, 早川堯夫: MALDI-TOF MS におけるタンパク質のシグナル増強 Part2, 日本薬学会第 125 年会, 東京 (2005, 3 発表予定)
- 4) 小林 哲, 河合 洋, 鈴木琢雄, 石井明子, 早川堯夫, 川西 徹: Protein signal enhancement in MALDI-TOF MS Part2, 第 53 回質量分析総合討論会, さいたま (2005, 5 発表予定)



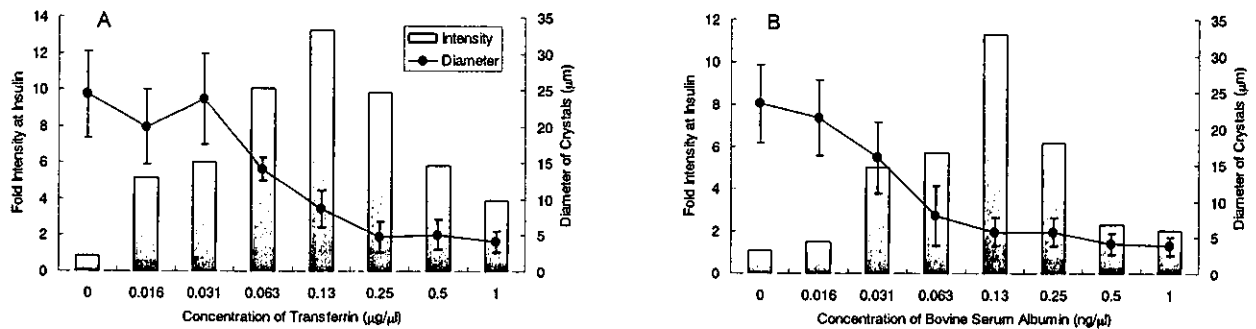
- 図1. (A) 抗トランスフェリン抗体または (B) 抗 β_2 ミクログロブリンモノクローナル抗体を結合した磁性マイクロ粒子で、希釈正常ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



- 図2. 抗インスリン抗体を結合した (A) 熱応答性磁性ナノ粒子または (B) 磁性マイクロ粒子で、インスリン添加ヒト血清を精製した場合における結合画分のマスペクトル



- 図3. (A) コントロールCHCAまたは (B) トランスフェリン添加CHCAをマトリックスとした場合におけるヒトインスリンのマススペクトル

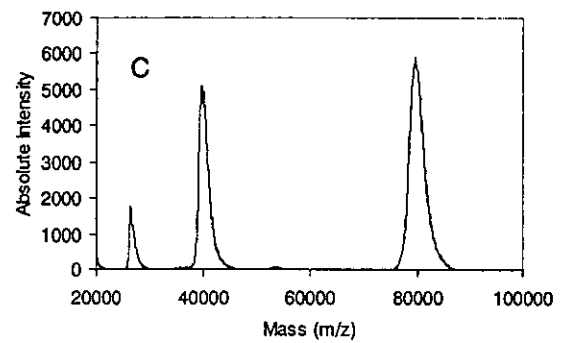
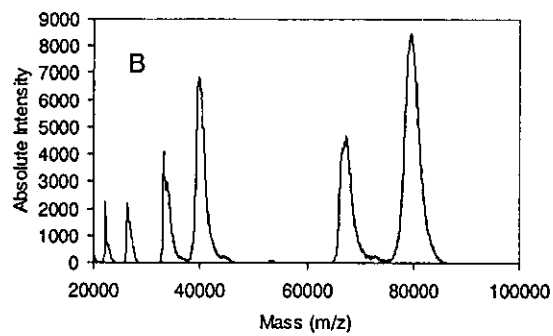
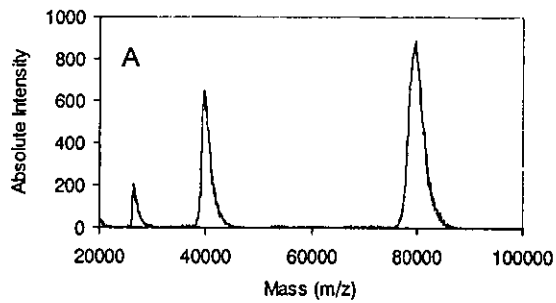


- 図4. (A)トランスフェリン添加CHCAまたは (B) BSA添加CHCAをマトリックスとした場合におけるインスリンシグナルの強度倍率と結晶径の添加物濃度に対する依存性
- 強度倍率は相当するコントロールに対するシグナル強度相対比の平均値 (N=3) 結晶径は平均値±標準偏差 (N=10)

表 1. トランスフェリンまたはBSA添加CHCAマトリックスを用いたときのペプチドタンパク質混合試料に由来するシグナルの強度

	water		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

Each entry is the average of the most intense signal from four samples. nd: no signal was detected



- 図5. (A) コントロールCHCA (B) BSA添加CHCAまたは (C) デキストラン添加CHCA をマトリックスとした場合におけるTfの質量分析スペクトル

表2. 高分子添加CHCAマトリックスを用いたときの各種タンパク質に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[F1] +	[BSA] +	[Tf] +	[IgG] 2+
poly-L-lysine (MW 500-2,000)	3.30 ± 2.09	8.75 ± 4.24	7.90 ± 3.87	1.62 ± 0.47
poly-L-lysine (MW 1,000-4,000)	6.11 ± 1.92	6.55 ± 1.03	23.00 ± 6.03	1.53 ± 0.41
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	4.60 ± 3.27	11.13 ± 2.09	7.72 ± 4.97	1.13 ± 0.49
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	7.62 ± 0.32	10.20 ± 1.68	7.89 ± 1.73	1.44 ± 0.33
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	4.89 ± 0.83	12.41 ± 1.22	9.87 ± 4.22	2.55 ± 0.55
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	7.25 ± 4.05	13.54 ± 2.13	11.08 ± 3.23	1.08 ± 0.40
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	4.65 ± 0.99	10.64 ± 3.20	13.11 ± 2.97	2.47 ± 0.20
poly-L-lysine (MW >300,000)	5.15 ± 2.38	9.79 ± 0.53	6.99 ± 2.05	3.50 ± 1.68
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	3.62 ± 0.86	1.55 ± 0.87	5.20 ± 2.88	0.22 ± 0.13
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	4.91 ± 1.80	2.90 ± 0.48	8.60 ± 2.31	0.88 ± 0.11
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	4.30 ± 1.38	6.03 ± 2.85	14.35 ± 2.10	1.84 ± 0.38
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	1.09 ± 0.62	0.70 ± 0.46	1.30 ± 1.27	0.84 ± 0.16
polyvinylpyrrolidone (average MW 40,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyvinylpyrrolidone (average MW 360,000)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.00 ± 0.00
polyethylenglycol (average MW 3,350)	8.51 ± 3.76	13.33 ± 4.50	42.59 ± 19.36	4.73 ± 1.73
polyethylenglycol (average MW 8,000)	1.17 ± 0.69	3.17 ± 1.58	24.34 ± 9.77	2.82 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	2.73 ± 0.40	3.41 ± 1.23	13.74 ± 4.26	2.00 ± 1.09
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.73 ± 0.36	3.38 ± 1.76	6.99 ± 1.87	1.19 ± 0.47
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.90 ± 0.34	4.14 ± 2.28	11.21 ± 2.85	0.60 ± 0.16
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.88 ± 0.50	5.17 ± 2.19	2.43 ± 0.51	0.19 ± 0.06
dextran (average MW 10,000)	5.27 ± 1.50	8.67 ± 1.61	11.45 ± 4.41	1.12 ± 0.15
dextran (average MW 40,000)	2.66 ± 1.18	16.25 ± 4.60	11.87 ± 3.34	1.33 ± 0.25
dextran (average MW 70,000)	5.01 ± 0.91	10.75 ± 2.65	13.08 ± 4.85	1.53 ± 0.22
dextran (average MW 200,000)	9.89 ± 4.03	12.98 ± 4.05	17.27 ± 2.38	0.98 ± 0.36
dextran (average MW 500,000)	2.93 ± 0.73	11.73 ± 1.26	16.37 ± 1.73	0.79 ± 0.24
dextran (average MW 20,000,000)	11.24 ± 3.84	19.32 ± 8.11	5.43 ± 0.93	1.14 ± 0.14

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.

表3. 高分子添加CHCAを用いたときのペプチドタンパク質混合試料に由来するシグナルの強度倍率

macromolecule	[ACTH 18-39] +	[insulin] +	[cytochrome C] +	[apomyoglobin] +
poly-L-lysine (MW 4,000-15,000)	1.76 ± 0.30	0.97 ± 0.05	12.89 ± 5.76	3.84 ± 0.58
poly-L-lysine (MW 15,000-30,000)	1.62 ± 0.21	1.98 ± 0.87	38.16 ± 18.19	27.50 ± 14.02
poly-L-lysine (MW 30,000-70,000)	1.49 ± 0.27	1.15 ± 0.38	20.26 ± 7.30	4.75 ± 1.72
poly-L-lysine (MW 70,000-150,000)	1.83 ± 0.09	4.29 ± 1.03	33.40 ± 6.55	15.58 ± 6.35
poly-L-lysine (MW 150,000-300,000)	2.25 ± 0.25	3.74 ± 0.30	15.21 ± 3.81	2.56 ± 0.76
poly-L-lysine (MW >300,000)	1.49 ± 0.16	5.14 ± 0.63	19.07 ± 8.49	9.33 ± 6.13
poly-L-glutamic acid (MW 50,000-100,000)	1.49 ± 0.74	2.77 ± 1.01	1.50 ± 0.48	9.05 ± 1.73
poly-L-arginine (MW 70,000-150,000)	0.68 ± 0.33	9.65 ± 3.42	7.07 ± 2.98	11.78 ± 7.14
polyvinyl alcohol (average MW 16,000)	0.87 ± 0.30	1.57 ± 0.24	0.60 ± 0.31	0.31 ± 0.22
polyvinyl alcohol (average MW 95,000)	0.57 ± 0.36	0.47 ± 0.14	0.93 ± 0.65	0.62 ± 0.39
polyethylenglycol (average MW 3,350)	0.64 ± 0.09	1.25 ± 0.35	1.92 ± 1.02	2.04 ± 0.96
polyethylenglycol (average MW 8,000)	0.23 ± 0.02	1.06 ± 0.17	0.73 ± 0.34	1.18 ± 0.46
polyethylenglycol (MW 15,000-25,000)	0.14 ± 0.05	1.30 ± 0.64	1.37 ± 0.54	1.32 ± 0.38
polyethylenglycol (MW 300,000-500,000)	0.07 ± 0.04	1.11 ± 0.56	1.94 ± 0.98	1.06 ± 0.23
polyethylenglycol (MW 1,500,000-2,000,000)	0.24 ± 0.14	1.60 ± 0.71	1.44 ± 0.46	1.20 ± 0.57
polyethylenglycol (MW 3,500,000-4,000,000)	0.12 ± 0.10	1.62 ± 0.74	2.35 ± 1.30	1.34 ± 0.71
dextran (average MW 10,000)	0.80 ± 0.12	2.13 ± 0.91	13.79 ± 5.48	2.50 ± 0.67
dextran (average MW 40,000)	1.27 ± 0.24	3.36 ± 0.88	5.81 ± 2.61	1.40 ± 0.43
dextran (average MW 70,000)	1.24 ± 0.13	3.49 ± 0.64	10.75 ± 4.01	2.82 ± 0.88
dextran (average MW 200,000)	1.05 ± 0.21	5.32 ± 0.79	12.66 ± 3.29	3.68 ± 1.61
dextran (average MW 500,000)	0.86 ± 0.12	7.50 ± 1.03	17.30 ± 3.13	11.21 ± 2.02
dextran (average MW 20,000,000)	0.87 ± 0.25	12.23 ± 3.69	20.38 ± 7.31	5.44 ± 1.99

Each entry is the average of the most intense signal from three samples. nd: not determined.

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 原園 景 （国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 主任研究官）
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）
協力研究者 橋井 則貴 （国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）

研究要旨 我々は、細胞発現タンパク質プロファイリング、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。平成15及び16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、及びタンデム型質量分析装置またはイオントラップ型質量分析装置を利用して糖鎖を特異的に解析する方法を開発し、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。そこで平成15、及び16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、及びタンデム型質量分析装置、または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開発することによって、ゲル内糖タンパク質の糖鎖解析を可能にすることを検討した。

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 フェトプロテインにはN結合糖鎖結合部位が1箇所存在し、複合型糖鎖が結合している(Fig. 1)。セルロプラスミンには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。さらに、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。