

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, 和光純薬株式会社製を用いた. PD-10 カラムは, Amersham Pharmacia 社製を使用した. ラット脳はより日本エスエルシー株式会社より購入した

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) 糖タンパク質のトリプシン消化

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) 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 \times 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 \times 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 相に冷アセトンを 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) Thy-1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.

10) タンデム型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

分析条件は以下の通りである.

試料:

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 µg (タンパク量換算)

CP 0.2 µg (m/z 400-2000)

1.0 µg (m/z 1000-2000)

(タンパク量換算)

HS-Alb 0.01 µl (試料血清換算)

HPLC:

装置: Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社)

カラム: MAGIC C18

(Michrom BioResource 社製, 0.2×50 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 µl/min

MS/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。

11) イオントラップ型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

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℃

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

12) 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。

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. タンデム型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

平成 15 年度は, ペプチド/糖ペプチドマッピングにタンデム型質量分析装置を導入することによって, 効率的に糖ペプチドを解析する方法を検討した。モデル糖タンパク質として, αフェトプロテイン, セルロプラスミン, 及びヒト血清を用いた。

(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の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 FTKVNFTEIQK 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、糖タンパク質の消化物をタンデム型質量分析装置で分析することによって、糖ペプチドの特異的解析が可能となることが明らかとなった。

2. イオントラップ型質量分析装置を用いたペプチド/糖ペプチドマッピング

平成 16 年度は、電気泳動ゲルから糖タンパク質を丸ごと抽出した後、プロテイナーゼ消化することによって、糖ペプチド回収率を向上させることを目指した。また、昨年度用いたデータ依存的 CID-MSMS に加えて、データ依存的 CID 多段階 MS 及び In-source CID の同時分析が可能である liner ITMS を導入することによって、さらに糖ペプチド特異的なペプチド/糖ペプチドマッピングの開発を行った。

(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 (Fig. 9)。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。Fig. 10A 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) 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、通常の検索方法では、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。

2) Asn74 結合糖鎖の解析 (Val69-Lys78)

Fig. 11 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。Fig. 11B 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 b₁ 及び y₁ 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構造は、前年度、タンデム型質量分析装置を用いた糖ペプチド解析と同様に、プロダクトイオンスペクトルを基に解析した。まず、単糖組成は糖鎖プリカーサーイオンから算出された糖ペプチドの分子量 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、dHex₂Hex₅HexNAc₄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_{2a}⁺(*m/z* 512⁺)、及び B_{3a}⁺(*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_{2a}/Y_{5a}⁺(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_{1a}⁺(*m/z* 1,456⁺), Y_{2a}⁺(*m/z* 1,660⁺), 及び Y_{3a/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_{3a/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、Fig. 11A 中に示すようなハイ

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 (Table 3)。

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。Fig. 12 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_{1a}⁺(*m/z* 1,467⁺), Y_{2a}⁺(*m/z* 1,670⁺), 及び Y_{3a/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_{3a/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⁺,

$B_{4\alpha}/Y_{3\alpha}^+$, $Hex_2HexNAC_1(m/z\ 528^+, B_{3\alpha}^+)$, $Hex_3HexNAC_1(m/z\ 690^+, B_{4\alpha}/Y_{3\beta/3\gamma}^+)$, $Hex_3HexNAC_2(m/z\ 893^+, B_{4\alpha}/Y_{3\beta}^+)$, $Hex_4HexNAC_2(m/z\ 1055^+)$, $Hex_5HexNAC_2(m/z\ 1217^+)$, 及び $Hex_6HexNAC_2(m/z\ 1380^+, B_{4\alpha}^+)$ が検出されたことから、結合糖鎖の構造は、Fig. 12 中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、 $m/z\ 1,525.78^{2+}$ 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(Table 3).

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。

Fig. 11B 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⁺)のマスキロマトグラムである。 $m/z\ 204^+$ のマスキロマトグラムでは、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。 $m/z\ 292^+$ のマスキロマトグラムでは、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 81 u のニュートラルロスが生じたイオンのマスキ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 (Fig. 11E)。In-source CID で得られた $m/z\ 204^+$ のマスキ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。

Fig. 13A は、ピーク T4 に溶出された糖ペプチド ($m/z\ 937.27^{3+}$, 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、 $m/z\ 898^{2+}$ 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 $m/z\ 898^{2+}$ 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 $m/z\ 898^{2+}$ 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 (Table 13B)。

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、 $Hex_5HexNAC_2$ 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

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 (Table 3).

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。

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

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。

Fig. 14 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 $\text{Man-PO}_4\text{-EtN}^+$ (m/z 286⁺)、及び $\text{PO}_4\text{-Inositol-GlcN}^+$ (m/z 422⁺) のマスキ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 (Fig. 14B, 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) GPI 構造の解析

Fig. 15 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、 $\text{PO}_4\text{-Man-GlcN}^+$ (m/z 404⁺)、 $\text{EtN-PO}_4\text{-Man-GlcN}^+$ (m/z 447⁺) 及び $\text{EtN-PO}_4\text{-(GalNAc)-Man-GlcN}^+$ (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、 $[\text{peptide+EtN}]^+$ (m/z 787⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4]^+$ (m/z 867⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man}]^+$ (m/z 1,191⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,476⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-(GlcN)-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,637⁺)、 $[\text{peptide+EtN-PO}_4\text{-Man-Man-(Ino-PO}_4\text{-GlcN)-Man-PO}_4\text{-EtN}]^+$ (m/z 1,897⁺) から、この GPI 結合ペプチドは、Asp106-Cys111 に、Fig. 15 中に示す 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、 $R_1=-\text{Man}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{GalNAc}$ 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 Fig. 15 中に示した 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、 $R_1=-\text{HexNAc}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{HexNAc}$, 糖ペプチド m/z 1,213²⁺ の側鎖構造は、 $R_1=\text{Hex}$, $R_2=-\text{PO}_4\text{-EtNH}_2$, $R_3=-\text{H}$, $R_4=-\text{HexNAc-Hex}$ (または、 $R_3=-\text{Hex}$, $R_4=-\text{HexNAc}$) 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。

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⁺ のマスクロマトグラム(Fig. 14D 及び E), CID-MS/MS による neutral loss 81 u のマスクロマトグラム(Fig. 14G) 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。

平成 15 年度、我々は、LC/MS/MS を用いて効率的に糖ペプチドを解析する方法を模索した。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、ペプチド混合物ピークの中からいかに糖ペプチドピークを特定するかという点にある。現在、プリカーサーイオン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、糖特異的イオンを指標として MS/MS スペクトルを選び出し、プロダクトイオンを帰属することで、糖ペプチドの構造をより正確に解析できることを見出した。

平成 16 年度は、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。ここでは、データ依存的 CID-MS/MS だけでなく、データ依存的 CID-MSⁿ、In-source CID など様々なスキンの同時進行が可能である 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を検討した。

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、平成 15 年度に見出した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で、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, 複数のプロテイ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た。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た糖特異的検出法を開発することによって, ゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析に成功した。

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 MATSUIISHI, 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 HARZONO, 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)
 - 11) 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)
 - 12) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Miyako OHTA., and Takao HAYAKAWA: Microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein by capillary liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 316, 15-22 (2003)
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「マススペクトロ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)
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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
 - 17) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, 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
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) 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
 - 21) Yayoi Yakehara, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Toru Kawanishi, Koh Nomura, Hiroko Matsushita-Oikawa, and Haruko Ogawa: Characterization of the glycans of bovine erythrocyte membrane glycophorin. 第77回日本

生化学会大会 (2004. 10)横浜

- 22) 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
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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

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/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1519.67	+2	3037.3	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
23	1081.29	+3	3240.9	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1621.44	+2	3240.9	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2281.4
23	1446.62	+2	2891.2	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.8
23	1118.67	+2	2235.3	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]3[Hex]4	1275.9
23	1264.05	2	2526.1	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
	1110.48	3	2526.1	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]3[Hex]4[Neu5Ac]1	1566.6
24	1665.44	+2	3328.9	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
24	1178.33	+3	3532.0	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.5
24	1061.78	3	3182.3	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
25	1592.17	2	3182.3	k/vnftelqk/l	977.5	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
27	1236.04	+3	3705.1	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1853.29	+2	3704.6	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2369.4
27	1187.17	+3	3558.5	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1780.23	+2	3558.5	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.8
28	1303.56	+3	3907.7	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2572.0
28	1138.84	+3	3413.5	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2077.8
28	1206.52	+3	3616.6	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]1[Fuc]1	2280.9
28	1090.14	+3	3267.4	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.7
28	1322.75	+3	3965.3	k/flkvnftelqk/l	1353.7	[HexNAc]6[Hex]5[Neu5Ac]2	2629.6

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	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.9
24	1366.54	+3	4096.6	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.9
24	1373.88	+3	4118.6	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.9
24	1061.67	+4	4242.7	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
25	1415.23	+3	4242.7	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.9
25	1262.24	+4	5045.0	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1682.65	+3	5045.0	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]5[Neu5Ac]3[Fuc]2	3171.2
25	1189.21	+4	4752.8	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1585.27	+3	4752.8	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2879.1
25	1225.72	+4	4898.9	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
25	1633.96	+3	4898.9	EHEGAIYPDNITDFQR	1891.8	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.1
27	1093.95	+4	4371.8	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1458.27	+3	4371.8	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
27	1057.43	+4	4225.7	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
27	1409.57	+3	4225.7	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
28	1257.99	+4	5028.0	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1677.01	+3	5028.0	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3[Fuc]1	3025.0
28	1221.48	+4	4881.9	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
28	1628.30	+3	4881.9	ELHHLQEQNVSNFLDK	2021.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
33	1347.54	+3	4039.6	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]1	1931.6
34	1450.24	+3	4347.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+NH3	2239.7
34	1083.68	+4	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1444.56	+3	4330.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
34	1493.28	+3	4476.8	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
34	1089.17	+4	4352.7	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7
35	1668.97	+3	5003.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3+NH3	2895.9
35	1663.29	+3	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
35	1247.72	+4	4986.9	ENLTAPGSDSAVFFEQGTTR	2126.0	[HexNAc]5[Hex]6[Neu5Ac]3	2878.9
37	1282.48	+3	3844.4	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
37	1923.24	+2	3844.4	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2	2222.7
38	1331.17	+3	3990.5	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2[Fuc]1	2368.8
38	1289.81	+3	3866.4	AGLQAFFQVQECNK	1639.7	[HexNAc]4[Hex]5[Neu5Ac]2+Na	2244.7

Table 3 Glycosylation analysis of rat Thy-1

Glycosylation site	Carbohydrate composition				Theoretical carbohydrate mass	Trypsin					Asp-N					
	dHex	Hex	HexNAc	NeuAc		Observed m/z	Charge	Peak No.	Amino acid residue	Theoretical m/z	Observed m/z	Charge	Peak No.	Amino acid residue	Theoretical m/z	
Asn23	0	6	2	0	1234.43	845.53	3	T3	H21-H31 (1315.63)	845.03	788.47	3	A3	E22-H31 (1178.57)	789.34	
						937.27	3	T4	H21-F33 (1591.74)	937.06	1198.89	2	A5	E22-H31 (1178.57)	1198.50	
						1405.81	2	T4	H21-F33 (1591.74)	1405.09	949.60	3	A3	N23-T36 (1626.80)	948.75	
											1423.40	2	A3	N23-T36 (1626.80)	1422.82	
	0	6	2	0	1396.49	859.49	3	T3	H21-H31 (1315.63)	859.04	853.54	3	A3	E22-H31 (1178.57)	853.56	
						1348.35	2	T3	H21-H31 (1315.63)	1348.06	1279.86	2	A3	E22-H31 (1178.57)	1279.63	
						942.18	3	T3	H21-E32 (1444.67)	942.06	1211.62	2	A5	E22-Q30 (1041.51)	1211.00	
						991.37	3	T5	H21-F33 (1591.74)	991.06						
						1486.40	2	T5	H21-F33 (1591.74)	1485.12						
	0	3	5	0	1515.57						1044.43	3	A3	N23-T36 (1626.80)	1043.79	
	0	7	2	0	1558.54	956.41	3	T3	H21-E32 (1444.67)	956.07	907.59	3	A3	E22-H31 (1626.80)	907.37	
	1	3	5	0	1655.82						1391.93	2	A3	E22-H31 (1178.57)	1390.58	
	1	5	4	0	1785.65						1093.32	3	A3	N23-T36 (1626.80)	1092.48	
	0	6	3	1	1890.86						1133.80	3	A3	N23-T36 (1626.80)	1132.82	
	1	6	4	0	1948.70						1188.51	3	A4	N23-T36 (1626.80)	1187.48	
	1	2	3	0	1495.52	1026.26	3	T6	V59-F75 (1195.12)	1025.18	1187.21	3	A3	N23-T36 (1626.80)	1186.84	
	0	5	2	0	1234.43	949.52	2	T2	A73-K78 (680.35)	949.39	985.71	3	A7	D64-K78 (1766.01)	985.15	
						1182.72	2	T5	V69-K78 (1106.62)	1182.53						
	1	3	3	0	1269.47						1195.68	3	A4	F66-D79 (1609.91)	1195.58	
	1	4	3	0	1421.52	1043.45	2	T2	A73-K78 (680.35)	1042.94	1249.75	3	A4	H60-D79 (2342.28)	1249.69	
1	3	4	0	1462.64	1063.68	2	T2	A73-K78 (680.35)	1063.45							
					1276.81	2	T5	V69-K78 (1106.62)	1276.58							
0	4	3	1	1586.58						1298.05	3	A4	H60-D79 (2342.28)	1297.94		
1	5	3	0	1583.57	1124.18	2	T2	A73-K78 (680.35)	1123.96							
					1337.84	2	T5	V69-K78 (1106.62)	1337.10							
1	3	5	0	1665.62	1165.13	2	T2	A73-K78 (680.35)	1164.99	1272.15	2	A4	T71-K78 (894.48)	1272.05		
					919.71	3	T8	V69-K78 (1106.62)	919.00	1139.79	3	A7	D64-K78 (1766.01)	1138.88		
					1378.18	2	T6	V69-K78 (1106.62)	1378.12							
0	3	5	0	1722.85						1105.31	3	A4	F66-D79 (1609.91)	1105.85		
2	5	3	0	1729.63	1197.53	2	T2	A73-K78 (680.35)	1196.99							
2	4	4	0	1770.66	1217.67	2	T2	A73-K78 (680.35)	1217.51							
					1430.71	2	T5	V69-K78 (1106.62)	1430.54							
1	5	4	0	1786.85	1226.28	2	T2	A73-K78 (680.35)	1225.50							
					960.81	3	T6	V69-K78 (1106.62)	959.43							
					1439.05	2	T6	V69-K78 (1106.62)	1438.84							
1	4	5	0	1827.68	973.78	3	T6	V69-K78 (1106.62)	973.10							
2	5	4	0	1932.71	1298.75	2	T2	A73-K78 (680.35)	1298.53	1228.18	3	A7	D64-K78 (1766.01)	1227.91		
					1008.71	3	T8	V69-K78 (1106.62)	1008.11							
					1511.86	2	T6	V69-K78 (1106.62)	1511.87							
1	6	4	0	1948.70	1306.81	2	T2	A73-K78 (680.35)	1306.53	1161.80	3	A4	F66-D79 (1609.91)	1161.21		
					1013.98	3	T6	V69-K78 (1106.62)	1013.45							
0	4	5	1	1972.71						1241.91	3	A7	D64-K78 (1766.01)	1241.25		
2	4	5	0	1973.73	880.04	3	T2	A73-K78 (680.35)	879.70	1241.84	3	A7	D64-K78 (1766.01)	1241.59		
					1319.24	2	T2	A73-K78 (680.35)	1318.04							
					1022.43	3	T6	V69-K78 (1106.62)	1021.79							
					1532.49	2	T6	V69-K78 (1106.62)	1532.48							
1	5	5	0	1989.73						1146.70	3	A4	F66-D79 (1609.91)	1146.20		
1	6	3	1	2039.72	1043.24	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1042.78							
1	5	4	1	2077.75	1057.08	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1056.48							
2	6	4	0	2094.78	1062.85	3	T6	V69-K78 (1106.62)	1062.13	1282.43	3	A7	D64-K78 (1766.01)	1281.82		
1	4	5	1	2118.77	1070.38	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1070.14							
2	5	5	0	2135.79	1078.32	3	T6	V69-K78 (1106.62)	1075.81							
1	5	4	1	2239.80	1110.97	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1110.48							
3	5	5	0	2281.85	1124.78	3	T6	V69-K78 (1106.62)	1124.49							
1	7	5	0	2313.84	851.75	4	T6	V69-K78 (1106.62)	851.82							
1	4	6	1	2321.85	1128.18	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1127.83							
2	5	6	1	2328.86	1241.13	3	T7	V69-K78 (1106.62)	1240.53							
0	5	2	0	1234.43	1168.34	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1167.99	912.24	3	A2	E86-K99 (1516.76)	911.74		
										1367.31	2	A2	E86-K99 (1516.76)	1367.10		
										930.26	3	A3	Q92-R105 (1879.84)	930.10		
										1821.28	5	A3	E86-R105 (1843.94)	1821.13		
										1011.55	3	A4	T95-K110 (1815.06)	1010.81		
										1516.43	2	A4	T95-K110 (1815.06)	1516.75		
										1444.21	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1443.88		
0	3	4	0	1316.49	1209.78	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1209.52							
0	3	5	0	1519.57	1310.68	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1310.56	1007.10	3	A2	E86-K99 (1516.76)	1006.78		
										1239.21	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1238.82		
0	4	3	1	1586.56						1230.58	3	A4	G81-K99 (2141.83)	1231.17		
2	3	4	0	1608.60						951.28	3	A4	Q91-N102 (1258.81)	951.08		
										1426.22	2	A4	Q91-N102 (1258.81)	1426.11		
1	4	4	0	1624.60	951.37	3	T3	S94-D106 (1245.57)	951.76							
0	5	4	0	1640.58	1371.84	2	T1	V88-K99 (1117.54)	1371.07	860.04	4	A5	E86-R105 (2212.18)	859.70		
										1279.89	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1279.28		
0	5	3	1	1728.61						1176.27	3	A4	T95-K110 (1815.06)	1175.23		
1	6	3	0	1745.62						1062.52	3	A2	E86-K99 (1516.76)	1062.13		
										986.39	4	A5	E86-R105 (2212.18)	985.98		
										1314.72	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1314.27		
										896.54	4	A5	E86-R105 (2212.18)	896.21		
										1328.49	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1327.85		
1	5	3	1	1874.87						1016.89	4	A5	E86-R105 (2212.18)	1016.22		
0	6	3	1	1890.86	1495.18	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1495.10	1022.70	4	A5	E86-R105 (2212.18)	1022.22		
2	5	4	0	1932.71	1517.32	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1517.15							
1	6	4	0	1948.70	1525.78	2	T1	V89-K99 (1117.54)	1525.12	1150.13	3	A2	E86-K99 (1516.76)	1149.83		
										1259.45	3	A3	E86-N102 (1843.94)	1259.22		
										1037.27	4	A5	E86-R105 (2212.18)	1036.73		
										1382.34	3	A5	E86-R105 (2212.18)	1381.97		
1	6	3	1	2038.72						1058.07	4	A5	E86-R105 (2212.18)	1058.73		
0	5	4	1	2092.74						1073.37	4	A5	E86-R105 (2212.18)	1072.99		

mkwvesifli	fllnftesrt	lhrneygias	ildsyqctae	isladlatif
faqfvqeaty	kevskmvkda	ltaiecptgd	eqssgclenq	lpafleelch
ekeilekygh	sdccsqseeg	rhncflahkk	ptpasiplfq	vpepvtsea
yedretfmm	kfiyeiarrrh	pflyaptill	waarydkiip	scckaenave
cfqtkaatvt	kelresslln	qhacavmknf	gtrtfqaitv	tklsqkftkv
nfteiqklvl	dvahvhehcc	rgdvldclqd	gekimsyics	qqdtlsnkit
eccklttler	gqcihaend	ekpeglspl	nrflgdrdfn	qfssgeknif
lasfvheysr	rhpqlavsvi	lrvakgyqel	lekcfqtenp	lecqdkgeee
lqkyiqesqa	lakrscglfq	klgeyylqna	flvaytkkap	qltsselmai
trkmaataat	ccqlsedkll	acgegaadii	ighlclrhem	tpvnpvgvqc
ctssyanrrp	cfsslvvdet	yvppafsddk	fifhkdlcqa	qgvalqtmkq
eflinlvkqk	pqiteeqlea	viadfsglle	kccqgqeqev	cfaeegqli
sktraalgv				

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

mkililgfl	flestpawak	ekhyyigiie	ttwdyasdhg	ekklisvdte
hsniylqngp	drigrlykka	lylqytdetf	rttiekpvwI	gflgpiiⁿkae
tgdkvyvhlk	nlasrpytfh	shgityykeh	egaiypdⁿtt	dfqraddkvy
pgeqytmll	ateeqspgeg	dgnvcvtriyh	shidakdia	sgligpliⁿic
kkdsldkeke	khidrefvvm	fsvvdenfsw	yledniktyc	sepekvdⁿkdn
edfquesrmy	svngytfⁿgsl	pglsmcaedr	vkwyIfgmgn	evdvhaaffh
gqaltnknyr	idtinlfpⁿat	lfdaymvaqn	pgewmlscqn	lnhIkaglqa
ffqvqecⁿks	sskdnirgkh	vrhyyiaⁿee	iiwnyapsⁿgi	diftkenⁿlta
pgsdsavffe	qgtⁿtriggⁿsy	kkIvyreytd	asfⁿnrkerⁿg	peeehlⁿgilⁿg
pviwaevgdt	irvtfhnkga	yplsiepigv	rⁿfnknegⁿty	yspnynpⁿqsr
svppsashva	ptetftyewt	vpkevgptna	dpvclakmyy	savdptkⁿdif
tgIlgpmkic	kkgsIhangr	qkdvdkefyl	fptvfdenes	lllednirmⁿf
ttapdqvdke	dedfqueskm	hsmngfmygn	qpⁿgltmckgd	svvwylfsag
neadvhgiyf	sgntylwrge	rrdtanlfpq	tslⁿtlhmwpd	tegtfnvecl
ttdhytggmk	qkytvnqⁿerr	qsedstfylg	ertyyiaave	vewdyspⁿqre
wekelhhlqe	qⁿvsnaflⁿdk	gefyigskyk	kvvyrqyⁿtds	tfrvpverka
eeehlgilgp	qlhadvgdkv	kiifknmatr	pysihahgvq	tesstvⁿtpⁿtl
pgetltyvⁿwk	ipersgagte	dsacipwayy	stvdqvkdly	sgligplivⁿc
rrpylkvfnp	rrklefallf	lvfdeneswy	lddniktysd	hpekvnkdde
efiesnkⁿmha	ingrmfⁿgnlq	gltmhvgdev	nwymgmⁿgne	idlhtvhfhg
hsfⁿqykhrgv	yssdvfdifp	gtyqtlemfp	rtpgiwllhc	hvtⁿdhihagm
ettytvlqne	dtksg			

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

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

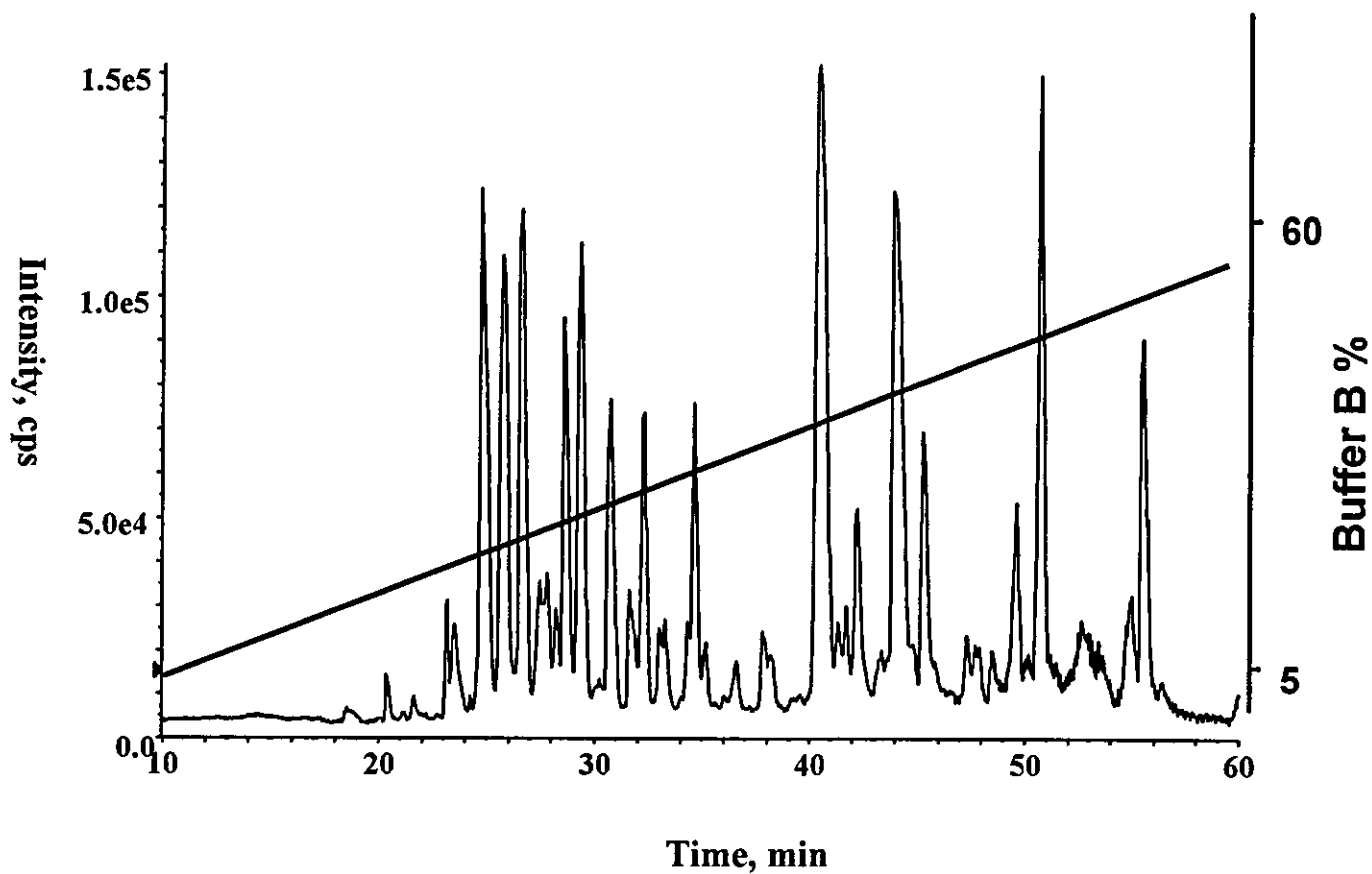


Fig. 3 LC-MS/MS of tryptic digest of α -fetoprotein

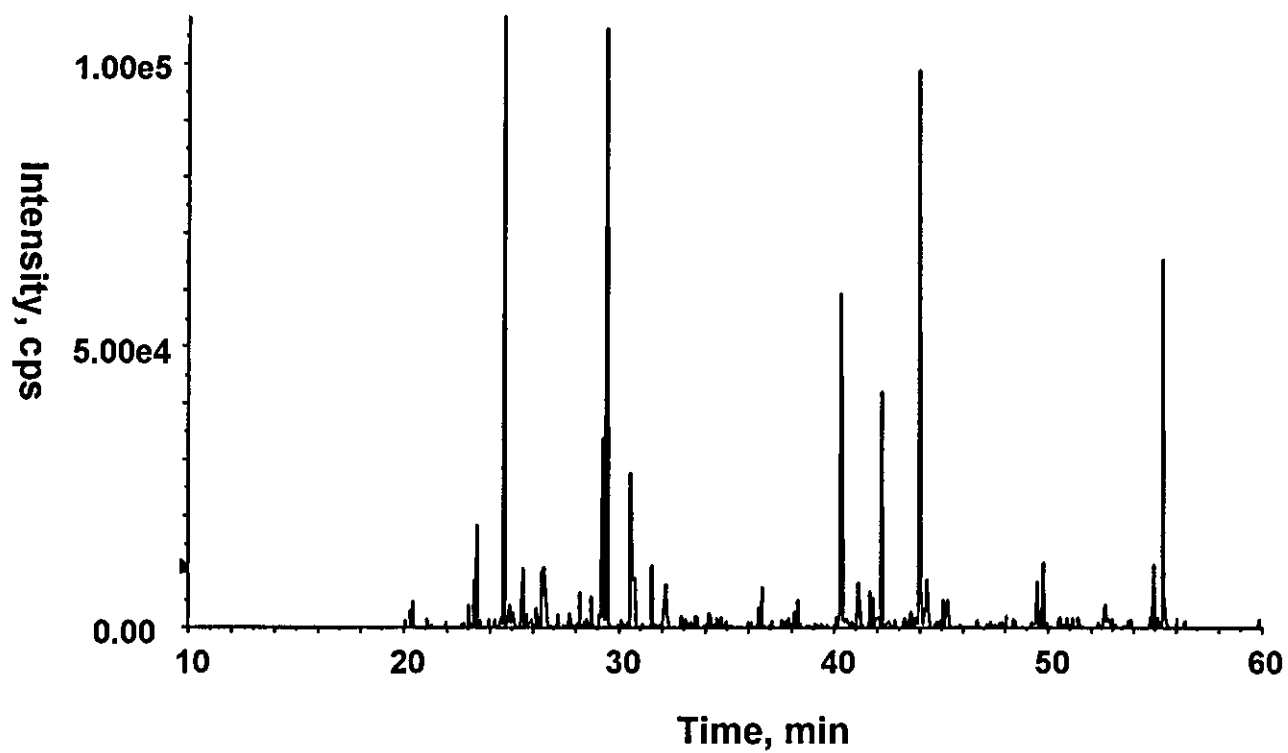
Column Magic C18

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

