

図34 N末端アミノ基を標的としたリジン欠損TNF- $\alpha$  のPEGylationとその生物活性

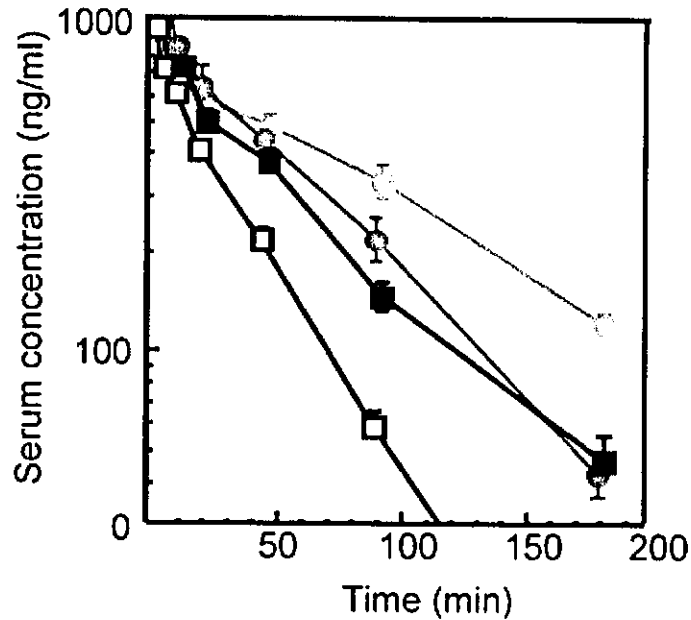


図35 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の静脈内投与後の血中濃度推移

表13 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R の静脈内投与後の血中動態パラメーター

	t1/2 (min)	AUC (x10 <sup>3</sup> ng·min/ml)	CL <sub>total</sub> ( $\mu$ l/min)
□ wTNF- $\alpha$	12 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2	39 $\pm$ 4
● mTNF- $\alpha$ -K90R	24 $\pm$ 5	62 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2
■ ran-PEG-wTNF- $\alpha$	24 $\pm$ 4	45 $\pm$ 2	22 $\pm$ 1
○ sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R	49 $\pm$ 16	85 $\pm$ 10	12 $\pm$ 1

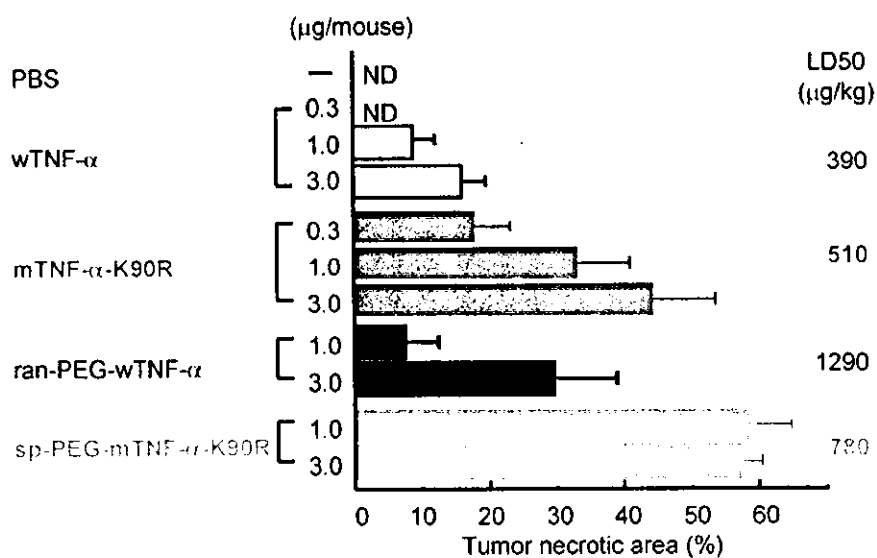


図36 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果 (腫瘍出血壊死誘導作用)

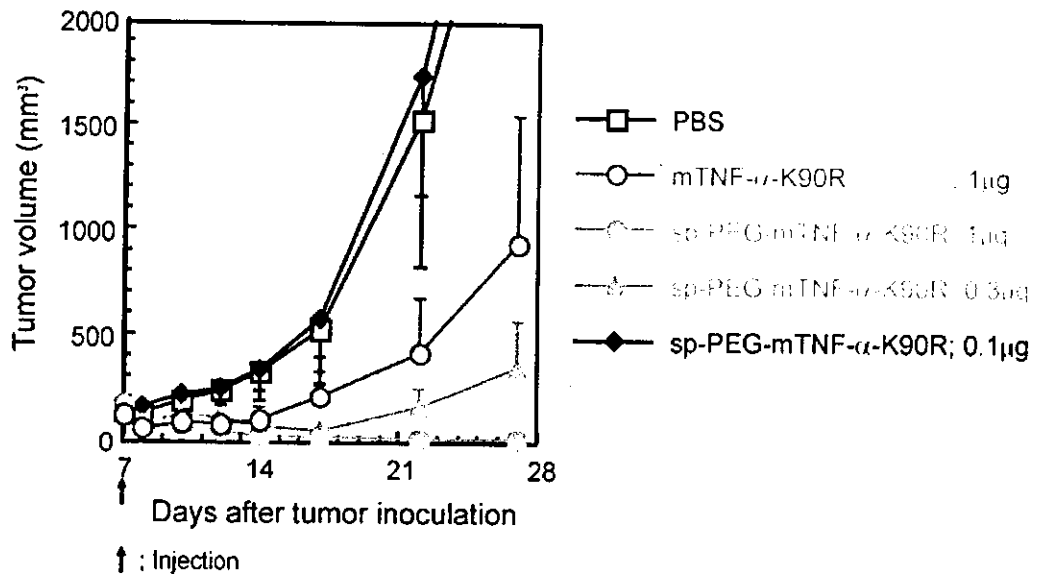


図37 sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90Rの*in vivo*における抗腫瘍効果

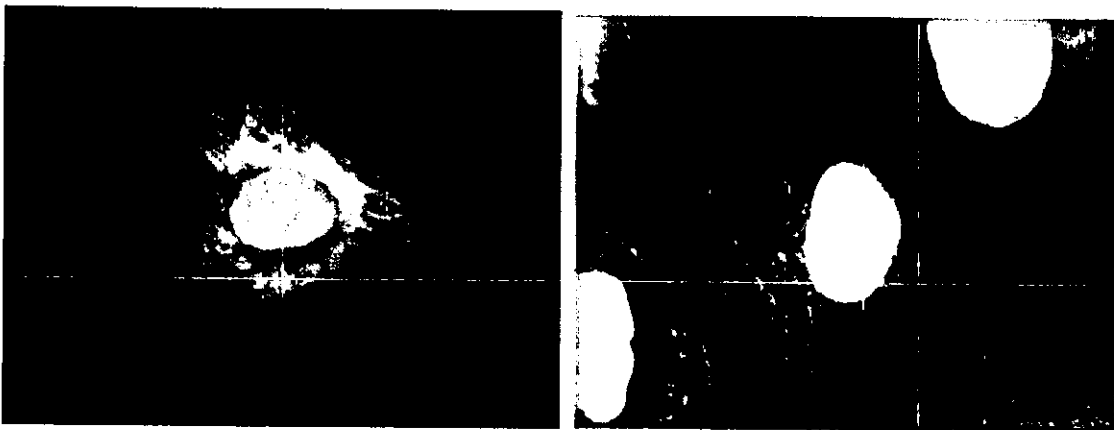


図38 半導体量子ドットによる染色法の確立

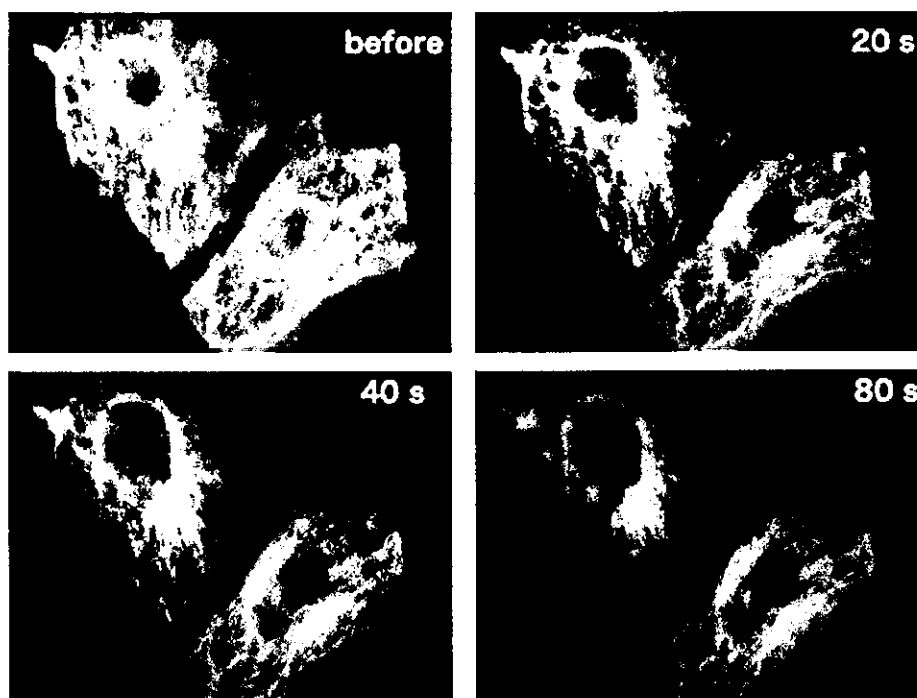
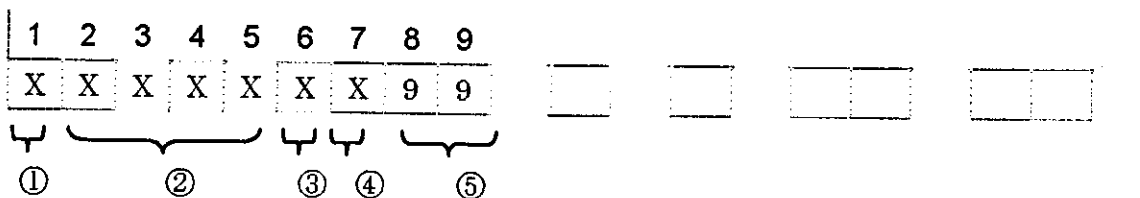
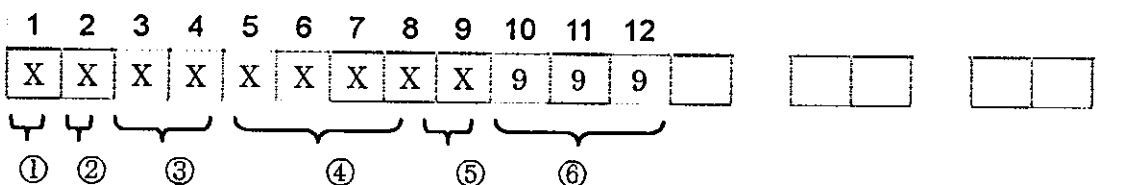


図39 半導体量子ドットの蛍光標識特性の評価



No	項目名	桁数	説明	例
①	機関区分	1	試料提供元の協力機関の ID	B,C,D...
②	試料 ID	4	患者毎に振られるランダムな4桁の英数字	0000~ZZZZ まで
③	試料区分	1	試料の種類を表す区分	血清 : S、組織 : T
④	時系列識別番号	1	試料の時系列を表す番号	1回目 : 1
⑤	小分け No	2	上記③毎に小分け毎の連番	01~99 まで

図40 一次匿名化番号体系



No	項目名	桁数	説明	例
①	固定文字	1	二次匿名化試料であることを表す固定文字	P
②	機関区分	1	試料提供元の協力機関の ID	B,C,D...
③	プロジェクト ID	2	疾患を表す ID	がん : CA
④	試料 ID	4	患者毎に振られるランダムな2桁の英数字	0000~ZZZZ まで
⑤	試料区分	1	試料の種類を表す区分	血清 : S、組織 : I
⑥	時系列識別番号	1	試料の時系列を表す番号	1回目 : 1
⑦	小分け No	2	上記③毎に小分け毎の連番	01~99 まで

図41 二次匿名化番号体系

プロテオームファクトリーにおけるデータ解析の流れ  
ペプチド・タンパク質の同定及び比較定量

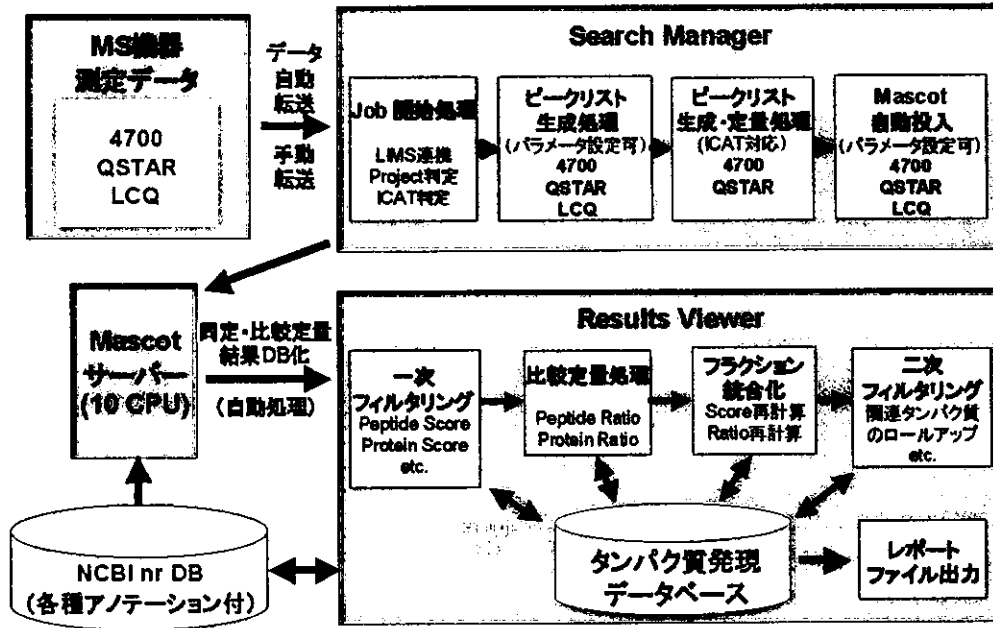


図42 プロテオームファクトリーにおけるデータ解析の流れ

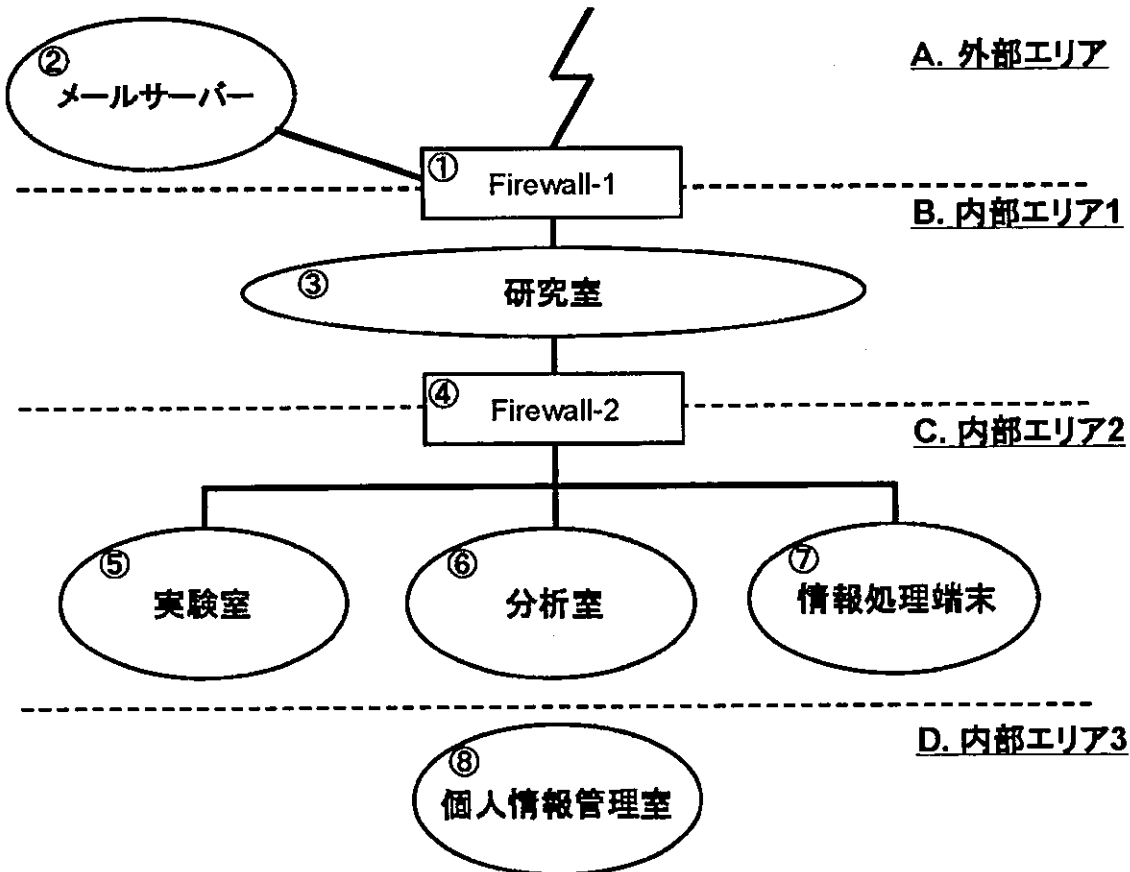
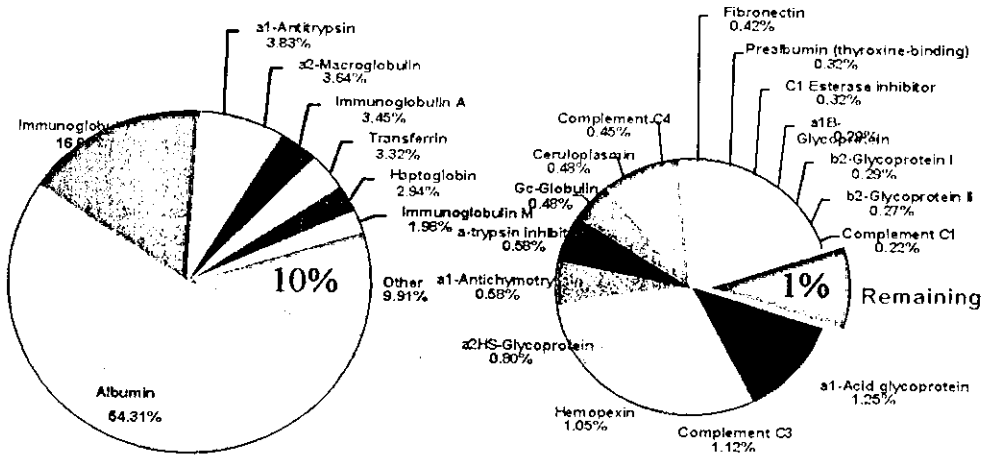


図43 情報セキュリティーネットワーク

## Why is Removal of High Abundant Proteins Important: Human Plasma



Concentration range of proteins: 1 to 10<sup>12</sup>

図44 ヒト血清中主要たんぱく質の分類と存在比 (Agilent社より提供)

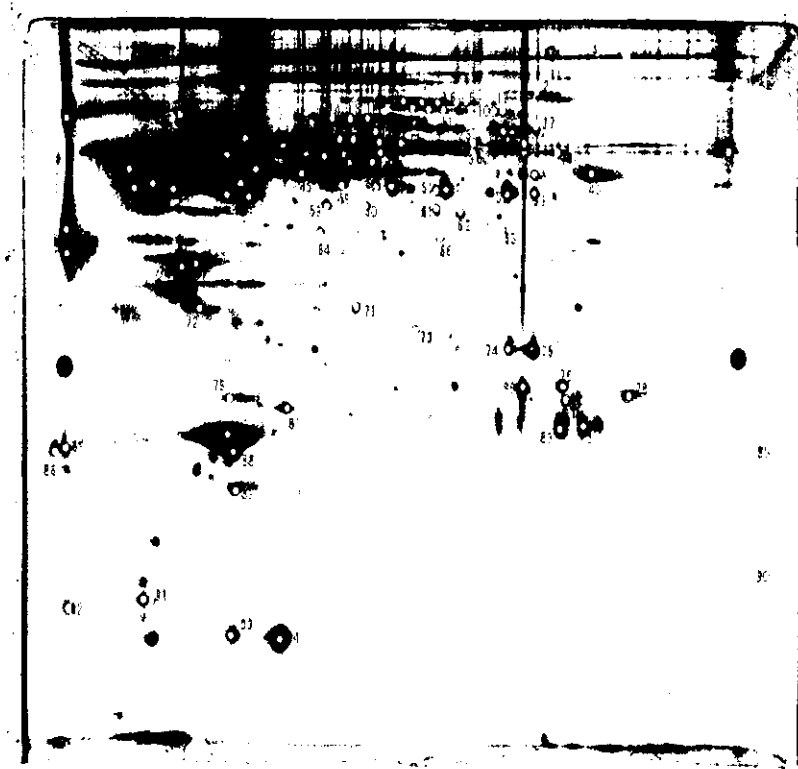


図45 Ettan Spot Handling Workstation (Amersham)によるアジレント抗体カラム処理血清の発現たんぱく質のスポットピッキング

表14 質量分析機器(Q-star)を用いたピックアップたんぱく質の同定

スポット	質量スコア	異変タンパク質	スポット	質量スコア	異変タンパク質	スポット	質量スコア	異変タンパク質
1	261.4	①0045② Carboxylesterase precursor (EC 1.10.3.1) (Famotidase)	33	450.1	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	65	431.1	①1153② Alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor (AGP 2) (Orosomucoid 2) (OMD 2)
2	288.1	①0014② Plasminogen precursor (EC 3.4.21.7) (Contains Angiotensin)	34	311.5	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	66	225.0	(D1448④ Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain I4 precursor (H1 heavy chain I4) (Inter-alpha-1)
3	303.2	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	35	240.0	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	67	345.1	①0212⑦ Apolipoprotein A-IV precursor (Apo-AIV)
4	230.7	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	36	264.4	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	68	117.8	①1153② Alpha-1-acid glycoprotein 2 precursor (AGP 2) (Orosomucoid 2) (OMD 2)
5	154.3	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	37	211.1	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	69	404.5	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)
6	312.4	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	38	114.4	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	70	183.2	①0610③ Complement factor H precursor (H factor 1)
7	130.4	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	39	285.4	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	71	183.2	①0610③ Complement factor H precursor (H factor 1)
8	268.5	①0102③ Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	40	401.3	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	72	43.1	①1010② Cisteine precursor (Complement-associated protein SP-42,43) (Complement cytolytic inhibitor)
9	224.1	①0102③ Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	41	225.1	①0101① Alpha-1-antitrypsin precursor (ACT)	73	112.2	(D14115④) Glutathione S-transferase, mitochondrial precursor (EC 3.5.1.13) (G-S) (L-glutathione S-transferase)
10	181.8	①0102③ Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	42	123.1	①0101① Alpha-1-antitrypsin precursor (ACT)	74	164.1	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)
11	229.2	①0102③ Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	43	184.4	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	75	234.4	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)
12	177.2	①0102③ Alpha-2-macroglobulin precursor (Alpha-2-M)	44	338.8	①0075① Complement factor B precursor (EC 3.4.21.47) (C3/C5 convertase) (Properdin factor B) (Dfyc)	76	174.3	①0087① Complement C1s subcomponent precursor (EC 3.4.21.47) (C1 sesterase)
13	236.5	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	45	100.0	①0107⑦ Ig alpha-1 chain C region	77	123.1	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)
14	142.1	①0104④ Complement factor XIII B chain precursor (Protein-glycine gamma-glutamyltransferase B)	46	114.7	①0104④ Kallikrein precursor (Alpha-2-thiol proteinase inhibitor) (Contains Bradykinin)	78	84.8	①0214④ Complement C1q subcomponent, B chain precursor
15	177.8	①0110① Debrinase precursor, plasma (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Deyin) (ADEL)	47	181.1	①0100② Antithrombin-III precursor (ATIII) (FIIID300)	79	127.7	(D35477④) ATP-binding cassette, sub-family A, member 1 (ATP-binding cassette transporter 1) (ATP-1a)
16	244.1	①0110① Debrinase precursor, plasma (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Deyin) (ADEL)	48	112.4	①0113④ Complement C1i subcomponent precursor (EC 3.4.21.41)	80	101.1	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)
17	134.4	(Q1242②) E3 ubiquitin protein ligase UBE-B1 (EC 3.1.1.1) (SPC17)	49	71.8	①0214④ Beta-2-glycoprotein 1 precursor (Apolipoprotein H) (Apo-H) (B2GPI) (Bom2) (BOP) (Activated)	81	314.4	①0214④ Beta-2-glycoprotein 1 precursor (Apolipoprotein H) (Apo-H) (B2GPI) (Bom2) (BOP) (Activated)
18	504.8	①0315③ Phosphatase C1 inhibitor precursor (C1 inh) (C1hi)	50	113.8	①0113④ Complement C1i subcomponent precursor (EC 3.4.21.41)	82	147.3	①0114④ Ig kappa chain V4 region EU
19	414.7	①0218② Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin) (BFR)	51	118.8	①0113④ Complement C1i subcomponent precursor (EC 3.4.21.41)	83	82.8	①0114④ Ig kappa chain C region
20	631.3	①0218② Serotransferrin precursor (Transferrin) (Siderophilin) (Beta-1-metal binding globulin) (BFR)	52	31.1	①0214④ Beta-2-glycoprotein 1 precursor (Apolipoprotein H) (Apo-H) (B2GPI) (Bom2) (BOP) (Activated)	84	116.8	①1344④ Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (CK10) (CK10)
21	190.1	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	53	48.5	①0214④ Beta-2-glycoprotein 1 precursor (Apolipoprotein H) (Apo-H) (B2GPI) (Bom2) (BOP) (Activated)	85	141.1	①0401② Transketolase, cytosolic, mitochondrial ATPase (TER ATPase) (15S Mg(2+)-ATPase p17 subunit) (Ta)
22	388.8	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	54	134.8	①0104④ Kallikrein precursor (Alpha-2-thiol proteinase inhibitor) (Contains Bradykinin)	86	132.0	①0418④ Keratin, type II cytoskeletal I (Cytokeratin I) (CK1) (17 kDa cyokeratin) (Ker-1)
23	194.7	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	55	80.1	(D1414④) Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain I4 precursor (H1 heavy chain I4) (Inter-alpha-1)	87	72.0	①0214⑦ Apolipoprotein A-4 precursor (Apo-A4)
24	537.0	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	56	123.1	①0214④ Beta-2-glycoprotein 1 precursor (Apolipoprotein H) (Apo-H) (B2GPI) (Bom2) (BOP) (Activated)	88	581.1	①0214⑦ Apolipoprotein A-4 precursor (Apo-A4)
25	300.9	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	57	397.4	①0214④ Vitamin D-binding protein precursor (DBP) (Group-specific component) (Gc-globulin) (VDB)	89	108.4	①0315③ Phosphatase C1 inhibitor precursor (PFIB) (PFIP) (FRI) (FII)
26	321.8	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)	58	311.6	①0214④ Vitamin D-binding protein precursor (DBP) (Group-specific component) (Gc-globulin) (VDB)	90	154.4	①0315③ Phosphatase C1 inhibitor precursor (PFIB) (PFIP) (FRI) (FII)
27	347.8	①0421⑦ Alpha-1B-glycoprotein precursor (Alpha-1-B glycoprotein)	59	84.5	①0611④ Complement factor I precursor (EC 3.4.21.45) (C3B/C4B inactivator)	91	41.5	①0214⑦ Apolipoprotein A-4 precursor (Apo-A4)
28	294.1	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	60	28.3	①0611④ Complement factor I precursor (EC 3.4.21.45) (C3B/C4B inactivator)	92	15.1	①0104④ Complement C4 precursor (Contains C4a anaphylatoxin)
29	16.8	①0315③ Phosphatase C1 inhibitor ribonucleoprotein D (hPBP-D) (PNA binding motif protein, X chromosome)	61	44.3	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	93	34.7	①0418④ Keratin, type II cytoskeletal I (Cytokeratin I) (CK1) (17 kDa cyokeratin) (Ker-1)
30	244.4	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	62	42.4	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)	94	55.5	①0214⑦ Transferrin precursor (Prealbumin) (TBP) (TTR) (ATTR)
31	189.5	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	63	38.1	①0210③ Haptoglobin precursor (Beta-1B-glycoprotein)			
32	294.7	①0104④ Complement C3 precursor (Contains C3a anaphylatoxin)	64	302.3	①0115④ Fibronectin oligomer-binding factor precursor (FBOF) (FPC-1)			



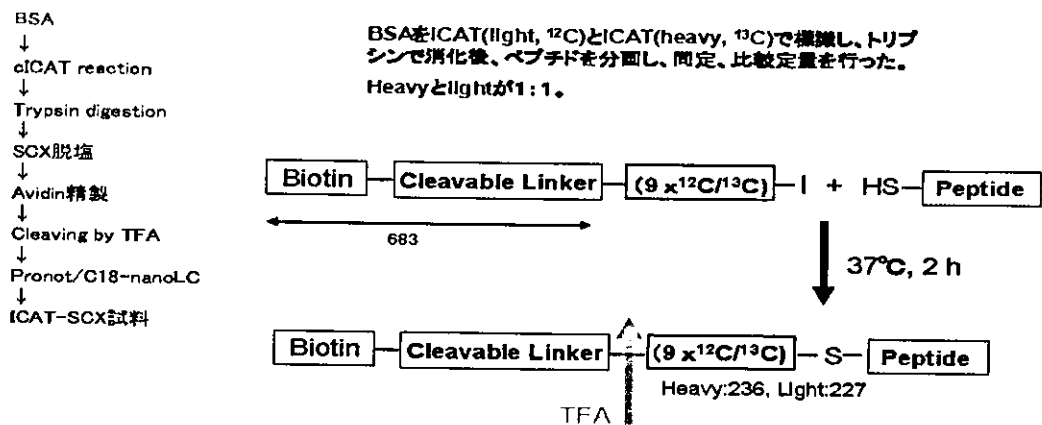


図46 Cleavable ICAT (cICAT) 試薬の構造

BSA Cysteine 含有ペプチド (トリプシン消化断片)	同定ICAT 反応ペプチド	ICAT Ratio H/L	Mascot 同定スコア	
			H	L
DYCK				
GASIQK				
GACLLPK				
LCYLHEK		1.14	25.5	23.0
CCRAADPK		1.04	15.2	13.4
QNGDQEEK		1.05	27.5	32.6
NEGFSLHK		1.00	33.2	31.7
CCTKPESEK		0.85	11.4	14.3
CCTESLVNR		0.85	13.8	19.8
SHQAEVEK		1.07	50.4	50.3
EGGDKPILFK		0.85	26.5	23.2
EAGFAVEGPK		1.00	54.0	49.9
ETYQDMDCCEK		0.88	42.1	29.7
YICDNDTISSK		0.97	43.4	53.8
SHHTLEGDELCK		0.97	88.7	79.4
EYEATLEGCAK		0.88	60.4	29.4
TOVARESHAGCEK		0.87	44.9	53.1
DDPHACYSTVFDK		0.97	71.1	65.8
LKPDNTLQDEEK		1.01	45.5	61.6
YNGVEQCCQAEDK		0.95	40.3	18.1
EGGHGDLLEGADDR		0.72	38.1	12.2
MPQTEDYSLINR		0.93	23.5	18.4
LFYFHADICTLPQTEK		1.10	23.2	27.2
RPGESALTPDETYPK		1.06	30.1	
GLVIAESQYLQRRPEDEHYK				

短いペプチド断片のため、ABI-4700  
質量分析器で検出するのが難しい

BSAのCys含有ペプチド  
断片(25種)の内、21種  
を同定・比較定量する  
ことが可能。

測定機器:ABI-4700

図47 BSA同定ペプチド断片の比較定量解析

**Mascot Search Results**

Taxonomy: *Bos taurus*  
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:  
 gi|1351907 from *Bos taurus*

Variable modifications: ICAT\_heavy, ICAT\_light, Oxidation (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 46%

Matched peptides shown in Bold Red

```

1 MKWVTFISLL LFFSSAYSRG VFRDTHKSE IAHRFKDLGE EHEKGLVLIA
51 FSQYLOOCPF DEHVKLVNEL TEFAKTCVAD ZSHAGCEKSL HTLFGDELCK
101 VASLRETYGD MADCCCKQEP ERNECFLSHK DDFDLPKLK PDPNTLCDEF
151 KADEKKFWGK YIYEIARRHP YFYAPPELLYY ANKINGVFQE CCQAEDRGAC
201 LLPKIETMRE KVLASSARQR LRCASIQKFG ERALKAWSVA RLSQKFPKAE
251 FVEVTKLVD LTKVHKECCH GDLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE
301 CCDKPLLEK HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DPAEDKDVCK NYQEAKOAFI
351 GSFLYEYSRR HPETAVSVLL RLAKYEYATL KECCAKDDPH ACYSTVFDKL
401 KHLVDEPQNL IKQNCDFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS
451 RSLGKVGTRC CTKPESERP CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTKCC
501 TESLVNRRPC FSALTFDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP DTEKQIKKQT
551 ALVELLKHKP KATEEQKTV MENTVAVVDK CCAADKKEAC FAVEGPKLVV
601 STOTALA
  
```

図48 BSAのアミノ配列, ICAT反応断片およびcICAT法によるBSA解析の配列カバー率

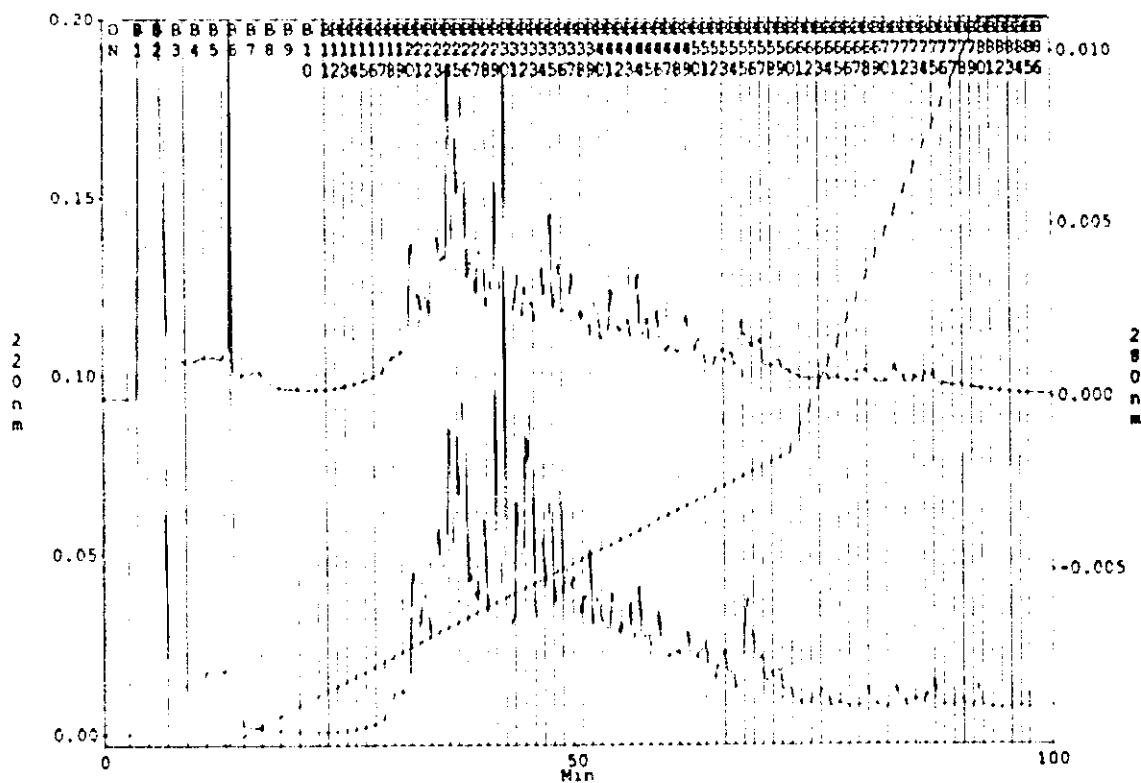


図49 ヒト血清たんぱく質のcICAT peptideのSCX columnによる分画







表15 の続き(その4)

スコア順位		Description	ID	分子量	システイン 残基数	Ratio		Score(D)		Score(L)		Protein Coverage(D)		Protein Coverage(L)	
A47	QSTAR					A47	QSTAR	A47	QSTAR	A47	QSTAR	A47	QSTAR	A47	QSTAR
276		myosin XV; unconventional myosin-15	gi22547229	395219.5	45	N/A			20.2						0
277		chemokine (C-C motif) receptor 6; chemokine (C-C re	gi4885121	40844.4	14	N/A			20.2						2
278		PERQ amino acid rich, with GYF domain 1; postmeob	gi12007656	89740.9	10	N/A			20.2						1
279		vascular protein sorting 29 isoform 1; vascular sorting	gi1708441	20505.7	3	0.72			20.2						3
280		hypothetical protein MGC48986	gi28557703	31084.9	7	N/A			20.1						5
281		D site of albumin promoter (albumin D-box) binding pro	gi31542493	34348.9	2	0.57			20.1				5		
282		transducin-like enhancer protein 2; transducin-like enhi	gi21361151	79841.0	21	0.80			18.1		20.1		2		2
283		hypothetical gene MGC16309	gi15529880	35339.8	6	0.61			20.0				7		
284		splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2,	gi5902076	27744.6	2	1.79			20.0				8		
285		super conserved receptor expressed in brain 3	gi9507143	41481.4	15	N/A			20.0						5
286		hypothetical protein XP_211108	gi27479549	10737.5	5	1.41			20.0						17

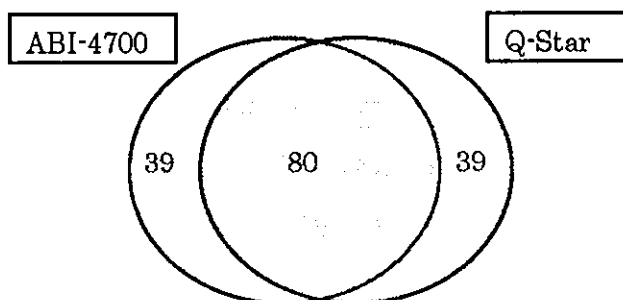


図50A Diagrammatic Representation of Top 1-119 Proteins Detected in Normal Human Serum by Q-Star and ABI 4700 Systems

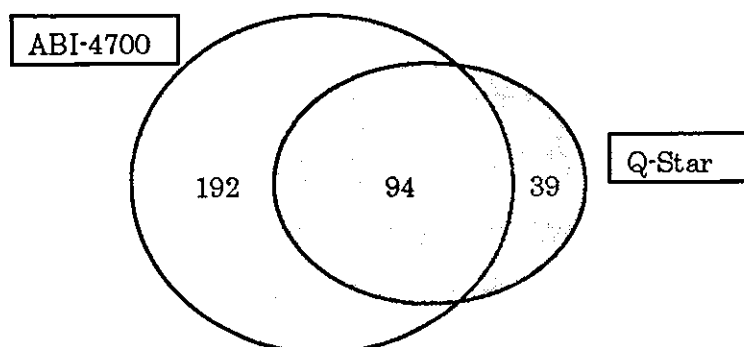
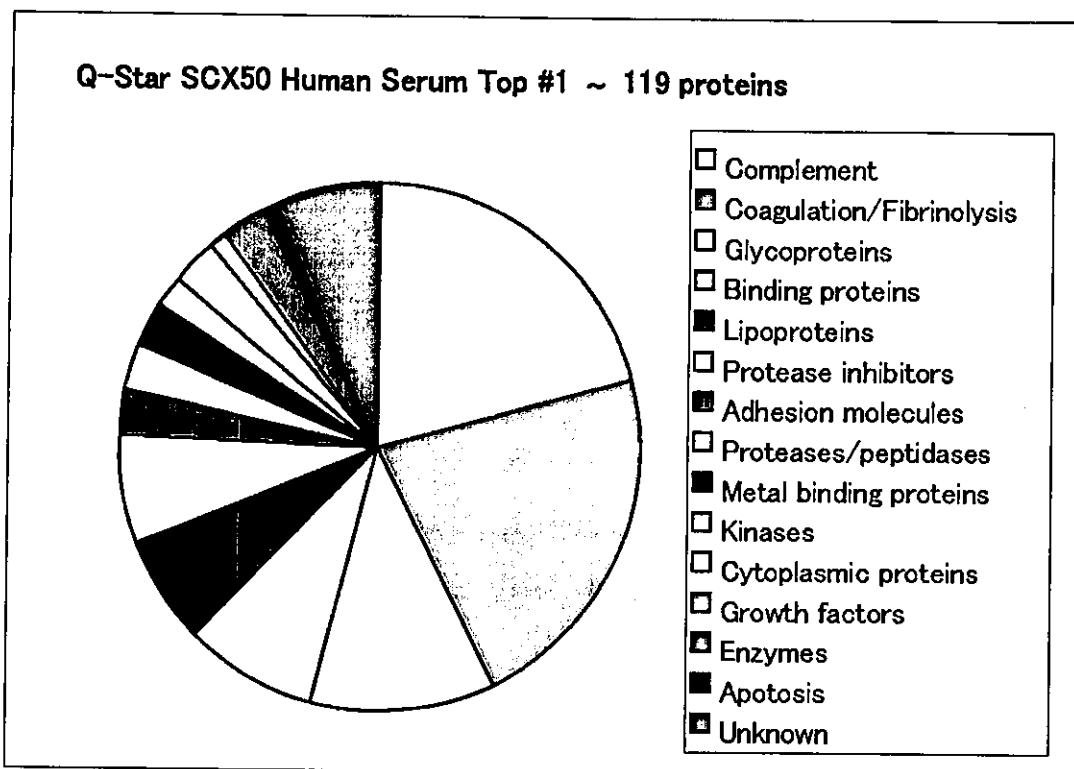
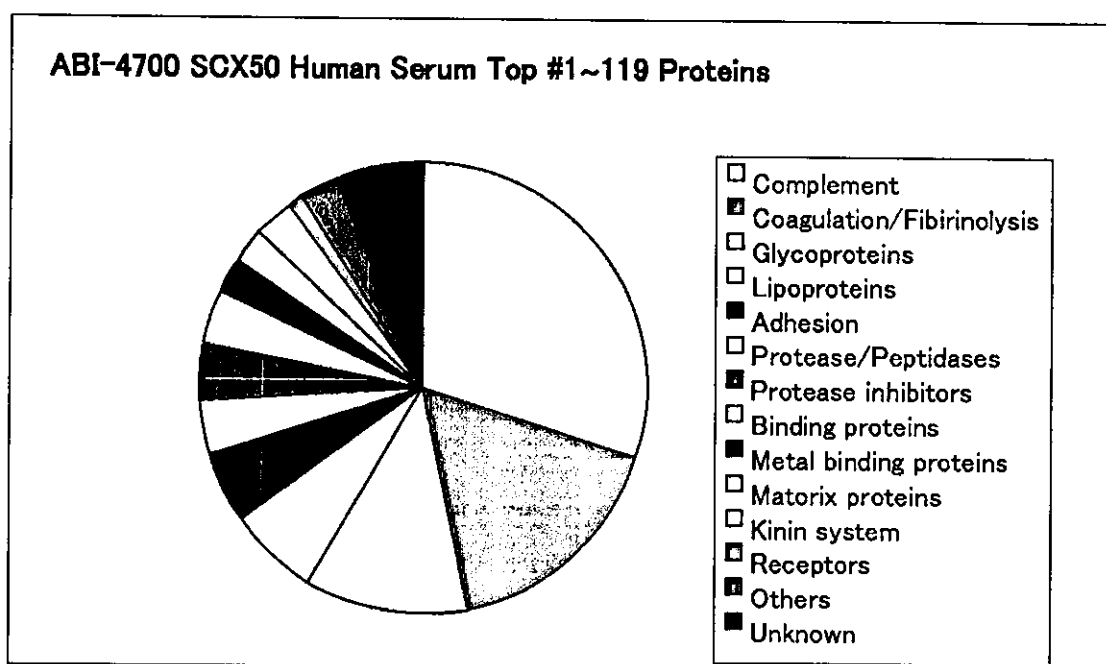


図50B Diagrammatic Representation of All Proteins Detected in Normal Human Serum by Q-Star and ABI 4700 Systems



☒51 Categories of Top #1~119 Proteins Detected in Normal Human Serum by Q-Star XL System

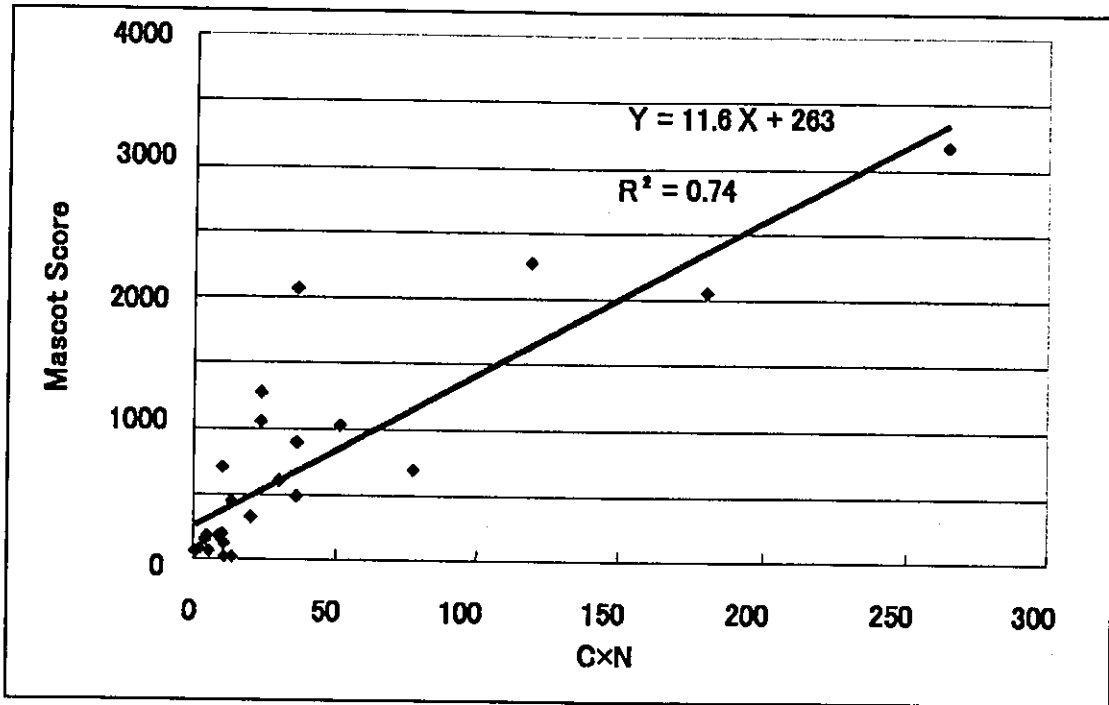


☒52 Categories of Top #1~119 Proteins Detected in Normal Human Serum by ABI-4700 System

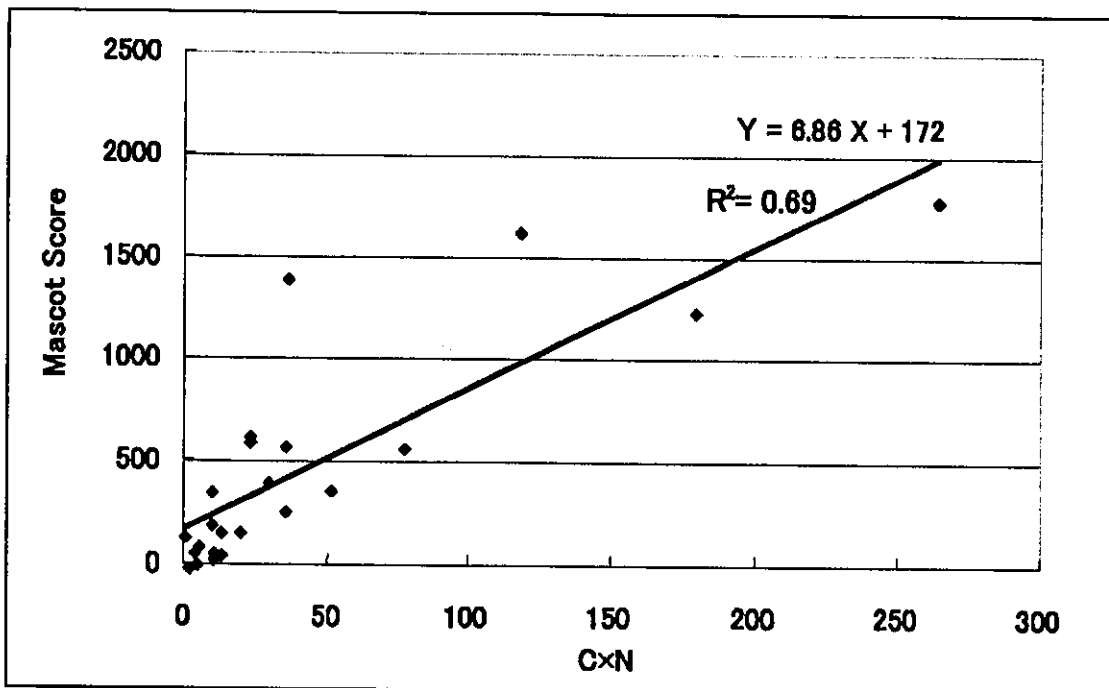
表16 主要血清たんぱく質の濃度(C)・Cys残基数(N)およびMascotスコア(S)

たんぱく質名	血中濃度 (C) ( $\mu$ M)	システイン 数(N)	C×N	スコア (ABI-4700)	スコア (Q-Star)
complement component 1, q subcomponent, alpha	2.6	5	13.2	17.7	38.4
complement component 1, q subcomponent, beta	2.6	4	10.5	11.9	48.4
complement component 1, q subcomponent, gamma	2.6	4	10.5	114.0	15.3
complement component 1, r subcomponent	1.3	27	35.8	892.6	565.5
complement component 1, s subcomponent	1.3	27	35.8	484.8	251.3
complement component 2	0.23	24	5.46	64.0	126.5
complement component 3	6.7	27	180.0	2039.2	1225.3
complement component 4	1.9	27	51.4	1021.8	354.2
complement component 5	0.44	30	13.3	443.4	151.5
Complement component 6	0.47	64	30.0	598.5	392.1
complement component 7	0.41	56	23.1	1274.2	583.7
complement component 8, alpha	0.33	30	9.80	705.3	340.2
complement component 8, beta	0.33	30	9.80	193.4	189.6
complement component 8, gamma	0.33	3	0.980	55.2	122.0
complement component 9	0.76	26	19.7	321.0	150.8
complement factor B	3.2	24	77.4	682.0	560.4
complement factor D	0.065	9	0.587	57.8	
complement factor H	3.2	82	264.5	3164.8	1774.8
I factor (complement)	0.56	42	23.3	1052.7	610.0
plasminogen	2.5	48	118.5	2260.1	1614.1
coagulation factor II precursor; prothrombin	1.4	26	36.1	2056.8	1383.4
coagulation factor V precursor; labile factor; factor V Leiden	0.20	20	4.00	143.8	105.9
coagulation factor X precursor; prothrombinase; factor Xa	0.20	24	4.80	180.5	44.4
coagulation factor IX; Coagulation factor IX (plasma thromboplastic component)	0.091	24	2.18	77.0	30.2
Coagulation factor VIII VWF (von Willebrand factor)	0.037	234	8.67	173.8	





☒53 Correlation between Mascot Score and Cys Concentration (C x N) of Proteins in Serum Detected by ABI-4700 System.



☒54 Correlation between Mascot Score and Cys Concentration (C x N) of Proteins in Serum Detected by Q-Star XL System.

表17 Spike sample (Lactoglobulin)を用いたHiSpec(ICAT比較定量ソフト)によるICAT比較定量解析

**ABI-4700 の cICAT 比較定量結果**

Description	Peptide Sequence	測定値1 (H//L)	測定値2 (H/L)	平均値(H/L)	Spike 比 (H/L)
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	1.39	1.18	1.29	1.5
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	2.14	2.33	2.23	2
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	3.89	4.09	3.99	5
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	8.34	9.60	8.97	10
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	20.13	17.34	18.74	20
lactoglobulin, beta	WENDECAQK	28.99	35.27	32.13	40

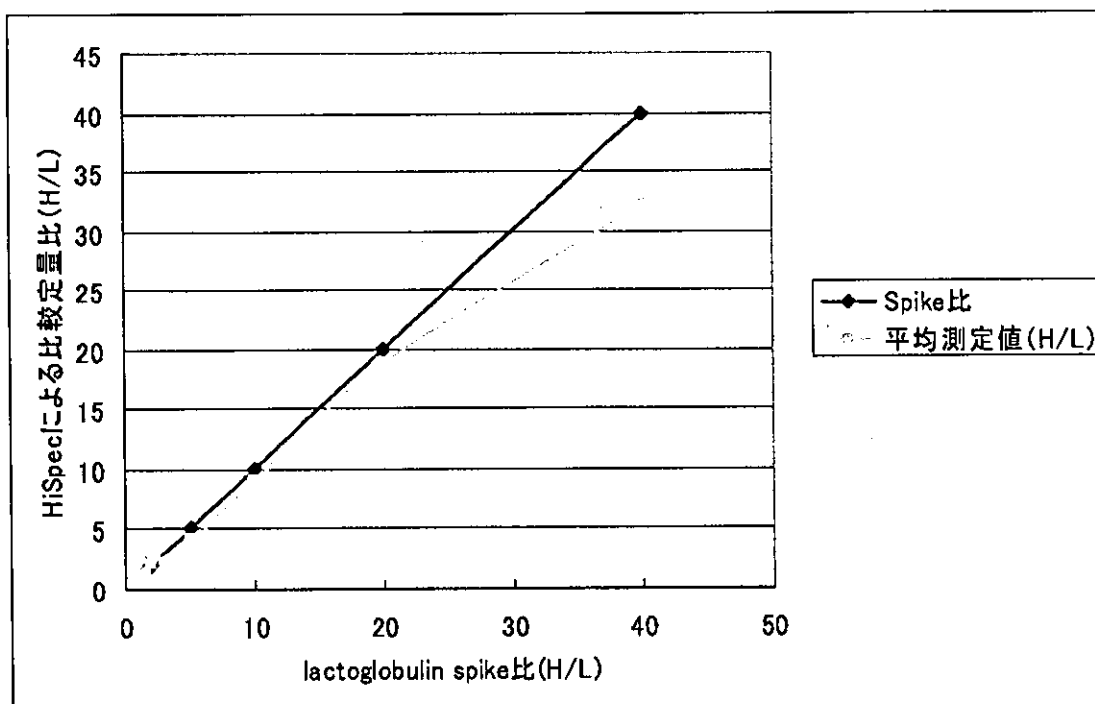


図55 ICAT比較定量ソフト(HiSpec)によるICAT比較定量比とSpike比との関係

## 疾患関連たんぱく質解析技術の確立

### －疾患関連グライコプロテオーム解析－

分担研究者 早川堯夫 国立医薬品食品衛生研究所副所長

**研究要旨** 糖鎖安定同位体標識法、及びリニアイオントラップ/フーリエ変換イオンサイクロトロン質量分析装置を用いた定量的定性的糖タンパク質糖鎖プロファイリング法を開発し、自己免疫疾患全身性エリテマトーデスモデルマウスと正常マウス腎臓に発現する糖タンパク質糖鎖の差異解析を行った。その結果、疾患モデルマウスと正常マウスでは、腎臓の可溶性及び不溶性画分中のN結合糖鎖の量が異なっていることが明らかとなった。そこで、蛍光標識2次元ディファレンシャル電気泳動を用いてタンパク質の発現解析を行ったところ、疾患モデルマウスでは、糖鎖生合成の初期段階に関与する $\alpha$ -glucosidase IIの発現量が低下していることが明らかとなった。これらの結果は、疾患モデルマウスの腎臓において、糖タンパク質糖鎖の生合成過程に何らかの変化が生じていることを示唆しているものと考えられる。本分析法は、疾患に関係する糖鎖や糖鎖関連タンパク質の探索に役立つことが示唆された。

#### 協力研究者

国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 川崎ナナ  
国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 橋井則貴

#### A. 目的

細胞発現タンパク質の約50%は糖タンパク質であり、糖鎖部分は細胞認識や接着等細胞間の相互作用や、様々なタンパク質の機能調節に関与していることが知られている。また、糖タンパク質の発現、及び結合糖鎖の構造や不均一性は、癌や自己免疫疾患等様々な疾病において変化していることが報告されている。従って、疾患の診断や治療法の発見のために、糖鎖の変化を見出すことは重要性である。

近年、細胞または組織に発現している全タンパク質（プロテオーム）を網羅的に解析することによって、疾患関連タンパク質を探索しようとする疾患プロテオミクス研究が盛んに行われている。しかし、

従来のプロテオミクスのアプローチでは、疾患に関与する糖タンパク質や糖鎖構造を見出すことは難しい。即ち、2次元電気泳動(2D-GE)、2次元HPLC(2D-LC)、質量分析(MS)、及びデータベース検索を基本とするタンパク質発現解析のみでは、疾患に伴って変化する糖鎖構造や、糖鎖構造が変化したタンパク質を明らかにすることは困難である。疾患関連糖タンパク質及び糖鎖を探索するためには、糖鎖の定性的・定量的解析に基づくグライコプロテオーム・グライコーム解析技術の開発が不可欠である。

我々はこれまでに、LC/MSやLC/MS/MSを用いた糖タンパク質糖鎖解析法を開発し、様々な糖タンパク質の解析に応用してきた(*Anal. Biochem.*, 2003)。昨年度本研究では、独自に開発したグラファイトカーボンカラムを用いたLC/MS(GCC-LC/MS)による糖鎖プロファイリングが、細胞や組織に由来する糖鎖の解析に利用できるこ

とを示した(投稿中)。また別途我々は、安定同位体標識法を用いた定量的糖鎖プロファイリング法を開発している(*J. Chromatogr. A*, 2005)。この方法は、Fig.1 に示すように、糖鎖の標識法として最も広く使われているピリジルアミノ化法を基本とするもので、検体糖鎖と標準糖鎖をそれぞれ2-アミノピリジン( $d_0$ AP)及び6重水素置換2-アミノピリジン( $d_6$ AP)で標識して $d_0$ PA糖鎖及び $d_4$ PA糖鎖とし、等量混合物をLC/MSで分析するものである。ここで両サンプルに共通して含まれる糖鎖は4 Da 差のイオン対として検出されるが、検体または標準サンプルにのみ存在する糖鎖は単一のイオンとして検出される。従って、検体に特徴的な糖鎖を容易に見分けることができるだけでなく、共通に存在する糖鎖は、その結合量を比較することが可能である。さらに我々は、多段階MS/MS( $MS^n$ )測定が可能なイオントラップ型質量分析装置(linear ion trap mass spectrometry)と高精度質量分析装置(Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry)を組み合わせたlinearITMS/FT-ICRMSを用いた精密MS測定及び糖鎖配列解析に基づく効率的糖鎖プロファイリング法(投稿中)を開発している。これら3つの分析方法を組み合わせることによって、細胞・組織由来糖鎖の定量的かつ定性的糖鎖プロファイリングが可能となり、疾患関連糖タンパク質糖鎖の探索が容易になるものと期待される。

ヒト全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)はループス腎炎等の慢性炎症性疾患を主症状とする自己免疫疾患である。SLEでは異常糖鎖を持つIgGが増加することや、 $\alpha$ -mannosidase II ノックアウトマウスがSLE様のループス腎炎を引き起こすことから、SLEの病態と糖鎖との関連性が注目されている。自己免疫疾患の原因及び発症機序を解明するために、様々な自己免疫疾患モデルマウスが作製されている。その中でも特にMRL/MpJ-lpr/lprマウス(lpr/lpr, ループスモデルマウス)は、ループス腎炎、関節炎及び抗核酸抗体産生等を表現することから、SLE様症状を自然発症

するモデルとしてよく利用されている。

本研究では、疾患関連タンパク質解析技術の一つとして、疾患に関係する糖鎖及び糖タンパク質の探索に焦点を当てた疾患関連糖タンパク質及び糖鎖解析法の開発を行った。すなわち、安定同位体標識法とGCC-LC/linearITMS/FT-ICRMSを用いた糖鎖プロファイリングを組み合わせた定量的かつ定性的糖鎖プロファイリング法を開発した。また、本分析法を用いて、SLEモデルマウスであるlpr/lpr、及びそのコントロールマウスMRL/Mp +/+ (+/+)の腎臓に発現する糖タンパク質N結合糖鎖の差異解析を行い、病態モデルと正常マウスでは、糖鎖結合量が異なることを見出した。そこで、蛍光標識2次元ディファレンシャル電気泳動(2D DIGE)を用いて、疾患モデルマウスと正常マウス間における糖タンパク質発現の差異を調べた。

## B. 研究方法

### 1) SLEモデルマウス腎臓由来可溶性タンパク質及び不溶性タンパク質の分画

lpr/lprマウス、及び+/+マウスの腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した。lpr/lpr及び+/+マウスの腎臓(n=3)から難溶性結合組織をCell strainer(70 mm, BD Biosciences)によって除去した後、組織細胞を遠心分離(1000 rpm, 5 min)によって回収した。得られたペレット中に混在する赤血球を10倍量の $NH_4Cl$ -Tris溶液(pH 7.2, 4°C, 2 min)処理により除去した後、プロテインインヒビターを含むPBS溶液で細胞を3回洗浄した。

可溶性及び不溶性タンパク質は市販のタンパク質分画キット(2D Fractionation kit, Amersham Biosciences, USA)を用いて、プロトコールに従い分画した。得られたタンパク質はアセトン沈殿(-20°C, 2 h)及び遠心分離(12000×g, 4°C, 10 min)により脱塩及び脱脂した後、7 M urea, 2 M thiourea, 18 mM DTT, 2% CHAPSを含むバッファーに溶解してサンプル溶液とした。タンパク質濃度は2D Quant kit (Amersham Biosciences)で定量した。