

2) 可溶性及び不溶性タンパク質画分からの N 合型糖鎖の切り出し

200 µg のタンパク質を含むサンプル溶液をアセトン沈殿、及び遠心分離により脱塩、乾燥した。サンプルに 8 M グアニジン塩酸塩、及び 5 mM EDTA を含む 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) 溶液 (500 µl) を加えて溶解し、さらに 2-メルカプトエタノール 3.6 µl を加えて室温で 2 時間放置した。モノヨード酢酸ナトリウム 10 mg を試料溶解液 84 µl に溶かし、試料溶液に加えて遮光下、室温で 2 時間放置した。反応終了後、PD-10 カラム (Amersham Biosciences) を用いて脱塩し、得られた溶液を凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルに PNGaseF (10 unit) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 500 µl を加えて、37 °C で 48 時間反応させた。反応液はエタノール沈殿によりタンパク質を除去した後、上清を濃縮、凍結乾燥した。

3) 糖鎖のピリジルアミノ化

カップリング試薬、及び還元試薬はそれぞれ 12.8 M AP-酢酸溶液、及び 3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液を用いた。20 µl のカップリング試薬を 200 µg の lpr/lpr マウス由来タンパク質から切り出した糖鎖に加えて 90 °C で 60 分間反応させた。反応液に 20 µl の還元試薬を加えて 80 °C で 60 分加熱して還元した。さらに、反応液にトリエチルアミン-メタノール (40 µl) 及びトルエン (50 µl) を加えた後、窒素気流下減圧乾固した (60 °C, 15 分間)。過剰の未反応試薬は残渣にメタノール (20 µl) 及びトルエン (40 µl) を加えた後、窒素気流下減圧除去した (60 °C, 10 分間)。さらに 50 µl のトルエンを残渣に加えた後、窒素気流下減圧乾固した (50 °C, 10 分間)。+/+マウス由来糖鎖は d₆AP で標識した。PA-糖鎖は Envi-Carb (Supelco, Bellefonte, USA) を用いて脱塩した。

4) 2D DIGE

4-1) タンパク質の Cy 標識

可溶性画分のタンパク質は 2D DIGE 用蛍光 cyanine dyes (CyDye DIGE Fluor minimal dyes: Cy2, 3, 5, Amersham biosciences) を用いてプロトコールに従いラベル化した。各標識試薬は無水ジメチルホルムアミド (DMF) で 400 pmol/µl に希釈し、50 µg のタンパク質に対して 400 pmol を使用した。サンプル溶液に標識試薬を加えて混和後、氷上暗所で 30 分間インキュベートした。10 mM リジンを加えて反応を停止させ、CyDye 標識サンプルとした。スタンダードとして、全てのサンプル (+/+1, +/+2, +/+3, lpr/lpr-1, lpr/lpr-2, lpr/lpr-3) の等量混合液を使用した。サンプルと CyDye の組み合わせは以下の通りである (Table 1)。

Table 1 2D DIGE experimental design for differential in-gel analysis

Gel Number	Cy2	Cy3	Cy5
1	Standard	+/+1	lpr/lpr-1
2	Standard	lpr/lpr-2	+/+2
3	Standard	+/+3	lpr/lpr-3

4-2) 1 次元目等電点電気泳動 (IEF: isoelectric focusing)

3 種類の標識サンプル溶液 (各 50 µl/ ゲル) を混和した後、等量のサンプルバッファー (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4 % CHAPS, 2 % Pharmalyte (pH 3-10), 130 mM DTT) を加えて IEF 用サンプル溶液とした。IEF 用ゲルとして、Immobiline DryStrip ゲル (IPG strip, 24 cm, pH 3-10 non-linear, Amersham biosciences) を使用し、サンプルを膨潤添加法により添加した後、下記の条件で IPGphorII (Amersham biosciences) を用いて泳動を行った (Table 2)。

Table 2 IEF condition

Step	Voltage (V)	Duration (h:min)	Volt-hour (kVh)
Rehydration		10:00	
1	500	1:00	0.5
2	1000	1:00	1.0
3	8000	8:20	62.5
	Total	10:20	64.0

(50 μ A/strip)

4-3) 2次元目電気泳動

1次元目電気泳動終了後、タンパク質チオール基をcarboxyamidemethyl化するためにIPG stripを2種類のバッファー(50 mM Tris-Cl (pH 8.8), 6 M urea, 30 % glycerol, 2 % SDS, 65 mM DTT), 及び(50 mM Tris-Cl (pH 8.8), 6 M urea, 30 % glycerol, 2 % SDS, 135 mM iodoacetamide)で平衡化した。2次元目電気泳動用ゲルは12%アクリルアミドゲル(25.5×20 cm, 1.0 mm)を使用し、泳動装置はEttanDALTwelve gel format (Amersham biosciences)を用いた。また、陽極側に×1、陰極側に×2の泳動バッファー(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS)を使用して1W (max. 600 V, 400 mA), 28時間泳動した。DIGE画像の取り込みはTyphoon 9400 (Amersham biosciences)を用いた。レーザ及び蛍光フィルターとして、Cy2は488/520 nm bandpass (BP) 40nm, Cy3は532/580 nm BP 30 nm, 及びCy5は633/670 nm BP 30 nmを使用した。画像解析及び統計処理はCy2画像をスタンダードとしてDeCyder Differential Analysis Software (Version 5.0, Amersham biosciences)を用いて行った。

4-4) 質量分析用2次元電気泳動

質量分析用サンプルとして、各100 μ l (500 μ g)のCy未標識スタンダード溶液を使用した。両サンプル溶液を混和後、前述と同様にサンプル溶液の調製、1次元及び2次元目電気泳動を行った。ゲルはSypro Ruby (Molecular Probes)で染色し、ゲル画像

の取り込みはTyphoon 9400 (457 nm/610 BP 30 nm)で行った。

5) スポットピッキング及びゲル内消化

質量分析用ゲルと解析用ゲルはDeCyderを用いてマッチングさせた。スポットのピッキングはDeCyderで作成したピッキングリストを使用してProHunter AS-2000 (アズワン株式会社)で行った。

ゲル内消化はすべて96穴プレート(V底ウェルタイプ, Nunc)内で行った。まず、100 μ lの50%メタノールを含む50 mM重炭酸アンモニウム水溶液で30分間振とうし、ゲル片を脱色した。さらに100 μ lの100%アセトニトリルで30分間インキュベートした後、Speed Vacで完全に乾燥させた。乾燥させたゲル片に5 μ lのトリプシン溶液(20 μ g/ml, 0.1%オクチルグルコシドを含む20 mM重炭酸アンモニウム)を加え、37°Cで一晩反応させた。50 μ lの1%トリフルオロ酢酸水溶液/50%アセトニトリルを加え、4°Cで5分間超音波処理し、ペプチド抽出液を回収した。次いで70 μ lの0.2%トリフルオロ酢酸水溶液/50%アセトニトリルを加え、再度抽出処理を行った。さらに100%アセトニトリルを加えて、室温で15分間インキュベート下の後に抽出液をすべて回収し、Speed Vacを用いて濃縮した。

6) LC/MS

6-1) LC/MSによるPA糖鎖のプロファイリング
分析条件は以下の通りである。

LC:

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

カラム: Hypercarb (Michrom BioResource 社製, 0.2×150 mm, 5 μ)

溶離液 A: 2%アセトニトリルを含む5 mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

溶離液 B: 80%アセトニトリルを含む5 mM酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6)

グラジエントプログラム：B 液 5~45 %
(60分)

流速：2 μ l/分,

ESI-MS :

装置：LTQ-FT (Thermo Electron, USA)

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 $^{\circ}$ C

ESI 電圧：2.0 kV

スキャン範囲：700-2,000

MSⁿ 測定 (n=2-4)

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 $^{\circ}$ C

ESI 電圧：2.0 kV

スキャン範囲：100-2,100

Isolation width : 3.0 unit

Activation time : 30 ms

Collision Gas : N₂

Collision energy : 30 %

データ依存的に MSⁿ 測定を行った。

6-2) LC/MS/MS によるタンパク質の同定
条件は以下の通りである。

LC :

装置：Paradigm MS4 (Michrom BioResource,
USA)

オートサンプラー LC-PAL (CTC)

カラム：MAGIC C18 (Michrom BioResource,
0.2 \times 50 mm, 3 μ)

溶離液 A：0.1 % 酢酸を含む 2 % アセトニ
トリル水溶液

溶離液 B：0.1 % 酢酸を含む 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：2 μ l/min

LC/MS/MS :

装置：LTQ

分析条件は 6-1) に準ずる。

データベース検索エンジン：Mascot (Matrix
Science) 及び TurboSEQUEST (Thermo
Electron)

倫理面への配慮

本研究では、市販の動物組織を使用しているの
で特に配慮は行っていない。

C. 実験結果

1) SLE モデルマウス及び正常マウス腎臓由来糖
タンパク質糖鎖の差異解析

lpr/lpr 及び+/+マウスを病態及びコントロールマ
ウスとし、それぞれの可溶性及び不溶性画分を用い
て糖鎖差異解析を行った。

1-1) 可溶性画分由来 N 結合型糖鎖の差異解析

lpr/lpr 及び+/+マウス腎臓の可溶性画分から
PNGaseF で N 結合型糖鎖を切り出し、それぞれ d₀AP
及び d₄AP で標識した。タンパク質量から換算して
等量に相当する d₀PA 及び d₄PA 糖鎖の混合物を
GCC-LC/linearITMS/ FT-ICRMS で分析した。Fig. 2A
はベースピーククロマトグラム (上段), 及びその 2
次元表示図 (time vs m/z value, 下段) である。病態
モデルにおける糖鎖結合量は、正常モデルにおける
糖鎖結合量を 1.0 とし、d₀PA と d₄PA のイオン強
度比から算出した。また、各イオンの糖鎖構造は、
FT-ICRMS で測定した精密分子量から計算された
糖組成、及び linearITMS による MSⁿ の結果得られ
た糖鎖配列情報を基に推定した。以下に代表的な糖
鎖の解析例を示す。

Fig. 3A はイオン強度が最も高く、32 分 (K2) に
溶出された糖鎖のマスペクトルである。m/z
989.88 及び m/z 991.89 のイオンは lpr/lpr マウスに由
来する糖鎖、及び+/+マウスに由来する糖鎖のイオ
ンである。両イオンの強度から、この糖鎖の結合量

は、病態モデルでは正常マウスの1.23倍に増加していることが明らかとなった。また、 m/z 989.88及び991.89のイオンは、 $[\text{Hex}]_9[\text{HexNAc}]_2$ (理論分子量, 1960.77, 1964.77 Da) 糖鎖のアンモニア付加体であることが分かった。Fig. 3Bは、 m/z 989.9をプリカーサーイオンとする MS^n スペクトルである。 MS^{2-4} スペクトルにおいて、ヘキソースの2価及び1価イオンに相当する m/z 81及び162間隔のY系列イオンが多数検出されたことから、本糖鎖は図中に示すようなM9糖鎖であることが明らかとなった。

Fig. 4AにM9のイオンに次いで強く検出された33.5分(E2)の糖鎖のマススペクトルを示す。イオン対 m/z 1189.47及び1191.48のイオン強度比から、この糖鎖の結合量は、病態モデルマウスでは正常マウスに比較して1.34倍に増加していることが明らかとなった。 m/z 値から算出した計算分子量(lpr/lpr; 2376.96 Da及び+/+; 2380.98 Da)は、糖組成式 $[\text{Fuc}]_3[\text{Hex}]_5[\text{HexNAc}]_5$ の1アンモニア付加体(理論分子量, lpr/lpr; 2377.22, +/+; 2381.22)に一致することから、これらのイオンは、Fucが3分子結合した2本鎖または3本鎖糖鎖のイオンであると推定された。Fig. 4Bは m/z 1191.5をプリカーサーイオンとする MS^n スペクトル、及び推定構造である。 MS^2 スペクトルに、 $[\text{Fuc}]_1[\text{Hex}]_1[\text{HexNAc}]_1$ 及び $[\text{Fuc}]_2[\text{Hex}]_1[\text{HexNAc}]_1$ のBイオン($\text{B}_{2\alpha}/\text{Y}_{5\alpha}^+$ または $\text{B}_{2\alpha}/\text{Y}_{6\alpha}^+$ 及び $\text{B}_{2\alpha}^+$)に相当する m/z 512及び m/z 658が確認された。また $[\text{Hex}]_1[\text{HexNAc}]_1$ のBイオン($\text{B}_{2\beta}^+$)に相当する m/z 366も強く検出された。 $\text{B}_{2\alpha}/\text{Y}_{5\alpha}^+$ または $\text{B}_{2\alpha}/\text{Y}_{6\alpha}^+$ フラグメントイオンは $\text{B}_{2\alpha}/\text{Y}_{6\alpha}^+$ フラグメントイオンの部分構造に相当すると考えられることから、本糖鎖は側鎖のGal-GlcNAcに2分子のFucが付加した構造を有することが示唆された。さらに MS^3 スペクトルに $\text{Y}_{4\alpha/4\beta}^+$ が検出されたことから、残りのFucは側鎖ではなくコア部分に付加していることが明らかになった。このFucは、一般的によく見られる糖鎖のように、還元末端GlcNAcに結合していると推定される。本糖鎖のもう1つの特徴は、5分子のHexNAcを持つことであ

る。N結合型糖鎖の場合、2分子のGlcNAcはコア部分を構成していることから、3分子のGlcNAcが側鎖に結合していると考えられる。従って、本糖鎖は3本鎖糖鎖またはbisecting GlcNAcが付加された2本鎖糖鎖と推定された。 MS^3 スペクトルを精査したところ、プロダクトイオン m/z 872($\text{Y}_{1/3\alpha/3\beta}^+$)及び1018($\text{Y}_{3\alpha/3\beta}^+$)が検出されたことから、この糖鎖にはbisecting GlcNAcが存在することが明らかとなった。これらの結果から、本糖鎖はGal-GlcNAc構造に2分子のFucが付加した側鎖構造を有するasialo-fucosylated bisected 2本鎖糖鎖であることが示唆された。

他のイオンについても同様に帰属した結果をTable 3に示す。また各糖鎖の推定糖鎖構造をTable 4に示す。解析の結果、マウス腎臓の可溶性画分に多く存在するN結合糖鎖は高マンノース型糖鎖M5-9(C1, A1, P1, N2及びK2)及びM9に1分子のヘキソースが付加した糖鎖M9+Hex(I1)であることが明らかとなった。また、これらの糖鎖結合量は、病態モデルマウスでは正常マウスと比較して、1.22-1.72倍に増加していることが分かった。高マンノース型糖鎖以外に腎臓に特徴的な糖鎖として、フコシル化トリマンノシルコア、及びコア糖鎖の非還元末端Manが欠損した比較的小さい糖鎖が検出された。これらの糖鎖の結合量は、病態では1.49-1.99倍に増加していることが明らかとなった(F1, L1及びO1)。さらに、Gal-GlcNAc構造に1分子のFucが付加した側鎖構造を有するasialo fucosylated bisected 2本鎖糖鎖(G1)、G1糖鎖の末端Galを欠く糖鎖(J1)及びasialo agalacto-fucosylated 2本鎖糖鎖(M1)などもマイナー糖鎖として検出され、これらの糖鎖も病態モデルマウスでは正常マウスと比較して1.23-2.27倍に増加していた。

以上の結果、可溶性画分ではlpr/lprマウス由来糖鎖の結合量は、+/+マウス由来糖鎖よりも全体的に増加していることが明らかとなった。

1-2) 不溶性画分由来 N 結合糖鎖の差異解析

可溶性画分と同様に, *lpr/lpr* マウス及び+/+マウスの不溶性画分から切り出した糖鎖を d_6 AP 及び d_6 AP でそれぞれ標識し, GCC-LC/linearITMS/FT-ICRMS で分析した (Fig. 2B). 不溶性画分由来糖鎖の中で最も多く存在する糖鎖は, 34.5 分 (E2)に溶出された側鎖の Gal-GlcNAc に 2 分子の Fuc が付加した asialo-fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖であり, その結合量は, 病態モデルでは正常マウスに比べて 66% に減少していることが明らかとなった. 次に結合量が多かった糖鎖は高マンノース型糖鎖 M9 (K2)及び M5 (C1)で, これらの糖鎖は正常と比較して, 0.65-0.72 倍に減少していた. さらに Gal-GlcNAc 構造に 1 分子の Fuc が付加した asialo fucosylated bisected 2 本鎖糖鎖 (G1), G1 糖鎖の末端 Gal を欠く糖鎖 (J1), 及び asialo agalacto-fucosylated 2 本鎖糖鎖 (M1) などが主な糖鎖として検出され, これらの糖鎖も正常と比較して, 0.55-0.56 倍に減少していることが明らかとなった.

以上の結果, 病態モデルマウスでは正常マウスと比較して, 可溶性画分の糖鎖結合量は全体的に増加し, 不溶性画分では逆に減少していることが明らかになった.

2) SLE モデルマウス及び正常マウス腎臓組織発現タンパク質の差異解析

lpr/lpr マウスの腎臓由来可溶性及び不溶性タンパク質糖鎖の結合量は, +/+マウスとは異なっていることが明らかになった. このように糖鎖結合量に差異が認められた原因として, 糖タンパク質の発現量が増加した可能性, 及びタンパク質の発現量に変化はないが, 糖鎖生成過程に何らかの変化が生じた可能性が考えられた. そこで *lpr/lpr* マウス, 及び+/+マウス腎臓における糖タンパク質の発現量を比較する目的で, 2D DIGE による発現タンパク質の差異解析を行った.

2-1) 可溶性画分のタンパク質発現解析

Fig.5 は可溶性画分の 2 次元電気泳動画像である. 可溶性画分の 2D DIGE では検出された約 3000 個のスポットの中 133 スポットに有意差が認められた. その中で増加したスポットは 82 個, 減少したスポットは 51 個であった. 有意差が認められたスポットのタンパク質同定結果を Table 5 に示す. 減少したタンパク質は α -glucosidase II α -subunit (No. 404, 438) metastasis-associated protein (No. 665), β -glucuronidase precursor (No. 796) 及び unnamed protein product (No. 868) などであった. また発現量が増加したタンパク質は oxoglutarate dehydrogenase (No. 459, 460), interferon-inducible protein 10 receptor (No. 556), aconitase II (No. 604), thimet oligopeptidase I (No. 690), ezrin (No. 693, 697), transglutaminase type 1 (No. 788) 及び PDZ domain containing I (No. 876) などであった. これらの発現量に変化が認められたタンパク質の中で, 糖鎖結合量の変化に関係して特に注目すべきタンパク質は α -glucosidase II α -subunit である. このタンパク質は糖タンパク質糖鎖生成過程の初期段階に関与する酵素として知られている. α -glucosidase II の発現量の低下は, 糖タンパク質糖鎖の生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思われる.

2-2) 不溶性画分のタンパク質発現差異解析

Fig.6 に不溶性画分の 2 次元電気泳動画像を示す. 検出されたスポット数は可溶性画分と同様に約 3000 スポットで, 43 スポットに有意差が認められた (Table 6). 有意差が認められたタンパク質を同定した結果, 増加したタンパク質は, nidogen 1 (No.132, 134 及び 137), NADH dehydrogenase (No. 302), vacuolar H^+ -ATPase (No. 492), D-lactate dehydrogenase (No. 702), tropomodulin 3 (No. 775), metaxin 2 (No. 1039), NADPH dehydrogenase (No. 1051) 及び glutathione peroxidase 3 (No. 1058 及び 1068) であった. 減少したタンパク質は, α -glucosidase II α -subunit (No. 155 及び 162), meprin (No.240) 及

び ATPS (No. 604, 609) であった。α-glucosidase II α-subunit は不溶性画分でも減少していることが明らかとなった。α-glucosidase II は不溶性のα及び可溶性のβ-subunit から成るヘテロ 2 量体で、α-subunit はβ-subunit と結合したときに可溶化することが知られている。可溶性の α-subunit が不溶性画分から検出された理由として、細胞を可溶化した時に一部の α-glucosidase II が解離され、不溶性になった α-subunit が不溶性画分に移行したと考えられる。

D. 考察

本研究では糖鎖の安定同位体標識法と GCC-LC/linearITMS/ FT-ICRMS を組み合わせた定性的・定量的糖鎖プロファイリング法を用いて、SLE モデルマウス (lpr/lpr) 及び正常マウス (+/+) 腎臓由来 N 結合型糖鎖の差異解析を行った。lpr/lpr マウス由来糖鎖は、可溶性画分では正常マウスに比べて増加しているのに対して、不溶性画分では逆に減少していることが明らかとなった。この結果から、糖タンパク質の発現量が変化している可能性、あるいは、タンパク質の発現量に変化はないが、糖鎖の結合量に変化が生じている可能性が考えられた。そこで、2D DIGE によるタンパク質発現差異解析を行ったところ、lpr/lpr マウスと+/+マウス間で、発現量が変化した糖タンパク質は極一部であり、両マウス腎臓由来糖タンパク質の全体の発現量には、ほとんど差がないことが明らかとなった。この結果は、lpr/lpr マウスと+/+マウス間の糖鎖結合量の差は、糖タンパク質の発現量の差異に基づくものではないことを示している。さらに、2-D DIGE による発現差異解析の結果、α-glucosidase II α-subunit の発現量が可溶性及び不溶性画分共に減少していることが明らかになった。

Fig. 7 は、小胞体における N 結合糖鎖の生合成過程をまとめたものである。はじめに、M9 糖鎖に 3 分子の Glc が付加した糖鎖 (M9+Glc₃) がドリコールリン酸からタンパク質に移行される。非還元末端

の 2 分子の Glc は α-glucosidase I によって切断され、ついで、残りの 1 分子の Glc は α-glucosidase II によってトリミングされる。Glc が切断されて非還元末端となった Man は α-mannosidase I によって順次切り離され、M5 までトリミングされる。M5 となった糖鎖を有するタンパク質は、ゴルジ装置に輸送される。ゴルジ装置で N-acetylglucosaminyltransferase I (GnT-I) によって GlcNAc が付加された後、糖鎖生合成経路は 2 つに別れる。複合型糖鎖合成経路と、混成型糖鎖合成経路である。今回、可溶性画分で検出された M9 にヘキソースが付加した糖鎖は、N 結合糖鎖生合成過程から、M9+Glc と推定される。本研究では、この M9+Glc 糖鎖を基質とし、糖鎖の生合成の初期段階に関与する酵素 α-glucosidase II の発現が、病態モデルマウスでは低下していることが明らかとなった。糖鎖結合量が、lpr/lpr マウス腎臓と正常マウスの腎臓とは異なっていたという結果と合わせて、病態モデルマウスでは、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が示唆された。

2D DIGE では、α-glucosidase II α-subunit 以外に、SLE または炎症反応に関与することが報告されている多くのタンパク質が同定された。可溶性画分で検出された oxoglutarate dehydrogenase は dihydrolipoyl transacylase E2 と複合体を形成して抗ミトコンドリア抗体の抗原となるタンパク質である。この自己抗体が SLE 患者において検出されることから、SLE との関連性が指摘されている。抗 transglutaminase 抗体も同様に SLE 患者から検出されることが知られている。Interferon-inducible protein 10 receptor は lpr/lpr マウスの免疫応答及び炎症反応惹起に関与するタンパク質として報告されている。Ezrin は細胞膜とアクチンフィラメントの架橋タンパク質であり、アポトーシスの初期段階に遊離されることが知られている。lpr/lpr マウスは Ras の変異によりアポトーシスに抵抗性を示すことから、このようなアポトーシスに関連した分子の発現量

が変化していることは非常に興味深い。

不溶性画分で検出された Nidogen 1 は、IV 型 collagen, laminin, perlecan と共に基底膜を構成している分子であり、これらの分子と複合体を形成し、インテグリンなどの分子間相互作用に関与している可能性が示唆されている。ループス腎炎では腎基底膜が肥厚すること、SLE 患者では抗 nidogen 抗体価が上昇することから、SLE との関連性が指摘されている。Meprin は、ごく最近になって、炎症性疾患時に増加することが知られているマンナン結合タンパク質 (MBP) の生体内リガンドであることが明らかにされた糖タンパク質である。Lamin は核膜の裏打ち構造を構成する核膜タンパク質である。SLE 患者において抗 lamin B1 抗体価が上昇することが報告されていることから、lamin C の発現量が増加していたという結果は非常に興味深い。抗酸化酵素である Glutathion peroxylase 3 の発現量の増加は、ループス腎炎により組織細胞に障害が生じていることを反映していると考えられる。

このように、今回の研究では、これまでに SLE 関連タンパク質として個別に報告されていた複数のタンパク質の発現量の変化を一度の分析で確認することができただけでなく、新たに、糖鎖生合成過程に関与する α -glucosidase II の発現量が低下していることを見出した。

本研究では定量的・定性的糖鎖プロファイリング法を開発し、疾患モデルマウス腎臓の糖鎖の結合量が正常マウスの腎臓とは異なっていることを明らかにした。また、2D DIGE によるタンパク質発現解析を行い、糖鎖生合成に係わる α -glucosidase II の発現が低下していることを見出した。我々が開発した定量的定性的糖鎖プロファイリングは、一回の分析に 500 マイクログラムものタンパク質を必要とする 2D DIGE と比べ、20 マイクログラム程度のタンパク質量で分析できること、また、操作が簡単で、分析及び解析に要する時間が短いことから、糖鎖の構造や分布の変化を直接検出する糖鎖差異解析法と

してはもとより、糖鎖の生合成及び分解に関与するタンパク質発現の解析法としても利用できることが示唆された。さらに本研究では、糖鎖生合成に関与する α -glucosidase II が低下することによって、膜を主成分とする不溶性画分と可溶性画分における糖鎖結合量が変化することを見出した。今後、糖鎖の生合成及び分解系に関わる他の酵素の発現解析、及び主な糖タンパク質の糖鎖構造解析を進め、糖鎖生合成・分解系酵素と糖鎖分布の変化の関係、さらに自己免疫疾患や炎症性疾患と糖鎖生合成及び分解系酵素との関係を明らかにしていきたいと考えている。

E. 結語

安定同位体標識法、及び linearITMS/FT-ICRMS を用いた定量的定性的糖鎖プロファイリング法を開発し、SLE モデルマウス腎臓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、両マウスにおける糖鎖結合量は異なっていることが明らかとなった。また、2D DIGE によるタンパク質発現解析を行い、糖鎖生合成に関わる α -glucosidase II の発現が低下していることを見出した。以上の結果から、疾患モデルマウスの腎臓では、糖タンパク質糖鎖の生合成過程に何からの変化が生じていることが示唆された。

F. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Okada Y., Okada N., Mizuguchi H., Takahashi K., Takao HAYAKAWA, Mayumi T., Mizuno N. Optimization of antitumor efficacy and safety of *in vivo* cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim. Biophys. Acta*, **1670**, 172-180 (2004)
- 2) Kazufumi Katayama, Koichiro Wada, Hiroyuki Miyoshi, Kozo Ohashi, Masashi Tachibana, Rie Furuki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Atsushi Nakajima, Takashi Kadowaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Yoshinori

- Kamisaki, Tadanori Mayumi ; RNA interfering approach for clarifying PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA, *FEBS Lett* , **560**, 178-182 (2004)
- 3) Nakamura T., Peng K-W., Vongpunsawad S., Harvey M., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Cattaneo R., Russell S.J. Antibody-targeted cell fusion, *Nature Biotech.*, **22**, 331-336 (2004)
 - 4) Okada N., Gao J-Q., Sasaki A., Niwa M., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Fujita T., Yamamoto A., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **317**, 68-76 (2004)
 - 5) Katayama K., Wada K., Miyoshi H., Ohashi K., Tachibana M., Furuki R., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Nakajima A., Kadowaki T., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Kamisaki Y., Mayumi T. : RNA interfering approach for clarifying the PPAR γ pathway using lentiviral vector expressing short hairpin RNA., *FEBS Letters*, **560**(1-3): 178-182, (2004)
 - 6) Gao J-Q, Alexandre L.S., Tsuda Y., Katayama K., Eto Y., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Nakayama T., Yoshie O., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Tumor-suppressive activities by chemokines introduced into OV-HM cells using fiber-mutant adenovirus vectors. *Pharmazie.*, **59**, 238-239 (2004)
 - 7) Kawai H., Suzuki T., Kobayashi T., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Kawanishi T. Simultaneous imaging of initiator / effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1693**, 101-110 (2004)
 - 8) Gao J-Q., Inoue S., Tsukada Y., Katayama K., Eto Y., Kurachi S., Mizuguchi H., Hayakawa T., Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. High gene expression of the mutant adenovirus vector, both in vitro and in vivo, with the insertion of integrin-targeting peptide into the fiber. *Pharmazie*, **59**, 571-572 (2004)
 - 9) Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* , **27**, 781-785 (2004)
 - 10) Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Simultaneous imaging of initiator/effector caspase activity and mitochondrial membrane potential during cell death in living HeLa cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1693**, 101-110 (2004)
 - 11) Shingo NIIMI, Masashi HYUGA, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Isolated small rat hepatocytes express both Annexin III and terminal differentiated hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase, at the mRNA level, *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(11), 1864-1866, (2004)
 - 12) Jun OKABE, Akiko EGUCHI, Renu WADHWA, Randeep RAKWAL, Rumi TSUKINOKI, Takao HAYAKAWA and Mahito NAKANISHI: Limited Capacity of the Nuclear Matrix to Bind Telomere Repeat Binding Factor TRF1 May Restrict the Proliferation of Mortal Human Fibroblasts, *Human Molecular Genetics*, **13**, 1-9 (2004)
 - 13) Masashi HYUGA, Satsuki ITO, 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)
 - 14) Eto Y., Gao J-Q, Sekiguchi F., Kurachi S., Katayama K., Mizuguchi H., Takao HAYAKAWA, Tsutsumi Y., Mayumi T., Nakagawa S. Neutralizing antibody evasion ability of adenovirus vector induced by the bioconjugation of MPEG-SPA. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 936-938 (2004)
 - 15) Tetsuji HOSONO, Hiroyuki MIZUGUCHI, Kazufumi KATAYAMA, ZHI-LI XU, Fuminori SAKURAI, Akiko ISHII-WATABE, Kenji KAWABATA, Teruhide YAMAGUCHI, Shinsaku

- NAKAGAWA, Tadanori MAYUMI, Takao HAYAKAWA : Adenovirus Vector-Mediated Doxycycline-Inducible RNA Interference, *Hum Gene Ther*, **15**, 813-819 (2004)
- 16) Hiroyuki Mizuguchi and Takao HAYAKAWA, Targeted adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.*, **15**, 1034-1044 (2004)
 - 17) Koizumi, N., Mizuguchi H., Kondoh, M., Fujii, M., Takao HAYAKAWA, Watanabe, Y. Efficient gene transfer into human trophoblast cells with adenovirus vector containing chimeric type 5 and 35 fiber protein. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 2046-2048 (2004)
 - 18) Satoru Kamoda, 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*, **1050**, 211-216(2004)
 - 19) Eriko Uchida, Koei Sato, Akiko Iwata, Akiko Ishii-Watabe, Hiroyuki Mizuguchi, Mikio Hikata, Mitsuhiro Murata, Teruhide Yamaguchi, and Takao HAYAKAWA: An improved method for detection of replication-competent retrovirus in retrovirus vector products, *Biologicals*, **32**, 139-146 (2004)
 - 20) 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)
 - 21) Satsuki ITOH, Akira HARZONO, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Yukari MATSUISHI, 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)
 - 22) Tetsu Kobayashi, Hiroshi Kawai, Takuo Suzuki, Toru Kawanishi, and Takao HAYAKAWA, Improved sensitivity of insulin in MALDI-TOF MS by premixing matrix CHCA with transferrin, *Rapid Communication in Mass Spectrometry* **18**, 1156-1160 (2004)
 - 23) Okamoto T., Mukai Y., Yoshioka Y., Shibata H., Kawamura M., Yamamoto Y., Nakagawa S., Kamada H., Takao HAYAKAWA, Mayumi T., Tsutsumi Y. : The Optimal Construction of Non-immune scFv phage display library from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs binding to antigens efficiently., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**(2):583-91, (2004)
 - 24) 早川 堯夫 : バイオロジクスの将来展望と課題、バイオロジクス:生体由来物質を用いた製品開発、(社)高分子学会編、pp.5-42 (2004)、(株)エヌ・ティー・エス、東京
 - 25) 早川 堯夫、永田龍二:バイオロジクスの品質と安全性評価、薬の安全性(長尾 拓編)、南山堂、pp.33-51 (2004) 東京
 - 26) 早川 堯夫、永田 龍二:再生医療分野における指針・ガイドライン:再生医療の適正かつ効果的な推進を目指して、*再生医療* **3**(3): 1195-1197 (2004)
 - 27) 早川 堯夫、石井明子:バイオ医薬品の現状と将来、*J.Integrated Med.*, **14**(2)、142-143 (2004)
 - 28) 早川 堯夫 : バイオ創薬の新たな展開と効果的な推進に向けて、*Drug Delivery System*, **19**(2), 18 (2004)
 - 29) 水口裕之、早川 堯夫; アデノウイルスベクター: *Mebio*, **21**(4), 8-16 (2004)
 - 30) 川崎ナナ、橋井則貴、伊藤さつき、日向昌司、川西 徹、早川 堯夫: LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングによるグライコーム解析. *生物物理化学*, **48**, 5-10 (2004)
 - 31) 早川 堯夫: 米国における新薬開発の動向、大阪医薬品協会会報、**662**, 1-18 (2004)
 - 32) Naoki Okada, Sayaka Iiyama, Yuka Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi, Takuya Fujita, Akira Yamamoto; Immunological properties and vaccine efficacy of murine dendritic cells simultaneously expressing melanoma-associated antigen and interleukin-12, *Cancer Gene Ther.* **12**, 72-83 (2005)
 - 33) Sumimoto H., Yamagata S., Shimizu A., Miyoshi H., Mizuguchi H., Hayakawa T., Miyagishi M., Taira K., Kawakami Y. Gene therapy for human small cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference. *Gene*

- Ther.*, **12**, 95-100 (2005)
- 34) Okada N., Mori N., Koretomo R., Okada Y., Nakayama T., Yoshie O., Mizuguchi H., Hayakawa T., Nakagawa S., Mayumi T., Fujita T., Yamamoto A. Augmentation of the migratory ability of DC-based vaccine into regional lymph nodes by efficient CCR7 gene transduction. *Gene Ther.*, **12**, 129-139 (2005)
- 35) Maeda M., Kida S., Hojo K., Eto Y., Gao J-Q, Kurachi S., Sekiguchi F., Mizuguchi H., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S., Kawasaki K. Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Medicinal. Chem. Lett.*, **15**, 621-624 (2005)
- 36) Gao J-Q, Sugita T., Kanagawa N., Iida K., Eto Y., Motomura Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Hayakawa T., Mayumi T., Nakagawa S. A single intratumoral injection of a fiber-mutant adenoviral vector encoding interleukin 12 induces remarkable anti-tumor and anti-metastatic activity in mice with Meth-A fibrosarcoma *Biochem Biophys Res Commun.*, **328**, 1043-1050 (2005)
- 37) Masuo Kondoh, Akane Masuyama, Azusa Takahashi, Nagayoshi Asano, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Koizumi, Makiko Fujii, Takao Hayakawa, Yasuhiko Horiguchi and Yoshiteru Watanbe. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator, *Mol Pharmacol.*, **67**, 749-756 (2005)
- 38) Kayoko TAKAGI, Reiko TESHIMA, Haruyo OKUNUKI, Satsuki ITO, Nana KAWASAKI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA, Yuichi KOHNO, Atsuo URISU, Jun-ichi SAWADA: Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments, *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **136**, 23-32 (2005)
- 39) 早川 堯夫、石井 明子: スタンダード薬学シリーズ 第 8 巻 医薬品の開発と生産 第 13 章 組換え医薬品 (SBO28 組換え医薬品の特色と有用性を説明できる、SBO29 代表的な組換え医薬品を列挙できる、SBO30 組換え医薬品の安全性を概説できる)、*日本薬学会編、東京化学同人*, pp.98-103 (2005)
- 40) Toru KAWANISHI, S. ISHIZAKI, N. KAWASAKI, R. SHIBAYAMA, Hiroshi. KAWAI, H. OHATA, K. MOMOSE, Takao HAYAKAWA, Abnormal fluorescence spectra of carboxy SNARF-1 acetoxymethyl acetate ester-loaded hepatocytes –Biotransformation of Carboxy SNARF-1, a pH probe- *Pfluger Archiv. Eur. J. Physiol* (in press)
- 41) Xu Z.L., Mizuguchi H., Koizumi N., Sakurai F., Hosono T., Kawabata K., Watanabe Y., Yamaguchi T., Hayakawa T.: Approaches to improve the kinetics of adenovirus delivered gene and gene product. *Adv. Drug. Deli. Rev.*, (in press)
- 42) Naoya Koizumi; Masuo Kondoh; Hiroyuki Mizuguchi; Tsuyoshi Nakanishi; Akane Masuyama; Fumie Ida; Makiko Fujii; Takao Hayakawa; Emi Nakashima; Keiichi Tanaka; Yoshiteru Watanabe, Comparison of transgene expression mediated by several fiber-modified adenovirus vectors in trophoblast cells, *Placenta*, (in press)
- 43) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability, *J Gene Med.*, (in press)
- 44) Yuka Okada, Naoki Okada, Hiroyuki Mizuguchi, Takao Hayakawa, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi. Transcriptional targeting of RGD fiber-mutant adenovirus vectors can improve the safety of suicide gene therapy for murine melanoma, *Cancer Gene Ther.*, (in press)
- 45) Hiroko Shibata, Yasuo Yoshioka, Shinji Ikemizu, Kyoko Kobayashi, Yoko Yamamoto, Yohei Mukai, Takayuki Okamoto, Madoka Taniai, Maki Kawamura, Yasuhiro Abe, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Satoshi Nagata, Yuriko Yamagata, Tadanori Mayumi, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi: Functionalization of TNF- α using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window, *Clinical Cancer Research* (in press)
- 46) Takuo Suzuki, Tomoko Mogami, Hiroshi Kawai, Tetsu Kobayashi, Youichi Shinozaki, Yoji Sato, Toshihiro Hashimoto, Yoshinori Asakawa,

- Kazuhide Inoue, Yasuo Ohno, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi: Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives, *Phytomedicine* (in press)
- 47) Hiroko Shibata, Yasuo Yoshioka, Shinji Ikemizu, Kyoko Kobayashi, Yoko Yamamoto, Yohei Mukai, Takayuki Okamoto, Madoka Taniai, Maki Kawamura, Yasuhiro Abe, Shinsaku Nakagawa, Takao Hayakawa, Satoshi Nagata, Yuriko Yamagata, Tadanori Mayumi, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi: Functionalization of TNF- α h a using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window, *Clinical Cancer Research* (in press)
- 48) Tetsuji Hosono, Hiroyuki Mizuguchi, Kazufumi Katayama, Naoya Koizumi, Kenji Kawabata, Teruhide Yamaguchi, Shinsaku Nakagawa, Yoshiteru Watanabe, Tadanori Mayumi, Takao Hayakawa: RNA interference of PPAR γ using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells, *Gene*, (in press)
- 49) 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)
- 50) 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)
- 51) Niimi, S., Harashima, M., Takayama, K., Hara, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T. : Thrombomodulin enhances the invasive activity of mouse mammary tumor cells. *J. Biochem* (in press)
- 52) Niimi, S., Harashima, M., Gamou, M., Hyuga, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Expression of annexin A3 in primary cultured parenchymal rat hepatocytes and inhibition of DNA synthesis by suppression of annexin A3 using RNA interference. *Biol. Pharm. Bull.* (in press)
- 53) Nasimuzzaman, M., Kuroda, M., Dohno, S., Yamamoto, T., Iwatsuki, K., Matsuzaki, S., Rashel, M., Kumita, W., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakamura, H., Taguchi, T., Wakiguchi, H., Imai, S. Eradication of Epstein-Barr virus episome and associated inhibition of infected tumor cell growth by adenovirus vector-mediated transduction of dominant-negative EBNA1. *Mol. Ther.*, (in press)
- 54) Kawai H., Suzuki T., Kobayashi T., Sakurai H., Ohata H., Honda K., Momose K., Namekata I., Tanaka H., Shigenobu K., Hayakawa T., Kawanishi T.: Simultaneous real-time detection of initiator- and effector-caspase activation by double FRET analysis. *J. Pharmacol. Sci.*, (in press)
- 55) 水口裕之・川端健二・櫻井文教・早川堯夫；改良型アデノウイルスベクターを用いた造血幹細胞、間葉系幹細胞、ES細胞への高効率遺伝子導入、*炎症・再生*（日本炎症・再生医学会学会誌）、（印刷中）
- 56) 水口裕之・早川堯夫；ウイルスベクター：*Drug Delivery System*、（印刷中）
- 57) 早川堯夫、永田龍二：安全性評価の国内規制と技術商品化のための規制、医薬品、「遺伝子組換え体安全性評価システムガイドブック」、（株）エヌ・ティー・エス、東京、（印刷中）
- 58) 早川 堯夫、永田 龍二：商品化のための規制－医薬品 in 日野 明寛, 田部井 豊, 矢木 修身 ed.: 新しい遺伝子組換え体（GMO）による安全性評価システムガイドブック－食品・医薬品・微生物・動植物－、（株）エヌ・ティー・エス、東京、（印刷中）
- 59) Hiroshi Kawai1, Takuo Suzuki, Tetsu Kobayashi, Haruna Sakurai, Hisayuki Ohata, Kazuo Honda, Iyuki Namekata, Hikaru Tanaka, Koki Shigenobu, Ryu Nakamura, Takao Hayakawa and Toru Kawanishi : Simultaneous measurement of inhibitor- and effector-caspase activation by double FRET analysis, *J. Pharmaceutical Sci.*, (submitted)
- 60) Tanaka K., Towata S., Nakao K., Mizuguchi H., Hayakawa T., Niwa M., Ishii N., Nagayama Y.: Thyroid cancer immuno-therapy with retroviral and adenoviral vectors expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-12 in a rat model. *Clin.*

Endocrinol., (submitted)

- 61) 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)
- 62) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUISHI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: N-linked oligosaccharide analysis by liquid chromatography with graphitized carbon column/ liner quadrupole ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, (Submitted)
- 63) 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)

2. 学会発表

- 1) 早川堯夫: バイオロジクスの将来展望と課題、**04-1 ポリマープロンティア 21**、高分子学会、東京 (2004.4.23)
- 2) Takao Hayakawa: Bio-safety of Medicinal Products Derived from Urine –Current Situation in Japan- *Conference on the Bio-safety of Urinary Derived Medicinal Products*, , Buenos Aires, Argentina (April 26-27, 2004)
- 3) 早川堯夫 : 疾患関連タンパク質プロジェクトの現状と今後の展望、**第11回HAB研究機構学術年会**、東京 (2004.5.18)
- 4) 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
- 5) 杉田敏樹・高建青・Alexandre Learth Soares・衛藤佑介・倉知慎之輔・中山隆志・水口裕之・早川堯夫・義江修・堤康央・真弓忠範・中川晋作; Cell Delivery System による癌遺伝子治療の最適化; **第4回遺伝子・デリバリー研究会** (京都); 2004年5月
- 6) 衛藤佑介, 倉知慎之輔, 高建青, 堤康央水口裕之, 前田光子, 川崎鉦一, 早川堯夫, 真弓忠範, 中川晋作; 体内動態制御を目指したバイオコンジュゲート化アデノウイルスベクターの創製; **第4回遺伝子・デリバリー研究会** (京都); 2004年5月
- 7) Naoya Koizumi, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Yoshiteru Watanabe, Takao HAYAKAWA; Reduction of natural adenovirus tropism to mouse liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and av integrin-binding ablation ; **2nd Pharmaceutical sciences world congress** (京都); 2004年5月30日-6月3日
- 8) Jian-Qing Gao, Yusuke Eto, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi; Enhanced gene expression of adenovirus vector in tumor induced by the PEGylation ; **2nd Pharmaceutical sciences world congress** (京都); 2004年5月30日-6月3日
- 9) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Shinnosuke Kurachi, Fumiko Sekiguchi, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Mitsuko Maeda, Koichi Kawasaki, Yasuo Tsutsumi, Shinsaku Nakagawa, Tadanori Mayumi; PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides show high transduction efficiency and protection ability from neutralizing antibodies ; **2nd Pharmaceutical sciences world congress** (京都); 2004年5月30日-6月3日
- 10) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao HAYAKAWA; Role of CD46 on Ad35 vector-mediated transduction. American Society of Gene Therapy, **6th Annual Meeting, Minneapolis** (2004.6)
- 11) Takafumi Nakamura, Kah-Whye Peng, Sompong Vongpunsawad, Mary Harvey, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA Roberto Cattaneo and Stephen J. Russell; Antibody-targeted fusion has great potential as a new research tool and provides a versatile platform for novel targeted therapies. American Society of Gene Therapy, **6th Annual Meeting, Minneapolis** (2004.6)

- 12) 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** (2004, 6) 名古屋
- 13) 萩山裕之・上阪 等・水口裕之・早川堯夫・宮坂信之; 関節リウマチの遺伝子治療にむけたウイルスベクター発現カセットの改変; **第25回日本炎症・再生医学会**(東京); 2004年7月13-14日
- 14) 細野哲司、水口裕之、形山和史、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯夫; PPAR γ に対する siRNA 発現アデノウイルスベクターを用いた培養マウス脂肪前駆細胞の分化抑制; **第20回日本DDS学会** (東京); 2004年7月15-16日
- 15) 櫻井文教、水口裕之、川端健二、井上直和、岡部勝、佐々木朋美、福島敬、山口照英、早川堯夫; CD46 トランスジェニックマウスを用いた35型アデノウイルスベクターの遺伝子導入特性の解析; **第20回日本DDS学会** (東京); 2004年7月15-16日
- 16) 倉知慎之輔、衛藤佑介、高建青、堤康央、水口裕之、早川堯夫、真弓忠範、中川晋作; 体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの in vivo 遺伝子発現特性に関する研究; **第20回日本DDS学会**(東京); 2004年7月15-16日
- 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) 川崎ナナ、伊藤さつき、原園 景、橋井則貴、松石 紫、川西 徹、早川堯夫; LC/MS を用いたゲル内糖タンパク質の糖鎖解析. 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2回夏期シンポジウム** (2004. 8)かづさ
- 19) Kenji Kawabata, Hiroyuki Mizuguchi, Fuminori Sakurai, Teruhide Yamaguchi, Takao HAYAKAWA; Development of an adenoviral vector system for embryonic stem (ES) cells; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 20) Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Kenji Kawabata, Naokazu Inoue, Masaru Okabe, Teruhide Yamaguchi, Takao HAYAKAWA; Adenovirus serotype 35 vector-mediated transduction into human CD46-transgenic mice.; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 21) Ke-Qin Xin, Kenji Someya, Fumihiko Takeshita, Shin Sasaki, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Kenji Hamajima, Mitsuo Honda, Kenji Okuda; Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type5 vector with type35 fiber induces persistent protective immunity against HIV in mice; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 22) Hong Xin, Masahiro Kanehira, Sita Andarini, Toshiaki Kikuchi, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Toshihiro Nukiwa, Yasuo Saijo; Tumor-targeting immunogene therapy by mesenchymal stem cells expressing CX3CL1; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 23) Hidetoshi Sumimoto, Makoto Miyagishi, Hiroyuki Miyoshi, Hiroyuki Mizuguchi, Shizuko Yamagata1, Ayako Shimizu1, Takao HAYAKAWA, Kazunari Taira, Yutaka Kawakami; Gene therapy for human cell lung carcinoma by inactivation of Skp-2 with virally mediated RNA interference.; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 24) Yusuke Eto, Jian-Qing Gao, Fumiko Sekiguchi, Shinnosuke Kurachi, Kazufumi Katayama, Fuminori Sakurai, Hiroyuki Mizuguchi, Takao HAYAKAWA, Yasuo Tsutsumi, Tadanori Mayumi, Shinsaku Nakagawa; PEGylation of adenovirus vector enhances gene expression in tumor via systemic administration ; **第10回日本遺伝子治療学会** (東京); 2004年8月5-6日
- 25) 細野哲司、水口裕之、中川晋作、山口照英、真弓忠範、早川堯夫; ドキソサイクリン誘導型 siRNA 発現アデノウイルスベクターの開発; **第63回日本癌学会総会** (福岡); 2004年9月29日-10月1日
- 26) 岡田直貴、水口裕之、早川堯夫、義江 修、中川晋作、藤田卓也、山本 昌; リンパ組織指向性樹状細胞の創製と癌免疫療法への応用; **第63回日本癌学会総会** (福岡); 2004年9月29

- 日-10月1日
- 27) 住友秀敏、宮岸真、三好浩之、水口裕之、山形志津子、清水亜矢子、早川堯夫、多比良和誠、河上裕; Skp-2 RNAiを利用した肺小細胞癌の遺伝子治療; **第63回日本癌学会総会** (福岡); 2004年9月29日-10月1日
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Youko Nagaoka, Chieko Saito, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao HAYAKAWA: Mechanism of inhibition of dexamethasone-dependent induction of tyrosine aminotransferase activity by the proteasome inhibitor lactacystin. **第77回日本生化学会大会** (2004. 10)横浜
- 32) Mizuho Harashima, Shingo Niimi, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao HAYAKAWA: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. **第77回日本生化学会大会** (2004. 10)横浜
- 33) Toshie KANEYASU-TOYODA, Tadashi OSHIZAWA, Takayoshi SUZUKI, Eriko UCHIDA, Takao HAYAKAWA, Effect of siRNA of PKC α on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. **第77回日本生化学会大会** (2004. 10)横浜
- 34) 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
- 35) 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回学術集會**「新しいバイオロジクスの開発動向と規制」(2004. 11)東京
- 36) 杉田敏樹, 高 建青, 金川尚子, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作: 抗腫瘍免疫細胞の体内動態を制御する Cell Delivery System による癌免疫療法の最適化., **第3回ファーマ・バイオフォーラム2004**, 東京, 2004年11月
- 37) 高 建青, 杉田敏樹, 金川尚子, 飯田恵介, 中山隆志, 水口裕之, 早川堯夫, 義江 修, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作: Cell Delivery System に基づく癌免疫療法の最適化., **第54回日本薬学会近畿支部総会・大会**, 2004年11月
- 38) 岡田直貴, 中川晋作, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江 修, 水口裕之, 早川堯夫, 藤田卓也, 山本 昌; ケモカイン発現ベクターの腫瘍内投与による抗腫瘍効果と免疫細胞浸潤; **第34回日本免疫学会総会・学術集會** (札幌); 2004年12月1-3日
- 39) 住本秀敏, 山形志津子, 宮岸真, 多比良和誠, 水口裕之, 早川堯夫, 河上裕; RNA 干渉法による、ヒト樹状細胞 TLR4 シグナルにおける SOCS-1 のネガティブフィードバック機構の解析; **第34回日本免疫学会総会・学術集會** (札幌); 2004年12月1-3日
- 40) 大和 友子, 向 洋平, 柴田寛子, 川村真紀, 阿部康弘, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの特性評価., **第34回日本免疫学会総会・学術集會**, 札幌, 2004年12月.
- 41) 川村真紀, 柴田寛子, 向 洋平, 大和友子, 阿部康弘, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: フェージ表面提示法を利用したウイルス感染を担うペプチド探索法の構築., **第34回日本免疫学会総会・学術集會**, 札幌, 2004年12月.
- 42) 大川亜紀子, 向 洋平, 柴田寛子, 川村真紀, 大和友子, 阿部康弘, 今井 直, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: 抗体療法の最適化を目指したリジン欠損一本鎖抗体の

- 創製., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月
- 43) 阿部康弘, 柴田寛子, 向 洋平, 川村真紀, 大和友子, 今井 直, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: サイトカイン療法の最適化を目指した新規部位特異的バイオコンジュゲーション法の開発とその評価., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月.
- 44) 今井 直, 向 洋平, 柴田寛子, 大和友子, 川村真紀, 阿部康弘, 大川亜紀子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: ファージ抗体ライブラリによる抗原特異的モノクロナール抗体の網羅的な迅速単離., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月.
- 45) 向 洋平, 柴田寛子, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: 医薬価値に優れた機能性人工 TNF- α の創製とその疾病治療への展開., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月.
- 46) 柴田寛子, 向 洋平, 中川晋作, 真弓忠範, 鎌田春彦, 早川堯夫, 堤 康央: 癌免疫療法最適化を目指した機能性サイトカインの創出システムの開発とその評価., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月.
- 47) 鎌田春彦, 角田慎一, 山本陽子, 真弓忠範, 早川堯夫, 堤 康央: サイトカインの新規バイオコンジュゲーション法の開発とその有用性評価., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月.
- 48) 杉田敏樹, 畑中 豊, 谷 洋一, 中山隆志, 義江修, 水口裕之, 早川堯夫, 岡田直貴, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作: IL-12及びCCL27発現アデノウイルスベクターの併用投与による抗腫瘍効果と免疫系細胞の浸潤., **第34回日本免疫学会総会・学術集会**, 札幌, 2004年12月
- 49) 衛藤佑介, 高 建育, 倉知慎之輔, 森重智弘, 櫻井文教, 水口裕之, 早川堯夫, 堤 康央, 真弓忠範, 中川晋作; 体内動態制御を目指したポリエチレングリコール修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討; **日本薬剤学会第20年会** (東京) 2005年3月
- 50) 小泉直也, 近藤昌夫, 水口裕之, 中西剛, 藤井まき子, 早川堯夫, 中島恵美, 田中慶一, 渡辺善照; 胎盤由来細胞への改良型アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率の検討; **日本薬剤学会第20年会** (東京) 2005年3月
- 51) Shingo Niimi, Mizuho Harashima, Masaru Gamou, Masashi Hyuga, Taiichiro Seki, Toyohiko Ariga, Toru Kawanishi, Takao HAYAKAWA: Expression of annexin III in primary cultured rat hepatocytes and its role on DNA synthesis. **第3回アネキシン国際会議** (2005.3) スイス
- 52) 早川堯夫: ファーマコジェノミクスを活用する創薬と国際化: ICHの新しい方向(レギュラトリーサイエンス部会シンポジウム, ファーマコジェノミクスが創薬に及ぼす意義) **日本薬学会第125年会**(2005. 3.31)東京
- 53) 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
- 54) 鈴木琢雄, 最上(西巻)知子, 河合洋, 小林哲, 佐藤陽治, 橋本敏弘, 浅川義範, 井上和秀, 大野泰雄, 早川堯夫, 川西徹: 新規 FXR 活性化化合物による遺伝子発現制御 **日本薬学会第125年会**(2005. 3)東京
- 55) 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**(2005. 3)東京
- 56) 小木 美恵子, 押澤 正, 内田 恵理子, 永田 龍二, 早川堯夫, 村田 充弘, 日方 幹男, 佐藤 功栄, 岩田 明子, 山口 照英: 医薬品の安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発ーポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮機構の検討ー, **日本薬学会第125年会** (2005.3) 東京
- 57) 小泉直也, 水口裕之, 中川晋作, 真弓忠範, 渡辺善照, 早川堯夫; 標的細胞へのターゲティングを目指した抗体結合能を持つアデノウイルスベクターの開発; **日本薬学会第125年会** (2005.3) 東京
- 58) 川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫; ES細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発; **日本薬学会第125年会** (2005.3) 東京
- 59) 増山茜, 近藤昌夫, 高橋梓, 藤井まき子, 水口裕之, 早川堯夫, 渡辺善照; ウェルシュ菌エンテロトキシン C 未断片の吸収促進作用における Claudin-4 の関与; **日本薬学会第125年会**

(2005.3) 東京

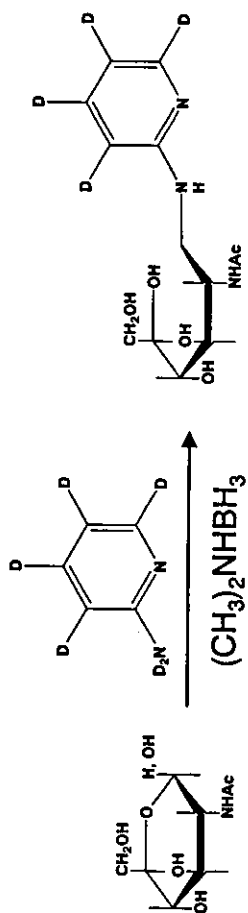
- 60) 丹羽貴子、吉川友章、小田淳史、下川摩里子、岡田直貴、堤 康央、水口裕之、早川堯夫、麻生定光、太田成男、真弓忠範、中川晋作；変異型 Bcl-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-1；**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 61) 吉川友章、丹羽貴子、小田淳史、下川摩里子、岡田直貴、堤 康央、水口裕之、早川堯夫、麻生定光、太田成男、真弓忠範、中川晋作；変異型 Bcl-X_L(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2；**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 62) 杉田敏樹、高 建青、金川尚子、飯田恵介、本村吉章、畑中 豊、谷 洋一、中山隆志、義江修、水口裕之、早川堯夫、岡田直貴、堤 康央、真弓忠範、中川晋作；IL-12 と CCL27 の併用による抗腫瘍効果増強機構の解明；**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 63) 阿部康弘、川村真紀、岡本貴行、柴田寛子、大川亜紀子、向 洋平、大和友子、今井 直、中川晋作、真弓忠範、鎌田春彦、角田慎一、早川堯夫、堤 康央：蛋白質断片化ペプチドライブラリを利用した蛋白質機能ドメインの新規探索システムの構築—その2.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 64) 大川亜紀子、川村 真紀、岡本貴行、柴田寛子、阿部康弘、野村鉄也、向 洋平、大和 友子、山名田夏枝、今井 直、中川晋作、真弓忠範、鎌田春彦、角田慎一、早川堯夫、堤 康央：フェージ表面提示法を駆使した新規細胞内移行ペプチドの網羅的創出システムの確立.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 65) 金川尚子、高 建青、杉田敏樹、飯田恵介、本村吉章、衛藤佑介、水口裕之、早川堯夫、堤 康央、真弓忠範、中川晋作；IL-12 発現アデノウイルスベクターを用いたIL-12 非奏功性腫瘍に対する治療効果に関する検討；**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 66) 倉知 慎之輔、衛藤 佑介、高 建青、森重 智弘、櫻井 文教、水口 裕之、早川 堯夫、堤 康央、真弓 忠範、中川 晋作；Polyethylene Glycol 修飾アデノウイルスベクターの腫瘍集積性に関する検討；**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 67) 大和友子、向 洋平、柴田寛子、川村真紀、山名

- 田夏枝、阿部康弘、今井 直、大川亜紀子、野村鉄也、中川晋作、真弓忠範、鎌田春彦、角田慎一、早川堯夫、堤 康央：細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの特性評価.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 68) 向 洋平、大和友子、柴田寛子、川村真紀、山名田夏枝、阿部康弘、今井 直、大川亜紀子、野村鉄也、中川晋作、真弓忠範、鎌田春彦、角田慎一、早川堯夫、堤 康央：次世代ターゲティング療法を目指した新規細胞内移行ペプチドの創製.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 69) 柴田寛子、川村真紀、岡本貴行、阿部康弘、大川亜紀子、野村鉄也、向 洋平、大和友子、山名田夏枝、今井 直、中川晋作、真弓忠範、鎌田春彦、角田慎一、早川堯夫、堤 康央：蛋白質断片化ペプチドライブラリを利用した蛋白質機能ドメインの新規探索システムの構築—その1.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京
- 70) 吉川友章、丹羽貴子、小田淳史、下川摩里子、岡田直貴、堤 康央、水口裕之、早川堯夫、麻生定光、太田成男、真弓忠範、中川晋作：変異型 Bcl-XL(FNK)遺伝子導入樹状細胞を用いた腫瘍ワクチン療法の最適化-2.、**日本薬学会第125年会**（2005.3）東京

G. 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

(A)



(B)

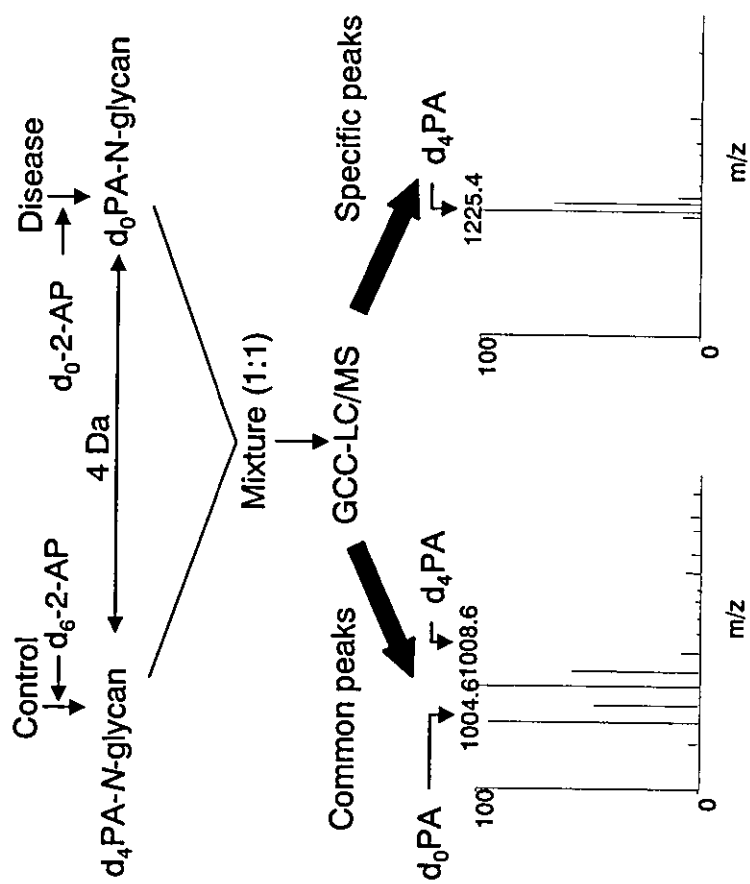


Figure 1. (A) Pyridylation of oligosaccharide with d_6 AP. (B) Qualitative and quantitative analysis of oligosaccharides by isotope tagging method and LC/MS

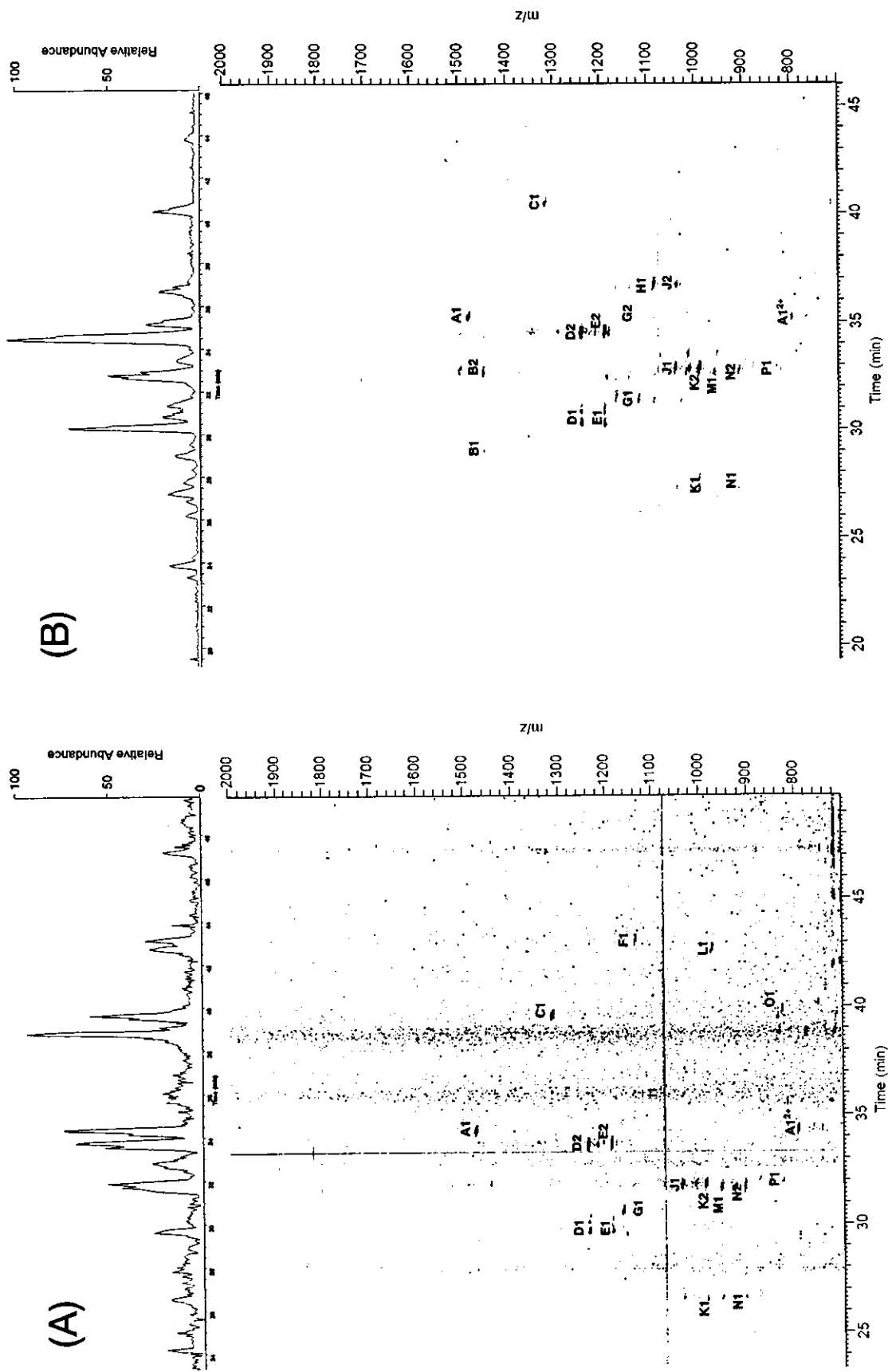


Figure 2. Two-dimensional displays of the basepeak of PA-labeled *N*-linked oligosaccharides from soluble fraction (A) and insoluble fraction (B) prepared from +/- and lpr/lpr mouse kidney.

