

増幅、LOH といった異常を持つ可能性があり、特に細胞のがん化形質の獲得へとつながる可能性もあることから注意が必要である。染色体の欠失は、がん抑制遺伝子の不活性化を、増幅は *myc* 等のがん遺伝子の活性化を引き起こし、がん化へとつながる引き金になると考えられる。そこで、染色体の増減に関する情報を得る上で、従来メタフェーズ染色体を用いた CGH 法が使われていたが、これに変わる簡便でより詳細な方法として、BAC クローンを使った CGH アレイが有用であることを我々は既に示した。今回さらに SNP をゲノムワイドに解析することにより LOH を含めた異常に関して検討が可能であると考え、Affymetrix 社より提供される SNP 検出用の GeneChip を使用した検討を行った。このアレイは SNP を検出するためにデザインされているが、アレイへのハイブリシグナルを解析することにより、染色体のコピー数の解析、即ち CGH 的な使い方ができることが期待された。しかし、Affymetrix 社より提供されるコピー数解析ツールでは満足した結果を得ることができなかった。これは、解析に用いるコントロール DNA の由来が不明なことにも起因すると考えられる。幸い、他の研究者によりコピー数を解析するためにデザインされた dChip というソフトが無償で利用可能であったことからこれを用いて解析を行ったところ、BAC CGH データとも一致するデータを得ることができた。この事より、SNP チップが CGH にも利用可能であることが示された。今回用いたの 10K アレイであり、SNP 数は約 1 万であり、4000 クローンの BAC CGH アレイと比べてやや詳細な解析が期待されたが、17 番染

色体などはプローブの設計上、むしろ BAC データの方が切断点に関して有効な情報が得られた。しかし、SNP チップに関しては 100K さらには最近では 500K とより高密度なチップが利用可能となっており、さらに詳細な検討が期待できる。一方で、CGH アレイに関しても、最近では BAC クローンをを用いたものに加えて、オリゴ DNA を用いたマイクロアレイが、agilent 社などから市販されており、これらは BAC アレイに比べてさらにプローブ数が増加しているため、より詳細に検討が可能であると予想される。SNP チップは本来多型を検出するためにデザインされたものであることから、コピー数に関しては、CGH アレイに比べると信頼性は低いと思われる。実際のデータを見ても、ベースラインの安定性や、再現性と言った観点では CGH アレイの方が優れていることから、コピー数の増減に着目した解析には CGH アレイが向いていると言える。さらに、コピー数の増減に関しては、定量的リアルタイム PCR を用いた検証が有効である。

一方、SNP チップは染色体の増減を伴わない LOH を検出でき、より広範囲な異常を一つのアレイで検出できるという点で優れている。今回 HL60-RG 細胞においてこれまでには全く正常だと考えられていた 1 番染色体が全領域に渡って LOH を示すことが検出できたことは非常に意義が深い。細胞治療の現場では、G-バンディング等の標準的染色体検査を用いて核型が正常であることを保証する場合も見受けられるが、一見正常に見える染色体も実は LOH 型の異常を持つ危険性が示唆される。より確実な検証のためには、今後 SNP チップの利用

が有効であると考えられる。

さらに、SNP チップでは検出できない異常として、染色体転座があげられる。白血病の発生においては特定の染色体転座がその成因のメカニズムとなっており、これらを有効に検出するためには、m-FISH 等の方法を用いる必要がある。これら各染色体解析手法の持つ特徴とその応用性に関して表 2 にまとめた。今後は、これらの手法を有効に組み合わせて、より詳細に細胞の遺伝的安定性を検証することが重要だと考えられる。

さらに、今回遺伝子発現情報との比較により、ゲノムインプリンティングの可能性および欠失アレルの由来に関することも迫ることができた。11 番染色体においては、インプリンティング遺伝子が既に知られており、それらの発現状態から RG 株において欠失したアレルが母親由来であることを突き止めることができたが、1 番染色体に関しては現在検討中である。1p36 領域にあるがん抑制遺伝子である p73 遺伝子がインプリンティングを受けることが過去の報告において示唆されているが、その詳細に関してはまだ明らかになっていないことと、HL60 細胞では p73 遺伝子の発現レベルが低く、GeneChip によりその発現変化が検出できなかったことから、結論を出すことができなかった。現在、1p36 領域において発現変化した遺伝子についてインプリンティングの可能性を検討しており、その解析により今後欠失アレルの由来が明らかになると期待される。この 1 番染色体は **uni-parental disomy** であるわけだが、直接それが生成することは考えにくいいため、おそらく **trisomy** を経て、生成したと考えられる。染色体の

数的異常ががん化につながるという指摘もあり、今後このヘテロ接合性の消失が細胞の形質変化にどのような影響を与えているかを調べていきたい。

E. 結論

SNP チップを用いた解析により、LOH 解析とともに染色体コピー数の変化の検出に有効であることが示された。今後、細胞治療における細胞の遺伝的安定性の検証法として、CGH アレイとともに有効なツールとしてその利用が期待できる。

また、遺伝子発現などのデータとの組み合わせにより、染色体異常の生成に関しより詳細な検討を加えることができた。

G. 健康危険情報

特になし

H. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Kato TA, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K. Nitrogen-substitution effect on in vivo mutagenicity of chrysene. *Mutat Res.*, 586, 1-17. (2005)

Kanayasu-Toyoda T, Fujino T, Oshizawa T, Suzuki T, Nishimaki-Mogami T, Sato Y, Sawada J, Inoue K, Shudo K, Ohno Y, Yamaguchi T. HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced binding with steroid receptor coactivator-1 as detected by surface plasmon resonance.

J Steroid Biochem Mol Biol., 94, 303-309.
(2005)

Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M.
Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. Proteomics. 16, 4287-4295. (2005)

2. 学会発表

鈴木孝昌, 欒 洋, Palanisamy 田中剛太郎, 中嶋圓, 浜田修一, 三浦知弘, 降旗千恵
Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS: Quantitative RT-PCR analysis on the selected genes by the GeneChip
日本環境変異原学会第34回大会(2005. 11)

欒 洋, 本間正充, Suresh Thirupathi, 小木 美恵子, 山口照英, 鈴木孝昌
Application of CGH and SNP arrays for chromosome analysis
日本環境変異原学会第34回大会(2005. 11)

鈴木孝昌, 降旗千恵
Transcriptomics — Can gene expression profiles distinguish the genotoxic hepatocarcinogens?
日本環境変異原学会第34回大会(2005. 11)

三浦知弘, 欒 洋, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 鈴木孝昌, 田代英夫, 降旗千恵

DNA マイクロアレイを用いた非遺伝子傷害性肝発癌物質投与マウス肝臓における遺伝子発現解析

第28回日本分子生物学会年会(2005. 12)

原田基裕, 戸部香織, 仲地豊, 近藤恭光, 中嶋圓, 浜田修一, 鈴木孝昌, 兵庫淳志, 田代英夫, 榊佳之, 降旗千恵

Original oligonucleotide microarray による5種類の遺伝子傷害性肝発がん物質と phenobarbital と ethanol の遺伝子発現解析
第28回日本分子生物学会年会(2005. 12)

宮島正樹, 欒 洋, 渡辺貴志, 鈴木孝昌, 村上勝彦, 野村靖幸, 降旗千恵

大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイクロアレイを用いた解析
第28回日本分子生物学会年会(2005. 12)

鴻野貴司, 欒 洋, 鈴木孝昌, 野村靖幸, 太田浩良, 降旗千恵

8ヶ月齢の老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) SAMP8 海馬における Transthyretin の発現低下
第28回日本分子生物学会年会(2005. 12)

Toshie Kanayasu-Toyoda, Tomofumi Fujino, Tadashi Oshizawa, Takayoshi Suzuki, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yoji Sato, Jun-ichi Sawada, Kazuhide Inoue, Koichi Shudo, Yasuo Ohno, Teruhide Yamaguchi
HX531, a retinoid X receptor antagonist, inhibited the 9-cis retinoic acid-induced

binding with steroid receptor
coactivator-1 as detected by surface
plasmon resonance
第 78 回日本生化学会大会(2005. 10)

Declan Mulhern, Shinya Yokokawa, Hitoshi
Shimizu, Arihiro Kohara, Takayoshi,
Suzuki, Haruhiko Okuda, Naoki Miyata,
Shin-ichi Ninomiya and Tetsuji Sudo
Gene expression profiles of
hepatotoxin-treated human hepatocytes
can be used to cluster unknown compounds
according to their mode of actions
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005. 6)

横川 伸也, Declan Mulhern, 清水 和, 小原
有弘, 北島 正人, Jose Martin Ciloy, 鈴木
孝昌, 奥田 晴宏, 宮田 直樹, 二宮 真一,
須藤 哲司
網羅的遺伝子発現解析データを用いた肝毒
性予測モデルの構築
第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会
(2005. 6)

Takayoshi Suzuki
Organ-specific toxicity of aristolochic
acid; studied by the transgenic mouse
mutation assay and the DNA microarray
2nd International Conference and
Exposition on the Modernization of
Traditional Chinese Medicine (成都、中国)

Suzuki, T. , Luan, Y. , Honma, M. , Kogi,
M. , and Yamaguchi, T.
Application of microarrays for chromosome

analysis
第 9 回国際環境変異原学会サテライトシン
ポジウム”トキシコゲノミクス” (ハワイ、
米国)

C Furihata, K Tobe, Y Nakachi, Y Kondoh,
M Nakajima, S Hamada, C Namiki, T Suzuki,
A Hyogo, M Hoshino, M Harada, T Tashiro,
H Ito, H Inazumi, Y Sakaki and H Tashiro
Original oligonucleotide microarray-
based gene expression profile induced by
genotoxic carcinogens and Phenobarbital
in mouse liver
第 9 回国際環境変異原学会サテライトシン
ポジウム”トキシコゲノミクス” (ハワイ、
米国)

鈴木孝昌
変異原処理による in vivo/in vitro 遺伝子
発現
日本動物実験代替法学会第 19 回大会
(2005. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1. STR マーカーおよびBAC CGH 解析による TK6 細胞変異体の欠失部位

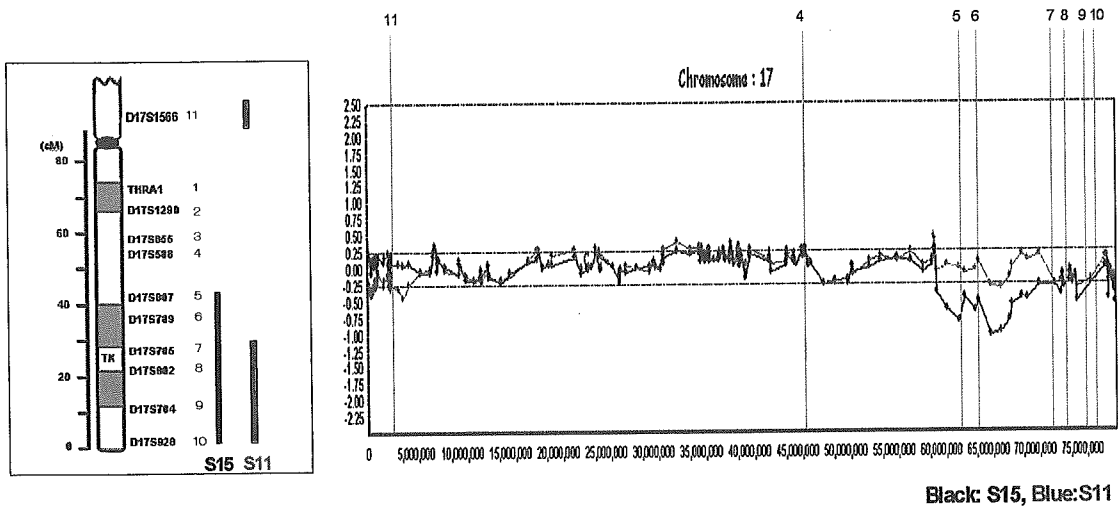


図2 TK6 細胞株の 17 番染色体の SNP call の比較 (黒枠は LOH の範囲)

| Pter | Position TK6 S11 S15 | | | | Cent | Position TK6 S11 S15 | | | | Qter |
|------|----------------------|-------|-----|-----|------|----------------------|-------|-----|------|------|
| | Position | TK6 | S11 | S15 | | Position | TK6 | S11 | S15 | |
| | 22802254 | AB | AB | AB | | 49029601 | AB | AB | AB | |
| | 22839015 | AA | AA | AA | | 49253291 | AB | AB | AB | |
| | 23026451 | BB | BB | BB | | 49427482 | AB | AB | AB | |
| | 23092869 | AB | AB | AB | | 49668269 | AA | AA | AA | |
| | 23092917 | AB | AB | AB | | 50007384 | BB | BB | BB | |
| | 24488142 | AA | AA | AA | | 50052312 | BB | BB | BB | |
| | 25122345 | AB | AB | AB | | 50052572 | AA | AA | AA | |
| | 25755541 | BB | BB | BB | | 50112164 | BB | BB | BB | |
| | 26887999 | AB | AB | AB | | 50185576 | AA | AA | AA | |
| | 26955730 | AA | AA | AA | | 50405024 | AB | AB | AB | |
| | 27014232 | BB | BB | BB | | 51292515 | BB | BB | BB | |
| | 28713731 | AA | AA | AA | | 51454698 | NoCal | BB | BB | |
| | 28813156 | AA | AA | AA | | 52197554 | AA | AA | AA | |
| | 28813215 | BB | BB | BB | | 52536345 | BB | BB | BB | |
| | 28942170 | AB | AB | AB | | 54792947 | AA | AA | AA | |
| | 28942222 | BB | BB | BB | | 55320513 | AB | AB | AB | |
| | 29183029 | AB | AB | AB | | 57029085 | AA | AA | AA | |
| | 29615779 | AA | AA | AA | | 57159092 | AA | AA | AA | |
| | 29706619 | AB | AB | AB | | 57230707 | BB | BB | BB | |
| | 30539277 | AA | AA | AA | | 57734309 | AB | AB | AB | |
| | 30711529 | AB | AB | AB | | 59136652 | AA | AA | AA | |
| | 30770914 | AB | AB | AB | | 61578821 | AA | AA | AA | |
| | 31041457 | BB | BB | BB | | 61670208 | AB | AB | BB | |
| | 32663038 | AA | AA | AA | | 61700898 | AB | AB | AA | |
| | 33248878 | BB | BB | BB | | 62034036 | AB | AB | NoCa | |
| | 34169959 | BB | BB | BB | | 62512579 | BB | BB | BB | |
| | 34693022 | BB | BB | BB | | 63694336 | AB | AB | AA | |
| | 36182069 | BB | BB | BB | | 63940203 | AA | AA | AA | |
| | 36518826 | AA | AA | AA | | 64213939 | BB | BB | BB | |
| | 36815436 | AA | AA | AA | | 64214235 | BB | BB | BB | |
| | 36902470 | BB | BB | BB | | 64914787 | AA | AA | AA | |
| | 39115918 | BB | BB | BB | | 65148453 | AA | AA | AA | |
| | 40352675 | BB | BB | BB | | 65388241 | AB | AB | AA | |
| | 40668876 | BB | BB | BB | | 65762031 | AB | AB | AA | |
| | 41412603 | AB | AB | AB | | 65762135 | AB | AB | BB | |
| | 41412669 | AB | AB | AB | | 65942534 | AB | AB | BB | |
| | 42522367 | BB | BB | BB | | 65942588 | BB | BB | BB | |
| | 43381030 | BB | BB | BB | | 65942621 | AA | AA | NoCa | |
| | 44162133 | BB | BB | BB | | 66103923 | AB | AB | NoCa | |
| | 45647724 | AB | AB | AB | | 66313271 | AA | AA | AA | |
| | 47396100 | AA | AA | AA | | 66467656 | BB | BB | BB | |
| | 47542451 | AA | AA | AA | | 66657008 | AB | AB | AA | |
| | 47810325 | AB | AB | AB | | 66848285 | BB | BB | BB | |
| | 47925935 | AB | AB | AB | | 66940099 | BB | BB | BB | |
| | 47934288 | AA | AA | AA | | 66952872 | AA | AA | AA | |
| | 48020820 | BB | BB | BB | | 67801683 | AB | AB | AA | |
| | 48076070 | AA | AA | AA | | 68095922 | BB | BB | BB | |
| | 48168557 | AB | AB | AB | | 68880877 | AA | AA | AA | |
| | 48416713 | AB | AB | AB | | 69271555 | AA | AA | AA | |
| | 48497919 | BB | BB | BB | | 70276810 | AB | AB | BB | |
| | 48498517 | AA | AA | AA | | 70734460 | AA | AA | AA | |
| | 48561694 | BB | BB | BB | | 71725370 | BB | BB | BB | |
| | 48608529 | NoCal | BB | BB | | 72151125 | AA | AA | AA | |
| | 48608764 | BB | BB | BB | | 74409070 | BB | BB | BB | |
| | 48730410 | BB | BB | BB | | 74635244 | BB | BB | BB | |
| | 49029601 | AB | AB | AB | | 74687946 | AB | BB | BB | |
| | 49253291 | AB | AB | AB | | 76399520 | AB | AA | AA | |

図3 CGH および SNP チップによる切断点解析

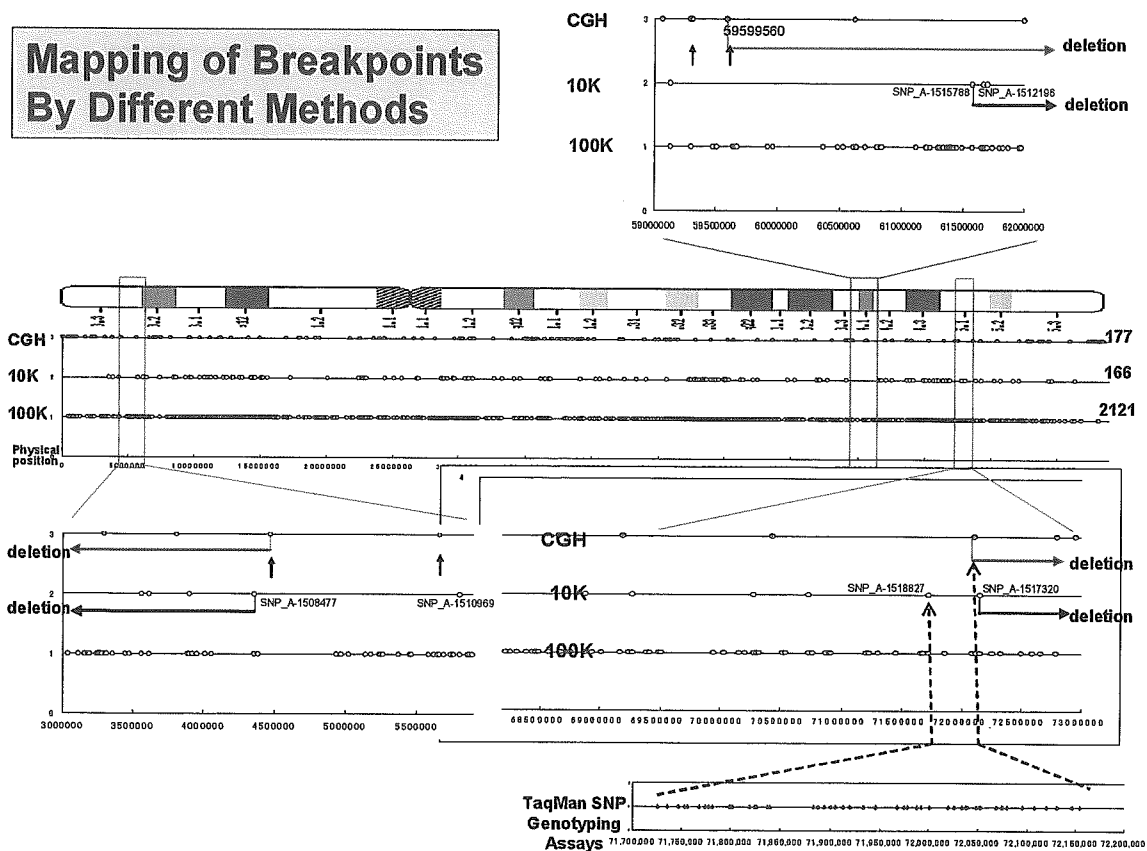


図4 HL60 および HL60-RG のm-FISH による染色体解析

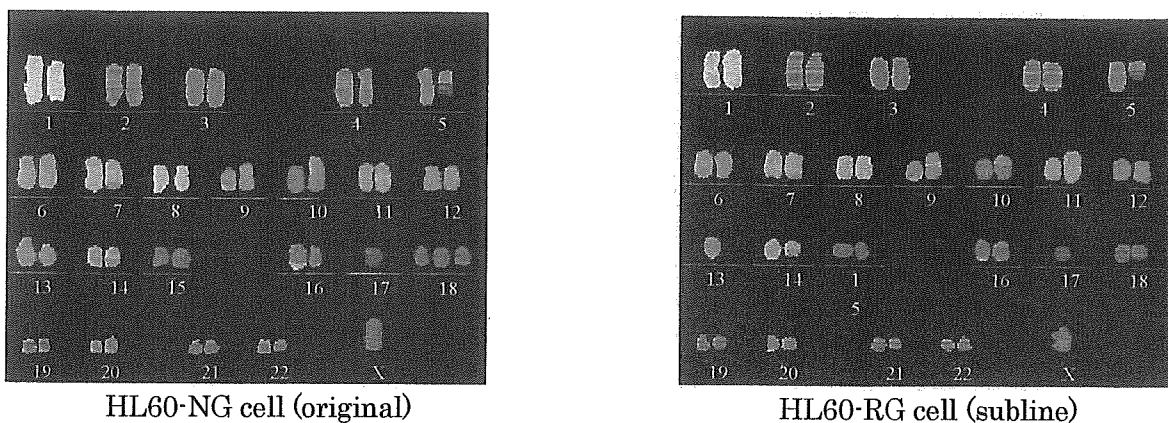


図6 c-myc 遺伝子近傍の増幅領域

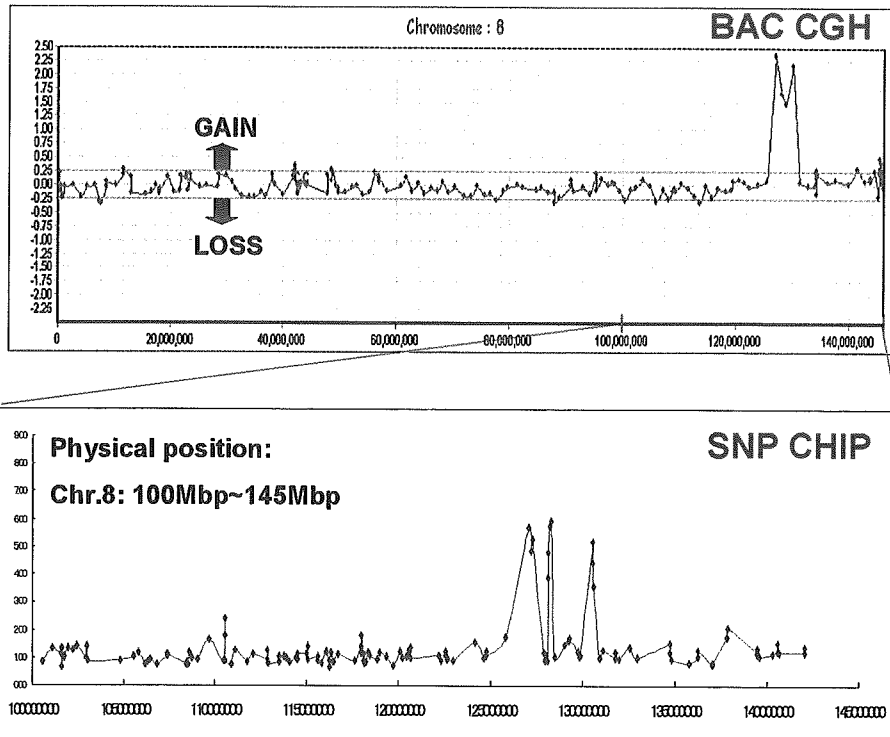


図7 発現解析データを利用した欠失アレルに関する検討

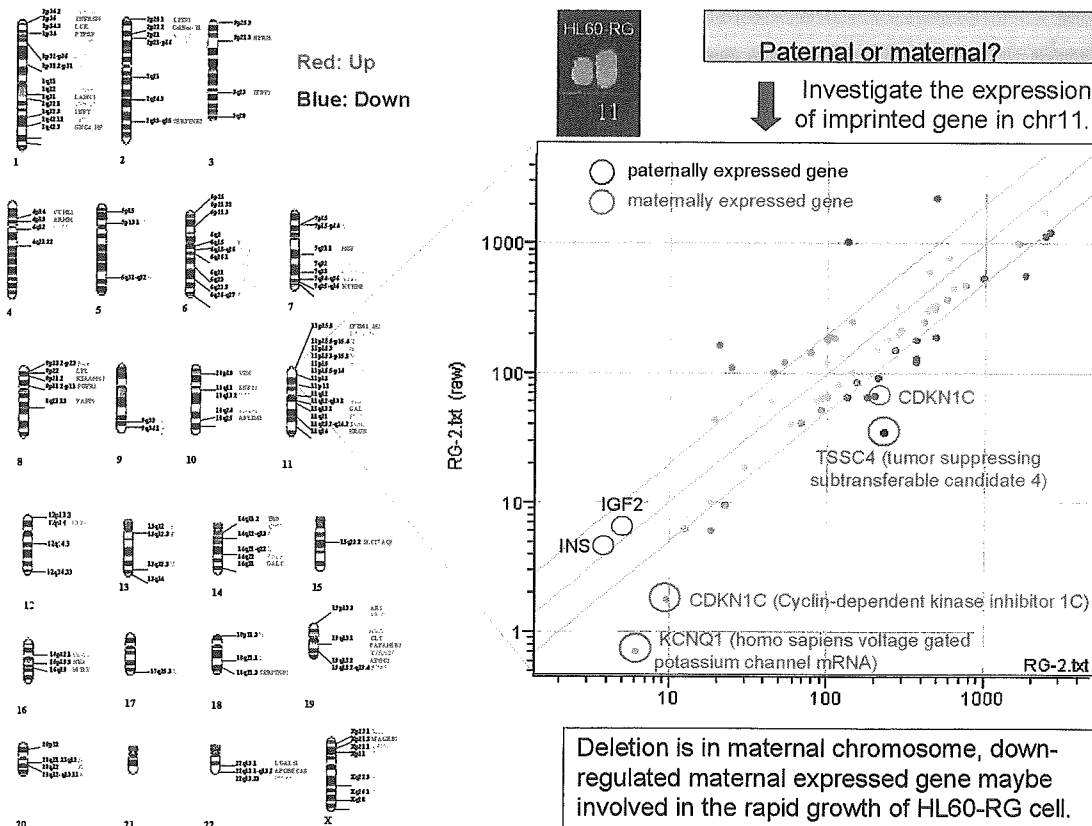


表 1 HL60-RG 細胞株において 1 番染色体上で発現変化した遺伝子群

| NG-1 | NG-2 | RG-1 | RG-2 | Ratio-1 | Ratio-2 | Gene Name | Map | Description |
|---------------|--------|-------|--------|---------|---------|------------|----------------|--|
| (1p36) | | | | | | | | |
| 881 P | 1128 P | 25 A | 14 A | 0.03 | 0.01 | PABPC4 | 1p32-p36 | poly(A)-binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form) |
| 114 P | 97 P | 969 P | 1112 P | 9.15 | 8.19 | TNFRSF8 | 1p36 | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 |
| 10 A | 33 A | 4 A | 3 A | 0.41 | 0.16 | T1A-2 | 1p36 | lung type-1 cell membrane-associated glycoprotein |
| 75 A | 80 A | 32 A | 29 A | 0.46 | 0.42 | DHRS5 | 1p36.1 | short-chain dehydrogenase/reductase 1 |
| 117 A | 85 A | 40 A | 22 A | 0.36 | 0.17 | RHCE | 1p36.11 | Rhesus blood group CoEa antigens |
| 27 A | 28 A | 10 A | 13 A | 0.41 | 0.32 | RHCE | 1p36.11 | Rhesus blood group CoEa antigens |
| 33 A | 30 A | 12 A | 23 A | 0.38 | 0.54 | RHD | 1p36.11 | Rhesus polypeptide (RhIII) |
| 129 A | 61 A | 30 A | 23 A | 0.25 | 0.27 | D_M62C23.2 | 1p36.12-p35.1 | hypothetical protein D_M62C23.2 |
| 90 A | 69 A | 9 A | 12 A | 0.10 | 0.13 | PADI4 | 1p36.13 | peptidyl arginine deiminase, type V |
| 94 A | 97 A | 3 A | 4 A | 0.04 | 0.03 | PADI4 | 1p36.13 | PADI-H protein |
| 458 P | 341 P | 123 A | 255 A | 0.29 | 0.54 | SLC2A5 | 1p36.2 | solute carrier family 2, member 5 |
| 117 A | 119 A | 10 A | 13 A | 0.09 | 0.08 | SLC2A5 | 1p36.2 | solute carrier family 2, member 5 |
| 40 A | 42 A | 19 A | 22 A | 0.52 | 0.37 | KIAA1026 | 1p36.21 | KIAA1026 protein |
| 102 A | 42 A | 11 A | 11 A | 0.11 | 0.19 | CDA | 1p36.2-p35 | cytidine deaminase |
| 128 A | 135 P | 37 A | 89 A | 0.31 | 0.47 | FGF | 1p36.2-p36.1 | Cardiac-Rhesus feline sarcoma viral oncogene homolog |
| 83 A | 68 A | 19 A | 53 A | 0.25 | 0.56 | EGFL3 | 1p36.3 | EGF-like domain, multiple 3 |
| 446 P | 324 P | 870 P | 1039 P | 2.09 | 2.30 | BACH1 | 1p36.31-p36.11 | Brain acyl-CoA hydrolase |
| 124 A | 83 A | 37 A | 31 A | 0.32 | 0.24 | C1QA | 1p36.3-p34.1 | complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide 1 |
| 160 P | 219 P | 7 A | 22 A | 0.05 | 0.07 | TNFRSF1B | 1p36.3-p36.2 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B |
| (1q21) | | | | | | | | |
| 289 P | 167 P | 34 A | 53 A | 0.13 | 0.23 | S100A6 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A6 (calycylin) (S100A6) |
| 1594 P | 1581 P | 92 A | 68 A | 0.06 | 0.03 | S100A9 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B) |
| 5921 P | 3269 P | 85 A | 97 A | 0.02 | 0.02 | S100A8 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A) |
| 45 A | 53 A | 1 A | 4 A | 0.03 | 0.05 | S100A8 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A) |
| 262 A | 110 A | 23 A | 22 A | 0.09 | 0.14 | S100A10 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I) |
| 56 A | 69 A | 20 A | 24 A | 0.33 | 0.25 | GBA | 1q21 | glucosylase, beta, acid (includes glucosylceramidase) |
| 217 P | 125 P | 60 P | 87 P | 0.29 | 0.50 | S100A12 | 1q21 | S100 calcium-binding protein A12 (calgranulin C) |
| 88 P | 68 A | 175 P | 240 P | 2.12 | 2.54 | SH2D2A | 1q21 | SH2 domain protein 2A |
| 312 P | 272 P | 156 P | 172 P | 0.54 | 0.45 | PEA15 | 1q21.1 | phosphoprotein enriched in astrocytes 15 |
| 9 A | 8 A | 3 A | 6 A | 0.36 | 0.49 | KCNK3 | 1q21.3 | potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel |
| 47 A | 10 A | 15 A | 8 A | 0.34 | 0.53 | FLN21919 | 1q21.3 | FLN21919 |
| 37 A | 14 A | 10 A | 10 A | 0.30 | 0.53 | APOA2 | 1q21-q23 | apolipoprotein A-II |

図 8 TNFRSF1B (TNF receptor 2) と TNFRSF8 (CD30) 遺伝子の配置と CpG アイランド

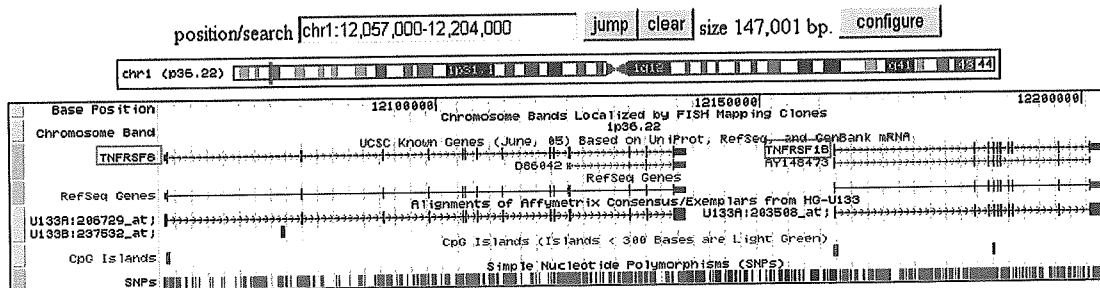


表 2 各種染色体解析手法とその応用性に関するまとめ

| 解析手法 | 構造異常 (量的変化) | 染色体の欠失・増幅 | | 転座 | 細胞型 LOH | 数の異常 | 点変異 | 個人識別 | コスト | 難易度 | 信頼性 |
|-----------------------|----------------|-----------|--------|----|------------|------|-----|------|-----|-----|-----|
| | | 大きなサイズ | 小さなサイズ | | | | | | | | |
| G-banding | ○ | ○ | △ | △ | × | ○ | × | × | L | H | L |
| multicolor-FISH | ○ | ○ | △ | ○ | × | ○ | × | × | H | H | M |
| microsatellite marker | × | × | × | × | △ | △ | × | ○ | M | L | H |
| metaphase OGH | × | ○ | △/× | × | × | ○ | × | × | H | H | M |
| OGH array | × | ○ | △ | × | × | ○ | × | × | H | M | H |
| SNP array | × | ○ | ○ | × | ○ | ○ | △ | ○ | H | L | H |
| sequencing | × | × | ○ | × | △ | × | ○ | ○ | M | L | H |

○ 可能
 △ 一部可能
 × 不可能

H high
 M middle
 L low

最適と思われる方法

細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術及び構造解析技術の開発

分担研究者 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

協力研究者 橋井則貴 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて、LC/MSⁿを用いた糖鎖プロファイリング法が細胞組織発現糖タンパク質由来糖鎖の網羅的解析法として応用可能であることを確認した。また、MSⁿによって生じた任意の糖鎖構造に特徴的なイオンを診断イオンとして利用することによって、全糖鎖の中から、その糖鎖構造を持つ糖鎖のみを特異的に検出し、詳細構造を明らかにできることを見出した。さらに、マウス ES 細胞の分化マーカーとして利用されている Lewis x (Le^x)糖鎖抗原をモデル糖鎖として、Le^x 診断イオンを用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から Le^x 結合糖鎖のみを選択的に検出し、その構造を明らかにできることを確認した。LC/MSⁿ が細胞組織発現糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることが確認されたことから、今後、細胞組織利用医薬品の特性解析、品質評価、同等性評価、及び分化・癌化マーカーの探索に応用できるものと期待される。

A. 研究目的

細胞表面には多くの糖タンパク質が発現しており、その糖鎖部分は種や組織によって異なることが知られている。また、糖鎖は、細胞の分化や癌化等に伴って変動することから、様々な細胞の分化マーカーや癌診断マーカーとして利用されている。分化マーカーや癌診断マーカーとなる糖鎖は抗体を用いて検出されることが多いが、糖鎖認識抗体の多くは IgM 抗体で、取扱いが難しく、特異性に問題がある場合も見受けられる。また、抗体を利用した検出法は、目的糖鎖抗原の有無の確認には役立つが、その糖鎖抗原を持つ糖鎖の分布や詳細構造の解析には利用できない。そこで、細胞組織利用医薬品の特性解析、品質評価、同一性評価、特性指標及び癌化指標等の探索に関する研究において、細胞表面糖鎖の構造や不均一性な

を正しく解析するための技術開発が必要である。

我々はこれまで、液体クロマトグラフィー/多段階質量分析法 (LC/MSⁿ) を利用した糖鎖プロファイリング法を開発し、様々な糖タンパク質の糖鎖の不均一性及び構造解析に利用してきた。この分析法は、糖タンパク質から切り出した糖鎖をグラファイトカーボンカラム (GCC) を用いた LC で分離しながら、MS で糖鎖の分子量を測定し、MS² 以降で糖鎖構造を解析するものである。この方法を細胞発現糖タンパク質の糖鎖解析に応用することによって、細胞表面の全糖鎖 (グリコーム) の網羅的解析が可能になると思われる。糖鎖の中には、細胞分化や癌化と密接な関係があることが明らかにされているいくつかの部分構造が存在する。例えば、マウス ES 細胞の分化

指標として利用されている SSEA-1 は, Lewis x (Le^x) と呼ばれる 3 糖からなる糖鎖抗原で, N-アセチルグルコサミン (GlcNAc), フコース (Fuc) 及びガラクトース (Gal) から構成されている. また, 腫瘍マーカーとして代表的なシアリル SSEA-1 は Le^x にシアリ酸が 1 分子結合した糖鎖部分構造である. 分化や癌化を評価する際には, 全糖鎖を網羅的に解析するのではなく, 分化・癌関連糖鎖に焦点を当てて解析することも重要になると思われる. そこで, 本年度は, LC/MSⁿ を用いて, 細胞組織由来糖鎖を網羅的に解析すること, 及び全糖鎖の中から, 分化や癌化と密接な関係のある任意の糖鎖構造を持つ糖鎖を特異的に検出し解析することを検討した. 細胞組織のモデルとしてマウス腎臓, また, 糖鎖抗原のモデルとして, Le^x 抗原を選んだ.

B. 研究方法

1) 試薬

Le^x 及び ルイス a (Le^a) 結合ピリジルアミノ化 (PA) 糖鎖, 及び Le^x 結合複合型 3 本鎖 PA 糖鎖はタカラより購入した.

2) マウス腎臓糖鎖の調製

マウス (MRL/MpJ-+/+) 腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した. 腎臓から難溶性結合組織を Cell strainer (70mm, BD Biosciences) を用いて除去した後, 組織細胞中に混在する赤血球を NH_4Cl -Tris 溶液処理により除去した. 細胞を 7 M ウレア, 2 M チオウレア, 2% CHAPS, 30 mM Tris-HCl を含む緩衝液に溶解させてタンパク質を可溶化した後, 7 倍量の冷アセトンを加えてタンパク質を沈殿させた. 還元カルボキシメチル化したタンパク質 (200 μ g) を 200 mM リン酸緩衝液 (500 μ l, pH 7.2) に溶解し, PNGase F 処理 (10 unit, 37 °C, 48 時間) により N 結合型糖鎖を切り出した. 反応液に冷エタノール (1.2 ml, 終末

70%) を加えてタンパク質を沈殿除去した後, 得られた上清を濃縮, 凍結乾燥により糖鎖を回収した.

3) 糖鎖の PA 化

10 μ l のカップリング試薬 (12.8 M 2-アミノピリジン-酢酸溶液) を糖鎖に加えて 90°C で 60 分間反応させた. 反応液に 10 μ l の還元試薬 (3.3 M ボランジメチルアミン複合体-酢酸溶液) を加えて 80°C で 60 分加熱して還元した. 反応液にトリエチルアミン-メタノール (20 μ l) 及びトルエン (40 μ l) を加えた後, 窒素気流下減圧乾固した (60°C, 10 分間, 1 回). 過剰の未反応試薬は残渣にメタノール (20 μ l) 及びトルエン (40 μ l) を加えた後, 窒素気流下減圧除去し (60°C, 10 分間, 2 回), さらに 50 μ l 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, 1 回). 得られた PA 糖鎖は Envi-Carb C カートリッジ (Supelco) を用いて脱塩した後, 凍結乾燥させた.

4) Le^a 及び Le^x 結合 PA 糖鎖の MSⁿ

PA 糖鎖を 1 pmol/ μ l になるように 10 μ M NaCl を含む 50% アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6) に溶解し, LC/MS に注入した.

MSⁿ :

装置 : LTQ linear ion trap / Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (Finnigan LTQ-FT, Thermo Electron)

イオン源 : nanoESI (AMR)

スプレー電圧 : 2.0 kV

イオンモード: ポジティブ

キャピラリー温度 : 200°C

MSⁿ の衝突エネルギー : 20-30%

流速 : 2.0 μ l/min

5) マウス腎臓由来糖鎖の LC/MSⁿ

以下の条件で糖鎖の LC/MSⁿ を行った。

HPLC :

装置 : Magic 2002 system (Michrom BioResource)
カラム : Hypercarb (Thermo electron, 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 : 10–70% (0–60 分)
流速 : 2 μl/min

ポストカラム : 10 μM NaCl 溶液、流速 2 μl/min

MSⁿ :

装置 : LTQ-FT
イオン源 : nanoESI
キャピラリー温度 : 200°C
キャピラリー電圧 : 2.0 kV
スキャン範囲 (*m/z*) : 750–2,000
衝突エネルギー : 25%
測定方法 :
① MS¹ : Full scan (positive ion mode)
② MS² : Data-dependent scan (positive ion mode)
③ MS^{3,4} : Target ion scan (positive ion mode)
MS³ : *m/z* 534
MS⁴ : *m/z* 388

倫理面への配慮

本研究では、市販の動物組織を使用したのが対象とはならない。

C. 結果

(1) Le^x 糖鎖の MSⁿ

はじめに、Le^x 糖鎖特異的検出法の開発を検討した。Le^x 抗原は、GlcNAc に Fuc と Gal がそれぞれ α1-3 結合及び β1-4 結合した糖鎖である。その位置異性体として、GlcNAc に Gal と Fuc が β1-3 及び α1-4 結合した Le^a が存在する。また、Le^x 及び Le^a の Gal に Fuc が α1-2 結合した糖鎖は、それぞれ Le^y 及び Le^b と呼ばれる (Fig. 1)。Le^x と Le^a、及び Le^y と Le^b は分子量と糖組成が同一であるため、MS による分子量測定や MS² による糖鎖配列解析では識別することができない。そこで、Le^x 結合糖鎖のみを特異的に検出する方法として、MSⁿ によって Le^a からは生じない GlcNAc のピラノース環開裂イオンを検出することを試みた。

ここではモデルとして Fig. 2 に示す市販の Le^x 及び Le^a 構造を含む PA 糖鎖を用いた。糖鎖 I 及び II はそれぞれ Le^x 及び Le^a を含む糖鎖であり、糖鎖 III は、より複雑な構造を持つ Le^x 結合糖鎖である。一般に、環開裂イオンを含む様々なプロダクトイオンを得るためには、糖鎖をナトリウム付加体として解析するとよいことが知られている。そこで、モデル糖鎖は、10 μM の塩化ナトリウムを含む溶媒に溶解して、MSⁿ に付した。

Fig. 3 はモデル糖鎖 I の MS¹⁻⁴ スペクトルである。Fig. 3A はフル MS¹ スキャンによって得られたマススペクトルで、ナトリウム付加体が *m/z* 954 に検出されている。これを前駆イオンとして MS² を行った結果、Fig. 3B に示すように Le^x の 3 糖構造のナトリウム付加体が *m/z* 534 に検出された。さらに、この *m/z* 534 を前駆イオンとして MS³ を行ったところ、Fuc が開裂した GalGlcNAc が *m/z* 388 に検出された (Fig. 3C)。さらにこのイオンを前駆イオンとして MS⁴ を行

ったところ、GlcNAcのピラノース環のC-3及びC-4間が開裂した $^{35}A_2$ イオンが m/z 259に検出された。この環開裂イオンはGalがGlcNAcの3位ではなく4位に結合していることを示すイオンであり、 Le^a からは生じないプロダクトイオンである。このように、 MS^n によって、 Le^x 糖鎖に特徴的なイオンを検出できることが確認された。

つぎに、 Le^a モデルの糖鎖IIの MS^{1-4} スペクトルを測定した(Fig. 4)。 MS^1 では Le^x と同様に m/z 954にナトリウム付加体が検出された。また、 MS^2 でも、Gal(Fuc)GlcNAcからなる m/z 534のイオンが検出され、さらに MS^3 でも m/z 388のイオンが検出された。しかし、 MS^4 では、 Le^x で検出された m/z 259は検出されなかった。このことは、 MS^2 によって生じたGal(Fuc)GlcNAc $^+$ を選択して MS^3 を行い、さらに MS^3 で生じたGalGlcNAc $^+$ を選択して MS^4 を行って、環開裂イオン(m/z 259)の有無を確認することによって、 Le^a と Le^x を識別できることを示唆している(Fig. 5)。

そこで、より複雑な構造を有する Le^x 糖鎖のモデル(糖鎖III)を用いて、 MS^2 において生じたGal(Fuc)GlcNAc、さらに MS^3 において生じたGalGlcNAcを前駆イオンとして MS^4 を行った場合、 Le^x に特徴的なイオンが生成されるかどうかを検証した。Fig. 6は糖鎖IIIの MS^{2-4} スペクトルである。 MS^2 で m/z 534、 MS^3 で m/z 388、さらに MS^4 で m/z 259が検出されることを確認した。このことから、この3つのプロダクトイオン(m/z 534, 388, 259)を、 Le^x 構造の診断イオンとして利用することによって、 Le^x のみを選択的に検出できることが実証された。

(2) LC/ MS^n による糖鎖のプロファイリングと Le^x 結合糖鎖特異的検出

つぎに、LC/ MS^n を用いて、細胞組織由来糖鎖

の網羅的解析を検討した。マウス腎臓由来のタンパク質にPNGase Fを作用させてN結合型糖鎖を切り出した。イオン化効率を高めるため糖鎖をPA化した後、その糖鎖をLC/ MS^n 装置を用いて分析した。ここでは、フル MS^1 スキャンに続いて(Fig. 7A)、データ依存的 MS^2 (Fig. 7B)スキャンを行った。フル MS^1 スキャンで得られたトータルイオンクロマトグラム(TIC)にピークa-jが検出された。これらは、分子量及び MS^2 スペクトルから、高マンノース型糖鎖及び複合型フコシル糖鎖と推定された。フコースが複数結合した糖鎖が検出されたことから、 Le^x 糖鎖の存在が示唆された。

そこで、(1)で開発した Le^x 糖鎖の特異的検出法を用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から、 Le^x 結合糖鎖だけを選択的に検出することを検討した。データ依存的 MS^2 スキャンで生じた m/z 534イオンを前駆イオンとして MS^3 (Fig. 7C)、さらに MS^3 で生じた m/z 388イオンを前駆イオンとして MS^4 を行い、生じた m/z 259イオンを検出した(Fig. 7D)。その結果、ピークa-jのうち、ピークa, b, e, f及びhの MS^{2-4} から Le^x 診断イオンが検出され、この5つの糖鎖に Le^x が結合していることが示唆された。

Le^x 構造の存在が示唆された糖鎖の詳細構造は、データ依存的 MS^{2-4} スペクトルから解析した。代表的な MS^{2-4} スペクトルとして、Fig. 8にピークfの MS^{2-4} スペクトルを示す。まず、フラグメントパターン及び分子量から、この糖鎖にはFucが3分子結合していることが示唆された。また、データ依存的 MS^2 で m/z 534のイオンが検出され(Fig. 8A)、 m/z 534イオンを前駆イオンとした MS^3 で m/z 388のイオンが観察され(Fig. 7C)、さらに m/z 388イオンを前駆イオンとした MS^4 で m/z 259イオンが観察されることから、 Le^x が結合していることが確認された。さらに、 m/z 1035にバイセクティング糖鎖に特徴

的な $Y_{3\alpha/3\beta}$ イオンが比較的強く検出されたことから、この糖鎖は、 Le^x 構造を 2 つ有するフコシル糖鎖と予想された。しかし、 m/z 680 に検出されたプロダクトイオンから、 Le^y (FucGal(Fuc)GlcNAc) 構造を有する可能性も示唆された。一般に、ナトリウム付加体の MS^2 スペクトルは、プロトン化イオンの MS^2 に比べて複雑になることが知られている。そこで、糖鎖配列を明らかにする目的で、ナトリウム塩を添加せずに MS を行い、生じたプロトン化イオンに対して MS^2 を行った (Fig. 9)。その結果、 m/z 658 に Le^y 構造の存在を示唆する $B3\alpha$ イオンが検出されたことから、この糖鎖は Le^x ではなく、 Le^y を部分構造として有することが示唆された。同様に、 Le^x の存在が示唆された主な糖鎖について、 MS^{2-4} スペクトルを基に糖鎖構造を推定した結果を Table 1 にまとめる。マウス腎臓には Le^x 及び Le^y 糖鎖が存在することが明らかになった。

このように、LC/MSⁿ によって、細胞や組織に発現している糖タンパク質の糖鎖の分布と構造を解析できること、さらに、任意の糖鎖抗原に特徴的なイオンを診断イオンとして利用することによって、その糖鎖抗原のみを特異的に検出し、分布や詳細な構造を明らかにできることが示された。

D. 考察

細胞表面には多くの糖タンパク質が存在し、その糖鎖は様々な生命現象や疾患に深く関わっていることが知られている。その中でも一部の糖鎖は、細胞の分化や癌化等に伴って変動することから、細胞分化マーカーや腫瘍マーカーとして利用されている。例えば、今回モデルとして用いた Le^x は、マウスの ES 細胞の分化マーカーとして広く利用されている糖鎖抗原である。また、この糖鎖は脳など特定の組織に多く存在し、ヒトでは胎児期に多く見られることが知られている。さら

に、シアル酸が結合したシアリル Le^x は癌関連糖鎖抗原として臨床診断に用いられている。このように分化・癌化に密接に関連している糖鎖、あるいは特定の組織や器官に存在する糖鎖は、今後、再生医療の評価研究においても、癌化や分化のマーカーとして利用されるものと思われる。

多くの糖鎖抗原は抗体で検出することができるが、糖鎖抗体の多くは IgM 抗体であるため、取扱いが難しい。また、抗体を用いた検出は、その糖鎖の有無を確認するには適しているが、微細な構造変化や、各糖鎖の結合量の変化を明らかにすることはできない。より確実に糖鎖の質的量的変動を解析できる技術として、本研究では、LC/MSⁿ を使った糖鎖プロファイリングを検討した。

まず、糖鎖プロファイリングは糖鎖の網羅的解析法として利用できることが確認された。この結果は、今後、細胞治療用医薬品の細胞表面の糖鎖解析や、サンプル間の糖鎖差異解析に利用できることを示唆するものである。また、本研究では、MSⁿ によって生じた糖鎖に特徴的なプロダクトイオンを診断イオンとして用いることによって、全糖鎖の中から、分化や癌化の指標となる任意の糖鎖抗原をもつ糖鎖を特異的に検出し、その詳細構造を明らかにできることを見出した。この方法は、 Le^x 糖鎖だけではなく、例えば硫酸基、ジシアル酸、グルクロン酸結合糖鎖などの特異的検出にも応用可能と思われる。今後、分化レベルの異なる細胞間や正常・癌化細胞間の糖鎖差異解析等に応用することによって、細胞組織利用医薬品の品質評価、特性解析、安全性評価、同一性評価等への応用可能性を評価していきたいと考えている。

E. 結論

マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて、LC/MSⁿ を用いた糖鎖プロファイリング法は細胞組織発現糖タンパク質由来糖鎖の

網羅的解析に応用可能であることを確認した。また、MSⁿによって生じた任意の糖鎖構造に特徴的なイオンを診断イオンとして利用することによって、全糖鎖の中から、その糖鎖構造を持つ糖鎖のみを特異的に検出し、詳細構造を明らかにできることを見出した。さらに、マウス ES 細胞の分化マーカーとして利用されている Lewis x (Le^x)糖鎖抗原をモデル糖鎖として、Le^x診断イオンを用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から Le^x結合糖鎖のみを選択的に検出し、その構造を明らかにできることを確認した。LC/MSⁿが細胞組織発現糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることが確認されたことから、今後、細胞組織利用医薬品の特性解析、品質評価、同等性評価、及び分化・癌化マーカーの探索に応用できるものと期待される。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*. 15, 447-462 (2005)
- 2) 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)
- 3) 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*, 1067, 145-152 (2005)
- 4) Hideki TAGAWA, Yasuhiko KIZUKA, Tomoko IKEDA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Hidetake KURIHARA, Maristela Lika ONOZATO, Akihiro TOJO, Tasuo SAKAI, Toshisuke KAWASAKI Shogo OKA, and: A non-sulfated form of the HNK-1 carbohydrate is specifically expressed in mouse kidney, *J. Biol. Chem.*, 280, 23876-23883 (2005)
- 5) Makoto HIRANO, Bruce Yong MA, Nana KAWASAKI, Kazumichi OKIMURA, Makoto BABA, Tomoaki NAKAGAWA, Keiko MIWA, Nobuko KAWASAKI, Shogo OKA, Toshisuke KAWASAKI: Mannan-binding protein blocks the activation of metalloproteases meprin α and β , *J. Immunol.*, 175, 3177-3185 (2005)
- 6) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Glycomic/glycoproteomic analysis by LC/MS: Analysis of glycan structural alternation in the cells. *Proteomics*, 5, 4665-4672 (2005)
- 7) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/ multiple tandem mass spectrometry. Analysis of rat brain Thy-1

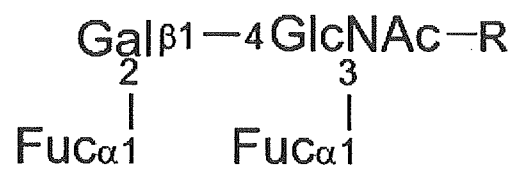
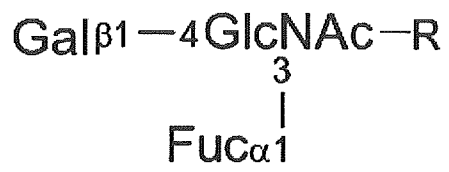
- separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1094, 105-1017 (2005)
- 8) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Noritaka HASHII, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA, and Toru KAWANISHI: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17, 193-203 (2005)
- 9) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 早川堯夫: 糖タンパク質の質量分析, 「糖鎖科学の新展開」谷口直之, 伊藤幸成監修, エヌ・ティー・エス, 東京 pp69-75, (2005)
- 10) 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, *J. Chromatogr. A*, 1103, 296-306 (2006)
- 11) Akira HARAZONO, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Noritaka HASHII, Akiko ISHII-WATABE Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Site-specific N-glycosylation analysis of human plasma ceruloplasmin using liquid chromatography/electrospry ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 348, 259-268 (2006)
- 12) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Takao HAYAKAWA and Toru KAWANISHI: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid commun. Mass spectrom.*, 19, 3315-3321 (2005)
- 13) Nana KAWASAKI, Satsuki ITOH and Toru KAWANISHI: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
- 14) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MS を用いたグライコーム解析, *臨床化学*, 34, 309-318 (2005)
- 15) 川崎ナナ: LC/MSⁿによる糖タンパク質糖鎖の解析, 未来を拓く糖鎖科学. 永井克孝監修, 20-21, 金芳堂 (2005)
2. 学会発表
- 1) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: リニアイオントラップ型 MS を用いたゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析. 第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
- 2) 橋井則貴, 伊藤さつき, 川崎ナナ, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹, 早川堯夫: multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ)による Lewis^x の特異的解析. 第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
- 3) 福原 潔, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 宮田直樹, 奥田晴宏: 脂溶性平面型カタキンの抗酸化作用とがん細胞増殖阻害効果. 第 64 回日本癌学会学術総会 (2005, 9, 14-16) 札幌
- 4) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/ESI/MS/MS によるタンパク質混合物中のヒト血漿ビトロネクチンの部位特異的糖鎖解析. 第 25 回日本糖質学会 (2005, 7, 20) 大津
- 5) 佐野琴音, 宮本泰則, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 内堀・岩城はるひ, 浅沼公恵, 鈴木理沙, 小川温

- 子：肝再生時のビトロネクチン糖鎖がマトリックスリガンド結合と細胞伸展活性に与える影響. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20) 大津
- 6) 川崎ナナ, 橋井則貴, 松石 紫, 伊藤さつき, 原園 景, 川西 徹: LC/MSⁿによる糖鎖の構造特異的検出. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1) 横浜
- 7) 永石貴之, 野村和子, 水口惣平, 出嶋克史, 川崎ナナ, 松石 紫, 野村一也: 線虫の糖鎖付加タンパク質の決定. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1) 横浜
- 8) 野村和子, 水口惣平, 永石貴之, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 野村一也: *C. elegans* を用いた糖鎖の網羅的機能解析—二次元電気泳動(2D-DIGE)による定量解析. 日本プロテオーム機構第3回大会 (2005, 8, 1) 横浜
- 9) Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Akira HARAZONO, Yukari MATSUIISHI, Akiko HACHISUKA, Reiko TESHIMA, Jun-ichi SAWADA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycosylation analysis of IgLON family glycoprotein in rat brain by LC/MSⁿ. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 10) Noritaka HASHII, Nana KAWASAKI, Akira HARAZONO, Satsuki ITOH, Yukari MATSUIISHI, and Toru KAWANISHI: Decrease in alpha-glucosidase II expression in the kidney of a MRL/lps murine model of human systemic lupus erythematosus (SLE). 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 11) Risa INOUE, Motoki TERADA, Kay-Hooi Khoo, Nana KAWASAKI, Bruce Y. MA, Shogo OKA, Toshiyuki KAWASAKI, Nobuko KAWASAKI: Isolation of glycoproteins carrying the characteristic MBP-ligands oligosaccharide from the human colon cancer cells. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 12) Miho ASAHI, Kotone SANO, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Maiko YANAGIBASHI, Haruhi UCHIBORI-IWAKI, Haruko OGAWA: Characterization of glycan moieties of fibronectin and vitronectin during liver regeneration. 第77回日本生化学会大会 (2005, 10, 19) 神戸
- 13) 佐野琴音, 内堀—岩城はるひ, 浅沼公恵, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木理沙, 玉井幸恵, 加藤恵己, 赤松 暢, 小川温子: 肝再生時ビトロネクチンの部位特異的糖鎖修飾ならびに糖鎖構造変化が多量体形成に与える影響. 文部科学省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3回夏期シンポジウム (2005, 8) 浜松
- 14) 福原 潔, 中西郁夫, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 浦野四郎, 小澤俊彦, 宮田直樹, 伊古田暢夫, 奥田晴宏: カテキンの立体構造固定による抗酸化効果の増強と生物作用. 第20回生体機能関連化学シンポジウム (2005, 9, 17) 名古屋
- 15) 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 松石 紫, 川西 徹: 自己免疫疾患モデルマウス腎臓における糖鎖異常. 第1回臨床プロテオーム研究会 (2005, 10, 15) 東京
- 16) 澤田 均, 澤 彩映子, 伊藤さつき, 川崎ナナ: マボヤ卵黄膜上の精子レセプターHrVC700の糖鎖構造. 日本動物学会第76回大会 (2005, 10, 6-8) つくば
- 17) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 原園 景, 川西 徹: LC/MS のグライコムクスへの応用. 文部科学省科学研究費補助

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4回公開シンポ
ジウム (2006, 1, 31) 名古屋

H. 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



Lewis a (Le^a)

Lewis b (Le^b)

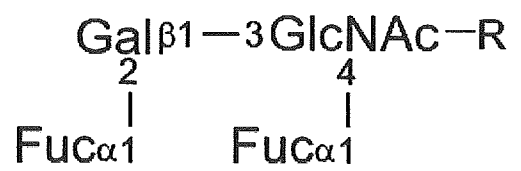
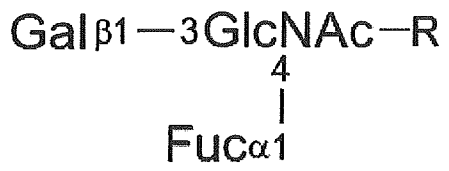


Fig. 1 Le^x, Le^y, Le^a 及び Le^b 糖鎖の構造