

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

第1分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析;癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法の作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	綱脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍兒 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆宇 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンス
に関する研究

プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発

所属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 川崎ナナ

研究要旨 本研究の目的は、プロテオミクスや構造生物学の技術を取り入れた効率的なバイオ医薬品の特性解析・品質評価法を開発することである。本年度は、バイオ医薬品の製造技術に関する研究、特性解析技術の開発、規格試験法に関する研究、並びに安定性評価に関する研究を行った。

分担研究者

- | | |
|----------------------------|------|
| 1) 国立医薬品食品衛生研究所 | 川西 徹 |
| 2) キリンビール(株)医薬カンパニー生産技術研究所 | 石川リカ |
| 3) 中外製薬(株)分析技術研究部 | 名淵義明 |
| 4) (財)化学及血清療法研究所 | 菅原敬信 |
| 5) アステラス製薬(株)創剤研究所 | 山口秀人 |
| 6) 大日本住友製薬(株)愛媛工場 | 秋丸仁朗 |
| 7) 協和発酵工業(株)バイオロジック研究所 | 矢野敬一 |
| 8) 大阪大学大学院理学研究科 | 長谷純宏 |
| 9) 近畿大学薬学部 | 掛樋一晃 |
| 10) 名古屋市立大学大学院薬学研究科 | 加藤晃一 |

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用技術の進展に伴い、様々なタンパク質がバイオ医薬品として開発されている。バイオ医薬品は生体による生合成過程を生産に利用していることから、生物由来の不純物が混在する可能性、分子構造上不均一なものが産生される可能性、及び翻訳後修飾や高次構造など人為的に制御できない理由により生物活性が変化する可能性が指摘されており、化学薬品とは異なる特性解析法・試験法の整備が求められている。さらに最近では、新しい分子設計に基づく非天然型タンパク質が医薬品として開発されており、個々のバイオ医薬品の製造工程や特性に応じた評価法・試験法の設定が不可欠となっている。

本研究の目的は、昨今のタンパク質研究の飛躍的な進展の原動力となっているプロテオミクス及び構造生物学の技術をバイオ医薬品の特性解析・

品質評価に役立てること、すなわち、プロテオミクスや構造生物学的な新しいタンパク質解析技術を開発すること、並びに既存の技術を改良・応用することによって、バイオ医薬品研究開発・評価を取り巻く様々な課題に適切に対処できる技術を開発することである。平成17年度は、MS、NMR、各種LC、及びデータベースを利用して、バイオ医薬品の製造技術に関する研究、特性解析技術の開発、規格試験法に関する研究、並びに安定性評価に関する開発を行った。

B. 研究方法

1) 製造技術に関する研究

① 細胞培養インフルエンザワクチンの大量培養法の検討と同等性評価

大量培養法として、希釈法(細胞を200Lまで継代・拡張した後、新鮮培地400Lを添加)と培地交換法(細胞を50Lまで継代・拡張し、培養液を膜ろ過装置に通して2倍に濃縮した後、25Lの新鮮培地を添加)を検討した。ワクチンは、ウイルスを除外し、シヨ糖密度勾配遠心及びアフィニティークロマトグラフィーで精製した後、エーテルスプリット化して調製した。免疫原性はワクチンを接種したラットのHI価(血液凝集阻害)を測定し評価した。

② 抗体依存性細胞障害(ADCC)活性の高い抗体医薬品の製造に関する研究

抗CD20抗体(Rituximab)及び抗Her2抗体(Trastuzumab)を研究材料とした。高マンノース型糖鎖を含む抗体をConAクロマトグラフィーに

よって吸着除去した。さらに非吸着画分を LA-LCA クロマトグラフィーでフコース結合糖鎖の有無により分画した。ADCC 活性は、健常人の末梢血より得た単核球をエフェクター細胞、CD20 または Her2 を発現する Raji 細胞または MCF-7 細胞をターゲット細胞として、抗体と共に 37℃ で 4 時間反応し、遊離される乳酸脱水素酵素の量を測定することにより算出した。

2) 特性解析技術の開発

① LC/MS/MS とエキソグリコシダーゼ消化による部位特異的糖鎖解析技術の開発

ヒト血清セルロプラスミンのトリプシン消化物を α -2-3 ノイラミニダーゼ、 α 1-3,4 フコシダーゼ、または β 1-4 ガラクトシダーゼ消化して LC/MS/MS を行った。装置は四重極飛行時間型質量分析装置 (QqTOFMS) を用いた。

② 各種 LC を用いた糖鎖解析法の開発：

(i) アフィニティークロマトグラフィーと順相分配型アミノカラムを用いた糖鎖プロファイリング

培養細胞由来約 50 種類の糖鎖を分析した。

(ii) ピリジルアミノ (PA) 化/多次元 HPLC マップ法と糖鎖データベースの整備に関する研究

糖タンパク質から遊離させた糖鎖を 2-アミノピリジンで標識し、多種類の HPLC カラムにおける溶出時間を糖鎖データベースと照合し糖鎖を同定した。また、新たにシアロ硫酸化糖鎖やグルクロン酸含有糖鎖の構造を決定し、データベースの充実を図った。

③ NMR, フロントアフィニティークロマトグラフィー (FAC), 及び糖鎖ライブラリーを用いた糖鎖結合分子と糖鎖の相互作用解析

VIP36 は大腸菌で発現させた。NMR は JNM-ECA920 を使用した。

④ リン酸化プロテオーム解析を利用した生物学的性質評価法の開発

C2C12 細胞由来タンパク質をトリプシン消化し、リン酸化ペプチドを強陽イオン交換カラム (SXC, PolySULFOETHYL) で濃縮した。ペプチドは LC/MS/MS 及び Mascot を用いたデータベース検索 (NCBI nr) により同定した。

3) 規格及び試験法に関する研究

① MS/MS を用いたペプチド性医薬品の確認試験

法の規格に関する研究

QqTOFMS 装置を用いてサブスタンス P の MS/MS スペクトルを測定した。

② LC/MS 及び cross link 試薬または軽水素/重水素 (H/D) 置換を利用した高次構造解析法の開発

最も出現頻度の高い一次配列をもつ遺伝子組換え型 Interferon- α (CIFN) を cross link 試薬修飾し、トリプシン消化物の LC/MS を行った。また、CIFN を減圧乾固した後、重水素を加えて室温静置し、分子量変化を測定した。

③ LC/MS を用いた純度試験法の開発

ヒト化モノクローナル抗体の類縁物質を陰イオン交換 LC で単離し、その還元化合物及び非還元化合物の LC/MS を行った。

4) 安定性評価に関する研究

分光学的手法として円偏光二色性 (CD) スペクトル、赤外 (IR) スペクトル、蛍光 (UV) スペクトル法を用いた。また、熱分解法として、示差走査型熱量 (DSC) を測定した。モデルタンパク質として、完全ヒト抗体を用いた。

倫理面への配慮：

動物実験については、各施設の動物実験指針を遵守し、動物福祉・愛護の精神に基づいて実験を実施し、倫理審査の承認を得て行った。また、ヒト由来の生体試料を用いた場合は、試料提供者に一切不利益、危険性が伴わないように配慮し、人権擁護を含めたインフォームドコンセントのもとに試料を採取するとともに、研究目的を含め、研究内容の倫理的、科学的妥当性について適正な倫理委員会等による審査・承認を得た上で行った。

C. 研究結果

1) バイオ医薬品製造技術の開発に関する研究

① 細胞培養インフルエンザワクチンの大量培養法の検討と同等性評価

インフルエンザワクチン培養基材を現行の鶏卵から MDCK 細胞に変更する過程で、MDCK 細胞の培養上清中にインフルエンザウイルスの増殖を阻害する物質が存在することを見出し、昨年度、それが新規のプロテアーゼインヒビターであることを同定した。今年度は、同インヒビター濃度を低減してウイルスの収量を高めるために、2つの

培養法を検討した。産生量は、希釈法では 12.8 μ g HA/mL、また培地交換法では 70 μ g HA/mL であった。ウイルス接種時の細胞密度は、それぞれ約 1.5 $\times 10^6$ cells/mL 及び約 3 $\times 10^6$ cells/mL であった。従って、細胞当たりの産生量は、希釈法では 8.5pg HA/cell、培地交換法では 23.3pg HA/cell となり、後者が約 3 倍高いことがわかった。さらに、MDCK 細胞由来ワクチンと現行卵由来ワクチンの免疫原性の比較を行った結果、ほぼ同等であることが明らかとなった。

② ADCC 活性の高い抗体医薬品の製造に関する研究

抗体重鎖に結合する N 結合型糖鎖のコアフコースは、ADCC 活性に大きな影響を及ぼすことが知られている。本研究では、2 種類の抗体医薬品を使って、コアフコースを含まない複合 2 本鎖型糖鎖構造を有する抗体を精製する技術の構築を検討し、ConA と LA-LCA レクチンクロマトグラフィーにより目的糖鎖構造を有する抗体画分を得ることに成功した。抗 CD20 抗体では、フコース非含有糖鎖含有量が 2.0% から 6.8% に増加し、ADCC 活性が 10~100 倍程度亢進することを確認した。同様に抗 Her2 抗体でも、フコース非含有糖鎖含有量が 5.9% から 61.6% に増加し、ADCC 活性も 100 倍程度亢進することを確認した。

2) 特性解析技術の開発

① LC/MS/MS とエキソグリコシダーゼ消化による部位特異的糖鎖解析技術の開発

昨年度は LC/MS/MS を用いた糖タンパク質性医薬品の部位特異的糖鎖構造解析法の開発の一環として、データ依存的に測定した MS/MS スペクトルから糖ペプチドイオンを帰属する方法を見出した。本年度は、基質特異性の高いエキソグリコシダーゼを用いることで、さらに部位毎の糖鎖の部分構造に関する情報を得ることを検討した。モデル糖タンパク質として 4 箇所 に N 結合型糖鎖が結合しているヒト血清セルロプラスミンを用い、そのトリプシン消化物を α 2-3 ノイラミニダーゼ、 α 1-3,4 フコシダーゼ、または β 1-4 ガラクトシダーゼで消化して LC/MS を行った。糖ペプチドイオンの m/z 値の変化から、結合部位ごとに糖鎖のシアロ酸残基やフコース残基の結合様式に関する情報

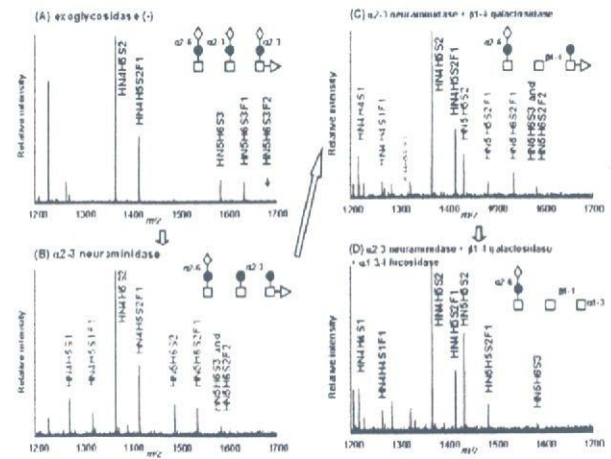


図 1 エキソグリコシダーゼ消化したセルロプラスミンの Asn119 を含む糖ペプチドのマススペクトル

が得られることが明らかになった (図 1)。

② 各種 LC を用いた糖鎖解析法の開発

(i) アフィニティークロマトグラフィーと順相分配型アミノカラムによる糖鎖プロファイリング法の開発

酸性及び中性糖鎖を含む多様な糖鎖を網羅的に解析する方法として、セロトニンアフィニティークロマトグラフィーでシアロ糖鎖を 5 つに分画し、さらに各画分を順相分配型アミノカラムで分離した後、MALDI-TOFMS により解析する方法を検討した。本分析法は、ヒト培養細胞由来の複雑な糖鎖混合物の分析に利用可能であることから、糖鎖解析法として有用であると評価された(図 2)。

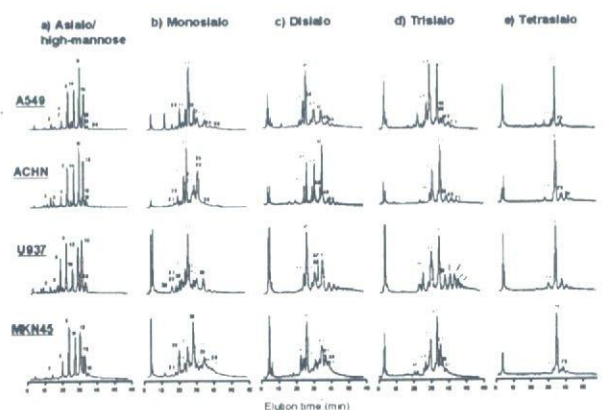


図 2 培養細胞由来シアロ糖鎖画分の順相分配型アミノカラム HPLC

(ii) PA 化/多次元 HPLC マップ法と糖鎖データベースの整備に関する研究

PA 化/多次元 LC に酸部分水解, エキソグリコシダーゼ消化を組み合わせることによって, 神経突然変異マウス脳に存在し, 通常のマウスには検出されない糖鎖の構造を明らかにすることに成功し, 本分析法の糖鎖構造解析法としての有用性が確認された(図 3). また, 様々なシアロ硫酸化糖鎖やグルクロン酸含有糖鎖の構造を PA 化と多次元 HPLC マッピングにより決定し, 糖鎖データベースを充実させた.

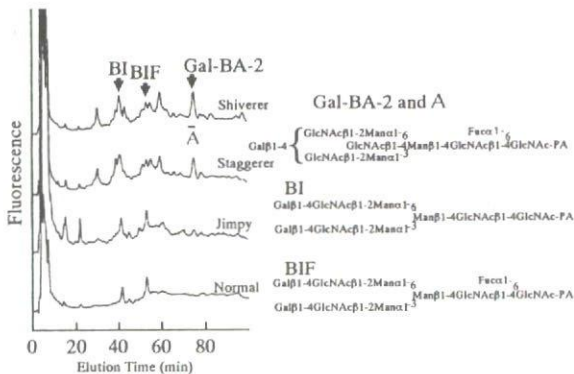


図 3 正常及び突然変異マウス脳から調製した PA 糖鎖の逆相 HPLC と主なピークの糖鎖構造

③ NMR, FAC, 及び糖鎖ライブラリーを用いた糖鎖結合分子と糖鎖の相互作用解析

VIP36はゴルジ体と小胞体を往来して積み荷糖タンパク質の輸送を担っていると考えられている。VIP36は高マンノース型糖鎖をもつ糖タンパク質と結合することが知られているが, その糖鎖認識の特異性についてはこれまで明らかとされていない。本研究では, 糖鎖ライブラリーとFACを用いてVIP36の糖鎖結合特異性を解析し, D1アームにグルコース残基が付加している場合, 及び D1アームのマンノース残基がトリミングされている場合はVIP36との親和性が低下することを明らかにした(図4上)。さらに, 超高磁場NMR装置を用いてVIP36の糖鎖認識ドメイン(VIP36-CRD)の糖鎖結合特異性を詳細に解析し, VIP36-CRDは高マンノース型糖鎖内の主にD1アームと結合することが明らかとなった(図4下)。これらの手法は様々な糖鎖結合分子と糖鎖の相互作用を調べる有用なツールとなることが期待できる。

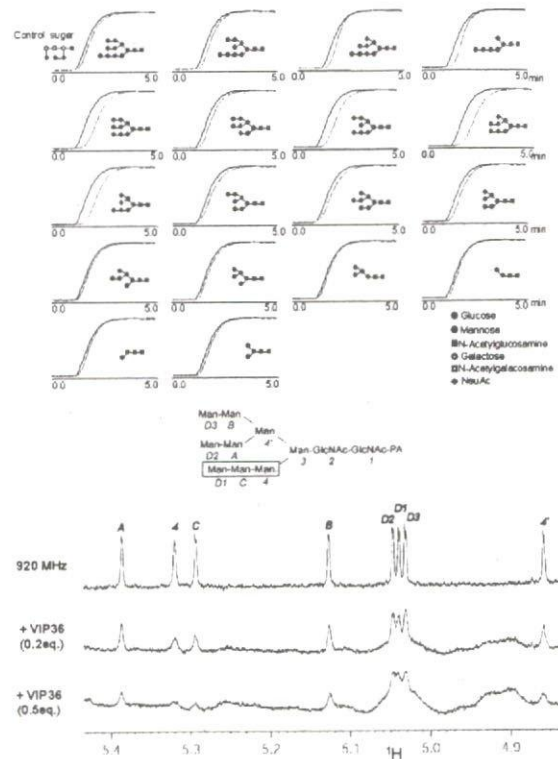


図 4 糖鎖ライブラリーとFAC (上図), 及び超高磁場NMR (下図) を利用したVIP36と糖鎖との相互作用解析

④ リン酸化プロテオーム解析を利用した生物学的性質評価法の開発

本研究では, シグナル伝達に関係するリン酸化タンパク質発現解析に基づく薬剤の作用機序の解明, 及び生物学的性質評価法の開発を目的として, リン酸化プロテオーム解析を行っている。本年度は SCX カラムによるリン酸化ペプチドの効率的分画を検討した。トリプシン消化ペプチドはC末にリジン残基またはアルギニン残基が結合しているため2価イオンとして存在するが, リン酸基のため1価イオンとなるリン酸化ペプチドは, SCXカラムによって, 非リン酸化ペプチドから分離される(図5)。この方法を利用してC2C12細胞抽出物のトリプシン消化物からリン酸化ペプチドを濃縮精製し, 40種類のタンパク質から60個のリン酸化ペプチドを同定することに成功した(表1)。これらのペプチドは, MS/MSにおいてリン酸基のニュートラルロスが確認されることや, リン酸化部位予測ソフト(NetPhos)によってリン酸化が予想される部位であることから, リン酸化ペプチドであることが示唆された。以上のようにリン酸化ペプチドを効率的に解析することが可能になった。

リン酸化ペプチド精製原理

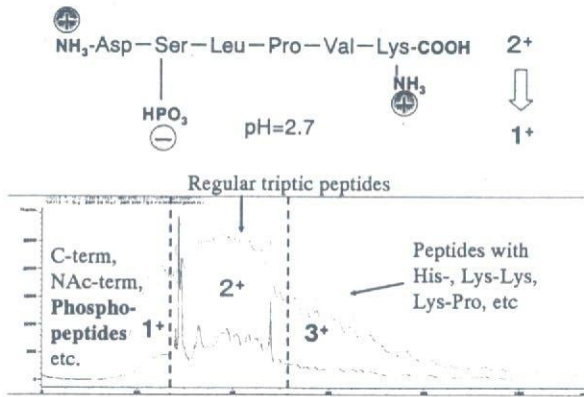


図5 SCXカラムを用いたリン酸化ペプチドの濃縮の原理

表1 C2C12細胞抽出物から同定されたリン酸化ペプチド

Protein	Accession No.	Sequence	NetPhe Score	Ident.	Intensity
14-3-3 protein zeta/delta	P82101	DDMMAMKVTEDGNEISNER	0.874, 0.872	25	25
18L Ndc80 protein 1 - tandem protein	P58771	SSQLESLGSLTLPFLNHR	0.882	10	26
Adaptor-related protein 3 domain 2 subunit A/NAK (Fragment)	P81462	SKMVAIDKH	0.912	24	24
	P81464	ASLQLEKVEKASPK	0.838, 0.886	60	60
Alpha-crystallin	P81184	ALGLLQKLVKASPK	0.838	60	60
Asutrasin phosphatase domain 1	P58408	WEDDQKAMKPYDQKQDQVQK	0.864, 0.860	10	43
Asutrasin 2 protein	P58407	QSPFPPKFDQK	0.864, 0.864	10	32
Asutrasin 3 protein	P58406	PLRLEKQKAVGRTKQKQVLEKQK	0.893, 0.844	14	24
ATP-binding cassette, sub-family F, member 1	P28542	QGNVFAIQDQEESEK	0.985	28	45
BTB/POZ domain containing protein 3	P58545	KANSSQKQKQKQKQKQKQK	0.844	28	28
Bucomin-1 domain 1	P58202	WVDEKQKQKQKQKQKQKQK	0.818	45	45
Chaperonin 10.1	P58201	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.894	28	48
Deaf-1 domain 2	P58200	SAVNSDQKQKQKQKQKQKQK	0.895, 0.865, 0.856	30	30
Diaphanous 1 domain 3 subunit 1	P58203	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 2	P58204	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 3	P58205	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 4	P58206	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 5	P58207	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 6	P58208	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 7	P58209	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 8	P58210	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 9	P58211	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 10	P58212	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 11	P58213	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 12	P58214	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 13	P58215	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 14	P58216	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 15	P58217	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 16	P58218	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 17	P58219	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 18	P58220	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 19	P58221	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 20	P58222	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 21	P58223	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 22	P58224	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 23	P58225	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 24	P58226	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 25	P58227	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 26	P58228	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 27	P58229	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 28	P58230	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 29	P58231	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 30	P58232	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 31	P58233	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 32	P58234	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 33	P58235	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 34	P58236	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 35	P58237	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 36	P58238	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 37	P58239	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 38	P58240	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 39	P58241	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 40	P58242	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 41	P58243	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 42	P58244	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 43	P58245	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 44	P58246	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 45	P58247	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 46	P58248	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 47	P58249	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 48	P58250	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 49	P58251	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 50	P58252	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 51	P58253	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 52	P58254	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 53	P58255	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 54	P58256	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 55	P58257	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 56	P58258	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 57	P58259	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 58	P58260	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 59	P58261	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 60	P58262	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 61	P58263	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 62	P58264	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 63	P58265	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 64	P58266	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 65	P58267	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 66	P58268	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 67	P58269	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 68	P58270	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 69	P58271	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 70	P58272	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 71	P58273	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 72	P58274	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 73	P58275	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 74	P58276	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 75	P58277	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 76	P58278	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 77	P58279	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 78	P58280	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 79	P58281	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 80	P58282	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 81	P58283	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 82	P58284	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 83	P58285	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 84	P58286	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 85	P58287	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 86	P58288	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 87	P58289	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 88	P58290	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 89	P58291	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 90	P58292	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 91	P58293	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 92	P58294	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 93	P58295	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 94	P58296	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 95	P58297	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 96	P58298	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 97	P58299	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 98	P58300	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 99	P58301	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32
Diaphanous 1 domain 3 subunit 100	P58302	QKQKQKQKQKQKQKQKQKQK	0.885	10	32

であるかが問題である。そこで、サブスタンス P を用いて QqTOF の MS/MS スペクトルの再現性を検証したところ(図6)、測定間で相対強度比の再現性を得ることは難しいが、相対強度の高いプロダクトイオンを再現良く検出することは可能であることが明らかになった(図7)。以上のことから、ペプチドの確認試験の判定基準として、一次構造の確認に必要で、かつ相対強度の高いプロダクトイオンを検出すべきイオンとして多数設定することが可能であることが示唆された。

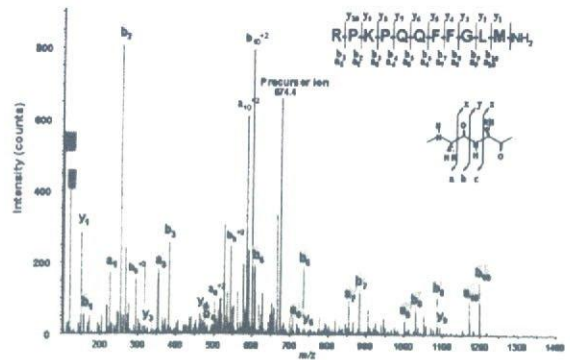


図6 サブスタンス P の MS/MS スペクトル

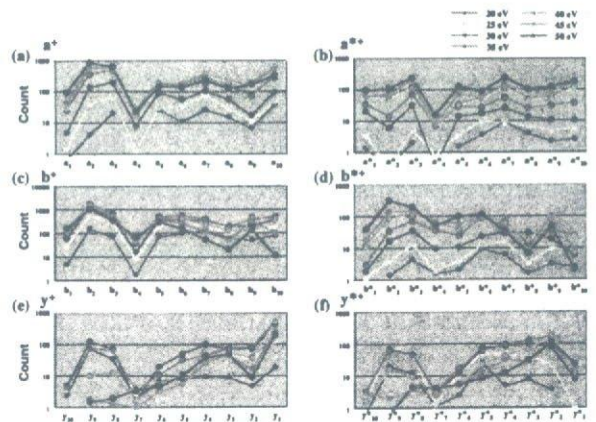


図7 プロダクトイオンのイオン強度のコリジョンエネルギー依存性

3) 規格及び試験法に関する研究

① MS/MS を用いたペプチド性医薬品の確認試験法の規格に関する研究

MS/MS とデータベース検索によってペプチドやタンパク質を同定するプロテオミクスの技術は、ペプチド性医薬品の確認試験やタンパク質性医薬品のペプチドマッピングとして目的物質の定性的な確認をするとともに、一次構造の変化、修飾の有無、不純物の検出などに利用できる可能性がある。しかし、ペプチドの MS/MS は、測定条件、累積時間、装置の状態等の影響を受けることから常に全く同一のスペクトルを得ることは難しいと考えられ、検出すべきプロダクトイオンおよびそのイオン強度を含む規格をどのように設定すべき

② LC/MS 及び cross link 試薬または H/D 置換を利用した高次構造解析法の開発

バイオ医薬品の活性や安定性評価につながるタンパク質高次構造確認法として、昨年に引き続き、CIFN に cross link 試薬を反応させ、酵素消化と LC/MS によって反応したアミノ酸残基を特定し、cross link 試薬の spacer の長さから残基間の空間的

な距離情報を求め立体構造を類推する方法を検討した。非還元条件下の SDS-PAGE において、CIFN はジスルフィド結合による球状構造のため移動度が大きくなり、還元条件に比べ見かけ上の分子量は小さくなる。Sulfo-EGS 修飾 CIFN の SDS-PAGE において、非還元条件では若干の移動度の増加と二量体の生成が認められ、還元条件でも移動度が非還元条件と変わらない分子種が観察された。これは一部の Sulfo-EGS 修飾がジスルフィド結合と同様に、タンパク質の folding に寄与したためと推察された。また、比活性が活性体の約 3% の CIFN 部分還元体を調製し、BS3, Sulfo-DST, Sulfo-EGS 修飾を行い、還元及び非還元 SDS-PAGE を行ったところ、非還元電気泳動では folding 由来と推定される移動度が大きなバンドは観察されなかった。これは活性発現と folding の関係を示すとともに、cross-link 試薬による修飾と SDS-PAGE は、立体構造形成確認に利用できることを示唆するものである。また、H/D 交換と MS を用いて、変性剤存在下での CIFN の熱変性や二量体形成などの現象を分析し、得られたパラメータを用いて立体構造の変化に起因する現象を解釈できることが明らかになった(図 8, 表 2)。以上の 2 つの方法はバイオ医薬品の品質保証や製剤の処方設計への適用が可能であると思われる。

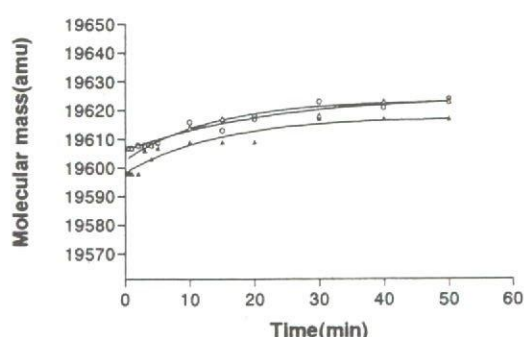


図 8 高濃度 CIFN の H/D 交換時間と分子量
○: インタクト、△: 高濃度 CIFN portion A、▲: 高濃度 CIFN portion B

表 2 高濃度 CIFN の H/D 交換パラメータ

Parameters	Intact	High concentrated (58μM)	
		Portion A	Portion B
$M_{\infty}(Da)$	19623	19625	19618
$A(Da)$	21	19	19
$M_0(Da)$	19602	19606	19599
$\Delta M_0(Da)$	41	45	38
$Kex(min^{-1})$	0.08	0.05	0.07

③ LC/MS を用いた純度試験法の開発

電荷的に異なるタンパク質構造由来の類縁物質の定量的解析における LC/MS の応用可能性を検討した。陰イオン交換クロマトグラフィー(AIEC)によりヒトモノクローナル抗体の 4 種の類縁物質を単離精製した後、任意の割合で混合し、還元体の LC/MS を行った(図 9)。x 軸に AIEC 結果から期待される H 鎖 Lys 付加体の存在比を、y 軸に本試験法で得られた H 鎖 Lys 付加体の存在比をプロットし、直線性を調べたところ、Lys 付加体の存在比に依存することなく、良好な室内再現精度で直線性が得られた。真度は 100% を下回る傾向が認められた。非還元体の LC/MS では、解析可能な範囲は還元体に比べ狭かったが、分析可能な範囲において良好な室内再現精度で直線性が確認された。真度は、Lys が 1 つ付加した類縁物質において、100% を下回る傾向が認められた。さらに、各類縁物質の電荷的な違いが LC/MS のイオン強度に与える影響を調べたところ、理論値 (Lys 付加体+Lys 非付加体: 脱アミド体=2:1) にほぼ等しい比率が認められ、脱アミド化による一電荷の付加が、イオン強度に与える影響はほとんどないことが示唆された。今回の研究結果から、抗体医薬品の H 鎖上に生じた電荷的な違いは LC/MS に影響を与えないこと、また、得られる試験結果は良

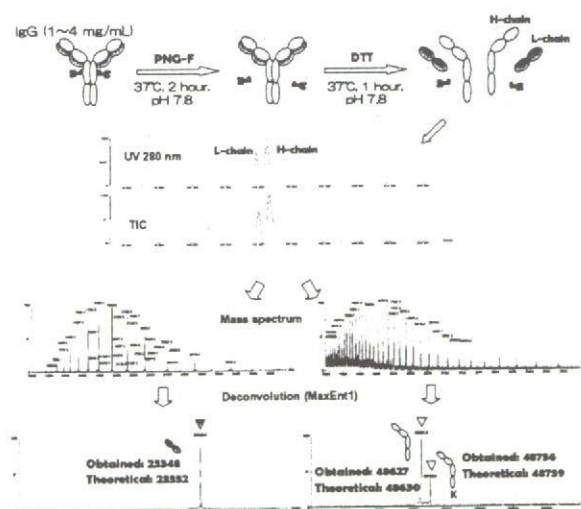


図 9 LC/MS を用いた類縁物質試験法の概略

好な直線性及び精度を示すことが確認できた。LC/MSによる類縁物質評価法は、試料の精製が不要で、AIECで分離されない類縁物質も分析対象にできることから、他の分析方法と相補的に用いることで、同等性や均一性の検証に有用であると考えられる。

4) 安定性評価に関する研究

処方開発は多種類の処方の検体を実保存温度、加速、苛酷条件下で保存した後、様々な理化学試験を行い、安定性の良い処方を選択することが多く、時間と労力がかかるのが現状である。一方、タンパク質の高次構造評価に使用されている分光学的手法及び熱分析法は、操作が簡便であり、短時間で測定が可能である。本研究では、分光学的手法及び熱分析法を用いて異なる処方間での熱安定性を比較することにより、処方開発の効率化を検討した。熱安定性評価の結果と保存安定性における抗体の重合体量は図10の通りであった。CD（近紫外領域）、及び蛍光法ではpH 4.8付近で変性温度が最も高く、IR、及びCD（遠紫外領域）ではpH 5.0付近でアグリゲーションの生成温度、及び変性温度が最も高かった。また、DSCではpH 5.5付近で最も変性温度が高かった。これらの結果と保存安定性の結果を比較すると、熱安定性の良いpH 5.0～5.5では、重合体の生成量も低く、熱安定性の結果と保存安定性では安定なpH領域がほぼ一致することが明らかとなった。この方法は、緩衝液組成、及び等張化剤の異なる溶液についても応用可能であり、安定性の良い処方を効率的に選択するため、特に開発初期における物性評価、処方のスクリーニング、及び保存安定性データの科学的解釈に有用であると考えられた。

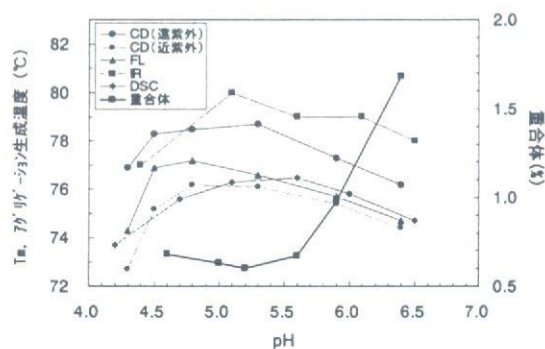


図10 抗体の熱安定性評価と保存安定性の比較

D. 考察

本年度はバイオ医薬品の製造方法、特性解析法、規格試験法、安定性評価に関する研究を実施した。

バイオ医薬品の製造技術に関する研究では、インフルエンザワクチンの培養基材を発育鶏卵からイヌ腎臓由来MDCK細胞へ変更する過程で、昨年度見出したMDCK細胞上清中のトリプシンインヒビターを除去した大量培養法を確立し、現行卵由来ワクチンと同等の免疫原性を有することを確認した。本研究の成果は、ワクチン製造の短縮化、廃卵の処理に伴う環境負荷の軽減、卵由来の不純物による副作用問題の解決などにつながるものである。また、高いADCC活性を有する抗体医薬品を精製することに成功し、有効性の高い医薬品の提供が可能となった。

特性解析法の開発に関する研究では、第一に、バイオ医薬品の特性解析における重要課題の一つである糖鎖解析法の開発を行った。昨年度見出したLC/MS/MSとデータベースを利用した部位特異的糖鎖解析法に、さらにエキソグリコシダーゼ消化を組み合わせることによって、部位毎に部分構造情報が得られることを見出した。また、各種LCや標識法を用いて、データベース未登録の糖鎖を解析し、データベースの充実化を図った。さらに糖鎖ライブラリー、FACとNMRを用いて、レクチンと糖鎖の相互作用を解析した。これらは、糖鎖試験法の整備はもとより、グライコミクスの技術として糖鎖関連医薬品開発につながる技術である。第二に、薬剤の作用機序の解明、及び生物学的性質評価法の開発を目的としたリン酸化プロテオーム解析に不可欠な効率的なリン酸化ペプチドの濃縮に成功した。今後、リン酸化ペプチド同定率の飛躍的向上が期待される。

規格及び試験法に関する研究として、まず、MS/MSを用いたペプチド性医薬品の確認試験やペプチドマッピングの規格に関する研究を行い、検出すべきイオンとして一次構造の確認に必要なプロダクトイオンを多数設定可能であることを確認した。つぎに、電荷的に異なるタンパク質構造由来の類縁物質の定量的測定におけるLC/MSの応用可能性を調べ、良好な直線性及び精度が確認できたことから、LC/MSは同等性や均一性の検証に有用であることが実証された。さらに、修飾試薬とMSを用いたペプチドマッピング、及びH/D

交換と MS を組み合わせた高次構造解析法は立体構造変化に起因する現象を解釈できることを確認し、バイオ医薬品の品質保証や製剤の処方設計への適用が可能であることが示唆された。

安定性評価に関する研究として、タンパク質の高次構造を評価する分光学的手法及び熱分析は保存安定性における重合体の生成量を反映することが確認され、物性・安定性の良い処方を短時間に効率的に選択するために有用であることがわかった。

本研究で得られた成果は、バイオ医薬品の研究開発における構造解析・機能解析法や、品質試験法及び規格の設定に役立つものであり、承認申請・審査や日本薬局方における試験法の整備等、幅広い分野において貢献できるものと期待される。

E. 結論

1) 製造方法：MDCK 細胞を培養基材とし、現行卵由来ワクチンと同等の免疫原性を有するインフルエンザワクチンの大量培養法、並びに高い ADCC 活性を有する抗体医薬品の精製法の確立に成功した。

2) 特性解析法：糖鎖に関する研究として、LC/MS/MS、データベース検索、及びエキソグリコシダーゼ消化を組み合わせた部位特異的糖鎖構造解析法の開発、各種 LC や標識法を用いた糖鎖プロファイリング法の開発、糖鎖データベースの充実化、並びに糖鎖ライブラリーと NMR を用いたレクチンと糖鎖の相互作用解析を行った。また、効率的なリン酸化ペプチドの濃縮に成功した。

3) 規格試験法：MS/MS を用いたペプチド性医薬品の確認試験やペプチドマッピングの判定基準として、一次構造の確認に必要なプロダクトイオンを多数設定できること、LC/MS を用いて電荷的に異なるタンパク質構造由来の類縁物質の定量的測定が可能であること、並びに修飾試薬と MS を用いたペプチドマッピングや H/D 交換と MS の組み合わせは高次構造評価に応用可能であることが示唆された。

4) 安定性評価：分光学的手法及び熱分析は物性・安定性の良い処方を短時間に効率的に選択するために有用であることがわかった。

協力研究者

原園 景 (国立医薬品食品衛生研究所), 山崎勝由 (キリンビール(株)医薬カンパニー生産技術研究所), 寺田 勇 (中外製薬(株)分析技術研究部), 西山清人, 野内俊伸, 来海和彦, 牧角啓一, 遠藤昌史 ((財)化学及血清療法研究所), 村田芳美 (アステラス製薬(株)創剤研究所), 左海 順, 木村 徹 (大日本住友製薬(株)ゲノム科学研究所), 木下充弘 (近大薬学部), 山口芳樹 (名古屋市立大院薬学部)

F. 研究業績

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 mepirin a and b, *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/ electrospray 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)
 - 16) Ryosuke Naka, Satoru Kamoda, Aya Ishizuka, Mitsuhiro Kinoshita, and Kazuaki Kakehi: Analysis of Total N-Glycans in Cell Membrane Fractions of Cancer Cells Using a Combination of Serotonin Affinity Chromatography and Normal Phase Chromatography. *Journal of Proteome Research* 5, 88-97 (2005)
 - 17) Hirokazu Yagi, Noriko Takahashi, Yoshiki Yamaguchi, Naoko Kimura, Kenji Uchimura, Reiji Kannagi and Koichi Kato: Development of structural analysis of sulfated N-glycans by multi-dimensional HPLC mapping methods. *Glycobiology* 15, 1051-1060 (2005)
 - 18) Yukiko Kamiya, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, Yoichiro Arata, Ken-ichi Kasai, Yoshito Ihara, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Kazuo Yamamoto and Koichi Kato: Sugar-binding properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor. *J. Biol. Chem.* 280, 37178-37182 (2005)
 - 19) Nakakita, S., Natsuka, S., Okamoto, J, Ikenaka, K., and Hase, S.: Alteration of Brain Type N-Glycans in Neurological Mutant Mouse Brain. *J. Biochem.*, 138, 277-283 (2005)
 - 20) Menon, K.N., Ikeda, T., Fujimoto, I., Narimatsu, H., Nakakita, S., Hase, S., and Ikenaka, K.: Changes in N-Linked Sugar Chain Patterns Induced by Moderate-to-High Expression of the Galactosyltransferase I Gene in a Brain-Derived Cell Line, CG4. *J. Neurosci. Res.*, 80, 29-36 (2005)
 - 21) Sasaki, A., Ishimizu, T., Geyer, R., and Hase, S.: Synthesis of β -mannosides Using the Transglycosylation Activity of Endo- β -mannosidase from *Lilium longiflorum*. *FEBS Journal*, 272, 1660-1668 (2005)
 - 22) Ishimizu, T., Uchida, T., Sano, K., and Hase, S.: Chemical Synthesis of Uridine 5'-diphospho-a-D-xylopyranose. *Tetrahedron Asymmetry*, 16, 309-311 (2005)
 - 23) Takemoto, T., Natsuka, S., Nakakita, S., and Hase, S.: Expression of Complex-type N-glycans in Developmental Periods of Zebrafish Embryo. *Glycoconjugate J.*, 22, 21-26 (2005)
 - 24) Sasaki, A., Ishimizu, T., and Hase, S.: Substrate Specificity and Molecular Cloning of Endo- β -Mannosidase Acting on N-Glycan in *Lilium longiflorum*. *J. Biochem.*, 137, 87-93 (2005)
 - 25) 長谷純宏 (編集委員): 未来を拓く糖鎖科学, 金芳堂, 2005
 - 26) 長束俊治, 長谷純宏: 「O-結合型糖鎖の構造解析」, タンパク質の翻訳後修飾解析プロトコール, pp 81-88, 2005
 - 27) Ishimizu, T., Hase, S.: Substrate Recognition by Sugar Chain-Related Enzymes: Recognition of a Large Area of Substrates and Its Strictness and Tolerance. *TIGG*, 17, 215-227 (2005)
 - 28) 中北慎一, 長谷純宏: 糖による修飾と機能発現, 分子生物学実験シリーズ「図・写真で観るタンパク構造・機能解析実験ガイド」, (株)メディカルドゥ, pp 202-207, (2005)
- 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) 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
 - 4) 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張活性に与える影響. 第25回日本糖質学会 (2005, 7, 20) 大津
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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. elegance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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) Risa INOUE, Motoki TERADA, Kay-Hooi Khoo, Nana KAWASAKI, Bruce Y. MA, Shogo OKA, Toshisuke 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
 - 11) 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)
 - 12) 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
 - 13) 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)
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 川西 徹: LC/MSとエキソグリコシダーゼによる糖タンパク質の部位特異的な糖鎖解析. 日本薬学会年会 (2006,

2. 学会発表

- 3, 28-30) 仙台
- 17) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤さつき, 中島 紫, 川西 徹: LC/MSⁿを用いた糖鎖抗原が結合したコアタンパク質の同定法の開発. 日本薬学会年会 (2006, 3)
- 18) 川崎ナナ: グライコムクス技術を用いた疾患関連糖タンパク質解析. 日本薬学会年会 (2006, 3, 28-30) 仙台
- 19) 菅原敬信他: 第42回ウイルス学会九州支部総会
- 20) 西山清人, 牧角啓一, 城野洋一郎, 菅原敬信: MDCK細胞培養上清中に見出したインフルエンザウイルス増殖阻害因子の同定と性状解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005, 11, 20-22) 横浜
- 21) 仲 亮輔, 石塚 文, 橋本有樹, 木下充弘, 掛樋一見: 細胞糖タンパク質糖鎖の網羅解析と癌細胞の個性解析. 第25回日本糖質学会年会 (大津)
- 22) 仲 亮輔, 石塚 文, 橋本有樹, 木下充弘, 掛樋一見: Comprehensive analysis of N-linked glycans in cellular glycoproteins and its application to finding of marker oligosaccharides in cancer cells. 第78回日本生化学会大会
- 23) Natsuka, S., Takemoto, T., Moriguchi, K., Aoki, T., Ito, N., Hase, S.: LewisX-Oligosaccharides at Segmentation Period of Zebrafish Embryo. XVIII International Carbohydrate Symposium. Sept. 4-9, 2005. Milano
- 24) Sasaki, A., Ishimizu, T., Geyer, R., Hase, S.: Synthesis of α -Mannosides Using Endo- α -Mannosidase. XVIII International Carbohydrate Symposium. Sept. 4-9, 2005. Milano
- 25) Kusaka, K., Otsu, T. C., Kuboyama, T., Ishimizu, T., and Hase, S.: Transposon Mediated Gene Disruption of a Beta-1,3 Glucanase Gene Expressed in the Ollen of Petunia. 10th International Congress of SABRAO. Oct. 22-23, 2005 Ohashi, T., Ishimizu, T., Akita, K., and Hase, S.: Polygalacturonic Acid Synthase As a Protein Complex. Plant Cell Wall Biosynthesis Meeting. August 4-7, 2005, Asilomar, CA, USA
- 26) Koichi Kato, Yoshiki Yamaguchi, Yukiko Kamiya, Takeshi Hirao, Hirokazu Yagi and Noriko Takahashi: NMR structural biology of glycoproteins: Structures, dynamics, and interactions. 2nd Workshop the Netherlands - Japan. (2005, 4, 18-21) Utrecht, The Netherlands
- 27) Yukiko Kamiya, Yoshiki Yamaguchi, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Yoichiro Arata, Ken-ichi Kasai, Masayasu Toyomoto, Naoki Matsumoto, Kazuo Yamamoto, Koichi Kato: Structural studies of interactions between the cargo receptor VIP36 and glycoproteins. 第58回日本細胞生物学会大会 (2005, 6, 15) 埼玉
- 28) 神谷由紀子, 山口芳樹, 高橋禮子, 荒田洋一郎, 笠井献一, 井原義人, 松尾一郎, 伊藤幸成, 山本一夫, 加藤晃一: VIP36の標的糖タンパク質認識の構造学的基盤. 第10回糖質若手フォーラム (2005, 6, 24) 岐阜
- 29) Koichi Kato, Yoshiki Yamaguchi, Yukiko Kamiya, Hirokazu Yagi, Takeshi Hirao, Mamiko Nishimura, Mayumi Nagano and Noriko Takahashi: Structural biology of glycoproteins and lectins by stable-isotope-assisted NMR spectroscopy. Glycoproteomics - protein modifications for versatile functions (2005, 6, 30) Dubrovnik, Croatia
- 30) 矢木宏和, 高橋禮子, 鈴木 隆, 渡邊慎也, 谷川歩美, 鈴木康夫, 加藤晃一: 宿主細胞の違いによるインフルエンザウイルスの糖鎖プロファイルの比較解析. 第25回日本糖質学会年会 (2005, 7, 22) 滋賀
- 31) 高橋禮子, Seon-joo Yoon, 仲山賢一, 飯田和子, Natalia Utkina, 矢木宏和, 加藤晃一, 箱守仙一郎: N結合型糖鎖とガングリオシドとの間にみられる糖鎖-糖鎖相互作用. 第25回日本糖質学会年会 (2005, 7, 21) 滋賀
- 32) 山口芳樹, 笹川拓明, 神谷由紀子, 長野真弓, 高橋禮子, 加藤晃一: 920 MHz 超高磁場 NMR 装置を用いた複合糖質の構造解析. 第25回日本糖質学会年会 (2005, 7, 21) 岩瀬仁勇, 高橋禮子, 加藤晃一, 伊藤昭彦, 高谷 徹, 岩波直美, 比企能之: IgA 腎症研究における IgA1 糖鎖の重要性. 第25回日本糖質学会年会 (2005, 7, 22) 滋賀
- 33) 加藤晃一, 矢木宏和, 神谷由紀子, 山田兼三, 山口芳樹, 高橋禮子: N型糖鎖ライブラリーのグライコムクス解析への応用. 第3回グライコムクス夏季シンポジウム (2005, 8, 8) 岐阜
- 34) Koichi Kato, Yoshiki Yamaguchi, Takeshi Hirao, Tadashi Suzuki, Yukiko Yoshida, Keiji Tanaka: NMR structural biology of sugar-recognizing ubiquitin ligase involved in glycoprotein degradation. XVIII International Symposium on Glycoconjugates (2005, 9, 9) Firenze, Italy
- 35) Yukiko Kamiya, Haruko Tsukakoshi, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, Yoichiro Arata Ken-ichi Kasai, Yoshito Ihara, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Kazuo Yamamoto, Koichi Kato: Sugar-binding, properties of VIP36, an intracellular animal lectin operating as a cargo receptor. XVIII International Symposium on Glycoconjugates (2005, 9, 9) Firenze, Italy
- 36) Hitoo Iwase, Noriko Takahashi, Koichi Kato, Akihiko Itoh, Toru Takatani, Naomi Iwanami, Yoshiyuki Hiki: Glycoform of N-linked oligosaccharide of tonsillar IgA1, and aberrant IgA1 prepared from the serum by asialo-, agalacto-IgA1-sepharose column and their involvement in IgA nephropathy. XVIII International Symposium on Glycoconjugates (2005, 9, 4-9) Firenze, Italy
- 37) 加藤晃一: 超高磁場 NMR 装置と糖鎖ライブラリーを活用したタンパク質・複合糖質の構造機能解析. タンパク3000 プロジェクト タンパク質の個別解析プログラム「翻訳後修飾と輸送」第4回班会議 (2005, 10, 16) 京都
- 38) Koichi Kato: Carbohydrate-protein interactions probed by NMR and sugar library. 第78回日本生化学会大会 (2005, 10, 22) 神戸
- 39) Hirokazu Yagi, Noriko Takahashi, Yoshiki Yamaguchi, Naoko Kimura, Kenji Uchimura, Koichi Kato: Application of the HPLC map of sulfated oligosaccharides. 第78回日本生化学会大会 (2005, 10, 21) 神戸
- 40) Mayumi Nagano, Mamiko Nishimura, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, Kazuhisa Uchida, Kenya Shitara, Koichi Kato: Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of immunoglobulin G as revealed by NMR spectroscopy. 第78回日本生化学会大会 (2005, 10, 22)
- 41) Hitoo Iwase, Noriko Takahashi, Koichi Kato, Akihiko Itoh, Toru Takatani, Naomi Iwanami, Shinichi Makita, Yoshiyuki Hiki: Comparative study of N-glycan glycoform of control serum IgA1, tonsillar IgA1 and aberrant IgA1 in IgA1-binding protein prepared from serum. 第78回日本生化学会大会 (2005, 10, 21) 神戸
- 42) Uichiro Yabe, Noriko Takahashi, Koichi Kato: Glycosylation profile of antibody by an analytical technique using 3-D HPLC MAP. BioProduction 2005 (2005, 10, 25-26) Amsterdam, The Netherlands
- 43) Koichi Kato: NMR and sugar library approaches to protein sociology. International Symposium on Life of Proteins (2005, 10, 30-11, 3) 淡路島
- 44) Yukiko Kamiya, Haruko Tsukakoshi, Yoshiki Yamaguchi, Noriko Takahashi, Yoichiro Arata Ken-ichi Kasai, Yoshito Ihara, Ichiro Matsuo, Yukishige Ito, Kazuo Yamamoto, Koichi Kato: Structural basis for the mechanism of glycoprotein transport by cargo receptors. International Symposium on Life of Proteins (2005, 10, 31) 淡路島
- 45) 山口芳樹, 高橋禮子, 加藤晃一: タンパク質の糖鎖修飾と NMR 構造生物学. 第43回日本生物物理学会年会 (2005, 11, 24) 札幌
- 46) 山田兼三, 矢木宏和, 山口芳樹, 高橋禮子, 岡 昌吾, 川崎敏祐, 加藤晃一: グルクロン酸含有糖鎖の構造解析への多次元 HPLC マップ法の展開. 日本薬学会第126年会 (2006, 3, 28-30) 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- MDCK細胞培養上清中に見出した新規プロテアーゼインヒビター (平成16年11月出願)
- アミノピリジン標識糖鎖の質量分析法.
発明者: 関谷禎規, 田中耕一, 加藤晃一, 山口芳樹
特許出願人: 株式会社島津製作所
出願日: 平成17年6月7日
出願番号: 特願2005-167015

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社