

かったことから、NeuAc 2 分子は、共に 2 本鎖型糖鎖の非還元末端側の Gal に結合していることが示唆された。また、 m/z 370 ($Y_{1\alpha}$) 及び 1059 ($Y_{4\omega/4\beta}$) が検出されたことから、Fuc 1 分子は、トリマンノシルコア構造の GlcNAc に結合していることが分かった (Fig. 17B 中の図)。

以上のように、FT ICRMS によって得られた精密質量と、liner ITMS のポジティブ及びネガティブ両イオンモード測定によって得られたプロダクトイオンスペクトルをもとに、Thy-1 に結合する多数の N-結合型糖鎖を明らかにすることができた。

(3) 糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造特性解析のためのストラテジーの開発

ここでは、hCG をモデル糖タンパク質として用いて、糖鎖プロファイリング法、及び本研究とは別に我々が見出したペプチドマッピングを利用した糖ペプチド解析法が、糖タンパク質性医薬品の糖鎖構造解析法として応用可能性であるかを検証するとともに、両分析法を組み合わせた糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の構造特性解析のためのストラテジーを構築した。

1) ペプチドマッピング

ペプチドマッピングは、タンパク質性医薬品の一次構造を確認することを目的として、従来から取り入れられている試験法の一つである。最近では、LC/MS と組み合わせ、 MS^1 で得られた分子量や MS^2 で得られたペプチド配列情報からピークを帰属するのが一般的になっている。この MS^2 を利用したペプチドマッピングは、プロテオミクスにおけるペプチド同定の定法としても知られている。これは、 MS^2 によってペプチドから生じた b イオン及び y イオンを、データベースに登録されているタンパク質から生じるペプチドに由来する b 及び y イオンの理論値と照合することによって、ペプチドの配列を推定するものである。糖ペプチドの場合は、 MS^2 によって糖鎖部分が優先的に開裂するため、データベースとの照合が難しく、これまで、データベース検索による糖ペプチドの同定は難しいとされてきた。しかし、先に我々は、 MS^2 で糖鎖を開裂させて糖鎖構造情報を得、さらに、GlcNAc 結合ペプチドを前駆イオンとして MS^3 を行い、生じた b 及び y イオンを利用してデータベース検索することにより、ペプチド配列情報を得られることを見出した。この方法を利用することによって、糖ペプチドの同定はもとより、結合部位毎の糖鎖の構造・不均一性解析が可能になると思われる。そこで我々は、hCG をモデルとして、糖タンパク質性医薬品のペプチドマッピングへの LC/MSⁿ とデータベース検索の応用可能性について検討を行った。

前述したように、hCG は α サブユニット、及び β サブユニットのヘテロダイマーからなる糖タンパク質である。 α サブユニットは 92 アミノ酸残基からなり、Asn52 と 78 に N 結合型糖鎖が結合している (Fig. 18)。 β サブユニットは 145 アミノ酸残基か

らなり、Asn13 と 30 に N 結合型糖鎖、並びに Ser121, 127, 132, 及び 138 に O 結合型糖鎖が付加している。酵素消化を完全に行うために hCG を還元カルボキシメチル化した後、トリプシンで消化し、N 結合型糖鎖が結合した 4 つの糖ペプチド (A6, A9, B3, 及び B4)、並びに O 結合型糖鎖が結合した 3 つの糖ペプチド (B13, B14, 及び B15) を含むペプチド混合物を調製した。

Fig. 19 は、LC/MS によって得られた hCG トリプシン消化物のペプチドマップである。ここではポジティブイオンモードでフル MS^1 スキャン、インソース CID、及びデータ依存的 MS^{2-4} 測定を行った (Table 6)。尚、インソース CID とは、イオン化してから検出器に導入されるまでの間に気体を衝突させてイオンを開裂させる方法である。また、データ依存的 MS^n では、 MS^{n-1} の各スキャンで最も強く検出されたイオンを前駆イオンとして自動的に MS^n を行った。Fig. 19 は MS^1 のトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、ペプチド及び糖ペプチドに由来するピークが表れている。Fig. 19B は、インソース CID によって生じた糖鎖に特徴的な GlcNAc の B イオンのみを抜き出したクロマトグラムで、主に糖ペプチドに由来するピークが表れている。これらの糖ペプチドの配列を推定するために、タンパク質データベース解析エンジン TurboSEQUENT を用いて、得られたマススペクトルとタンパク質データベース NCBInr に登録されているタンパク質の照合を行った。その際に、糖ペプチドの同定を可能にするため、検索条件に Asn, Thr, 及び Ser に GlcNAc が結合している可能性を追加して検索した。その結果、Fig. 19B の 19-22, 20, 及び 53 分に溶出されたピークは、GlcNAc が結合したペプチド A9, A6, 及び B4 と帰属された。また、3, 22-27, 及び 32-35 に溶出されたピークは、ペプチド B13, B3, 及び B15 と同定された。これらのペプチドからは糖鎖が完全に脱離したペプチドイオンが生じたため、データベース検索上では糖ペプチドとして特定されなかったが、 MS^2 スペクトル上に糖鎖に特徴的なイオンが検出されることから、糖ペプチドと判定した。26 分のピークは、データベース検索によって同定されなかったが、 MS^2 スペクトルを解析した結果、B14 であることが推定された。このペプチドには糖鎖が 2 本結合しているため、データベース検索では同定できなかったものと思われる。

各ペプチドに結合している糖鎖の構造は、 MS^2 スペクトルから推定した。Fig. 20 は 7 つの糖ペプチドの典型的な MS^2 スペクトルと、その帰属結果を示している。A-D は N 結合型糖鎖が結合した A6, A9, B3, 及び B4 で、E-G は O 結合型糖鎖が結合した B13, B14, 及び B15 である。N 結合型糖鎖は、混成型及び複合型糖鎖で、O 結合型糖鎖は、シアル酸が結合した 3-4 糖からなる糖鎖であることが確認された。

2) 糖鎖プロファイリング

糖タンパク質性医薬品の糖鎖部分の恒常性を評価

するため、遊離糖鎖のプロファイリングが糖鎖試験として設定されることが多い。これまでは、2-AP や 2-アミノベンザミドによる糖鎖の標識と HPLC によるプロファイリングや、HPAEC-PAD によるプロファイリングが取り入れられてきた。ここでは、hCG の N 結合型糖鎖を用いて、我々が開発した LC/MSⁿ に基づく糖鎖プロファイリング法 (Table 7) の応用可能性を検証した。

Fig. 21A 及び B は、ポジティブ及びネガティブイオンモードのフル MS¹ スキャンによって得られた糖鎖プロファイルである。各ピークの糖鎖配列は、MS¹ によって測定された分子量及び MS² スペクトルから解析した。糖鎖配列解析の一例として、Fig. 22 に 37 分に溶出された糖鎖の MS² スペクトルを示す。一連の B イオンシリーズ、及び Y イオンシリーズが検出され、シアル酸が結合した複合型糖鎖と推定された。

以下同様に主なピークの MS² スペクトルを解析した結果、hCG の主な糖鎖の構造はシアル酸結合混成型及び複合型 2 本鎖と推定され、ペプチドマッピングの結果とよく一致した。さらに、2 本鎖糖鎖に加えて、ペプチドマッピングでは検出されなかったトリシアロ 3 本鎖型糖鎖が検出された。糖鎖プロファイリングは糖鎖の詳細な解析に適していることが示唆された。

3) 糖タンパク質性医薬品の糖鎖の構造特性解析のためのストラテジー

hCG を用いた実験により、LC/MSⁿ システムを用いたペプチドマッピングと糖鎖プロファイリングによって、部位毎の糖鎖の概略、糖鎖の詳細構造、及び不均一性が明らかになることが確認された。この 2 つの手法を用いることによって、分子内に複数の糖鎖結合部位を持つ糖タンパク質の構造解析や、類似糖タンパク質の同等性・同質性評価が可能になることが予想される。

Fig. 23 は、LC/MSⁿ を利用した糖タンパク質性医薬品の糖鎖に関する構造特性解析の流れを示したものである。まず、酵素消化を完全に行うため、糖タンパク質は予め還元カルボキシメチル化する。サンプルを 2 つに分け、一方をトリプシン等でペプチドに断片化する。このとき、LC/MS² に適したサイズのペプチド、すなわち C18 カラムに保持される程度の疎水性を持ち、MS² が可能な分子量で、かつ、分子内に糖鎖を 1 分子しか含まないペプチドが得られるように消化酵素を選択するのが望ましい。Lys-C、Glu-C、または Asp-N やそれらの組み合わせも検討する。そして、得られたペプチド断片の LC/MSⁿ を行う。

つぎに、ペプチドマップで得られたデータを基に、以下の手順で糖ペプチドを解析する。まず、すべてのペプチド・糖ペプチドのマススペクトルデータを使ったデータベース検索を行い、ペプチド及び糖ペプチドの配列を推定する。このとき、データベース検索エンジンの検索条件に糖鎖付加の可能性を追加する。つぎに、MS² スペクトルの中から、糖鎖に特

徴的なイオンを指標にして糖ペプチドを選別する。その中で既にデータベース検索エンジンによって同定された糖ペプチドは、MS²⁻⁴ スペクトルから糖鎖構造を推定する。データベース検索で同定されなかった糖ペプチドについては、MS² スペクトル中の各プロダクトイオンを帰属してペプチド関連イオンを探し出し、マニュアルでペプチド配列と糖鎖配列を推定する。

残りの還元カルボキシメチル化糖タンパク質には PNGaseF を作用させて N 結合型糖鎖を遊離させる。LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングを行い、糖鎖構造を詳細に解析する。両者を比較し、構造特性を明らかにする。

我々は、本ストラテジーが、今回用いた hCG だけでなく、ラットやマウス組織中の微量糖タンパク質の構造特性解析に応用可能であることを確認している。このストラテジーは糖タンパク質性医薬品の特性解析・品質評価のみならず、開発段階の微量糖タンパク質や不純物、並びにバイオジェネリック等の糖鎖解析にも応用可能と期待される。

D. 考察

これまで我々は LC/MS を用いた独自の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解析に利用してきた。本研究では、糖タンパク質性医薬品の特性解析、同等性・同質性等の評価に利用することを目的として、糖鎖プロファイリング法の改良と、その応用可能性の検証を行った。

まず平成 15 年度は、安定同位体標識法と LC/MS を組み合わせた単糖組成分析法及び定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、MS の課題である再現性を向上させることができた。

つぎに平成 16 年度は、糖鎖プロファイリングにおいて、ポジティブ及びネガティブ両イオンモードで精密分子量測定及び MSⁿ 測定を行うことによって、従来よりも多くの糖鎖構造情報が得られることを実証した。この方法を、SDS-PAGE で分離されたゲル内糖タンパク質の糖鎖解析に応用し、ラット脳の GPI アンカー型タンパク質 Thy-1 の構造特性を明らかにすることができた。改良型糖鎖プロファイリングは、電気泳動で分離された微量糖タンパク質の糖鎖解析にも役立つことが確認され、糖タンパク質性医薬品はもとより、細胞治療用医薬品が発現する糖タンパク質の糖鎖解析にも応用可能であることが示唆された。

平成 17 年度は、hCG をモデル糖タンパク質として用いて、糖タンパク質性医薬品の特性解析における糖鎖プロファイリング法、並びに本研究とは別に我々が見出した LC/MS とデータベース検索を組み合わせた糖鎖構造解析法の応用可能性を検証した。両分析法を利用することによって、短時間で hCG の詳細な糖鎖構造や、部位特異的糖鎖不均一性を明らかにできることを確認し、これらの方法を取り入れた糖タンパク質の糖鎖部分に関する構造特性解析のためのストラテジーを構築した (Fig. 23)。この解析手法は、糖タンパク質性医薬品が抱える課題、すな

わち糖鎖構造解析, 糖鎖試験, 同等性・同質性やバイオジェネリックの糖鎖部分の評価などに利用できると思われる。

E. 結論

- 1) 安定同位体標識標準単糖と LC/MS を用いた単糖組成分析, 並びに定量的糖鎖プロファイリング法を開発した。
- 3) GCC-LC/liner ITMS-FT ICRMS を用いた改良型糖鎖プロファイリング法を開発し, 従来法より多くの糖鎖構造情報が得られることを実証した。
- 3) 糖鎖プロファイリング法, 並びに本研究とは別に我々が見出した LC/MS とデータベース検索を組み合わせた, 糖タンパク質の糖鎖部分に関する構造特性解析のためのストラテジーを構築した。

E. 健康危害情報 なし

F. 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/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)
- 16) 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)

- 17) 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)
 - 18) Nana KAWASAKI, Noritaka HASHII, Satsuki ITOH, Masashi HYUGA, Toru KAWANISHI, Takao HAYAKAWA: Glycome analysis by oligosaccharide profiling using liquid chromatography / mass spectrometry, *J. Electrophoresis*, 48, 5-10 (2004)
 - 19) Masashi HYUGA, Sumiko HYUGA, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, Shingo NIIMI, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Enhancement of hepatocyte growth factor-induced cell scattering in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HepG2 cells, *Biol. Pharm. Bull.* 27, 781-785 (2004)
 - 20) Masashi HYUGA, Satsuki ITOH, Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Akiko ISHII, Sumiko HYUGA, and Takao HAYAKAWA: Analysis of site-specific glycosylation in recombinant human follistatin expressed in Chinese hamster ovary cells, *Biologicals*, 32, 70-77 (2004)
 - 21) Nana KAWASAKI, Miyako OHTA, Satsuki ITOH, and Takao HAYAKAWA: Analyses of glycoproteins and glycopeptides by liquid chromatography/mass spectrometry, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Methods Molecular Biology*, 251, HPLC of Peptides and Proteins, Edited by M. I. Aguilar, 263-274 (2003)
2. 学会発表
- 1) 川崎ナナ, 早川堯夫: LC/MS を用いた糖鎖のプロファイリングと構造解析. 第 53 回電気泳動学会シンポジウム (2003 年, 大阪)
 - 2) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 蜂須賀暁子, 橋井則貴, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動及び LC/MS を用いたグライコーム解析. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第一回夏期シンポジウム (2003 年, 浜松)
 - 3) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 横浜バイオテクノロジー懇談会平成 15 年度第 1 回リカレント講座「マススペクトロメトリーとプロテオミクスー蛋白質研究の最前線」(2003 年, 横浜)
 - 4) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Jin Yuan, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akiko Ishii, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Isotope tag method for quantitative oligosaccharide analyses by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
 - 5) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Masashi Hyuga, Toru Mawanishi, Takao Hayakawa: Oligosaccharide profiling of cell membrane by LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
 - 6) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akiko Hachisuka, Reiko Teshima, Jun-ichi Sawada, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa: Analysis of IgLON family protein in rat brain by gel electrophoresis and capillary LC/MS. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
 - 7) Kayoko Takagi, Reiko Teshima, Haruyo Okunuki, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, Jun-ichi Sawada: Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragments. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
 - 8) Akiko Ishii-Watabe, Edwin Chang, Nana Kawasaki, Toru Kawanishi, Takao Hayakawa, John Cooke: Transcriptional profiling in nicotine-treated human microvascular endothelial cells. 第 76 回日本生化学会大会 (2003 年, 横浜)
 - 9) 川崎ナナ: 糖鎖関連医薬品の現状と課題. 第 3 回糖鎖科学名古屋拠点研究会(2004 年, 名古屋)
 - 10) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の質量分析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
 - 11) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 日向昌司, 川西 徹, 早川堯夫: 糖鎖プロファイリングを用いた差異解析に基づくグライコーム解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
 - 12) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 蜂須賀暁子, 手島玲子, 澤田純一, 川西 徹, 早川堯夫: 2次元電気泳動と LC/MS を用いたラット脳内 GPI アンカー型タンパク質の解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
 - 13) 原園 景, 川崎ナナ, 川西 徹, 早川堯夫: LC/MS/MS による apolipoprotein B100 の部位特異的糖鎖構造解析. 日本薬学会第 124 年会(2004 年, 大阪)
 - 14) Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Toru Kawanishi, And Takao Hayakawa: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS. 第 2 回ヒトプロテオーム学会 (2004 年, 東京)
 - 15) 川崎ナナ: 糖タンパク質の質量分析. 第 54 回日本電気泳動学会シンポジウム(2004 年, 横浜)
 - 16) 川崎ナナ: LC/MS による糖タンパク質の糖鎖解析. シンポジウムゲノムと生物機能 (2004 年, 札幌)
 - 17) Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuisi, 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, 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 年, かずさ)
 - 19) Moroki Terada, Risa Inoue, Naoko Kadowaki, Kay-Hooi Khoo, Nana Kawasaki, Toshisuke

- Kawasaki, Nobuko Kawasaki : Characterization of mannose-binding protein ligands expressed on human colon cancer cells. 第 77 回日本生化学会大会 (2004 年, 横浜)
- 20) 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 年, 横浜)
 - 21) 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 年, 横浜)
 - 22) Yayoi Takehara, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Toru Kawanishi, Koh Nomura, Hiroko Matsushita-Oikawa, and Haruko Ogawa: Characterization of the glycans of bovine erythrocyte membrane glycoprotein. 第 77 回日本生化学会大会 (2004 年, 横浜)
 - 23) 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 年, 横浜)
 - 24) 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, Hawaii)
 - 25) 野村和子, 水口惣平, 安藤恵子, 三谷昌平, 平林義雄, 松石 紫, 川崎ナナ, 出嶋克史, 野村一也: 二次元電気泳動を用いた線虫 Acetyl CoA トランスポーターの解析. 第 27 回日本分子生物学会年会 (2004 年, 神戸)
 - 26) 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 年, 東京)
 - 27) 川崎ナナ: 糖鎖結合部位と糖鎖の解析. 蛋白質研究所セミナー「翻訳後修飾のプロテオミクス」(2005 年, 大阪)
 - 28) 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 年, 東京)
 - 29) 川村義彦, 石井明子, 川崎ナナ, 浦野四郎, 川西 徹, 奥田晴宏, 福原 潔: 平面型カテキンの細胞増殖阻害作用. 日本薬学会第 125 年会 (2005 年, 東京)
 - 30) 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 年, 大宮)
 - 31) 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 年, 大宮)
 - 32) 福原 潔, 石井明子, 川崎ナナ, 川西 徹, 宮田直樹, 奥田晴宏: 脂溶性平面型カテ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 年, 札幌)
 - 33) 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 年, 大津)
 - 34) 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 年, 大津)
 - 35) 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 年, 横浜)
 - 36) 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 年, 横浜)
 - 37) 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 年, 横浜)
 - 38) 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 年, 神戸)
 - 39) 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 年, 神戸)
 - 40) 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 年, 神戸)
 - 41) Miho ASAHII, 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 年, 神戸)

- 42) 佐野琴音, 内堀一岩城はるひ, 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 年, 浜松)
- 43) 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 年, 名古屋)
- 44) 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 年, 東京)
- 45) 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 年, つくば)
- 46) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 中島 紫, 原園 景, 川西 徹: LC/MS のグライコミクスへの応用. 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 年, 名古屋)

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

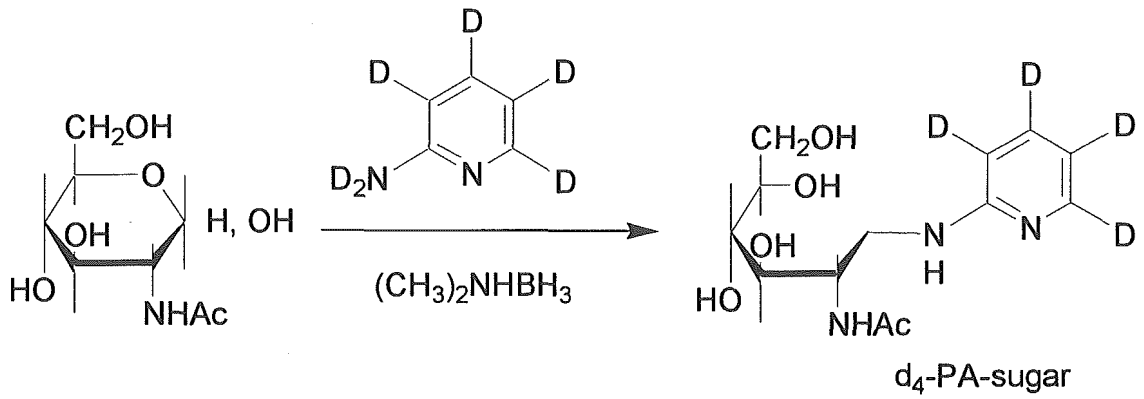


Fig. 1 糖鎖の安定同位体標識化

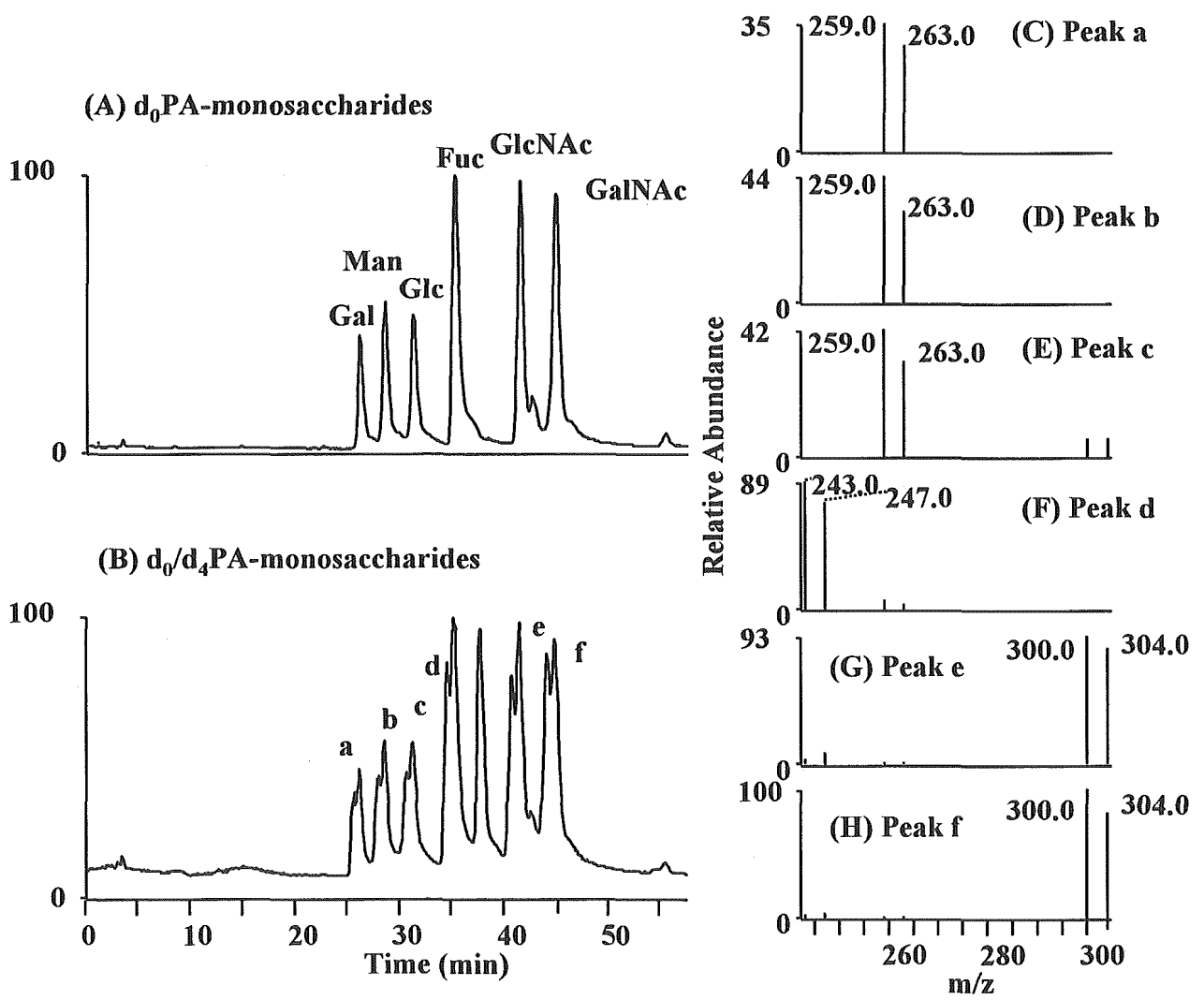


Fig. 2 GCC-LC/MSを用いた単糖分析

(A) d₀PA-単糖のクロマトグラム、(B) d₀/d₄PA-単糖のクロマトグラム、(C)-(H) ピーク a-f のマススペクトル

Table 1 GCC-LC/MS を用いた PA 単糖分析における PA 糖鎖安定同位体の影響

SIM ion intensity (peak area ratio %) derived from d ₀ -PA and d ₄ -PA-monosaccharides												
Ion (<i>m/z</i>)	d ₀ PA-Fuc	d ₄ PA-Fuc	d ₀ PA-Gal	d ₄ PA-Gal	d ₀ PA-Man	d ₄ PA-Man	d ₀ PA-Glc	d ₄ PA-Glc	d ₀ PA-GlcNAc	d ₄ PA-GlcNAc	d ₀ PA-GalNAc	d ₄ PA-GalNAc
243	86.6	-										
244	11.7	-										
245	1.7	0.7										
246	-	4.6										
247	-	82.6										
248	-	10.4										
249	-	1.7										
259			87.4	-	88.6	-	87.6	-				
260			11.0	-	9.9	-	11.1	-				
261			1.6	0.7	1.5	0.4	1.3	0.8				
262			-	4.1	-	2.9	-	4.1				
263			-	83.1	-	78.7	-	79.3				
264			-	10.5	-	14.4	-	13.4				
265			-	1.6	-	3.6	-	2.4				
300									86.0	-	85.5	-
301									12.3	-	12.9	-
302									1.7	0.4	1.6	0.5
303									-	4.1	-	4.6
304									-	81.0	-	81.1
305									-	12.5	-	12.0
306									-	2.0	-	1.8

10 pmol PA or d₄PA-monosaccharide was injected

Table 2
内部標準単糖を用いた GCC-LC/MS による d₀-PA-単糖分析の再現性(RSD)

	d ₀ -PA-monosaccharides (pmol)								
	0.05			0.5			5		
	IS(-)	IS(A)	IS(B)	IS(-)	IS(A)	IS(B)	IS(-)	IS(A)	IS(B)
Gal	16.2	15.5	5.7	11.6	8.3	2.1	5.0	5.5	2.3
Man	12.7	15.3	4.7	9.7	7.1	1.8	7.2	4.6	1.7
Glc	12.9	17.5	3.9	8.9	7.6	4.8	10.9	5.1	1.1
Fuc	23.9	17.3	4.2	9.9	7.6	1.9	5.4	6.1	0.8
GlcNAc	15.2	7.7	3.5	9.0	5.6	2.0	5.4	6.0	1.2
GalNAc	16.0	21.0	9.4	11.4	7.4	4.7	9.8	3.5	1.5

Note. n=5. IS, internal standard. A, PA-rhamnose; B, d₄-PA-monosaccharides.

Table 3
内部標準単糖を用いた GCC-LC/MS による単糖組成分析

Glycoprotein	Monosaccharide	mol/mol ^a	mol/mol
Fetuin	Fuc	0.3	0 ^b
	Gal	10.4	12
	Man	7.6	9
	GlcNAc	14.7	15
	GalNAc	3.4	3
Erythropoietin	Fuc	3.4	4.1 ^c
	Gal	12.8	13.8
	Man	8.1	8.7
	GlcNAc	15.6	17.2
	GalNAc	1.5	0.9

^aValues were expressed as mol detected in 1 mol glycoprotein. ^bRef, *Anal. Biochem.* 197, (1991) 132-136; ^cRef, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 12059-12076

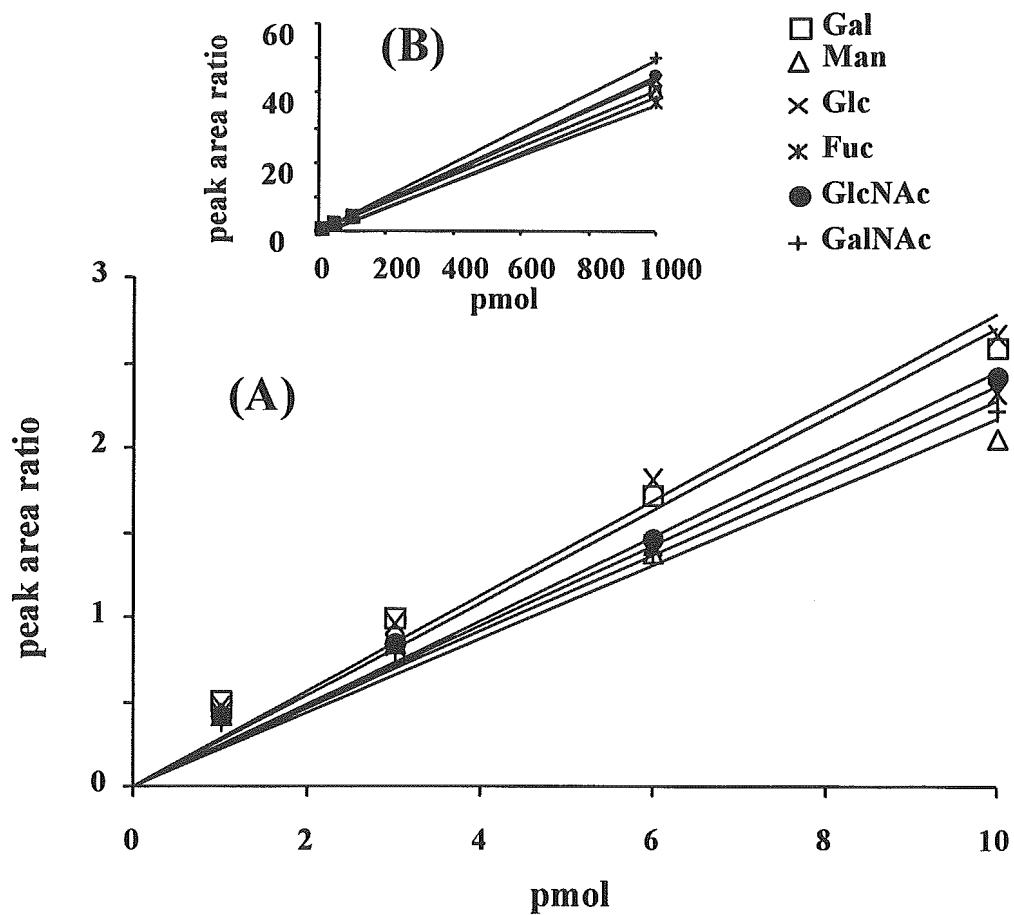


Fig. 3 安定同位体標識単糖及びGCC-LC/MSを用いた単糖分析法の定量性

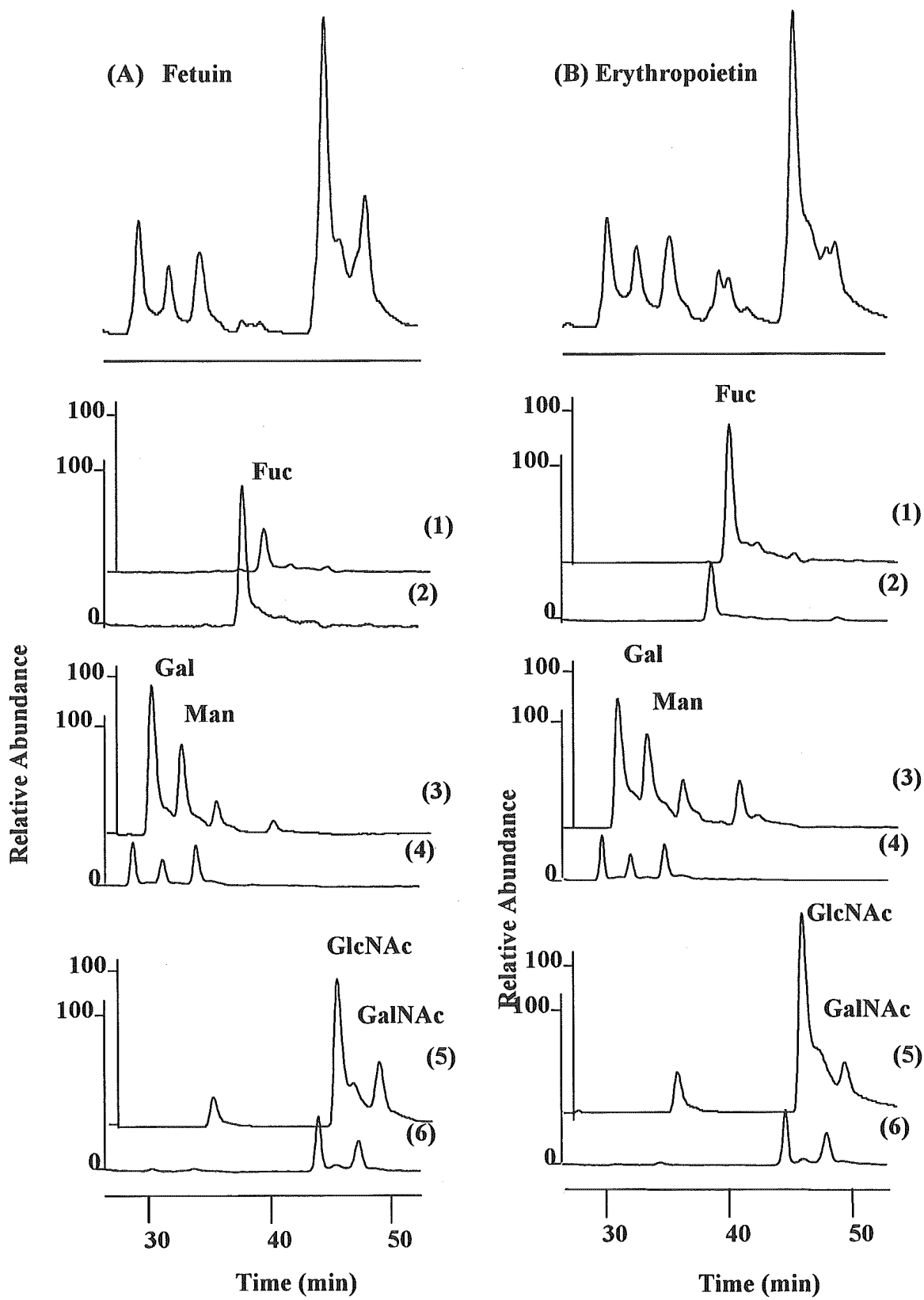


Fig. 4 フェツイン(A)及びエリスロポエチン(B)の単糖組成分析
 マスクロマトグラム m/z 243 (1), 247 (2), 259 (3), 263 (4), 300 (5), 304 (6)

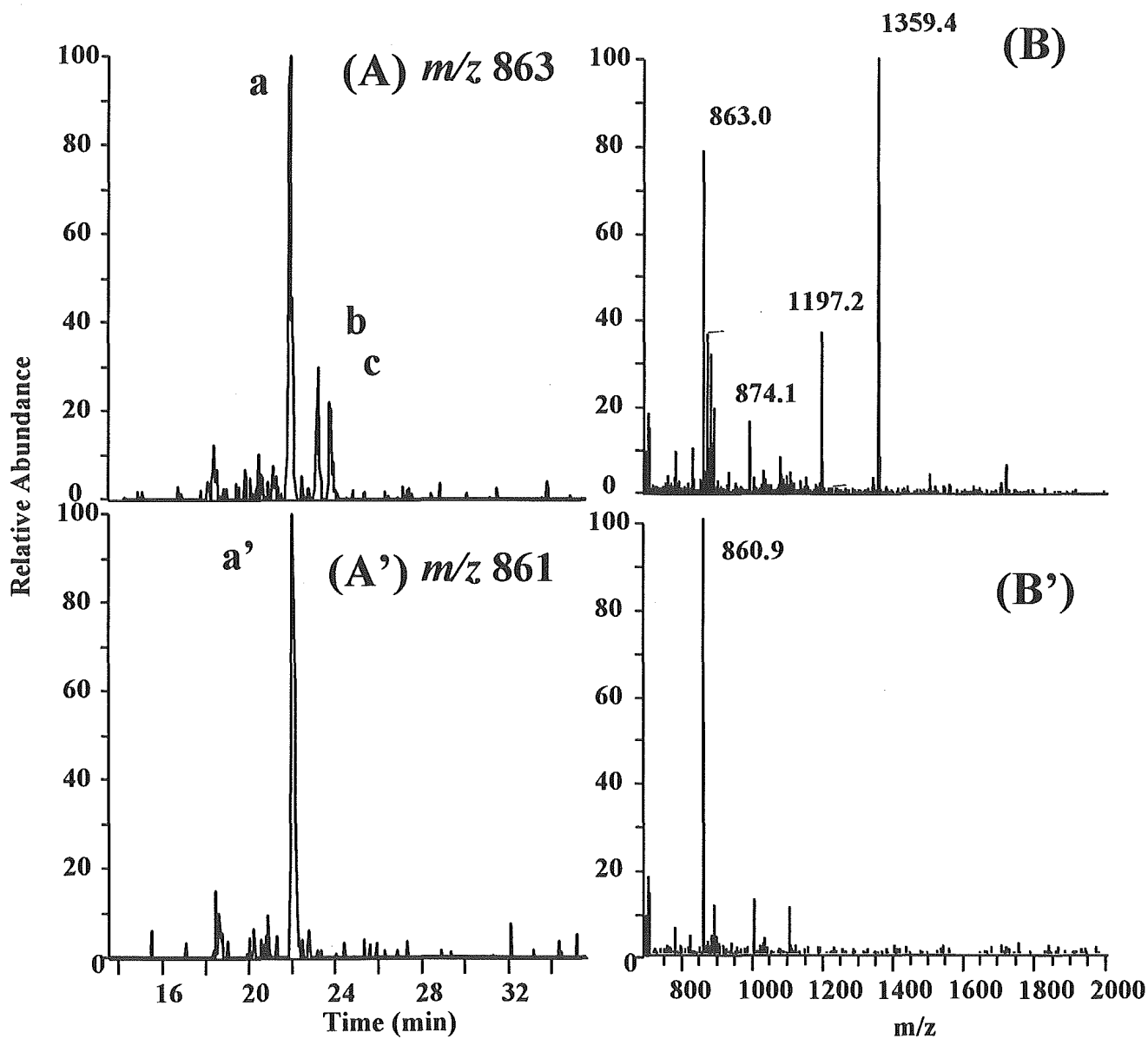


Fig. 5 hCG由来 d_4 -PA化アシアロ2本鎖糖鎖のGCC-LC/MS

(A), (A'), マスクロマトグラム; ピーク a, a' のマススペクトル (B), (B')
 (A), (B), positive ion mode; (A'), (B'), negative ion mode

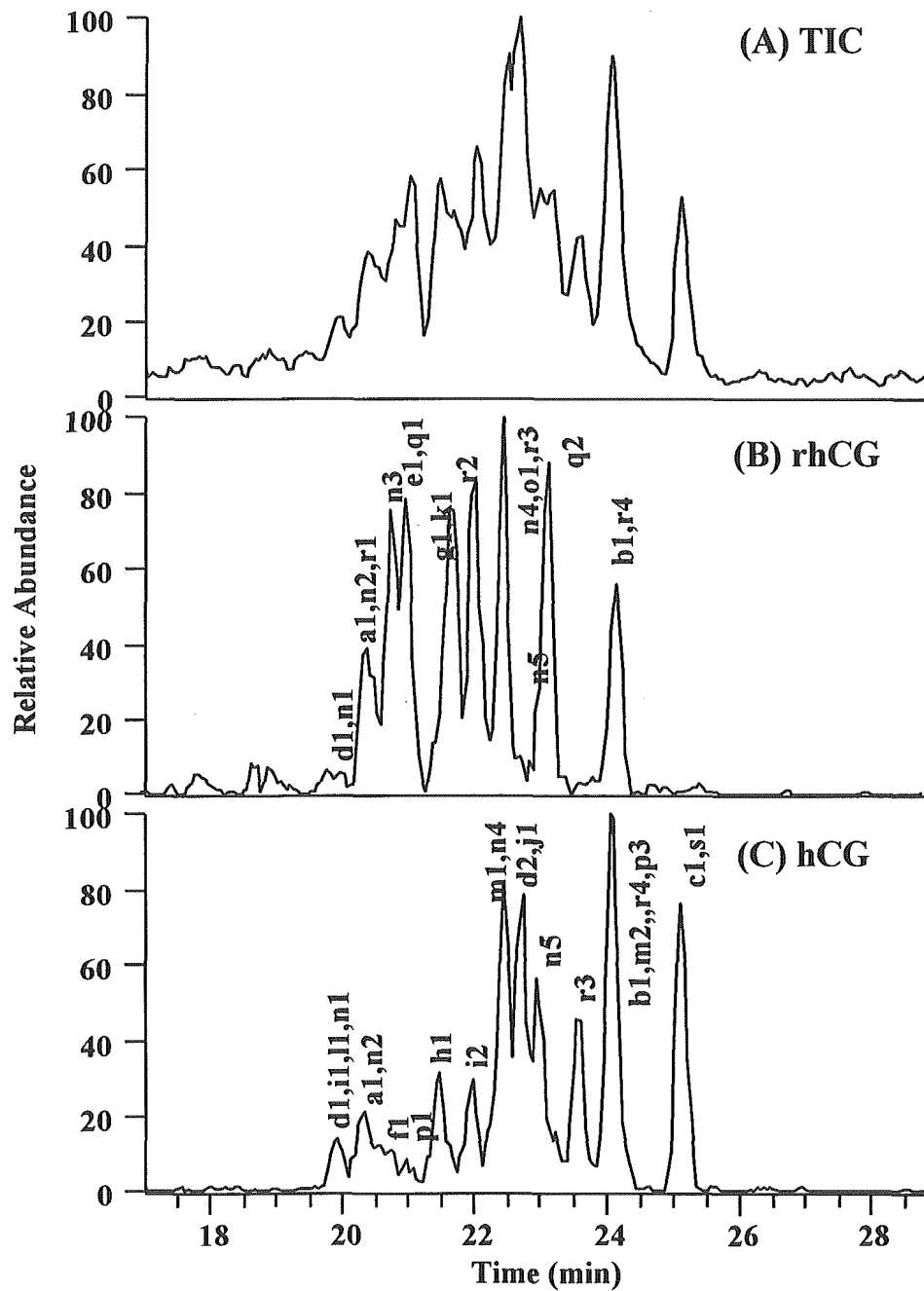


Fig. 6 PA化hCG由来糖鎖のプロファイル

(A), d_4 -PA hCG 及び d_0 -PA rhCG 混合物のTIC; (B), d_4 -PA hCGのTIC; (C), d_0 -PA rhCG のTIC

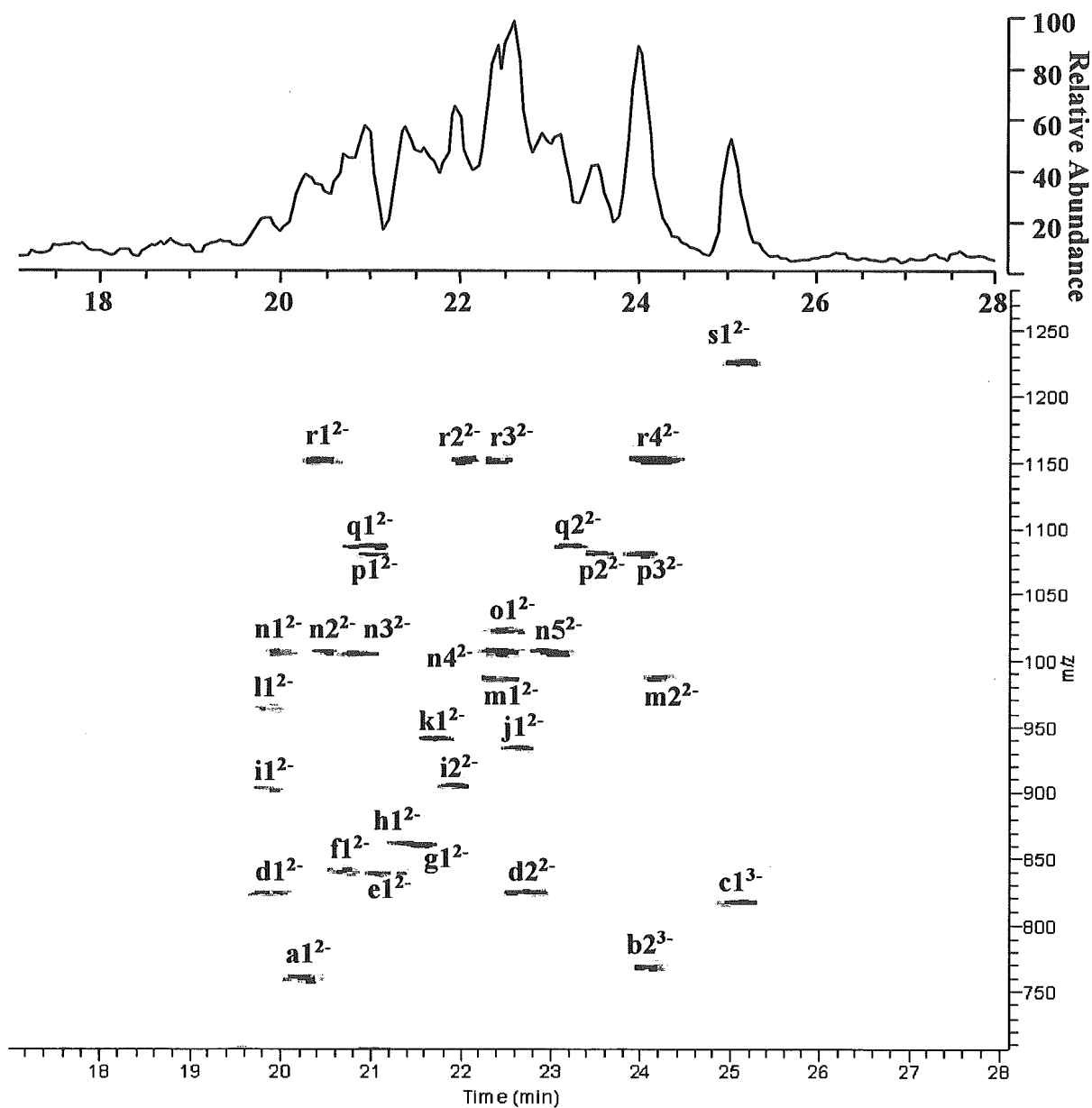


Fig. 7 d₀-PA rhCG 及び d₄-PA hCG 混合物のTICの2D表示

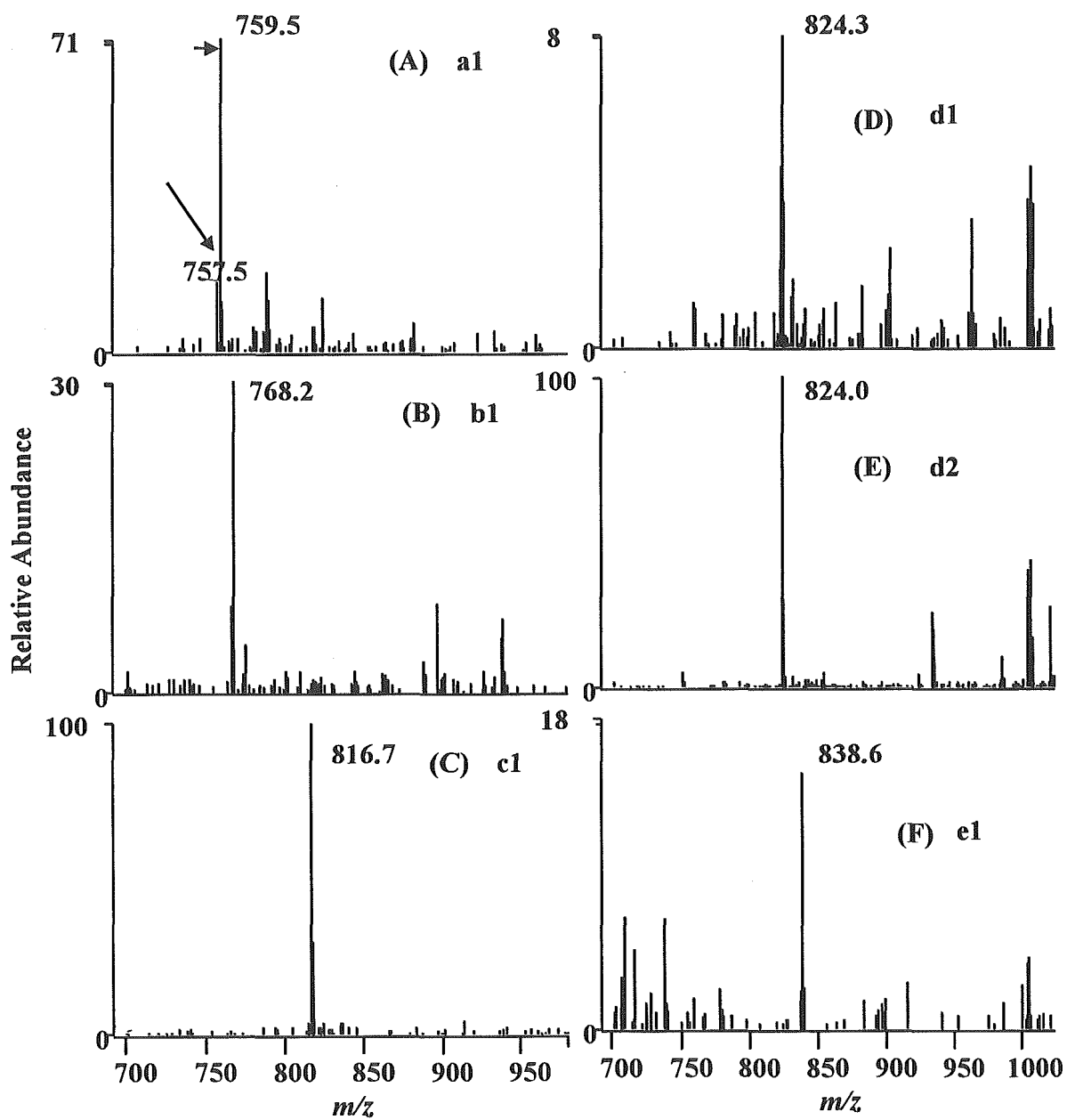


Fig. 8-1 Fig. 7中のピーク a~s のマススペクトル

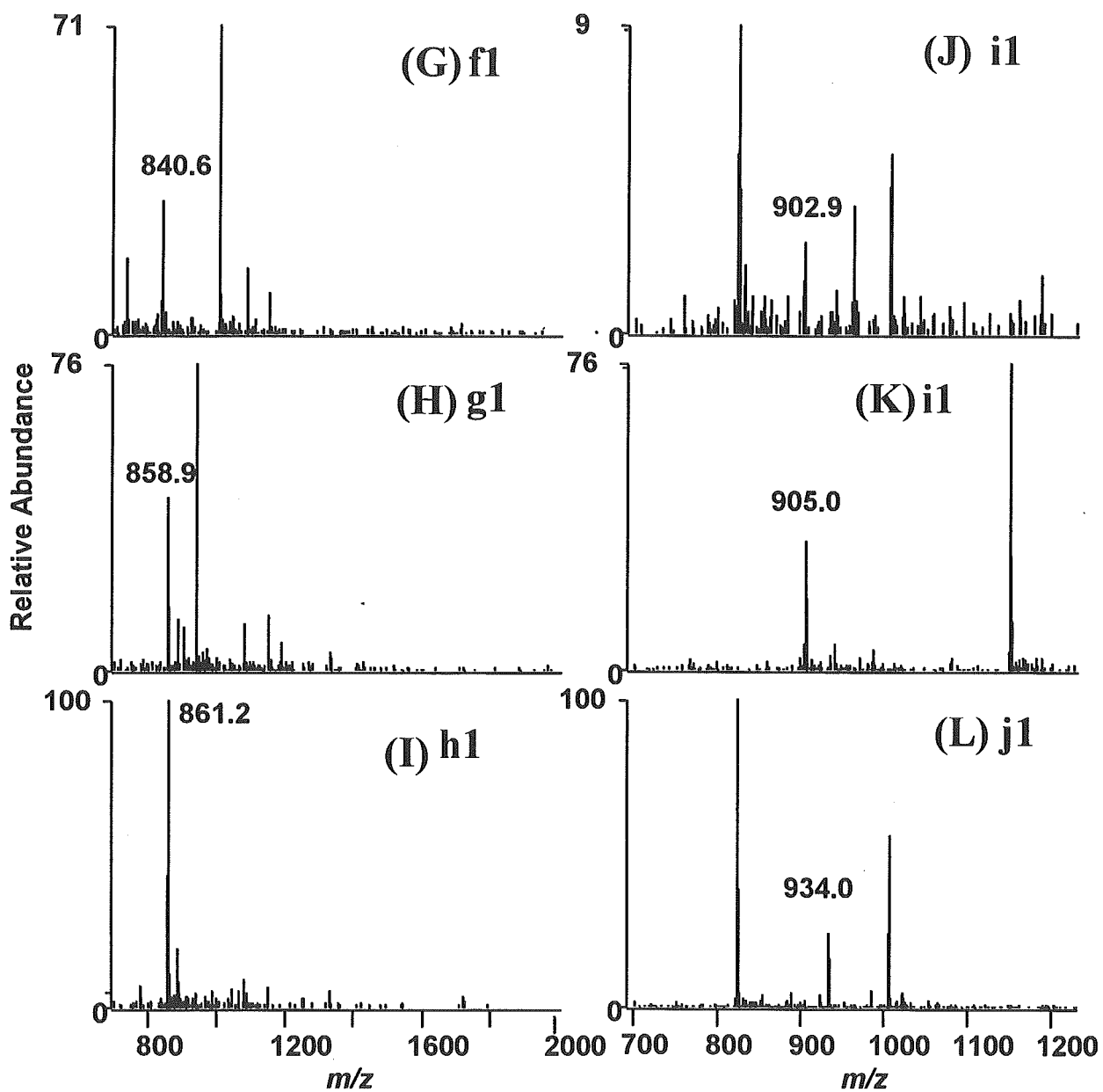


Fig. 8-2 つづき

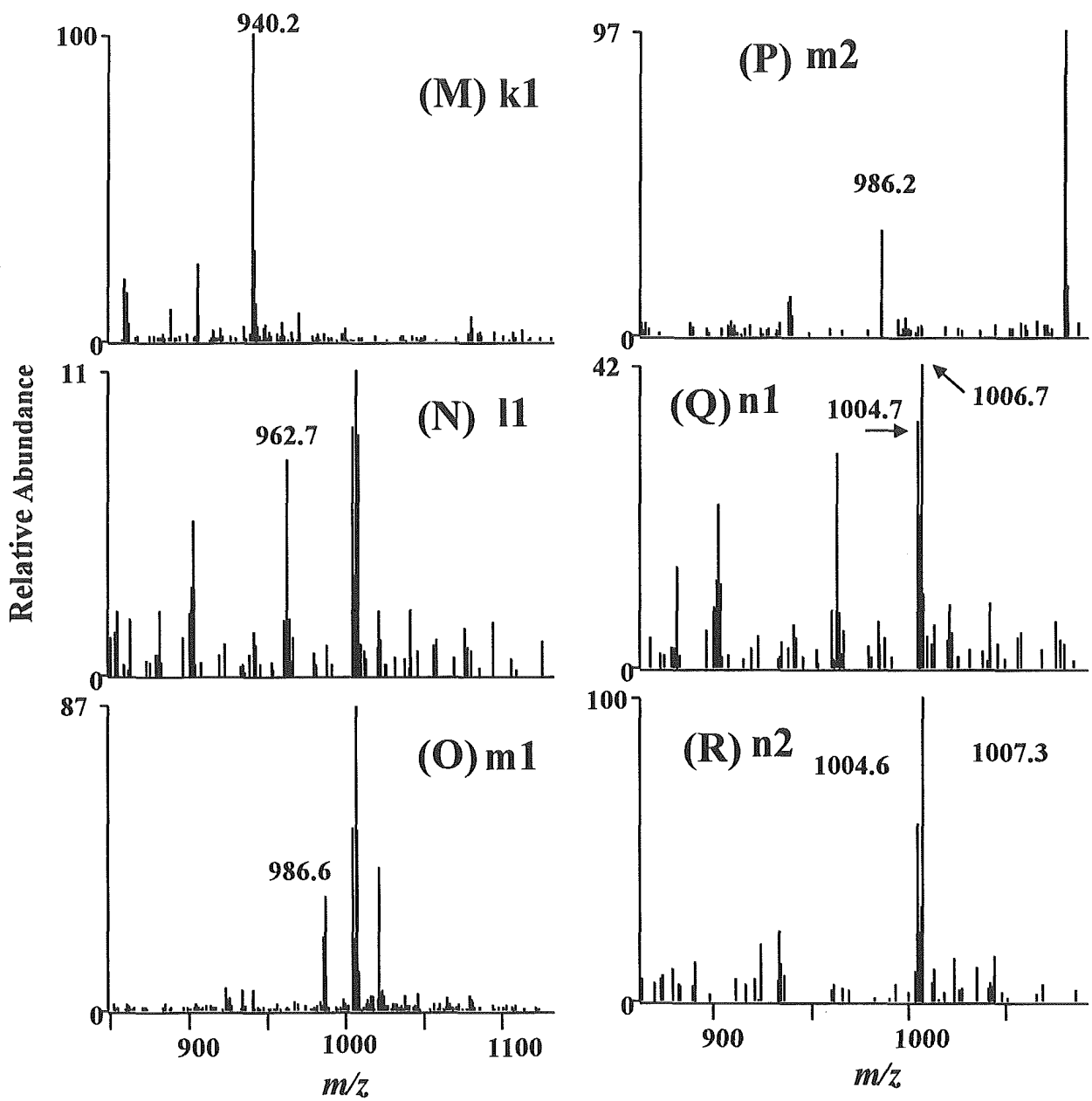


Fig. 8-3 つづき

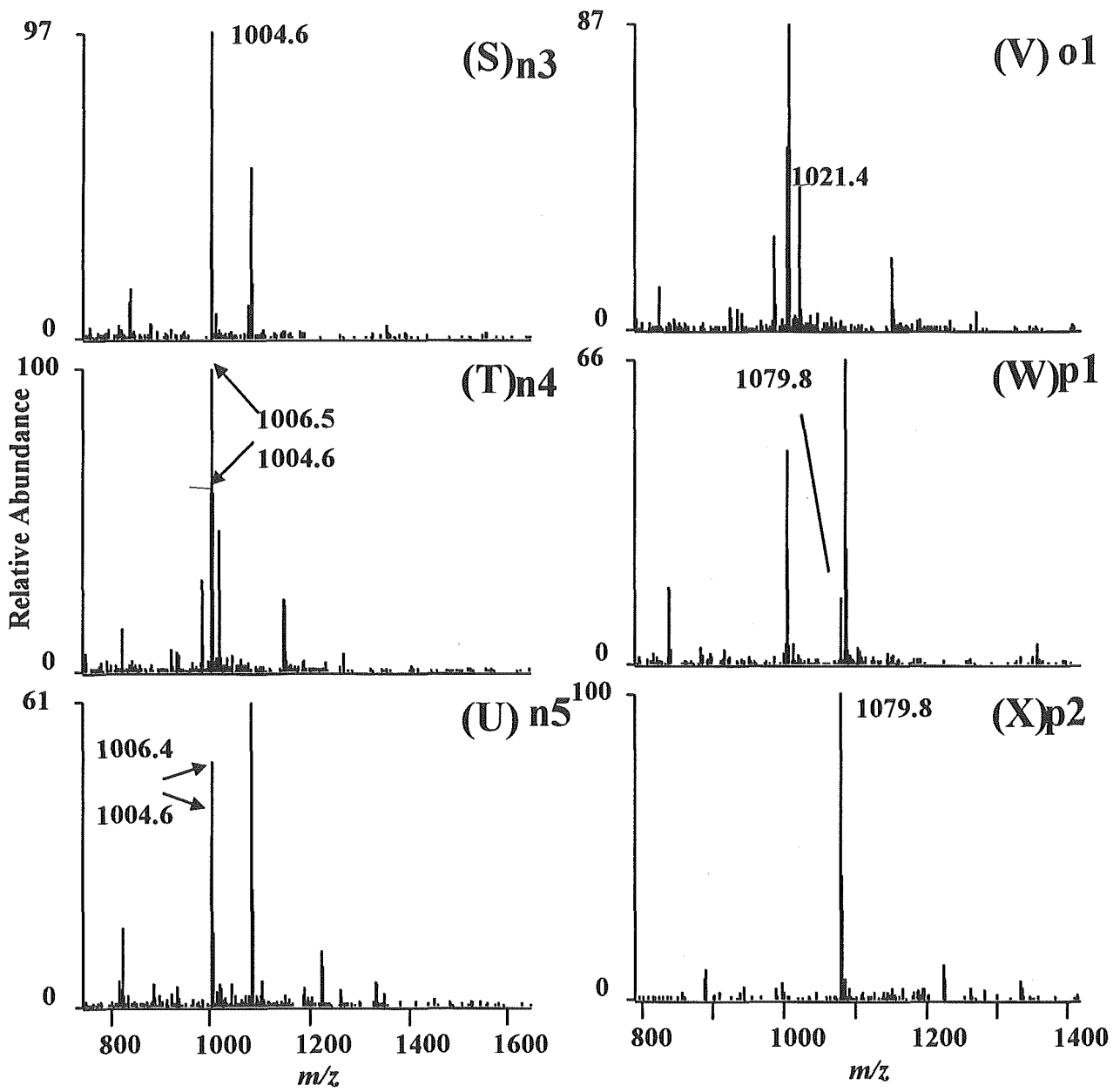


Fig. 8-4 つづき

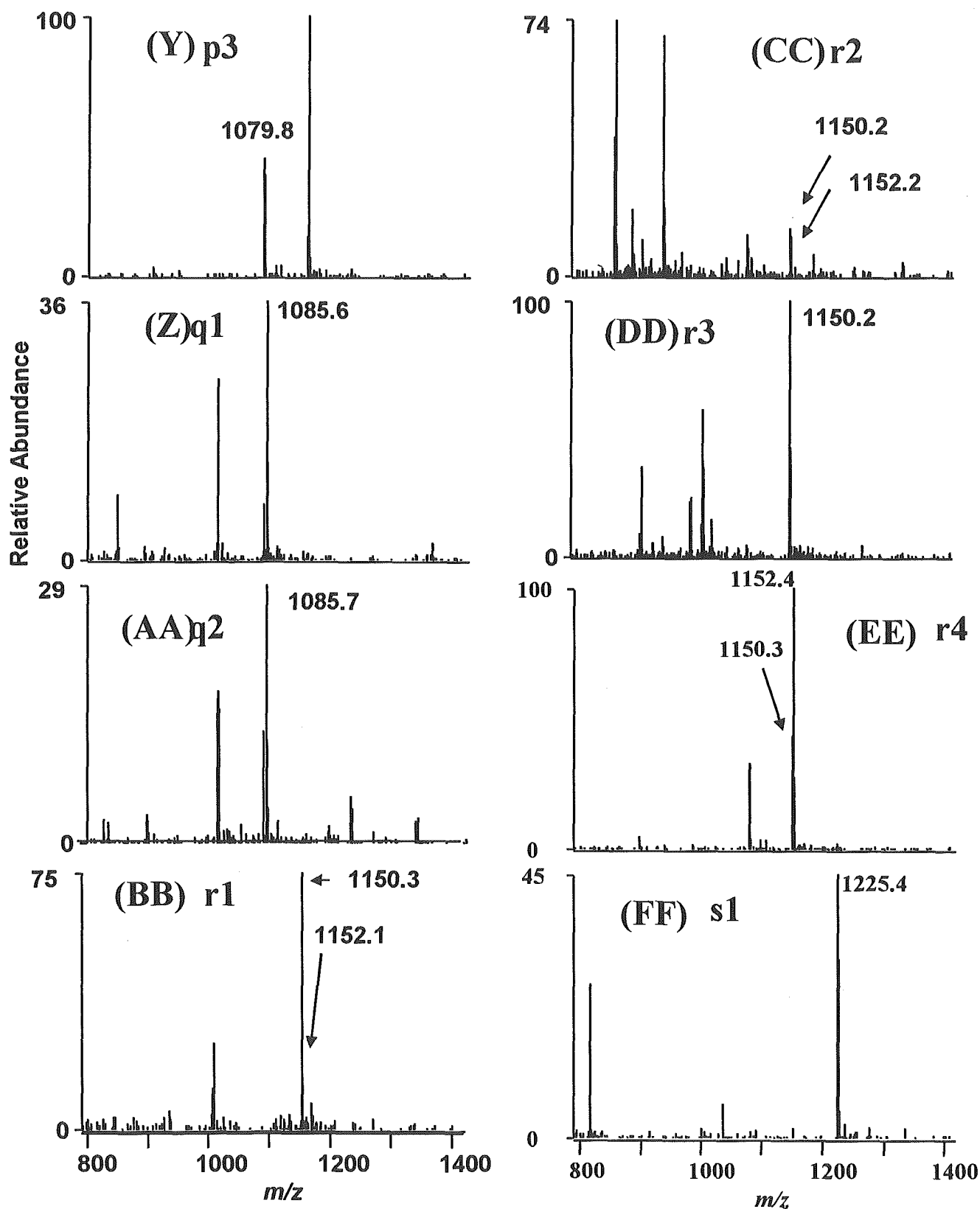


Fig. 8-5 つづき

Table 4 Fig. 7 で検出されたピーク a-s の帰属

Peak No.	Carbohydrate composition	Deduced structure	Theoretical mass (d ₀ PA-sugar)	Observed m/z		
				d ₀ -PA rhCG		d ₄ -PA hCG
				M ²⁻	M ³⁻	M ²⁻
a1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₃	Hybrid(1)	1517.5	757.5		759.5
b1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1		768.2	
c1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2449.3		816.7	
d1	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Mono(1)NA	1646.6			824.3
d2	[Hex] ₄ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Mono(1)NA	1646.6			824.0
e1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃	Hybrid(2)	1679.6	838.6		
f1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃	Hybrid(2)	1679.6			840.6
g1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄	Bi(1)	1720.7	858.9		
h1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄	Bi(1)	1720.7			861.2
i1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(1)NA	1807.7	902.9		
i2	[Hex] ₅ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(1)NA	1808.7			905.0
j1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄	FBi(1)	1866.8			934.0
k1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₄	Hybrid(3)	1882.8	940.2		
l1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₅	Bi(1)-GN	1924.9			962.7
m1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(2)NA	1970.8			986.8
m2	[Hex] ₆ [HexNAc] ₃ [NeuNAc] ₁	Hybrid(2)NA	1970.8			986.2
n1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.7		1006.7
n2	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1007.3
n3	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		
n4	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1006.5
n5	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Bi(1)NA	2011.9	1004.6		1006.4
o1	[Hex] ₇ [HexNAc] ₄	Hybrid(4)	2044.9	1021.4		
p1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
p2	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
p3	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	FBi(1)NA	2158.0			1079.8
q1	[Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Hybrid(3)NA	2174.0	1085.6		
q2	[Hex] ₆ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₁	Hybrid(3)NA	2174.0	1085.7		
r1	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.3		1152.1
r2	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.2		1152.2
r3	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.1		
r4	[Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	Bi(1)NA ₂	2303.1	1150.3		1152.4
s1	[Fuc] ₁ [Hex] ₅ [HexNAc] ₄ [NeuNAc] ₂	FBi(1)NA ₂	2449.3			1225.4

Hex: hexose, HexNAc: *N*-acetyl hexosamine, NeuNAc, NA: *N*-acetyl neuraminic acid, Fuc, F: fucose, mono: monoantennary, bi: biantennary, GN: bisecting GlcNAc