

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

課題番号		
KH11001	バイオフォトニクス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 …… 16
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 …… 21
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 …… 30
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 …… 40
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 …… 100
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 …… 126
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 …… 144
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 …… 154
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 …… 168
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 …… 181
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 …… 196
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 …… 208
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 …… 221
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 …… 235
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 …… 247
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 …… 262
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 …… 286
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 …… 300
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 …… 310
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 …… 318

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 …… 344
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 …… 358
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合 田 幸 広 …… 373
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 …… 390
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 …… 402
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ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉 里 勝 利 …… 417
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 …… 435
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的手法の開発に関する研究	斎 藤 嘉 朗 …… 449
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 …… 466
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 謙 …… 481
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 …… 494
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 …… 509
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 …… 525
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 …… 537
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 …… 551
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 …… 566
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 …… 576

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 MSやNMRなどの先端技術を用いたバイオ医薬品の製造、特性解析・品質（質量、一次構造、糖鎖、高次構造、不均一性及び生物学的性質）評価法及び安定性評価法の開発、並びに組織培養インフルエンザワクチンの開発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
村田 博, 名瀬義昭, 古賀明子
- (4) (財)化学及血清療法研究所菊池研究所
菅原敬信
- (5) 山之内製薬(株)創薬研究所 横田祥士
アステラス製薬(株)製剤研究所 山口秀人
- (6) 住友製薬(株)研究本部 秋丸仁郎
大日本住友製薬(株)研究本部 木村 徹
- (7) 協和発酵工業(株)東京研究所 内田和久
同バイオフロンティア研究所 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

ゲノム情報やバイオインフォマティクスなどの革新的創薬技術を活用した画期的な新規バイオ医薬品開発が進み、非常に多くの製品が上市されるようになってきた。しかしその一方で、バイオ医薬品の我が国の開発力の低下が指摘されており、特性解析・品質評価に必要な解析技術も欧米に依存しているのが現状である。世界的にバイオ医薬品の開発競争が激化する中で、日本の国際競争力を高めるため、あるいは、優れた医薬品を迅速に臨床の場に提供するためには、バイオ医薬品開発の初期段階から承認審査に至る開発全般に渡る迅速化・効率化、とりわけ、品質面における特性解析・評価技術の開発、規格及び試験法の国内整備、

並びに国際調和が望まれている。

本研究では、プロテオミクスの技術を中心とした最先端のタンパク質特性解析法を取り入れて、製造方法の効率化、特性解析・品質評価法及び安定性評価法の開発、並びに組織培養インフルエンザワクチンの開発に関する研究を行った。

B. 研究方法

(1) 試料及び試薬

試料：インスリン、インスリンリスプロ、インスリンアスパルト、インスリングルルギン及びアルギニンインスリン、ヒト型IgG抗体、ヒト化IgG抗体、ポリペプチド鎖と糖鎖が¹³Cおよび¹⁵N標識されたIgG抗体、各種グリコシダーゼ処理されたIgG、ゼブラフィッシュ胚由来糖鎖、ヒト正常及び脳腫瘍組織由来N結合型糖鎖、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)等；Cross-link 試薬：Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS³), Sulfo-DST, DGS及び Sulfo-EGS

(2) 装置

MS：四重極飛行時間型 (Qstar Puler i, Applied Biosystems), 三連四重極型 (API4000 system, Applied Biosystems), イオントラップ/FT型 (LTQ-Orbitrap, ThermoFisher), イオンモビリティ質量分析計 (Synapt, Waters)；NMR：ECA-920 (JEOL), Avance 600, DMX-500 (Bruker)；データベース：SwissProt；検索ソフト：Sequest (ThermoFisher), Mascot (Matrix Science)

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) 製造方法の効率化

1) 細胞選抜プロセスの効率化

従来のELISA法やProteinA法に代わる効率的抗体医薬品産生細胞選抜法として、迅速かつ簡便な時間分解蛍光測定と蛍光共鳴エネルギー移動を組み合わせたホモジニアスアッセイ法を検討し、良好な分析精度、添加回収率、及び相対標準偏差を示すことを確認した。また、従来法と本分析法によって4種類の組換えヒト抗体生産細胞培養上清中の抗体を測定したところ、同様な定量値が得られたことから、本法の有用性が示唆された。

2) 抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性の高い抗体医薬品の製造

IgG1重鎖のN結合型糖鎖のコアに結合しているフコース (Fuc) 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、ConAとLA-LCAレクチンクロマトグラフィーによりコアFucを含まない複合2本鎖型糖鎖を有する抗体画分を得ることに成功した。抗CD20抗体では、Fuc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、Fuc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・品質評価法の開発

1) 質量及び一次構造

MSによる質量測定、及びMS/MSとデータベース検索によってペプチドのアミノ酸配列を推定するプロテオミクスの技術は、バイオ医薬品の質量測定や、一次構造、修飾の有無、不純物及び類縁物質の確認などに利用できる可能性がある。しかし、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同一のスペクトルを得ることは難しく、検出すべきプロダクトイオンやそのピーク強度等の規格設定が課題である。本研究では、モデルペプチドを用いて、MS/MSにおいて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を確認した。さらに、

インスリン及びそのアナログのMSを行い、質量誤差0.5 Da (0.24~0.34 Da) 以内、分析精度 (6回測定) 8 ppm以下で質量を測定できること、また、MS/MSにより同一質量でアミノ酸配列が異なるインスリン及びインスリンリスプロを識別できることを確認した。MS及びMS/MSは特異性が高い確認試験法として利用可能であると思われる。

2) 糖鎖

① 遊離糖鎖

遊離糖鎖の解析法として、2-アミノ安息香酸で標識し、セロトニンアフィニティークロマトグラフィー及び順相分配HPLCで分離した後、MALDI-TOFMSで解析する方法、並びに、2-アミノピリジンで標識し、各種エキソグリコシダーゼによる逐次消化、陰イオン交換、順相分配、及び逆相HPLCによるマッピング及びMALDI-TOFMSで解析する方法を検討した。これらの方法は、様々な糖鎖の分離・構造解析が可能であり、糖鎖試験法としても有用であることが示唆された。

② 部位特異的糖鎖

糖タンパク質のLC/MS/MSによって得られたMS/MSスペクトルの中から、糖鎖特異的イオンを利用して糖ペプチドのマスマスペクトルを効率的に選び出し、糖鎖の不均一性、及び構造を解析する部位特異的糖鎖解析法を開発した。この技術を用いてビトロネクチンやセルロプラスミンなどの部位特異的糖鎖構造を明らかにした。

③ グリコフォーム

ADCC活性に影響を及ぼすFucの結合数が異なるグリコフォームを識別する方法として、非還元末端Galをβ-ガラクトシダーゼで除去して糖鎖を4種類に集約させ、Lys-C消化によりFabとFcに断片化し、MSで各グリコフォームの質量を測定する方法を開発した。得られた定量値と単糖組成分析の結果には整合性が認められ、グリコフォーム評価法として応用可能であることが確認された。

3) 高次構造

① NMRによる各グリコフォームの高次構造評価

抗体のFcを対象として、超高分解能スペクトル計測 (2D ¹H-¹³C HSQC, 2D ¹H-¹³C HSQC-TOCSY, 3D HCCH-COSY, 3D HCCH-TOCSY, 3D ¹³C-edited NOESY) を行い、糖鎖に由来するNMRシグナルを帰属した。さらに、各種グリコフォームのFcのNMRを行い、糖鎖の非還元末端側のGalやGlcNAcの除去は大きな構造変化を誘起しないが、Fuc-GlcNAcの2糖にまで短鎖化すると、Fcレセ

プターの結合部位であるヒンジ領域下流にまで構造変化が及ぶこと、また、FucがないFcのTyr296のNMRシグナルは顕著に広幅化していることが明らかとなった。このように、糖鎖構造がFcの立体構造や運動性に影響を及ぼすことが判明した。

② LC/MS及びcross-link試薬を用いた評価

CIFNをモデルタンパク質として、 α アミノ基と反応する各種cross-link修飾試薬を用いた立体構造確認を行い、分子内cross-linkや二量体・多量体の形成は修飾試薬のspacerの長さに依存すること、また、変性させたCIFNでは、分子内及び分子間cross-linkの形成率が低下し、特に分子内結合形成率が大きく低下することが明らかとなった。これらは、CIFNと各種cross-link修飾試薬の間に立体構造特異性があることや、分子内cross-linkは変性による立体構造変化に対して鋭敏であることを示しており、CIFNの立体構造の特徴をcross-link修飾試薬との反応性で定義できると考えられた。本法によって、タンパク質性医薬品の簡便且つ詳細な高次構造確認ができる可能性が示唆された。

③ H/D置換を用いた評価

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ー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。

④イオンモビリティを利用した評価

変性前後のCIFNのマスペクトルを測定し、変性前後で平均価数が、13価から10~11価に減少することが明らかとなった。また、変性後 m/z 1,990及び1,780付近のイオンのモビリティが相対的に小さくなっていることが判明した。これらの変化は変性により構造変化したことを示唆しており、高次構造変化を検出する簡単な方法として利用できる可能性が示唆された。

4) 不均一性

① 酸化体

製造中や保存中のMet残基等の酸化によって起きる構造変化の評価法として、疎水HPLCを検討した。ヒト型抗体及びその強制酸化体の疎水HPLCにおいて、酸化体と考えられるピークが観察されること、パパイン消化でFabとFcに切断することにより酸化体ピークの分離が向上し、強制酸化による変化はFcでしか認められないことが明らかになった。LC/MSの結果、酸化部位は主にFcに存在するMet256及びMet432残基であることが明らかになった。本分析法における酸化体含量の添加回収率は94%、また、相対標準偏差は0.6

~1.0%と良好であり、定量系として使用できることが示唆された。

② N末端ピログルタミン酸形成

多くの抗体医薬品のN末端はGlnかGluである。N末端がGlnの抗体はピログルタミン酸を形成していることが知られているが、Gluのピログルタミン酸形成は注目されていなかった。そこで、N末端のGluとピログルタミン酸を識別できるLC/MSを用いたペプチドマッピング法を確立して、熱加速処理中にGluからのピログルタミン酸形成が起きること、加熱温度が高いほどその割合が増加していること、また、この増加は緩衝液種や抗体によって異なることを明らかにした。

③ C末端Lys残基の欠失及び脱アミド体

陰イオン交換HPLCによりヒト化抗体の電荷的に異なる4種の類縁物質(C末端Lys欠失体、脱アミド体等)を単離精製した後、任意の割合で混合して還元体のLC/MSを行い、x軸に陰イオンHPLC結果から期待されるLys付加体の存在比を、y軸にLC/MSで得られた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及び真度が確認された。また、各類縁物質の電荷的な違いはLC/MSのイオン強度にほとんど影響しないことが示唆され、LC/MSによる類縁物質評価法は有用であると考えられた。

5) 生物学的性質

シグナル伝達に関係するリン酸化タンパク質の発現解析に基づく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の効率的な濃縮法及び同定法を検討した。その結果、チタニアカラム(Titansphere TiO₂)及び移動相としてLactic acid添加0.1% TFA / 80% CH₃CNを用いることによって、リン酸化ペプチドを選択的かつ高収率で回収できることを見出した。また、高感度なMS装置によるニュートラルロススキャンで得られたMS/MS/MSデータを用いてデータベース検索することにより、同定できるリン酸化ペプチドが増えることを確認した。

(3) 安定性評価法の開発

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。本研究では、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。分光学的手法及び熱分析法を用いて抗体の重合体量を調べたところ、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、示差走査型熱量(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。

(4) 組織培養インフルエンザワクチンの開発

現行のインフルエンザワクチンは発育鶏卵より生産しているが、ワクチンの製造に9ヶ月程度の時間を要すること、廃卵の処理に伴う環境負荷が大きいこと、残存する卵由来の不純物による副作用の心配があることなどの問題を抱えていることから、培養基材を MDCK 細胞へ変更することを検討した。MDCK 細胞がウイルスの増殖を阻害する物質を産生していることを見出し、このウイルス増殖阻害因子を除去した効率的な培養方法を考案した。さらに、得られたウイルスから HA を取得し、その性状を解析した結果、HA の物理化学的性質はほぼ理論値に近いものであることが確認された。また、マウスを用いた免疫原性の評価系を構築し、MDCK 細胞由来 HA 抗原と我国で製造されている4品目+海外メーカー1品目の卵由来スプリットワクチンの免疫原性を評価したところ、免疫原性に有意な差がないことが確認された。

D. 考察

製造方法の効率化に関する研究では、時間分解蛍光測定と蛍光共鳴エネルギー移動原理を用いた抗体生産細胞選抜法及びADCC活性の高い抗体医薬品の製造に関する研究を行った。本研究の成果は医薬品生産プロセス研究の効率化や有効性の高い医薬品開発に繋がるものである。

特性解析・品質評価法として、MS を用いた質量測定及び一次構造確認法に関する研究、並びに糖鎖解析法に関する研究を行った。MS 及び糖鎖試験法は現在、バイオ医薬品の品質試験法の中で

国内整備及び国際調和が最も期待されている分析法であり、本研究の成果は、試験法の国内標準化や国際調和、日局第16改正における参考情報としての収載に貢献するものである。また、本研究では、高次構造評価法、及び動物を用いない生物学的性質評価法の開発にも取り組んだ。特に、高次構造評価では様々な評価法を提案し、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た。今後、バイオ医薬品の品質保証や製剤の処方設計への適用が期待される。さらに、N末端やC末端の変化及び酸化に起因するバイオ医薬品の不均一性を評価する系の確立にも成功した。これらの不均一性は、活性や抗原性に影響を与える可能性があるため、保存中の変化(安定性)の評価、並びに規格及び試験法の設定にも役立つものと思われる。

安定性評価に関する研究では、分光学的手法及び熱分析法を検討した。これらの方法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で効率的に選択する方法として有用であることがわかった。

組織培養インフルエンザウイルスの製造に関する研究を実施し、現行の卵由来ワクチンと同等の免疫原性を有する HA 抗原を大量に得ることに成功した。今後、より精度の高い品質評価法を構築し、恒常的生産につなげたい。

E. 結論

MS や NMR などの先端技術を用いたバイオ医薬品の製造、特性・品質(質量、一次構造、糖鎖、高次構造、不均一性、生物学的性質)評価法及び安定性評価法の開発、並びに組織培養インフルエンザワクチンの開発に関する研究を行った。本研究の成果は、バイオ医薬品の製造、特性解析/品質評価、規格及び試験法の設定、及び品質管理に役立つものであり、承認申請/審査の迅速化・効率化、試験法の国内標準化、日局整備、ガイドライン作成、及び国際調和などに貢献するものである。

協力研究者 原園 景 (国立医薬品食品衛生研究所)、中川泰志郎、津村治彦、井浦貴文、山崎勝由 (キリンビール(株)医薬カンパニー)、寺田 勇、下山敦子 (中外製薬(株))、西山清人、野内俊伸、来海和彦、牧角啓一、恩智達文、遠藤昌文、副島見事 ((財)化学及血清療法研究所)、平倉 穰、北村 聡、村田芳美、林 慎介 (アステラス製薬(株))、左海順(大日本住友製薬(株))、斎藤誠嗣 (協和発酵工業(株))、長束俊治 (阪大理)、木下充弘 (近大薬)、山口芳樹 (名市大薬)

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawasaki, N., Itoh, S., and Kawanishi, T.: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8, Elsevier, in press
2. Kawasaki, N., Itoh, S., and Yamaguchi, T.: LC/MSⁿ for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
3. Kawasaki, N., Itoh, S., and Yamaguchi, T.: LC/MS of oligosaccharides, *Glycoscience Lab. Manual.*, Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
4. Baba, M., Ma, B. Y., Nonaka, M., Matsuishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N., and Kawasaki, T.: Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion, *J Leukoc Biol*, in press
5. Murakami, T., Natsuka, S., Nakakita, S., and Hase, S.: Structure Determination of a Sulfated N-Glycans, Candidate for a Precursor of the Selectin Ligand in Bovine Lung, *Glycoconj. J.*, 2007 in press.
6. Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S. and Ikenaka, K.: Developmental Changes in the Expression of Glycogenes and the Content of N-glycans in the Mouse Cerebral Cortex, *Glycobiology.*, 2007 in press.
7. Murakami, T., Natsuka, S., Nakakita, S., and Hase, S.: Structure Determination of a Sulfated N-Glycans, Candidate for a Precursor of the Selectin Ligand in Bovine Lung, *Glycoconj. J.*, 2007 in press.
8. Yanagida, K., Natsuka S., and Hase, S.: Structural Diversity of Cytosolic Free Oligosaccharides in the Human Hepatoma Cell Line, HepG2, *Glycobiology*, **16**, 294-304 (2006)
9. Ishimizu, T., and Hase, S.: Endo- β -mannosidase, a Plant Enzyme Acting on N-Glycans, *TIGG*, **18(99)**, 39-47 (2006)
10. Naka R., Kamoda S., Ishizuka A., Kinoshita M., and Kakehi K.: Analysis of total N-glycans in cell membrane fractions of cancer cells using a combination of serotonin affinity chromatography and normal phase chromatography, *Proteome Res.*, **5(1)**, 88-97 (2006)
11. Naka, R., Kamoda, S., Ishizuka, A., Kinoshita, M., and Kakehi, K.: 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)
12. Holland, M., Yagi, H., Takahashi, N., Kato, K., Savage, C., Goodall, M., and Jefferis, R.: Differential glycosylation of polyclonal IgG, IgG-Fc and IgG-Fab isolated from the sera of patients with ANCA-associated systemic vasculitis, *Biochim. Biophys. Acta. -General Subjects* **1760**, 669-677 (2006)
13. Matsumiya, S., Yamaguchi, Y., Saito, J., Nagano, M., Sasaki, H., Otaki, S., Satoh, M., Shitara, K., and Kato, K.: Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human Immunoglobulin G1, *J. Mol. Biol.* (2007) in press

他 57 報

2. 学会発表

- 1) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 松石 紫, 川西 徹: LC/MSⁿ を用いた部位特異的糖鎖構造解析. 第 6 回日本蛋白質科学年会 (2006, 4) 京都
- 2) 馬場亮人, Ma Bruce Yong, 松石 紫, 川崎ナナ, 平野真, 川寄伸子, 川寄敏祐: レクチン jacalin による CD54 を介した T 細胞の活性化に関する研究. 第 26 回日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 3) 原園 景, 川崎ナナ, 橋井則貴, 伊藤さつき, 中島 紫, 山口照英: 質量分析を用いたペプチド性医薬品の確認試験法の基礎的検討. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
- 4) 橋井則貴, 川崎ナナ, 豊田雅士, 片桐洋子, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 梅澤明弘, 山口照英: 細胞治療薬の品質評価に関する研究: nanoLC/FTMS による細胞膜の N-グリコリルノイラミン酸の定量. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
- 5) 石水毅, 橋本周子, 佐々木明子, 武田亮, 長谷純宏: 植物液胞酵素エンド- β -マンノシダーゼの構造と機能. 日本糖質学会年会 (2006, 8, 23-25) 仙台
- 6) 長東俊治, 廣畑有紀子, 長島友美, 長谷純宏: 系統発生における N-結合型糖鎖の構造比較. 農芸化学会大会 (2007, 3, 25) 東京
- 7) 大橋貴生, 石水毅, 秋田一雅, 長谷純宏: タンパク質複合体としてのペクチン合成酵素の同定. 第 2 回シンポジウム「植物プロテオーム研究の最前線」(2006, 11, 17) つくば
- 8) 橋本有樹, 石塚 文, 木下充弘, 掛樋一晃, 片岡和夫: ヒト脳組織中糖鎖の網羅解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
- 9) 山田佳太, 兵頭里美, 木下充弘, 掛樋一晃, 米沢 傑, 中田 博: 癌細胞のムチン型糖鎖の解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
- 10) 橋本有樹, 石塚 文, 木下充弘, 掛樋一晃, 片岡和夫: 脳腫瘍組織の N 結合型糖鎖の構造解析. 第 127 回日本薬学会年会 (2007, 3, 28-30) 富山
- 11) 神谷由紀子, 塚越晴子, 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, 市川瑠子, 河崎徳人, 山本一夫, 加藤晃一: カーゴレセプターによる糖タンパク質の小胞輸送を制御する分子間相互作用の構造的基盤. 第 6 回日本蛋白質科学会 (2006, 4, 26) 京都
- 12) 山口芳樹: 安定同位体利用 NMR 法による糖タンパク質の高次構造解析. GlycoTOKYO 2006 シンポジウム (2006, 8, 31) 横浜
- 13) 大野恵里菜, 矢木宏和, 山口芳樹, 加藤晃一: O 結合型糖鎖の構造解析のための HPLC マップの構築. 平成 18 年度日本薬学会東海支部例会 (2006, 12, 2) 名古屋

他 124 件

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
- 1) プロテアーゼ阻害活性を有する新規ポリペプチド
発明者: 西山清人, 福島見事, 野内俊伸, 菅原敬信
特許出願人: 財団法人化学及血清療法研究所
出願日: 平成 17 年 6 月 24 日
出願番号: 特願 2005-184500
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19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