

Sanda T, Okamoto T, Uchida Y, Nakagawa H, Iida S, Kayukawa S, Suzuki T, Oshizawa T, Suzuki T, Miyata N, Ueda R. Proteome analyses of the growth inhibitory effects of NCH-51, a novel histone deacetylase inhibitor, on lymphoid malignant cells. *Leukemia*. 21:2344-2353, 2007.

Kanayasu-Toyoda, T., Suzuki, T., Oshizawa, T., Uchida, E., Hayakawa, T., Yamaguchi, T. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the translocation of protein kinase C α in neutrophilic differentiation cells. *J. Cell Physiol.*, 211: 189-196, 2007.

2. 学会発表

田邊思帆里, 鈴木孝昌, 山口照英, 鈴木和博, 佐藤陽治: 細胞治療薬応用を目的とした骨髓由来間葉系幹細胞のゲノムプロファイリング

日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会(2007年5月)

鈴木孝昌 生殖細胞特異的変異原物質は存在するか? ～トランスジェニックマウスを用いた突然変異試験結果より～
第34回日本トキシコロジー学会(2007年6月)

Y. Luan, T. Suzuki, M. Honma, J. Ren Application of SNP and CGH arrays for Chromosome analysis.

International Congress on Toxicology (2007年7月)

T. Suzuki, Y. Luan, D. Prabha, M. Kogi, M. Honma, T. Koizumi, S. Tanabe, Y. Sato, K. Suzuki, and T. Yamaguchi CGH and SNP Arrays as New Tools for Detailed Analysis of Chromosome

The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations(2007年10月)

T. Suzuki, T. Koizumi, D. Prabha, M. Honma, S. Hamada, M. Nakajima, T. Watanabe, C. Furihata Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput Quantitative Real-time PCR analysis by the TaqMan Low Density Array

The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens(2007年11月)

C. Furihata, T. Watanabe, A. Tadakuma, M. Sakurai, T. Suzuki, S. Hamada, K. Narumi, M. Nakajima, A. Koeda, T. Sakuma, K. Oshida, H. Sanada, M. Hirayama Collaborative study of JEMS/MMS/Toxicogenomics:

Quantitative real-time PCR analysis on mouse liver carcinogens.

The 1st Asian Conference on Environmental Mutagens(2007年11月)

田邊 思帆里, 佐藤 陽治, 鈴木 孝昌, 鈴木 和博, 山口 照英 遺伝子発現プロファイリングによる新規ヒト骨髓由来間葉系幹細胞継代培養時系列マーカー遺伝子の探索

BMB2007(第30回日本分子生物学会年

会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)
(2007 年 12 月)

押澤正、豊田淑江、内田恵理子、鈴木孝昌、
鈴木和博、山口照英 カルシウム結合タン
パク質 S100A8 は HL-60 細胞の好中球分化
において増殖・分化に重要な働きをする
BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年
会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)
(2007 年 12 月)

T Suzuki, T Suresh, K Ramesh, T
Oshizawa, K Suzuki Searching for the
hepatotoxicity-related makers in urinary
proteome by the nano-LC MS/MS and
original software “mzMore”
International Conference on Toxic
Exposure Related Biomarker, Genome
and Health Effects (2008 年 1 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1 異常を持つhMSC株での核型解析とCGH解析結果

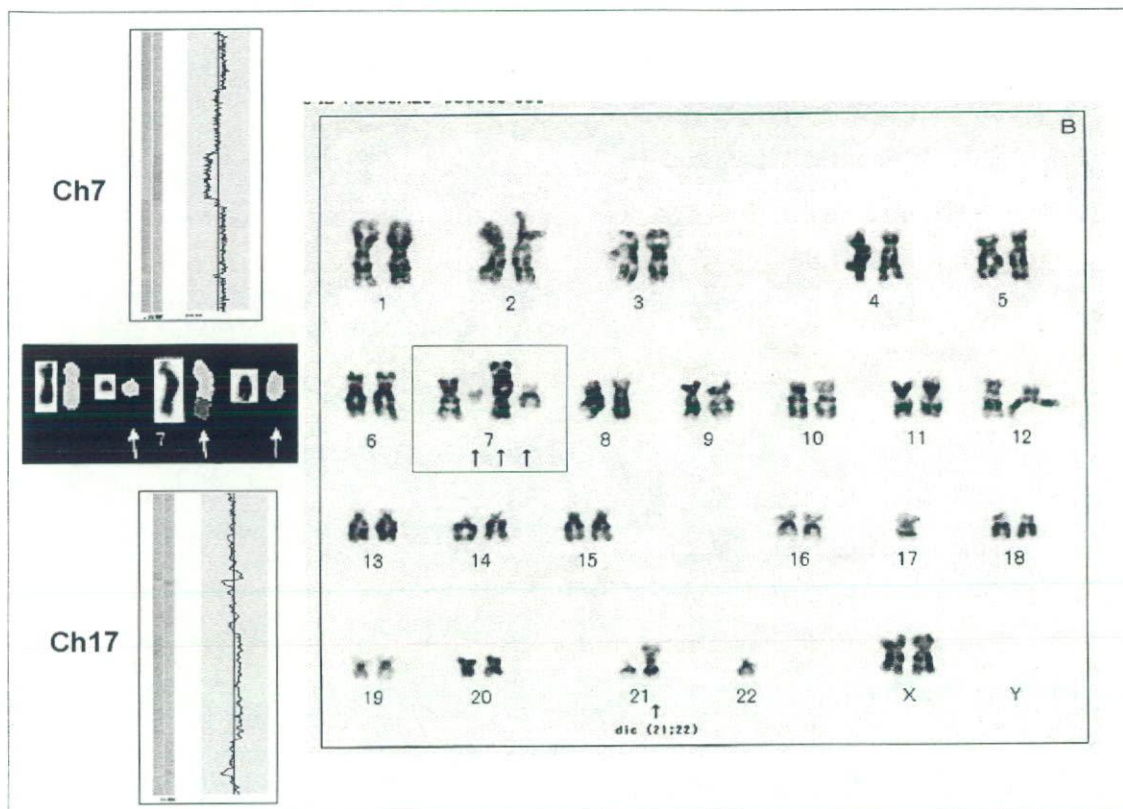


図2 Agilent CGH アレイを用いた 17 番染色体異常の確認

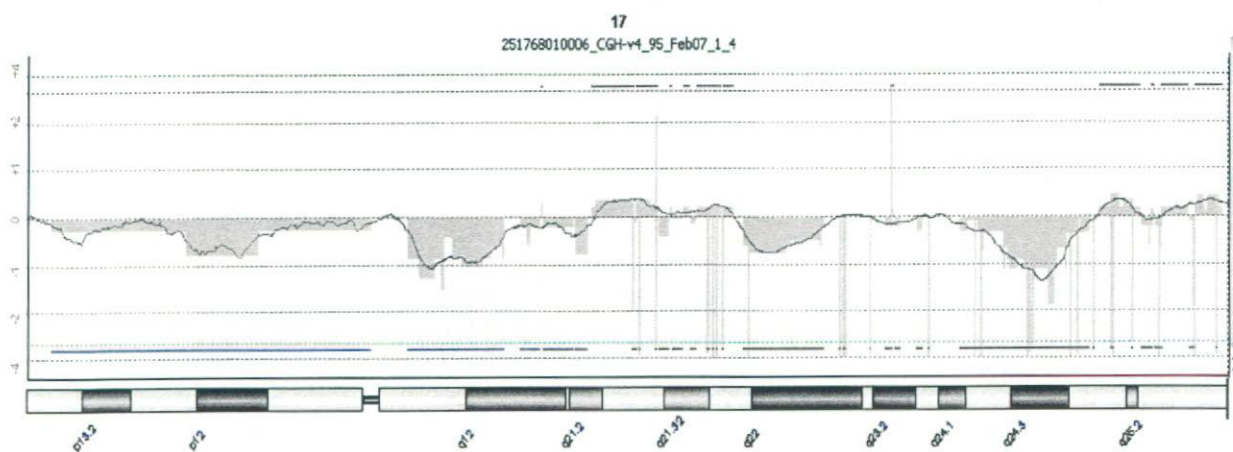
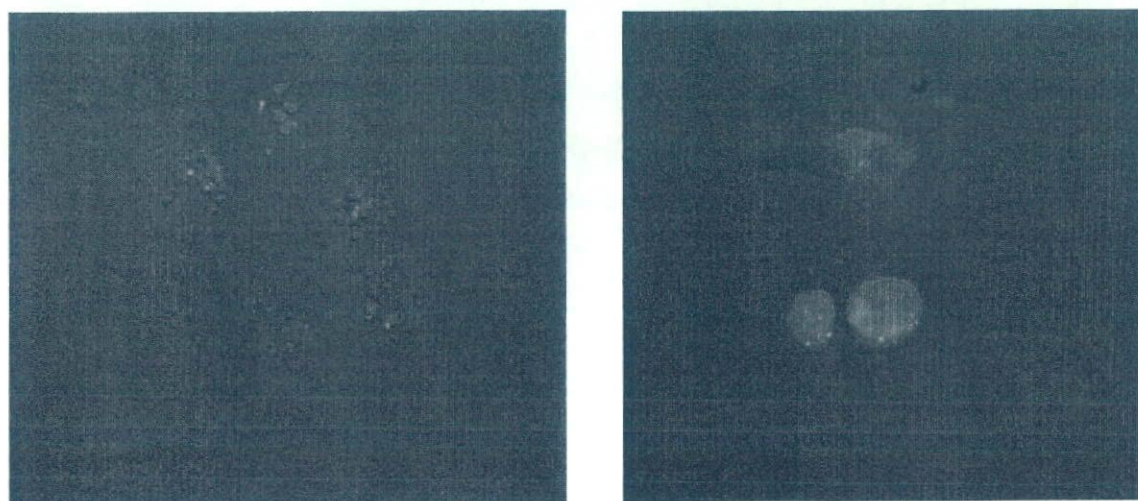


図3 HSMC細胞株の50K SNPチップによるCGH解析結果



図4 セントロメア FISH プローブによる異常 hMSC 細胞 (25 継代) の間期核染色



25 継代細胞における 7 番 (赤) 8 番染色体 (緑)
セントロメアプローブによる 2 重染色 FISH

25 継代細胞における 17 番染色体セントロメア
プローブ FISH

図5 12継代細胞の8番および17番染色体セントロメアプローブによる2重染色FISH

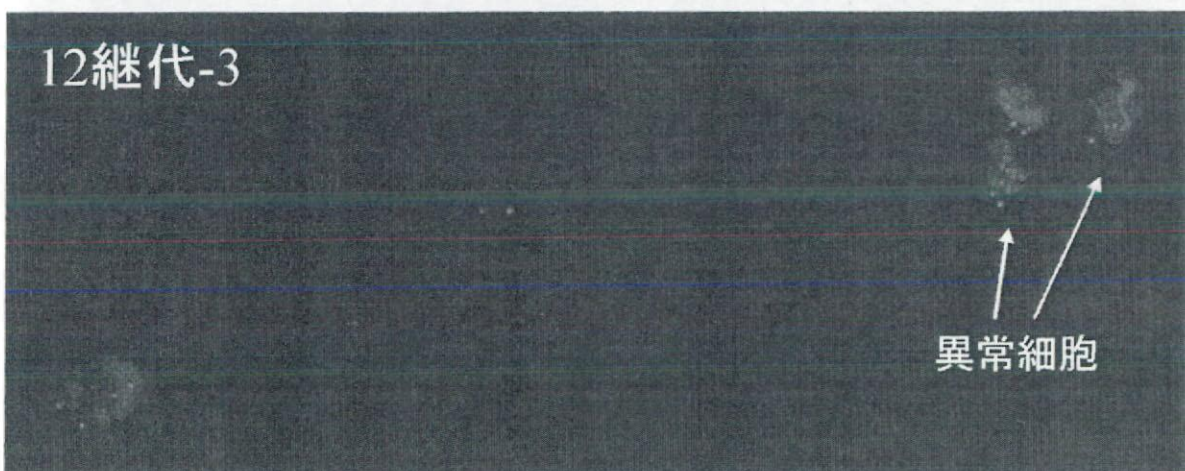
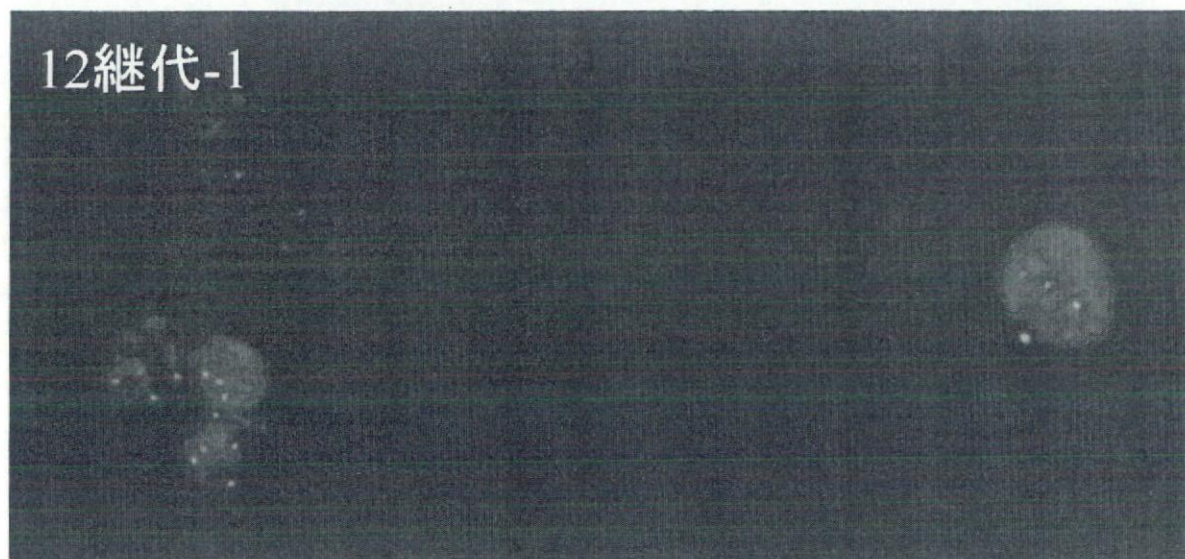


図6 21継代細胞の8番および17番染色体セントロメアプローブによる2重染色 FISH

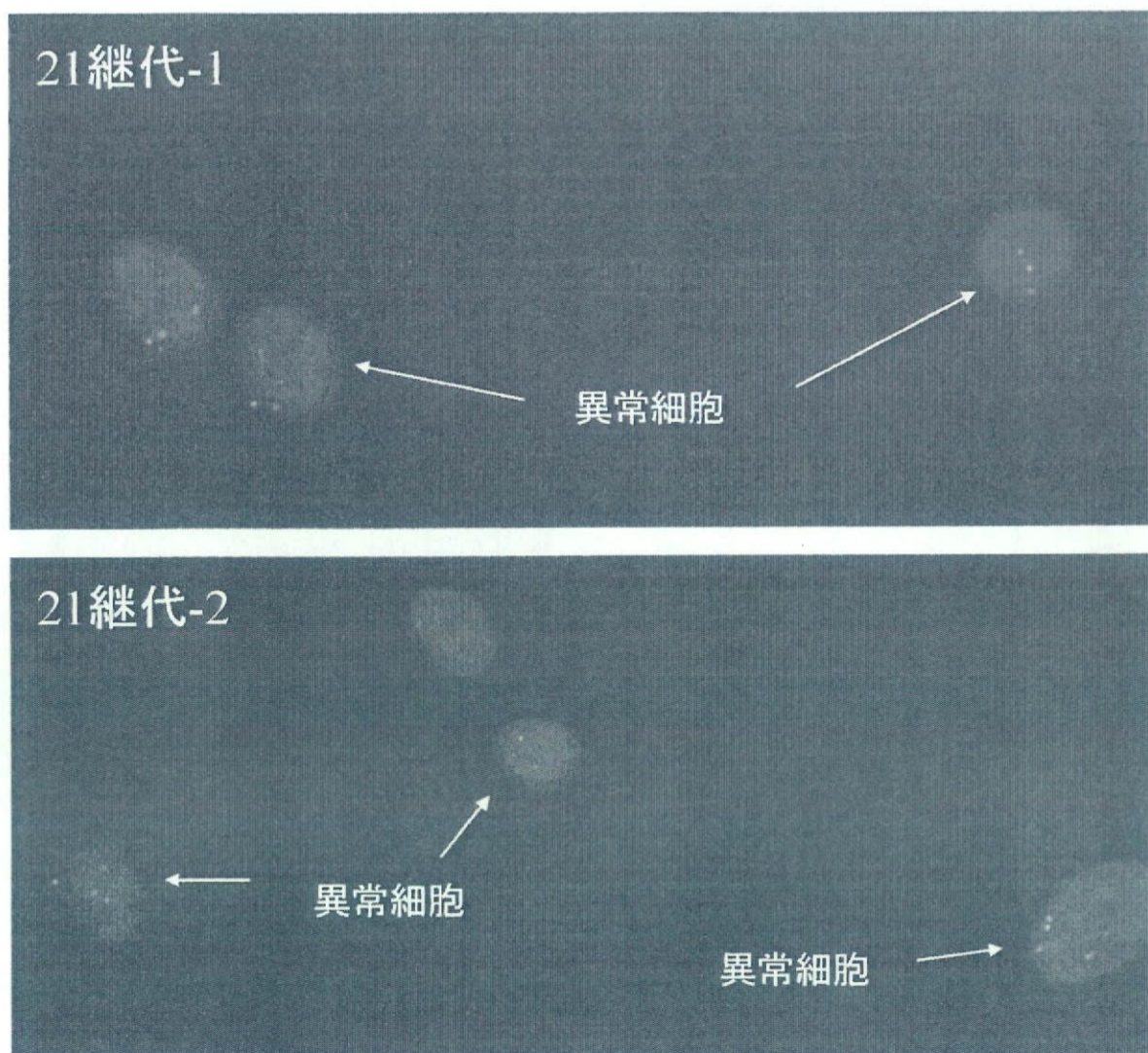


図7 hMSC 細胞各ロットの増殖曲線および異常ロットの異常出現頻度

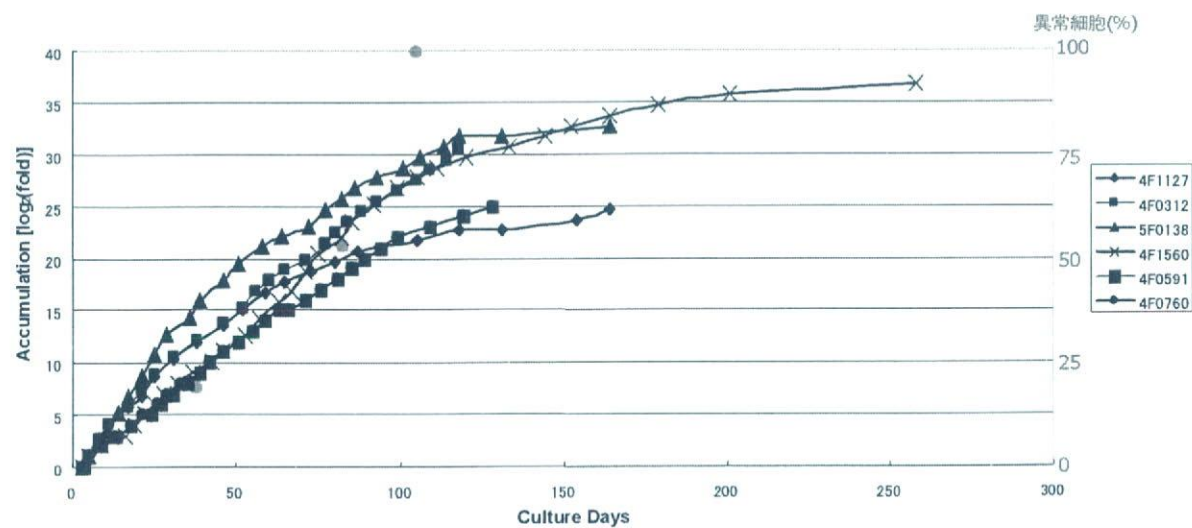


表 1 hMSC 細胞の培養過程における染色体変化の普遍性

Cell	hMSC							HSMM
Lot #	4F1127	4F0312		5F0138		4F1560		
Passage #	11	11	23	7	23	5	23	7
LOH	-	-	-	+	+	-	-	-
Copy Number Change	-	-	-	-	+	-	-	-

表 2 12 および 21 継代細胞における FISH シグナル数と異常頻度

シグナル個数		判定	細胞数	
Ch8	Ch17		12 継代	21 継代
1	2	正常	2	0
	3	異常	1	1
2	1	正常	1	0
	2	正常	75	41
	3	異常	11	33
	4	異常	5	13
	5	異常	0	4
	6	異常	0	1
3	2	正常	3	1
	3	正常	1	2
	4	正常	0	3
4	4	正常	1	0
	7	異常	0	1
合計		正常	83	47
		異常	17	53

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 糖鎖を指標とした細胞特性確認試験法の開発の一環として、フェニルヒドラジンの重水素置換体を標識試薬として用いる糖鎖の同位体標識法と液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を組み合わせた簡便、迅速かつ高精度な糖鎖比較定量法を開発した。さらに同分析法により培養条件の異なるモデルヒト細胞由来糖鎖の定量解析を行い、細胞特性確認試験法としての応用可能性が高いことを確認した。

A. 研究目的

細胞そのものを医薬品としてヒトに投与する細胞治療薬の開発が活発化している。本格的な実用化のために、細胞治療薬の特性解析及び品質評価技術の開発は急務である。しかし、細胞治療薬への応用が期待されているヒト胚性幹細胞 (ES 細胞)、ヒト間葉系幹細胞、さらには最近本邦において開発された人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの場合、特性解析等に利用できる細胞数は僅か 2×10^6 個程度とされており、分析技術の微量化は不可欠である。

近年、質量分析 (MS) 装置の高分解能・高感度化により、MS による細胞や組織に存在する微量糖鎖の分析が可能になりつつある。また、検出された糖鎖由来イオンの MS/MS や多段階 MS (MS^n) を行なうことによって、位置異性体の識別や、硫酸基やアセチル基等置換基の結合位置の特定が可能になってきた。特に、様々な特性をもつカラムを用いる液体クロマトグラフィーと組み合わせた LC/MS

は、多数の糖鎖の一斉分析が可能であり、最も利用されている糖鎖解析技術の一つである。我々はこれまでに、グラファイトカーボンカラムを用いる LC/MS による糖鎖プロファイリング法を開発し、糖タンパク質糖鎖や細胞由来糖鎖を解析してきた。昨年度は、細胞特性解析試験法としての糖鎖プロファイリング法の有用性を評価する目的で、異なる培養条件で培養したモデル細胞の糖鎖解析を行い、糖鎖プロファイリング法が細胞治療薬の特性解析法として利用できる可能性が高いことを示した。

しかし、LC/MS による糖鎖プロファイリングは MS の再現性に問題があり、定量的解析に利用することは難しいと言われている。この問題を解決するために、先に我々は、同位体標識した糖鎖標識試薬を利用した糖鎖標識法を用いる糖鎖の比較定量法を開発した。この方法は、糖鎖の標識法として最も汎用されている 2-アミノピリジン (2AP) を用いる方法である。2 種類の試料の一方を重水素標識

2AP で標識し、また、もう一方を重水素標識していない 2AP で標識し、両者を混合して LC/MS を行い、シグナル強度比から両糖鎖の比較定量を行なう方法である。しかし、2AP による糖鎖標識は、酢酸溶液中で加熱して行なうため、酸に弱いシアル酸が解離する可能性があった。昨年度報告したように、ヒト細胞には多くのシアリル糖鎖が存在するため、シアル酸が解離しない条件で糖鎖標識を行なう必要がある。そこで我々は中性付近で室温での糖鎖標識が可能なフェニルヒドラジン (PHN) に着目した。さらに PHN と糖鎖の反応によって得られるフェニルヒドラゾン糖鎖 (PHN 糖鎖) は、2AP による糖鎖標識のように還元操作を必要としないことから、操作が簡便であることが期待された。

本年度は、PHN の重水素置換体を糖鎖の同位体標識試薬として使用する簡便かつ高精度な糖鎖比較定量法の開発を検討した。本定量法ではサンプル 1 から切り出した糖鎖を重水素置換体 (d_5 -PHN) で標識して d_5 -PHN 糖鎖とし、サンプル 2 から切り出した糖鎖を重水素未標識 PHN (d_0 -PHN) で標識して d_0 -PHN 糖鎖とした (Fig. 1)。等量のタンパク質から調製した d_0 -PHN 及び d_5 -PHN 糖鎖を混合して LC/MS を行ない、両糖鎖のシグナル強度を比較することによって、サンプル間の糖鎖存在比を比較した。さらにこの糖鎖比較定量法を用いて異なる培地で培養したモデル細胞由来糖鎖の差異解析を行い、細胞特性解析法としての有用性を検討した。

B. 研究方法

1) 細胞及び試薬

Rapid Growth HL-60 細胞 (HL-60RG, ヒト前骨髄性白血病細胞) はセルバンク (JCRB,

Osaka, Japan) より供与された。PHN 及び重水素標識 PHN (d_5 -PHN) は、Sigma (Mo, USA) 及び大塚製薬 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。ウシ胎仔血清及びヒト血清は大日本住友製薬株式会社 (Japan) より購入した。RPMI1640 培地 (Sigma) 及び ASF104 培地は Sigma 及び味の素 (Tokyo, Japan) より購入した。標準ジシアリル 2 本鎖糖鎖 (A2F Glycan) 及び高マンノース型糖鎖 (MAN-9) は Ludger (Oxford, UK) より購入した。N-アセチルガラクトサミンは Sigma から購入した。

2) 細胞培養

HL-60RG 細胞は 10%FCS, ペニシリン (100unit/ml), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) 添加 RPMI1640 培地で培養した (5%CO₂, 37°C)。セミコンフルエントまで培養した後、その約 2×10^5 個ずつの細胞をウシ血清及びヒト血清 RPMI1640 培地、及び無血清 ASF104 培地を用いてそれぞれ培養した。培地交換を 4 回行った後に、セミコンフルエントまで細胞を培養した。回収した細胞をプロテアーゼインヒビター (protease inhibitor mix DMSO solution, Wako, Japan) 添加 PBS で 3 回洗浄した。

3) 膜画分の調製

洗浄済み細胞 (1×10^7 個) をプロテアーゼインヒビター添加 0.25 M ショ糖 / 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させ、4°C で 30 秒間の超音波処理 (40W, 2 回) を行った。核を遠心分離 (4°C, 600 $\times$ g, 10 分) により除去した後、細胞膜画分を超遠心分離 (4°C, 100,000 $\times$ g, 60 分) により沈殿させた。膜画分は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させて、超音波処理及

び超遠心分離を行いシヨ糖を除去した。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac により除去した。

4) 膜タンパク質の還元アルキル化及び糖鎖の切り出し

1×10^7 個の HL-60RG 細胞をプロテアーゼインヒビター添加 0.25 M シヨ糖/10 mM Tris-HCl 緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させ、4°C で 30 秒間の超音波処理 (40W, 2 回) を行った。核を遠心分離 (4°C, 600 $\times$ g, 10 分) により除去した後、超遠心分離 (4°C, 100,000 $\times$ g, 60 分) により細胞膜を含む画分を沈殿させた。沈殿物は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 μ l, pH 7.4) に懸濁させて、超音波処理及び超遠心分離を行いシヨ糖を除去した。得られた沈殿に残存する酢酸アンモニウムは Speed Vac により除去した。乾燥させた沈殿物を 500 μ l の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた。この溶液に 20 μ l の 1M dithiothreitol (DTT, Sigma, 終末 40 mM) を加えて 65 °C で 30 分間、遮光下で加熱し、タンパク質を還元した。次いで、48 μ l の 1 M モノヨード酢酸ナトリウム (終末 96 mM) を加えて室温、暗所で 40 分間反応させて、システイン残基のチオール基をカルボキシメチル化した。シスチン溶液 (終末 40 mM) を加えて反応を停止させ、反応溶液の 5 倍量の H₂O で希釈した。pH が 7.0 付近であることを確認した後、10 unit の Peptide-N-glycosidase F (PNGase F, Roche, Germany) を加えて、37°C で 4 日間反応させて、N-結合型糖鎖を切り出した。反応溶液に、冷エタノール (終末 70%) を加えて、-20°C で 2 時間インキュベートした後、遠心分離 (4°C, 8,500 $\times$ g, 15 分) によりタンパク質

を沈殿させた。遊離した N-結合型糖鎖を含む上清を、Speed Vac により乾燥させた。残渣を H₂O に再溶解させた後、溶液中の糖鎖を ENVI Carb C カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて精製した。

5) 糖鎖の PHN 標識

1×10^7 個の HL-60RG 細胞由来 N-結合型糖鎖を、1.5 ml のガラスチューブに移し、Speed Vac. を用いて乾燥させた後、45 μ l の反応溶媒を加えて、糖鎖を完全に溶解した。反応溶媒として、有機塩基 (室素複素環またはアルキルアミン)、酢酸及び H₂O の混合溶液を使用した。反応溶液に 5 μ l の PHN を加えて、室温または 80°C でインキュベートし、PHN 糖鎖を調製した。反応終了後、反応液を 0.1% ギ酸溶液を用いて 25 倍に希釈して、試料溶液とした (8×10^4 個細胞/ μ l)。

6) LC/MS

nanoLC は NanoFrontier nLC (HITACHI, Japan) を使用し、カラムはグラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 0.075 $\times$ 150mm, 5 μ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6, A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。PHN 糖鎖は流速 200 nl, 2-90%B 緩衝液 (60 分) のグラジエント条件で溶出した。MS 装置はナノエレクトロスプレー (nanoESI) イオン源 (AMR, Tokyo, Japan) を接続したイオントラップ型 MS-イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (ITMS-FTICRMS) 装置 (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を使用し、ポジティブイオンモードで測定した。キャピラリー

温度は 275°C, スプレー電圧は 2.5kV, スキャン範囲は m/z 700-2,000 に設定した。MSⁿ の衝突エネルギー(コリジョンエネルギー)は 35% に設定した。一回に 5 μ l (4×10^5 個細胞) の試料溶液を LC/MS に注入した。

C. 結果

1) 安定同位体標識法及び LC/MS による糖鎖の比較定量法

これまでに報告された PHN による糖鎖標識法では, H₂O, リン酸溶液, 及び 10-20% の有機溶媒 (メタノール又はアセトニトリル) 含有水溶液が反応溶媒として使用されている。しかし, その標識効率は詳細に検討されていない。そこでまず, 従来法による糖鎖の標識効率を検討したところ, いずれの溶媒を用いても加熱しなければ 90% 以上の標識効率が得られないことが明らかとなった。しかし, 細胞又は組織由来糖鎖は, シアル酸が付加しているため, 加熱処理はなるべく避けることが望ましい。次に, 中性付近で加熱せずに標識可能な標識条件を検討した。その結果, 有機塩基, 酢酸及び H₂O の混合液を用いることによって中性条件下, 室温で, 90%以上の収率で PHN 糖鎖が得られることが明らかとなった。そこで本研究では, PHN と糖鎖の反応はすべて有機塩基/酢酸/H₂O の混合液中で行なった。

Fig. 2A は, 標準ジシアリル 2 本鎖糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2368.837 Da) を d₅-PHN 及び d₀-PHN で標識して, 等量混合物の LC/MS により得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) である。Fig. 2B には

41.65 分に検出されたピーク (peak A) のマスペクトルを示した。同位体イオンの間隔が 0.5 マスユニットであることから, 2 価イオンであることが確認できた。d₀-PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2458.895 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンが m/z 1230.51 であり, また d₅-PHN 糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2463.935 Da) のモノアイソトピック 2 価イオンは m/z 1233.01 に観測された。尚, m/z 1230.5 と 1233.0 のシグナル強度が 1:1 ではないのは, d₅-PHN の純度 (57%) が原因である。Fig. 2C 及び 2D は d₀-PHN 糖鎖及び d₅-PHN 糖鎖の分子イオン $[M + 2H]^+$ (m/z 1230.5 及び m/z 1233.0) のマスキングクロマトグラムである。Fig. 3 は d₀-PHN 糖鎖の MS/MS スペクトルである。最も強く検出された m/z 657 は, シアル酸 (NeuAc), ガラクトース (Gal) 及び N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) からなる B₃⁺イオンである。NeuAc-Gal-GlcNAc が解離した分子に相当する Y₄⁺イオン, 及び Y₄⁺イオンから 1 分子の NeuAc が解離した B₆⁺/Y₄⁺イオンは, それぞれ m/z 1804 及び m/z 1347 に検出された。一方, Y₁⁺イオンに相当する m/z 458 が検出されたことから, 還元末端 GlcNAc にフコース (Fuc) が付加していることが確認された。これらの結果から, d₅-PHN を用いる糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせることで d₀-PHN 及び d₅-PHN 糖鎖のシグナル強度の比較による定量解析と, MS/MS による構造解析が可能であることが実証された。

以上のように, 本分析法は PHN の重水素置換体を標識試薬として使用することで, 還元操作をすることなく, 簡便かつ迅速に糖鎖の比較定量が可能であることが実証された。

2) 条件の異なる培地で培養した HL-60RG

細胞膜面分の比較定量解析

再生医療における課題の一つとして、培養に使用する血清の問題がある。そこで、我々はウシ胎仔血清 (FCS), ヒト血清 (HS) 添加培地, 及び無血清 (serum free) 培地で培養した細胞の膜面分から N-結合型糖鎖を調製し比較定量解析を行った。FCS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞由来糖鎖を d_0 -PHN で, HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖を d_5 -PHN でそれぞれ標識した (Fig. 4)。

2-1) FCS 及び HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の比較定量解析

Fig. 5 は, FCS 添加培地で培養した細胞から調製した d_0 -PHN 糖鎖, 及び HS 添加培地で培養した細胞から調製した d_5 -PHN 糖鎖の混合物の LC/MS により得られた TIC である。赤いラインはポジティブ, また青いラインはネガティブイオンモードで測定した結果である。糖鎖由来のイオンは, 矢印で示した約 35~50 分の位置に溶出されていた。また, 各糖鎖の構造は, MS/MS 及び MS/MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により推定した。

Fig. 6A は, ポジティブイオンモードで測定した高マンノース型糖鎖 ($\text{Hex}_{9,5}\text{HexNAc}_2$) のマスキロマトグラムである。約 35 分~42 分付近に Man-8, Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5 の順で溶出された。HS 添加培地で培養した細胞と比較して FCS 添加培地で培養した細胞では, 増 Man-9, Man-7, Man-6, Man-5(1) 及び Man-5 (2) 増加していることが明らかとなった。FCS 添加培地で培養した細胞の Man-5(1) は 1.97 倍に増加しており, 最も増加した糖鎖であった。また Man-9, Man-7, Man-6 及び Man-5 (2) も, 1.62, 1.72, 1.38 及び 1.52 倍にそれぞれ増加していた。一方, FCS

添加培地で培養した細胞の Man-8 は, HS 添加培地で培養した細胞の 79% に減少していることが明らかとなった (Fig. 6B)。

Fig. 7A は, ポジティブイオンモードで測定した側鎖が不完全な糖鎖 (低分子量糖鎖) のマスキロマトグラムである。低分子量糖鎖は約 38 分~42 分に溶出された。約 38 分に溶出された糖鎖は, 非還元末端にガラクトースが付加していない 2 本鎖糖鎖 (アガラクトシル糖鎖, $d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$) であった。41~42 分に溶出された糖鎖は, アガラクト糖鎖から 1 及び 2 分子の GlcNAc が欠損したパウチマンノース型糖鎖と呼ばれる糖鎖 ($d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$, $d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$), さらにトリマンノシルコアのマンノースが 1 分子欠損した糖鎖 ($d\text{Hex}_1\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2$) であった。FCS 添加培地で培養した細胞由来 $d\text{Hex}_1\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2$ は, HS 添加培地で培養した細胞の 1.04 倍であり, 変化はみられなかった。一方, FCS 添加培地で培養した細胞の $d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$, $d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$ 及び $d\text{Hex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$ は, HS 添加培地で培養した細胞の 1.90, 2.01 及び 1.64 倍に増加していた (Fig. 7B)。

Fig. 8A は, ポジティブイオンモードで測定した 2 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。約 35 分付近には, 還元末端の GlcNAc にフコース (コアフコース), 非還元末端に 2 分子のシアル酸, 1 分子の GlcNAc が付加した糖鎖 ($d\text{Hex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$) が溶出された。36 分付近には, コアフコース, 非還元末端に 1 または 2 分子のシアル酸が付加した糖鎖 ($d\text{Hex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_{1,2}$) が溶出された。37 分付近の糖鎖は, コアフコース, 非還元末端に 1 分子のシアル酸及び GlcNAc が付加した糖鎖 ($d\text{Hex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$) であった。

FCS 添加培地で培養した細胞由来の $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_2$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$ は、HS 添加培地で培養した細胞と比較して 1.09 倍で変化はみられなかった (Fig. 8B)。一方、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_2$ はそれぞれ 1.32 及び 1.59 倍に増加しており、FCS 添加培地で培養した細胞で増加していることが明らかとなった。

Fig. 9A は、ネガティブイオンモードで測定した 3 及び 4 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。糖鎖は 35~38 分付近に溶出されていることが明らかとなった。全ての糖鎖に、コアフコースが付加していた。35 分付近の糖鎖は、2 または 3 分子のシアル酸が付加した 3 本鎖糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$, $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_3$), 4 分子のシアル酸が付加した糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_6\text{NeuAc}_4(1,2)$), さらにテトラシアロ 4 本鎖糖鎖の非還元末端に 1 分子の HexNAc が付加した糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_7\text{NeuAc}_4$) であった。36~37 分付近に溶出された糖鎖は、3 分子のシアル酸が付加した 4 本鎖糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_6\text{NeuAc}_3$), 2~4 分子のシアル酸及び 1 分子のラクトサミンが付加した 4 本鎖糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_7\text{NeuAc}_4$), 及び 2~4 分子のシアル酸, 1 分子のラクトサミン, 1 分子の HexNAc が付加した 4 本鎖糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_8\text{NeuAc}_4$) であった。FCS 添加培地で培養した細胞の $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$ は、HS 添加培地で培養した細胞と比較して 1.12 倍に増加していたが、他の 3 及び 4 本鎖糖鎖は全て減少していた。特に最も高分岐化したと考えられる $\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_8\text{NeuAc}_4$ は、HS 添加培地で

培養した細胞由来糖鎖の 21% に減少していることが明らかとなった (Fig. 9B)。また 4 本鎖糖鎖は $\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_8\text{NeuAc}_2$ を除いて (FCS/HS = 0.77), いずれも 50% 以下に減少しており高分岐化した糖鎖は、FCS 添加培地で培養すると減少する、即ち HS 添加培地で高分岐糖鎖が増加することが明らかとなった。

FCS 及び HS 添加培地で培養した細胞膜糖鎖の比較定量解析の結果、FCS 添加培地で培養することによって、高マンノース型糖鎖、低分子量糖鎖及び 2 本鎖糖鎖は増加することが示唆された。一方、3 及び 4 本鎖糖鎖は減少することが示された (Fig. 10)。

2-2) 無血清培地で培養した細胞及び HS 添加培地で培養した細胞の比較定量解析

Fig. 11 は、無血清培地で培養した細胞及び HS 添加培地で培養した細胞からそれぞれ調製した d_0 -PHN 糖鎖及び d_5 -PHN 糖鎖の混合物の LC/MS により得られた TIC である。糖鎖由来のイオンは、矢印で示した約 35~50 分の位置に溶出されていた。また、各糖鎖の構造は、MS/MS 及び MS/MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により推定した。

Fig. 12A は高マンノース型糖鎖のマスキロマトグラムである。検出された糖鎖は、Man-9~Man-5 であり、いずれも d_0 -及び d_5 -PHN 糖鎖に共通して検出された。HS 添加培地で培養した細胞と比較して、無血清培地で培養した細胞で最も変化した高マンノース型糖鎖は Man-9 であり、2.43 倍に増加していた。また Man-7, Man-6 及び Man-5 (1,2) も、それぞれ 1.57, 1.76, 1.55 及び 1.54 倍に増加していた。一方、無血清培地で培養した細胞の Man-8 は、HS 添加培地で培養した細胞とほぼ等量であった (serum free / HS = 0.97) (Fig. 12 B)。

Fig. 13A は、低分子量糖鎖のマスキロマトグラムであり、アガラクト糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$)、アガラクト糖鎖から1分子の GlcNAc が欠損した糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$) 及び パウチマンノース型糖鎖 ($\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2$) が検出された。最も変化した糖鎖は $\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$ であり、無血清培地で培養した細胞で、HS 添加培地で培養した細胞の 3.06 倍に増加していた (Fig. 13B)。また $\text{dHex}_1\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$ も無血清培地で培養した細胞で、1.30、2.14 及び 2.22 倍にそれぞれ増加しており、血清を除いた培地で HL60-RG 細胞を培養すると低分子量糖鎖が増加することが示唆された。

Fig. 14A は、2 本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地及び HS 添加培地で培養した細胞に共通して $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_{1,2}$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$ が検出された。Fig. 14B に示したように、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{NeuAc}_{1,2}$ 及び $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$ は、無血清培地で培養した細胞でそれぞれ 98%、90% 及び 80% にそれぞれ減少していた。一方、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$ は、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の 1.92 倍に増加していることが明らかとなった。そこで、この糖鎖(糖鎖(a))の MS/MS スペクトルのフラグメントイオンの帰属により糖鎖構造を推定した。Fig. 15 は、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$ の MS/MS スペクトルである。 B_3^+ イオン (NeuAcHexHexNAc^+ , m/z 657) 及び、 B_2^+ イオン (NeuAcHex^+ , m/z 454) が検出されたことか

ら、シアル酸は Gal に結合していることが示唆された。また、 B_4^+ イオン ($\text{NeuAcHexHexNAcHex}^+$, m/z 819)、及び B_4^+ イオンに1分子の HexNAc が付加したフラグメントイオン (m/z 1022) から、この糖鎖はシアル酸が付加した側鎖にもう1分子 HexNAc が結合した糖鎖であり、バイセクテッド糖鎖(トリマンノシルコアの還元末端 Man に GlcNAc が付加した糖鎖)ではないことが明らかとなった。また dHexHexNAc-PHN^+ に相当する Y_1^+ イオンが m/z 458 に検出されたことから、還元末端の GlcNAc に Fuc が付加していることが明らかとなった。これらの結果から、この糖鎖は、Fig. 15 挿入図に示したように、非還元末端にシアル酸及び HexNAc が結合した側鎖を持ち、コアフコースが付加した2本鎖糖鎖、あるいは Hex-HexNAc の繰り返し構造の非還元末端にシアル酸が結合した側鎖とコアフコースを持つ2本鎖糖鎖であることが示唆された。無血清培地で培養した細胞由来の2本鎖糖鎖は、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_1$ のみ増加していたが、他の糖鎖はいずれも減少しており、無血清培地で培養した細胞由来糖鎖のプロファイルは血清添加培地で培養した細胞とは異なることが明らかとなった。

Fig. 16A は3及び4本鎖糖鎖のマスキロマトグラムである。無血清培地で培養した細胞由来の3及び4本鎖糖鎖は、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_2$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{NeuAc}_3$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_6\text{NeuAc}_3$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_6\text{NeuAc}_4(1,2)$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_7\text{NeuAc}_4$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_7\text{NeuAc}_{2,4}$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_8\text{NeuAc}_2$ 、 $\text{dHex}_1\text{Hex}_8\text{HexNAc}_8\text{NeuAc}_3(1,2)$ 、

dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄)であり、糖鎖の種類に HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖と違いはみられなかった。Fig. 16B に示したように、無血清培地で培養した細胞由来 dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₃ 及び dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₄ は、HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の僅か 32% 及び 36% であり、顕著に減少していることが明らかとなった。また Hex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2), dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄, dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc₄ 及び dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₃(1,2) も 50%~60% に減少しており、無血清培地で培養した細胞の 3 及び 4 本鎖糖鎖は、HS 添加培地で培養した細胞と比較していずれも減少していることが明らかとなった。このことから、無血清培地で HI-60RG を培養すると高分岐糖鎖が減少することが示唆された。

以上のように無血清培地及び HS 添加培地で培養した細胞膜糖鎖の比較定量解析の結果、高マンノース型糖鎖、低分子量糖鎖は、無血清添加培地で培養することによって増加することが明らかとなった(Fig.17)。一方複合型鎖糖鎖は dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁ を除き、無血清培地で培養すると減少し、HS 添加培地で培養すると増加することが明らかとなった。

D. 考察

昨年度は、分担研究者らが独自に開発した糖鎖プロファイリング法の細胞特性解析試験法としての有用性を評価する目的で、糖鎖プロファイリング法により、HS 添加培地、及び無血清培地で培養した HL60-RG 細胞から調製した還元化糖鎖の差異解析を行った。その

結果、無血清培地で培養すると Man-9 糖鎖が増加すること、及び複合型糖鎖のプロファイルが変化することを明らかにできることを示した。しかし還元した糖鎖を分析する方法では、サンプルを別々に分析することから、正確な量的比較をすることができなかった。以前に分担研究者らは、糖鎖の比較定量法として 2-AP の重水素置換体を用いた糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせた分析法を開発している。この定量法では酢酸中加熱して糖鎖を標識するために、シアル酸が解離してしまう恐れがあったので本年度は、中性溶液中での標識が可能な PHN の重水素置換体を糖鎖標識試薬として使用する比較定量法の開発を検討した。有機塩基、酢酸及び H₂O からなる反応溶媒を使用することにより、中性条件下、室温でシアル酸を解離させることなく糖鎖を標識することが可能であった。この標識法と LC/MS を組み合わせることで簡便かつ高精度な糖鎖の比較定量が可能となった。

さらに FCS, HS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞から切り出した糖鎖の比較定量解析に応用することで同定量法の細胞特性解析試験法としての有用性を検討した。その結果、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖、アガラクトシル糖鎖及び 2 本鎖糖鎖は、FCS 添加培地で培養した細胞に多いこと、一方 3 及び 4 本鎖糖鎖は HS 添加培地で培養した細胞に多いことが明らかになった。また無血清培地で培養した細胞及び HS 添加培地で培養した細胞由来糖鎖の比較定量解析の結果、無血清培地で培養した細胞は FCS 添加培地で培養した細胞と同様に、高マンノース型糖鎖、パウチマンノース型糖鎖及びアガラクト糖鎖が増加していることを明らかにした。これらの結果は、HS 添加培地で HL60-RG 細

胞を培養すると、FCS 添加培地及び無血清培地で培養した細胞と比較して、糖鎖の高分岐化が進むことを示すものと考えられる。

以上のことから、培養条件により生じた細胞変化は、糖鎖の変化として捉えることが可能であることが明らかとなった。さらに PHN の重水素置換体を使用する糖鎖標識法と LC/MS を組み合わせた比較定量法は細胞特性解析試験法として応用することができることが示唆された。

E. 結論

フェニルヒドラジンの重水素置換体を用いる同位体標識法と LC/MS を組み合わせた糖鎖の比較定量法を開発した。また本分析法を用いて培養条件の違いにより生じた細胞の変化は、糖鎖プロファイルの変化として表れることを確認することができた。以上のことからフェニルヒドラジンを用いる糖鎖の同位体標識法と LC/MS を組み合わせた分析法が簡便かつ高精度な糖鎖比較定量法として有用であること、また細胞特性確認試験法として利用可能であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Yukari Matsuishi, Masashi Toyoda, Yoko Katagiri, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Akihiro Umezawa, Teruhide Yamaguchi: Study on the quality control of cell therapy product: Determination of N-glycolylneuraminic acid incorporated

into human cells by nano-flow liquid chromatography/Furrier transformation ion cyclotron resonance mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1160, 263-269

- 2) Satsuki Itoh, Daisuke Takakura, Nana Kawasaki, Teruhide Yamaguchi: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis of a glycoprotein. The protein Protocols Hand-book. Third Edition. Published by Humana Press, USA. Edited by John Walker. In press
- 3) Yasuhiko Kizuka, Kyoko Kobayashi, Shinako Kakuda, Nakajima Yukari, Nana Kawasaki, Shougo Oka: Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein of non-sulfated HNK-1 epitope in mouse kidney, Glycobiology, in press
- 4) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MS of oligosaccharides. Glycoscience Lab. Manual., Ed. Naoyuki Taniguchi, in press
- 5) Nana Kwasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Daisuke Takakura, Teruhide Yamaguchi: Mass spectrometry for analysis of carbohydrate heterogeneity in characterization and evaluation of glycoprotein products. Trends in Glycosci. Glycotech. In press

- 6) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 原園 景, 橋井則貴, 山口照英: 液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いた糖タンパク質構造解析. 実験医学増刊号, 25, 1127-1136 (2007)
 - 7) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 抗体の LC/MS. 「抗体医薬品の最前線」105-115, 植田充美監修, シーエムシー (東京) 2007
 - 8) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 9 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 101-109 (2007)
 - 9) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 12 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 1603-1611 (2007)
 - 10) 内田恵理子, 川崎ナナ, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 15 回, *Pharm. Tech. Japan*, 23, 2187-2194 (2007)
 - 11) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 18 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 101-105 (2008)
 - 12) 川崎ナナ, 内田恵理子, 宮田直樹: 薬の名前. ステムを知れば薬がわかる. 第 21 回, *Pharm. Tech. Japan*, 24, 印刷中
 - 13) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 文部科学省特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能解析」(Functional GLycomics)研究成果公開発表シンポジウム「第 3 の生命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」(監修: 古川鋼一) 印刷中
 - 14) 川崎ナナ, 橋井則貴, 山口照英: 糖鎖異常の網羅的解析. 蛋白質核酸酵素増刊号「糖鎖情報の独自性と普遍性. 印刷中
 - 15) 川崎ナナ, 石井明子, 山口照英: 糖鎖と生物薬品. *Journal Applied Glycoscience*. 印刷中
2. 学会発表
 - 1) 川崎ナナ, 高倉大輔, 中島 紫, 橋井則貴, 伊藤さつき, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿ を用いた糖鎖抗原付加タンパク質の同定. 日本プロテオーム機構第 5 回大会 (2007. 7. 30-31) 東京
 - 2) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本 純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性. 第 27 回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3) 福岡
 - 3) 橋井則貴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 中島 紫, 原園 景, 山口照英: LC/MSⁿ による目的部分糖鎖構造を持つ糖タンパク質の特異的同定. 第 27 回日本糖質

- 学会 (2007. 8. 1-3)福岡
- 4) 佐野 琴音, 旭美穂, 浅沼公恵, 伊藤 さつき, 橋井則貴, 川崎ナナ, 安川然太, 佐藤ちひろ, 北島健, 小川温子: 組織再生に関わるマトリクス糖タンパク質の活性調節と修復過程における糖鎖変化. 第 27 回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 5) 楽 娜, 伊原友紀, 松下-及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 小川温子: ブタ膵臓 α -アミラーゼに対する十二指腸刷子縁膜糖タンパク質レセプターの探索. 第 27 回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 6) 野村和子, 林 康宏, 村田大輔, 永石貴之, 水口惣平, 出嶋克史, 福嶋宏史, 松石 紫, 川崎ナナ, 安藤恵子, 三谷昌平, 伊藤 信, 平林義雄, 野村一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明. 第 27 回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 7) 井上理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎ナナ, Bruce Youg MA, 川寄敏祐, 川寄伸子, : ヒト結腸ガン細胞上に発現するマンナン結合タンパク質 (MBP) の内在性糖鎖リガンド. 第 27 回日本糖質学会 (2007. 8. 1-3)福岡
 - 8) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 山口照英: 糖鎖と医薬品. 日本応用糖質科学会平成 19 年度大会 (2007. 8. 30)平塚
 - 9) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 原園 景, 中島 紫, 高倉大輔, 内田恵理子, 押澤 正, 山口照英: ヒトミエロペルオキシダーゼの部位特異的糖鎖構造解析. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 10) 片桐洋子, 佐藤 伴, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 鈴木佑典, 中島英規, 大喜多肇, 藤本 純一郎, 清河信敬: ヒト B 前駆細胞株に発現する CD10 の糖鎖の多様性と endopeptidase 活性. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 11) 中村里香, 手島玲子, 佐藤里絵, 中島紫, 川崎ナナ, 山口照英, 澤田純一, 名古屋博之 (養殖研): GM 遺伝子組換えアマゴの安全性研究—アレルゲン性について. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 12) 楽 娜, 伊原友紀, 松下-及川浩子, 中村公亮, 川崎ナナ, 白川 剛, 小川温子: 膵臓 α -アミラーゼに対する内在性レセプターの同定と糖鎖結合部位の予測. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15)横浜
 - 13) Kotone Sano, Miho Asahi, Kimie Asanuma, Maiko Yanagibashi, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Nana Kawasaki,

- Zenta Yasakawa, Chihiro Sata, Ken Kitajima, Haruko Ogawa: Mechanism of tissue remodeling regulation by the change in glycosylation and biological activity of extracellular matrix glycosylation. 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 14) 森田 一平, 角田 品子, 山本 修平, 鮫島 健彦, 川崎 ナナ, 川寄 敏祐, 岡 昌吾: 樹状突起スパイン形成における HNK-1 糖鎖機能に関する研究 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 15) 小林 恭子, 木塚 康彦, 川崎 ナナ, 角田 品子, 岡 昌吾: マウスの腎臓における非硫酸化型 HNK-1 糖鎖を発現する新規タンパク質の同定とその機能に関する研究 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 16) 水口 惣平, 野村 和子, 出嶋 克史, 泉川 友美, 江草 徳幸, 谷口 史恭, 田村 純一, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 北川 裕之, 菅原 一幸, 野村 一也: モデル生物 *C. elegans* を用いたヘパラン硫酸とコンドロイチンプロテオグリカンの生体内機能解析 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 17) 村田 大輔, 野村 和子, 水口 惣平, 出嶋 克史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 福島 慶子, 山下 克子, 中島 紫, 伊藤 さつき, 川崎 ナナ, 野村 一也: 線虫 *C. elegans* における GPI アンカーの機能解析 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 18) 野村 和子, 林 康広, 村田 大輔, 永石 貴之, 水口 惣平, 出嶋 克史, 福島 宏史, 安藤 恵子, 三谷 昌平, 中島 紫, 川崎 ナナ, 伊東 信, 平林 義雄, 野村 一也: 線虫におけるセラミドグルコシル転移酵素の機能解明 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 19) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎 ナナ, 川寄 伸子, 川寄 敏祐: Binding of MBP to Meprins Results in the Inhibition of the Proteolytic Activity of Meprins and the Initiation of the Complement Activation
- 20) 川寄 伸子, 井上 理抄, Kay-Hooi Khoo, 川崎 ナナ, Bruce Yong MA, 川寄 敏祐: ヒト結腸がん細胞より単離されたマンナン結合タンパク質リガンド糖タンパク質の性質 第 30 回日本分子生物学会年会第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007. 12, 11-15) 横浜
- 21) 橋井則貴, 川崎ナナ: シュードプロテオグリカンの検定と構造解析. 平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金政策創

薬総合研究推進事業研究成果発表会
「糖鎖の機能解明と医療への応用」お
茶の水女子大学糖鎖科学研究教育セン
ターシンポジウム(2007. 11. 21)東京

- 22) 川崎ナナ: LC/MSⁿ を用いた糖蛋白質の
特性解析大阪大学蛋白質研究所セミナ
ー「蛋白質翻訳後修飾」吹田市(2008. 1.
10, 11)
- 23) 川崎ナナ: 文部科学省特定領域研究「糖
鎖によるタンパク質と分子複合体の機
能解析」(Functional Glycomics)研究
成果公開発表シンポジウム「第3の生
命鎖: 糖鎖の謎が今, 解る」 有楽町
(2008. 1. 25, 26)
- 24) 川崎ナナ: LC/MS を用いた糖鎖の微量
かつ網羅的解析と創薬への応用. 日本
薬学会第 128 年会一般シンポジウム
「グライコサイエンスから創薬へ」. 横
浜 (2008. 3. 26-28) 予定
- 25) 橋井則貴, 川崎ナナ, 原園 景, 伊藤
さつき, 中島 紫, 高倉大輔, 山口照
英: 質量分析法を用いたグリコサミノ
グリカンの構造特性解析. 日本薬学会
第 128 年会, 横浜 (2008. 3. 26-28)
予定
- 26) 原園 景, 川崎ナナ, 伊藤さつき, 石
川リカ, 高井俊紀, 古賀明子, 岡本寿
美子, 山口秀人, 濱詰康樹, 佐藤貴之,
窪田雅之, 掛樋一晃, 木下充弘, 山口
照英: ペプチド及びタンパク質医薬品
の質量分析試験の標準化に関する研究.

日本薬学会第 128 年会, 横浜 (2008. 3.
26-28) 予定

- 27) 伊藤さつき, 川崎ナナ, 橋井則貴, 山
口照英: LC/MS を用いた抗体医薬品の
特性解析, 日本薬学会第 128 年会, 横
浜 (2008. 3. 26-28) 予定
- 28) 平野 真, Bruce Y. Ma, 川崎ナナ, 川
寄伸子, 川寄敏祐: マンナン結合タン
パク質による meprin のプロテアーゼ活
性調節. 日本薬学会第 128 年会, 横浜
(2008. 3. 26-28) 予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

特願: 2007-322161

発明の名称: 「同位体標識フェニルヒドラジン
と LC/MS を用いた糖鎖比較定量法」

発明者: 山口 照英, 川崎 ナナ, 橋井 則
貴

H-2. 実用新案登録 なし

H-3. その他 該当事項なし