

表 5 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

表 6 各種染色体解析手法とその応用性に関するまとめ

解析手法	構造異常 (目的遺伝子)		染色体の欠失 増幅 大きなサイズ 小さなサイズ		転座	細胞型 LOH	数の異常	点突然変異	個人識別	コスト	難易度	信頼性
	○	△	△	△/x								
G-banding	○	○	△	△	x	○	x	x	L	H	L	
multicolor-FISH	○	○	△	○	x	○	x	x	H	H	M	
microsatellite marker	x	x	x	x	△	△	x	○	M	L	H	
metaphase CGH	x	○	△/x	x	x	○	x	x	H	H	M	
CGH array	x	○	△	x	x	○	x	x	H	M	H	
SNP array	x	○	○	x	○	○	△	○	H	L	H	
sequencing	x	x	○	x	△	x	○	○	M	L	H	

○ 可能 H high
 △ 一部可能 M midte
 x 不可能 L low

○ 最も思われる方法

細胞由来生理活性物質のプロファイリング技術及び構造解析技術の開発

分担研究者 川崎ナナ （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部室長）

協力研究者 橋井則貴 （国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）

研究要旨 我々は細胞治療薬の品質評価法の開発の一環として、糖鎖を指標とした細胞特性解析、及び品質評価技術の開発を検討してきた。平成 17 年度は、液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS) による糖鎖プロファイリング法が組織発現糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることを示した。平成 18 年度は、LC/MS を用いた製造工程由来不純物として考えられる *N*-グリコシルノイラミン酸の微量定量法を開発した。平成 19 年度は、簡便、迅速かつ高精度な糖鎖比較定量法を開発し、同分析法が細胞治療薬の細胞特性確認試験法として応用可能性であることを実証した。

A. 研究目的

細胞治療薬とは、細胞治療を目的として、自己、同種、あるいは異種の細胞を生体外で選別し、加工し、あるいは増殖した後にヒトに投与する医薬品のことで、近年、細胞治療薬の開発は企業活動として活発化してきた。今後の本格的な実用化に向けて、現在、細胞治療薬の有効性確保と特性解析及び品質・安全性評価技術の開発が求められている。

細胞の特性確認試験は、製造工程における培養条件の一定性、並びに最終製品の表現型、遺伝型、機能特性及び細胞活性の安定性確認を目的として設定するものである。現在、表現型としては各種 CD 抗原の発現をはじめとして、様々な分化マーカーなどがその指標として用いられているが、製造工程の変動等により細胞の特性が変化することを想定した場合、細胞の変化をより鋭敏に検出する方法を開発する必要がある。

細胞治療薬の表面には多くの糖タンパク質が

発現しており、その糖鎖部分は種や組織、さらには培養条件によっても変化することが知られている。また糖鎖は、細胞の分化や癌化等に伴って変動することから、様々な細胞の分化マーカーや癌診断マーカーとしても利用されている。このことから細胞が発現する糖タンパク質の糖鎖のプロファイルが製造工程や最終製品における細胞の品質特性指標としてエピジェネティックな表現型の変化も含めて利用できる可能性は高い。一方、分化マーカーや癌診断マーカーとなる糖鎖は抗体を用いて検出されることが多いが、同検出法では糖鎖抗原を持つ糖鎖の分布や詳細構造の解析には利用できない。そこで、細胞組織利用医薬品の特性解析、品質評価、同一性評価法の開発研究において、細胞表面糖鎖の構造、分布及び不均一性を正しく評価するための定性的定量的解析技術の開発は不可欠である。また、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

胞 (iPS 細胞) などの細胞治療薬への応用が期待されている細胞の特性解析等に利用できる細胞数は僅か 2×10^6 個程度であることから、微量分析が可能であることが望ましい。

製造工程由来不純物とは、医薬品製造中に血清、培地、及び試薬等から混入し、品質・有効性・安全性に影響を及ぼすおそれがある物質のことで、最終製品中に含まれる対象分子の定量試験を設定し、存在を否定するか、もしくは予め規定した存在許容量以下であることを確認する必要がある。現在、製造工程において血清やフィーダー細胞から混入されることが懸念されている物質の一つに、シアル酸の一種である *N*-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc) がある。NeuGc は、ウシなど様々な動物で産生されるが、ヒトでは産生されないために、ヒトに対して抗原性を示すことが知られている。有効性や安全性に対する NeuGc の影響を正しく評価するために、現在、細胞治療薬に含まれる NeuGc の定量法の開発が求められている。

これまで分担研究者らは、液体クロマトグラフィー/多段階質量分析法 (LC/MSⁿ) を利用した糖鎖プロファイリング法を開発し、単糖分析や様々な糖タンパク質の糖鎖の不均一性及び構造解析に利用してきた。この分析法は、糖タンパク質から切り出した糖鎖をグラファイトカーボンカラム (GCC) を用いた LC で分離しながら、MS で糖鎖の分子量を測定し、MS² 以降で糖鎖構造を解析するものである。一方で、LC/MS による分析は、MS の再現性の問題があり、定量解析には適さないことが指摘されていた。この問題を解決するために、分担研究者らは、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てきた。これら独自の分析手法を細胞発現糖タンパク質の糖鎖解析に応用す

ることによって、細胞表面の全糖鎖や単糖の定性的定量的解析が可能になると思われる。

平成 17 年度は、細胞治療薬の特性解析、及び品質評価技術の開発を目的として LC/MSⁿ を用いて、細胞組織由来糖鎖を網羅的に解析すること、及び全糖鎖の中から、分化や癌化と密接な関係のある任意の糖鎖構造を持つ糖鎖を特異的に検出し解析することを検討した。細胞組織のモデルとしてマウス腎臓、また、糖鎖抗原のモデルとして、Lewis x (Le^x) 抗原を選んだ。Le^x は、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、フコース (Fuc) 及びガラクトース (Gal) で構成される 3 糖からなる糖鎖抗原でありマウス ES 細胞の分化指標 (SSEA-1) として利用されている。また腫瘍マーカーとして代表的なシアル酸 SSEA-1 は Le^x にシアル酸が 1 分子結合した糖鎖部分構造である。

平成 18 年度は第一に、ナノフロー液体クロマトグラフィー/質量分析 (nanoLC/MS) 装置を用いた NeuGc の微量定量法の開発を行った。また、その分析法をモデルヒト細胞中に存在する NeuGc の定量に応用することによって、細胞治療薬の製造工程由来不純物試験としての応用可能性を評価した。第二に、先に分担研究者らが開発した糖鎖プロファイリング法を用いて異なる培地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の細胞品質特性確認試験法としての有用性を検証した。

平成 19 年度は、フェニルヒドラジン (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定量的糖鎖プロファイリング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 (d₅-PHN) で標識して d₅-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

(d₀-PHN) で標識して d₀-PHN 糖鎖とした(Fig. 1). 等量のタンパク質から調製した d₀-PHN 及び d₅-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. さらにこの定量的糖鎖プロファイリング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) 試薬

Le^x 及び ルイス a (Le^a) 結合ピリジルアミノ化 (PA) 糖鎖, 及び Le^x 結合複合型 3 本鎖 PA 糖鎖はタカラより購入した. Rapid Growth HL-60 (HL-60-RG) 細胞 (ヒト前骨髄性白血病細胞) はセルバンクより供与された. NeuAc 及び NeuGc 標準品はナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した. 1,2-diamino-4,5-methylene-dioxybenzene (DMB) 標識試薬 (シアル酸蛍光標識用キット) は Takara (Tokyo, Japan) より購入した. ウシ胎仔血清 (FCS) 及びヒト血清は大日本住友製薬会株式会社 (Japan) より購入した. RPMI1640 培地, 及び ASF104 培地は Sigma (Mo, USA) 及び味の素 (Tokyo, Japan) より購入した. PHN 及び重水素標識 PHN (d₅-PHN) は, Sigma (Mo, USA) 及び大塚製薬 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した. 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 (100 unit/ml), ストレプトマイシン (100 µg/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 2 × 10⁵

個ずつの細胞を FCS 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) マウス腎臓糖鎖の調製

マウス (MRL/MpJ-+/+) 腎臓は日本エスエルシー株式会社より購入した. 腎臓から難溶性結合組織を Cell strainer (70mm, BD Biosciences) を用いて除去した後, 組織細胞中に混在する赤血球を NH₄Cl-Tris 溶液処理により除去した. 細胞を 7 M ウレア, 2 M チオウレア, 2% CHAPS, 30 mM Tris-HCl を含む緩衝液に溶解させてタンパク質を可溶化した後, 7 倍量の冷アセトンを加えてタンパク質を沈殿させた. 還元カルボキシメチル化したタンパク質 (200 µg) を 200 mM リン酸緩衝液 (500 µl, pH 7.2) に溶解し, PNGase F 処理 (10 unit, 37 °C, 48 時間) により N 結合型糖鎖を切り出した. 反応液に冷エタノール (1.2 ml, 終末 70%) を加えてタンパク質を沈殿除去した後, 得られた上清を濃縮, 凍結乾燥により糖鎖を回収した.

4) 膜面分の調製

洗浄済み細胞 (1 × 10⁷ 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 µl, 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 ×g, 10 分) により除去した後, 細胞膜面分を超遠心分離 (4 °C, 100,000 ×g, 60 分) により沈殿させた. 膜面分は 150 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (100 µl, 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ョ糖を除去した. 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。

5) 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、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, pH7.4) に懸濁させて、超音波処理及び超遠心分離を行いショ糖を除去した。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。シスタン溶液 (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。

6) 糖鎖の還元

精製した糖鎖を 1ml の 0.5 M NaBH₄ 溶液中で還元した (室温, 16 時間)。還元糖鎖は、ENVI Carb C カートリッジを用いて精製した。

7) マウス腎臓由来糖鎖の 2-アミノピリジン (2-AP) 標識

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

8) 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 (窒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)。

9) NeuAc 及び NeuGc の切り出し及び DMB 標識

膜画分に 250 μ l の H₂O を添加し、超音波で懸濁させた。さらに 250 μ l の 4 M 酢酸を加え (終末 2 M 酢酸溶液), 80°C で 3 時間加温し, NeuAc 及び NeuGc を遊離させた。シアル酸を含む液をメタノール/アセトニトリル/H₂O (3/1/10) 溶液で活性化した SepPak C-18 カートリッジ (Waters, MA, USA) にアプライした後, 素通り画分及び H₂O (2 ml) で溶出した画分を回収し蒸発乾燥させた。得られた NeuAc 及び NeuGc は, シアル酸蛍光標識キットを用いて DMB 誘導体とし, 0.2 mm フィルター (Millex-LG, Milipore, MA, USA) を装着した EnviCarb カートリッジ (Supelco, PA, USA) を用いて精製した。尚, 反応溶液は, 3 ml の 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で平衡化したカートリッジにアプライした後, 2.5 ml の 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で脱試薬した。カートリッジに吸着した DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc は 3 ml の 45% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム (pH9.6) で回収した。得られた溶液は蒸発乾燥させた。

10) Le^a 及び Le^x 結合 PA 化糖鎖の MSⁿ

PA 化糖鎖を 1 pmol/ μ l になるように 10 μ M NaCl を含む 50% アセトニトリル/5 mM 酢酸アンモニウム溶液 (pH 9.6) に溶解し, LC/MS に注入した。MS 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-FTMS) 装置 (LTQ-FT, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) を使用した。ポジティブイオンモードで流速を 2.0 μ l/min に設定してシリンジによる直接導入法により測定した。スプレー電圧は 2.0 ekV, キャピラリー温度は 200°C, MSⁿ の衝突エネルギーは 20-30% に設定した。

11) マウス腎臓から調製した PA 化糖鎖の LC/MSⁿ

LC は Magic 2002 system (Michrom BioResource, CA, USA) を使用した。カラムはグラファイトカーボンカラム (Hypercarb, 0.2 \times 150 mm, 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 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6) (A 溶媒), 及び 80% アセトニトリルを含む 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液 (pH 9.6) (B 溶媒) を使用した。PA 化糖鎖は流速 2 μ l/min で 10-70% (60 分) のグラジエント条件で溶出した。また糖鎖分子由来のイオンをナトリウムアダクトにするためにポストカラム (10 μ M NaCl 溶液, 流速 2 μ l/min) を使用した。MS 装置は nanoESI を接続した LTQ-FT を使用した。キャピラリー温度は 200°C, スプレー電圧は 2.0 ekV, MSⁿ の衝突エネルギーは 25%, スキャン範囲は m/z 750-2,000 に設定した。MSⁿ の測定は, 以下の方法により行なった。

- ① MS¹ : Full scan (positive ion mode)
- ② MS² : Data-dependent scan (positive ion mode)
- ③ MS^{3,4} : Target ion scan (positive ion mode)

MS³ : m/z 534

MS⁴ : m/z 388

12) nanoLC/ESI-FTMS

12-1) シアル酸分析

ナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResource) を使用した。カラムは逆相系 C18 カラム (Magic C18, 0.1 \times 50 mm, 3 μ) を用いた。溶離液として, 2% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 0.1% ギ酸溶液 (B 溶媒) を使用した。DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc は流速 0.75 μ l で 10-90% B 緩衝液

(20 分) のグラジュエント条件で溶出した。DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析は、nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) を用いて行った。測定はポジティブイオンモードで行い、選択イオン検出 (SIM) モードで行った。キャピラリー温度は 200 °C, スプレー電圧は 1.8 ekV, スキャン範囲は m/z 400-450 に設定した。MS/MS 衝突エネルギー (コリジョンエネルギー) は 35% に設定した。また、イオンの取り込み量を調節する AGC セッティングの値は $5E+04 \sim 5E+06$ の範囲に設定して最適値を確認した。FT モードのイオンの取り込み時間を調節する Maximum injection time は 1250 ms, FT の分解能は 12,500 に設定した。

12-2) HL60-RG から調製した還元化糖鎖のプロファイリング

ナノ液体クロマトグラフィー (nanoLC) は Paradigm MS4 (Michrom BioResource) を使用した。MS 装置は nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) を使用した。カラムはグラファイトカーボンカラム (HyperCarb, 0.1 x 150 mm, 5 μ) を用いた。溶離液として、2% アセトニトリルを含む 5mM AcONH₄ 溶液 (pH 9.6, A 溶媒) 及び 80% アセトニトリルを含む 5mM AcONH₄ 溶液 (pH 9.6, B 溶媒) を使用した。還元化糖鎖は流速 0.4 μ l, 10-40% B 緩衝液 (60 分) のグラジュエント条件で溶出した。測定はポジティブ及びネガティブイオンモードで行った。キャピラリー温度は 275 °C, スプレー電圧は 1.8 ekV, スキャン範囲は m/z 800-2000 に設定した。MSⁿ の コリジョンエネルギーは 35% に設定した。

12-3) HL60-RG から調製した PHN 標識糖鎖のプロファイリング

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 x 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) のグラジュエント条件で溶出した。MS 装置は nanoESI (AMR) を接続した ITMS-FTMS 装置 (LTQ-FT) 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 2.5ekV, 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。

13) シアル酸分析法のバリデーション

分析法の直線性は NeuAc 及び NeuGc 標準品を用いて 0.0078-500 pmol の範囲で検討した。分析法の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は $DL=3.3 \cdot \sigma / \text{slope}$ (σ =マスキロマトグラム平均ノイズ) 及び $QL=10 \cdot \sigma / \text{slope}$ を用いて算出した。分析法の真度及び精度は、無血清培地で培養した細胞の膜画分に 10 及び 100 fmol の NeuGc を添加した試料を 3 回測定して求めた。真度は回帰直線を用いて計算した NeuGc 量と既知量の比較により示した。精度は NeuGc 添加試料の測定により得られた実測値の相対標準偏差により求めた。

倫理面への配慮

本研究では、市販の動物組織を使用したもので対象とはならない。

C. 結果

1) Le^x 糖鎖の MSⁿ

はじめに、Le^x 糖鎖特異的検出法の開発を検討

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

ここではモデルとして Fig. 3 に示す市販の Le^x 及び Le^a 構造を含む PA 糖鎖を用いた。糖鎖 I 及び II はそれぞれ Le^x 及び Le^a を含む糖鎖であり、糖鎖 III は、より複雑な構造を持つ Le^x 結合糖鎖である。一般に、環開裂イオンを含む様々なプロダクトイオンを得るためには、糖鎖をナトリウム付加体として解析するとよいことが知られている。そこで、モデル糖鎖は、10 μ M の塩化ナトリウムを含む溶媒に溶解して、MSⁿ に付した。

Fig. 4 はモデル糖鎖 I の MS¹⁻⁴ スペクトルである。Fig. 4A はフル MS¹ スキャンによって得られたマススペクトルで、ナトリウム付加体が m/z 954 に検出されている。これを前駆イオンとして MS² を行った結果、Fig. 4B に示すように Le^x の 3 糖構造のナトリウム付加体が m/z 534 に検出された。さらに、この m/z 534 を前駆イオンとして MS³ を行ったところ、Fuc が開裂した GalGlcNAc が m/z 388 に検出された (Fig. 4C)。さらにこのイオンを前駆イオンとして MS⁴ を行ったところ、GlcNAc のピラノース環の C-3 及び C-4 間が開裂した ^{3,5}A₂ イオンが m/z 259 に検出された。この環開裂イオンは Gal が GlcNAc の 3 位ではなく 4 位に結合していることを示すイ

オンであり、Le^a からは生じないプロダクトイオンである。このように、MSⁿ によって、Le^x 糖鎖に特徴的なイオンを検出できることが確認された。

つぎに、Le^a モデルの糖鎖 II の MS¹⁻⁴ スペクトルを測定した (Fig. 5)。MS¹ では Le^x と同様に m/z 954 にナトリウム付加体が検出された。また、MS² でも、Gal(Fuc)GlcNAc からなる m/z 534 のイオンが検出され、さらに MS³ でも m/z 388 のイオンが検出された。しかし、MS⁴ では、Le^x で検出された m/z 259 は検出されなかった。このことは、MS² によって生じた Gal(Fuc)GlcNAc⁺ を選択して MS³ を行い、さらに MS³ で生じた GalGlcNAc⁺ を選択して MS⁴ を行って、環開裂イオン (m/z 259) の有無を確認することによって、Le^a と Le^x を識別できることを示唆している (Fig. 6)。

そこで、より複雑な構造を有する Le^x 糖鎖のモデル (糖鎖 III) を用いて、MS² において生じた Gal(Fuc)GlcNAc、さらに MS³ において生じた GalGlcNAc を前駆イオンとして MS⁴ を行った場合、Le^x に特徴的なイオンが生成されるかどうかを検証した。Fig. 7 は糖鎖 III の MS²⁻⁴ スペクトルである。MS² で m/z 534、MS³ で m/z 388、さらに MS⁴ で m/z 259 が検出されることを確認した。このことから、この 3 つのプロダクトイオン (m/z 534, 388, 259) を、Le^x 構造の診断イオンとして利用することによって、Le^x のみを選択的に検出できることが実証された。

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

つぎに、LC/MSⁿ を用いて、細胞組織由来糖鎖の網羅的解析を検討した。マウス腎臓由来のタンパク質に PNGase F を作用させて N 結合型糖鎖を切り出した。イオン化効率を高めるため糖鎖を PA 化した後、その糖鎖を LC/MSⁿ 装置を用いて

分析した。ここでは、フル MS¹ スキャンに続いて(Fig. 8A), データ依存的 MS² (Fig. 8B)スキャンを行った。フル MS¹ スキャンで得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) にピーク a-j が検出された。これらは、分子量及び MS² スペクトルから、高マンノース型糖鎖及び複合型フコシル糖鎖と推定された。フコースが複数結合した糖鎖が検出されたことから、Le^x 糖鎖の存在が示唆された。

そこで、(1)で開発した Le^x 糖鎖の特異的検出法を用いて、マウス腎臓由来糖鎖の中から、Le^x 結合糖鎖だけを選択的に検出することを検討した。データ依存的 MS² スキャンで生じた m/z 534 イオンを前駆イオンとして MS³ (Fig. 8C), さらに MS³ で生じた m/z 388 イオンを前駆イオンとして MS⁴ を行い、生じた m/z 259 イオンを検出した (Fig. 8D)。その結果、ピーク a-j のうち、ピーク a, b, e, f 及び h の MS²⁻⁴ から Le^x 診断イオンが検出され、この 5 つの糖鎖に Le^x が結合していることが示唆された。

Le^x 構造の存在が示唆された糖鎖の詳細構造は、データ依存的 MS²⁻⁴ スペクトルから解析した。代表的な MS²⁻⁴ スペクトルとして、Fig. 9 にピーク f の MS²⁻⁴ スペクトルを示す。まず、フラグメントパターン及び分子量から、この糖鎖には Fuc が 3 分子結合していることが示唆された。また、データ依存的 MS² で m/z 534 のイオンが検出され (Fig. 9A), m/z 534 イオンを前駆イオンとした MS³ で m/z 388 のイオンが観察され (Fig. 9B), さらに m/z 388 イオンを前駆イオンとした MS⁴ で m/z 259 イオンが観察されることから (Fig. 9C), Le^x が結合していることが確認された。さらに、 m/z 1035 にバイセクティング糖鎖に特徴的な Y_{3α/3β} イオンが比較的強く検出されたことから、この糖鎖は、Le^x 構造を 2 分子有するバイセクテッド糖鎖と予想された。同様に、Le^x の存在が示唆された主な糖鎖について、MS²⁻⁴

スペクトルを基に糖鎖構造を推定した結果を Table 1 にまとめる。マウス腎臓には Le^x 糖鎖が存在することが明らかになった。

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

3) 製造工程由来不純物試験: NeuGc 定量法

3-1) nanoLC/ITMS-FTMS による

DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の測定

シアル酸の定量法として、DMB 誘導体化と LC/蛍光検出法や MS を組み合わせた方法が用いられている。MS には、分子量やフラグメントからシアル酸分子種を同定できるという利点がある反面、DMB シアル酸の分子イオンは脱水しやすいために十分な検出感度が得られないという問題がある。そこで、脱水イオンの生成を抑えるためにイオンの取り込み量 (AGC 値) 及び脱水イオンの生成量の関係について調べたところ、FTMS のイオン取り込み量を 5E+04 に設定することによって、脱水イオンの生成をほぼ抑えられることが明らかとなった (Fig. 10)。本研究ではこの AGC 値を用いて DMB-NeuAc 及び DMB-NeuGc の分析を行った。

まず、nanoLC/FTMS 装置を用いて、DMB で標識した NeuGc 標準品 (MW 442.14) 及び NeuAc 標準品 (MW 426.15) (各 2 pmol) をポジティブイオンモードの Selected ion monitoring (SIM, m/z 400-450) により測定した。 m/z 442.12-442.16 及び m/z 426.13-426.17 のエクストラクトイオンクロマトグラム (EIC) を描いたところ、Fig. 11 に示すように、14 及び 15 分周辺に peak a 及び b が出現した。14 分に溶出さ

れた分子は、分子イオン ($[M + H]^+$) の m/z 値 (m/z 442.145) から、DMB-NeuGc であることが示唆された (Fig. 12A)。さらに、 m/z 442.145 のイオンをプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオンスペクトル (Fig. 12B) 上に、2 分子及び 3 分子の H_2O が解離したイオン (m/z 406 及び m/z 388)、 H_2O 3 分子及びグリコリル基が解離して生じたイオン (m/z 313)、並びに環開裂フラグメントイオン (m/z 229 及び m/z 283) が観測されたことから、この分子は DMB-NeuGc であることが確認された。同様に、peak b の分子は、 $[M + H]^+$ (m/z 426.150) 及びそれをプリカーサーイオンしたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc であることが確認された (Fig. 12C 及び 12D)。

nanoLC/ESI-FTMS による DMB-シアル酸測定法の直線性について、500 pmol から 7.8 fmol の範囲で検討した。その結果、0.0078-50 pmol の範囲で直線性が確認された。DMB-NeuGc 及び NeuAc の回帰直線式はそれぞれ $Y=1.31 \times 10^6 X - 9028.5$ ($r=0.9998$) 及び $Y=2.03 \times 10^6 X - 21548.0$ ($r=0.9995$) であった (Fig. 13)。また NeuGc の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) は 8.6 fmol 及び 26.3 fmol、並びに NeuAc の DL 及び QL は 5.6 fmol 及び 16.9 fmol であった。NeuGc 分析の精度は 7.3%、また、真度は 92.4% であった。以上の結果から、nanoLC/FTMS により DMB-NeuGc 及び DMB-NeuAc の定量が可能であることが確認された。

3-2) HL-60 細胞膜面分由来 NeuGc 及び NeuAc の定量

モデル細胞として HL-60 細胞を用いて、細胞膜に存在する NeuGc 及び NeuAc の定量法としての本分析法の実行可能性を評価した。

FCS 添加培地で培養した細胞 (1×10^6 個) の膜面分を超遠心分離により調製し、酸処理 (2 M

酢酸, 80°C, 3 時間) によりシアル酸を遊離させた。DMB でシアル酸を標識した後、細胞 2.5×10^3 個分のシアル酸を用いて、nanoLC/FTMS 及び nanoLC/MS/MS を行った。Fig. 14A に示すように、EIC (m/z 442.12-442.16) の 14 分にピークが出現した (peak c)。この位置に溶出された分子は、分子イオン (m/z 442.145) (Fig. 14B)、及び $[M + H]^+$ (m/z 442.145) をプリカーサーイオンとして得られたプロダクトイオン (m/z 406, 388, 313, 283 及び 229) から (Fig. 14C)、DMB-NeuGc と同定された。同様に、EIC (m/z 426.13-426.17) 上に出現した 15 分付近のピーク (peak d) (Fig. 15A) の分子は、分子イオン (m/z 426.150) 及びその分子イオンの MS/MS により得られたプロダクトイオン (m/z 390, 372, 313, 283 及び 229) から、DMB-NeuAc と同定された (Fig. 15B 及び 15C)。

10% FCS 添加培地中で培養された HL-60 細胞 (2.5×10^3 個) 膜面分に存在する NeuGc 及び NeuAc 量は、Peak c 及び d のピーク面積から、それぞれ 55.4 ± 4.6 fmol 及び 13.5 ± 0.6 pmol と算出された (Fig. 16)。

つぎに、ヒト血清添加培地中で HL-60 細胞を 10 日間培養 (培地交換 4 回) した後、本分析法を用いて、細胞膜面分に存在する NeuGc 及び NeuAc を定量した。ヒト血清を使用したにも関わらず、EIC (m/z 442.12-442.16) 上の DMB-NeuGc が溶出される 14 分付近にピーク (peak e) が確認された (Fig. 17A)。Peak e の位置に溶出された分子は、分子イオン (m/z 442.145) 及びその MS/MS から、DMB-NeuGc と同定された (Fig. 17B 及び 17C)。細胞 (2.5×10^3 個) 膜面分に存在する NeuGc 及び NeuAc の含量は、それぞれ 29.2 ± 2.4 fmol 及び 21 ± 1.4 pmol であった (Fig. 16)。これらの結果から、ヒト血清添加培地で培養しても、HL-60 細胞膜面分に NeuGc が存在することが明らかとなった。以上のように、

nanoLC/FTMS を用いたシアル酸分析法によって、細胞膜に存在する微量の NeuGc を定量できることが実証された。

さらに、HL-60 細胞を無血清培地で培養し、膜画分に含まれるシアル酸分子の同定と定量を行った。その結果、EIC (m/z 442.12-442.16) 上に NeuGc に相当するピークは観察されなかった。尚、NeuAc 量は 20.5 ± 1.6 pmol であった (Fig. 16)。以上のことから、NeuGc を含まない無血清培地で培養したヒト細胞には NeuGc は混入しないことが確認された。

4) 細胞特性確認試験：還元化 N 結合型糖鎖のプロファイリング

はじめに、10% FCS を含む培地で培養した HL-60 細胞から N 結合型糖鎖を酵素的に切り出し、 NaBH_4 で還元した後、細胞 1×10^6 個相当の糖鎖を用いて、ポジティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS²~MS⁴、並びにネガティブイオン FTMS、データ依存的 LC/MS²~MS⁴ を行った。データ依存的 MS²~MS⁴ は各スキャンで最も強度の高いイオンをプリカーサーイオンとして行った。Fig. 18 の青で示す部分は、ポジティブイオン FTMS によって得られたトータルイオンクロマトグラム (TIC) で、主に中性糖鎖とシアル酸結合数の小さい糖鎖のプロファイルを示している。赤で示す部分は、ネガティブイオン FTMS によって得られた TIC で、主にシアル酸結合数の大きい糖鎖のプロファイルを表している。主なピークの糖鎖構造は、プロダクトイオンスペクトルから、Fig. 18 中に示すように推定された。以上のように、nanoLC/MS を利用することによって、 10^6 個程度の細胞の糖鎖プロファイリングが可能になることを確認した。

つぎに、ヒト血清を含む培地、及び無血清培地で培養した HL-60 細胞の糖鎖プロファイリングを行った。Fig. 19A 及び 19B はそれぞれ、ヒト血清

及び無血清培地で培養した HL-60 細胞由来高マンノース型糖鎖のプロファイルである。無血清培地で培養すると、Man-9 糖鎖が増加することがわかる。Fig. 19C 及び 19D は、ポジティブイオンモードで得られたヒト血清及び無血清培地で培養した細胞由来複合型糖鎖のプロファイルである。また、図 19E 及び 19F はネガティブイオンモードで得られた同糖鎖のプロファイルである。ヒト血清添加培地と無血清培地で培養した細胞の糖鎖プロファイルは全く異なること、特に、無血清培地ではバイセクテッド 2 本鎖糖鎖が著しく増加することが明らかとなった。以上の結果から、糖鎖プロファイリングは細胞の変化を検出する方法として利用可能であることが示唆された。

5) 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、 H_2O 、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 H_2O 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/ H_2O の混合液中で行なった。

Fig. 20A は、標準ジシアルリル 2 本鎖糖鎖 (モノアイソトピック質量, 2368.837 Da) を d_5 -PHN 及

び d_0 -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. 20B には 41.65 分に検出されたピーク (peak A) のマス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。 d_0 -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 d_5 -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、 d_5 -PHN の純度 (57%) が原因である。Fig. 20C 及び 20D は d_0 -PHN 糖鎖及び d_5 -PHN 糖鎖の分子イオン $[M + 2H]^2+$ (m/z 1230.5 及び m/z 1233.0) のマスクロマトグラムである。Fig. 21 は d_0 -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 B_3^+ イオンである。NeuAc-Gal-GlcNAc が解離した分子に相当する Y_4^+ イオン、及び Y_4^+ イオンから 1 分子の NeuAc が解離した B_6^+/Y_4^+ イオンは、それぞれ m/z 1804 及び m/z 1347 に検出された。一方、 Y_1^+ 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、 d_5 -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 d_0 -PHN 及び d_5 -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。

6) 条件の異なる培地で培養した HL-60RG 細胞膜画分の比較定量解析

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画分から 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. 22)。

6-1) 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. 23 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. 24A 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 (Hex_9 - $HexNAc_2$) のマスク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. 24B).

Fig. 25A 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) のマスク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, $dHex_1Hex_3HexNAc_4$) 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 ($dHex_1Hex_3HexNAc_3$, $dHex_1Hex_3HexNAc_2$), 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 ($dHex_1Hex_2HexNAc_2$) であった。FCS 添加培地で培養した細胞由来 $dHex_1Hex_2HexNAc_2$ 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 $dHex_1Hex_3HexNAc_2$, $dHex_1Hex_3HexNAc_3$ 及び $dHex_1Hex_3HexNAc_4$ 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. 25B).

Fig. 26A は、ポジティブイオンモードで測定した 2 本鎖糖鎖のマスク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 ($dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_2$) 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 ($dHex_1Hex_5HexNAc_4NeuAc_{1-2}$) 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 ($dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_1$) であった。FCS 添加培地で培養した細胞由来の $dHex_1Hex_5HexNAc_4NeuAc_2$ 及び $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_2$ 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. 26B)。一方, $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_1$ 及び $dHex_1Hex_5HexNAc_4NeuAc_2$ 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. 27A は、ネガティブイオンモードで測定した 3 及び 4 本鎖糖鎖のマスク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 ($dHex_1Hex_6HexNAc_5NeuAc_2$, $dHex_1Hex_6HexNAc_5NeuAc_3$), 4 分子のシアル酸が付加した糖鎖 ($dHex_1Hex_7HexNAc_6NeuAc_{1, 2}$), 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 ($dHex_1Hex_7HexNAc_7NeuAc_4$) 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 ($dHex_1Hex_7HexNAc_6NeuAc_3$), 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 ($dHex_1Hex_8HexNAc_7NeuAc_4$), 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 ($dHex_1Hex_8HexNAc_8NeuAc_4$) であった。FCS 添加培地で培養した細胞の $dHex_1Hex_6HexNAc_5NeuAc_2$ 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 $dHex_1Hex_8HexNAc_8NeuAc_4$ 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. 27B)。また 4 本鎖糖鎖は $dHex_1Hex_8HexNAc_8NeuAc_2$ 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. 28)。

6-2) 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. 29 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. 30A 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. 30B)。

Fig. 31A 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 ($dHex_1Hex_3HexNAc_4$), アガラクト糖鎖から 1 分子の GlcNAc が欠損した糖鎖($dHex_1Hex_3HexNAc_3$) 及び パウチマンノース型糖鎖 ($dHex_1Hex_3HexNAc_2$ 及び $dHex_1Hex_2HexNAc_2$) が検出された。最も変化した糖鎖は $dHex_1Hex_3HexNAc_3$ 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. 31B)。また $dHex_1Hex_2HexNAc_2$, $dHex_1Hex_3HexNAc_2$ 及び $dHex_1Hex_3HexNAc_4$ 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. 32A 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 $dHex_1Hex_5HexNAc_4NeuAc_{1-2}$, $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_2$ 及び $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_1$ が検出された。Fig. 32B に示したように, $dHex_1Hex_5HexNAc_4NeuAc_{1-2}$ 及び $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_2$ 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, $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_1$ 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.33 は, $dHex_1Hex_5HexNAc_5NeuAc_1$ 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($NeuAcHexHexNAcHex^+$, 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.33 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、dHex₁Hex₅HexNAc₅NeuAc₁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. 34A は 3 及び 4 本鎖糖鎖のマスキングクロマトグラムである。無血清培地で培養した細胞由来の複合型 3 及び 4 本鎖糖鎖は、dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₂, dHex₁Hex₆HexNAc₅NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₃, dHex₁Hex₇HexNAc₆NeuAc₄(1,2), dHex₁Hex₇HexNAc₇NeuAc₄, dHex₁Hex₈HexNAc₇NeuAc_{2,4}, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₂, dHex₁Hex₈HexNAc₈NeuAc₃(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. 34B に示したように、無血清培地で培養した細胞由来 dHex₁Hex₆HexNAc₇NeuAc₃ 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.35)。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

我々は、平成 12 年度から参加した厚生労働省の再生医療の品質・安全性評価に関わる研究班において、LC/MS を用いた独自の糖鎖プロファイリング法を確立し、細胞発現生理活性物質の構造特性解析や、分化・がん化指標の探索に応用してきた。平成 17~19 年度は糖鎖プロファイリングを用いた細胞表面糖鎖及び単糖の定性的定量的解析技術の開発に取り組んだ。

平成 17 年度は、MSⁿによって生じた Le^x糖鎖に特徴的なプロダクトイオンを診断イオンとして用いることによって、組織全糖鎖中の Le^x糖鎖の特異的検出と構造解析に成功した。この糖鎖は脳など特定の組織に多く存在し、ヒトでは胎児期に多く見られることが知られている。さらに、シアル酸が結合したシアリル Le^x は癌関連糖鎖抗原として臨床診断に用いられている。このような分化・癌化に関連した糖鎖、または特定の組織に存在する糖鎖は、再生医療の評価研究においてもマーカーとして利用されるものと思われる。

平成 18 年度は、まず、高分解能質量分析が可能な FTMS を用いて SIM により質量範囲を制限

して測定することにより、微量シアル酸の分析が可能になることを見出した。さらに、この分析法を用いて、FCS 及びヒト血清添加培地を用いて培養した HL-60 細胞の細胞膜画分の NeuGc 及び NeuAc を定量し、僅か 2.5×10^3 個の細胞を使って、NeuGc の含量を測定できることを確認した。本分析法は感度及び特異性が高いことから、細胞治療薬の NeuGc の定量に応用可能であることが示唆された。

次に、細胞特性確認試験法としての糖鎖プロファイリング法の応用可能性を評価する目的で、HL-60 細胞を用いて、培養条件の変化によって生じた細胞の変化を糖鎖プロファイリングによって捉えることができるかどうかを調べた。その結果、培養条件によって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、さらに、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングは、それを鋭敏に検出できることが確認された。今回の結果は、LC/MS を用いた糖鎖プロファイリングが細胞特性確認試験法として応用可能であることを示唆していると思われる。

平成 19 年度は、迅速、簡便、高精度な定性的定量的糖鎖プロファイリングの開発を目指して、PHN の重水素置換体を糖鎖標識試薬として用いる比較定量法の開発を検討した。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 H_2O 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を示唆された。

以上のように、本研究で開発した細胞及び組織由来糖鎖の定性的定量的解析技術は、細胞治療薬の特性解析、及び品質評価技術として利用可能であると考えられる。

E. 結論

(1) マウス腎臓をモデル細胞組織として用いて、LC/MS を用いる糖鎖プロファイリングが、細胞組織発現糖タンパク質糖鎖の網羅的解析及び糖鎖抗原特異的解析法として利用可能であることを実証した。(2) LC/MS を用いて、細胞治療薬

の製造工程由来不純物として懸念されている NeuGc の微量定量法を開発し、モデルヒト細胞中に含まれている微量の NeuGc を定量できることを確認した。(3) PHN を用いた定性的定量的糖鎖プロファイリング法を開発し、同分析法が糖鎖を指標とした細胞特性確認試験法として利用できることを確認した。

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 Ymaguchi: Glycosylation analysis using LC/MS and LC/MSn. Site-specific glycosylation analysis if 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)研究成果公开发表シンポジウム「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
- 16) Yanyang Zhao, Yakatoshi Nakagawa, Satsuki Itoh, Kei-ichiro Inamori, Tomoya Isaji, Yoshinobu Kariya, Akihiro Kondo, Eiji Miyoshi, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, Jianguo Gu: N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on $\alpha 3\beta 1$ integrin-mediated cell migration. *J. Biol. Chem.*, 281: 32122 – 32130 (2006)
- 17) Yanyang Zhao, Satsuki Itoh, Xiangchun Wang, Tomoya Isaji, Eiji Miyoshi, Yoshinobu Kariya, Kaoru Miyazaki, Nana Kawasaki, Naoyuki Taniguchi, and Jianguo Gu: Deletion of core fucosylation on $\alpha 3\beta 1$ integrin down-regulates its functions, *J. Biol. Chem.*, 281, 38343-38350 (2006)
- 18) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh and Toru Kawanishi: LC/MS strategies in the characterization of glycoproteins, *Encyclopedia of mass spectrometry*, Vol. 8: Hyphenated, Editor Wilfried M. A. Gross & Richard M. Caprioli, Methods, Elsevier Science, Oxford, 923-930 (2006)
- 19) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, and Teruhide Yamaguchi: LC/MSn for glycoproteome analysis: Glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides, *Methods in Molecular Biology*, in press
- 20) Yoshinao Wada, Parastoo Azadi, Catherine E. Costello, Anne Dell, Rudolf Geyer, Kazuki Kakehi, Niclas G. Karlsson, Koichi Kato, Nana Kawasaki, Kay-Hooi Khoo, Soohyun Kim, Akihiro Kondo, Kazuyuki Nakamura, Hisashi Narimatsu, Milos V. Novotny, Nicolle H. Packer, Helene Perreault, Jasna Peter-Katalinic, Gottfried Pohlentz, Vermin N. Reinhold, Pauline M. Rudd, Akemi Suzuki, And Naoyuki Taniguchi: Mass spectrometry of glycoprotein glycans: HUPO HGPI (Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative) Multi-institutional study. *Glycobiology*, 17, 411-422 (2007)
- 21) Makoto Baba, Bruce Yong Ma, Motohiro Nonaka, Yukari Matsuishi, Makoto Hirano, Natsuko Nakamura, Nana Kawasaki, Nobuko Kawasaki, and Toshisuke Kawasaki: Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *J Leukoc Biol.*, 81,

- 1002-1011 (2007)
- 22) 川崎ナナ, 原園 景, 川西 徹: 糖タンパク質性医薬品の試験法に関する研究—LC/MS/MSを用いたペプチドマッピング. 医薬品研究, 37, 438-447 (2006)
- 23) 川崎ナナ, 伊藤さつき, 橋井則貴, 日向昌司, 川西 徹: 局方組換えタンパク質性医薬品の糖鎖試験法に関する研究—LC/MSnを用いた糖鎖プロファイリング. 医薬品研究, 37, 448-456 (2006)
- 24) 川崎ナナ, 早川堯夫: 糖鎖構造解析, バイオ医薬品の品質, 安全性評価, 早川堯夫監修, 308-329, エル・アイ・シー (東京)
- 25) 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)
- 26) Kayoko Takahi, 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)
- 27) 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)
- 28) Hideki Tagawa, Yasuhiko Kizuka, Tomoko Ikeda, Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Hidetake Kurihara, Maristela Lika Onozaki, Akihiro Tojo, Tasuo Sakai, Toshisuke Kawasaki, and Shogo Oka: A non-sulfated form of the NHK-1 carbohydrate is specifically expressed in mouse kidney, *J. Biol. Chem.*, 280, 23876-23883 (2005)
- 29) 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 a and b, *J. Immunol.*, 175, 3177-3185 (2005)
- 30) 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)
- 31) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, 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)

- 32) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Noritaka Hashii, Yukari Matsuishi, Takao Hayakawa, and Toru Kawanishi: Mass spectrometry of glycoprotein, *Trends in Glycosci. Glycotech.* 17, 193-203, 2005
- 33) 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
- 34) Satsuki Itoh, Nana Kawasaki, Noritaka Hashii, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, 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)
- 35) 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)
- 36) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Akira Harazono, Yukari Matsuishi, 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)
- 37) 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)
- 38) 川崎ナナ：LC/MSⁿによる糖タンパク質糖鎖の解析、未来を拓く糖鎖科学。永井克孝監修、20-21、金芳堂 (2005)
2. 学会発表
- 1) 伊藤さつき、川崎ナナ、橋井則貴、原園 景、松石 紫、川西 徹、早川堯夫：リニアイオントラップ型 MS を用いたゲル内糖タンパク質の部位特異的糖鎖解析。第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
- 2) 橋井則貴、伊藤さつき、川崎ナナ、原園 景、松石 紫、川西 徹、早川堯夫：multiple-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ)による Lewis^xの特異的解析。第 53 回質量分析総合討論会 (2005, 5, 19) 大宮
- 3) 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展活性に与える影響。第 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