

表1. ヒト血液凝固第VIII因子のペプチドマッピングで観測されたトリプシン消化ペプチド

Residues	Min	m/z	Charge	Observed mass	Missed cleavage	Peptide sequence
5 - 29	57.6	964.10	3	2889.28		R.YYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAR.F
5 - 29	57.6	969.43	3	2905.28		R.YYLGAVELSWDYM(O)QSDLGELPVDAR.F
49 - 63	54.4	598.97	3	1793.89		K.TLFVEFTDHLFNIK.P
64 - 89	62.9	965.52	3	2893.54		K.PRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLK.N
		724.39	4	2893.52		
64 - 89	60.4	970.83	3	2909.48		K.PRPPWM(O)GLLGPTIQAEVYDVTVVITLK.N
90 - 107	32.2	661.65	3	1981.93		K.NMASHPVSLHAVGVSYWK.A
90 - 107	30.6	500.48	4	1997.89		K.NM(O)ASHPVSLHAVGVSYWK.A
108 - 121	8.2	778.81	2	1555.60		K.ASEGAEYDDQTSQR.E
122 - 142	36.8	616.30	4	2461.17	2	R.EKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK.E
124 - 142	39.5	552.02	4	2204.05	1	K.EDDKVFPGGSHTYVWQVLK.E
128 - 142	40.3	573.29	3	1716.85		K.VFPGGSHTYVWQVLK.E
143 - 166	55.4	904.08	3	2709.22		K.ENGPMASDPLCLTYSLYLSHVVDLVK.D
143 - 166	54.3	909.41	3	2725.21		K.ENGPM(O)ASDPLCLTYSLYLSHVVDLVK.D
167 - 180	51.0	751.39	2	1500.76		K.DLNSGLIGALLVCR.E
187 - 194	2.6	492.76	2	983.50	1	K.EKTQLHK.F
189 - 213	52.4	593.30	5	2961.46	2	K.TQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK.N
195 - 206	56.6	699.87	2	1397.72		K.FILLFAVFDEGK.S
195 - 213	53.8	564.28	4	2253.09	1	K.FILLFAVFDEGKSWHSETK.N
207 - 213	2.9	437.69	2	873.36		K.SWHSETK.N

214 - 220	8.0	432.19	2	862.36	K.NSLMQDR.D
214 - 220	3.0	440.19	2	878.36	K.NSLM(O)QDR.D
241 - 250	24.9	555.77	2	1109.52	R.SLPGLIGCHR.K
252 - 279	51.9	803.89	4	3211.53	K.SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLV.R.N
		1071.52	3	3211.55	
283 - 325	70.6	978.96	5	4889.78	R.QASLEISPITFLTAQTL <del>L</del> MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK.V
283 - 325	69.6	982.16	5	4905.78	R.QASLEISPITFLTAQTL <del>L</del> MDLGQFLLFCHISSHQHDGM(O)EAYVK.V
326 - 336	19.8	665.78	2	1329.54	K.VDSCPEEPQLR.M
339 - 359	33.9	1237.47	2	2472.92	K.NNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR.F
339 - 359	33.8	1277.45	2	2552.88	K.NNEEAEDY(SO <sub>3</sub> )DDDLTDSEMDVVR.F
360-372	33.0	777.35	2	1552.68	R.FDDDNSPSFIQR.S
381-405	53.0	992.12	3	2973.34	K.TWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDR.S
		1487.82	2	2973.63	
409-418	10.2	588.77	2	1175.52	K.SQYLNNGPQR.I
428-437	28.1	626.76	2	1251.50	R.FMAYTDETFK.T
428-437	25.1	634.76	2	1267.50	R.FM(O)AYTDETFK.T
428-439	26.8	503.89	3	1508.65	R.FMAYTDETFKTR.E
440-466	64.1	975.85	3	2924.53	R.EAIQHESGILGPLLYGEVGD <del>TLL</del> IIFK.N
467 - 489	33.4	544.30	5	2716.46	K.NQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR.R
472 - 484	29.1	515.59	3	1543.75	R.PYNIYPHGITDVR.P
472 - 489	35.5	541.02	4	2160.05	R.PYNIYPHGITDVRPLYSR.R
497 - 510	43.2	551.97	3	1652.89	K.HLKDFPILPGEIFK.Y
500 - 510	48.2	638.33	2	1274.64	K.DFPILPGEIFK.Y
511 - 523	27.0	508.58	3	1522.72	K.YKWTVTVEDGPTK.S

513 - 523	24.8	616.79	2	1231.56	K.WTVTVEDGGPTK.S
532 - 541	28.2	648.27	2	1294.52	R.YYSSFVNMER.D
532 - 541	22.3	656.27	2	1310.52	R.YYSSFVNM(O)ER.D
542 - 556	53.8	817.42	2	1632.82	R.DLASGLIGPLLI <del>CY</del> K.E
542 - 562	56.4	783.40	3	2347.18	R.DLASGLIGPLLI <del>CY</del> KESVDQR.G
563 - 570	4.2	446.70	2	891.38	R.GNQIMSDK.R
563 - 571	3.6	524.75	2	1047.48	R.GNQIMSDKR.N
572 - 583	45.8	726.86	2	1451.70	R.NVILFSVFDENR.S
572 - 593	53.5	915.11	3	2742.31	R.NVILFSVFDENRSWYLTENIQR.F
584 - 593	31.8	655.31	2	1308.60	R.SWYLTENIQR.F
662 - 698	56.2	1086.16	4	4340.62	K.MVYEDTLTLPFFSGETVFMSPGLWILGCHNSDFR.N
734 - 740	3.6	407.20	2	812.38	K.NNAIEPR.S
741 - 747	3.0	413.18	2	824.34	R.SFSQNSR.H
769 - 776	21.4	515.23	2	1028.44	K.TDPWFAHR.T
863 - 872	16.8	502.77	2	1003.52	K.LGTTAAATELK.K
925 - 946	27.1	759.35	3	2275.03	K.KSSPLTESGGPLSLEENNDK.L
926 - 946	30.3	716.65	3	2146.93	K.SSPLTESGGPLSLEENNDK.L
947 - 962	32.7	883.40	2	1764.78	K.LLESGLMNSQESSWGK.N
947 - 962	27.8	891.40	2	1780.78	K.LLESGLM(O)NSQESSWGK.N
978 - 986	10.3	454.26	2	906.50	R.AHGPA <del>LLTK</del> .D
1012 - 1041	52.6	685.94	5	3424.66	R.KTHIDGPSLLIENSPSVWQNI <del>LES</del> DTEFKK.V
1013 - 1040	56.4	1057.16	3	3168.46	K.THIDGPSLLIENSPSVWQNI <del>LES</del> DTEFK.K
1042 - 1049	11.1	475.76	2	949.50	K.VTPLIHDR.M
1073 - 1080	8.8	504.22	2	1006.42	K.NMEMVQQK.K

1073 - 1080	17.5	512.22	2	1022.42	K.NM(O)EMVQQK.K
1081 - 1098	34.5	673.31	3	2016.91	K.KEGPIPPDAQNPDMSSFFK.M
1082 - 1098	38.2	945.42	2	1888.82	K.EGPIPPDAQNPDMSSFFK.M
1099 - 1107	31.7	532.27	2	1062.52	K.MFLPESAR.W
1099 - 1107	26.6	540.27	2	1078.52	K.M(O)JFLPESAR.W
1116 - 1127	4.2	593.28	2	1184.54	K.NSLNSGGQGPSPK.Q
1128 - 1136	2.9	485.77	2	969.52	K.QLVSLGPEK.S
1137 - 1147		619.29	2	1236.56	K.SVEGQNFLSEK.N
1165 - 1172	15.2	484.71	2	967.40	K.EM(O)VFPSSR.N
1193 - 1200	7.5	508.77	2	1015.52	K.KIQEEIEK.K
1193 - 1201	41.0	572.81	2	1143.60	K.KIQEEIEKK.E
1194 - 1200	8.4	444.72	2	887.42	K.IQEEIEK.K
1194 - 1201	4.0	508.77	2	1015.52	K.IQEEIEKK.E
1202 - 1221	40.6	740.73	3	2219.17	K.ETLIQENVVLPQIHTVTGTK.N
1226 - 1233	33.9	482.27	2	962.52	K.NLFLSTR.Q
1234 - 1252	41.0	710.32	3	2127.94	R.QNVEGSYDGAYAPVLQDFR.S
1264 - 1270	2.7	414.20	2	826.38	K.HTAHFSK.K
1271 - 1285	19.6	549.25	3	1644.73	K.KGEEENLEGLGNQTK.Q
1297 - 1310	21.1	810.39	2	1618.76	R.ISPNTSQQNFVTR.S
1320 - 1329	25.6	600.80	2	1199.58	R.LPLEETELEK.R
1320 - 1330	23.7	452.91	3	1355.71	R.LPLEETELEK.R
1331 - 1342	25.3	696.83	2	1391.64	R.IIVDDTSTQWSK.N
1346 - 1360	28.1	587.28	3	1758.82	K.HLTPSTLTQIDYNEK.E
1363 - 1376	30.5	760.34	2	1518.66	K.GAITQSPSCLTR.S

1377 - 1385	3.3	505.25	2	1008.48	R.SHSIPQANR.S
1393 - 1400	22.4	446.73	2	891.44	K.VSSFPSIR.P
1393 - 1406	37.8	545.97	3	1634.89	K.VSSFPSIRPIYLTR.V
1425 - 1439	22.6	530.57	3	1588.69	K.DSGVQESSHFLQGAK.K
1458 - 1473	22.9	807.38	2	1612.74	R.EVGLGTSATNSVTYK.K
1474 - 1487	24.7	526.63	3	1576.87	K.KVENTVLPKPDLPK.T
1475 - 1487	26.9	483.93	3	1448.77	K.VENTVLPKPDLPK.T
1535 - 1543	5.6	536.25	2	1070.48	K.WNEANRPGK.V
1561 - 1577	42.2	660.99	3	1979.95	K.LLDPLAWDNHYGTQPK.E
1596 - 1628	46.5	910.17	4	3636.65	K.DTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAK.Q
1535 - 1644	19.6	578.78	2	1155.54	R.LCSQNPPVLK.R
1653 - 1673	35.9	1270.5	3	3808.54	R.TTLQSDQEEIDY(SO <sub>3</sub> )DDTISVEMK.K
1674 - 1689	25.3	667.27	3	1998.79	K.KEDFDIYDEDENQSPR.S
1674 - 1689	25.2	1040.38	2	2078.74	K.KEDFDIY(SO <sub>3</sub> )DEDENQSPR.S
1697 - 1705	22.7	553.28	2	1104.54	R.HYFIAAVER.L
1706 - 1719	32.5	549.92	3	1646.74	R.LWDYGMSSSPHVL.R.N
1706 - 1719	28.6	555.26	3	1662.76	R.LWDYGM(O)SSSPHVL.R.N
1722 - 1731	16.4	524.76	2	1047.50	R.AQSGVPQFK.K
1733 - 1749	45.1	678.65	3	2032.93	K.VVFQEFDTGSGFTQPLYR.G
1750 - 1764	40.8	560.96	3	1679.86	R.GELNEHLGLLGPYIR.A
1765 - 1776	34.3	712.33	2	1422.64	R.AEVEDNIMVTFR.N
1765 - 1776	30.2	720.33	2	1438.64	R.AEVEDNIM(O)VTFR.N
1777 - 1797	44.1	847.37	3	2539.09	R.NQASRPYFYSSLSIYEEDQR.Q
1782 - 1797	45.6	661.96	3	1982.86	R.PYSFYSSLSIYEEDQR.Q

1804 - 1813	3.2	402.23	3	1203.67	1	R.KNFVKPNETK.T
1805 - 1813	6.2	538.77	2	1075.52		K.NFVKPNETK.T
1819 - 1833	16.0	461.69	4	1842.73	1	K.VQHMAPTKDEFDCK.A
1828 - 1833	7.3	407.64	2	813.26		K.DEFDCK.A
1834 - 1845	40.2	722.32	2	1442.62		K.AWAYFSDVDLEK.D
1834 - 1869	52.8	801.6	5	4002.95	1	K.AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHR.Q
1846 - 1869	37.6	645.57	4	2578.25		K.DVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHR.Q
1870 - 1897	61.9	721.68	3	2162.02		R.QVTVQEFALFFTFIDEK.S
1888 - 1897	33.3	681.78	2	1361.54		K.SWYFTENMER.N
1888 - 1897	28.3	689.77	2	1377.52		K.SWYFTENM(O)ER.N
1901 - 1913	29.1	776.32	2	1550.62		R.APCNIQMEDPTFK.E
1901 - 1913	23.9	784.32	2	1566.62		R.APCNIQM(O)EDPTFK.E
1901 - 1917	29.9	705.30	3	2112.88	1	R.APCNIQMEDPTFKENYR.F
1901 - 1917	25.9	710.63	3	2128.87	1	R.APCNIQM(O)EDPTFKENYR.F
1918 - 1939	50.8	830.73	3	2489.17		R.FHAINGYIMDTPLPGLVMAQDQR.I
1942 - 1966	48.4	587.07	5	2930.31		R.WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR.K
1973 - 1992	55.7	768.04	3	2301.10		K.MALYNLYPGVFETVEMLPSK.A
1973 - 1992	53.7	773.37	3	2317.09		K.M(O)ALYNLYPGVFETVEMLPSK.A
1998 - 2020	51.0	655.56	4	2618.21		R.VECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK.C
2021 - 2033	26.1	476.88	3	1427.62		K.CQTPLGMASGHIR.D
2034 - 2049	36.5	898.90	2	1795.78		R.DFQITASGQYGQWAPK.L
2053 - 2065	26.1	488.57	3	1462.69		R.LHYSGSINAWSTK.E
2066 - 2072	32.0	453.73	2	905.44		K.EPFSWIK.V
2073 - 2085	43.8	473.94	3	1418.80		K.VDLLAPMIHGK.T

2091 - 2111	53.8	624.81	4	2495.21	R.QKFSSLYISQFIIMYSLDGKK.W
2093 - 2110	58.8	1056.52	2	2111.02	K.FSSLYISQFIIMYSLDGK.K
2093 - 2111	56.2	747.38	3	2239.12	K.FSSLYISQFIIMYSLDGKK.W
2111 - 2116	8.8	441.22	2	880.42	K.KWQTYR.G
2137 - 2147	31.2	646.34	2	1290.66	K.HNIFNPPHAR.Y
2151 - 2159	11.2	562.29	2	1122.56	R.LHPHYSIR.S
2164 - 2183	44.6	1146.42	2	2290.82	R.MELMGC <del>DL</del> NS <del>CS</del> MPLGMESK.A
2184 - 2207	55.1	875.39	3	2623.15	K.AISDAQITASSYFTNMFATWSPSK.A
2184 - 2207	49.2	880.72	3	2639.14	K.AISDAQITASSYFTNM(O)FATWSPSK.A
2216 - 2227	17.5	470.9	3	1409.68	R.SNAWRPQVNNPK.E
2228 - 2236	34.3	596.78	2	1191.54	K.EWLQVDFQK.T
2240 - 2249	8.9	495.27	2	988.52	K.VTGVTTQGVK.S
2250 - 2258	31.6	521.27	2	1040.52	K.SLLTSMYVK.E
2250 - 2258	25.2	529.27	2	1056.52	K.SLLTSM(O)YVK.E
2259 - 2279	49.1	823.71	3	2468.11	K.EFLISSQDGHQWTLFFQNGK.V
2282 - 2304	47.7	848.75	3	2543.23	K.VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR.Y
2308 - 2320	31.0	528.95	3	1583.83	R.IHPQSWVHQIALR.M
2321 - 2332	38.0	714.78	2	1427.54	R.MEVLGCEAQDLY.-

表 2. ヒト血液凝固第 VIII 因子の LC/MS/MS で検出した N 結合型糖鎖結合糖ペプチド

Domain	Site	Position	Peptide sequence	Mass	Previously reported N-linked glycans	Composition of detected N-linked glycans				
A1 domain	42	37-47	SFPFNTSVVYK	1287.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S3F1	
	239	231-240	MHTVNGYVNR	1189.57	High mannose, Hybrid, and Complex	N2H5	N2H6	N2H7	N3H5	N3H6
A2 domain	582	572-583	NVILFSVFENR	1451.74	Not glycosylated	Not glycosylated				
	757	755-768	QFNATTIPENDIEK	1618.78	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1			
B domain	784	782-795	IQNVSSDLLMLLR	1587.87	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1
	828	813-858	YETFSDDPSFGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSGLDMVFTPESGLQLR	5146.35	Complex	N6H7S3F1	N6H7S4F1			
	900	878-924	VSSTSNLITIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMPVHYDSQLDITLFGK	4849.32	Complex	Not detected				
	943	926-946	SSPLTESGGPLSLSEENNDSK	2146.99	Not glycosylated	Not glycosylated				
	963	963-971	NVSTESGR	935.43	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1	



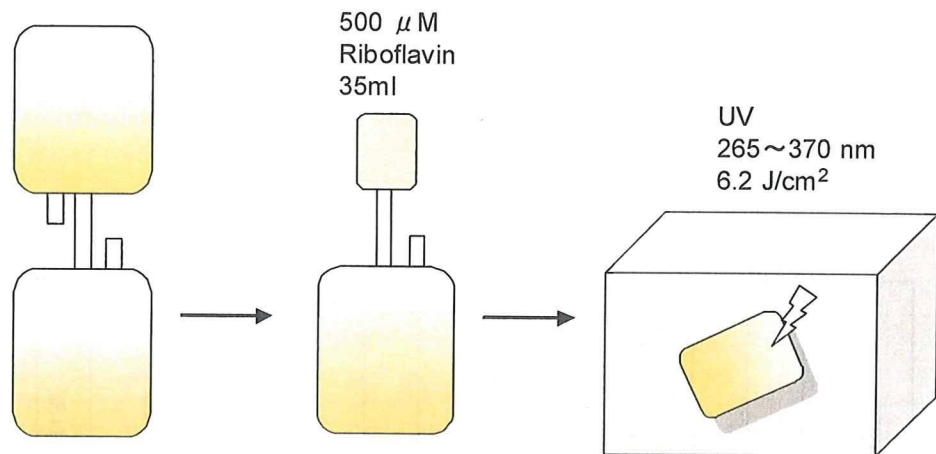
1001	1000-1002	TNK		361.2	Complex	Not detected							
1005	1003-1011	TSNNSATNR		963.44	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1				
1055	1050-1060	MLMDKNATALR*		1262.65	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
1066	1061-1067	LNHMSNK		842.41	Complex	N6H7S2F1	N6H7S3F1						
1185	1173-1192	NLFLTNLDNLHENNTNQEK		2407.15	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1			
1255, 1259	1253-1260	SLNDSTNR		905.42	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N8H10S2F2	N8H10S3F2	N9H11S3F2			
1282	1271-1285	KGEEENLEGLGNQTK		1644.8	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S1F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1		
1300	1297-1310	ISPNTSQNFVTQR		1618.81	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1						
1384	1377-1385	SHSIPQANR		1008.51	Not glycosylated	Not glycosylated							
1412	1407-1422	VLFQDNSSHLPAASYR		1803.89	Complex	N4H5S1F1	N4H5S2F1	N5H6S2F1	N5H6S3F1				
1442	1440-1457	KNNLSLAILTLEMTGDQR		2016.07	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1					
1512	1504-1534	DLFPTETSNQSPGHLDLVEGSLQGTGAIK		3181.58	Potantial	Not detected							
	1675-1689	EDFDIYDEDENQSPR		1870.75	Not glycosylated	Not glycosylated							
A3C1C2	1804-1813	KNFVKPNETK		1203.66	Complex	N4H5F1	N4H5S1F1	N4H5S2F1					
2118	2117-2136	GNSTGTLMVFFGNVDSSGIK		2029.98	High mannose	N2H8	N2H9						

\*, N 結合型糖鎖と O 結合型糖鎖の両方が結合している可能性がある。

表 3. ヒト血液凝固第 VIII 因子の O 結合型糖鎖結合部位を含むと推定されたペプチド及び実際に検出した糖ペプチド

Position	Potential O-linked glycopeptide	Mass	Deduced from*		Detected O-linked glycans	
	Peptide sequence				Compositions	
360-372	FDDDNSPSFIQIR	1552.72	β			Not detected
428-437	FMAYTDETFK	1251.55	β			Not detected
513-523	WTVTVEDGPTK	1231.61	β			Not detected
769-781	TDPWFAHRTMPK	1582.77	HN	2HN		N1H1S1 N1H1S2
796-812	QSPTPHGLSLDLQEA	1806.91	HN	2HN		N1H1S1 N1H1S2
863-872	LGTTAAATELK	1003.55	HN	2HN		2(N1H1)S3 2(N1H1)S4
926-946	SSPLTESGGPLSSEENDSK	2146.99	4-6β	ME		Not detected
1013-1040	THIDGPSLLIENSPVWQNI <del>ES</del> DT <del>E</del> FK	3168.56	4β			Not detected
1042-1049	VTPLIHDR	949.53	HN			Not detected
1128-1136	QLVSLGPEK	969.55	HN	β		Not detected
1297-1310	ISPNTSQQNFVTQR	1618.81	HN			Not detected
1331-1342	IIVDDTSTQWSK	1391.69	HN	2HN		N1H1S2
			β	ME		
1346-1360	HLTPSTLTQIDYNEK	1758.88	HN	2HN		N1H1S1 N1H1S2
1363-1376	GAITQSPSLDCLTR	1518.73	HN	2HN		N1H1S1 N1H1S2
1458-1473	EVGSLGTSATNSVTYK	1612.79	HN	2HN	β	N1H1S2
1475-1487	KVENTVLPKPDLPK	1576.92	HN			N1H1S2
1561-1577	LLDPLAWDNH <del>Y</del> GTQIPK	1980.01	HN			N1H1S2

\*、HN、及びME：それぞれ、ヘキソサミン付加ペプチド、・脱離したペプチド、2メルカプトエタノール付加したペプチドとして検出した。



①製剤を照射用バッグに移す ②リボフラビン溶液を添加する ③UV照射する(6~10分)

図3. リボフラビンを用いた不活化法の概略

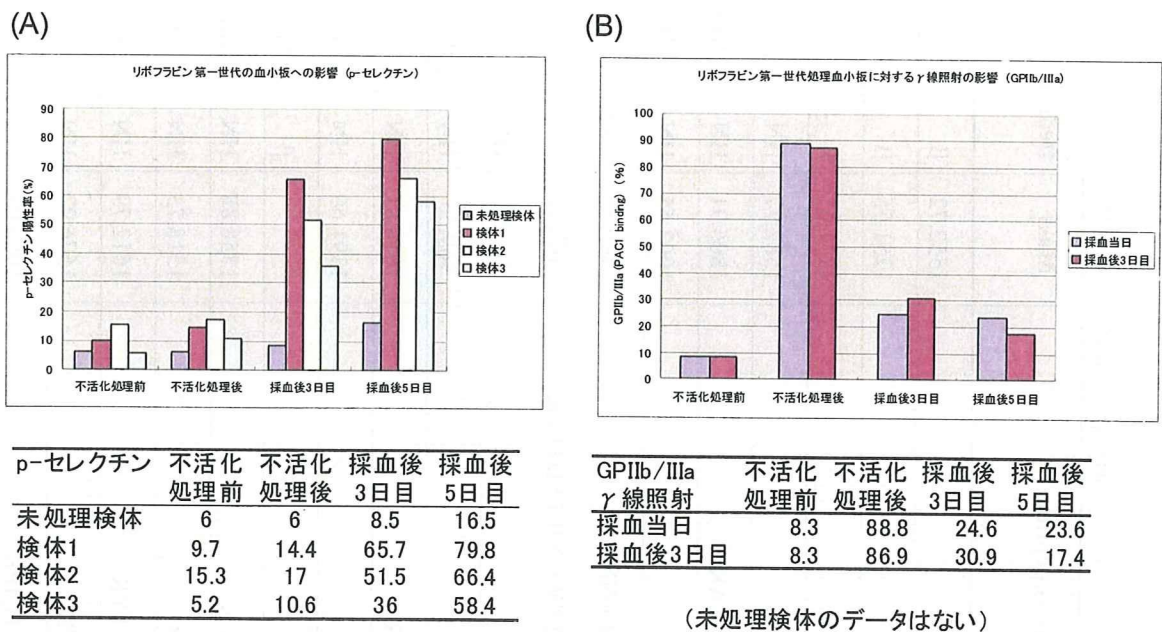


図4. リボフラビンによる不活化処理の血小板への影響

(平成21年12月24日血液事業部会 参考資料4-6 日本赤十字社からの報告データをグラフ化)

## ウイルス不活化技術の有効成分への影響評価に関する研究

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第1室室長 川崎ナナ  
協力研究者 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部主任研究官 原園 景

**研究要旨** 光化学反応を利用した新規ウイルス不活化法が、血漿製剤の血液凝固因子の活性を低下させることが知られている。本研究の目的は、血液凝固第 VIII 因子を用いて、ウイルス不活化法がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を明らかにすることである。本年度は、LC/MS を用いて遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子のペプチドマッピングを行い、約 65% のアミノ酸配列並びに 18 カ所の N 結合型糖鎖及び 10 カ所の O 結合型糖鎖を確認した。確認できなかった O 結合糖鎖付加部位は、エキソグリコシダーゼ消化、 $\beta$ 脱離及びマイケル付加により推定した。次年度以降、本データを利用し、ウイルス不活化操作がタンパク質の一次構造や翻訳後修飾に与える影響を明らかにする予定である。

### A. 研究目的

ウイルススクリーニングとして、問診や血清学的検査に加えて核酸増幅検査が実施されるようになり、血液製剤のウイルスに対する危険性は飛躍的に減少した。しかし、スクリーニング法の確立していないウイルスや未知の病原体に対する危険性を回避できないことから、様々な病原体不活化法が研究されてきた。血液製剤には大きく分けて、血漿分画製剤と輸血用血液製剤（全血製剤、赤血球製剤、血小板製剤及び血漿製剤）があるが、全ての製剤に適用可能な不活化技術は未だ確立されていない。

血漿分画製剤においては、加熱処理、ソルベント/デタージェント (S/D) 処理、ウイルス除去膜処理、及び各種分離精製処理等が開発されており、いくつかの方法が組み合わされて用いられている。輸血用血液製剤においては、血小板製剤に対するソラレン/紫外線照射並びにリボフラビン/紫外線照射、また、血漿製剤に対する S/D 処理、ソラレン/紫外線照射並びにメチレンブルー/光照射が開発されている。欧州ではこれらの方法がすでに実用化されているが、その導入は限定的である。また、米国では、現在の不活化技術が全ての感染源を不活化できるわけではな

いことから、承認されているものの不活化技術の導入は行われていない。我が国では、ソラレン、メチレンブルー及びリボフラビン等の光増感剤及び光照射を用いたウイルス不活化法の導入が検討されているが、不活化処理に伴う製剤の有効成分への影響や、不活化に伴う有害事象の発症に対する懸念から、まだ取り入れられていない。血液製剤の有効性/安全性確保のためには、ウイルス不活化技術の有効成分等への影響を評価する手法の開発が急務である。

光化学反応を利用したウイルス不活化の機序として、光照射による増感剤の活性化、及びそれによって生じた活性酸素による核酸等の傷害が考えられている。これらの操作は、タンパク質に対しても、切断、酸化、カルボニル化等の修飾を引き起こす可能性がある。実際、これらの光増感剤及び光照射処理により、様々な血液凝固因子の活性が 15% 前後低下することが報告されている。このような活性の低下は、操作に伴って高次構造が変化したことによるのか、または、タンパク質や糖鎖部分に何らかの修飾が生じたことによるのかを早急に明らかにする必要がある。

本研究の目的は、光化学反応を利用したウイルス

不活化操作により、タンパク質がどのような修飾を受けるかを明らかにすることである。本研究では、モデル血漿タンパク質として血液凝固第八因子 (FAVIII) を選択し、LC/MS/MS を用いたペプチドマッピングにより、光化学反応前後のアミノ酸配列、糖鎖構造並びにその他の翻訳後修飾を比較する。本年度は、未照射の遺伝子組換え FAVIII のペプチドマッピングを行い、ピークの帰属と糖鎖構造の確認を行った。

## B. 研究方法

### 1. 試薬

組換えヒト FAVIII は、コージネイト FS (バイエル薬品社) を使用した。修飾トリプシンはプロメガ社より、 $\alpha$ 2-3, 6, 8, 9 ノイラミニダーゼ、 $\beta$ 1-4 ガラクトシダーゼはシグマアルドリッチ社より購入した。その他の試薬は、入手できる高純度のものを用いた。

### 2. 還元カルボキシメチル化及びトリプシン消化

コージネイト FS は、PD10 カラム (GE ヘルスケア) で脱塩し、凍結乾燥した。8 M 塩酸グアニジン、5 mM EDTA 及び 500 mM Tris を含む pH 8.5 の緩衝液 100  $\mu$ L に溶解し、1 M DTT を 4  $\mu$ L 加え、37°C、1 時間反応させ、その後、1 M ヨード酢酸ナトリウム 9.6  $\mu$ L を加え、45 分間、室温で反応させた。PD10 カラムで脱塩、凍結乾燥後、修飾トリプシンにて消化を行った。

### 3. エキソグリコシダーゼ消化

トリプシン消化物を 100°C、5 分加熱した後、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 中、37°C、12 時間ノイラミニダーゼ及びガラクトシダーゼ消化を行った。

### 4. $\beta$ 脱離及びマイケル付加

トリプシン消化物を 25 mM NaCl、0.1% トリエチルアミン及び 25 mM 2-メルカプトエタノールを含む溶液中で 50°C で 2hr 加熱した。

### 5. LC MS

LC 装置には、Paradigm MS4 (Michrom BioResource 社) を、カラムには、MonoCap 0.1 X 250 mm (ジューエルサイエンス) を用いた。溶離液には、0.1% ギ酸を含む 2% アセトニトリル水溶液 (A) 及び 0.1% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液 (B) を用いた。試料は、0.5  $\mu$ L/min で 5 分間に 5% B で流した後、40 分かけて 25% B へ、その後 25 分かけて 45% B となるように溶離液 B の濃度を上昇させ溶出した。質量分析装置には Qstar Elite (Applied Biosystem 社) を用いた。ポジティブイオンモードで、ion spray voltage は 3000~3600 V に設定した。MS の測定範囲を  $m/z$  400-2100, 800-2100, 又は 1000-2100 に、MS/MS の測定範囲を  $m/z$  100-2100 に設定した。

### 6. データベース検索

LC/MS/MS により得られた MS データを、マスコット検索エンジンを用いて、ヒト SwissProt データベース (ver. 51.3) に対して検索し、ペプチドを帰属した。MS の許容範囲を 1.2 Da、MS/MS の許容範囲を 0.6 Da に設定した。アミノ酸の可変修飾として、メチオニンの酸化 (+16.00)、チロシンの硫酸化 (+79.96) を設定した。シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化物の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として N-アセチルヘキソサミン付加 (+203.08) を設定した。 $\beta$ 脱離及びマイケル付加した試料の MS データの検索の際には、セリン及びスレオニン残基に可変修飾として脱水 (-18.01) と 2-メルカプトエタノール付加 (+60.00) を設定した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来サンプル及び動物を使用していないので、特に配慮していない。

## C. 結果

### 1. ペプチドマップ

FAVIII は、アミノ酸 2332 個からなる糖タンパク質である。還元アルキル化及びトリプシン消化して得られたペプチド及び糖ペプチド混合物を LC/MS/MS により分析したところ、図 1A のようなク

ロマトグラムが得られた。検索条件として、酵素：トリプシン、許容切断部位数：2、可変修飾：システインのカルボキシメチル化、修飾：メチオニンの酸化及びチロシンの硫酸化を設定し、マスコット検索エンジンを用いて検索を行ったところ、全体の65%の一次配列が確認された(図1B)。酵素の条件をあらゆる切断条件を推定できる No enzyme として同様に検索したところ、70%の一次配列が確認された(データ非表示)。尚、トリプシンの特異性とは異なるいくつかのペプチドが観測された(データ非表示)。帰属されたペプチドのうち、リジン及びアルギニン残基のC末側で切断されたペプチドのみを表1に示す。FAVIIIには6カ所のチロシン硫酸化が報告されているが、本研究ではそのうち3カ所の硫酸化(Y346:ペプチド339-359, Y1664:ペプチド1653-1673, Y1680:ペプチド1674-1689)が確認された。Y1680に関しては硫酸化されていないペプチドも観測され、一部のチロシンは硫酸化を受けていないことが示唆された。残りの3カ所(Y737, Y738及びY742)は同一ペプチド上(ペプチド708-733)にあるため、複数の硫酸化によるイオン化効率の低下により検出されなかったと推測される。

## 2. N結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

糖ペプチドイオンの帰属は、データ依存的に測定したプロダクトイオンスペクトル中に観測される  $m/z$  204.1 のN-アセチルヘキサミンに由来するイオンを指標に選択し、FAVIIIのN結合型糖鎖に関する既報のデータを参照する方法により行った。MSの測定範囲を  $m/z$  400-2100, 800-2100 及び 1000-2100 として分析したときに検出された糖ペプチドを表2にまとめる。

FAVIIIには、25カ所の推定N結合型糖鎖結合部位(Asn42, 239, 582, 757, 784, 828, 900, 943, 963, 1001, 1005, 1055, 1066, 1185, 1255, 1259, 1282, 1384, 1412, 1442, 1512, 1685, 1810 及び 2118)が存在する。このうち Asn42, 239, 757, 784, 828, 963, 1005, 1055, 1066, 1185, 1412, 1442, 及び 2118 に関しては、糖鎖が結合したペプチドのみが観測された。Asn1255 及び 1259 の両方を含むペプチドに

ついては、糖鎖が1個及び2個結合した糖ペプチドとして検出された。Asn1282, 1300 及び 1810 を含むペプチドは、糖ペプチド及び糖鎖の結合していないペプチドの両方として観測された。Asn582, 943, 1384, 及び 1685 は、ペプチドとしては観測されたが、糖ペプチドとしては観測されなかった。Asn900, 1001, 及び 1512 はペプチドとしても糖ペプチドとしても観測されなかった。

## 3. O結合型糖鎖結合ペプチドの推定及びO結合型糖鎖結合ペプチドの帰属

MS/MSによって、比較的短い簡単な組成の糖鎖(HexNAc1Hex1NeuAc1 など)の結合が示唆されたペプチドは、O結合型糖鎖結合ペプチドと推定された。図2Aに、一例として、ある二価イオン( $m/z$  1170.5)を前駆イオンとして得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。ペプチド IIVDDTSTQWSK 及び GalNAc が結合したペプチドに相当するイオンが観測されていること、また、糖鎖に特徴的な  $m/z$  204.1 (HexNAc), 292.1 (NeuAc) 並びに 366.1 (HexHexNAc) 等のプロダクトイオンが観測されていることから、NeuAc-Hex-HexNAc が結合したペプチド IIVDDTSTQWSK であることが示唆された。ペプチド部分の配列は、IIVDDTSTQWSK より生じる  $\gamma$  シリーズのフラグメントイオンがいくつか観測されていたことから確認された。しかしながら、CID-MS/MSにおいて糖鎖は壊れやすく、またセリン及びスレオニンに結合した HexNAc は開裂しやすいため、糖が結合したペプチド由来のフラグメントは観測されておらず、結合位置は不明であった。

一般に、糖ペプチドはイオン化効率が低いこと、MS/MS で得られるフラグメントが少ないこと、並びに、O結合型糖鎖結合のコンセンサス配列ははっきりしていないことから、O結合型糖鎖結合糖ペプチドの検出と帰属は容易でない。ペプチドマッピングでは同定されなかったO結合糖鎖が存在する可能性を否定できなかったため、1) シアリダーゼ及びガラクトシダーゼ消化により糖鎖をトリミングし、O結合型糖鎖の還元末端の GalNAc のみを残したペプチド試料、並びに 2)  $\beta$  脱離及びマイケル付加により、

糖鎖結合部位を脱水または結合部位に2-メルカプトエタノールを付加したペプチド試料を調製し、LC/MS/MSとデータベース検索による0結合型糖鎖結合部位を含むペプチドの同定を試みた。前者の分析の結果、HexNAcが結合していたと推定されるペプチドをいくつか同定することができた(表3)。一例として、図2Bにある二価イオン( $m/z$  894.0)を前駆イオンとして得られたプロダクトイオンスペクトルを示す。プロダクトイオン  $m/z$  204.1 (HexNAc)、並びにb及びyシリーズのフラグメントイオンから、ペプチドTDPWFARHTPMPKにHexNAcが結合していることが推定された。尚、全てのスペクトルでHexNAcがニュートラルロスされていたため、結合部位を示すフラグメントを確認できなかった。つぎに、後者のサンプルのLC/MSデータを取得した後で、セリン及びスレオニンにおける脱水または2-メルカプトエタノールの付加(OH基 → CH<sub>2</sub>OH)の可能性を設定し、データベース検索を行ったところ、いくつかのペプチドが推定された(表3)。図2Cに、β脱離したペプチドの例として、ある三価イオン( $m/z$  575.3)のプロダクトイオンスペクトルを示す。視測されたb及びyシリーズイオンから、ペプチドEVGSLGTSATNSVTYKKの中の4番目セリンでβ脱離が生じたことが確認され、S1461に0結合型糖鎖が付加していたことが推測された。ただし、脱水したセリン残基で断片化したyイオン(この例ではy14)は検出されにくい傾向があった。図2Dに、マイケル付加の例として、ある二価イオン( $m/z$  726.9)のプロダクトイオンスペクトルを示す。スペクトルから、ペプチドIIVDDTSTQWSKの8番目スレオニンにメルカプトエタノールが付加していることが示唆され、T1338に0結合型糖鎖が付加していたことが示された。

以上の操作によって帰属された10箇所(0結合型糖鎖)に関する情報を表3にまとめた。視測された糖鎖の組成は、HexNAcHexNeuAcまたはHexNAcHexNeuAc<sub>2</sub>であった。ペプチドQ796-K812を除き、確認された0結合型糖鎖結合ペプチドは、糖鎖が結合していないペプチドとしても検出されていたことから、これらの結合部位の糖鎖付加は部分的であることが示された。

#### D. 考察

新しいウイルス不活化技術として、光化学反応を利用した技術が開発され、そのうちいくつかの手法は一部の国で導入されている。しかし、これらの処理により、フィブリノーゲンやFAVIIIなどのいくつかの血液凝固因子の活性は15%程度低下することが報告されている。現在までに、光化学反応を利用したウイルス不活化処理に由来する有害事象発症例は報告されていないが、光化学反応の有効成分への影響を評価する必要がある。本研究は、光化学反応を利用したウイルス不活化処理がFAVIIIに与える影響を明らかにするものであり、本年度は、ウイルス不活化処理前のFAVIIIについてLC/MSによるペプチドマッピングを行い、その一次構造並びに翻訳後修飾(N及びO結合型糖鎖)を可能な限り帰属した。

ペプチドマッピングにより、約65%の配列をトリプシン切断ペプチドとして確認することができた。FAVIIIには、25カ所の推定N結合型糖鎖結合部位があり、そのうち20カ所に糖鎖が結合していることが報告されているが、今回、18カ所について糖鎖が結合していること、そのうち3カ所は糖鎖が結合していない場合があることを確認した。また、4カ所には糖鎖が結合していないことを確認した。しかしながら、残りの3カ所分の糖鎖結合部位を確認できなかったため、今後、分析条件を変えて検討を行う予定である。結合していた糖鎖は、ほとんどの部位においてフコシル化されたシアリル二本鎖または三本鎖糖鎖であったが、Asn239には、高マンノース型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖並びにフコース及びシアル酸が0から1個結合した二本鎖糖鎖が、Asn2118には、高マンノース型糖鎖のみが結合していた。これらは、過去の報告とほぼ同じであったが、Asn239についてはより多くの糖鎖が検出された。

本研究では、エキソグリコシダーゼ消化並びにβ脱離及びマイケル付加を行った試料を用いて、0結合型糖鎖結合ペプチドの推定を行い、18箇所の0結合型糖鎖結合部位を含むペプチドを推定した。そのうち、10カ所の0結合型糖鎖結合部位の糖組成を明らかにすることができたが、残り8カ所については、まだ

実際に糖鎖が結合していることを確認できていない。 $\beta$ 脱離及びマイケル付加は、糖鎖が付加していないセリン及びスレオニン残基においても起こりうることから、今後、糖ペプチドとして確認する必要がある。

本年度は、ウイルス不活化処理前の FAVIII について LC/MS によるペプチドマッピングを行った。来年度は、ウイルス不活化処理がペプチドマップに及ぼす影響を調べる予定である。光化学反応で起きうる修飾として、糖鎖への影響、ペプチド鎖の切断、メチオニンの酸化、カルボニルの生成等が考えられることから、これらの検出に加えて、N 末修飾法及びカルボニルの誘導体化を利用した検出法を検討する予定である。

#### E. 結論

モデル血漿タンパク質として FAVIII を用い、還元アルキル化及びトリプシン消化した後、LC/MS によるペプチドマッピングを行った。データベース検索により、アミノ酸配列のうち約 65%に相当するペプチド部分を確認した。また、既報の N 結合型糖ペプチドの分析データと比較することにより、18 カ所の糖鎖を確認した。更に、新たに 10 カ所の O 結合型糖鎖が結合した糖ペプチドを検出した。今後、残りの O 結合型糖鎖結糖ペプチドを解析するとともに、このペプチドマップのデータを利用し、光化学反応を利用したウイルス不活化法がタンパク質一次構造や翻訳後修飾に及ぼす影響を明らかにする予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Noritaka Hashii, Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Yukari Nakajima, Akira Harazono, Toru Kawanishi, Teruhide Yamaguchi: Identification of glycoproteins carrying a target glycan-motif by liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry. Identification of Lewis x-glycoproteins in mouse kidney. *J. Proteome Res.*, 8, 3415-3429 (2009)

- 2) Nana Kawasaki, Satsuki Itoh, Noritaka Hashii, Daisuke Takakura, Yuan Qin, Huang Xiaoyu, Teruhide Yamaguchi: The significance of glycosylation analysis in development of biopharmaceuticals, *Biol. Pharm. Bull.*, 32 (5) 796-800 (2009)

##### 2. 学会発表:

- 1) 川崎ナナ: 糖タンパク質性医薬品の開発と質量分析. 第7回日本糖質科学コンソーシアムシンポジウム, 大阪(2009, 12, 7,8)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

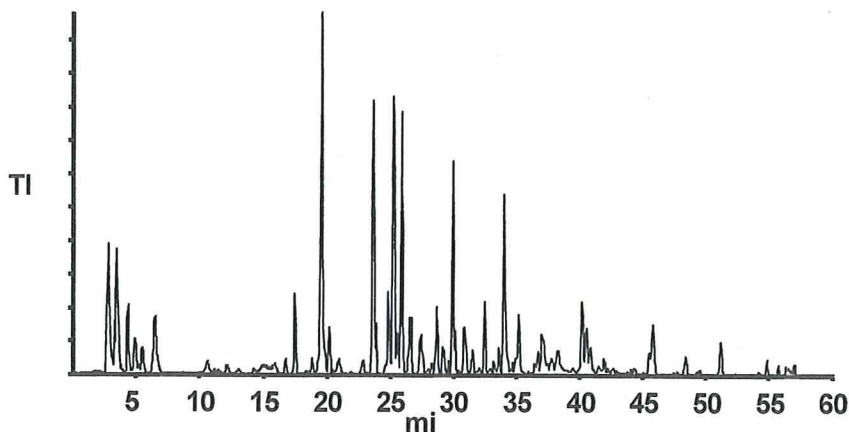
##### 3. その他

該当なし



図1. (A) ヒト血液凝固第VIII因子のトリプシン消化物のLC/MS (B) データベース検索結果

(A)



(B)

Taxonomy: Homo sapiens

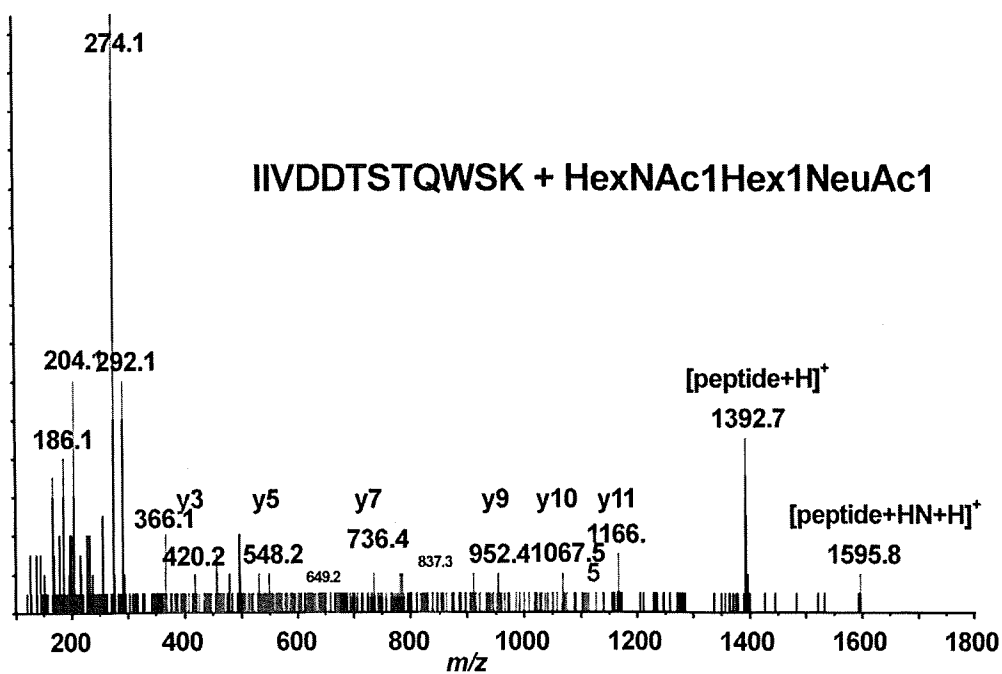
Variable modifications: Carboxymethyl (C), Oxidation (M), Sulfation (Y), Sulphone (M)  
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P  
 Sequence Coverage: 65%

```

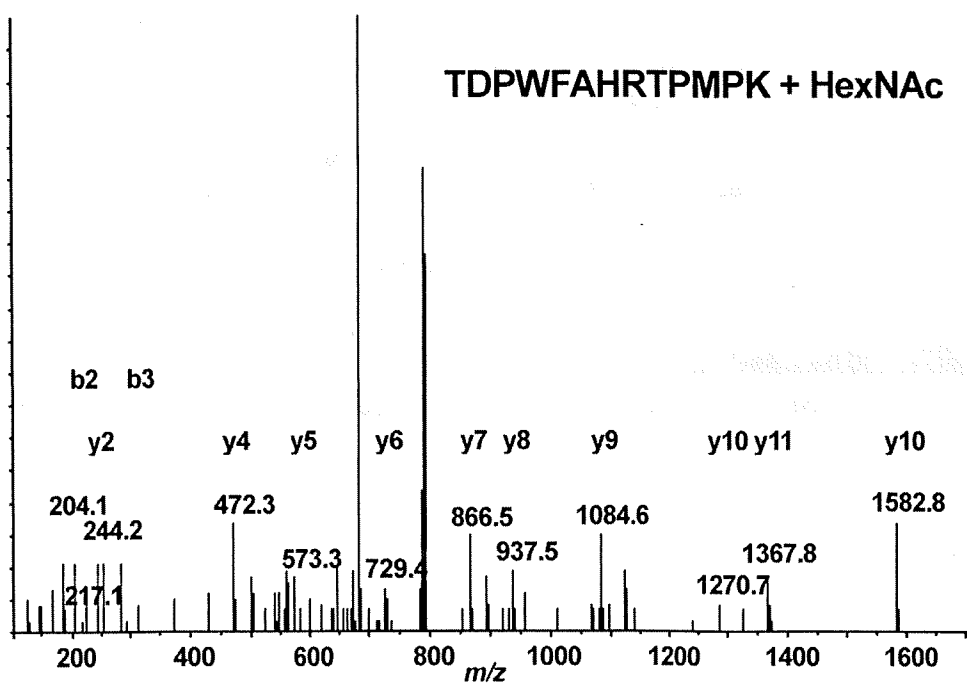
1 MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYLGAWE LSWDYMQSDI GELPVDARFP
51 PRVPKSPFFN TSVVYKRTLF VEFTDHLFNI AKPRPPWMLG LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMAADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKAKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHFTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YSSFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDPLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMG
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTDW WFAHRTPMPK
801 IQNVSSDDL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDPS PGAIDSNNSL
851 SEMTHFRPQL HHSGDMVFTP ESGLQLRLNE KLGTTAATEL KRLDFKVSST
901 SNNLISTIPS DNLAAGTNT SSLGPPSMPV HYDSQLDRTL FGKSSPLTE
951 SGGPLSLSEE NNDSKLESG LMNSQESSWG KNVSTESGR LFKGKRAHGF
1001 ALLPKDNALF KVSISLLKTN KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSVWQN
1051 ILESDETFEK VTPLIHDRML MDRNATALRL NHMSNKTSS KNMEMVQKKK
1101 EGGPPDAQN PDMSFFKMLF LPESARWIQR THGKNLNSG QGSPKQLVLS
1151 LGPEKSEVGG NFLSEKNKVV VGRGEFTKDV GLKEMVFPSS RNLFLTNLDN
1201 LHENNTNQE KKIQEEIEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGTK NFMKNLFLLS
1251 TRQNVGSYD GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG
1301 NQTKQIVEKY ACTTRISPNT SQQNFTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI
1351 IVDDTSTQWS KNMKHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS DCLTRSHSIP
1401 QANRSPLEIA KVSFFPSIRP IYLTRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES
1451 SHFLQGAKKN NLSLAILTLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YKKVENTVLP
1501 KPDLPKTSBK VELLPKVHIY QKDLFPETES NGSPGHLDLV EGSLQGTGEG
1551 AIKNEANRPP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LDPLAWDNHY GTQIPKEEWK
1601 SQEKSPKETA FKKKDTILSL NACESNHALA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR
1651 TERLCSQPPP VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1701 EDENQSPRSP QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPPQFK
1751 KVVQEFETDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVDNI MVTFRNQASR
1801 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1851 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALPFT
1901 IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1951 LVMAQDQIRI WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
2001 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLMGASGH
2051 IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
2101 HGIRTOGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
2151 SSGIKHNIFF PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEIMGCDL NSCSMLGME
2201 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
2251 VDFQKTMKVT GVTTOGVKSL LTSMYKVEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
2301 VDFQNGDSFT PUVNSLDPPPL LTRYLRILHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
2351 Y
    
```

図2. (A) O結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル ( $m/z$  1170.5 2<sup>+</sup>) (B) エキソグリコシダーゼ消化後のO結合型糖鎖結合ペプチドのプロダクトイオンスペクトル ( $m/z$  894.0 2<sup>+</sup>) (C)  $\beta$ 脱離した糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル ( $m/z$  575.3 3<sup>+</sup>) (D)  $\beta$ 脱離及びマイケル付加 (2-メルカプトエタノール) 糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトル ( $m/z$  726.9 2<sup>+</sup>)

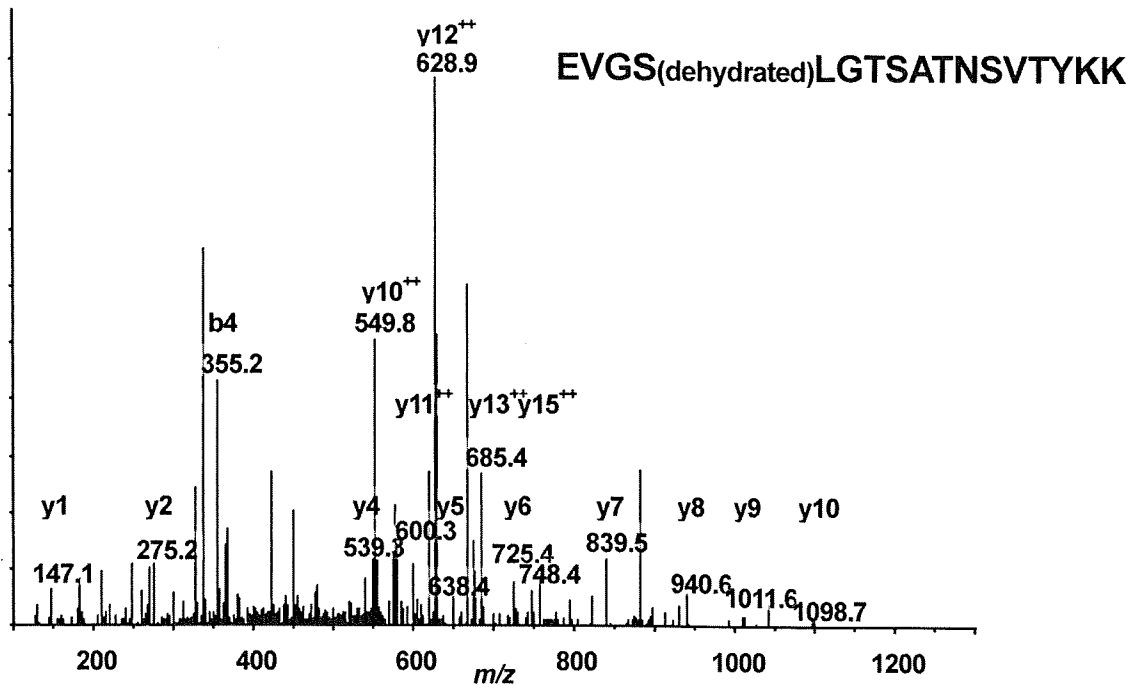
(A)



(B)



(C)



(D)

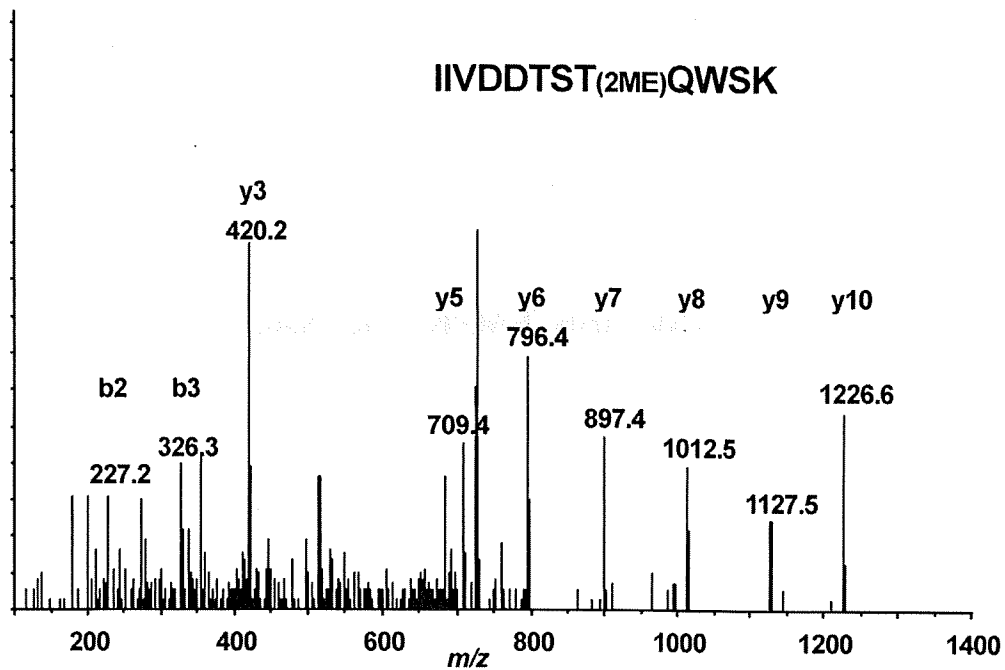


表1. ヒト血液凝固第VIII因子のペプチドマップでピーキングで観測されたトリプシン消化ペプチド

Residues	Min	m/z	Charge	Observed mass	Missed cleavage	Peptide sequence
5 - 29	57.6	964.10	3	2889.28		R.YYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAR.F
5 - 29	57.6	969.43	3	2905.28		R.YYLGAVELSWDYM(O)QSDLGELPVDAR.F
49 - 63	54.4	598.97	3	1793.89		K.TLFVEFTDHLFNIAK.P
64 - 89	62.9	965.52	3	2893.54		K.PRPPWMGLLGP <sup>U</sup> TIQAEVYDTVVITLK.N
64 - 89	62.9	724.39	4	2893.52		K.PRPPWM(O)GLLGP <sup>U</sup> TIQAEVYDTVVITLK.N
64 - 89	60.4	970.83	3	2909.48		K.NMASHPVSLHAVGVSYWK.A
90 - 107	32.2	661.65	3	1981.93		K.NM(O)ASHPVSLHAVGVSYWK.A
90 - 107	30.6	500.48	4	1997.89		K.ASEGAEYDDQTSQR.E
108 - 121	8.2	778.81	2	1555.60		R.EKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK.E
122 - 142	36.8	616.30	4	2461.17	2	K.EDDKVFPGGSHTYVWQVLK.E
124 - 142	39.5	552.02	4	2204.05	1	K.VFPPGGSHTYVWQVLK.E
128 - 142	40.3	573.29	3	1716.85		K.ENGPMASDPLCLTYSLSHVDLVK.D
143 - 166	55.4	904.08	3	2709.22		K.ENGPM(O)ASDPLCLTYSLSHVDLVK.D
143 - 166	54.3	909.41	3	2725.21		K.DLNSGLIGALLVCR.E
167 - 180	51.0	751.39	2	1500.76		K.EKTQTLHK.F
187 - 194	2.6	492.76	2	983.50	1	K.TQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK.N
189 - 213	52.4	593.30	5	2961.46	2	K.FILLFAVFDEGK.S
195 - 206	56.6	699.87	2	1397.72		K.FILLFAVFDEGKSWHSETK.N
195 - 213	53.8	564.28	4	2253.09	1	K.SWHSETK.N
207 - 213	2.9	437.69	2	873.36		K.NSLMQDR.D
214 - 220	8.0	432.19	2	862.36		K.NSLM(O)QDR.D
214 - 220	3.0	440.19	2	878.36		R.SLPGLIGCHR.K
241 - 250	24.9	555.77	2	1109.52		K.SVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVR.N
252 - 279	51.9	803.89	4	3211.53		R.QASLEISPITFLTAQTLMLDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVK.V
283 - 325	70.6	1071.52	3	3211.55		R.QASLEISPITFLTAQTLMLDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVK.V
283 - 325	69.6	978.96	5	4889.78		R.QASLEISPITFLTAQTLMLDLGQFLFCHISSHQHDGM(O)EAYVK.V
326 - 336	69.6	982.16	5	4905.78		K.VDSCPEEPQLR.M
339 - 359	19.8	665.78	2	1329.54		K.NNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR.F
339 - 359	33.9	1237.47	2	2472.92		K.NNEEAEDY(SO <sub>3</sub> )DDDLTDSEMDVVR.F
339 - 359	33.8	1277.45	2	2552.88		R.FDDDNSPSFIQIR.S
360-372	33.0	777.35	2	1552.68		K.TWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDR.S
381-405	53.0	992.12	3	2973.34		