

- Ibrahim, M.S., Ideno, S., Yunoki, M., Okuno, Y., Takagi, T., Yasunaga, T., and Ikuta, K.: Highly conserved sequences for human neutralization epitope on hemagglutinin of influenza A viruses H3N2, H1N1 and H5N1: Implication for human monoclonal antibody recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 614-618, 2010.
- 46) Horie, M., Honda, T., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Daito, T., Oshida, T., Ikuta, K., Jem, P., Gojobori, T., Coffin, J. M., and Tomonaga, K.: Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463, 84-87, 2010.
- 47) Ueda, M., Daidoji, T., Du, A., Yang, C.S., Ibrahim, M.S., Ikuta, K., and Nakaya, T.: Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus induces extracellular Ca²⁺ influx, leading to apoptosis in avian cells. *J. Virol.* 84, 3068-3078, 2010.
- 48) Sakudo, A., Xue, G., Kawashita, N., Ano, Y., Takagi, T., Shintani, H., Tanaka, Y., Onodera, T., and Ikuta, K.: Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 166-179, 2010.
- 49) Yunoki, M., Tanaka, H., Urayama, T., Kanai, Y., Nishida, A., Yoshikawa, M., Ohkubo, Y., Kawabata, Y., Hagiwara, K., and Ikuta, K.: Infectious prion protein in the filtrate even after 15 nm filtration. *Biologicals* 38, 311-313, 2010.
- 50) Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., and Hagiwara, K.: Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.* 82, 69-76, 2010.
- 51) de Silva, U.C., Warachit, J., Sattagowit, N., Jirapongwattana, C., Panthong, S., Utachee, P., Yasunaga, T., Ikuta, K., Kameoka, M., and Boonsathorn, N.: Genotypic characterization of HIV-1 env gp160 sequences from three regions in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 26, 223-227, 2010.
- 52) Yunoki, M., Kubota-Koketsu, R., Urayama, T., Sasaki, T., Du, A., Konoshima, Y., Ideno, S., Fukunaga, Y., Morikawa, S., Hiroi, S., Takahashi, K., Okuno, Y., Hagiwara, K., and Ikuta, K.: Significant neutralizing activity of human immunoglobulin preparations against pandemic 2009 H1N1. *Br. J. Haematol.* 148, 953-955, 2010.
- 53) Kato-Mori Y, Orihashi T, Kanai Y, Sato M, Sera K, Hagiwara K. Fermentation Metabolites from *Lactobacillus gasseri* and *Propionibacterium freudenreichii* Exert Bacteriocidal Effects in Mice. *J Med Food.* 13, 1460-1467, 2010.
- 54) Sakemi Y, Tamura Y, Hagiwara K. Interleukin-6 in quarter milk as a further prediction marker for bovine subclinical mastitis. *J Dairy Res.* 77, 1-4, 2010.
- 55) Hagiwara K, Ando T, Koiwa M. The Influence of Borna Disease Viral Infection on Dairy Cow Reproduction. *J Vet Med Sci.* 2011 Nov 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22123302.
- 56) Hisaeda K, Arima H, Sonobe T, Nasu M, Hagiwara K, Kirisawa R, Takahashi T, Kikuchi N, Nagahata H. Changes in Acute-Phase Proteins and Cytokines in Serum and Milk Whey from Dairy Cows with Naturally Occurring Peracute Mastitis Caused by *Klebsiella pneumoniae* and the Relationship to Clinical Outcome. *J Vet Med Sci.* 73, 1399-1404, 2011.
- 57)
- G-2 学会発表**
- 1) 橋井則貴, 黄 笑宇, 栗林亮佑, 川崎ナナ: 糖鎖プロファイルによる間葉系幹細胞の分化初期における細胞の識別. 第84回 日本生化学会大会 (2011. 9) 京都.
- 2) 中澤志織, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: 水素/重水素交換質量分析法によるヒトインスリンアナログ製剤の多量体安定

- 性の解析. 第 84 回 日本生化学会大会 (2011. 9) 京都.
- 3) 中澤志織, 橋井則貴, 原園 景, 川崎ナナ: ヒトインスリンアナログ製剤の水素/重水素交換反応性と薬物動態の相関性. 第 11 回 日本蛋白質科学会年会 (2011. 6) 大阪.
 - 4) ©Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. June 2011, Barcelona, Spain.
 - 5) 久保 純, 大久保 祐士, 中川 典子, 佐々木 祐子, 柚木 幹弘, Larisa Cervenakova, 萩原 克郎, 生田 和良. vCJD を用いた血漿分画製剤の工程評価 (O1-4-15). 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010. 11) 徳島.
 - 6) ©久保 純, 大久保 裕士, 中川 典子, 坂井 薫, 柚木 幹弘, 川見 祥代, 萩原 克郎, 生田 和良. バイオ医薬品からのマウス馴化型 vCJD の除去の可能性; 作用機序が異なる 3 種類のろ過膜のプリオン除去能. 第 35 回日本血液事業学会 (2011. 10) 埼玉.
 - 7) 菊池裕, 豊田淑江, 遊佐精一, 中島治, 手島玲子, 小西良子, 山口照英: 低酸素条件下で誘導される GPI アンカー欠損型プリオン蛋白質の発現に関与する因子の解析. 第 83 回日本生化学会大会 (2010, 12) 神戸.
 - 8) 東原知宏, 菊池裕, 中島治, 手島玲子, 辻 勉, 小西良子, 山口照英: ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質 mRNA の発現解析. 第 83 回日本生化学会大会 (2010, 12) 神戸.
 - 9) Y. Kikuchi, T. Kanayasu-Toyoda, O. Nakajima, S. Yusa, T. Higashihara, T. Tsuji, R. Teshima, Y. Sugita-Konishi, T. Yamaguchi: Identification of a splice variant of prion protein mRNA lacking the GPI anchor signal sequence in bovine and sheep brain, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Neurodegenerative Diseases: The Molecular and Cellular Basis for Neurodegeneration, Feb. 21-26, 2011, Taos, New Mexico, USA
 - 10) 東原 知宏, 菊池 裕, 中島 治, 手島 玲子, 辻 勉, 小西 良子, 山口 照英: ヒツジスプライス変異型プリオンタンパク質 mRNA の解析. 日本薬学会第 131 年会 (2011. 3) 札幌.
 - 11) 遊佐精一, 菊池裕, 小西良子, 山口照英: Molecular characterization of mouse, human, bovine, and sheep PrP^C in cell lines. Asian Pacific Prion Symposium 2011 (2011. 7) 軽井沢.
 - 12) 東原知宏, 菊池裕, 中島治, 遊佐精一, 手島玲子, 辻 勉, 小西良子, 山口照英: ヒツジ OA1 細胞が発現するスプライス変異型プリオン蛋白質遺伝子の解析, 第 84 回日本生化学会大会 (2011. 9) 京都.
 - 13) Yutaka Kikuchi, Sei-ichi Yusa, Toshie Kanayasu-Toyoda, Osamu Nakajima, Reiko Teshima, Yoshiko Sugita-Konishi, Teruhide Yamaguchi: Expression of a splice variant of prion protein during hypoxia in human glioblastoma cell line T98G, Keystone Symposia, Advances in Hypoxic Signaling: From Bench to Bedside, February 12 - 17, 2012, Banff, Alberta, Canada.
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

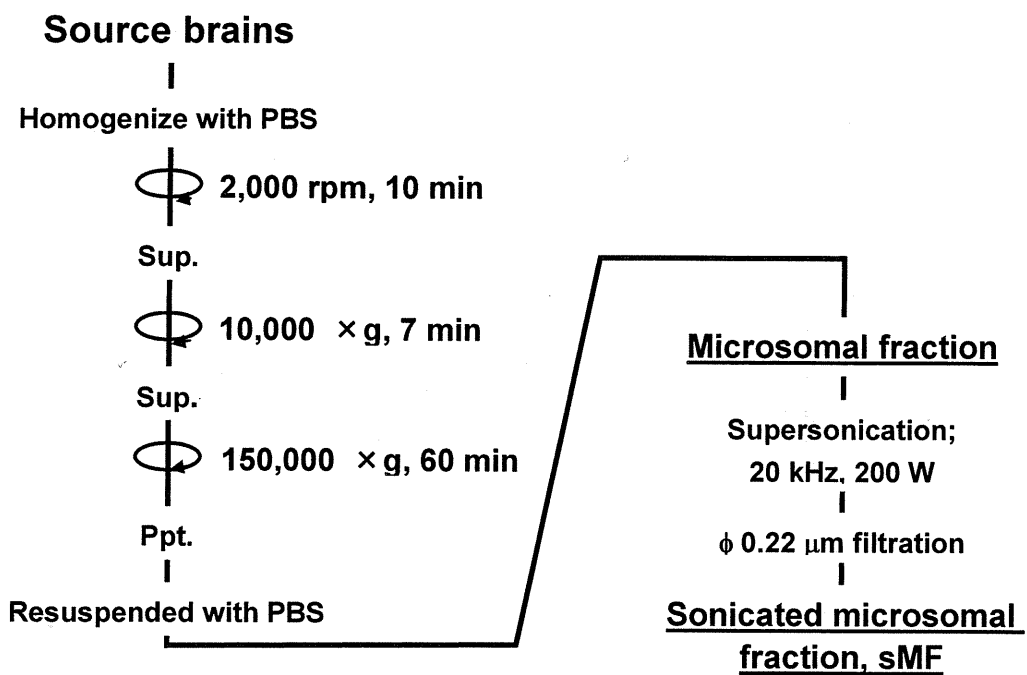


図1 マウス馴化 vCJD 感染マウス脳あるいはハムスター馴化 Scrapie263K 感染ハムスター脳からの Microsomal fraction と Sonicated microsomal fraction, sMF の調整方法

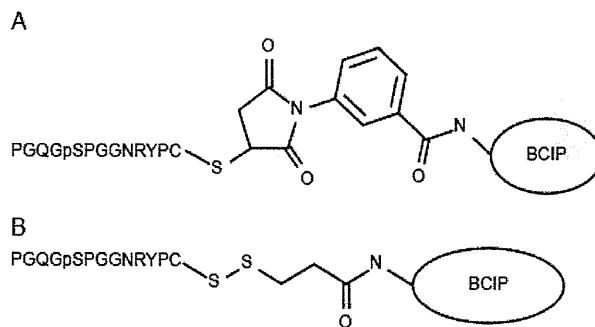
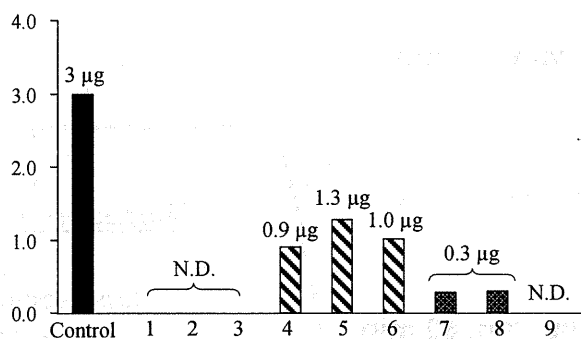
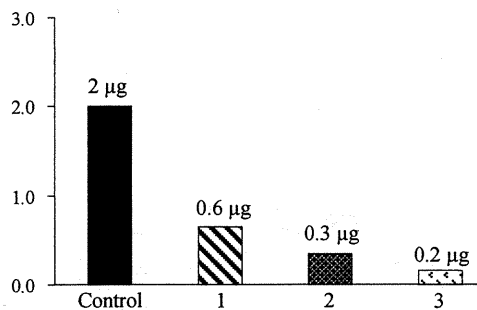


図2 Schematic diagram of antigens.



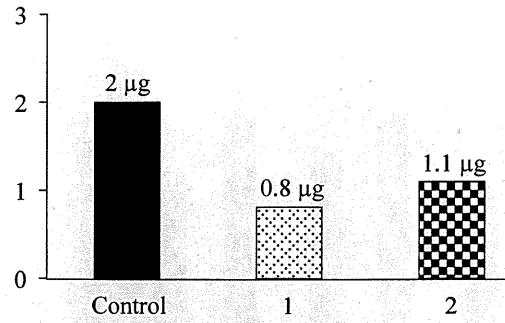
Lane	脱色液	抽出液
1	—	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% メタノール/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
4	—	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
5	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
6	30% メタノール/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
7	—	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル
8	30% アセトニトリル/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル
9	30% メタノール/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

図3 クーマシーブルー染色ゲルからのフェツイン (3 µg) 回収率



Lane	脱色液	抽出液
1	30% アセトニトリル/5% 酢酸	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
2	30% アセトニトリル/5% 酢酸	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)
3	30% アセトニトリル/5% 酢酸	0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

図4 クーマシーブルー染色ゲルからのフェツイン (2 µg) の回収率



Lane	固定	脱色液	抽出液
1	+	50% メタノール	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
2	-	50% メタノール	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)

図 5 SYPRO Ruby 染色ゲルからのフェツイン (2 μg) の回収率

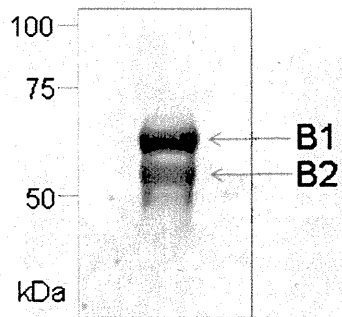


図 6 フェツインの SDS-PAGE 像

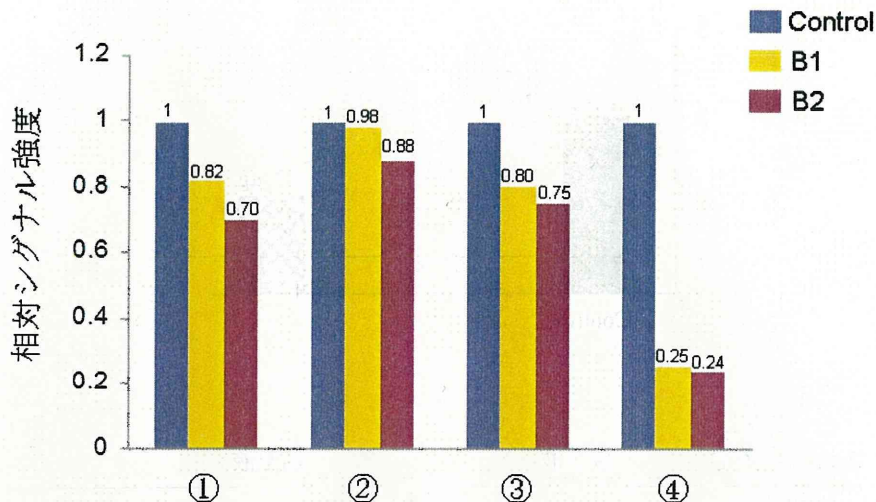


図7 抽出用緩衝液の最適化.

①~④: 抽出用緩衝液; Cy5 標識した 5 μg /レーンのフェツインをアクリルアミドゲルより抽出後, 再泳動し, ゲル抽出前のフェツインをコントロールとしてバンドの相対シグナル強度を算出.

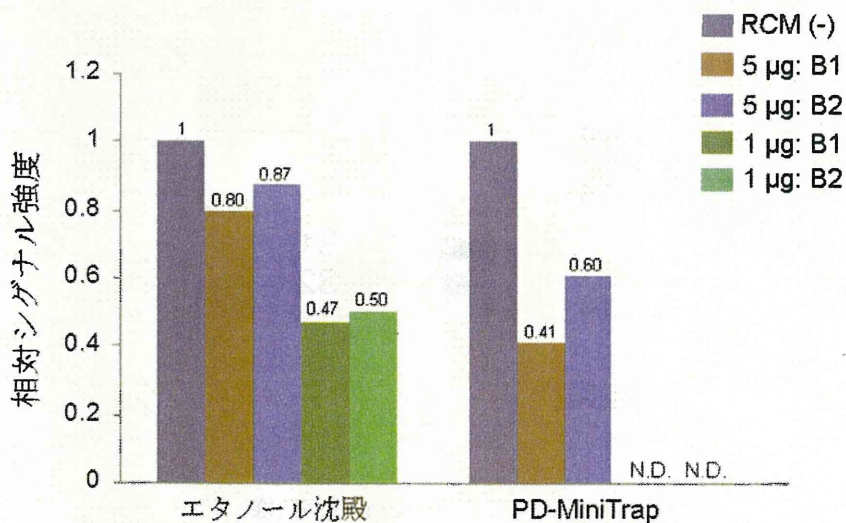


図8 RCM 後脱塩操作の影響.

RCM 操作の後, エタノール沈殿及び PD-MiniTrap を用いて脱塩し, SDS-PAGE で分離. RCM 操作 (-) のフェツインをコントロールとして相対シグナル強度を算出.

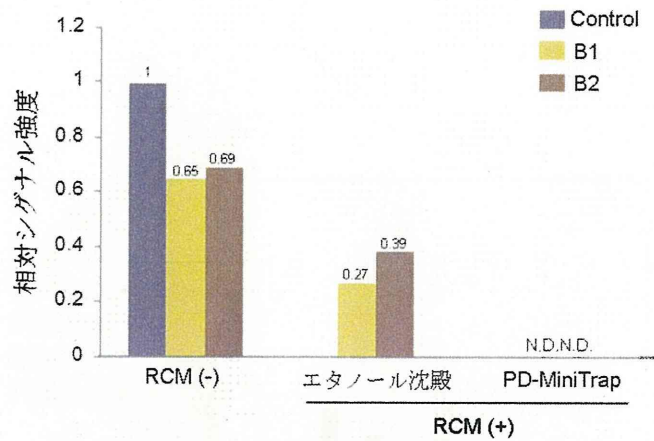


図9 抽出法の最適化.

抽出液②のアクリルアミドゲルからの抽出効率を RCM 後の脱塩操作 (-/+) の影響と併せて検討. Cy5 標識した 1 μg/レーンのフェツインをアクリルアミドゲルより抽出後, 再泳動し, ゲル抽出前の RCM (-) フェツインをコントロールとしてバンドの相対シグナル強度を算出

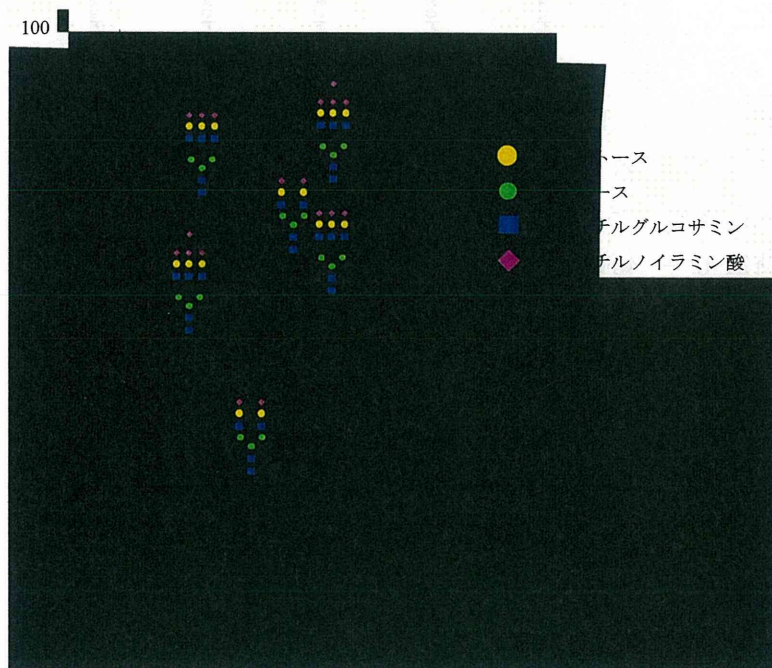


図10 LC/MS により得られた還元アルキル化フェツイン由来

N-結合型糖鎖のプロファイル(ポジティブイオンモード)

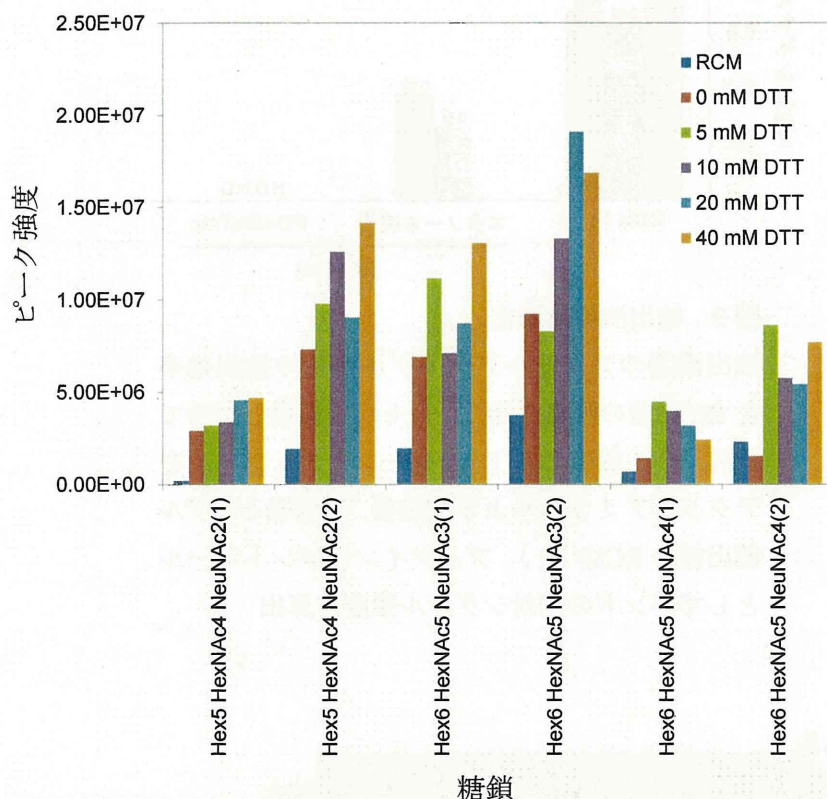


図 11 PNGase F による糖鎖切り出し条件の検討.

モデル糖タンパク質としてフェツインを用いた. RCM, 還元アルキル化した後, ゲルろ過により精製したフェツインから切り出した糖鎖; 0 - 40 mM DTT, 0 - 40 mM DTT を添加したリン酸緩衝液中で切り出した糖鎖. Hex, ヘキソース(マンノース及びガラクトース); HexNAc, N-アセチルヘキソサミン(N-アセチルグルコサミン); NeuNAc, N-アセチルノイラミン酸

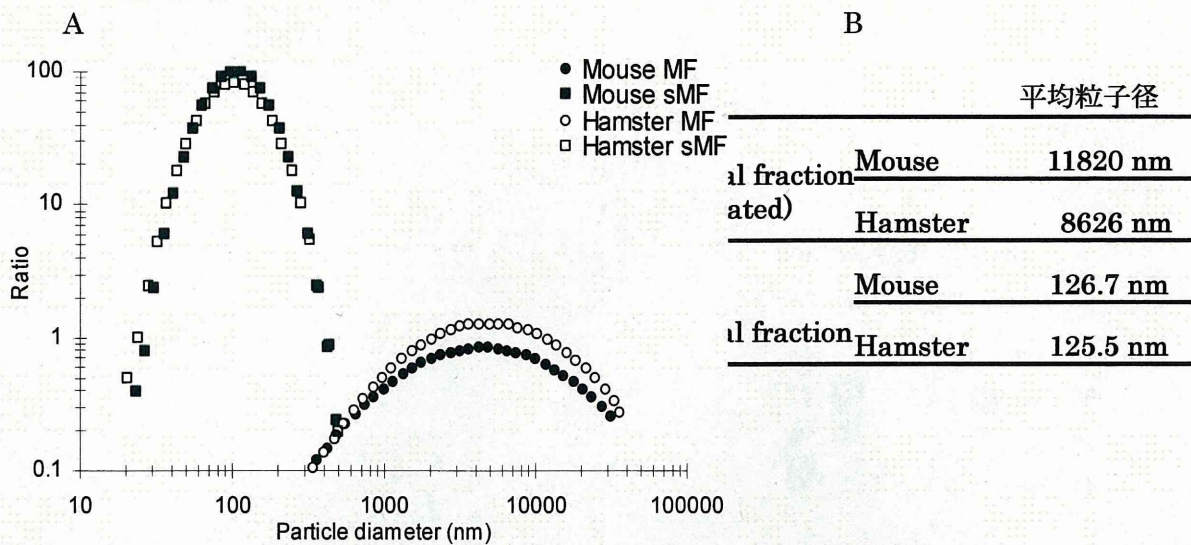


図 12 マウス馴化 vCJD 株およびハムスター-263K 株から調整した Microsomal fraction (●, ○) と Sonicated microsomal fraction, sMF (■, □) の粒度分布図 (A) と平均粒子径 (B)

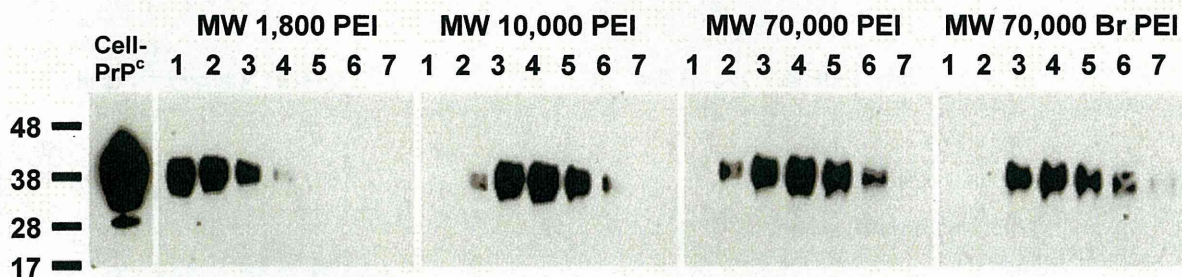


図 13 4 種の PEI ビーズの PrP 吸着能の比較
 分子量及び構造が異なる 4 種類の PEI ビーズ, MW 1800, MW 10000, MW 70000, MW 70000 Br に, 培養細胞由来の組成精した PrP^C を負荷した. レーンの内訳は以下の通りである. Cell-PrP^C; 負荷した PrP^C, 1; Flow through, 2; 200 mM NaCl 溶出画分, 3; 400 mM NaCl 溶出画分, 4; 600 mM NaCl 溶出画分, 5; 800 mM NaCl 溶出画分, 6; 1 M NaCl 溶出画分, 7; PEI ビーズ sample buffer 処理画分.



図 14 クローン間の PrP^C 発現量と mo-vCJD への感染効率
クローン化する前の SP-SC と単クローン化した bSP-SC_148 について, (no)は mo-vCJD 感染前に PK 未処理で, (P5) は mo-vCJD に細胞を感染させてから 5 回経代したものを PK 処理して, それぞれ WB 法により PrP^C と PrP^{res} を検出した. 1 レーンあたりの細胞数は(no), (P5) でそれぞれ 3×10^3 , 1.5×10^5 個となっている.

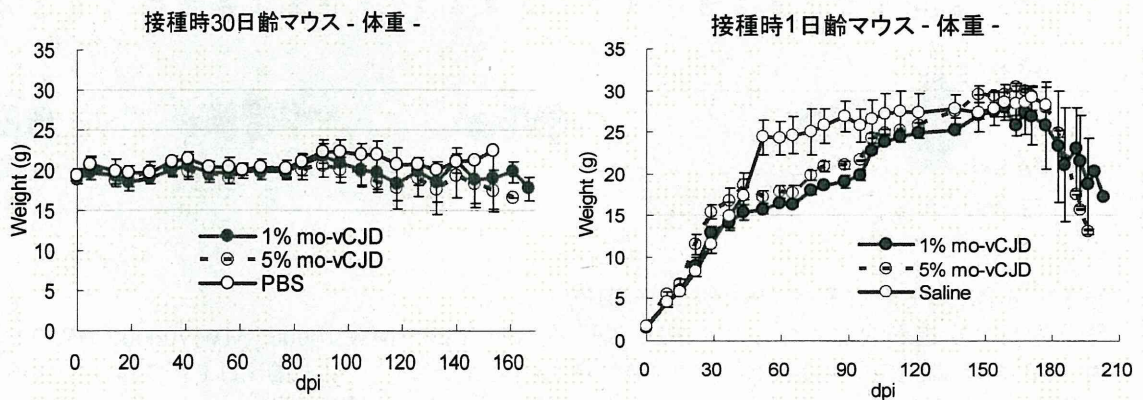


図 15 mo-vCJD 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの体重の推移

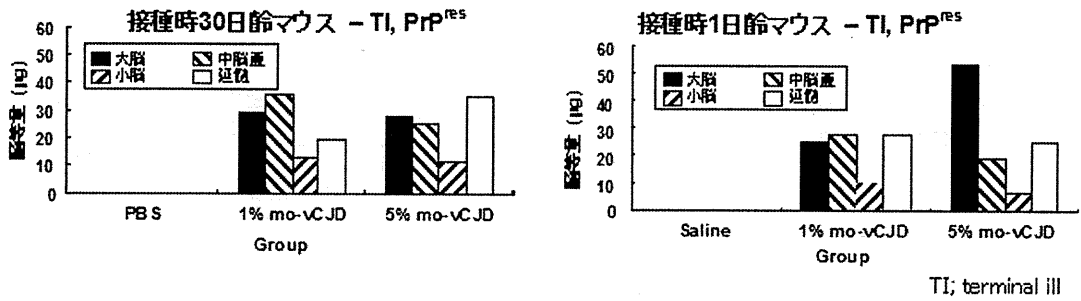


図 16 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの脳内における PrP^{res} の量
採取した脳は 大脳, 中脳, 小脳, 延髄に分け, WB 法により PrP^{res} 量を測定した. Y 軸は測定した 1.6%脳乳剤の, 接種に用いた瀕死状態の接種時 30 日齢マウスに対する脳等量として示した.

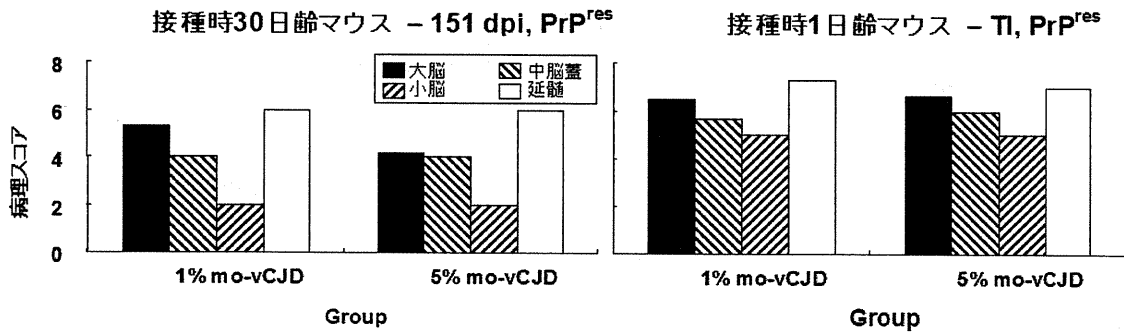


図 17 接種時 30 日齢マウスと 1 日齢マウスの脳の病理学的所見
採取した脳について GFAP, HE 染色を施し, 大脳, 中脳, 小脳, 延髄についてそれぞれスコア化した.

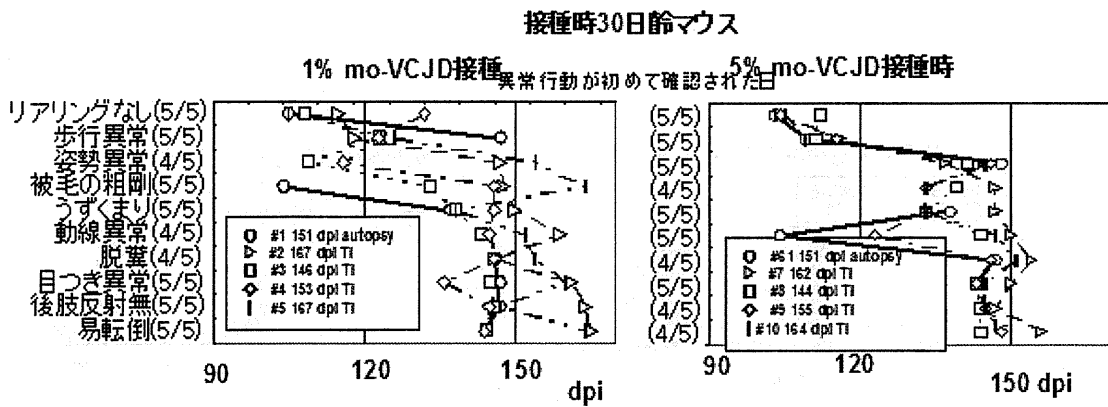


図 18 mo-VCJD 接種時 30 日齢マウスの主な異常行動確認の経時変化

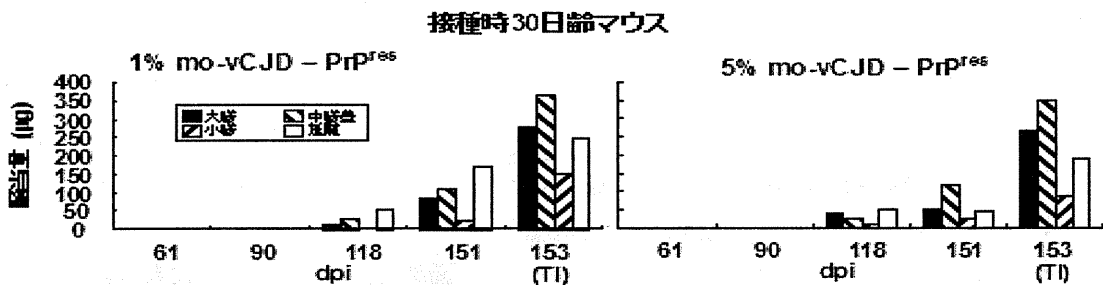


図 19 mo-VCJD 接種時 30 日齢マウスの脳部位別の PrP^{Sc} 蓄積量の経時変化 (定量)

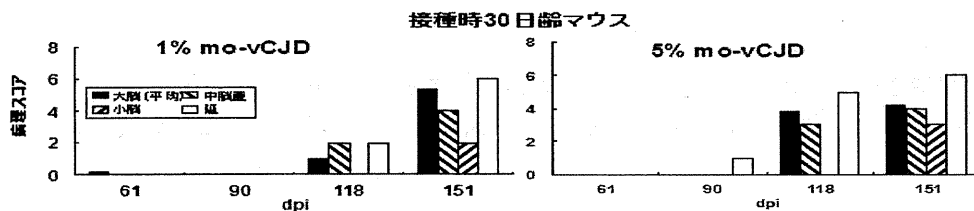
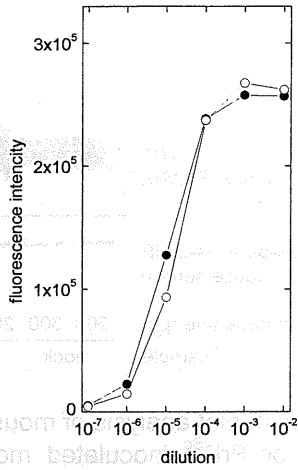
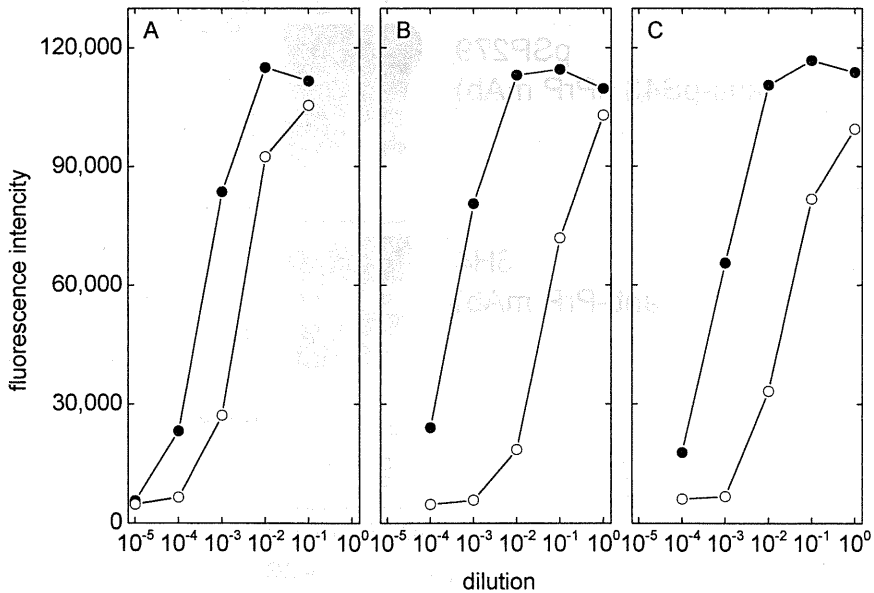


図 20 mo-VCJD 接種時 30 日齢マウスの脳の病理学的所見
採取した脳について GFAP, HE 染色を施し, 大脳, 中脳, 小脳, 延髄についてそれぞれスコア化した。

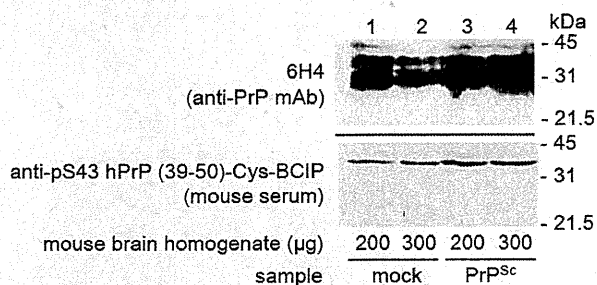


☒ 21 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BCIP mouse serum were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (○) as coating antigen.

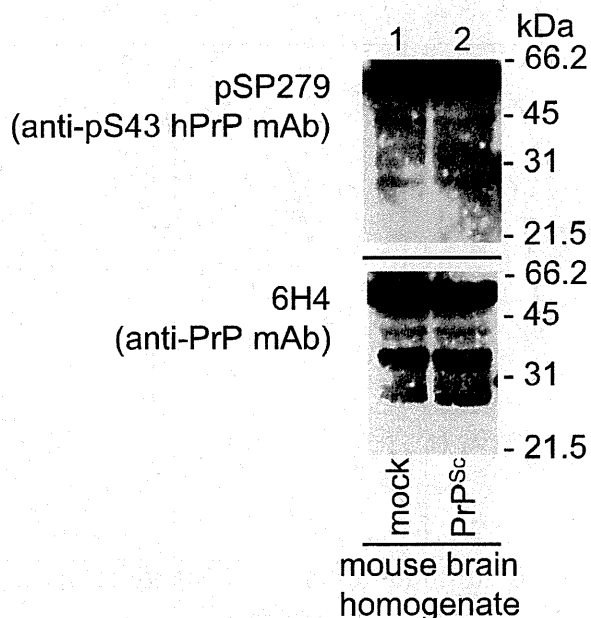


☒ 22 Binding of antibodies to coating antigen in ELISA. Various concentration of anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP antibodies were incubated with pS43-hPrP (39-50)-Cys-MBS-BSA (●) or hPrP

(39-50)-Cys-MBS-BSA (O) as coating antigen. A, pSP240; B, pSP279; C, pSP289.



☒ 23 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lanes 1 and 2) and PrP^{Sc} (lanes 3 and 4) were detected with anti-PrP mAb 6H4 (upper panel) and anti-pS43-hPrP (39-50)-Cys-BCIP mouse serum (lower panel).



☒ 24 Immunoblot analysis of mouse PrP^{Sc}. The mock or PrP^{Sc} inoculated mouse brain were prepared. Brain homogenates were subjected to SDS-PAGE. Mock (lane 1) and PrP^{Sc} (lane 2) were detected with

anti-pS43 hPrP mAb pSP249 (upper panel)
and anti-PrP mAb 6H4 (lower panel).

表 1. アクリルアミドゲルからの抽出条件とフェツインの回収率

試料	固定	染色	脱色液	抽出液	回収率
3 μ g ↓	+	CBB	-	I	N.D.
	+	CBB	①	I	N.D.
	+	CBB	②	I	N.D.
	+	CBB	-	II	30%
	+	CBB	①	II	43%
	+	CBB	②	II	33%
	+	CBB	-	III	10%
	+	CBB	①	III	10%
	+	CBB	②	III	N.D.
2 μ g ↓	+	CBB	①	II	30%
	+	CBB	①	III	15%
	+	CBB	①	I	10%
	+	SYPRO	③	II	40%
	-	SYPRO	③	II	55%

脱色液① : 30% アセトニトリル/5% 酢酸

脱色液② : 30% メタノール/5% 酢酸

脱色液③ : 50% メタノール

抽出液 I : 50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA (pH7.5)

抽出液 II : ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)

抽出液 III : 0.1% トリフルオロ酢酸/50% アセトニトリル

表 2. アクリルアミドゲルからの抽出用緩衝液

抽出液	組成
①	ギ酸/水/2-プロパノール (1:3:2, v/v/v)
②	33% 2-プロパノール
③	50% アセトニトリル
④	50 mM トリス-塩酸/150 mM 塩化ナトリウム/0.1 mM EDTA, pH 7.5

表3 各種ろ過膜によるPBS中のvCJD除去 (WB法による評価)

プリオン株	プリオン材料	Planova 15N (孔径約 15nm)	Mustang E (孔径約 200nm)	Zetaplus 90LA (孔径約 0.1~0.5μm)
vCJD	sMF ¹⁾	2.8	≥3.5	2.8
Scrapie 263K	sMF ¹⁾	≥3.2	Effective ²⁾	≥2.4

除去能はLog Reduction Factorとして示した。

1) : 感染動物脳由来MFを超音波処理したもの。

2) : 定性評価の為数値は示していない

表4 マウス馴化vCJD sMFを用いたプリオン除去効果

Condition	Antithrombin	Albumin	PBS
Filter	Planova15N	Planova15N	MW 70000 Br
Log Reduction Factor	≥3.5	≥3.1	Effective

表5 mo-vCJD接種から主要な病態発症までの期間 (dpi: days post-infection)

	接種時30日齢マウス		接種時1日齢マウス	
	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD	1% mo-vCJD	5% mo-vCJD
Terminal illに至るまでの期間	158 dpi	153 dpi	191 dpi	196 dpi
体重減少開始	90 dpi	90 dpi	159 dpi	164 dpi
異常行動開始*	約100 dpi	約100 dpi	188 dpi	191 dpi

*接種時30日齢マウスと1日齢マウスでは評価項目が異なる

表6 抗リン酸化プリオン蛋白質抗体の特異性

抗体	アイソ タイプ	抗体価		比率
		固相抗原		
		リン酸化 プリオン	プリオン ペプチド	
pSP240	κ, γ2b	2,222	333	7
pSP279	κ, γ2b	2,500	18	138
pSP289	κ, γ2b	1,429	31	46

異常型プリオンの検出のための処理方法に関する試験／調査研究

研究分担者：橋井 則貴 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部第一室長

研究要旨 異常型プリオン (PrP^{Sc}) の除去工程の開発、及び不活化能評価法を確立するためには、PrP^{Sc} の高感度かつ高特異的検出法の開発が不可欠である。プリオンタンパク質は糖タンパク質であり、PrP^{Sc} と正常プリオンタンパク質 (PrP^C) の糖鎖構造が異なることが示唆されている。PrP^{Sc} に特異的な糖鎖構造を見出すことで、PrP^{Sc} 特異的検出法の開発に繋がる可能性がある。そこで本研究では、微量プリオンタンパク質及びその糖鎖の効率的回収法の確立を目的として、アクリルアミドゲルからの微量糖タンパク質抽出法、及び微量糖タンパク質からの糖鎖調製法について最適化を行った。

A. 研究目的

遺伝子組換え医薬品等の開発における異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の混入／迷入の低減、および製造工程における PrP^{Sc} の除去・不活化能を評価するためには、PrP^{Sc} の高感度かつ高特異的検出法の開発が不可欠である。PrP^{Sc} を特異的に検出するためには、正常プリオンタンパク質 (PrP^C) との構造の違いを明確にして、PrP^{Sc} に特異的な構造を標的とした検出技術を開発することが重要である。PrP^{Sc} および PrP^C は、209 個のアミノ酸残基からなる同一配列を持つ GPI アンカー型の糖タンパク質であり、β シートおよびα ヘリックス構造の割合が異なること、さらに PrP^{Sc} は protease K に抵抗性を示すが PrP^C は感受性を示すことなどが明らかにされている。PrP^{Sc} および PrP^C には 2 つの N 結合型糖鎖が結合しており、PrP^{Sc} の糖鎖構造については、protease K

消化により調製された変異型 CJD モデル 263K 株を用いた研究により、複合型 2 本鎖、3 本鎖および 4 本鎖糖鎖が結合していること、さらに一部の糖鎖の側鎖にはルイス x やシアリルルイス x 構造が付加していることが報告されている。これに対して PrP^C の糖鎖構造は、タンパク質部分が protease K に対して感受性であり精製が困難であることから、未だに十分に明らかにされていない。PrP^{Sc} 特異的糖鎖構造を見出すためには、PrP^C の糖鎖構造を明らかにする必要がある。プリオンタンパク質のような微量タンパク質の分画・濃縮には、一般に、ゲル電気泳動が有用であるが、糖タンパク質の場合、ゲル片からの回収率がよくないこともあり、ゲル電気泳動を用いた方法はあまり用いられていない。そこで本研究では、モデル糖タンパク質を用いて、電気泳動ゲルから糖タンパク質を回収する方法の最適化を検討

した。

異常型プリオン (PrP^{Sc}) は、細菌、真菌、マイコプラズマ及びウイルス等と同様に外来性感染物質の一つであり、バイオ医薬品の開発において、PrP^{Sc}の混入/迷入の低減は、医薬品の安全性を確保するための課題となっている。PrP^{Sc}の除去工程の開発、及び不活化能評価法を確立するためには、PrP^{Sc}の高感度かつ高特異的検出法の開発が不可欠である。正常プリオンタンパク質 (PrP^C) は、209 個のアミノ酸残基からなるホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型糖タンパク質である。PrP^{Sc}は PrP^Cが二次構造の変化を起こしたものとされており、PrP^Cと比較してβ-シート構造の割合が高いことが特徴である。また、PrP^{Sc}はprotenase Kに抵抗性を示すがPrP^Cは感受性を示すこと、PrP^{Sc}は難溶性で凝集体を形成しやすいがPrP^Cは可溶性であることなどが明らかにされている。プリオンタンパク質は2箇所のN-結合型結合部位を有しており、糖鎖が二次構造の変化に影響を及ぼすことが報告されている (Zhong L *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 26, 525-533, 2009)。即ち、PrP^{Sc}とPrP^Cの糖鎖構造が異なることが示唆されており、PrP^{Sc}に特異的な糖鎖構造を見出すことで、糖鎖を指標とした特異的検出法の開発に繋がる可能性がある。

そこで本研究では、微量プリオンタンパク質及びその糖鎖の効率的回収法の確立を目的として、アクリルアミドゲルからの微量糖タンパク質抽出法、及び微量糖タンパク質からの糖鎖調製法について最適化を行った。

B. 研究方法

1. 還元アルキル化タンパク質の調製

モデル試料としてフェツイン (SIGMA, Cat. No. F3004) を使用した。乾燥フェツインを 50 µl の 8 M グアニジン-HCl / 0.5 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解させた後、2 µl の 1 M dithiothreitol (DTT, 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、4.8 µl の 1 M モノヨード酢酸ナトリウムを加えて室温下、暗所で 40 分間反応させてカルボキシメチル化した。反応終了後、PD MiniTrap G-25 desalting column (GE Healthcare) を用いて脱塩し、還元アルキル (RCM) 化タンパク質とした。

2. アクリルアミドゲルからの糖タンパク質回収

1) クーマシーブルー染色ゲルからの糖タンパク質回収

モデル試料としてフェツイン (SIGMA, Cat. No. F3004) を使用した。フェツインを還元処理した後、5~20%グラジエントゲル (ATTO) に表 1 に示すタンパク質量をアプライシ、Laemmli 法により 20 mA・80 min 分離した。固定化試薬を含むクーマシーブルー染色液 (SimplyBlue™ SafeStain, invitrogen) で染色した後、目的とするフェツインのバンド部分を切り出して数 mm 程度の角片とし、タンパク低吸着マイクロチューブに回収した。次に、表 1 に示す脱色液を各チューブに 500 µl 加え、マイクロチューブ攪拌機を用いて 15min 室温で振盪した。脱色液を取り除き、再び等量の脱色液を加えて 15 min 室温で振盪した。脱色済みのゲル片をミリ Q 水で軽く洗浄した後、キ