

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年4月27日 (27.04.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/043405 A1

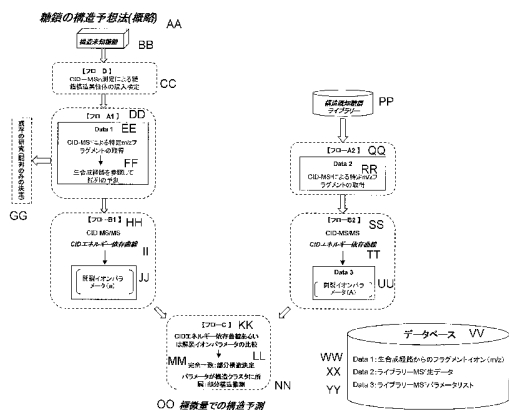
- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/018134
- (22) 国際出願日: 2005年9月30日 (30.09.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2004-303358
2004年10月18日 (18.10.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱化学株式会社 (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1080014 東京都港区芝五丁目3番8号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 蟹江 治 (KANIE, Osamu) [JP/JP]; 〒1948511 東京都町田市南大谷11号

- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ANALYZING STRUCTURE OF SUGAR CHAIN

(54) 発明の名称: 糖鎖構造解析方法



- AA METHOD OF PROSPECTING STRUCTURE OF SUGAR CHAIN (OUTLINE)
- BB SUGAR CHAIN OF UNKNOWN STRUCTURE
- CC [FLOW D] ASSAY OF MIXING OF SUGAR CHAIN STRUCTURAL ISOMER BY CID-MSⁿ MEASUREMENT
- DD ACQUIRE SPECIFIED m/z FRAGMENT BY CID-MSⁿ
- EE PREDICT SEQUENCE WITH REFERENCE TO BIOSYNTHETIC ROUTE
- GG STUDY EXISTENCE (DETERMINE SEQUENCE ONLY)
- HH [FLOW B1]
- II CID ENERGY-DEPENDENT CURVE
- JJ CLEAVAGE ION PARAMETER (A)
- KK [FLOW C]
- LL COMPARE CID ENERGY-DEPENDENT CURVE OR CLEAVAGE ION PARAMETER
- MM COMPLETE AGREEMENT, PARTIAL STRUCTURE DETERMINATION
- NN BELONGING OF PARAMETER TO STRUCTURAL CLUSTER, PARTIAL STRUCTURE PREDICTION
- OO STRUCTURE PREDICTION WITH EXTREMELY MINUTE AMOUNT
- PP LIBRARY OF SUGAR CHAINS OF KNOWN STRUCTURE
- QQ [FLOW A2]
- RR ACQUIRE SPECIFIED m/z FRAGMENT BY CID-MSⁿ
- SS [FLOW B2]
- TT CID ENERGY-DEPENDENT CURVE
- UU CLEAVAGE ION PARAMETER (A)
- VV DATA BASE
- WW DATA 1: FRAGMENT ION (m/z) FROM BIOSYNTHETIC ROUTE
- XX DATA 2: LIBRARY MSⁿ RAW DATA
- YY DATA 3: LIBRARY MSⁿ PARAMETER LIST

(57) Abstract: A method of analyzing the structure of sugar chain through performing of CID-MSⁿ measurement as to a sugar chain of unknown structure and comparing of thus obtained data with reference data acquired in advance. There is provided a method of analyzing the structure of sugar chain, characterized in that (a) as to a target sugar chain, CID-MSⁿ measurement is carried out until obtaining of specified m/z fragment ion, (b) as to the fragment ion, further CID-MS/MS measurement is carried out to thereby prepare a CID energy-dependent curve showing the relationship between total ion count of obtained specified m/z daughter ion and CID energy, and (c) this CID energy-dependent curve is compared with the CID energy-dependent curve of the same m/z daughter ion as above-mentioned daughter ion obtained by CID-MS/MS measurement of the same m/z fragment ion as above-mentioned fragment ion obtained from a reference sugar chain of known structure.

(57) 要約: 本発明の目的は、構造未知の糖鎖についてCID-MSⁿ測定を行い、得られたデータをすでに取得されている参照データと比較することにより糖鎖の構造解析を行う方法を提供することである。本発明によれば、(a) 目的糖鎖について特定のm/zのフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定のm/zの娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線と、構造既知の参照糖鎖から得られた、上記フラグメントイオンと同一のm/zのフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一のm/zの娘イオンのCIDエネルギー依存曲線とを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法が提供される。

WO 2006/043405 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

糖鎖構造解析方法

技術分野

[0001] 本発明は、構造未知の糖鎖についてCID-MSⁿ測定を行い、得られたデータをすでに取得されている参照データと比較することにより該糖鎖の構造解析を行う方法に関する。さらに本発明は、構造既知の複数の参照糖鎖をCID-MSⁿ測定することにより得られる複数の特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線からなるCIDエネルギー依存曲線ライブラリーに関する。

背景技術

[0002] 糖鎖は主に細胞表面に糖タンパク質や糖脂質の一部として存在し、発生、分化誘導、受精、免疫、癌化、感染症等、様々な生命現象に深く関与している。このように多彩な機能を有する糖鎖の研究は近年盛んになっている。また、糖鎖は、タンパク質の翻訳後修飾の重要な部分を占め、今後の大きな研究対象である。糖タンパク質や糖脂質の機能は糖鎖により制御される場合があり、糖鎖の構造解析を極微量において達成する技術が必要である。しかし、糖鎖は生物工学的手法により増幅ができない分子種であるため、微量の物質のみで構造解析を達成することを可能とする新たな構造解析技術の開発が必要である。タンパク質の配列はゲノム配列が判明している場合、対応するタンパク質のアミノ酸配列も取得できるため、目的のタンパク質のアミノ酸配列は質量分析(例えば、MS/MS法)により解析することができる。しかし、被修飾タンパク質の配列解析技術については今後の課題として残されている。特に、糖鎖によるタンパク質の修飾は極めて大きな分子の多様性を生み出している。したがって、糖鎖の構造解析技術の開発は必要不可欠である。

[0003] 糖鎖は、核酸やタンパク質とは異なり配列以外の要因による構造異性体群を形成している。この理由の基本は、糖鎖を形成する単糖には反応点となる水酸基が複数存在するため結合位置異性体を形成する性質を有し、かつ、単糖間の結合の際にはアノメリック位の立体異性によるアノマー異性体を形成する性質を有しているため

である。単糖間の結合は、生物体内においては糖鎖の合成に関わる酵素群の連続反応により行われるため、必ずしも組み合わせの原理に基づく糖鎖群を形成しているわけではない。しかし、酵素反応は副反応を伴うことが知られており、このような現象の生物における意味は解明されておらず、このような場合には遺伝情報によることのない全く新しい概念に基づく構造解析法が必要である。もちろん、遺伝情報が解明されていない、また、糖鎖の生合成経路が解明されていない生物種における糖鎖構造の解析についても新しい構造解析法が必要である。

[0004] 現在用いられている糖鎖の構造解析技術としては、(1)核磁気共鳴分光法、(2)質量分析法、(3)多次元クロマトグラフィーによるマッピング法(Royle, L. et al., *Anal. Biochem.*, 2002,304,70-90を参照)、(4)加水分解酵素による特異的部分加水分解法(Chaplin, M.F et al., *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford,1994を参照)、(5)レクチンによるマッピング法(Chaplin, M.F et al., *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford,1994を参照)、及び(6)メチル化-加水分解-ガスクロマトグラフィーによる組成分析法(Chaplin, M.F et al., *Carbohydrate Analysis, A Practical Approach*, IRL Press, Oxford,1994を参照)をあげることができ、通常はこれらを組み合わせて糖鎖の解析が行われている。

[0005] 上記の中でも特に有効な糖鎖の解析手段としては、核磁気共鳴分光法及び質量分析法をあげることができるが、前者の問題点は解析に必要な量が μg 以上であることであり、後者の問題点は立体異性体の解析が不可能なことである。これらの方法を含めいずれの解析法を用いるにせよ、糖鎖の構造解析は、得られた天然糖鎖構造の構造解析を直接行わなければならない(Dell, A., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1987, 45, 19-72を参照)。

[0006] 一方、異なる糖鎖を質量分析することにより、その結果が異なることが示されている。例えば、ステロイドの水酸基の立体異性体のCID-MS/MS測定によるフラグメント化を行うと、各フラグメント強度が異なること(Faretto, D. et al., *Mass Spectrom.*, 1991,5,240-244を参照)や、合成された硫酸化糖鎖の構造異性体のCID-MS/MS測定をFAB-q-Massで行って、特定イオンの強度を測定すると、その値に差があること(Kurono, S. et al., *J. Mass Spectrom.*, 1998, 33,35-44を参照)が示されている。

- 。しかし、これらはいずれも具体的に糖鎖の構造解析方法を示すものではなかった。
- [0007] 質量分析装置を用いる糖鎖の構造解析技術において一般的な構造解析法としては、 m/z とそのピーク強度をパラメータとし、構造既知の糖鎖のそれと比較することで同一構造か否かの判定をする方法がある(Viseux, N. et al., Anal. Chem. 1998, 70, 4951-4959、およびKameyama, A. et al., Anal. Chem. 2005, 77, 4719-4725を参照)。この方法は、特定の一点の電圧におけるフラグメントのピーク強度を指標とし、各々のフラグメントの強度が総合的に一致するか否かをスコア化して判定する方法であり、参照とする化合物群の網羅的なデータセット、あるいは、網羅的なデータベースが必要である。また、この方法の限界は、合否の判定をするだけで否の場合の構造予測が不可能な点であった。
- [0008] 構造的に類似性のある化合物群に対しては、多変量解析が、質量分析により得られたデータから構造的特徴を抽出するのに新たな可能性を与えることを示唆している報告があるが、2糖の構造予測に応用できることを報告しているにすぎず、長い糖鎖の構造予測の可能性については具体的には何も触れていない(Faengmark, I. et al., Anal. Chem. 1999, 71, 1105-1110)。
- [0009] さらに、質量分析法は極微量分析であり、検出される質量数(H、Na付加等)から物質の分子量が分かると共に、フラグメントイオンの解裂様式から、分子構造に関して重要な情報を得ることができるものの、サンプルに異性体(構造異性体、光学異性体)が混入して存在する場合、質量分析計のみではその混入物の存在すら識別できなかった。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明の目的は、構造未知の糖鎖についてCID-MSⁿ測定を行い、得られたデータをすでに取得されている参照データと比較することにより該糖鎖の構造解析を行う方法を提供することである。具体的には、本発明の目的は、構造解析の目的糖鎖に関する特定の m/z のフラグメントイオンについてCID-MS/MS測定を行い、得られたCIDエネルギー依存曲線を、同一の m/z の親イオンから同一の m/z の娘イオンを得た参照データであるCIDエネルギー依存曲線と比較して、同一か否かを特定

することにより該糖鎖の構造決定を行う方法を提供することである。本発明の別の目的は、上記の目的糖鎖および参照糖鎖のCIDエネルギー依存曲線について、これらの曲線の特徴付ける数値で表した解裂イオンパラメータをそれぞれ作成し、これらのパラメータを統計的に解析することにより、目的糖鎖の構造決定又は構造推定を行う方法を提供することである。本発明のさらに別の目的は、質量分析計のみを用いた糖鎖の構造異性体混合物を識別するための分析方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を達成するために鋭意検討を進めた結果、構造が異なる糖鎖および立体異性の糖鎖を合成し、特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成したところ、同一の構造を有する糖鎖は複数回これを測定しても同一のCIDエネルギー依存曲線が得られ、逆に構造が異なる糖鎖はCIDエネルギー依存曲線も異なることを見出した。また、立体異性体もCIDエネルギー依存曲線が異なることを見出した。さらに、糖鎖の部分構造、そこから得られるCIDエネルギー依存曲線またはCIDエネルギー依存曲線のパラメータが一致しなくても、パラメータの統計的解析に基づき部分構造を推定できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

[0012] すなわち本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線と、構造既知の参照糖鎖から得られた、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線とを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法。

[0013] (2) 構造既知の複数の参照糖鎖をCID-MSⁿ測定することにより得られる複数の

特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線からなるCIDエネルギー依存曲線ライブラリー。

(3) 参照糖鎖が3糖からなることを特徴とする(2)に記載のライブラリー。

[0014] (4) (2)に記載のCIDエネルギー依存曲線から作成された、構造既知の複数の参照糖鎖の解裂イオンパラメータからなる解裂イオンパラメータライブラリー。

(5) 構造既知の複数の参照糖鎖の解裂イオンパラメータが、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、CIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータであることを特徴とする、(4)に記載のライブラリー。

(6) 参照糖鎖が3糖からなることを特徴とする(4)または(5)に記載のライブラリー。

[0015] (7) (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線と、(2)または(3)に記載のライブラリーに含まれる、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線とを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法。

[0016] (8) (1)または(7)に記載の(c)の工程において、目的糖鎖の特定の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータを作成し、該解裂イオンパラメータと、構造既知の参照糖鎖の上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータとを比較することを特徴とする、(1)または(7)に記載の方法。

[0017] (9) 解裂イオンパラメータが、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、CIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータであることを特徴とする、(8)に記載の方法。

- [0018] (10) (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータを作成し、(d) 該解裂イオンパラメータと、(4)～(6)のいずれかに記載のライブラリーに含まれる、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線から作成された解裂イオンパラメータを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法。
- [0019] (11) CIDエネルギー依存曲線の特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数が、特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数と、該娘イオンの総イオンカウント数と親イオンの総イオンカウント数の和の比であることを特徴とする(1)または(7)～(10)のいずれかに記載の方法。
- [0020] (12) 目的糖鎖に含まれる異なる特定の m/z のフラグメントイオンについて(1)もしくは(7)に記載の(a)～(c)の工程または(10)に記載の(a)～(d)の工程を繰り返し、それらの結果を組み合わせることを特徴とする糖鎖構造解析方法。
- [0021] (13) 少なくともCID-MSⁿ測定装置、(2)～(6)のいずれかに記載のライブラリーをコンピューター読み取り可能なように記録した記録媒体、および目的糖鎖に含まれる異なる特定のフラグメントイオンについて(1)もしくは(7)に記載の(b)および(c)の工程または(10)に記載の(b)～(d)の工程を行なうためのプログラムを記録した記録媒体を含む糖鎖構造解析システム。
- [0022] (14) (a) 糖鎖検体について特定の m/z のフラグメントイオンが消失しないような任意の電圧でCID-MSⁿ測定を行い、(b) 残存する該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、(c) 前記2工程で得られたマススペクトル、CIDエネルギー依存曲線または該曲線の解裂イオンパラメータを比較することを特徴とする、糖鎖構造異性体の混入検定方法。
- 発明を実施するための最良の形態
- [0023] 以下、本発明を更に詳細に説明するが、以下の構成要件の説明は、本発明の実

施態様の代表例であり、本発明はこれらの内容のみに特定されるものではない。

以下の説明において、「CID-MSⁿ測定」とは、CID (Collision induced dissociation : 衝突誘起解離) による多段マススペクトロメリーの取得を行うことを示し、「フラグメントイオン」とは、上記CID-MSⁿ測定や物理化学的分解等により得られる各 m/z を有するイオンを示し、「 m/z 」とは、質量数(m)と電荷(z)の比を示し、「娘イオン」とは、フラグメントイオンを上記CID-MSⁿ測定することにより得られる各 m/z を有するフラグメントイオンを示し、「総イオンカウント数」とは、各 m/z を有するすべてのフラグメントイオンのイオン強度の総和を示し、また、「CIDエネルギー」とは、CIDを起こすときに加えるエネルギーを一般的に示し、実際にはイオンを振動させるためのある周波数の電場の電圧を示す。さらに、「構造解析方法」とは、構造決定方法および/または構造推定方法を意味する。

[0024] 本発明の方法を図1～5に示し、この図に従って以下に本発明を説明する。

(1) 構造解析方法の概略(図1)

本発明は、構造未知の糖鎖(本明細書中では、これを「目的糖鎖」と称することがある)を特定の m/z のフラグメントイオン(以下、これを「親イオン」又は「親フラグメントイオン」と称することがある)が得られるまでCID-MSⁿ測定を行い(フローA1)、得られた親フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行う(フローB1)。ここで、得られた特定の m/z を有する娘イオンについて総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、必要に応じて該曲線の各特長をパラメータ化した解裂イオンパラメータを作成する(フローB1)。一方、参照データとして、構造既知の糖鎖(本明細書中では、これを「参照糖鎖」と称することがある)またはそのライブラリーについて、特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い(フローA2)、得られたフラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行う(フローB2)。ここで、得られた特定の娘イオンについて総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、必要に応じて該曲線の各特長をパラメータ化した解裂イオンパラメータを作成する(フローB2)。本明細書中では、これら参照糖鎖のCIDエネルギー依存曲線および解裂イオンパラメータをあわせて「参照データ」と称することがある。なお、フローA1に先立

って、目的糖鎖についてCID-MSⁿ測定による糖鎖構造異性体の混入検定を行ってもよい(フローD)。

[0025] かくして得られた目的糖鎖の特定の m/z のフラグメントイオンから得られた特定の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線、または解裂イオンパラメータを、参照データと比較し(フローC)、目的糖鎖のデータと一致する参照データがあった場合に、その参照データが得られた参照糖鎖と目的糖鎖の一部の構造が一致すると判断することができる。

[0026] また、目的糖鎖のデータと参照データが一致しない場合でも、目的糖鎖のパラメータが参照糖鎖のパラメータの統計的解析結果の範囲内であれば、部分構造を推定することができる。本発明には、このような構造の推定を行う方法も含まれる。

[0027] このようにして目的糖鎖の一部の構造が決定または推定された場合、これらを目的糖鎖の生合成経路を参照する等して全体の構造を決定または推定していく(フローA1)ことができる。

[0028] (2) 目的親フラグメントイオンの調製(図1・図2/フローA1)

本発明に用いられる目的糖鎖は、以下に説明する方法により分解するなどしてCID-MSⁿ測定を行い得るものであればいかなるものであってもよい。また、構造解析を目的として本発明の方法に供するものであるので、その全部または一部の構造が未知のものが好ましい。目的糖鎖は、生体組織又は細胞等から得られたものでもよいし、合成されたタンパク質に結合したのから得られたものでもよく、またそれを酸加水分解又は酵素分解したり、さらにHPLC等で分離精製したもの等を用いることができる。また、化学合成された糖鎖を用いることもできる。

[0029] 本発明では、目的糖鎖と参照糖鎖から得られる同一の m/z を有する親イオンについて、CID-MSⁿ測定して得られる娘イオン強度を比較するので、参照データを誘導する親イオン(以下、これを「参照親フラグメントイオン」と称することがある)と同一の m/z を有するフラグメントイオン(以下、これを「目的親フラグメントイオン」と称することがある)が得られるまで何らかの方法で分解する必要がある。分解の方法は、それ自体公知の常法を用いることができるが、例えば、酸加水分解、酵素分解等により得られる糖鎖を液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ゲル電気泳動等によ

り分離精製して用いることもでき、あるいは後述するCID-MSⁿ測定等により得られる任意のフラグメントイオンをm/zにより分離して用いることができる。フローA1では、参照糖鎖として3糖ライブラリーを用いた場合を示しているの、目的糖鎖を1~3糖に分解することが望ましい。また、目的糖鎖が置換基を有する場合、これを除去しても、また参照データに置換基を含むものがあれば付いたままでも用いることができる。最終的に得られた目的糖鎖分解物は、それぞれ質量分析することによりm/zを確認し、この質量とその他の情報、例えば生合成経路などの情報から配列を決定することもできるが、本発明の方法は、ここで決定することのできなかつたフラグメントイオンについて用いることができる。

[0030] (3) 目的親フラグメントイオンのCID-MSⁿ測定 (図1、図3/フローB1)

上記で得られた目的親フラグメントイオンは、これをCID-MSⁿ測定する(CID-MSⁿ測定により得られた目的親フラグメントの場合は、これをCID-MS/MS測定する)。

[0031] イオン化法としては、FAB(高速原子衝撃法)、CI(化学イオン化法)、ESI(エレクトロスプレーイオン化法)、MALDI(マトリクス支援レーザー脱離イオン化法)、APCI(大気圧化学イオン化法)等が用いられるが、本発明においてはサンプル調製が容易で、かつ、マトリクス由来の夾雑イオンの影響がないESI法を用いることが好ましい。しかし、上記CID-MSⁿ測定が可能であればイオン化法はこれらに限定されるものではない。また、ESI法にはマイクロスプレー法とナノスプレー法があるが、サンプル使用量の面から本発明においてはナノスプレー法が好ましく用いられる。

[0032] 上記目的糖鎖またはその分解物をイオン化する場合、微液滴を真空下溶媒を蒸発させることでイオン化するため水/メタノールあるいは水/アセトニトリル(1:1)を溶媒として用いることができるが、物質の性質に従い選択が可能でありこれに限られることはない。目的糖鎖またはその分解物は、この溶媒に対して0.01~100nmol/ml、より好ましくは0.5~5nmol/ml、さらに好ましくは1nmol/mlの濃度に溶解することが好ましい。

[0033] また、CID-MSⁿ測定を行なう装置は、これが可能であれば、機種を問うものではないが、本発明においては、CID-MSⁿ測定が可能な四重極イオントラップ型質量

分析計を用いることが好ましい。このような装置としては、具体的には例えば、esquire 3000 plus (ブルカーダルトニクス社製)、LCQ DECA (サーモフィニガン社製)、AXIMA QIT (島津社製)、LCMS-IT-TOF (島津社製) 等が挙げられる。測定方法としては、各親フラグメントイオンから解離する娘イオンのイオン強度が測定できる方法であればいかなるものでもよいが、具体的には、例えば、熱キャピラリー温度 20~365°C、キャピラリー電圧 0~6.0kV、CID エネルギーが 0~25V、ポジティブモードまたはネガティブモードのいずれか等で測定することができる。ポジティブモードを用いる場合には、プロトン、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、アンモニウム等の陽イオンを選択して用いることができる。

- [0034] 目的親フラグメントイオンについて、さらに上述のCID-MSⁿ測定(またはCID-MS/MS測定)を行なう。該測定により得られたプロットから、特定のm/zの娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成する(式1)。このうち、特定のm/zの娘イオンの総イオンカウント数を、該娘イオンの総イオンカウント数と、該娘イオンの総イオンカウント数と上記親イオンの総イオンカウント数の和との比で表すことが好ましい(式2)。なお、式1及び式2は、親イオンAから娘イオンa, b, c, d, ..., (i), ...nが生成する場合の関係式を示す。この比で娘イオン強度を表すことにより、微弱なその他のイオンカウント数に影響を受けず、正確なCIDエネルギー依存曲線を作成することができる。特定のm/zの娘イオンとは、目的親フラグメントイオンから解離する何れの娘イオンでもよいし、その全てでもよい。

- [0035] [数1]

$$y = \frac{[I.C.^i]}{[I.C.^A] + \sum_a^n [I.C.^i]} \times 100$$

- [0036] [数2]

$$y = \frac{[I.C.^i]}{[I.C.^A] + [I.C.^i]} \times 100$$

[0037] さらに、上記CIDエネルギー依存曲線をそれ自体公知の方法で、特徴付ける数値で表すことにより、解裂イオンパラメータを作成することもできる。

[0038] 解裂イオンパラメータとしては、例えば、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、及びCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータを用いることができる。また、CIDエネルギー依存曲線をイオンカウント数の相対数としての基底値(Bottom=0)と最大値(Top=100)、その50%にあたるCIDエネルギー(V_{50})、およびCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き(Slope)を指標として以下の式3により計算し、解裂イオンパラメータとすることもできる。式3の x は、CIDエネルギーを示す。

[0039] [数3]

$$y = Bottom + (Top + Bottom) \left(1 + \exp^{-\frac{V_{50}-x}{Slope}} \right)$$

[0040] 上記のCIDエネルギー依存曲線あるいは解裂イオンパラメータを作成するためのCID-MSⁿ測定において、CID-MSⁿ測定器の機種、あるいは個体間においてデータのばらつきがあると、後述する参照データとの正確な比較が困難となる。そこで、必要に応じてスタンダードとなり得る物質についても同様にCID-MSⁿ測定を行ない、このデータを用いて補正して比較することが好ましい。

[0041] (4) 参照親フラグメントイオンの調製(図1、図2/フローA2)

参照データを取得する目的で、参照糖鎖について上記(2)と同様に親フラグメントイオンを調製する。参照糖鎖は、目的糖鎖の全部または一部の構造を本発明の方法を用いて決定し得るものであればいかなるものであってもよい。具体的には、目的糖鎖またはその一部と構造が一致する可能性があり、構造が明らかであるものが用いられる。このような参照糖鎖は、天然のものでも合成されたものでもよく、また置換基がついていてもよい。糖鎖の長さは、1~13個の糖が連結したものが用いられる。

[0042] この参照糖鎖として、ある特定の集団であるライブラリーを用いることによれば、より網羅的、組織的に目的糖鎖の構造決定を行なうことができる。このようなライブラリー

としては、例えば、2～25個の糖が連結した構造を有しており、ライブラリーを構成する各糖鎖は、天然糖鎖を構成する全ての種類の単糖の順列組み合わせの配列を有するもので、かつ立体異性も含むもの等が好ましく用いられる。また、非天然の単糖を含んでいてもよい。

[0043] また、糖鎖構造を一般化すれば、非還元末端糖、還元末端糖、およびそれらの間に存在する糖からなるポリマー性糖化合物ということができ、このポリマーの最小単位は3糖が連結した糖鎖である。このような3糖からなる天然糖鎖を構成する全ての種類の単糖の順列組み合わせの配列を有するもので、かつ立体異性も含む3糖ライブラリーは、生体に存在するあらゆる直鎖構造を有する糖鎖の部分構造を含んでいるため、本発明の参照糖鎖のライブラリーとしてより好ましい。

[0044] 上記の天然糖鎖を構成する単糖とは、例えば、グルコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、キシロース、シアル酸、グルクロン酸、フコース等が挙げられる。また、これらは修飾基を有していても良い。

[0045] 参照糖鎖および参照糖鎖ライブラリーは、これを化学合成することが好ましい。合成の方法としては、通常用いられるそれ自体公知の方法を用いることができる。化学合成には、上述のような単糖各々を適当に保護した合成ユニットが必要である。さらに、立体異性体から成る糖鎖ライブラリーを効率良く合成するためには、立体選択的な合成では α -グリコシドを得るためには隣接基関与のない保護基、例えばベンジル基(Bn)を、 β -グリコシドを得るためには、隣接基関与のある保護基、例えばアセチル基等を用いる必要がある。これらの立体制御のための保護基の他に通して用いる保護基を用いる必要性から、単糖合成ユニット数は多くなり、合成経路の複雑化につながる。従って、2位の保護基は隣接基関与のない保護基とし、合成経路の簡略化を、例えばPCT/JP2004/009523号明細書に記載の方法等に従って行なうことが好ましい。

[0046] かくして得られた参照糖鎖または参照糖鎖ライブラリーは、これを目的糖鎖と同様に特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行なう。特定の m/z のフラグメントイオンとは、目的糖鎖の親フラグメントイオンが有する m/z と同一のものであればいかなるものでもよい。また、参照糖鎖がライブラリーの場合には、該

ライブラリーの各構成要素から得られる何れの解裂しえるフラグメントイオンでもよく、全ての解裂し得るフラグメントイオンでもよい。

[0047] (5) 参照親フラグメントイオンのCID-MSⁿ測定 (図1、図3/フローB2)

上記(4)で取得された参照親フラグメントイオンは、これを目的親フラグメントイオンと同様にCID-MSⁿ測定する(CID-MSⁿ測定により取得された参照親フラグメントの場合は、これをCID-MS/MS測定する)。イオン化法、溶媒、糖鎖の調製、測定装置などは全て目的糖鎖および親フラグメントイオンと同様のものを用いることができる。該測定により得られたプロットから、特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成する(前述の式1)。このうち、特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数を、該娘イオンの総イオンカウント数と、該娘イオンの総イオンカウント数と上記親イオンの総イオンカウント数の和との比で表すことも好ましい(前述の式2)。この比で娘イオン強度を表すことにより、微弱なその他のイオンカウント数に影響を受けず、正確なCIDエネルギー依存曲線を作成することができる。特定の m/z の娘イオンとは、参照親フラグメントイオンから解離する何れの娘イオンでもよいし、その全てでもよい。さらに、参照糖鎖が、ライブラリーであった場合、該ライブラリーの全ての構成要素から得られる参照親フラグメントイオンについて得られる全ての娘イオンであることが網羅的、組織的解析を行なう上で好ましい。

[0048] さらに、上記CIDエネルギー依存曲線をそれ自体公知の方法で、特徴付ける数値で表すことにより、解裂イオンパラメータを作成することもできる。

[0049] 解裂イオンパラメータとしては、例えば、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、及びCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータを用いることができる。また、CIDエネルギー依存曲線をイオンカウント数の相対数としての基底値(Bottom=0)と最大値(Top=100)、その50%にあたるCIDエネルギー(V_{50})、およびCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き(Slope)を指標として前述の式3により計算し、解裂イオンパラメータとすること等が挙げられる。このとき、他の式によるCIDエネルギー依存曲線

のカーブフィッティングを行なうこともでき、そのような場合には対応するパラメータを用いることができる。

- [0050] 上記した方法により得られる、構造既知の複数の参照糖鎖をCID-MSⁿ測定することにより得られる複数の特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線からなるCIDエネルギー依存曲線ライブラリー、並びに上記CIDエネルギー依存曲線から作成された、構造既知の複数の参照糖鎖の解裂イオンパラメータからなる解裂イオンパラメータライブラリーも本発明に含まれる。
- [0051] さらに、参照糖鎖または参照糖鎖ライブラリーをCID-MSⁿ測定することにより得られるCIDエネルギー依存曲線、解裂イオンパラメータ等の参照データを、コンピュータにより読み取り可能な記憶装置に格納したデータセットも本発明に含まれる。
- [0052] さらに、CIDエネルギー依存曲線、または解裂イオンパラメータは深度を持つ新しい種類のバーコードとして扱うこともでき、分子の構造を記述するために用いることもできる。参照データとともに参照糖鎖名、起源、測定方法や条件等も同時にコード化することができ、サンプル瓶等に貼ることができる。従って、これを読み取るバーコードリーダー等と解析ソフトウェアについても当業者によれば作成することは可能であり本発明の範囲に含まれる。
- [0053] (6) 目的糖鎖の構造決定(図1、図4/フローC)
- 本発明においては、上記(3)で得られた目的糖鎖の特定の m/z の親フラグメントイオンから得られた特定の m/z の娘イオン(以下、これを「目的娘イオン」と称することがある)のCIDエネルギー依存曲線について、目的親フラグメントイオンと同一の m/z を有する参照親フラグメントイオンから得られた、目的娘イオンと同一の m/z の娘イオン(以下、これを「参照娘イオン」と称することがある)のCIDエネルギー依存曲線を選択し、これを比較する。また、これらのCIDエネルギー依存曲線から得られた解裂イオンパラメータを比較してもよい。
- [0054] また、参照糖鎖がライブラリーである場合には、まず、参照データから目的親フラグメントイオンと同一の m/z を有する親イオンのデータを選択し、さらにその中から、比較しようとする目的娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線ま

たは解裂イオンパラメータを選択してこれを比較する。

[0055] 目的親フラグメントイオンから得られたCIDエネルギー依存曲線または解裂イオンパラメータと、これに対応する参照データが一致した場合、参照データが誘導されたもとの参照親フラグメントイオンの構造と目的親フラグメントイオンの構造が同じであると決定することができる。ここで、それぞれのデータが一致するとは、CIDエネルギー依存曲線の場合、各々の曲線が95%以上の一致度を示すこといい、また、解裂イオンパラメータの場合にはその値の差が±2%以内であることを示す。また、目的親フラグメントイオンに置換基が結合していた場合には、置換基が結合した参照親フラグメントイオンから得られた参照データと比較して、一致した場合には、同一の置換基を有していると判断することができる。このとき、Z検定を判断基準とすることもできる。

[0056] ここで、1つの特定の m/z を有する娘イオンのCIDエネルギー依存曲線または解裂イオンパラメータが一致しても、さらに他の m/z を有する娘イオンのデータを比較すると異なる場合もあるので、複数の娘イオンのデータを比較することが好ましい。

[0057] かくして本発明の方法により目的糖鎖の一部が決定された場合、これらの全配列を決定するために、例えば、生合成経路に当てはまるものを参照してつなぎ合わせたり、初めに目的親フラグメントイオンを産生するために分解した場合には、その分解の方法から再構築する等の方法が用いられる。

[0058] (7) 目的糖鎖の構造推定(図1、図4/フローC)

上記(6)で比較したCIDエネルギー依存曲線または解裂イオンパラメータが一致しなかった場合は、解裂イオンパラメータを比較し、目的糖鎖の構造を推定することができる。具体的には、目的娘イオンのCIDエネルギー依存曲線から解裂イオンパラメータを作成し、参照娘イオンのCIDエネルギー依存曲線から作成した解裂イオンパラメータと比較することにより、目的糖鎖の構造を推定すればよい。統計的解析により比較するのが好ましく、また参照糖鎖として、前述の糖鎖ライブラリーを用いるのが好ましい。また、解裂イオンパラメータとして、例えば、CIDエネルギー依存曲線をイオンカウント数の相対数としての基底値(Bottom=0)と最大値(Top=100)、その50%にあたるCIDエネルギー(V_{50})、およびCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き(Slope)を指標として前述の式3により計算した値を、挙げるることができる。

[0059] (8)糖鎖の構造異性体の純度検定(図1、図5/フローD)

前述のように、糖鎖の構造異性体毎にCID-MSⁿ測定結果は相違する(図10)。すなわち、同一質量数であっても構造が異なる糖鎖異性体はこれを形成する結合の解裂反応の様子が異なる。この理由は構造異性を形成する化学結合エネルギーに差異が存在し、このため、異なる結合が各々CID条件下で解裂することによるためである。これを利用し、CID-MSⁿ測定で親イオンが消失しない程度に衝突誘起解離を行い、この残存する親イオンをn+1段目で再度衝突誘起解離を行うこと(CID-MSⁿ⁺¹測定)により、糖鎖の構造異性体の純度検定を行うことができる。検体が純品ならばCID-MSⁿとCID-MSⁿ⁺¹の段数で得られるマススペクトル、あるいは、エネルギー依存曲線は一致する。検体が同一質量数の物質からなる混合物である(構造異性体混合物)ならば、CID-MSⁿとCID-MSⁿ⁺¹の各段の親イオンの組成比が異なることとなるので、得られる質量分析結果、特に、各シグナル強度、あるいは、エネルギー依存曲線が異なる。上記の純度検定の概略を図5に示す。

実施例

[0060] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例1 CID-MSⁿ測定の定量性の確認

(1)CID-MS/MS測定値の定量性

立体異性体や結合位置異性体からなる糖鎖のCID-MS/MS測定を行い、得られたCID-エネルギー依存曲線を比較して上記糖鎖の化学構造を決定するためには、取得したデータの定量性が問題となるためこれを確認した。Fuc α (1-3)Gal β -Octyl(PCT/JP04/009523号明細書に記載の方法で合成した)をH₂O/メタノール(1:1)溶液に最終濃度10ng/μlとなるように溶解し、これをCID-MSⁿ測定装置(esquire 3000 plus:ブルカーダルトニクス社製)のニードルにシリンジポンプを用いたインフュージョン法(流速を2μl/分)で注入し、熱キャピラリー温度250℃、キャピラリー電圧4.0kV、CIDエネルギーが0.5~1.5V、ポジティブモードで測定を行った。

[0061] 上記の測定で得られる実際のイオングラフの1例として、m/z=315のフラグメント

イオンのイオンクロマトグラム(TIC)を図6Aに示す。図中、階段状のカーブが電圧変化を示し、縦軸が総イオンカウント数、横軸が測定時間である。

[0062] 上記の測定における $m/z=315$ およびその親イオンである416について、CIDエネルギー(電圧)と総イオンカウント数の関係を示したグラフ(CIDエネルギー依存曲線)を図6Bに示す。図中丸で示したグラフが $m/z=315$ のもので、四角で示したグラフは $m/z=416$ のもので、いずれも16プロットから電圧変化の直前直後の各々2プロットを除いた平均値をプロットした。

[0063] 図6Bの縦軸は、 $m/z=315$ の総イオンカウント数と、 $m/z=315$ の総イオンカウント数と親イオン($m/z=416$)の総イオンカウント数の和の比である。この値を用いることにより、微弱な他の m/z のイオンカウント数の影響を受けない値で参照データとの比較することができる。

[0064] このグラフの定量性を検証するために $m/z=315$ のCIDエネルギー依存曲線の立ち上がり点(0.94V)、減衰する親イオン($m/z=416$)のCIDエネルギー依存曲線との交点(1.12V)、およびプラトーに達する点(1.38V)の3点におけるイオンカウント数について上記16プロットから上限2プロットを除いた12プロットで、CV値(変動係数)を算出した結果を図6Cに示す。算出式は、標準偏差/平均値 $\times 100$ である。結果、それぞれの電圧における値のCV値(変動係数)がCIDエネルギー依存曲線の立ち上がり点で24.2%、親イオンCIDエネルギー依存曲線との交点で3.5%、およびプラトー到達点で7.3%であり、特に親イオンCIDエネルギー依存曲線との交点以降のデータは信頼性が高く、上記の方法により定量的解析が可能であることを示した。

[0065] (2) CID-MSⁿ測定により得られるCIDエネルギー依存曲線の同一性

本発明においては、同一のフラグメントイオンについて、CID-MS/MSとMS/MS/MS測定またはそれ以上の各CID-MSⁿ測定で得られたCIDエネルギー依存曲線が同一でないと、参照データとの比較ができないので、これを確認した。

[0066] マルトヘキサオース(6糖)のピリジリアミノ化物(図7A)をH₂O/メタノール(1:1)溶液に最終濃度10ng/ μ lとなるように溶解し、これをCID-MSⁿ測定装置(esquire 3000 plus:ブルカーダルトニクス社製)のニードルにシリンジポンプを用いたイン

フュージョン法(流速を $2\mu\text{l}/\text{分}$)で注入し、熱キャピラリー温度 250°C 、キャピラリー電圧 4.0kV 、CIDエネルギーが $0.9\sim 1\text{V}$ 、ポジティブモードで測定を行った。上記CID-MS/MS測定で得られた $m/z=443$ (2糖)のCIDエネルギー依存曲線を図7A-1に示した。ここで、縦軸は、 $m/z=443$ の総イオンカウント数と、 $m/z=443$ の総イオンカウント数と親イオン($m/z=1091$)の総イオンカウント数の和の比である。

[0067] 次にマルトヘptaオース(7糖)のピリジルアミノ化物(図7B)を上記と同様にCID-MS/MS測定を行い、得られた $m/z=1091$ のフラグメントイオンについて、さらに $1.1\sim 1.9\text{V}$ のCIDエネルギーでCID-MS(この時点ではMS/MS/MS)測定を行って得られた $m/z=443$ (2糖)のCIDエネルギー依存曲線を図7B-1に示した。さらに上記2つのCIDエネルギー依存曲線を重ね合わせたものを図7Cに示した。図から明らかなように、同一のフラグメントイオンのCIDエネルギー依存曲線は、CID-MSⁿ測定の異なる段数で得られたものでも同一でありCID-MSⁿ測定の定量性が確認された。

[0068] 実施例2 CIDエネルギー依存曲線比較による構造決定

(1)天然糖鎖と合成オリゴ糖鎖におけるCIDエネルギー依存曲線の同一性

本発明は、参照糖鎖(ライブラリー)のCIDエネルギー依存曲線と構造未知の天然の糖鎖のCIDエネルギー依存曲線を比較することにより目的糖鎖の構造解析を行う方法である。ここで、構造は同じであるが異なる置換基を有している合成糖鎖と天然糖鎖について、CID-MS/MS測定で同一の m/z を有する親イオンを取得し、これをさらにCID-MS/MS測定した場合、得られた娘イオンのCIDエネルギー依存曲線が同一であることを確認した。

[0069] $\text{Fuc}\alpha(1-6)\text{Gal}\beta(1-4)\text{Glc}\beta$ -Octyl(合成品/図8B)と、 $\text{Fuc}\alpha(1-2)\text{Gal}\beta(1-4)\text{Glc}$ を含む H_2O -メタノール(1:1)(Dextra Laboratories, Ltd. 製/図8A)について、例1(1)と同様にして、CID-MS/MS測定を行い、得られた $m/z=305.08$ のフラグメントイオン(グルコース環が解裂したもの(A^0 、2イオン))について、さらにCID-MS/MS測定を行った。この測定の $m/z=245$ の時のCIDエネルギー依存曲線を図8に示す。図中、A-1で示されるグラフが天然の糖鎖から得ら

れたもの、B-1がオクチル基が付いた合成オリゴ糖から得られたものである。また、これらを重ね合わせたものをCで示した。図から明らかなように、合成オリゴ糖と天然糖鎖では、同一の m/z を有するフラグメントイオンでは、その前段数のCID-MS/MS測定のプロトタイプイオンが異なる置換基を有していても、また、天然糖鎖と合成糖鎖でも同一のCIDエネルギー依存曲線が得られることが確認された。

[0070] また、上記CIDエネルギー依存曲線をイオンカウント数の相対数としての基底値(Bottom=0)と最大値(Top=100)、その50%にあたるCIDエネルギー(V_{50})、およびCIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き(Slope)を指標として式1によりパラメータ化(Prism4(GraphPad Software社製)を用いた)し、比較したところ、ほぼ同一の値を示した。従って、上記パラメータの比較によっても、構造未知の天然糖鎖の部分構造を明らかにすることができることが確認された。

[0071] (2)異なる構造を有する糖鎖から得られる同一のフラグメントイオンにおけるCIDエネルギー依存曲線の同一性

本発明の方法は、目的糖鎖(参照データの親フラグメントイオンとは異なる構造を有する)を参照データの親イオンと同一の構造を有するフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、これをさらにCID-MS/MS測定することにより得られたCIDエネルギー依存曲線を参照データと比較することにより糖鎖の構造解析を行う方法である。そこで、異なる構造を有する2種の糖鎖について同一のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、得られたフラグメントイオンをさらにCID-MS/MS測定し、得られた娘イオンのCIDエネルギー依存曲線が同一であることを確認した。

[0072] PA化LeX5糖(図9A)および還元末端遊離のLeX5糖(B)のナトリウム付加イオンを実施例1と同様にCID-MS/MS測定を行い、LeX-osyl残基(LeX構造を含み、N-アセチルグルコサミン1位の酸素原子を含む)由来のフラグメントイオン($m/z=552.19$)が共通に観察された。

[0073] そこで、このフラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS(この時点での段数は3段目となる)測定を行った。得られたプロットから $m/z=406$ (C)および388(D)のフラグメントイオンについてCIDエネルギー依存曲線を作成した結果を図9Cおよび

びDに示す。図中丸で示したグラフは、PA化LeX5糖由来のもの、四角が還元末端遊離のLeX5糖由来のものを示す。図から明らかなように、異なる構造を有する糖鎖から得られたものであっても、同一の構造を有するフラグメントイオンから得られる同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線は一致することが確認された。

[0074] (3) アノマーの識別

同一の構造を有するが立体異性のフラグメントイオンについて、これを本発明の方法で識別することができることを確認した。Fuc α / β (1-6)Gal α / β (1-6)Glc α / β - Octyl(図10A)の3つのグリコシド結合がそれぞれ異なる8種のアノマーを化学合成し、HPLCで分離精製を行なった後、これらを実施例1と同様にCID-MS/MS測定を行った。このときのFuc α (1-6)Gal α (1-6)Glc β - OctylのMS/MSを異なるCIDエネルギー(B:0.82V, C:0.96V)で測定したスペクトルの1例を図10B, Cに示した。図から明らかなように、 $m/z=623.3$ の親イオンは、CIDエネルギーが0.82Vでは $m/z=477.2$ のフラグメントイオンを生じ、さらに0.96Vでは、該親イオンは $m/z=477.2$ と331.1の2つのフラグメントイオンを生じた。

[0075] 本解析に用いた糖鎖が構造未知であったとすると、上記の結果からは、該糖鎖がデオキシヘキソースとヘキソースを含むことが判るが、上記8種のアノマーのいずれのグリコシド結合を有しているかは判らない。

[0076] そこで、上記で得られた $m/z=477.2$ のフラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行った(この時点での段数は3段目となる)。条件は、実施例1と同じで、CIDエネルギーは0.5~1.75Vで行った。 $m/z=477.23$ のフラグメントイオンは還元末端の単糖(フコース)を失った2糖の4種のアノマーのものである。

[0077] 得られたプロットから $m/z=315$ のフラグメントイオンについてCIDエネルギー依存曲線を作成した結果を図10Dに示す。図中丸で示したグラフは、グリコシド結合 α / α のもの、四角が β / α のもの、三角が α / β のもの、ひし形が β / β のものを示す。また、黒で示したグラフは1段目のCIDで遊離したフコースとのグリコシド結合が α であったもの、白で示したグラフが β であったものを示す。

[0078] 図から明らかなように、アノマー間では、CIDエネルギー依存曲線が明らかに異なり、本解析によりアノマーを識別できることが判った。また、親イオンのアノマーの違い

は娘イオンのCIDエネルギー依存曲線には影響しないことが判った。

- [0079] さらに、上記のCIDエネルギー依存曲線をイオンカウント数の相対数としての基底値(Bottom=0)と最大値(Top=100)、その50%にあたるCIDエネルギー(V_{50})、およびCID-MSエネルギー依存曲線の変曲点での傾き(Slope)を指標として上記式1によりPrism4(GraphPad Software社製)を用いて算出、比較したところ、アノマー間では異なる値となり、また、親イオンのアノマーの違いは娘イオンの値には影響せず、上記計算式によってもアノマーを識別できることが判った。
- [0080] 従って、構造未知の糖鎖についてCID-MSⁿ測定を行い、得られるCIDエネルギー依存曲線を参照データと比較し、同一のものがあつた場合には、目的糖鎖は、該CIDエネルギー依存曲線を与えた糖鎖と同一の構造であり、アノマーの違いも特定できることがわかつた。
- [0081] 逆に、構造が同一の糖鎖の参照データと、目的糖鎖をCID-MSⁿ測定して得られたCIDエネルギー依存曲線が一致しなかつた場合、参照データのもととなる糖鎖は目的糖鎖のアノマーである可能性がある。
- [0082] (4)CID-MSⁿ測定の異なる段数におけるCIDエネルギー依存曲線の比較
- 本発明において、目的糖鎖の特定の m/z のフラグメントイオンの娘イオンのCIDエネルギー依存曲線が、参照データと一致した場合、この段数では一致していても、構造が異なることが考えられる。そこで、該CID-MSⁿ測定で得られるその他の娘イオンについても参照データの同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線と比較すると、さらに正確な構造解析を行うことができる。この場合の例を以下に示す。
- [0083] 非還元末端にO型血液型抗原エピトープ(Fuc α (1-2)Gal)を有する天然型糖鎖2種を比較対象として選択した。これらの糖鎖はエピトープ(Fuc α (1-2)Gal)を共有するものの、フコースが結合しているガラクトースを含む2糖構造がラクト系列(図11A)とネオラクト系列(図11B)であり、結合位置異性体である。さらに、Aは3糖、Bは5糖であり、親イオンとしての質量数も明らかに異なるが、糖鎖A、BをそれぞれCID-MSⁿ測定を行うことによりグルコサミニル結合部分で解裂したと考えられる共通の m/z を有するフラグメントイオン($m/z=534.18$)がナトリウム付加物として得られる(図11A、およびBの線の左側部分)。

[0084] そこで、さらにこのフラグメントイオンについてCID-MSⁿ測定を行い、これらの娘イオン($m/z=388$)のCIDエネルギー依存曲線を作成したところ、これらは一致した(図11C)。しかし、その他の娘イオンについても同様にCIDエネルギー依存曲線を作成したところ、 $m/z=349$ の娘イオンでは図11Dとなり、 $m/z=331$ の娘イオンでは図11Eとなり、明らかにCIDエネルギー依存曲線は異なることがわかった。このことから、上記2種の糖鎖の構造は異なることが判断することができた。

[0085] 実施例3 パラメータ解析による構造異性の判別の可能性の確認

最初にアノマー異性体、および、結合位置異性体の判定をおこなうことの可能性に関して、単一の単糖の特定の結合のみからなるオリゴ糖を用いて検討した。マルトオリゴ糖はグルコースのみが α (1-4)、セロオリゴ糖は β (1-4)結合それぞれした構造体であり、アノマー異性体の比較に適している。また、イソマルトオリゴ糖は α (1-6)の結合から成っており、マルトオリゴ糖との比較において結合位置異性の判別に重要な位置を占める。

[0086] (1)アノマー異性の判別

実施例1(2)においてマルトオリゴ糖のCID-MS/MSとMS/MS/MS(CID-MSⁿとCID-MSⁿ⁺¹)測定のCIDエネルギー依存曲線が良い一致を示すことを示した。ここで得られたエネルギー依存曲線をシグモイドカーブフィットし、得られたパラメータ(Top、Slope、 V_{50})について3D散布図を作成、この2D展開図を作成した。同時に結合位置はマルトオリゴ糖と同じでアノマー立体配置のみが異なるセロオリゴ糖に関して同様にプロットした(図12)。この結果、CID-MSⁿ測定の2段目と3段目においてプレカーサーイオンが同一であればパラメータが良い一致を示し、特に、 V_{50} が1.40~1.45Vの範囲に集中することが分かった。一方、セロオリゴ糖においては V_{50} 値が1.5V付近にあり、これは、アノマー立体配置の相違による結合の解裂状況をパラメータで判別できることを示す結果である。

[0087] (2)結合位置異性の判別

実施例3(1)のマルトースの結果に対し α (1-6)の結合から成っているイソマルトオリゴ糖の衝突エネルギーマップから各パラメータを取得し、マルトースのそれらと共にグラフとした(図13)。この結果、 V_{50} 値が結合位置異性の指標として使用できること

が示された。

[0088] 実施例4 構造推定方法に利用可能な3糖ライブラリーの参照データの同定

(1) 3糖ライブラリーの合成およびそのCID-MSⁿ測定

3糖ライブラリーの一部であるフコース(Fuc)、ガラクトース(Gal)、および、グルコース(Glc)で構成される3糖Fuc α / β (1-6)Gal α / β (1-2/3/4/6)Glc α / β -Octylをアノマー混合物として合成しHPLCを用いて単離した各々の3糖についてCID-MSⁿ測定を行い、得られたライブラリー化合物からの構造情報を用いて構造未定化合物の構造予測をおこなった。情報源となる化合物は本来計32種($2^3 \times 4$)であるが、単離可能であった計23化合物についてライブラリー構造データとしてあつかった。全てのサンプルにおいてCID-MS/MS測定は $m/z=623[M+Na]^+$ 、CID-MS/MS/MS測定は $m/z=477[M-Fuc+Na]^+$ に関しておこなった。

[0089] (2) CID-MS/MS測定時の3糖ライブラリーのフコース残基解離データ

実施例1に記載の方法でCID-MS/MS測定をそれぞれのサンプルに関して行ってデータを取得した(図14)。その後カーブフィット(ボルツマンのシグモイド式)をおこない、各パラメータ(Top、Slope、 V_{50})を算出した(図15)。3糖ライブラリーの23化合物のうち、Fuc α / β (1-6)Gal α / β (1-6)Glc β -Octylの例を図14および15に示す。

[0090] 算出されたパラメータの散布図を作成するとプロットが二分していることが明らかであり、アノマー異性体(Fuc α :黒丸、Fuc β :白丸)に着目すると、プロットがCIDプロセス下のフラグメント化においてグリコシド結合の立体(アノマー異性)を反映することが明らかである(図16)。この場合、 V_{50} とSlopeの両パラメータがアノマー異性の判別の指標となることが分かる。 β 体において1点のみSlopeが小さな値を示したが、これはデータのばらつきによるエラーであり統計的にもはずれ値として認識される。

[0091] (3) CID-MS/MS/MS測定時の3糖ライブラリーのガラクトース残基解離データ

CID-MS/MS/MS測定においてもCID-MS/MS測定時のFucの脱離に関するプロットと同様にGalが脱離した $m/z=315$ に関するデータは、2極化の傾向がある(図17)。この結果は V_{50} のみがアノマー異性体を反映する結果である。

[0092] 実施例5 3糖ライブラリーのCID-MSⁿ散布図を利用したアノマーの識別法

(1) 各プロットと各平均との距離によるプロットの範囲

CID-MSⁿ測定により得られるシグモイドカーブのグラフから、 α 配置および β 配置(本実施例においてはフコースとガラクトースの場合について説明)はそれぞれある範囲を持ち収束していることがわかる。未知糖鎖のアノマー解析を行う際、この範囲に入っているか否かによりアノマーの推定が可能である。

[0093] まずバラつきの範囲を認識するために、Fucの α 配位、 β 配位の V_{50} およびSlopeの平均をそれぞれもとめ、各プロットとの距離の値を範囲(R)とした。具体例を示すと、Fuc α (1-6)Gal α (1-3)Glc β -Octylでは、

$$V_{50} - \alpha \text{ 全体の } V_{50} \text{ の平均} = 0.00597、$$

$$\text{Slope} - \alpha \text{ 全体の Slope の平均} = 0.000229$$

である。この値からの距離をもとめ、この距離を半径とする円をFuc α の範囲とした(図18)。Fuc α に関するライブラリーから得た数値を表1に示す。

[0094] [表1]

Table 1. 算出した距離の数値

V50	V50距離(α V50- α Ave.)	SLOPE	SLOPE距離(α SLOPE- α Ave.)	距離
0.8759	0.00597	0.02884	0.000229	0.5974×10^2
0.8684	-0.00153	0.0286	-1.1E-05	0.1530×10^2
0.8949	0.02497	0.02718	0.02718	2.5011×10^2
0.8749	0.00497	0.02774	-0.000871	0.5046×10^2
0.8533	-0.01663	0.02604	-0.002571	1.6828×10^2
0.8559	-0.01403	0.02758	-0.001031	1.4068×10^2
0.8694	-0.00053	0.02937	0.000759	0.09257×10^2
0.8708	0.00087	0.03002	0.001409	0.1656×10^2
0.8763	0.00637	0.03077	0.002159	0.6726×10^2
0.8595	-0.01043	0.02997	0.001359	1.0518×10^2
Ave.				0.882877×10^{-2}

V50	V50距離(β V50- β Ave.)	SLOPE	SLOPE距離(β SLOPE- β Ave.)	距離
163 BAB 0.9553	0.017046154	0.04419	0.003145385	1.7333921×10^{-2}
163 BBA 0.9393	0.001046154	0.03922	-0.001824615	$0.21032494 \times 10^{-2}$
163 BAA 0.949	0.010746154	0.02918	-0.011864615	1.6007769×10^{-2}
163 BBB 0.9332	-0.005053846	0.04186	0.000815385	$0.51192004 \times 10^{-2}$
166 BAA 0.9478	0.009546154	0.04305	0.002005385	$0.97545184 \times 10^{-2}$
166 BBB 0.9145	-0.023753846	0.04094	-0.000104615	$2.37540764 \times 10^{-2}$
166 BAB 0.9402	0.001946154	0.04173	0.000685385	$0.20633147 \times 10^{-2}$
166 BBA 0.9187	-0.019553846	0.04136	0.000315385	$1.95563892 \times 10^{-2}$
164 BAA 0.9551	0.016846154	0.04228	0.001235385	$1.68913906 \times 10^{-2}$
164 BBA 0.9319	-0.006353846	0.04117	0.000125385	$0.63550831 \times 10^{-2}$
164 BBB 0.9389	0.000646154	0.04162	0.000575385	$0.08652069 \times 10^{-2}$
162 BBB 0.9212	-0.017053846	0.0421	0.001055385	$1.70864712 \times 10^{-2}$
162 BAB 0.9522	0.013946154	0.04488	0.003835385	$1.44639341 \times 10^{-2}$
Ave.				$1.164285972 \times 10^{-2}$

[0095] (3) 構造解析における分子量の影響の補正

実施例2で、糖鎖ライブラリーをなす化合物のCID解析から得られる部分構造体のエネルギー依存曲線と未知物質の部分構造体のエネルギー依存カーブの比較から、カーブが完全一致すれば部分構造を推定できることを示した。これは異なった元の構造から得られた同一のフラグメントをライブラリーデータと参照することで可能としている。この場合トラップされたイオンは同一分子量であるため、部分構造の完全一致が可能となる。しかし質量分析において、親イオンの分子量(分子の大きさ)は結果に影響する重要な因子であり、本研究においても分子量の差異によりカーブおよびパラメータ(V_{50} 、Slope等)が異なる結果が得られているため、分子量の影響を考慮した糖鎖構造解析が必要となる。以下、得られた結果の補正法を提供する(図20)。

[0096] 糖鎖ライブラリー (Fuc α / β (1-6) Gal α / β (1-2/3/4/6) Glc α / β - Octyl) の $m/z=477$ のフラグメントイオンのCIDエネルギー依存曲線と、今回補正

サンプルとして用いる未知糖鎖の目的娘イオンと同一の m/z を有するLewis aの参照娘イオンのCIDエネルギー依存曲線からそれぞれ得られる V_{50} およびSlopeを同一グラフにプロットした(図21)。ここからプロットは分子量の差異の影響を大きく受けていることが分かる。次にこの差異から V_{50} 、Slopeの補正值を導いた。以下に式を示す。

$$V_{50} \text{の補正值} = \text{脱Fuc } \alpha \text{ ライブラリー}(m/z=477) \text{の} V_{50} \text{平均} / \text{Lewis aの} V_{50}$$

$$\text{Slopeの補正值} = \text{脱Fuc } \alpha \text{ ライブラリー}(m/z=477) \text{のSlope平均} / \text{Lewis aのSlope}$$

[0097] この算出された各補正值を未知糖鎖の目的娘イオンのCIDエネルギー依存曲線から得られる V_{50} およびSlopeに掛け合わせた。一例を示すと未知糖鎖の補正前プロットは図21に示すように、この未知糖鎖がFuc β とは大きく差があるためFuc α ということが示唆された。この方法のみではデオキシヘキソースが何であるかの特定はできないが、ここで未知糖鎖として使用した糖鎖はヒトから単離された四糖構造であり、ヒトにおいて存在するデオキシヘキソースがフコースであるので未知検体はFuc α 構造を有すると推測できた。実際に未知糖鎖として用いた糖鎖はLewis XでありFuc α 構造を持っている。ライブラリーデータを充足することで、より精度の高い構造予測が可能である。

[0098] (4) 機器間のデータ補正

質量分析計を用いた構造解析を行うにあたり問題視されるのは、機器間のデータの差異である。これを上記の方法を用いて補正を行った。まず、共通のサンプルとしてFuc α (1-6)Gal α (1-6)Glc β -Octylを補正サンプルとして用いた。比較に用いた機器は同一会社ではあるがブルカーQITMSを用いることで「個体差」の補正をおこなった。エネルギー依存曲線データを比べるとX軸(Amplおよび V_{50})に差異が見られる(図22)。次に、このサンプルを補正サンプルとしてFuc β (1-6)Gal β (1-6)Glc α -Octylの補正を段落番号0096の補正と同様の方法で行ったところ、差異が少なくなり補正可能であることが示唆された。補正用検体数を増やすことにより補正の精度を改善できる。

[0099] 実施例6 糖鎖の構造異性体の混入検定

(1) 検体の調製および質量分析

以下の4種類の検体を調製し、それぞれを実施例1の方法に従い測定した。すなわち、検体の質量分析計への注入はインフュージョン法で、流速 $120 \mu\text{l}/\text{h}$ で行い、用いているイオン源(エレクトロスプレーイオン化法:ESI)は $1 \mu\text{l}/\text{min} \sim 1\text{ml}/\text{min}$ の範囲で使用した。また、on lineあるいはoff line nanoESIを用いることにより、nl/minスケールでの分析が可能であった。検出機として質量分析計はブルカードルトニクス esquire 3000plus(QIT? MSⁿ)を用いた。分析条件を以下に示す。1) 熱キャピラリー温度: 205°C 、2) キャピラリー電圧: 4.0kV 、3) Dry Gas: $4.0\text{l}/\text{min}$ 。ポジティブイオンモードで測定。ここで、CID-MSⁿ測定の条件である Isolation widthは同位体を含まない 0.8 ms で行った。

[0100] 純品A Gal α (1-3)Gal α -OMe (7 nmol)

純品B Gal α (1-3)Gal β -OMe (7 nmol)

混合物C 純品A:純品B=1:1

混合物D 純品A:純品B=1:9

[0101] (2) 純品Aおよび純品Bの分析結果

純品AのCID-MS/MS測定及びCID-MS/MS/MS測定のAmpl Voltage毎の各フラグメント強度と各々の差を図23に示した。CID-MS/MS測定及びCID-MS/MS/MS測定では結果に差異が見られなかった。純品Bも同様の結果であった(図24)。

[0102] (3) 混合物Cおよび混合物Dの分析結果

混合物Cおよび混合物DのCID-MS/MS測定及びCID-MS/MS/MS測定のAmpl Voltage毎の各フラグメント強度と各々の差を図25および図26にそれぞれ示した。それぞれの混合物に関して、純品に比べ大きな差異が見られた。この差異から混合物/非混合物の判定が可能であった。

産業上の利用可能性

[0103] 本発明の糖鎖解析方法は、構造未知の糖鎖についてCID-MSⁿ測定を行ない、得られたCIDエネルギー依存曲線を構造既知の糖鎖からえら得た参照データと比較することにより構造決定を行う方法である。該方法は、天然に存在する構造未知の糖

鎖を、置換基が異なるものや立体異性体等も含めその構造、またはその一部を決定又は推定することができ、また極微量の解析が行える点で非常に有用である。また該方法は、糖鎖の構造解析という次世代生命科学研究の基盤技術となるのみならず、糖鎖の異常を伴う疾病や感染症を引き起こすきっかけとなる糖鎖レセプターの特定等、診断医療に貢献する技術となるものである。さらに、本発明の純度検定方法により、検体の詳細なデータ解析をおこなう以前にその必要性を簡便に判定することが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0104] [図1]図1は、本発明の方法の概略を示した図である。
- [図2]図2は、本発明の方法の概略を示した図である。
- [図3]図3は、本発明の方法の概略を示した図である。
- [図4]図4は、本発明の方法の概略を示した図である。
- [図5]図5は、本発明の方法の概略を示した図である。
- [図6]図6は、 $\text{Fuc } \alpha (1-3) \text{Gal } \beta - \text{Octyl}$ をCID-MSⁿ測定した結果を示すグラフである。
- [図7]図7は、マルトヘキサオースとマルトヘプタオースの構造、およびそれらをCID-MSⁿ測定した結果、並びにそれらを比較した結果を示すグラフである。
- [図8]図8は、 $\text{Fuc } \beta (1-6) \text{Gal } \beta (1-4) \text{Glc}$ の天然物および合成品の構造、およびそれらをCID-MSⁿ測定した結果、並びにそれらを比較した結果を示すグラフである。
- [図9]図9は、PA化LeX5糖と還元末端遊離のLeX5糖の構造、およびそれらをCID-MSⁿ測定した結果、並びにそれらを比較した結果を示すグラフである。
- [図10]図10は、 $\text{Fuc } \alpha (1-6) \text{Gal } \beta (1-6) \text{Glc } \beta - \text{Octyl}$ のアノマーの構造、およびそれらをCID-MSⁿ測定した結果、並びにそれらを比較した結果を示すグラフである。
- [図11]図11は、非還元末端にO型血液型抗原エピトープ($\text{Fuc } \alpha (1-2) \text{Gal}$)を有する天然型糖鎖2種の構造、およびそれらをCID-MSⁿ測定した結果、並びにそれらを比較した結果を示すグラフである。

[図12]図12は、マルトヘキサオースとマルトヘプタオースのCIDエネルギー依存曲線から得られた解裂イオンパラメータ(Top、Slope、 V_{50})をそれぞれ2D展開図にプロットした結果を示すグラフである。

[図13]図13は、マルトヘキサオースとイソマルトヘキサオースのCIDエネルギー依存曲線から得られた解裂イオンパラメータ(Top、Slope、 V_{50})をそれぞれ2D展開図にプロットした結果を示すグラフである。

[図14]図14は、3糖ライブラリーを構成するFuc α / β (1-6)Gal α / β (1-2/3/4/6)Glc α / β -Octylのアノマーのうち、Fuc α (1-6)Gal α (1-6)Glc β -OctylをCID-MSⁿ測定した結果を示すグラフである。

[図15]図15は、Fuc α (1-6)Gal α (1-6)Glc β -OctylのCIDエネルギー依存曲線をカーブフィットした結果を示すグラフと、そのグラフから得られた解裂イオンパラメータ(Top、Slope、 V_{50})の値である。

[図16]図16は、3糖ライブラリーを構成するFuc α / β (1-6)Gal α / β (1-2/3/4/6)Glc α / β -Octylの各アノマーのフコース残基を解離させた解裂イオンパラメータ(Top、Slope、 V_{50})を2D展開図にプロットした結果を示すグラフである。各アノマーは結合位置異性で略して表記し、例えば163AABはFuc α (1-6)Gal α (1-3)Glc β -Octylを意味する。

[図17]図17は、3糖ライブラリーを構成するFuc α / β (1-6)Gal α / β (1-2/3/4/6)Glc α / β -Octylの各アノマーのガラクトース残基をさらに解離させた解裂イオンパラメータ(Slope、 V_{50})を2D展開図にプロットした結果を示すグラフである。

[図18]図18は、3糖ライブラリーを構成するアノマーの解裂イオンパラメータの平均値の2D展開図において、未知糖鎖のアノマーの推定が可能な範囲を示すグラフである。

[図19]図19は、3糖ライブラリーを構成するアノマーのフコースを解離させた解裂イオンパラメータ(Slope、 V_{50})の α 配置および β 配置の各平均値ならびにそれらの標準偏差と、Fuc β (1-6)Gal α (1-6)Glc α -Octylのフコースを解離させた解裂イオンパラメータを2D展開図にプロットした結果を示すグラフである。

[図20]図20は、参照娘イオンと目的娘イオンの分子量が異なった場合の補正方法の概略を示した図である。

[図21]図21は、参照娘イオンと目的娘イオンの分子量が異なった場合に得られる解裂イオンパラメータ(Slope、 V_{50})の2D展開図における、測定値と補正值の関係を示すグラフである。

[図22]図22は、Fuc α (1-6)Gal α (1-6)Glc β -Octylを異なる機種ⁿの質量分析計を用いてCID-MSⁿ測定した結果を示すグラフである。

[図23]図23は、2糖の純品A(Gal α (1-3)Gal α -OMe)を、親イオンと最も強度の高いフラグメントイオンの比が約1:3、1:1、3:1となるAmpl VにてそれぞれCID-MS/MS測定およびCID-MS/MS/MS測定した結果を示すグラフである。

[図24]図24は、2糖の純品B(Gal α (1-3)Gal β -OMe)を、親イオンと最も強度の高いフラグメントイオンの比が約1:3、1:1、3:1となるAmpl VにてそれぞれCID-MS/MS測定およびCID-MS/MS/MS測定した結果を示すグラフである。

[図25]図25は、2糖の純品A(Gal α (1-3)Gal α -OMe)および純品B(Gal α (1-3)Gal β -OMe)を1:1の比で混合した混合物Cを、親イオンと最も強度の高いフラグメントイオンの比が約1:3、1:1、3:1となるAmpl VにてそれぞれCID-MS/MS測定およびCID-MS/MS/MS測定した結果を示すグラフである。

[図26]図26は、2糖の純品A(Gal α (1-3)Gal α -OMe)および純品B(Gal α (1-3)Gal β -OMe)を1:9の比で混合した混合物Cを、親イオンと最も強度の高いフラグメントイオンの比が約1:3、1:1、3:1となるAmpl VにてそれぞれCID-MS/MS測定およびCID-MS/MS/MS測定した結果を示すグラフである。

請求の範囲

- [1] (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線と、構造既知の参照糖鎖から得られた、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線とを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法。
- [2] 構造既知の複数の参照糖鎖をCID-MSⁿ測定することにより得られる複数の特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線からなるCIDエネルギー依存曲線ライブラリー。
- [3] 参照糖鎖が3糖からなることを特徴とする請求項2に記載のライブラリー。
- [4] 請求項2に記載のCIDエネルギー依存曲線から作成された、構造既知の複数の参照糖鎖の解裂イオンパラメータからなる解裂イオンパラメータライブラリー。
- [5] 構造既知の複数の参照糖鎖の解裂イオンパラメータが、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、CIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータであることを特徴とする、請求項4に記載のライブラリー。
- [6] 参照糖鎖が3糖からなることを特徴とする請求項4または5に記載のライブラリー。
- [7] (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線と、請求項2または3に記載のライブラリーに含まれる、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線とを比較することを特徴とする糖鎖構造

造解析方法。

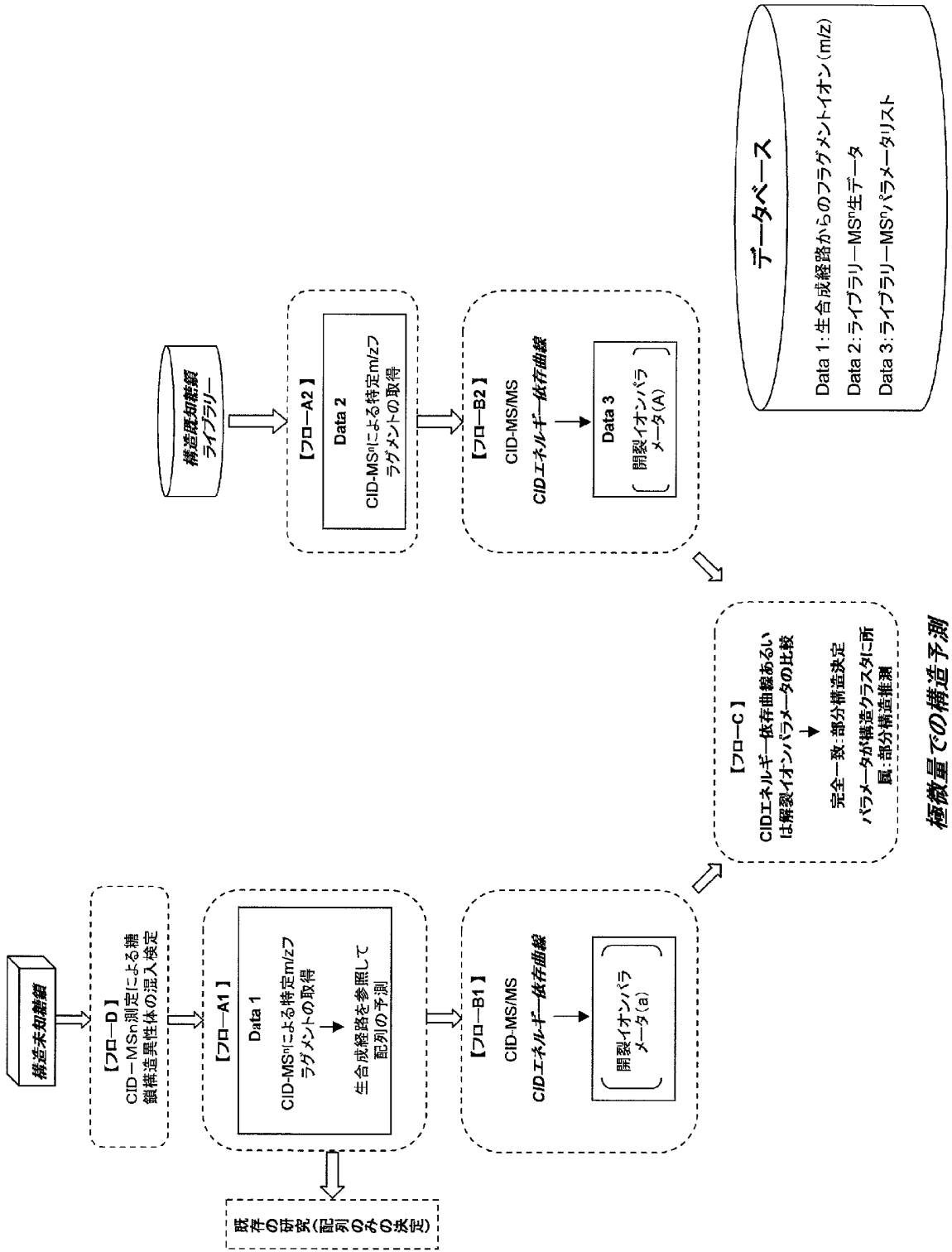
- [8] 請求項1または7に記載の(c)の工程において、目的糖鎖の特定の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータを作成し、該解裂イオンパラメータと、構造既知の参照糖鎖の上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータとを比較することを特徴とする、請求項1または7に記載の方法。
- [9] 解裂イオンパラメータが、特定の m/z の娘イオンのイオン強度の最大値を該娘イオンの総イオンカウント数の相対数としてあらわした相対値、前記相対値が50%となるCIDエネルギー値、CIDエネルギー依存曲線の変曲点での傾き、から選ばれる少なくとも1つのパラメータであることを特徴とする、請求項8に記載の方法。
- [10] (a) 目的糖鎖について特定の m/z のフラグメントイオンが得られるまでCID-MSⁿ測定を行い、(b) 該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、得られた特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数とCIDエネルギーとの関係を示すCIDエネルギー依存曲線を作成し、(c) 該CIDエネルギー依存曲線の解裂イオンパラメータを作成し、(d) 該解裂イオンパラメータと、請求項4~6のいずれかに記載のライブラリーに含まれる、上記フラグメントイオンと同一の m/z のフラグメントイオンをCID-MS/MS測定することにより得られた、上記娘イオンと同一の m/z の娘イオンのCIDエネルギー依存曲線から作成された解裂イオンパラメータを比較することを特徴とする糖鎖構造解析方法。
- [11] CIDエネルギー依存曲線の特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数が、特定の m/z の娘イオンの総イオンカウント数と、該娘イオンの総イオンカウント数と親イオンの総イオンカウント数の和の比であることを特徴とする請求項1または7~10のいずれかに記載の方法。
- [12] 目的糖鎖に含まれる異なる特定の m/z のフラグメントイオンについて請求項1もしくは7に記載の(a)~(c)の工程または請求項10に記載の(a)~(d)の工程を繰り返し、それらの結果を組み合わせることを特徴とする糖鎖構造解析方法。
- [13] 少なくともCID-MSⁿ測定装置、請求項2~6のいずれかに記載のライブラリーをコンピューター読み取り可能なように記録した記録媒体、および目的糖鎖に含まれる異なる

る特定のフラグメントイオンについて請求項1もしくは7に記載の(b)および(c)の工程または請求項10に記載の(b)～(d)の工程を行なうためのプログラムを記録した記録媒体を含む糖鎖構造解析システム。

- [14] (a)糖鎖検体について特定の m/z のフラグメントイオンが消失しないような任意の電圧でCID-MSⁿ測定を行い、(b)残存する該フラグメントイオンについてさらにCID-MS/MS測定を行い、(c)前記2工程で得られたマススペクトル、CIDエネルギー依存曲線または該曲線の解裂イオンパラメータを比較することを特徴とする、糖鎖構造異性体の混入検定方法。

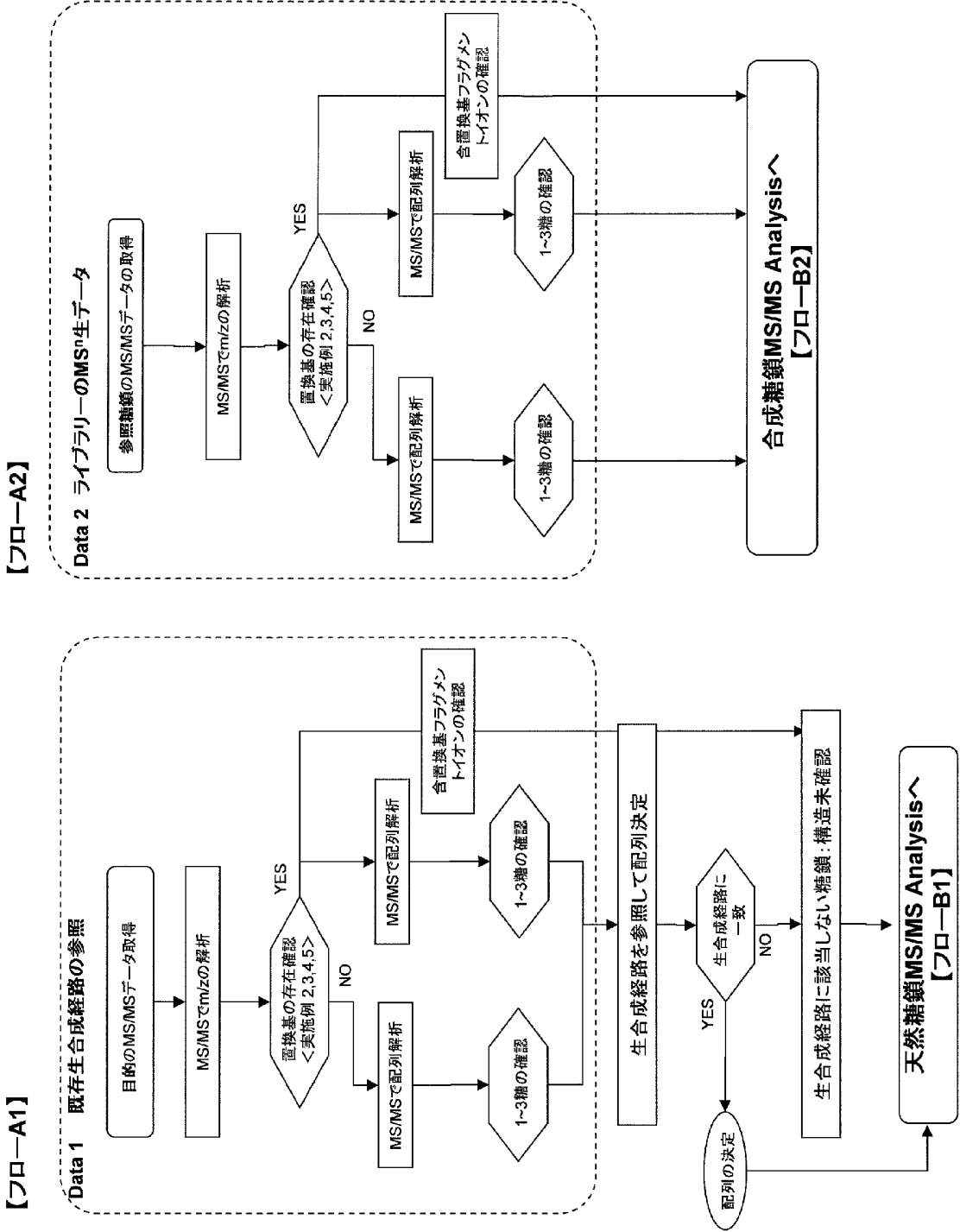
[図1]

糖鎖の構造予想法(概略)



極微量での構造予測

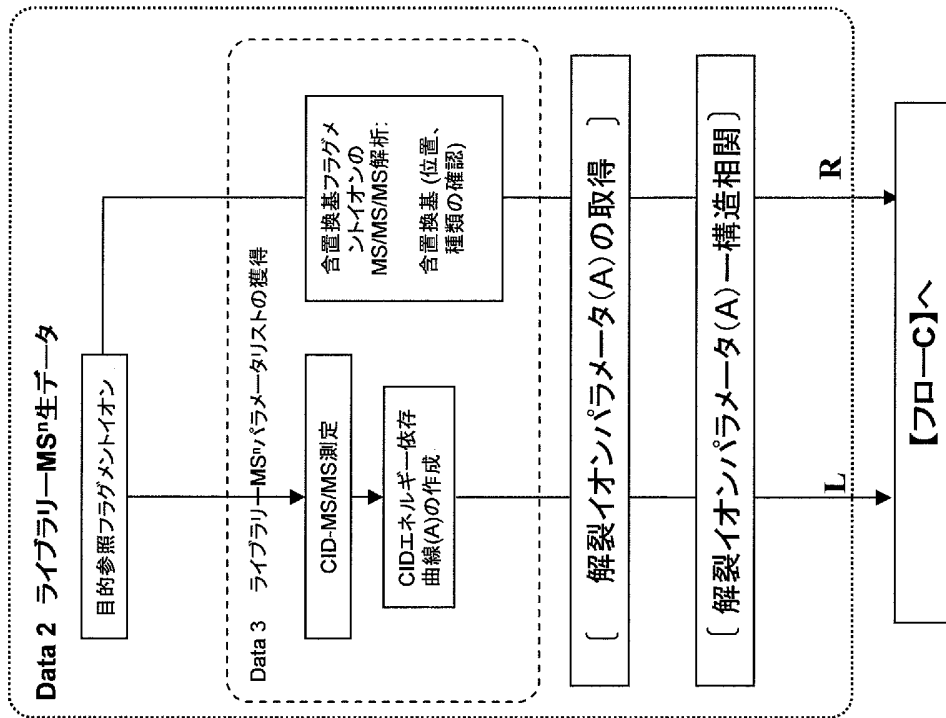
図2



注、括弧内は参照データ

[図3]

【フローB2】



【フローB1】

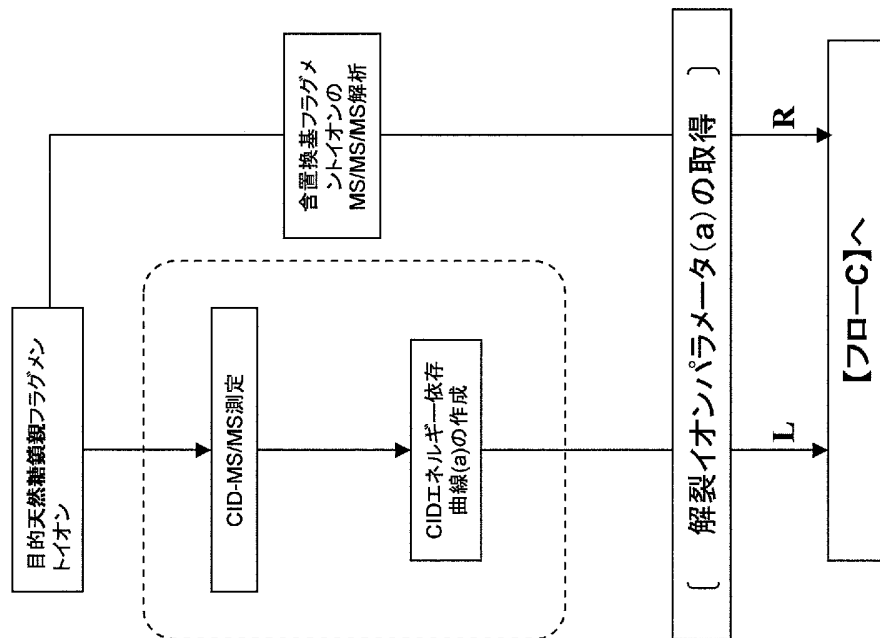
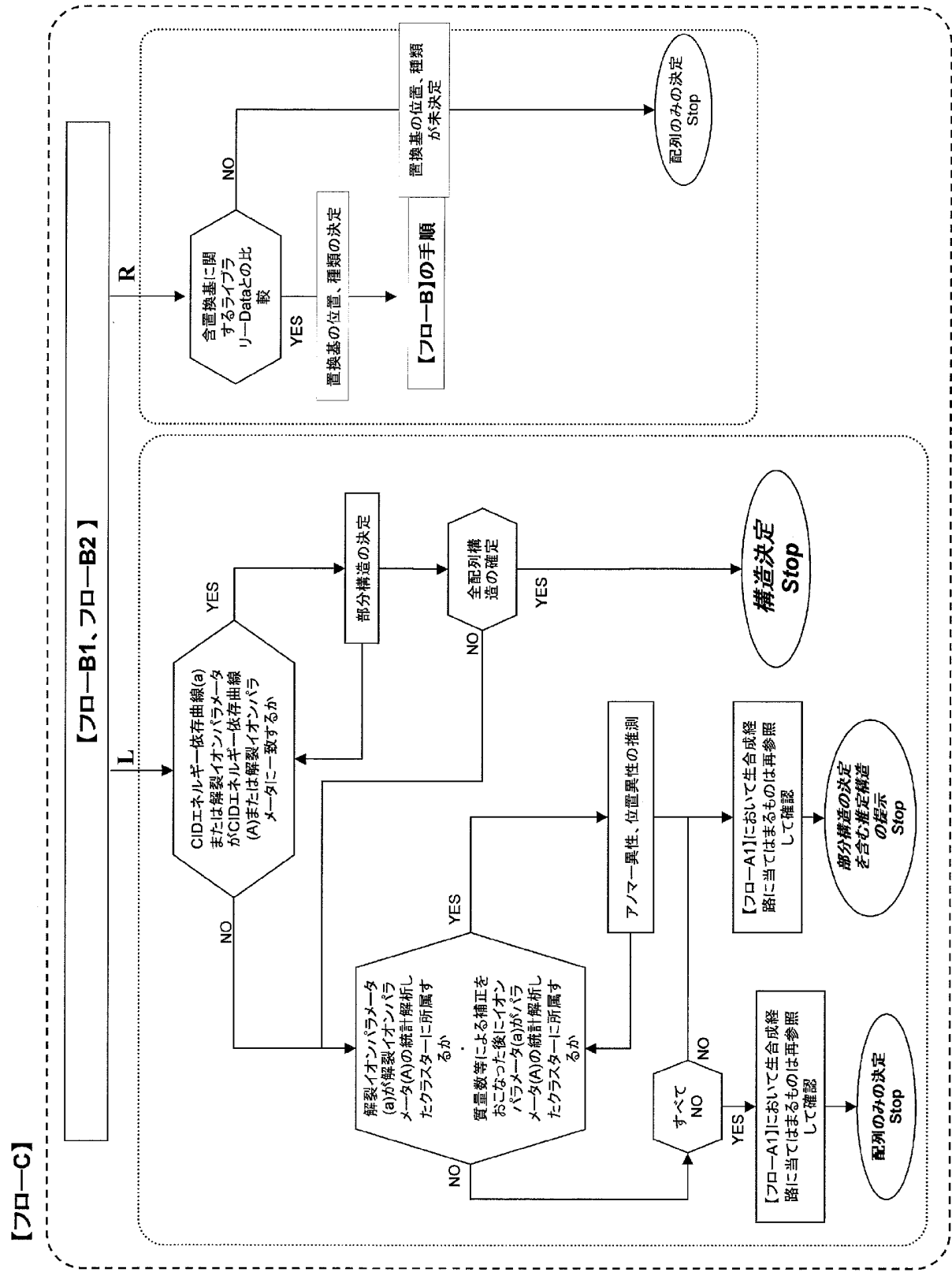
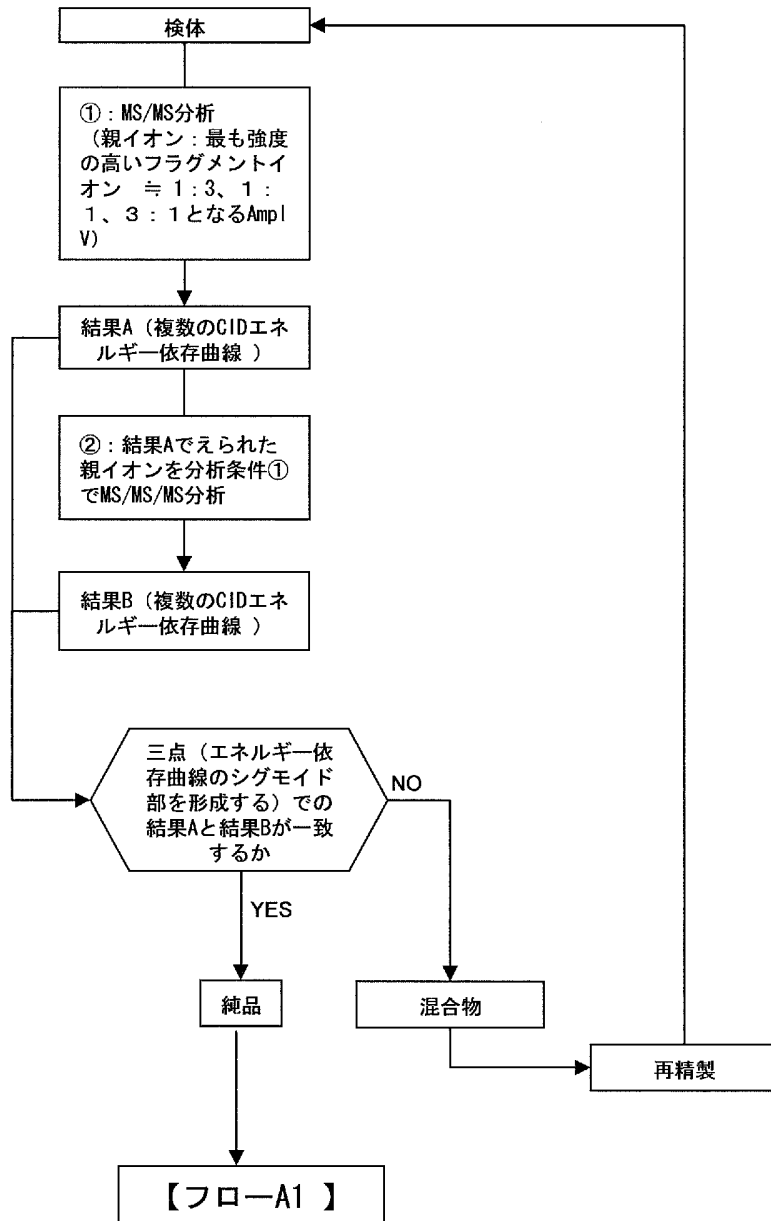


図4

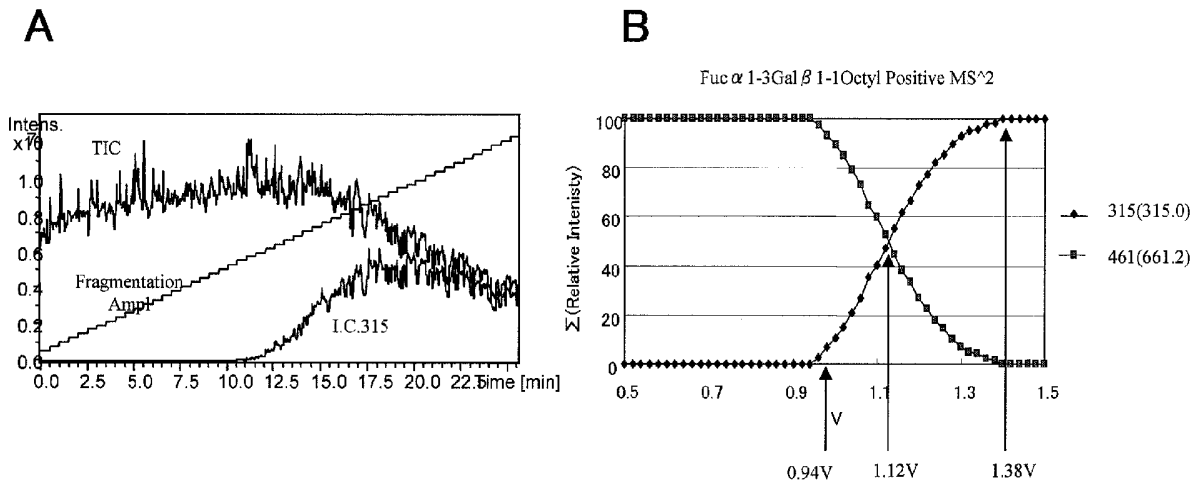


[図5]

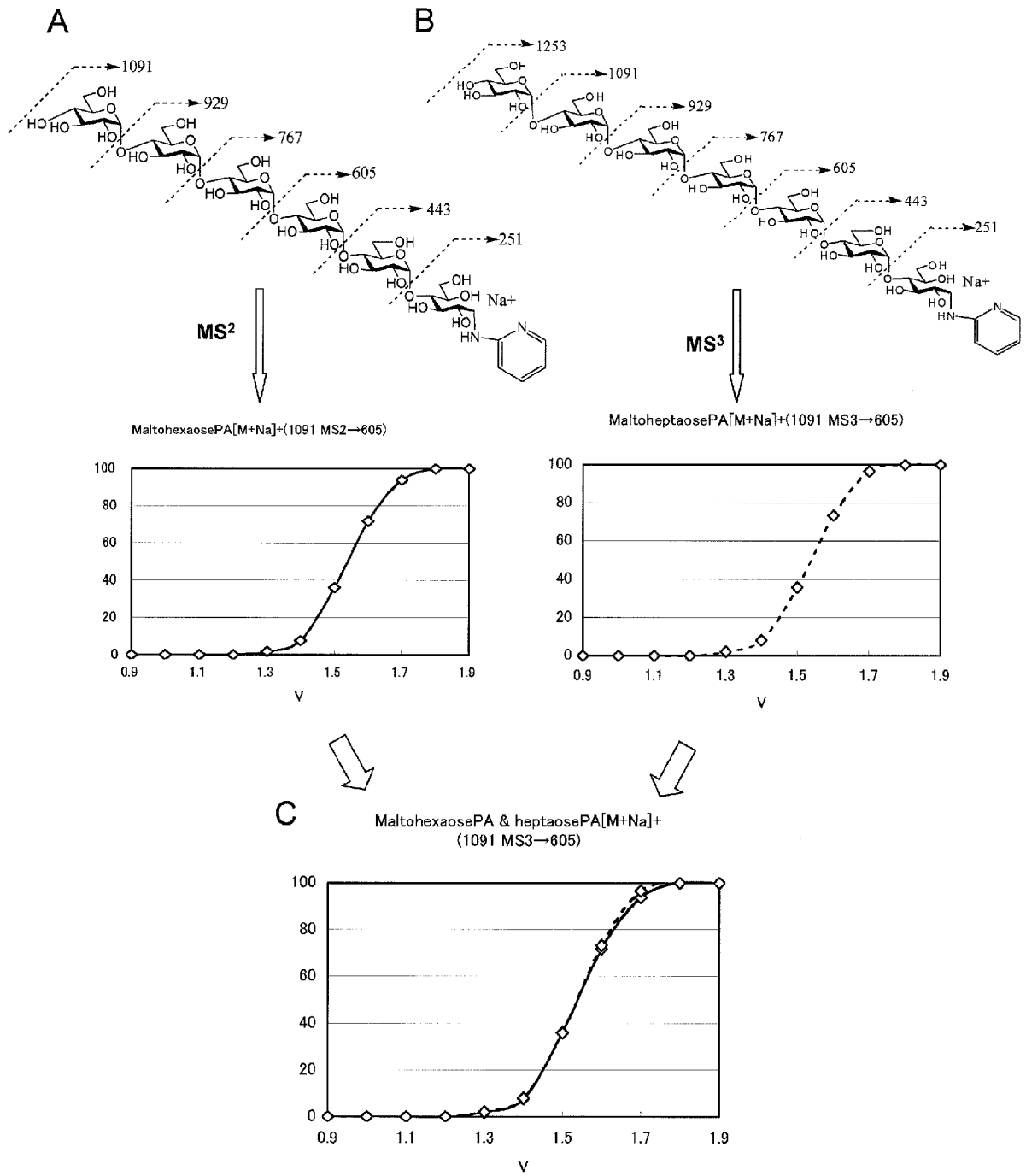
【フローD】



[図6]

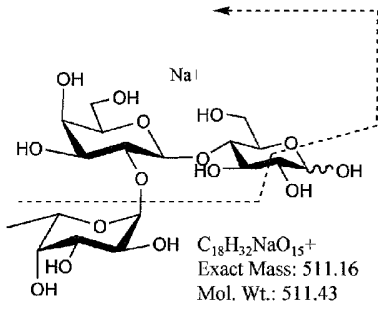


[図7]

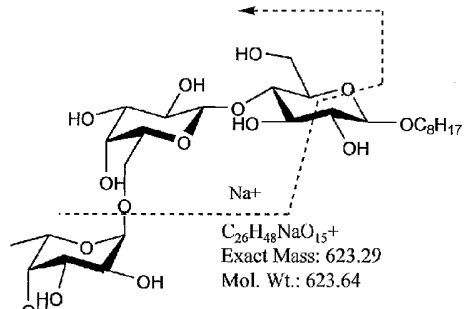


[図8]

A

Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc(天然物)MS²

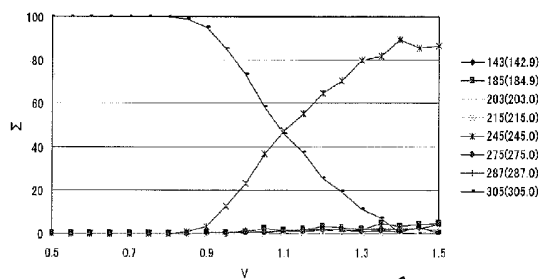
B

Fuc α 1-6Gal β 1-4Glc1-10Octyl(合成物)MS²

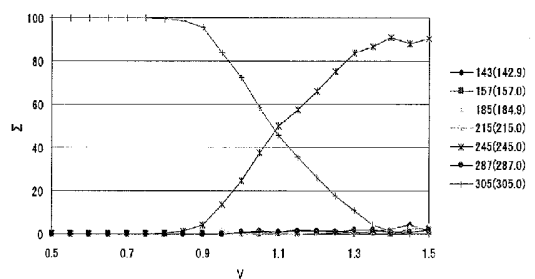
$C_{10}H_{18}NaO_9^+$
 Exact Mass: 305.08
 Mol. Wt.: 305.23

MS³MS³

A-1

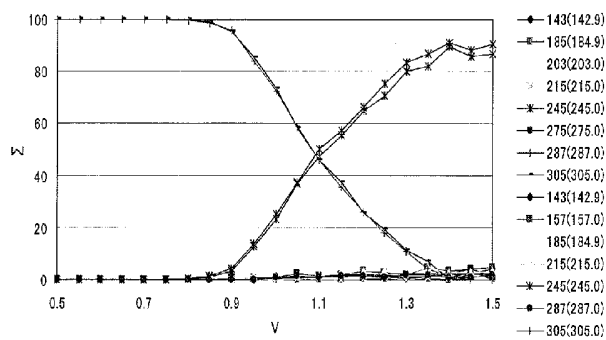
Fuc α 1-2Gal β 1-4Glc MS/MS/MS

B-1

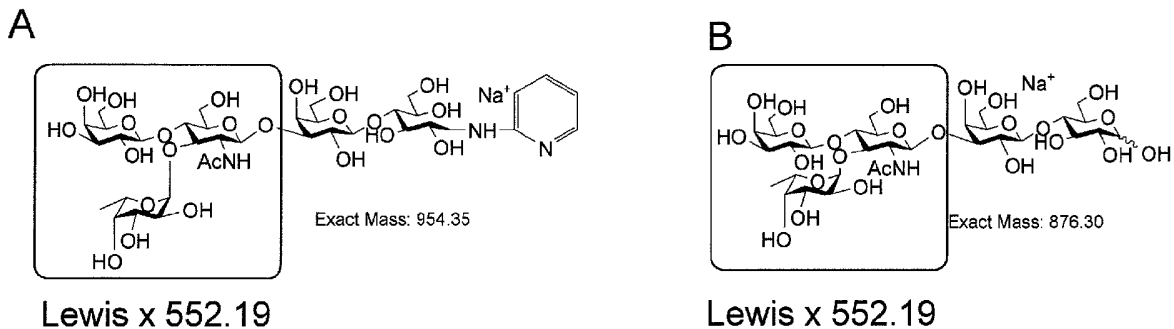
Fuc α 1-6Gal β 1-4Glc β 1-10Octyl MS/MS/MS

C

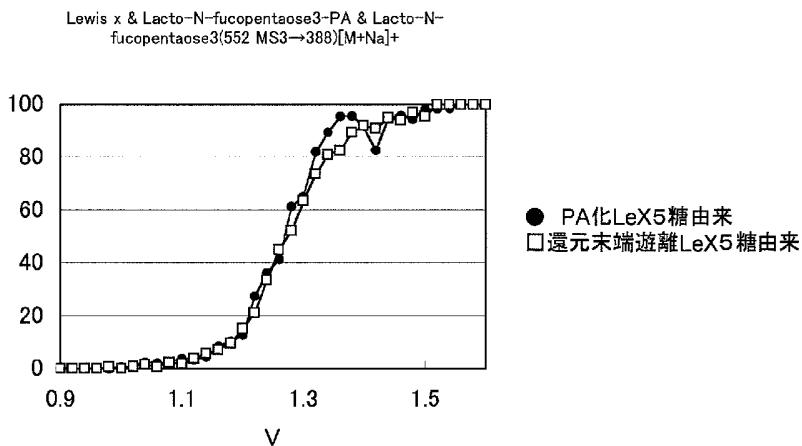
SD01131-2



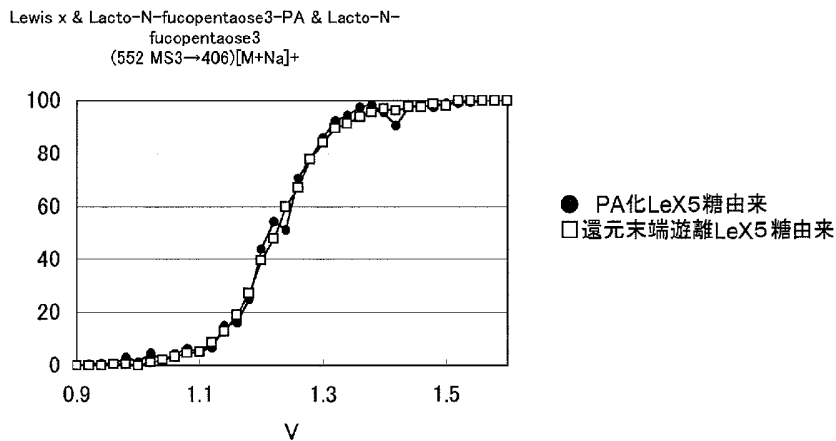
[図9]



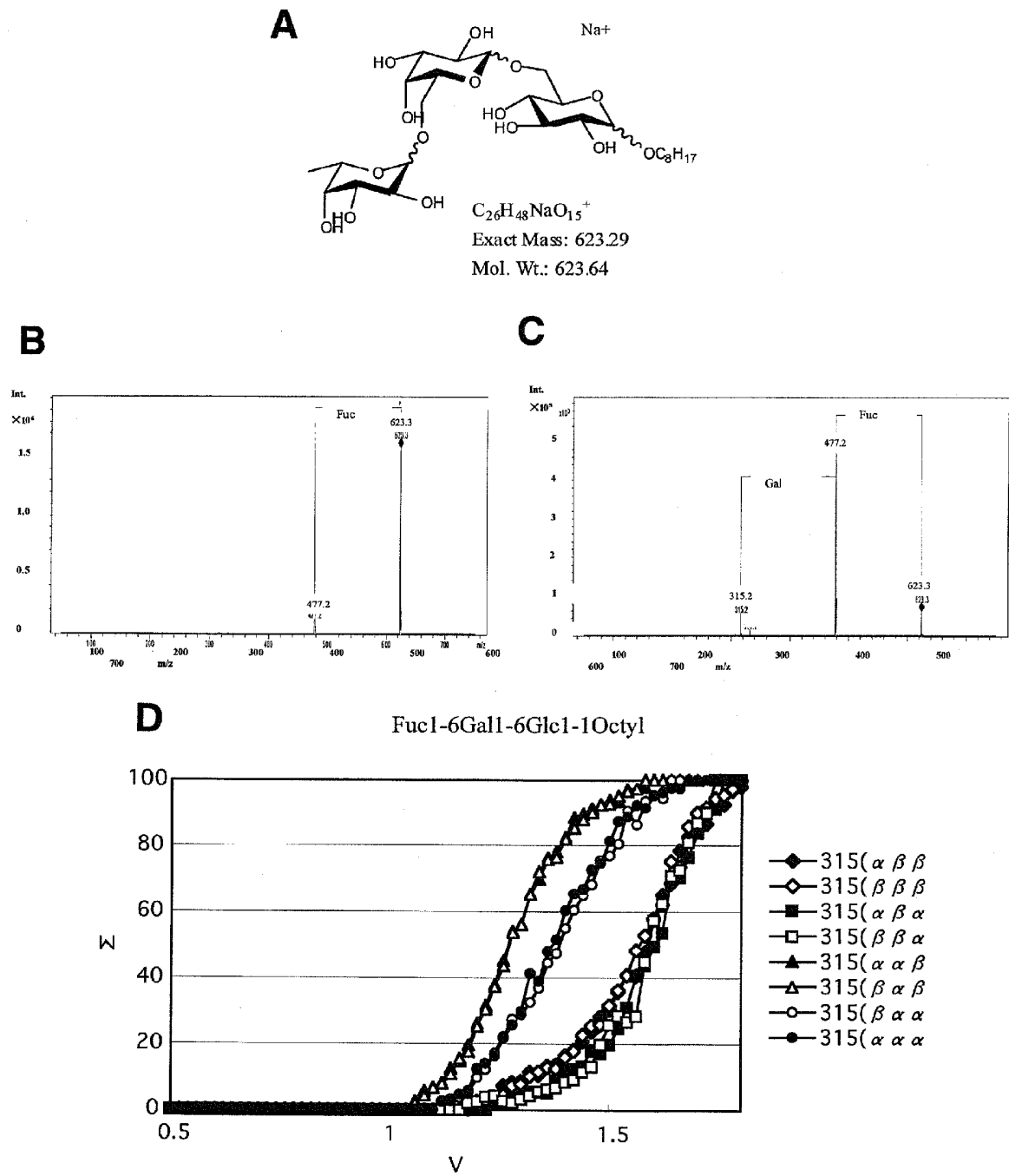
C 552→388の生成



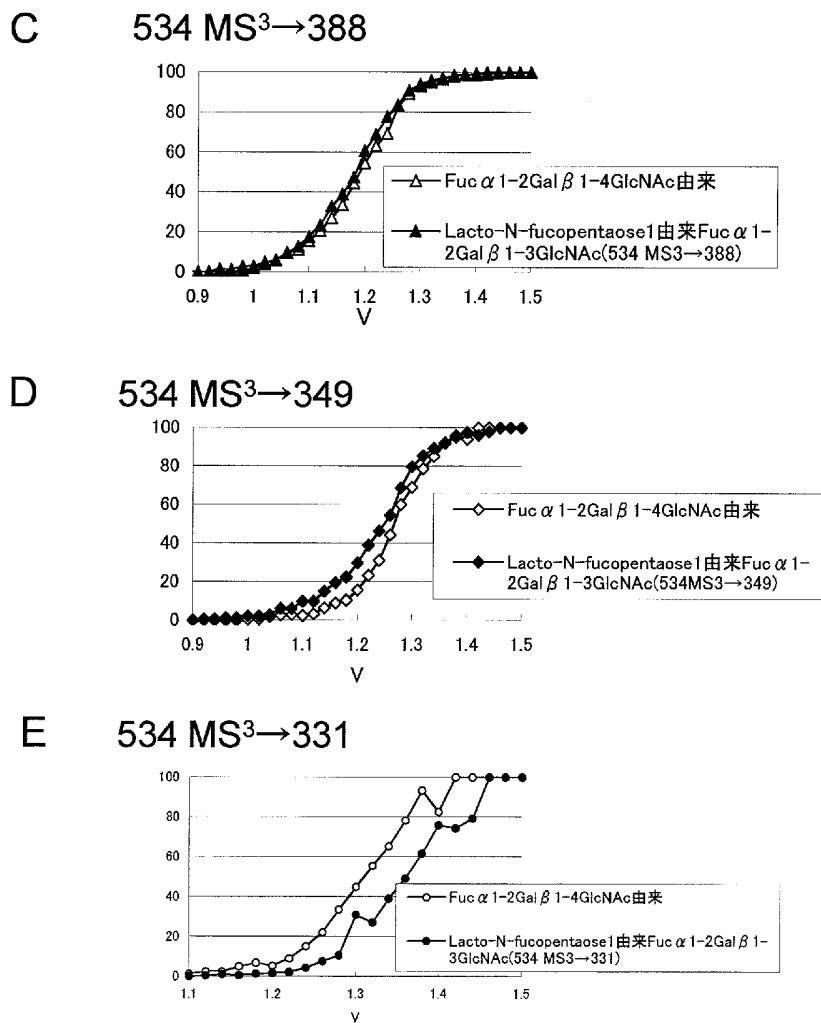
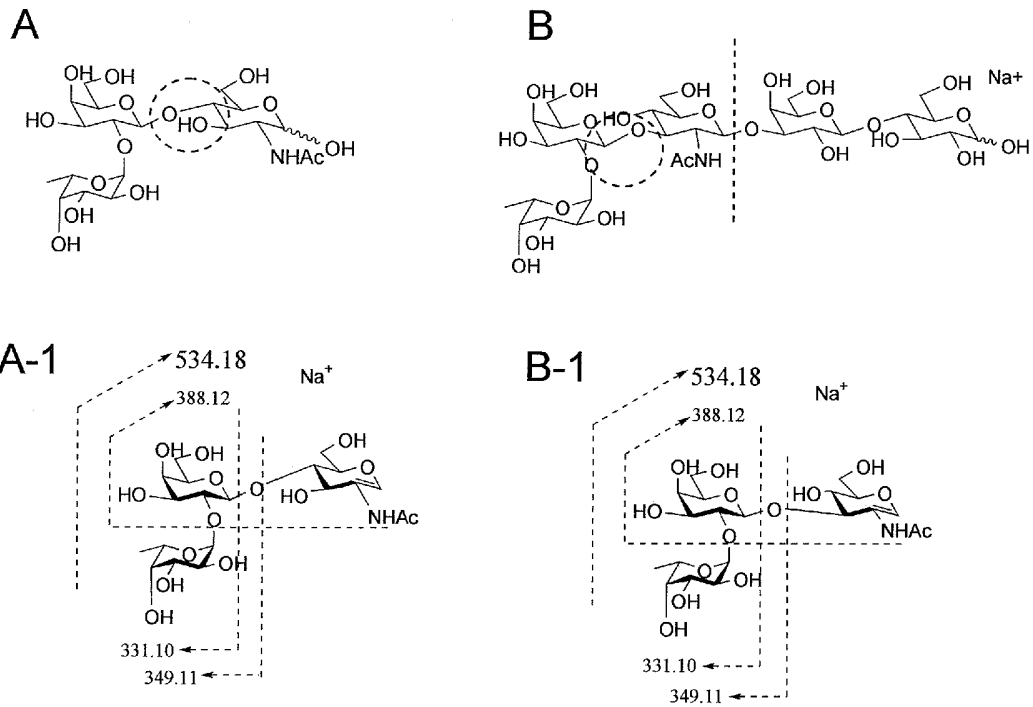
D 552→406の生成



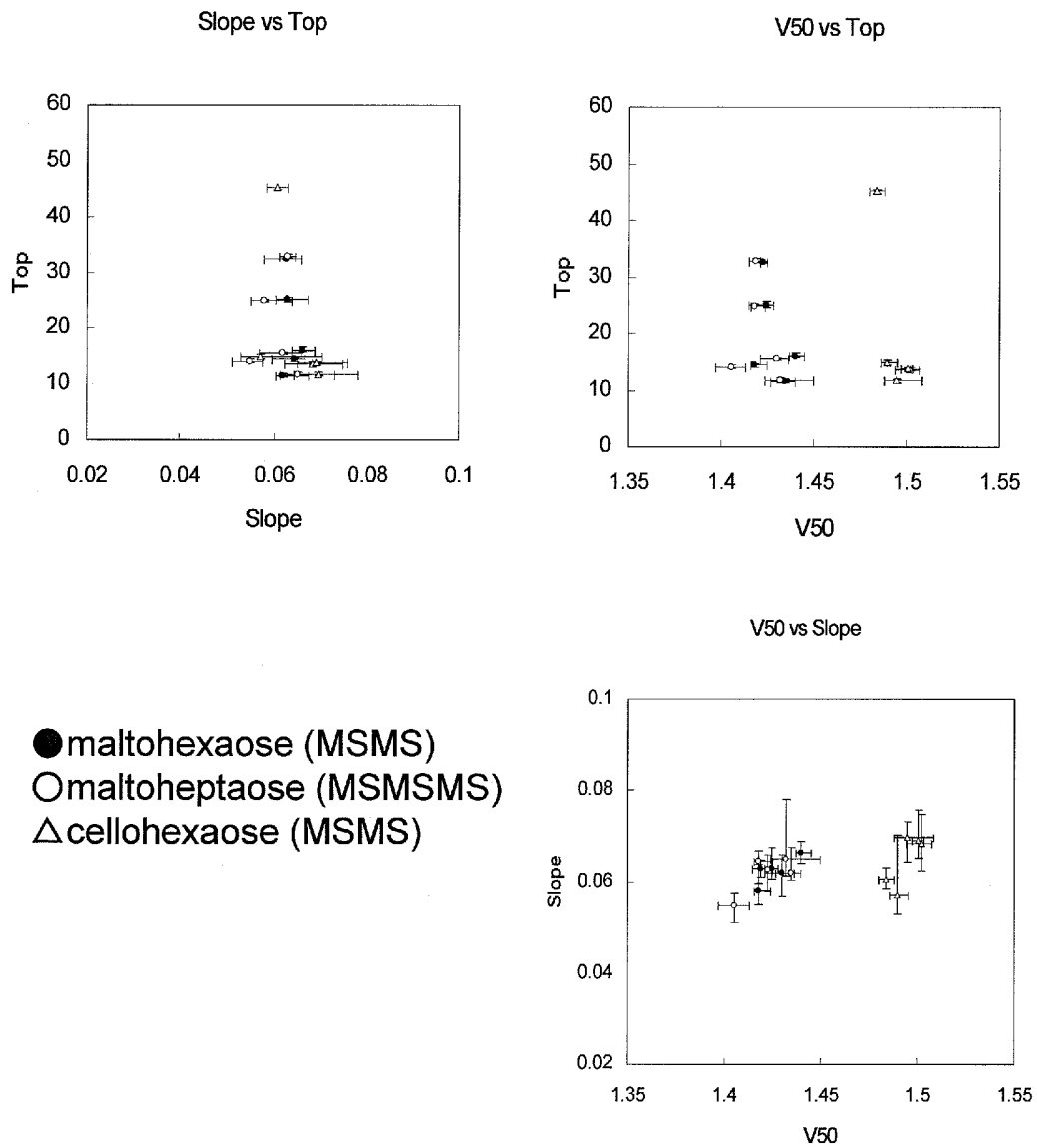
[図10]



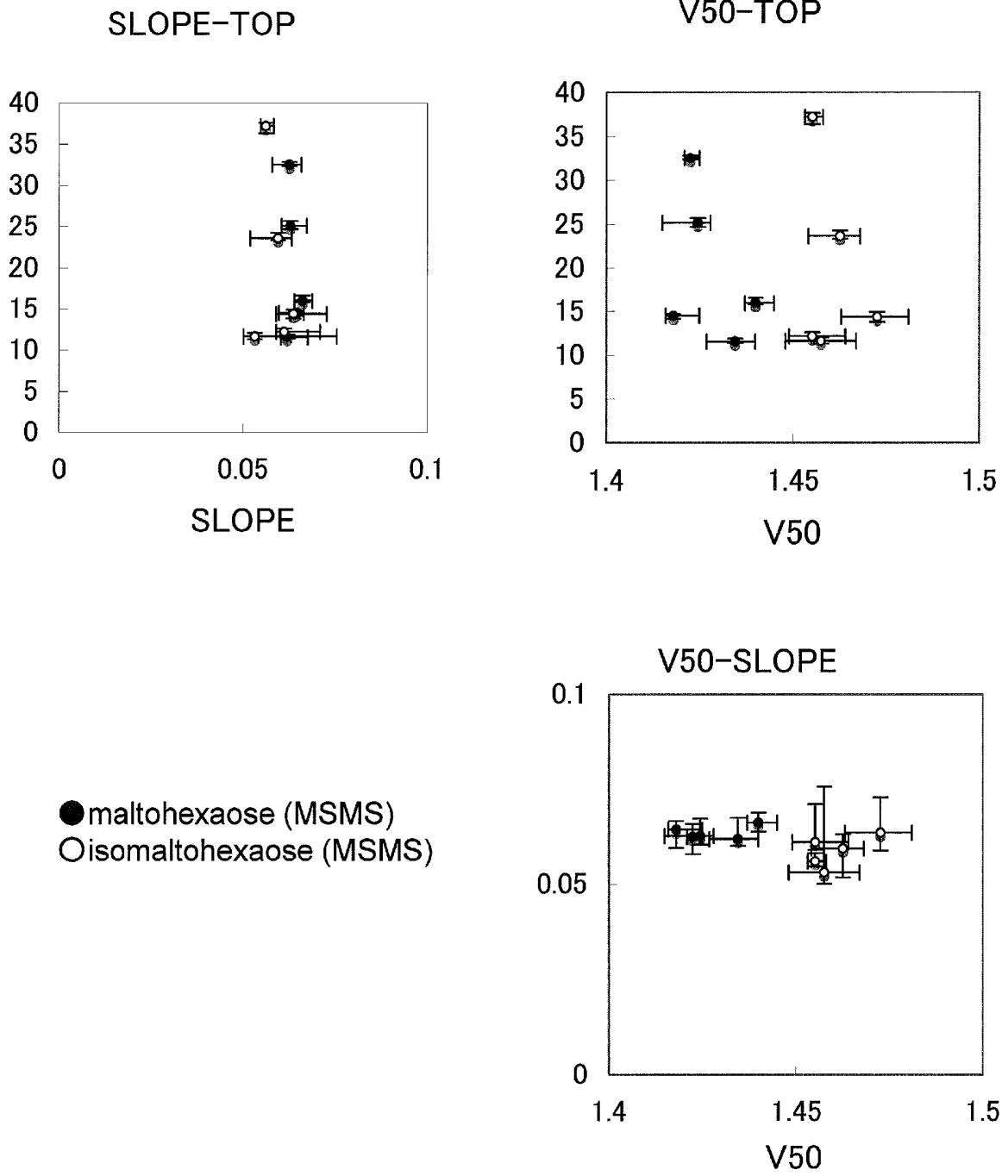
[図11]



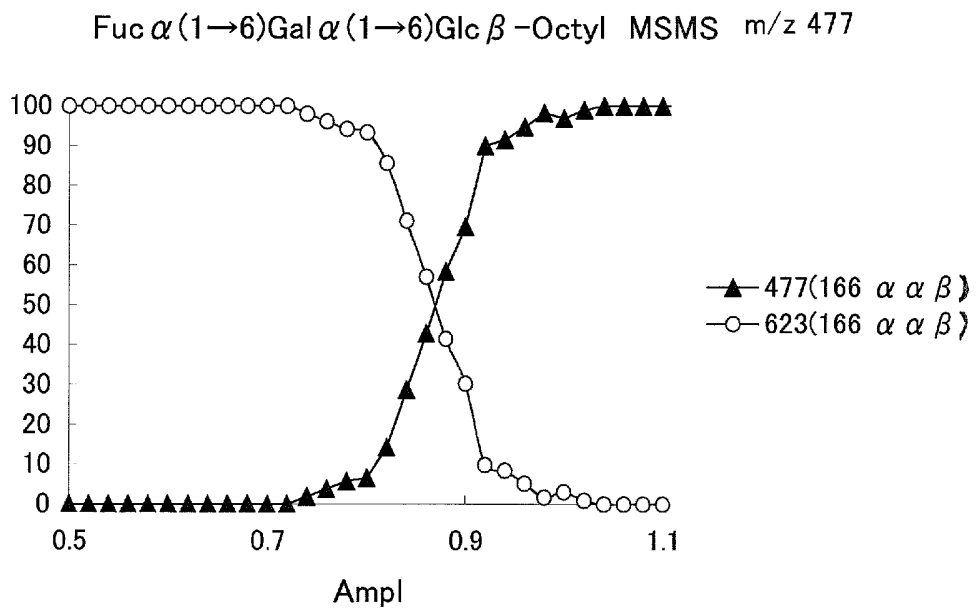
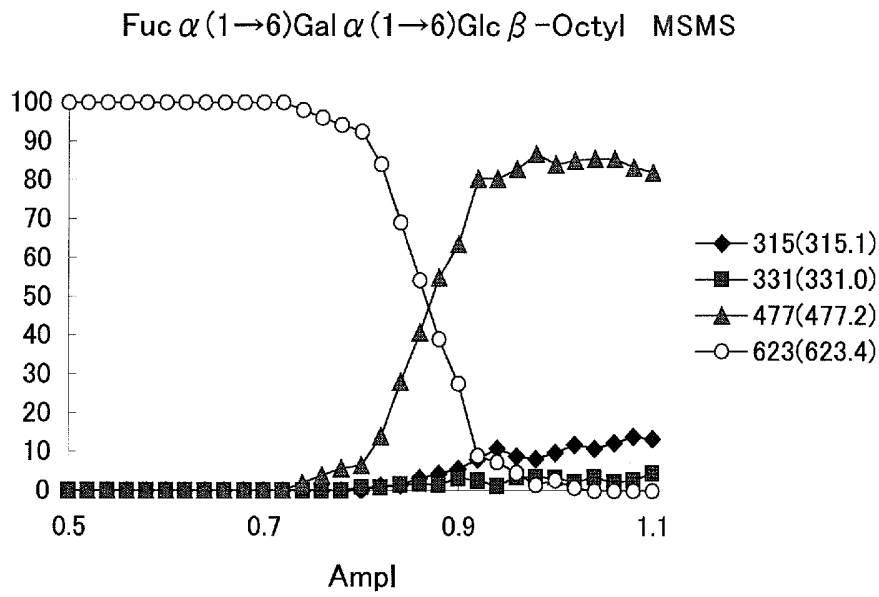
[図12]



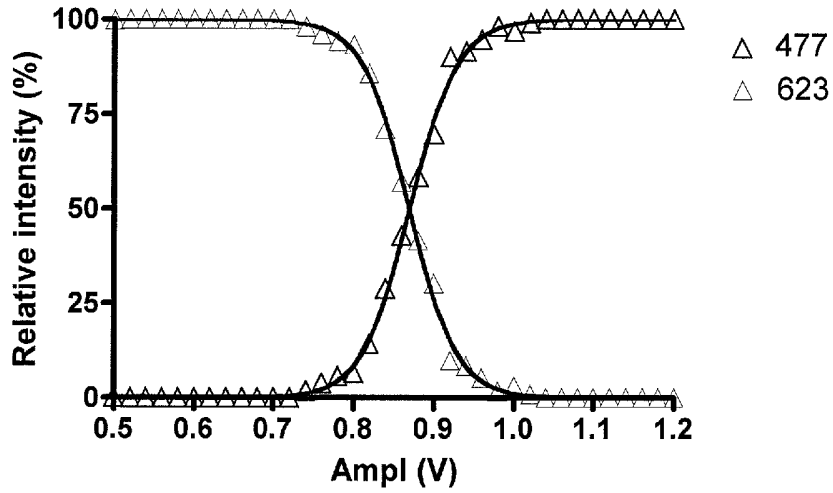
[図13]



[図14]



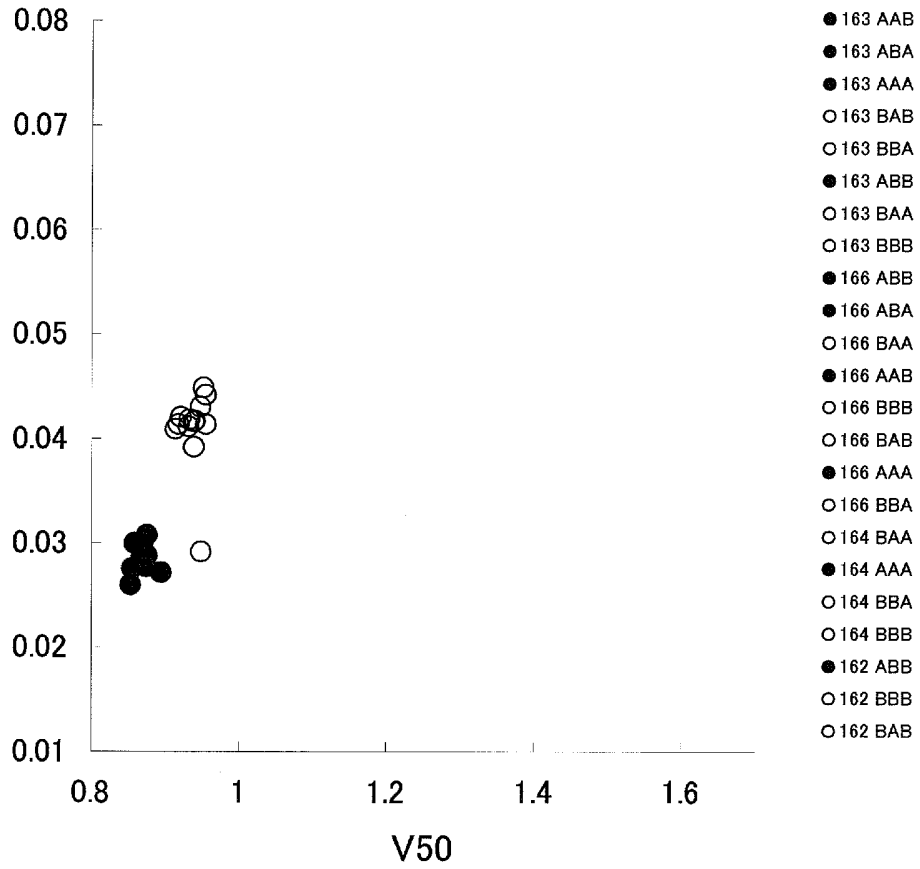
[図15]

MS² data of Fuc α 1-6Gal α 1-6Glc β -Octyl

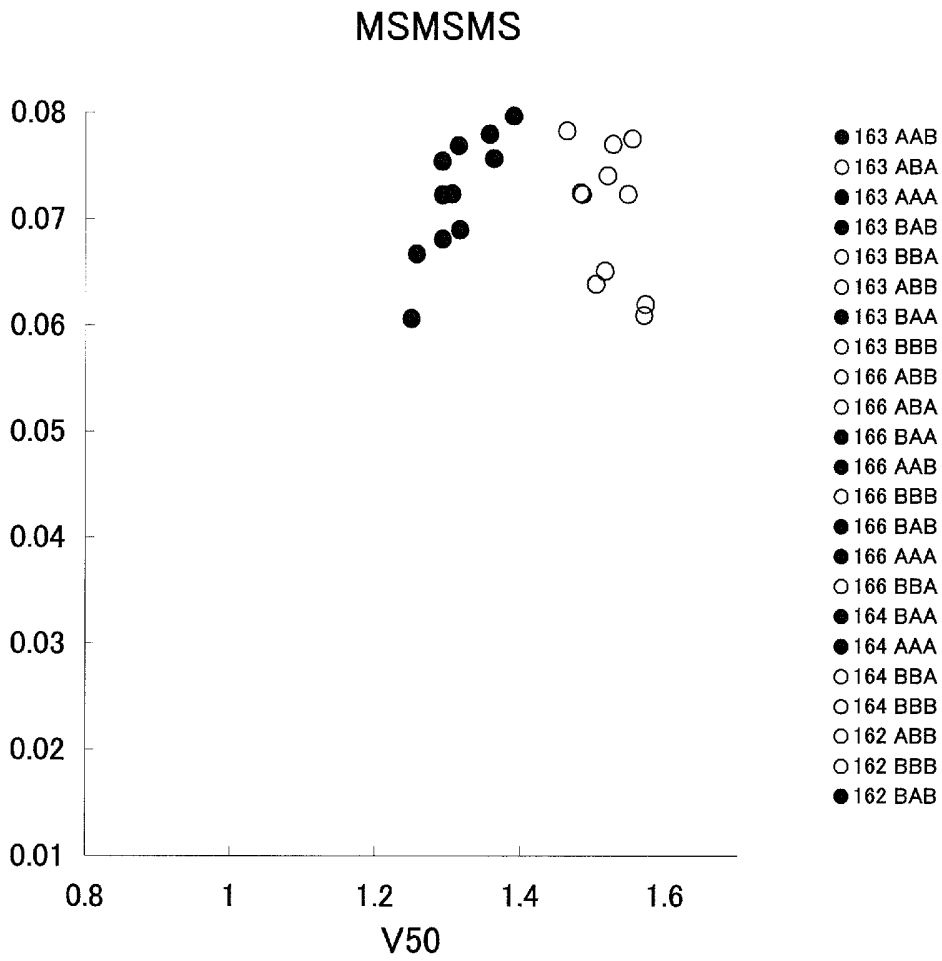
Best-fit values	477
BOTTOM	0
TOP	100
V50	0.8694
SLOPE	0.02937

[図16]

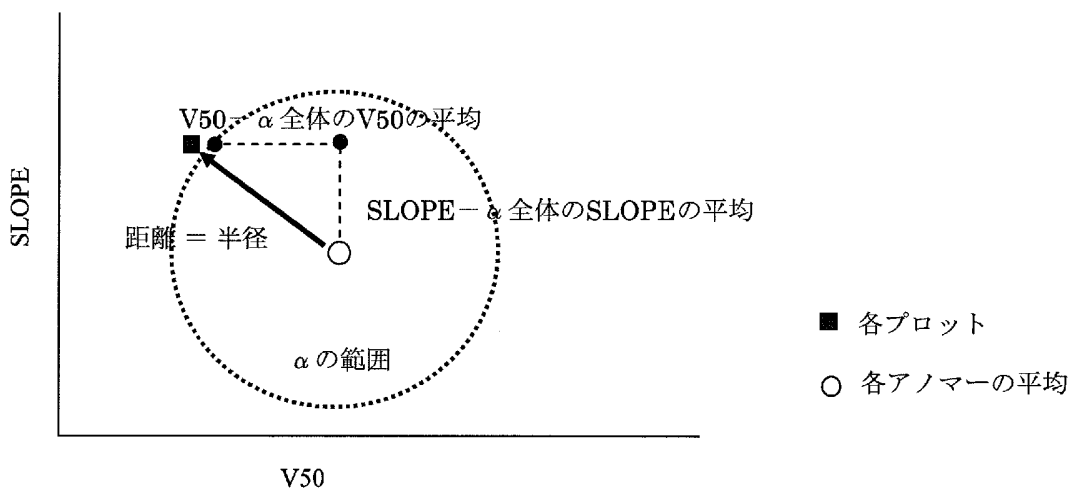
MSMS



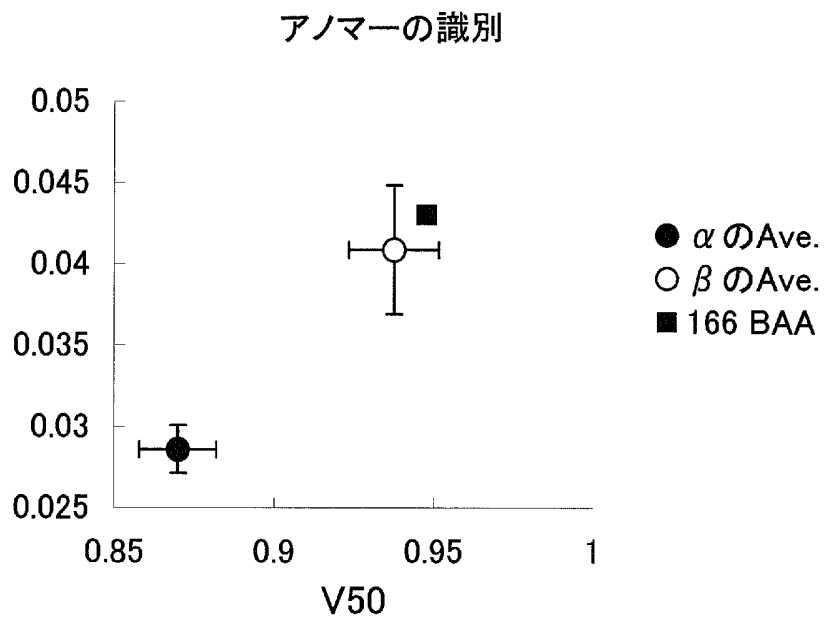
[図17]



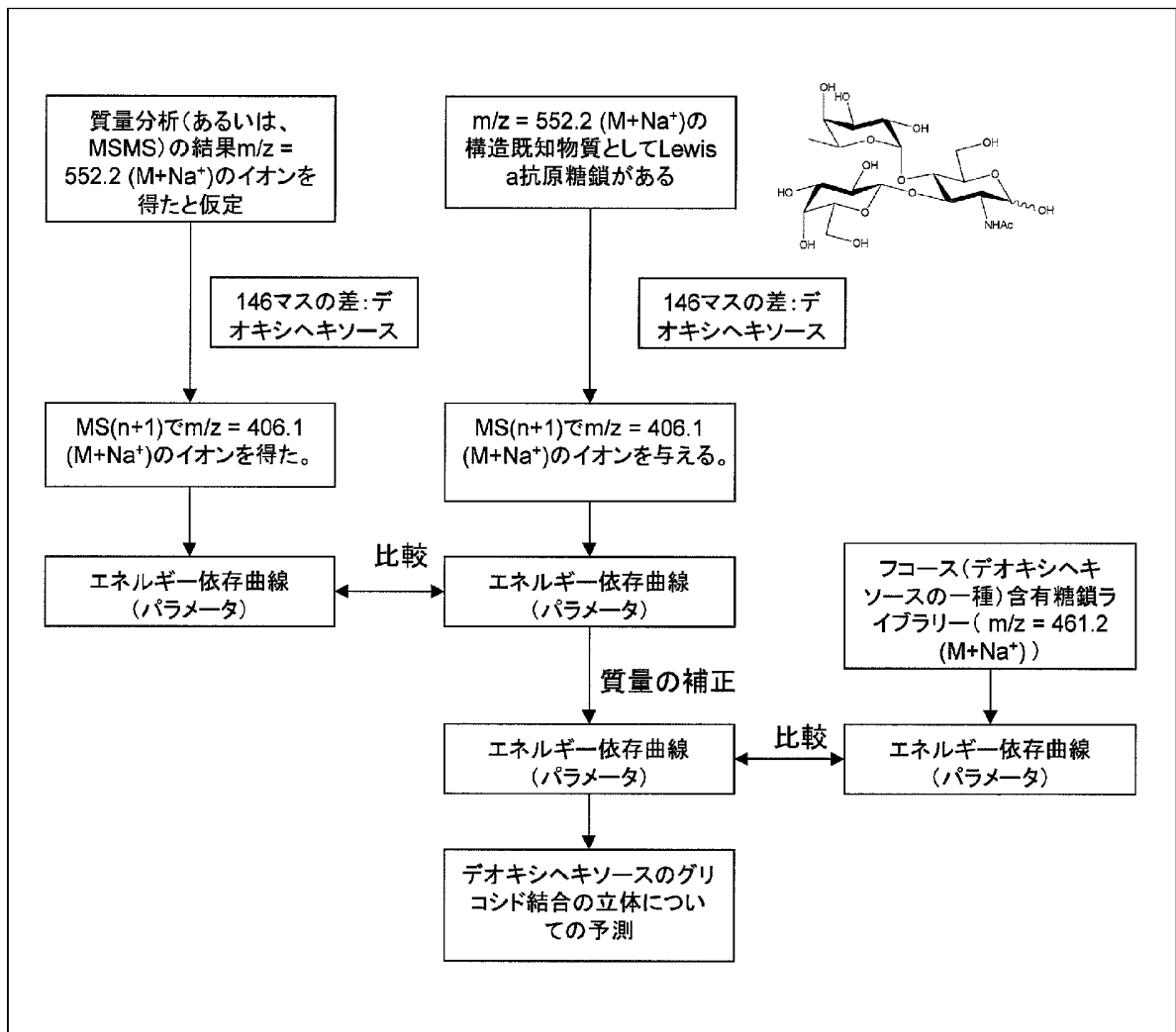
[図18]



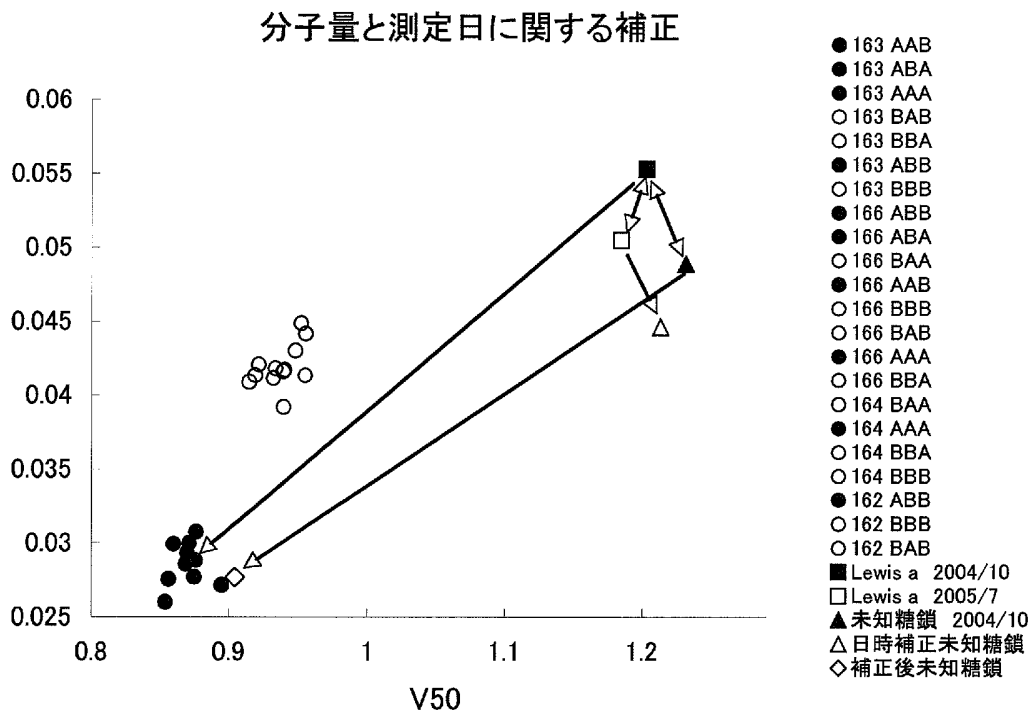
[図19]



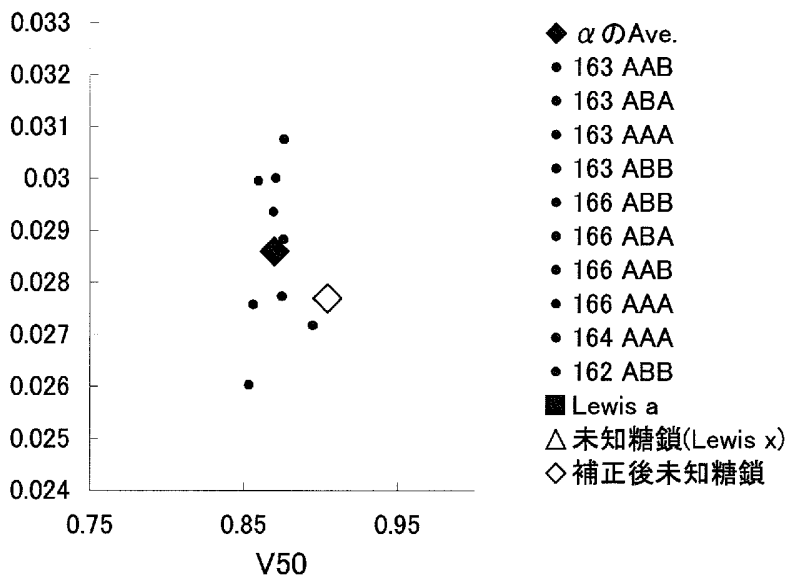
[図20]



[図21]

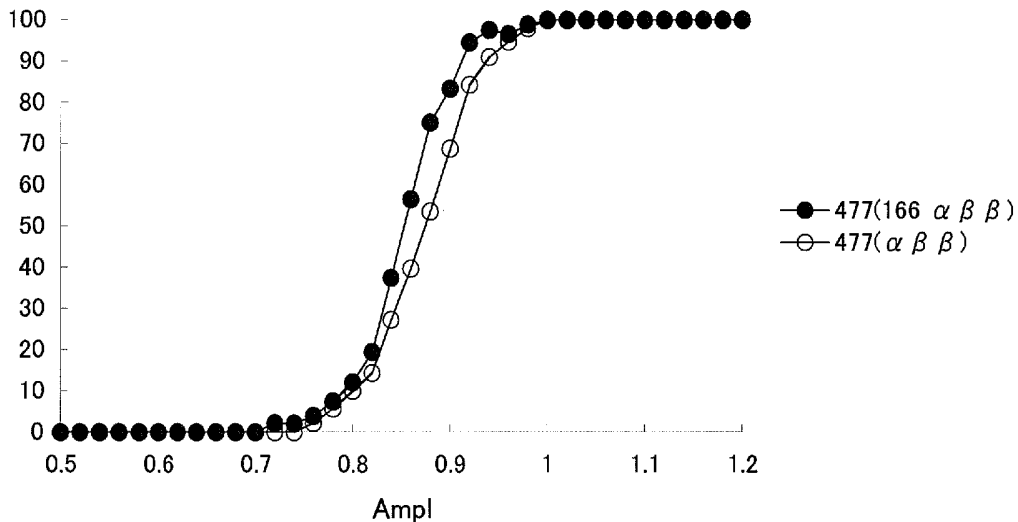


拡大図



[図22]

質量分析装置個体間の差異



一号機	
Best-fit values	m/z 477
BOTTOM	0
TOP	100
V50	0.8533
SLOPE	0.02604

二号機	
Best-fit values	m/z 477
BOTTOM	0
TOP	100
V50	0.873
SLOPE	0.03069

補正後の数値

	V50	SLOPE
補正前V50	0.9585	0.04686
補正後V50	0.9368706	0.03976
同一サンプル 一号機 V50	0.9187	0.04136

[図23]

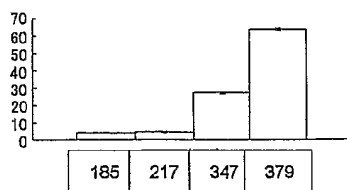
A : Gal α 1-3Gal α -OMe

MSMS

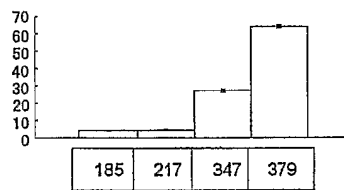
MSMSMS

0.87V

Gal α 1-3Gal α -OMe MS2 0.87V 0.8ms



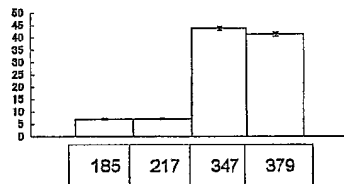
Gal α 1-3Gal α -OMe MS3 0.87V 0.8ms



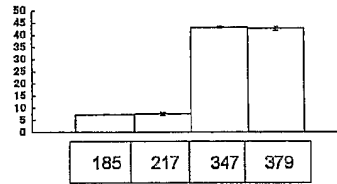
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	4.291673279	4.205637254	-0.086036025	0.086036025
217	4.47907401	4.415742707	-0.063331304	0.063331304
347	27.2805908	27.21399068	-0.06660012	0.06660012
379	63.94866191	64.16462936	0.215967449	0.215967449

0.91V

Gal α 1-3Gal α -OMe MS2 0.91V 0.8ms



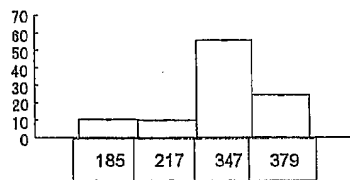
Gal α 1-3Gal α -OMe MS3 0.91V 0.8ms



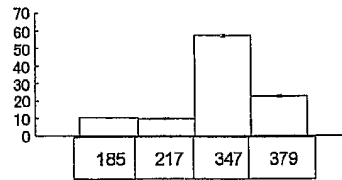
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	7.23485707	7.165323937	-0.069533133	0.069533133
217	7.344049074	7.435078365	0.091029291	0.091029291
347	43.86652455	42.97414055	-0.892384001	0.892384001
379	41.55456931	42.42545715	0.870887843	0.870887843

0.96V

Gal α 1-3Gal α -OMe MS3 0.96V 0.8ms



Gal α 1-3Gal α -OMe MS2 0.96V 0.8ms



Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	10.50179111	10.26250365	-0.239287451	0.239287451
217	9.685511916	9.877910155	0.192398239	0.192398239
347	57.25303185	55.64465285	-1.608378994	1.608378994
379	22.55966513	24.21493334	1.655268206	1.655268206

[図24]

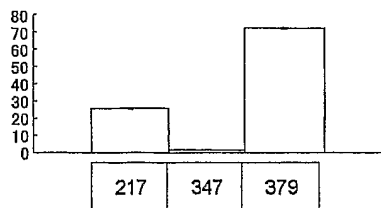
B : Gal α 1-3Gal β -OMe

MSMS

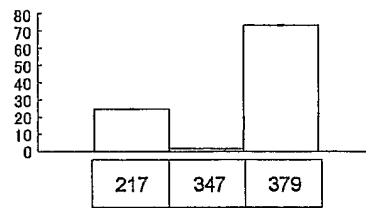
MSMSMS

0.90V

Gal α 1-3Gal β -OMe MS2 0.9V 0.8ms



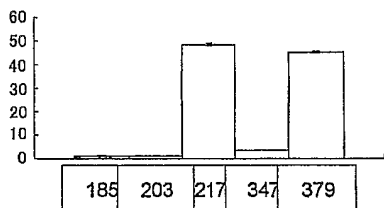
Gal α 1-3Gal β -OMe MS3 0.9V 0.8ms



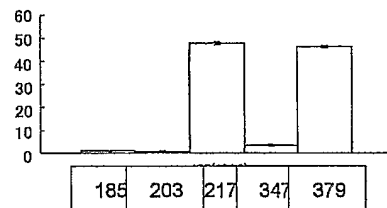
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
217	25.73078656	24.73175795	-0.999028613	0.999028613
347	1.988907127	2.010371004	0.021463877	0.021463877
379	72.28030631	73.25787105	0.977564736	0.977564736

0.98V

Gal α 1-3Gal β -OMe MS2 0.98V 0.8ms



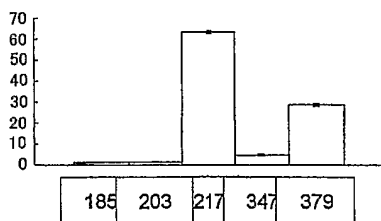
Gal α 1-3Gal β -OMe MS3 0.98V 0.8ms



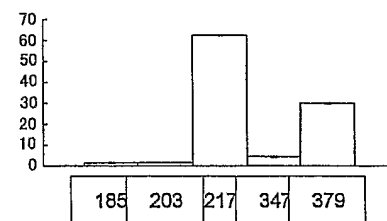
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	1.16006403	1.177220927	0.017156897	0.017156897
203	1.184955094	1.034916676	-0.150038418	0.150038418
217	48.55528189	47.92534649	-0.629935397	0.629935397
347	3.707426535	3.467802669	-0.239623866	0.239623866
379	45.39227246	46.39471324	1.002440784	1.002440784

1.04V

Gal α 1-3Gal β -OMe MS2 1.04V 0.8ms



Gal α 1-3Gal β -OMe MS3 1.04V 0.8ms



Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	1.412678377	1.496429438	0.083751061	0.083751061
203	1.553460169	1.66180761	0.108347441	0.108347441
217	63.57790073	62.45316586	-1.124734868	1.124734868
347	4.768716137	4.464844189	-0.303871947	0.303871947
379	28.68724459	29.92375291	1.236508314	1.236508314

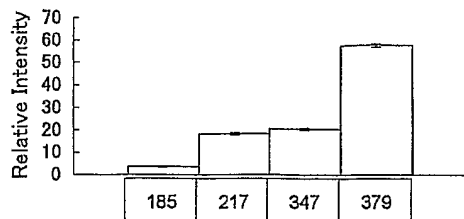
[図25]

A:B = 1:1

0.91V

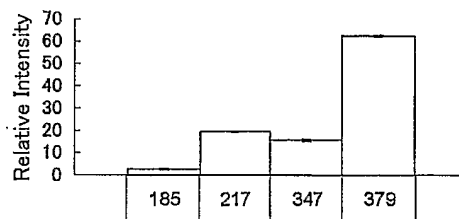
MSMS

A:B = 1:1 MSMS分析 0.91V



MSMSMS

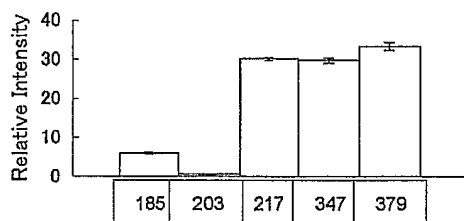
A:B = 1:1 MSMSMS分析 0.91V



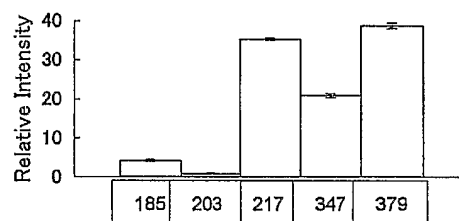
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	3.484124945	2.669347427	-0.814777518	0.814777518
217	18.30835749	19.51647481	1.20811732	1.20811732
347	20.46888782	15.53026173	-4.938626087	4.938626087
379	57.73862974	62.28391603	4.545286284	4.545286284

0.98V

A:B = 1:1 MSMS分析 0.98V



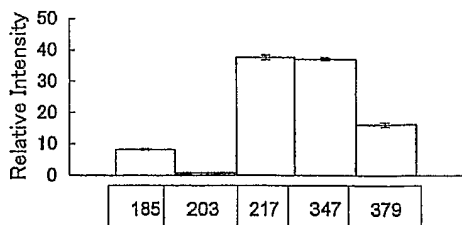
A:B = 1:1 MSMSMS分析 0.98V



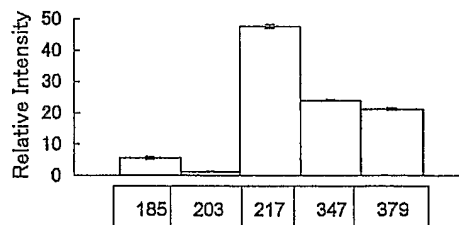
Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	5.985056558	4.214056227	-1.771000331	1.771000331
203	0.638853003	0.811426768	0.172573765	0.172573765
217	30.1725796	35.33544046	5.162860865	5.162860865
347	29.80854413	20.88359805	-8.924946081	8.924946081
379	33.39496671	38.75547849	5.360511783	5.360511783

1.05V

A:B = 1:1 MSMS分析 1.05V



A:B = 1:1 MSMSMS分析 1.05V



Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	8.229682068	5.636868146	-2.592813923	2.592813923
203	0.779632641	1.259585555	0.479952914	0.479952914
217	37.66115564	47.68850545	10.02734981	10.02734981
347	37.05919324	24.09569507	-12.96349817	12.96349817
379	16.27033641	21.31934578	5.049009372	5.049009372

[図26]

A:B = 1:9

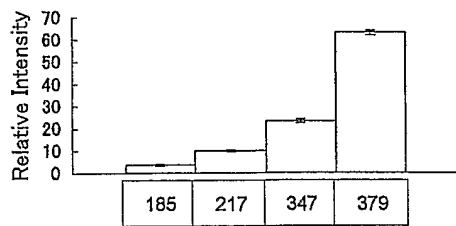
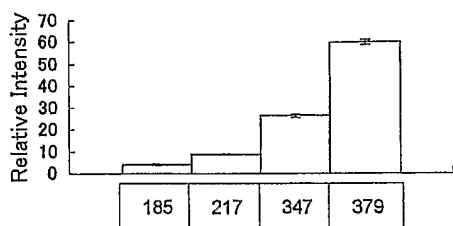
MSMS

MSMSMS

0.88V

A:B = 1:9 MSMS分析 0.88V

A:B = 1:9 MSMSMS分析 0.88V

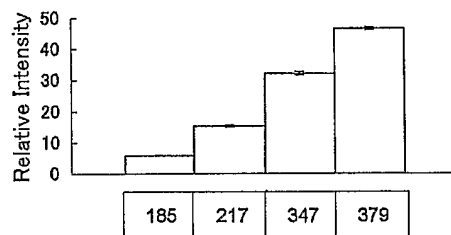
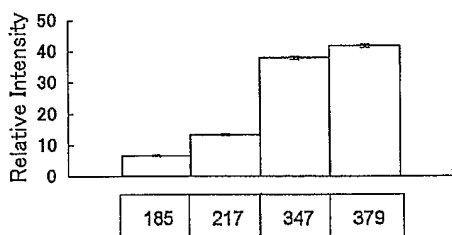


Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	4.268427092	3.697410827	-0.571016265	0.571016265
217	8.875992966	10.05705734	1.181064371	1.181064371
347	26.67459825	23.31471616	-3.359882094	3.359882094
379	60.18098169	62.93081568	2.749833988	2.749833988

A:B = 1:9 MSMS分析 0.93V

A:B = 1:9 MSMSMS分析 0.93V

0.93V

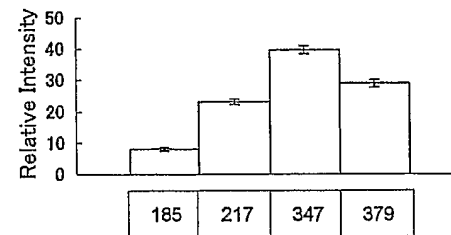
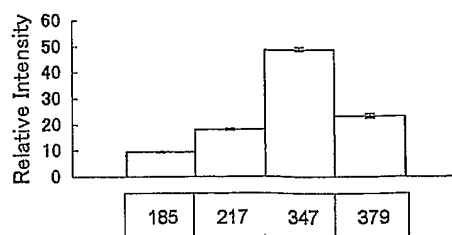


Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	6.699756906	5.919388937	-0.780367968	0.780367968
217	13.41044777	15.33931335	1.928865582	1.928865582
347	38.06541428	32.18630801	-5.879106271	5.879106271
379	41.82438105	46.5549897	4.730608657	4.730608657

A:B = 1:9 MSMS分析 0.99V

A:B = 1:9 MSMSMS分析 0.99V

0.99V



Ampl	Ave.MS2(A)	Ave.MS3(B)	差(B-A)	差(絶対値)
185	9.659541653	8.154820648	-1.504721005	1.504721005
217	18.25663222	23.17098712	4.9143549	4.9143549
347	48.72679769	39.74600932	-8.980788363	8.980788363
379	23.35702844	28.92818291	5.571154468	5.571154468

PCT

紙面による写し(注意 提出用では有りません)

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 三菱化学株式会社 は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のよ うに開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1(i)	開示の種類:	刊行物
VIII-5-1(ii)	開示の日付:	2004年 10月 01日 (01.10.2004)
VIII-5-1(iii)	開示の名称:	GLYCOBIOLOGY (2004) 14 : a b s t r a c t 66, 459, 461
VIII-5-1(iv)	開示の場所:	
VIII-5-1(v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018134

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N27/62(2006.01) , G01N33/483(2006.01)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>														
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N27/62-G01N27/70, H01J49/00-H01J49/48</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JOIS)</p>														
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X Y</td> <td>Osamu KANIE, "Shitsuryo Bunsekiho ni yoru Teiryoteki Kairetsu Hanno Kaiseiki", Polymer Preprints, Japan, Vol.53, No.2, 01 September, 2004 (01.09.04), pages 5378 to 5379</td> <td>1, 8, 9, 11 <u>7, 10, 12, 13</u></td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2004-191077 A (Hitachi, Ltd.), 08 July, 2004 (08.07.04), Claim 15; Par. Nos. [0002], [0025]; Fig. 9 & US 2004/0111228 A1 & EP 1429145 A1</td> <td>7, 10, 13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2003-507874 A (University of New Hampshire), 25 February, 2003 (25.02.03), Par. No. [0003] & WO 01/15201 A2</td> <td>12</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X Y	Osamu KANIE, "Shitsuryo Bunsekiho ni yoru Teiryoteki Kairetsu Hanno Kaiseiki", Polymer Preprints, Japan, Vol.53, No.2, 01 September, 2004 (01.09.04), pages 5378 to 5379	1, 8, 9, 11 <u>7, 10, 12, 13</u>	Y	JP 2004-191077 A (Hitachi, Ltd.), 08 July, 2004 (08.07.04), Claim 15; Par. Nos. [0002], [0025]; Fig. 9 & US 2004/0111228 A1 & EP 1429145 A1	7, 10, 13	Y	JP 2003-507874 A (University of New Hampshire), 25 February, 2003 (25.02.03), Par. No. [0003] & WO 01/15201 A2	12
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X Y	Osamu KANIE, "Shitsuryo Bunsekiho ni yoru Teiryoteki Kairetsu Hanno Kaiseiki", Polymer Preprints, Japan, Vol.53, No.2, 01 September, 2004 (01.09.04), pages 5378 to 5379	1, 8, 9, 11 <u>7, 10, 12, 13</u>												
Y	JP 2004-191077 A (Hitachi, Ltd.), 08 July, 2004 (08.07.04), Claim 15; Par. Nos. [0002], [0025]; Fig. 9 & US 2004/0111228 A1 & EP 1429145 A1	7, 10, 13												
Y	JP 2003-507874 A (University of New Hampshire), 25 February, 2003 (25.02.03), Par. No. [0003] & WO 01/15201 A2	12												
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>														
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family													
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
<p>Date of the actual completion of the international search 16 December, 2005 (16.12.05)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 27 December, 2005 (27.12.05)</p>												
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>												
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2004-245699 A (Hitachi, Ltd.), 02 September, 2004 (02.09.04), Par. No. [0040] & US 2004/0181347 A1 & EP 1447833 A2	14
Y	JP 2005-520176 A (HK Pharmaceuticals, Inc.), 07 July, 2005 (07.07.05), Par. No. [0094] & WO 2003/092581 A2	14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018134

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 2-6
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
claims 2-6 are directed to mere presentation of information.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See attachment (extra sheet).

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/018134

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The matter common to the invention of claims 1, 8 and 9, the invention of claims 7, 10 and 13, the invention of claim 11, the invention of claim 12 and the invention of claim 14 is use of a CID energy-dependent curve.

However, search has revealed that this common matter is not novel as it is disclosed in the reference (1): Osamu KANIE, "Shitsuryo Bunsekiho ni yoru Teiryoteki Kairetsu Hanno Kaiseki", Polymer Preprints, Japan, Vol.53, No.2, 01 September, 2004 (01.09.04), pages 5378 to 5379

Consequently, the above common matter falls within the category of prior art and hence the common matter is not a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence.

Therefore, there is no matter common to all of the invention of claims 1, 8 and 9, the invention of claims 7, 10 and 13, the invention of claim 11, the invention of claim 12 and the invention of claim 14.

As there exists no other common matter which can be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2, second sentence, no technical relationship within the meaning of PCT Rule 13 can be found among the different inventions.

Therefore, it is apparent that the invention of claims 1, 8 and 9, the invention of claims 7, 10 and 13, the invention of claim 11, the invention of claim 12 and the invention of claim 14 do not satisfy the requirement of unity of invention.

With respect to claims 2-6, it has been found that they relate to a subject matter for which no international search is required (see Box No. II). Even if they were a subject matter requiring international search, the claims 2-6 are directed to an invention whose special technical feature is identical with that of the invention of claims 7, 10 and 13, and accordingly there is no influence upon judgment of the unity of invention, especially the number of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. **G01N27/62** (2006.01), **G01N33/483** (2006.01)

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. G01N27/62-G01N27/70, H01J49/00-H01J49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	蟹江治, “質量分析法による定量的解裂反応解析”, 高分子学会予稿集, Vol. 53, No. 2, 2004. 09. 01, pp. 5378-5379	1, 8, 9, 11 <u>7, 10, 12, 13</u>
Y	JP 2004-191077 A (株式会社日立製作所) 2004. 07. 08, 【請求項 15】 , 【0002】 , 【0025】 , 図 9 & US 2004/0111228 A1 & EP 1429145 A1	7, 10, 13

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日
 16. 12. 2005

国際調査報告の発送日
 27. 12. 2005

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JIP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
 高場 正光
 電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2W	3311
----	------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-507874 A (ユニバーシティ オブ ニュー ハンプシャー) 2003. 02. 25, 【0003】 & WO 01/15201 A2	12
Y	JP 2004-245699 A (株式会社日立製作所) 2004. 09. 02, 【0040】 & US 2004/0181347 A1 & EP 1447833 A2	14
Y	JP 2005-520176 A (エイチケイ・ファーマシューティカルズ・イン コーポレイテッド) 2005. 07. 07, 【0094】 & WO 2003/092581 A2	14

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 2-6 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 2-6 は、情報の単なる提示である。
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。
別紙 (特別ページ) を参照。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

請求の範囲1, 8, 9に係る発明、請求の範囲7, 10, 13に係る発明、請求の範囲11に係る発明、請求の範囲12に係る発明、請求の範囲14に係る発明の共通事項は、CIDエネルギー依存曲線が用いられる点である。

しかしながら、調査の結果、当該共通事項は、

文献1 蟹江治, “質量分析法による定量的解裂反応解析”,
高分子学会予稿集, Vol. 53, No. 2, 2004. 09. 01, pp. 5378-5379

に開示されているから、新規でないことが明らかとなった。

結果として、前記各共通事項は先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、前記各共通事項は特別な技術的特徴ではない。

それ故、請求の範囲1, 8, 9に係る発明、請求の範囲7, 10, 13に係る発明、請求の範囲11に係る発明、請求の範囲12に係る発明、請求の範囲14に係る発明の全てに共通する事項はない。

PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことはできない。

以上から、請求の範囲1, 8, 9に係る発明、請求の範囲7, 10, 13に係る発明、請求の範囲11に係る発明、請求の範囲12に係る発明、請求の範囲14に係る発明は、発明の単一性を満たしていないことが明らかである。

なお、請求の範囲2-6については、国際調査をすることを要しない対象に係るものであると認定した(第II欄を参照)が、仮に国際調査の対象であるとしても、当該請求の範囲2-6は、上記請求の範囲7, 10, 13に係る発明と特別な技術的特徴を一にする発明であり、上記単一性の判断、特に発明の数、に影響を与えるものではない。