

氏 名	せきや さだのり 関 谷 禎 規
学位(専攻分野)	博 士 ( 工 学 )
学 位 記 番 号	博 乙 第 1 5 0 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 4 項該当
学 位 論 文 題 目	生体高分子の質量分析による新しい構造解析方法の開発 (主査)
審 査 委 員	教授 竹谷 茂 教授 山岡亮平 教授 村上 章

## 論文内容の要旨

本研究ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization ; MALDI) 質量分析による生体高分子の新しい構造解析方法を 4 種類開発した。

第 1 は、酸性アミノ酸残基を含有するペプチドのタンデムマススペクトロメトリー (MS/MS) において、プロダクトイオンの生成効率を向上させる方法を開発した。これまで、酸性アミノ酸 (アスパラギン酸およびグルタミン酸) が存在するペプチドの MS/MS では酸性アミノ酸残基部位で開裂が優先的に生じ、他のアミノ酸残基部位で開裂したプロダクトイオンの生成効率が低下する問題があった。本研究では酸性アミノ酸の側鎖カルボキシ基をアミド化することにより、MS/MS における酸性アミノ酸残基部位での優先的開裂を抑制し、他のアミノ酸残基部位で開裂したプロダクトイオンの生成効率を向上させることを試みた。また、アミド化反応において、アミンに窒素安定同位体  $^{15}\text{N}$  から構成される  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いることによって反応後の整数質量を変化させず、マススペクトル解析を簡易化する工夫を行った。アポミオグロビンのトリプシン消化ペプチドの MS/MS を行った結果、a、b、c、x、y、z シリーズのプロダクトイオンおよび内部プロダクトイオンの数が 35 個であったの対し、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  でアミド化したアポミオグロビンのトリプシン消化ペプチドでは 55 個であった。このことは、酸性アミノ酸残基の側鎖カルボキシ基をアミド化することによって、プロダクトイオンの生成効率が向上することを示している。また、アポミオグロビンに由来するペプチドを  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  でアミド化し、MS/MS により生成したプロダクトイオンの質量ピークリストを用いて MS/MS イオンサーチ (MIS) 解析によるタンパク質同定を行った結果、ミオグロビンが第一候補で同定された。このことは  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いたアミド化による質量変化が MIS 解析に影響を及ぼさないことを示しており、修飾に伴う質量変化なくすることができる。

第 2 では、MALDI 質量分析におけるシアル酸の脱離を抑制する修飾法を開発した。シアル酸を含有する糖鎖の MALDI 質量分析ではインソースディケイ (ISD) やポストソースディケイ (PSD) によりシアル酸が容易に脱離し、分子量関連イオンの検出感度の低下や MS/MS による構造解析が困難となる問題があった。シアル酸の脱離を抑制するために、 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いてシアル酸のカルボキシ基をアミド化することを試みた。シアル酸のカルボキシ基をアミド化した結果、シアル酸を含有する糖鎖の MALDI-TOF MS 測定において ISD や PSD によるシアル酸の脱離が抑制された。また、シアル酸を含有する糖鎖の MALDI-QIT-TOF MS 測定においては、イオンクーリングに使用しているヘリウムガスとの衝突によるシアル酸の脱離が著しく、分子量関連イオンを検出できな

かった。しかし、シアル酸をアミド化することによって MALDI-QIT-TOF MS を用いた分子量関連イオンの検出が可能になり、MS/MS によるシアル酸を含有する糖鎖の構造解析が可能になった。

第3は、MALDI 質量分析におけるピリジルアミノ (PA) 化糖鎖の還元機構の解明と PA 化糖鎖の還元産物の構造解析への応用である。PA 化糖鎖の MALDI 質量分析では、プロトン付加イオン ( $[M+H]^+$ ) に加えて、 $[M+H]^+$  が 2 Da 増加したイオン ( $[M+H+2]^+$ ) が優位に検出されることが確認された。 $[M+H+2]^+$  の MS/MS およびマトリックスによる解析を行った結果、PA 部位がマトリックスの作用により還元されることが明らかとなった。これにより、 $[M+H+2]^+$  を PA のマーカーとして利用することができ、MS/MS による PA 化糖鎖のプロダクトイオンの中から PA を含有するプロダクトイオンの識別が容易になり、構造解析を簡易化することができた。

第4では、分岐糖鎖の非還元末端の糖残基を選択的に安定同位体で標識することによる MS/MS でのプロダクトイオンの構造異性体を識別する方法を開発した。分岐糖鎖の質量分析では、分岐鎖の糖配列が同一である場合、MS/MS により分岐鎖で開裂したプロダクトイオンがどの分岐鎖に由来するか判別することは困難であった。分岐末端の糖残基を炭素安定同位体  $^{13}\text{C}$  で選択的に標識することによって、プロダクトイオンがどの分岐鎖に由来するかを容易に識別することができた。また、糖鎖配列および結合様式が同一の分岐鎖間で開裂頻度が異なり、検出されるプロダクトイオンの量に差が生じることがわかった。

これら4つの方法は、現在質量分析が中心的役割を果たしているプロテオーム解析および糖鎖解析の進展に貢献すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は MALDI-質量分析 (MS) を用いた生体高分子の4種類の新しい構造解析法を開発した結果をまとめたものである。

- ① これまで、アスパラギン酸およびグルタミン酸の酸性アミノ酸を含むペプチドのタンデムマスペクトロメトリー (MS/MS) では酸性アミノ酸残基部位での優先的開裂がプロダクトイオンの生成効率が低下させたが、酸性アミノ酸の側鎖カルボキシ基をアミド化することにより、MS/MS における酸性アミノ酸残基部位での優先的開裂を抑制させることに初めて成功した。また、アミド化反応時に窒素安定同位体  $^{15}\text{N}$  から構成される  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いて反応後の整数質量を変化させずマスペクトル解析を簡易化した。
- ② シアル酸を含有する糖鎖の MALDI 質量分析ではシアル酸が容易に脱離する問題があった。 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  を用いてシアル酸のカルボキシ基をアミド化することでシアル酸を含有する糖鎖の MALDI-TOF MS 測定時のシアル酸の脱離が抑制され、その結果シアル酸を含有する糖鎖の構造解析を可能することに成功した。
- ③ 糖鎖をピリジルアミノ (PA) 化するとプロトン付加イオン ( $[M+H]^+$ ) に加えて、 $[M+H]^+$  が 2 Da 増加したイオン ( $[M+H+2]^+$ ) が優位に検出されて、PA 部位がマトリックスの作用により還元されることを明らかにした。この方法の開発で PA を有するプロダクトイオンの識別を可能にして、糖鎖構造解析を簡易化した。
- ④ 分岐糖鎖の非還元末端の糖残基を炭素安定同位体  $^{13}\text{C}$  で選択的に標識して MS/MS でのプロダクトイオンの構造異性体を識別する方法を開発した。

上記の 4 法は、現在質量分析を用いて盛んに行われているプロテオームおよび糖鎖の高分子構造解析の大きな問題点である酸性分子の妨害を解決して、さらなる実用化に向っての大きな進展に貢献すると評価できる。

これらの研究の成果は、下記の国際化学雑誌 3 編および査読審査制度を有する学術論文誌に掲載されている。

「公表論文」

1. S. Sekiya, Y. Wada & K. Tanaka (2005) Derivatization for stabilizing sialic acids in MALDI-MS. Anal. Chem. 77 (15) 4962-4968.
2. S. Sekiya, Y. Yamaguchi, K. Kato & K. Tanaka (2005) Mechanistic elucidation of the formation of reduced 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides and their application in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectr. 19 (23) 3607-3611.
3. S. Sekiya, Y. Wada & K. Tanaka (2004) Improvement of the MS/MS fragment ion coverage of acidic residue-containing peptides by amidation with <sup>15</sup>N-substituted amine. Anal. Chem. 76 (19), 5894-5902.
4. K. Kato, Y. Yamaguchi, N. Takahashi, M. Nishimura, S. Iwamoto, S. Sekiya & K. Tanaka (2004) Discrimination of isomeric fragment ions observed in tandem mass spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labeling. 日本質量分析学会誌 52 (5) 284-288.
5. R. Tatsumi, S. Sekiya, R. Nakanishi, M. Mizutani, S. Kojima & Y. Sokawa (2003) Function of ubiquitin-like domain of chicken 2', 5'-oligoadenylate synthetase in conformational stability. J. Interferon Cytokine Res. 23 (11) 667-676.
6. R. Tasumi, K. Hamada, S. Sekiya, M. Wakamatsu, T. Namikawa, M. Mizutani & Y. Sokawa (2000) 2', 5'-oligoadenylate synthetase gene in chicken. Gene structure, distribution of alleles and their expression. Biochim. Biophys. Acta 1494 (3) 263-268.