

令和元年6月13日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14508

研究課題名(和文) 金属原子とタンパク質イオンの反応による新規ラジカル分解質量分析法の開発

研究課題名(英文) Development of radical induced dissociation tandem mass spectrometry

研究代表者

浅川 大樹 (Asakawa, Daiki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・計量標準総合センター・主任研究員

研究者番号：60584365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、反応性の高い金属原子やラジカルなどの中性原子を質量分析装置内に導入しタンパク質イオンと反応させることで、ラジカル分解の効率を飛躍的に向上させることを目標とする。イオントラップ型のタンデム質量分析装置に、ペプチドのイオンを導入し、原子との反応によりラジカル化を行った。ペプチドのラジカル化に伴う分解反応について、密度汎関数理論を用いた計算化学シミュレーションによって検討した。本手法によってリン酸化ペプチドなど重要な生体分子の詳細な配列解析が可能となることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の翻訳後修飾、特にリン酸化や糖鎖付加などによってタンパク質の活性が調節され、生命活動が営まれている。この翻訳後修飾の重要性は広く認識されるようになってきているが、タンパク質の中のどの位置に、どのような修飾が存在するのか、という詳細な情報を得ることは現在の分析手法では困難であることが多い。本研究では、この翻訳後修飾を含むタンパク質の「真の姿」を明らかにするために、タンパク質分析に広く用いられている「タンデム質量分析法」を高度化することで、タンパク質分析の基盤技術を構築することを目的としており、疾患の早期発見のためのバイオマーカー探索や治療薬の開発などへの貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, tandem mass spectrometry with radical induced dissociation has been developed. The radical induced dissociation of peptide has been performed by hydrogen atom irradiation, electron association, or laser dissociation. The dissociation mechanism is investigated by computational methods with density functional theory and transition state theory. The presented methods are potentially useful method for the sequencing of peptides containing post-transnational modification, such as phosphorylation, sulfonation, and glycosylation.

研究分野：分析化学、質量分析

キーワード：タンデム質量分析 ラジカル フラグメンテーション 密度汎関数理論

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般的に、タンパク質の同定は酵素消化により生成した消化ペプチドをマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) やエレクトロスプレーイオン化 (ESI-MS) などで分析し、得られたマススペクトルを MASCOT などのデータベースと照合するというプロセスで行われる。一方で、未知の翻訳後修飾を含むタンパク質や、データベースが十分に整備されていない生物由来のタンパク質の分析には対応できないことが多く、マススペクトルから直接タンパク質のアミノ酸配列を同定する目的で新しいフラグメンテーション手法の開発も行われている。正確なタンパク質アミノ酸配列同定には、タンパク質を規則的に分解する手法が必要であり、これはタンパク質イオンのラジカル化反応により実現されている。しかしながら、ラジカル化の効率が低いため、生体内に微量に存在するタンパク質の分析には適用できず、より高感度な分析手法の開発が求められている。また、より正確にタンパク質の同定を行うためにラジカル化によるフラグメンテーション過程の体系的な理解が求められている。

2. 研究の目的

本研究は、質量分析内におけるタンパク質のラジカル化の高効率化、およびこれに伴うフラグメンテーション過程の体系的に理解することを目的とする。タンパク質のラジカル化には電子やイオンなどとの反応を用いるが、これらの荷電粒子は電場や磁場の影響を受けるため、質量分析計内への導入量に制限がある。そこで本研究では、導入量に制限のない中性の原子やラジカルを用いることで、より効率的に分析対象のタンパク質イオンをラジカル化させ、分解の効率を向上させることを目的とする。これにより、微量のタンパク質のアミノ酸配列解析が可能になると考えられる。

さらに、タンパク質のラジカル化のメカニズムについて、密度汎関数理論を用いて体系的に理解し、タンパク質のより正確な同定法とすることを目指す。

3. 研究の方法

イオントラップ型のタンデム質量分析装置に、ペプチドのイオンを導入し、原子や電子との反応によりラジカル化を行った。また、タンパク質へのレーザー照射を用いるマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析の際のタンパク質ラジカル化についてもメカニズムの検討を行った。タンパク質のラジカル化に伴う分解反応について、密度汎関数理論を用いた計算化学シミュレーションによって検討した。

4. 研究成果

ペプチドに 2000 程度の水素ラジカルを照射することでペプチドのラジカル分解が起こることが明らかにした。密度汎関数理論を用いてフラグメンテーション過程を詳細に検討したところ、水素ラジカルはペプチド結合のカルボニル酸素に付加し、アミノケチルラジカル中間体を生じ、このラジカル中間体は速やかにペプチド結合の N-Ca 結合の切断によるフラグメントイオンを生じることが示唆された。このメカニズムは実験結果と一致した。本手法は、ペプチド結合を選択的に切断できるため、ペプチドの配列解析に有効であることがわかった。

電子を用いるペプチドのラジカル化について、リン酸化ペプチドの配列解析の高感度化について検討した。リン酸基に選択的に結合する二核亜鉛錯体を用い、リン坂ペプチドとの錯体を形成させることで、ラジカル化の効率を向上することができた。本手法はリン酸化ペプチドの配列解析に有効であることが確認された。

MALDI-MS の際に起こるタンパク質のレーザー照射によるラジカル化について、メカニズムの検討を行った。このタンパク質のラジカル化は水素ラジカルの移動によることがすでに知られているが、水素ラジカルの付加・脱離のサイトは明らかとなっていない。特に水素ラジカル脱離については、ペプチド結合のアミド窒素、ペプチド側鎖の炭素などが水素脱離のポテンシャルサイトと報告されており、議論が活発に行われている。本研究で、密度汎関数理論と繊維状態理論を用いシステイン残基に着目することで、ペプチド結合のアミド窒素とペプチド側鎖の炭素からの水素ラジカル脱離に起因するフラグメントイオンを区別できることを明らかとした。本手法を用いた結果、ALDI-MS の際に起こるタンパク質のレーザー照射により、ペプチド結合のアミド水素が脱離しタンパク質がラジカル化することがわかった。また、水素ラジカル付加のサイトは、他の手法とどのようにペプチド結合のカルボニル酸素であることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1) **D. Asakawa***

General Mechanism of C α -C Peptide Backbone Bond Cleavage in Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization In-Source Decay Mediated by Hydrogen Abstraction
J. Am. Soc. Mass Spectrom., **2019**, in press,

2) **D. Asakawa***, H. Takahashi, S. Iwamoto, K. Tanaka

Hydrogen Atom Attachment to the Histidine and Tryptophan Containing Peptides in Gas-Phase

Phys. Chem. Chem. Phys., **2019**, 21, 11633-11641

- 3) **D. Asakawa***, A. Miyazato, F. Rosu, V. Gabelica
Influence of the Metals and Ligands in Dinuclear Complexes on Phosphopeptide Sequencing by Electron Transfer Dissociation Tandem Mass Spectrometry
Phys. Chem. Chem. Phys. **2018**, 20, 26597-26607.
- 4) **D. Asakawa***, H. Takahashi, S. Iwamoto, K. Tanaka
Fundamental Study of Hydrogen-Attachment-Induced Peptide Fragmentation Occuring in the Gas Phase and during Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Process
Phys. Chem. Chem. Phys. **2018**, 20, 13057-13067.
- 5) **D. Asakawa***, H. Takahashi, S. Iwamoto, K. Tanaka
De Novo Sequencing of Tryptic Phosphopeptides using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Based Tandem Mass Spectrometry with Hydrogen Atom Attachment
Anal. Chem., **2018**, 90, 2701-2707.
- 6) **D. Asakawa***, H. Mizuno*, T. Toyooka
Gas-Phase Stability of Negatively Charged Organophosphate Metabolites Produced by Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
J. Am. Soc. Mass Spectrom., **2017**, 28, 2561-2568.

〔学会発表〕(計 5件)

- 1) **D. Asakawa***, H. Takahashi, S. Iwamoto, K. Tanaka, K. Kamiya
Dissociation of Hydrogen-Abundant Peptide Radical Formed by Hydrogen Attachment in Gas Phase
22th International Mass Spectrometry Conference, 2018年08月29日
- 2) **D. Asakawa**, H. Takahashi, S. Iwamoto, K. Tanaka, K. Kamiya
Fundamental Study of Hydrogen Attachment/Abstraction Dissociation (HAD) Tandem Mass Spectrometry by Ab initio Calculation
ASMS Sanibel Conference, 2018年01月27日
- 3) 浅川大樹
エレクトロスプレーイオン化 - 電子移動解離タンデム質量分析法のメカニズムと Phostag を利用したリン酸化ペプチド分析への応用
第68回日本電気泳動学会総会、2017年11月25日
- 4) 浅川大樹、水野初、豊岡利正
リン酸化代謝物負イオンの気相安定性：ATP、ADP をちゃんと測れていますか？
第65回質量分析総合討論会、2017年05月19日
- 5) 浅川大樹、宮里朗夫、大坂一生、Frederic Rosu, Valerie Gabelica
二核金属錯体添加によるリン酸化ペプチドの電子移動解離タンデム質量分析法
第65回質量分析総合討論会、2017年05月19日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。