

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550081

研究課題名(和文) 水素ラジカルによる特異な分解反応の基礎研究とタンパク質化学への応用  
研究課題名(英文) Specific degradation of peptides with hydrogen radical and its application to protein chemistry

研究代表者

高山 光男 (TAKAYAMA MITSUO)

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号：10328635

研究成果の概要(和文)：ベンゼンチオール添加剤と超音波照射を組み合わせ、水溶液中でのペプチドの加水分解反応を実施した。ペプチドの加水分解は従来の酸加水分解とは異なる優れた特徴を示した。すなわち、プロリン部位での分解による情報獲得が可能であった他、酸加水分解の特徴である脱水反応は起こらなかった。さらに従来と比較して反応時間の短縮化と添加剤量の低減化にも成功した。同時に、真空中でのレーザー光照射による新規水素発生試薬の発見、および電界噴霧イオン化法と組み合わせた電子線照射法により、水素発生と水素移動反応についても研究論文を発表することができた。

研究成果の概要(英文)：The ultrasound sonolytic hydrolysis of peptides was performed with added benzenethiol as a hydrogen-releasing reagent in aqueous solution. The ultrasound hydrolysis of peptides differed from that due to conventional acid hydrolysis in characteristics, i.e., cleavage at proline residue and dehydration as a side reaction. The sonolysis combined with the thiol addition made it possible to determine the amino-acid sequence of peptides. Furthermore, new reagent for releasing hydrogen atoms was found out in the experiment of the irradiation of ultraviolet laser photon in vacuum condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：水素ラジカル・質量分析・タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、平成18～19年度基盤研究(C)の採択課題“水素ラジカルによる特異な分解

反応の制御に関する基礎研究”の研究成果を背景としている。申請者は水素ラジカルの反応性を利用したタンパク質のアミド結合

(NH-CHR)の特異的分解反応の現象と機構を2001年に解明し(*J.Am.Soc.Mass Spectrom.*,**12**,1044(2001))、その基礎研究を基盤として“水”と“超音波”を組み合わせた新たな水素ラジカル発生法の探索とその反応特性の解明を進めてきた。その結果、水溶液中での水素ラジカルが積極的に関与する新規特性を有する加水分解反応を発見した。以上の発見に基づいて平成20～22年度には、さらに水素ラジカル関与の反応のタンパク質化学への応用も視野に入れることとした。

## 2. 研究の目的

水素ラジカルは最も小さな原子種であると同時に最小ラジカル種でもある。また、水素ラジカルはタンパク質などを含む有機分子の非共有電子対と特異的に付加反応を起こし、不対電子位置の固定化を生じさせる。固定不対電子を有する有機ラジカル種は、不対電子位置を引き金とする極めて高い開裂反応(ホモリシス)を生じるため、規則性のある分解反応系を確立することができる。このことを利用し、生体高分子であるタンパク質などの迅速で正確な解析(配列解析、翻訳後修飾解析、データベース支援同定など)を目標としている。

## 3. 研究の方法

1. 水素原子放出材には活性水素を有するベンゼン系誘導体と水を利用し、放出のための励起エネルギー源として超音波とレーザー光を用いた。実験は真空中および水溶液中で行い、反応生成物の解析には各種質量分析計を用いた。これまで、水素ラジカル発生補助剤としてジヒドロキシベンゼンが適していることを見出し発表しているため、さらに効果的

な物質の探索と水素ラジカル発生能の高い物質を探索する。さらに、これまで0℃の水溶液中で60分の超音波照射を行ってきたが、超音波パワーと添加物濃度については最適化ができていない。従って、超音波パワーを変化させることによって照射時間の短縮化および添加物濃度の低減を目的とした最適化を行う。

## 4. 研究成果

平成18～19年度にはジヒドロキシベンゼンを水素発生源とした超音波励起法を用いて、水溶液中ペプチドのアミノ酸配列解析を可能とする特異的分解法を見いだしたが、今期は、改良系としてベンゼンチオールを水素放出源とすることで、反応時間の短縮化と添加量の低減化に成功した。すなわち、図1に示すように、22残基のアミノ酸からなるモデルペプチドに対して、100マイクロモルのチオール試薬を添加することにより、0℃に氷冷した水溶液に27分間の超音波照射により、4番目以上のすべてのアミノ酸配列情報を得ることができた。

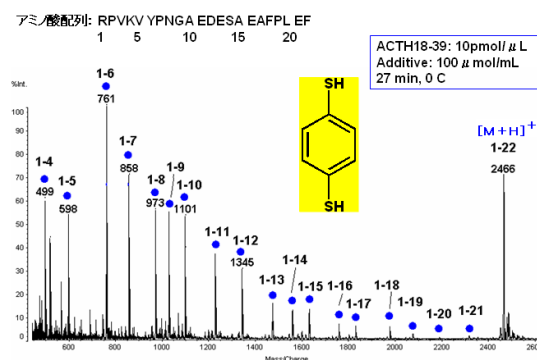


図1 チオール添加によるペプチド水溶液に超音波照射して得られた反応生成物の質量スペクトル。

図1のスペクトルからアミノ酸配列情報

を読む方法も極めて簡単であることを示すことができ、本手法は2008年に知財対象として発明委員会で認定された。図1からアミノ酸配列情報を獲得する方法も、図2のように図示することができた。

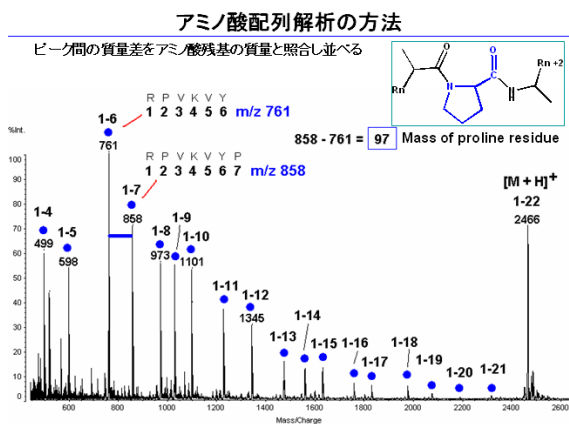


図2 ペプチドの分解物を示す質量スペクトルからアミノ酸配列を解析するための方法。

上記結果は下記のようにまとめることができた。

**<改善点・特長>**

- ・ 反応が10分~30分で終了
- ・ プロリン部位での高い分解効率
- ・ 反応の特異性高い (ペプチド結合だけ分解し、脱水やアミノ酸側鎖の分解、酸化反応などが起こらない)
- ・ 質量分析の結果が明瞭で解析が容易
- ・ 還元性試薬の添加効果は明瞭

さらに、超音波照射条件に関する新たな知見として、超音波発生金属表面のナノ構造が関与している事実も発見しその詳細も継続して進展中であるが、本研究期間内には完成に至っていない。同時に、真空中でのレーザー照射による新規水素発生材を発見した。本法は、安息香酸系(アミノサリチル酸)の結晶に紫外レーザー光を照射することによって、アミノ基から水素ラジカルが放出される現象であることが判明した。放出された水

素ラジカルは、結晶中に埋め込まれたタンパク質またはペプチド主鎖上のカルボニル酸素に結合し、以下の図3の中段に示すペプチドラジカル種が発生することが原因である。このためにラジカルの箇所を基点とする特異的な切断が起こるため、その分解生成物の質量スペクトルを観察するとアミノ酸配列を読むことができる。

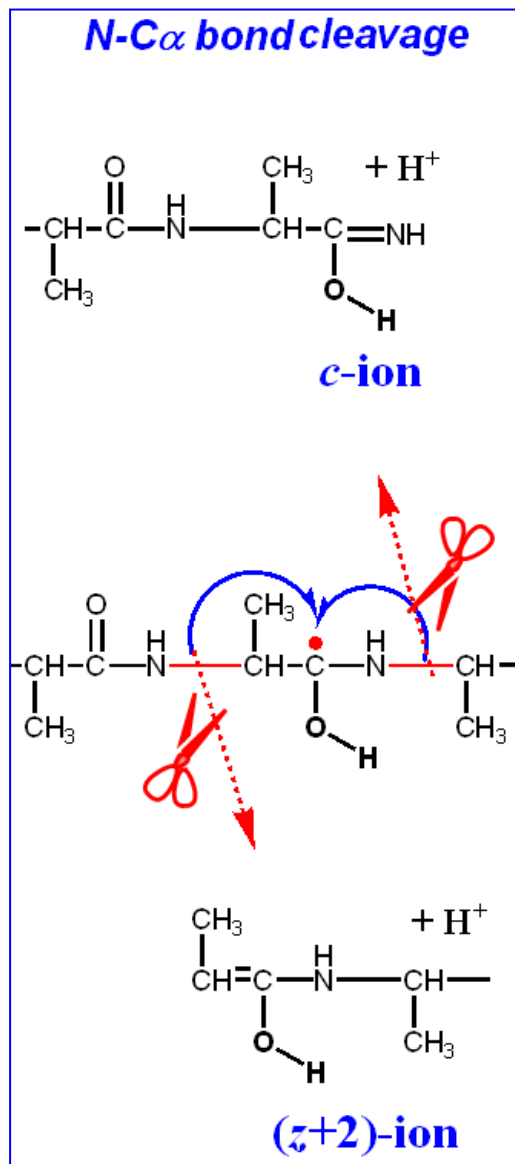


図3 水素ラジカル発生材(アミノサリチル酸)から発生した水素が中段のラジカル種を生成。NHとCHの間の結合だけが切断する。

図3の分解の結果、得られた生成物の質量ス

ペプトルを計測すると図4のデータが得られる。隣り合う各ピークの質量の値の差はアミノ酸残基の質量に相当するため、各ピーク間に相当するアミノ酸を充てると図中のようなペプチドの配列を読むことができる。

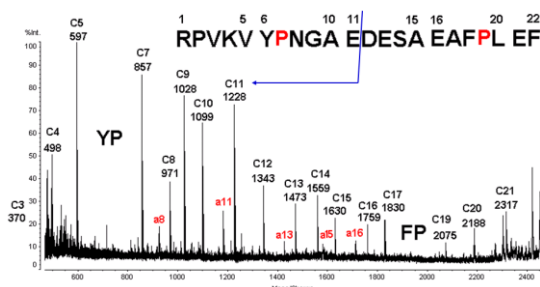


図4 水素ラジカルの付加によって切断した生成物の質量スペクトル。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- ① M. Sakakura, M. Takayama, Sonolytic hydrolysis of peptides in aqueous solution upon addition of catechol, *Ultrasonics Sonochemistry*, 査読有, Vol. 16, 2009, 367-371.
- ② M. Sakakura, M. Takayama, In-source decay and fragmentation characteristics of peptides using 5-aminosalicylic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry *Journal of the American Society for Mass Spectrometry, J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 査読有, Vol. 21, 2010, 979-988.
- ③ T. Nishikaze, M. Takayama, Influence of charge state and amino acid composition on hydrogen transfer in electron capture dissociation of peptides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 査読有, Vol. 21, 2010, 1979-1988.

[学会発表] (計 4件)

- ① 坂倉幹始, 高山光男 超音波によるペプチドの加水分解反応の特徴, 第17回ソノ

ケミストリー討論会, 電気通信大学, 東京 (2008年12月) .

- ② 坂倉幹始・高山光男: 超音波を用いたペプチドの分解反応とその特性、第70回分析化学討論会、和歌山大学、和歌山(2009, 5月) .
- ③ Motoshi Sakakura and Mitsuo Takayama: Comparative study of hydrogen-induced cleavage of peptides with MALDI-ISD and sonolysis, 18<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference (September, Bremen, Germany 2009).
- ④ Sakakura, M. and Takayama, M.: 「A new matrix suitable for MALDI-ISD of phosphorylated peptides」, the 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (May, Salt lake city, Utah, USA 2010).

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称: チオール化合物と超音波を利用したペプチドの加水分解方法

発明者: 高山光男

権利者: 横浜市立大学

種類: 特許

番号: 特願2008-316326.

出願年月日: 平成20年12月12日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://masspecs.sci.yokohama-cu.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 光男 (TAKAYAMA MITSUO)

横浜市立大学

生命ナノシステム科学研究科・教授

研究者番号: 10328635