

平成22年5月24日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20750062  
研究課題名 (和文) 赤外レーザーイオン化法による電気泳動ゲルからの直接タンパク質分析技術の構築  
研究課題名 (英文) Direct protein analysis from electrophoresis gel using a mid-infrared laser  
研究代表者  
鈴木 幸子 (SUZUKI SACHIKO)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号：20403157

研究成果の概要 (和文)：本研究課題では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法に赤外レーザーを利用した新しいイオン化法の確立とその手法により測定蛋白質をゲル状スポットから直接イオン化する測定の簡易化手法の開発を目指した。その結果、アクリルアミドゲルに含まれるC=O伸縮振動がイオン化に効果的であることを示し、周辺にOH基を持つことがイオン化促進につながることを見出した。また目標であったアクリルアミドゲルに含まれたインスリン分子を検出することに成功した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I performed protein analysis from acrylamide gel after electrophoresis using a Mid-infrared tunable laser. I reported that the IR-MALDI process is influenced by the hydrogen bond around the carboxyl group or residual water. The acrylamide solution has a strong absorption bands at around 6.0  $\mu\text{m}$  corresponding to the  $>\text{C}=\text{O}$  stretching vibration mode. I obtained the mass spectrum of insulin ionized from acrylamide gel when the sample was irradiated by the infrared laser in a wavelength range of 5.8-5.9  $\mu\text{m}$ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合科学

科研費の分科・細目：分析化学

キーワード：生体分析、赤外レーザー、質量分析、イオン化、蛋白質、直接分析

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノミクスとして、近年では生命現象を総合的に理解するため「細胞内分子機械」ともいえるタンパク質の発現の動態（細胞や組織内での局在、発現量、発現時系列など）を研究対象としたプロテオミクスやメタボロミクスと呼ばれる研究が盛んに行われている。これらプロテオーム解析、メタボローム解析には、タンパク質や代謝物の分子量および分子構造解明が同時に可能となる質量分析法が欠かす事のできない技術である。実際の分析では、質量分析法により蛋白質の同定を行う前に多くの前処理を必要とする。その一つの手法が、電気泳動法である。電気泳動法は高分解能に蛋白質を分類することができるため広く利用されている。一般的には、多くの蛋白質を含む試料を電気泳動により大まかに分類した後、電気泳動ゲルを酵素処理し、ゲル内で蛋白質を消化しペプチドを溶出し、得られたペプチド断片の質量を測定することが蛋白質同定の有効な方法である。しかしながら、ゲルから蛋白質消化物を回収できる割合は、蛋白質消化効率にペプチド溶出効率を乗じた値となり、低いペプチド回収率は、微量蛋白質の高感度検出を目指す上で重大な障害となる。さらにペプチドとして回収できなかった配列に含まれている翻訳後修飾情報は失われてしまう。研究代表者は、これまで蛋白質をイオン化させるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法に赤外レーザーを利用した新しいイオン化法を提案している。赤外波長域は、多くの分子の分子振動励起波長領域に一致しており、この作用を利用することで、これまで問題とされていた様々な蛋白質のイオン化法の解決を試みている。

## 2. 研究の目的

プロテオミクスにおいて赤外レーザーを用いたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法に期待することは、標準的な蛋白質分析のアプローチが抱える諸問題（先述した、電気泳動法による情報の欠陥や不溶性蛋白質測定に用いられる可溶化材によるイオン化の阻害など）の克服である。通常マトリックス支援レーザー脱離イオン化法では、測定対象をマトリックスと呼ばれる化合物と混合させ、マトリックス化合物に吸収される紫外レーザーを用いて脱離・イオン化させる。したがって、水やアクリルアミドゲルに含まれる OH やアミド結合による赤外吸収を利用すればイオン化が達成されると考えられる。本研究では、赤外レーザー光による分子振動励起を利用して二次元電気泳動法で用いられるアクリルアミドゲルをマトリックスとし

て使い、ゲル状のスポットから直接タンパク質分子をイオン化させることを目的とし、蛋白質検出感度の向上を目指すため、赤外レーザーによるイオン化法のイオン化メカニズムを検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、これまでの研究で立ち上げた中赤外波長可変レーザーによるマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法飛行時間型質量分析法値を用いて下記について評価した。

## (1) アクリルアミドおよびゲル化状態の赤外吸収特性の評価

最適波長を検証するため、アクリルアミドおよびゲル化状態など様々なサンプル状態での赤外吸収特性を測定し評価した。

## (2) 中赤外波長可変レーザーによるイオン化最適波長等の条件設定

使用した中赤外波長可変レーザーは、様々な化学結合の共鳴吸収波長が分布する中赤外域 (5~10  $\mu\text{m}$ ) をカバーしており、0.01  $\mu\text{m}$  毎に波長可変である。同レーザーを用いてイオン化最適波長を調査した。

## (3) ゲル中蛋白質のイオン化

アクリルアミドゲルにアンジオテンシンやインシュリンなど MALDI 測定における標準試料を埋め込み、(1)(2)の実験結果を元にゲル中の蛋白質のイオン化を行った。さらに、同手法の可能性を広げるため、培養細胞をすりつぶした試料にマトリックス剤をふりかけ、二次元電気泳動や液体クロマトグラフィーなどの前処理を除いたイオン化を試みた。

## (4) 赤外レーザーを用いた MALDI 法のイオン化メカニズム。

本手法を確立するため、イオン化メカニズムについて調査した。具体的には、様々な分子結合をもつマトリックス剤を用い赤外吸収スペクトルとイオン化量とを比較した。

## 4. 研究成果

本研究課題では、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法に赤外レーザーを利用した新

しいイオン化法の確立とその手法により測定蛋白質をゲル状スポットから直接イオン化する測定の簡易化手法の開発を目指した。本研究課題以前の研究において、研究代表者は、C=O伸縮振動がイオン生成に大きく関連していることを報告している。図1は、マトリックスにコハク酸を用いた時のイオン生成量とコハク酸の赤外吸収スペクトルを比較した結果である。同図の赤外吸収スペクトルより、コハク酸は波長5.8  $\mu\text{m}$ 付近にC=O伸縮振動に由来した吸収と波長7.0  $\mu\text{m}$ 付近にC-Hに由来した吸収を有するが、試料イオンは波長5.8  $\mu\text{m}$ の赤外レーザーを照射したときのみ検出された。

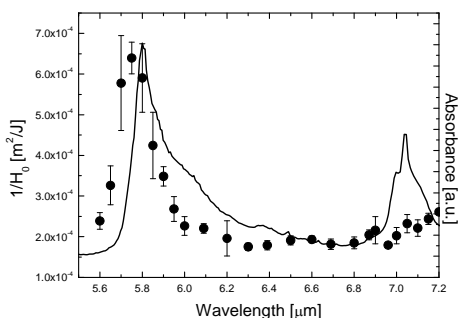


図1 コハク酸マトリックスを用いた場合の赤外吸収スペクトルとイオン生成量の比較

図2は、電気泳動で利用されるポリアクリルアミドとポリアクリルアミドゲルの赤外吸収スペクトルを示す。同図より、波長6  $\mu\text{m}$ 付近にC=O伸縮振動に由来した強い吸収ピークが見られる。

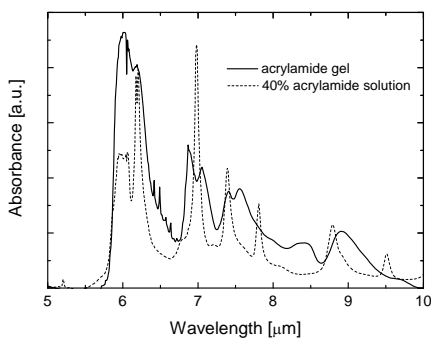


図2 ポリアクリルアミドとゲルの赤外吸収スペクトル

波長6  $\mu\text{m}$ 付近の赤外吸収は、アクリルアミドおよびアクリルアミドゲルの場合も見られるが、アクリルアミドゲルは、アクリルアミド溶液にTris-HCLやSDSなどを混合させるため

吸収スペクトルは複雑であるが、波長6  $\mu\text{m}$ 付近に幅広い吸収スペクトルを形成する。アクリルアミド溶液にインスリンを混合させ、波長6  $\mu\text{m}$ の赤外レーザーを照射した結果を図3に示す。非常に高い精度で一価および二価イオンが検出された。

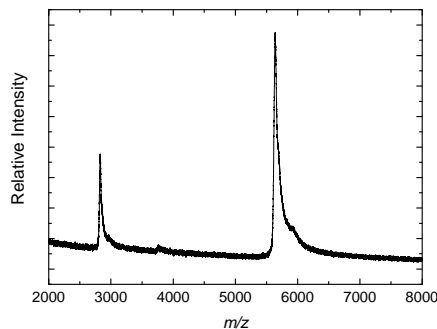


図3 アクリルアミド溶液からのインスリン測定結果

さらに図4(a)は、アクリルアミドゲルにインスリンを埋め込んで波長5.8  $\mu\text{m}$ の赤外レーザーを照射した結果である。また、本手法の有効性を検証するため、従来法である紫外レーザーを照射した結果を同図(b)に示す。紫外レーザーを照射した場合、インスリンはほとんど検出されず、赤外レーザーを用いたイオン化、すなわち分子振動励起を用いたイオン化の有効性が示された。

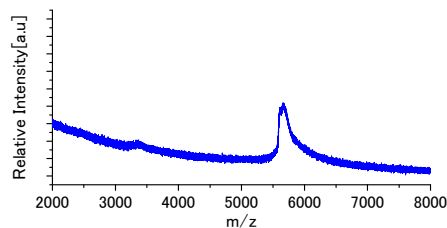


図4(a) 赤外レーザーを用いた場合のアクリルアミドからのインスリン測定結果

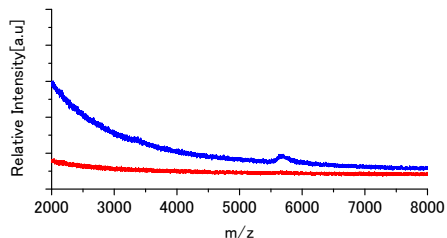


図4(b) 紫外レーザーを用いた場合のアクリルアミドからのインスリン測定結果

本研究において、アクリルアミドゲルに含まれるC=O伸縮振動がイオン化に効果的であることが示された。

さらに、赤外レーザーを用いたイオン化メカニズムについて次のような仮説を立てて報告した。カルボキシル基のC=O伸縮振動モードは、波長6 μm付近(ここで波長を限定しないのは、混合する物質や試料の状態の違いにより吸収波長がわずかにシフトする場合がある)のレーザー照射で非常に強く共振する。この時、電気陰性度の高い酸素原子は、周りの水素原子から電子を奪いやすくなる。周辺の水素原子(カルボキシル基中の水素原子や残留水の影響でカルボキシル基の酸素原子と弱い水素結合で繋がれた水分子の水素原子)は、電子を奪われてプロトンとして放出され、最終的に試料分子に引き付けられる。この仮説を証明するため、succinic acid(化学式:  $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) と mono methyl succinate(化学式:  $\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ) と末端構造が異なる化合物をマトリックスに用いてイオン生成量を評価した結果、同じ強度のレーザーを照射した際、末端にカルボキシル基を持つsuccinic acidをマトリックスに用いた場合の方が多くイオンが生成された。これは、メチル基は自身の結合が強く、周りの酸素と水素結合されていないことから、水素結合がイオン生成に関連していることを見出した。

## 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2件)

- (1) 鈴木幸子, 藤田珠美, 栗津邦男, 赤外レーザーMALDIの波長依存性に関する研究と応用, *Journal of the mass spectrometry society of Japan*, 査読有, 56(5), 235-240 (2008)
- (2) 鈴木幸子, 栗津邦男, 赤外レーザーを用いたタンパク質質量分析技術への期待, *OplusE*, vol30(4), 査読無, 348-353 (2008)

[学会発表] (計6件)

- (1) Sachiko Suzuki, Tamami, Fujita, Satoshi Fukumoto, Development of infrared laser desorption/ionization using polymer film, 18<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, 2009.8.30-9.4, Bremen, Germany,
- (2) Sachiko Suzuki, Tamami, Fujita, Satoshi Fukumoto, Kunio Awazu, Proton source of matrix-assisted laser

desorption/ionization using an infrared laser, The 57<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2009.5.31-6.4, Philadelphia, PA, USA

- (3) 鈴木幸子, 藤田珠美, 福本智志, 栗津邦男, カルボン酸マトリックスを用いたIR-MALDIにおけるプロトン付加分子の生成過程, 第57回質量分析総合討論会, 2009.5.13-15, 大阪
- (4) 鈴木幸子, 福本智志, 可視・紫外域透過性高分子化合物シートを用いた赤外レーザーイオン化法の開発, 第57回質量分析総合討論会, 2009.5.13-15, 大阪
- (5) Sachiko Suzuki, Tamami, Fujita, Kunio Awazu, Protein analysis from polyacrylamide gel using mid-infrared nanosecond pulsed laser, The 56<sup>th</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry, DENVER, Colorado, June 1-5, 2008
- (6) 鈴木幸子, 佐藤出, 藤田珠美, 栗津邦男, 赤外レーザーMALDIの波長依存性に関する研究と応用, 第56回質量分析総合討論会, 2008.5.14-16, つくば

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 幸子 (SUZUKI SACHIKO)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号: 20403157