

平成22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20810018
 研究課題名（和文）小型飛行時間型質量分析計による高エネルギー衝突解離を用いた生体分子の構造解析
 研究課題名（英文）Structural analysis of biomolecules via high-energy collision Induced dissociation using a Miniaturized TOFMS
 研究代表者 新間 秀一（SHIMMA SHUICHI）
 大阪大学・科学教育機器リノベーションセンター・特任研究員
 研究者番号：30515896

研究成果の概要（和文）：

リン脂質やリン酸化ペプチド、糖鎖、糖ペプチド等の構造解析を行った。特筆すべき成果として、いずれの試料においても、高エネルギーCIDにおいては詳細な構造解析には必須の情報が提供されることがわかった。また少ない試料消費量で、磁場方質量分析計と同等の構造情報が得られることは、今後新規生理活性物質の構造解析において強力な武器となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

A multi-turn tandem time-of-flight (TOF) mass spectrometer (MULTUM-TOF/TOF) was used in this study. The instrument has two features. One is high precursor ion selectivity of the first TOF, which has much longer flight distance. Another is the elimination of fragment ions via post-source decay process. Components of post-source decay change its kinetic energy, therefore they cannot path through electric sectors. We performed the structural analysis of biomolecules using high-energy collision induced dissociation (HE-CID). I confirmed that I could obtain a lot of useful information to determine precise structure of biomolecules with small quantity of analyte. The HE-CID using MULTUM-TOF/TOF is a powerful tool to determine structure of novel bioactive substances in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：機器開発、分析化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：質量分析、生体分子、構造解析

1. 研究開始当初の背景

申請者が 2007 年度より研究を行っている、10-20 keV のエネルギーでイオンを希ガスと衝突させ解離させる高エネルギー衝突誘起解離 (high energy collision-induced dissociation; HE-CID) は、古くは磁場型質量分析装置で解離イオンのスペクトル、すなわちプロダクトイオンスペクトルを取得する際に用いられた手法である。現在の質量分析装置のうち、飛行時間型 (Time-of-Flight; TOF) 質量分析計を 2 台繋いだタンデム質量分析装置では HE-CID が原理的に可能であるが、実際には衝突前に減速および衝突後に再加速するために、真の意味での HE-CID とは言いがたい。さらに 1 台目の TOF が直線型であるがために、ポストソース分解 (post-source decay; PSD) 由来成分がプロダクトイオンスペクトルに入り込む。PSD によるイオンは、低エネルギー CID (LE-CID; 100 eV 以下の衝突エネルギー) によって得られるイオンと良く似ている (但し PSD の解離過程は LE-CID と厳密には異なる)。しかしながら PSD は、飛行中に様々場所で解離が起こるために、2 台目のイオンミラーで十分なエネルギー収束が得られない。これによりプロダクトイオンの質量分解能の低下、S/N 比の低下によるピークの判別がつきにくいといった欠点が現れる上に、そもそも PSD の影響が大きく、HE-CID 由来のピークがほとんど得られないと言う問題を申請者は指摘している。申請者は、この PSD の影響を排除可能である上、高感度で HE-CID を取得することが可能な装置を現在有している。高感度であることから、過去に磁場型装置では測定が不可能であった試料についても HE-CID スペクトルを取得し、構造解析に有用なデータを提供できる可能性がある。

2. 研究の目的

小型マルチターンタンデム飛行時間型質量分析計のアプリケーションとし HE-CID を用いた生体分子の構造解析について、様々な試料よりデータを収集し HE-CID に特有な現象を整理し、将来開発された装置のユーザーへフィードバックすることを目的とする。

3. 研究の方法

マルチターンタンデム飛行時間型質量分析計実験機を用いて、様々な生体分子、具体的にはリン酸化ペプチド、脂質、糖ペプチド、糖鎖および生理活性物質の HE-CID スペクトルを取得し、HE-CID の特徴を整理し、その有用性を示すこととする。

4. 研究成果

まず既存の実験機を用いて、リン脂質やリン酸化ペプチド等の構造解析及び定量性の議論が可能か否かを検討した。特筆すべき成果として、リン脂質の構造、特に脂肪酸の構造が、高エネルギー衝突誘起解離で得られるプロダクトイオンスペクトルより完全に決定できることを見いだした。実験を進めた結果、リン脂質の脂肪酸の構造を反映するシグナルは非常に特徴的なパターンを示すことがわかった。ここで得られた知見をコイ棹体細胞より抽出したリン脂質混合物での解析に適用した。その結果、これまで報告のされていない脂肪酸の構造を発見した。リン酸化ペプチドについては、コイの棹体細胞よりロドプシンを抽出し、その抽出物に対し光刺激を与えたときのリン酸化部位とリン酸化度合いの検討を行った。リン酸化部位の特定は高エネルギー衝突誘起解離を用いた手法で確認を行った。主にリン酸化が光刺激を受けてからどのように変化して行くか定量を行う為に、試料前処理条件について検討を行った。その手順は、抽出したロドプシンに光刺激を与えた後、光刺激を与えてからの時間により酸を加え反応を止める。その後、反応を止めたロドプシンをリジルエンドペプチダーゼを用いてペプチド化する。得られたペプチドよりチタニアカラムを用いてリン酸化ペプチドのみを精製し、N 末端にタグをつけ、そのタグにより定量を行う手法である。本手法による定量は現在も引き続き検討を行っているところである。

次に生理活性物質のひとつである精子活性化誘引物質についても構造解析を試み過去に報告された磁場型における構造解析結果と一致することを確認した。次に糖鎖分析への応用とし、血液中に含まれる IgG より生成した N 型糖ペプチドの解析を試みた。選択したイオンを解離させ、解離生成物の質量スペクトルを得ることが可能であることを確認した。得られたスペクトルを解析した結果、高エネルギー衝突誘起解離法では低エネルギー衝突誘起解離法 (LE-CID) とは全く異なる解離パターンを示すことがわかった。本研究で行った HE-CID では主に糖鎖のクロスリンク解裂が主に観測されることがわかつ

た. さらにフコースの脱離も観測されなかった. 特にクロスリング解裂が観測されたことは, 糖鎖の構造解析で問題になっている結合様式の決定が可能になることを示唆している. またリボヌクレアーゼ B より, 別の枝分かれ構造を持つ糖ペプチドを作成し HE-CID を行ったところ, HE-CID 特有の 1 回衝突により生成されたフラグメントイオンのシグナルを得ることを確認した. これらのデータをもとに, 今後さらに様々な構造を持つ糖ペプチドを測定し得られたデータをデータベース化しようと考えている. さらにこの結果を発展させ, HE-CID を用いた 3 糖体における修飾基の結合位置決定を試みた. 予想される解離様式を考えたところ, クロスリング結合による解離生成物が確認されれば構造決定可能だと考えた. したがって, 既存の質量分析装置は一般的に LE-CID であるため, 既存装置では決定不可能ということになる. 本研究で HE-CID によりスペクトルを取得したところ, 予想したシグナルが得られ構造決定することが可能であった.

現在, 本研究で得られたデータと新規に得られた HE-CID による解離パターンのデータを整理し, 総説として発表準備中である.

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 3 件)

1. Nagao H, Shimma S, Shigeo H, Toyoda M, Awazu K J. Mass Spectrom. (in press) 査読あり 2010
2. Nagao H, Shimma S, Shigeo H, Toyoda M, Awazu K Eur. J. Mass Spectrom. (in press) 査読あり 2010
3. 豊田岐聡, 新聞秀一, 三木伸一
北海道土壌肥料研究通信, 55 巻, 1-12 ページ, 2009 年

[学会発表] (計 7 件)

1. Michisato Toyoda, Shuichi Shimma, Jun Aoki, Shinichi Miki
Development of a miniature multi-turn time-of-flight mass spectrometer "MULTUM-S", 18th International mass spectrometry conference, August 29-September 4, 2009, Bremen, Germany
2. Shuichi Shimma
Applications for structural analysis of biomolecules using a novel tandem

time-of-flight mass spectrometer with a spiral ion trajectory "MALDI SpiralTOF/TOF", 18th International mass spectrometry conference, August 29-September 4, 2009, Bremen, Germany

3. Shuichi Shimma

Structural analysis of biomolecules using high-energy collision induced dissociation in a multi-turn tandem time-of-flight mass spectrometer "MULTUM-TOF/TOF", 57th ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, May 31-June 4, 2009, Philadelphia, Pennsylvania

4. 新聞秀一

高質量分離能を備えたタンデム飛行時間型質量分析計 "MULTUM-TOF/TOF" と "SpiralTOF/TOD" の特徴と測定例, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日大阪市

5. 久保歩, 新聞秀一, 豊田岐聡, 佐藤貴弥
タンデム飛行時間型質量分析計 "MALDI-SpiralTOF/TOF" を用いたリン脂質の構造解析, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日大阪市

6. 長尾博文, 新聞秀一, 加納英朗, 豊田岐聡, 早川滋雄, 栗津邦男
ESI イオン源を搭載したタンデム飛行時間型質量分析装置 "ESI-TOF/TOF" の開発, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日大阪市

7. 豊田岐聡, 新聞秀一, 青木順, 長尾博文, 高橋圭二, 三木伸一
現場における残留農薬分析のための高分解能小型質量分析計, 第 57 回質量分析総合討論会, 2009 年 5 月 13 日～5 月 15 日大阪市

6.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アルカリ金属導入装置、およびアルカリ金属導入方法
発明者: 豊田岐聡、長尾博文、新聞秀一、早川滋雄
権利者: 大阪大学、大阪府立大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-35683
出願年月日: 平 22.2.22
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新間 秀一 (SHIMMA SHUICHI)

大阪大学・科学教育機器リノベーションセンター・特任研究員

研究者番号：30515896