

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658104

研究課題名(和文) LC-MS/MSにおけるイオン系列選択的観測法の開発

研究課題名(英文) Development of effective method selectively detecting y and b ions in the LC-MS/MS

研究代表者

橋本 勝 (Hashimoto, Masaru)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：40212138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：LC-MS/MSスペクトルにおいて、観測されるイオンの帰属は重要である。しかし、従来法ではC末端側とN末端側イオンとの区別は経験に基づくもので理論的にその帰属を行うことはできなかった。そこでN末端あるいはC末端を修飾する際、同位体を利用し、アイソトポログとし、MS/MSスペクトルを比較、共通のイオン、一定の質量差が生じるイオンを整理することでこれらを原理に区別することに成功した。本手法は、修飾時に、アイソトポログ混合物として誘導化しても、それぞれのイオンを選択すれば、十分解析が可能であることを確認した。また、自動的にイオンを分離するソフトウェア"MSMS Search Tool"を開発した。

研究成果の概要(英文)：In the LC-MSMS spectral analysis, assigning C-terminus y- and N-terminus b-ions are important to sequence the peptides. However, these have been based on empirical. In this study, the reporter established a method to theoretically distinguish N-terminus b-ions and C-terminus y-ions by introducing mass difference in at N- or C-terminus with derivatizations. The reporter also developed software named "MSMS Search Tool" which automatically selects y-ions and b-ions using raw mass data (ASCII format).

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：LC-MS/MS 配列決定 イオン帰属 アイソトポログ 自動化

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造を言及する場合、N 末端からいくつかのアミノ酸配列をエドマン分解法などで解析し、これを基に遺伝子技術を利用して全構造を得る手法が主である。一方、リボソーム外で生合成される、いわゆる non-ribosomal peptide の配列決定では構成アミノ酸が直接遺伝子にコードされていないため上記手法を適用させることはできず、遺伝子技術を利用しない、即ち、酵素等により部分消化し、そのペプチド断片のアミノ酸配列を解析、各断片の配列情報を組み合わせて解析することが必要である。高感度測定が可能な MS/MS 分析法の導入は、上記解析において必要サンプルの著しい微量化を実現した。さらに HPLC と組み合わせた LC-MS/MS 法では、酵素消化断片を精製することなく混合物のまま直接解析を可能にし、実験に必要な時間の短縮をもたらした。タンパク質など遺伝子にコードされたアミノ酸配列では、開裂パターン解析を遺伝子情報に基づくインフォマティク技術を併用することにより、その配列解析を実用範囲としてきた。

2. 研究の目的

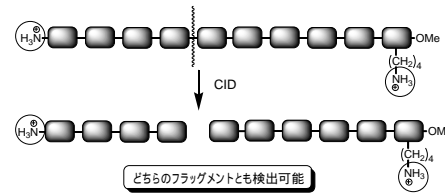
近年質量分析装置の発展は著しく、その応用の一つ HPLC を組み合わせた MS/MS 解析によるペプチドの配列解析は従来法に比べ、より微量サンプルによる解析を可能とした。しかし、実際にはニュートラルロスをはじめ、解析に複雑なフラグメントシグナルの存在から、各イオンの帰属を検証する方法が無く、市販の解析ソフトウェアでは遺伝子情報などを組み合わせたインフォマティク技術の支援を利用してその精度を高めている。本研究では、ペプチド MS/MS スペクトルにおいて、これまで困難であった N 末端、C 末端側イオンを区別したイオン検出を容易にし、観測イオンの検証を伴ったより確実なペプチド配列帰属法の開発を行う。

3. 研究の方法

C 末端にリシン或いはアルギニンを有する様々なアミノ酸配列を有するペプチド 10 種類程度を用意し、メタノール或いは重メタノール中でメチル(重メチル)エステルを作製して、ESI 法により MS/MS スペクトルを測定、前述の方法で解析し、本手法の確実さを検証する。

ESI 法では多価イオンを形成しやすいことが知られている。デカペプチド程度の分子サイズになると N 末端と C 末端の二か所に電荷を有することも容易となり、二価イオンの強度が大きくなることも知られている。一価イオンでは、一方のフラグメントは電気的に中性となり質量分析装置で観測できないのに対し、両端付近に帯電したペプチド鎖の CID (衝突ガス誘起分解) により開裂したフラグメントイオンは両者とも正の電荷を有する確率が高く、従ってフラグメントイオ

ンの強度が増大、言い換えれば MS/MS スペクトルの SN 比が増大する。このような場合の開裂が本手法にどのように適用可能かについても検討する。また CID 時間を変化させて、MS/MS スペクトルのクオリティーと本手法の適用範囲との関係についても検証する。

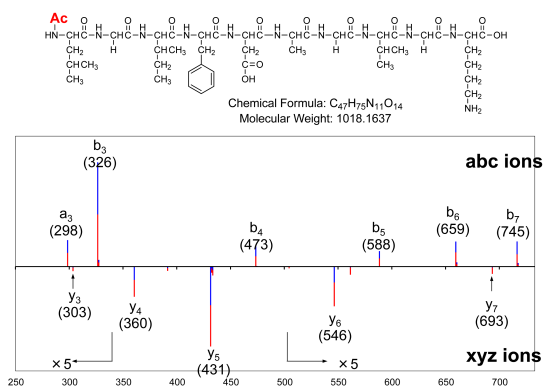


ペプチド内部にグルタミン酸など側鎖カルボン酸を有するペプチドの場合、側鎖カルボン酸もメチル化されることも予想される。部分的にエステル化が進行した段階で反応を停止させれば、エステル化される位置のモノエステル異性体、及びジエステル体等が得られるはずである。これらは HPLC で分離可能と考えられることから、LC-ESI-MS/MS 法によりそれぞれの異性体の MS/MS スペクトルを得ることも可能である。これらに本手法を組み合わせることによって、これまで不可能であった情報も得られる可能性はもちろん、酸性アミノ酸位置の、より確実な判断が可能となると期待できる。

4. 研究成果

オリゴペプチドをメタノール中、酸を作用させると C 末端カルボン酸がメチル化される。また重メタノールを溶媒とすると重メチルエステルとなる。MSMS スペクトルにおいて、これら両者を比較、質量 2 ユニット異なるフラグメントイオンは C 末端を含むこと、また N 末端を含むフラグメントイオンは共通の質量を与える。これを解析することにより、原理的に C 末端イオンを検出することができた。またメチル化を行う際に、重メタノール、通常メタノールの 1 : 1 混合物溶媒を用いると、アイソトポログの混合物となるが、CID 時にそれぞれのイオンを選択することにより、一回の操作でこれらイオンの区別を行うことができること判明した。また、装置より生データを ASCII 形式で取得し、それらを利用することにより、自動的にイオン判別を行うソフトウェア「MSMS Search Tool」を開発した。しかし、本手法では内部フラグメントイオンが多く、またアスパラギン酸やグルタミン酸を含むペプチドでは解析が複雑になるため、本手法による解析では完全に単純化されたとは言えないものであった。次に N 末端を修飾する手法の開発を行った。O-アセチル-N-ヒドロキシベンゾトリアゾールは水溶液中で比較的安定で、ペプチド溶液を pH5.0 付近で処理することにより、リシンなど側鎖アミノ基を損なうことなく、N 末端選択的に修飾することができた。同様に重アセチル化したサンプルを比較したところ、本手法の方

が内部フラグメントイオンも少なく、高い品質のスペクトルが得られると判明した(下図)



「MSMS Search Tool」については特許処理後パブリックドメインでの公開を予定している。

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 11 件)

- Hirose, A.; Kudo, S.; Murakami, T.; Tanaka, K.; Harada, K.; Hashimoto, M.
"Lambertellin System, the mechanism for fungal replacement of *Moniliniafructigena* with *Lambertellacorni-maris* without competitive inhibition on ager media."
Bioorg. Med. Chem., **22**, 2489, (2014).
- 橋本勝
「リンゴ果実におけるマイコパラサイト現象の生物有機化学的研究」
日本化学会生体機能関連部会ニュースレター、Vol. 28, No.3 (2014. 1. 23)
- Hirose, A.; Maeda, H.; Tonouchi, A.; Nehira, T.; Hashimoto, M.
Neomacrophorin I, II, and III, novel drimenyl cyclohexanes with hydroxylated butanoates from *Trichoderma* sp. 1212-03
Tetrahedron, **70**, 1458-1463 (2014).
- 橋本勝
「Plipastatin と Fengycin における構造混乱の終結」
化学と生物、51, 840-843 (2013).
- Yasumura, R.; Ashtekar, K. D.; Tonouchi, A.; Nehira, T.; Borhan, B.; Hashimoto, M.
7-β- and 10-β-Hydroxylated congeners of CAF-603; elucidation of absolute configuration of CAF-603 family, and their SAR studies in the anti-fungal activity
Tetrahedron 2013, **69**, 9469-9474 (2013).

- 橋本勝
Spartan の化学シフト計算による天然物の構造決定
Wavefunction User Letter No4.
- Takekawa, H.; Tanaka, K.; Fukushi, E.; Nehira, T.; Hashimoto, M.
Roussellols A and B, Tetracyclic Fusicoccanes from *Rousoella hysterioides*
J. Nat. Prod., **76**, 1047-1051 (2013).
- Takada, N.; Wakita, E.; Yamazaki, E.; Hashimoto, M.; Koda, Y. T
Methyl 3-iso-cucurbitate, a potential bolting inhibitor to *Brassica rapa*
Tetrahedron **69**, 5426-5430, (2013).
- R. Yasumura; K. Tanaka.; T. Nehira; M. Hashimoto.
Structural corrections of photinides A, B and their novel derivatives
Tetrahedron, **68**, 7991-7996 (2012).
- M. Honma, K. Tanaka, K. Konno, K. Tsuge, T. Okuno, M. Hashimoto
[Termination of the structural confusion between plipastatin AI and fengycin IX](#)
Bioorg. Med. Chem., **20**, 3793-3798 (2012).
- S. Kanamaru, M. Honma, T. Murakami, T. Tsushima, S. Kudo, K. Tanaka, K. Nihei, T. Nehira, M. Hashimoto.
"Absolute Stereochemistry of Altersolanol A and Alterporriols"
Chirality, **24**, 137-146 (2012).

[学会発表](計 32 件)

- 橋本勝・廣瀬あかね・殿内暁夫・根平達夫
Neomacropgorin I, II, および III の構造決定、日本農芸化学会 2014 年度大会(2014,03,28, 神奈川)
- 本村優奈・狩原恭平・田中和明・前多隼人・根平達夫・ウォーレン・ヒーリー・橋本勝
Epoxouroussenone 及び Epoxyroussenedione の構造決定、日本農芸化学会 2014 年度大会(2014,03,28, 神奈川)
- 橋本勝・竹川大登・田中和明・福士江里・松尾光一・根平達夫
「Roussellols A 及び B の構造決定」
日本農芸化学会 2013 年度大会(2013,03,25, 仙台)
- 広瀬あかね・村上貴宣・橋本勝
「リンゴ果実上におけるマイコパラサイト機構の全容解明」、日本農芸化学会 2013 年度大会(2013,03,25, 仙台)
- 六車美沙・本間美保・橋本勝、
「旧 Fengycin 構造の合成研究」
日本農芸化学会 2013 年度大会(2013,03,25, 仙台)

6. 村井嘉晃・高橋萌子・坂元君年・橋本勝
「Norleptoshol の合成研究」
日本農芸化学会 2013 年度大会(2013,03,26, 仙台)
7. 橋本勝
「計算機支援による天然物の構造決定」
第 8 回化学生態学研究会
(2013.0628 函館)
8. 廣瀬あかね・村上貴宣・橋本勝
「リンゴ果実におけるマイコパラサイト現象の機構解明」
第 55 回天然有機化合物討論会 (20130918 京都)
9. 村井嘉晃・高橋萌子・坂元君年・橋本勝
norleptoshol C の全合成研究
日本農芸化学会東北支部第 148 回大会
(2013.10.26、岩手大学)
10. 廣瀬あかね・殿内暁夫・根平達夫・橋本勝
Trichoderma sp. 1212-03 の清算する新規物質の構造決定日本農芸化学会東北支部第 148 回大会 (2013.10.26、岩手大学)
11. 六車美沙・本間美保・橋本勝
旧 Fengycin 構造の合成研究
日本農芸化学会東北支部第 148 回大会
(2013.10.26、岩手大学)
12. 橋本勝・安村良子・殿内暁夫・根平達夫
CAF-603 関連物質の絶対配置、及び抗菌活性日本農芸化学会東北支部第 148 回大会
(2013.10.26、岩手大学)
13. 高橋萌子・村井嘉晃・橋本勝・坂元君年
Spiroleptoshol 類の全合成研究
日本農芸化学会東北支部第 148 回大会
(2013.10.26、岩手大学)
14. M. Hashimoto, A. Hirose, T. Murakami,
Molecular Mechanism of Mycoparasitism between *Lambertella* spp. and *Monirinia fructigena* on Apple fruit., Riken - Brazil Workshop (2013.07.11, Saitama)
15. 安村良子・金丸沙樹・田中和明・根平達夫、橋本勝
Discosia sp. が生産する photinide A,B の構造訂正と新規誘導体の単離
日本農芸化学会 2012 年度大会
(2012,03,23, 京都)
16. 橋本勝、本間美保、田中和明、紺野勝弘、柘植謙爾、奥野智旦
Plipastain と Fengycin の構造混乱終結(2)
日本農芸化学会 2012 年度大会
(2012,03,23, 京都)
17. 金丸沙樹、坂元君年、紺野勝弘、橋本勝
確実なペプチド配列解析を目指した ESIMS/MS におけるイオン系列分離方法の開発研究
日本農芸化学会 2012 年度大会
(2012,03,24, 京都)
18. M. Hashimoto,
"Termination of the Structural Confusion between Plipastatin A1 and Fengycin IX "
- International Congress on Natural Products Research, (2012.07..29, New York)
19. M. Hashimoto,
"Termination of the Structural Confusion between Plipastatin A1 and Fengycin IX " International Conference of Natural Product Biosynthesis, (2012.06..19, Awaji Shima)
20. 橋本勝、
「リンゴ果実におけるマイコパラサイト現象の有機化学的研究」
日本化学会東北支部 有機化学コロキウム (2012.09.25, 秋田)
21. 橋本勝、本間美保、田中和明、紺野勝弘、柘植謙爾、奥野智旦、
「Plipastain と Fengycin における構造混乱の終結」
第 54 天然有機化合物討論会
(2012.09.18、東京)
22. 六車美沙、本間美保、橋本勝
「Plipastatin/Fengycin 構造混乱の終結(3) D-Tyr4-L-Tyr10 異性体の合成」
日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.107、弘前)
23. 村井嘉晃、八木橋優希、橋本勝
「norleptoshol C の全合成研究」
日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.07、弘前)
24. 大場雄貴、久守未央奈、秋山奈菜子、橋本勝
「シクロプロパンを組み込んだセルラーゼ反応遷移状態アナログの合成研究」
日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.07、弘前)
25. 安村良子、殿内暁夫、橋本勝
「*Trichoderma* sp. の生産するテルペン類とステロイド様物質の構造決定」日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.07、弘前)
26. 橋本勝、竹川大登、田中和明、福士江里、根平達夫、
「新規 4 環式フシコッカン Roussellols A, B の構造」
日本農芸化学会東北支部第 1 4 7 回大会
(2012.10.07、弘前)
27. 竹川大登、橋本勝、殿内暁夫、根平達夫
「子囊菌 *Chaetomium* sp. の生産する抗菌物質の構造」
日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.07、弘前)
28. 廣瀬あかね・工藤慎士・村上貴宣・橋本勝
「*Lambertella* 属によるマイコパラサイト現象の解明」
日本農芸化学会東北支部第 147 回大会
(2012.10.07、弘前)
29. 橋本勝
「セルラーゼ機構解明を目指したオリゴ糖ミミックの開発研究」
第 6 回東北糖鎖研究会
(2012.10.13)
30. 池田達也、田邊直也、橋本勝

「セルラーゼを選択的に阻害する抗シロアリ剤の開発」
第6回東北糖鎖研究会
(2012.10.13)

31. 久守未央奈, 大場雄貴, 橋本勝
「セルラーゼ反応遷移状態構造を組み込んだ分子プローブの開発」
第6回東北糖鎖研究会
(2012.10.13)

32. 橋本勝
「津軽地方の微生物の生産する二次代謝物 - 構造決定を中心にして - 」
熊本大学薬学部講演会
(2012.10.29, 熊本)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/2/biochem/yuki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本勝 (HASHIMOTO Masaru)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号：40212138

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：