

平成22年4月27日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056003

研究課題名（和文） 低エネルギーフォトンによる生体分子の修飾・代謝の計測

研究課題名（英文） Measurement of organic metabolism using low-energy photons

研究代表者

粟津 邦男 (AWAZU KUNIO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30324817

研究代表者の専門分野：レーザー医工学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学、複合化学・分析化学

キーワード：質量分析、タンパク質、イオン化メカニズム、中赤外レーザー

### 1. 研究計画の概要

生命現象を総合的に理解するためには「細胞内分子機械」ともいえるタンパク質の発現の動態を翻訳後修飾やタンパク質相互作用を含めて分子レベルで測定・制御する必要がある。マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法はタンパク質など生体高分子の質量分析におけるイオン化法として広く用いられているが、MALDI のイオン化機序は未だ解明には至っていない。MALDI のイオン化機序を解明することによってイオン化効率や再現性が向上すれば、MALDI のさらなる応用が期待できる。

本研究課題では、「低エネルギーフォトンによる生体分子の修飾・代謝の計測」を目指し、赤外レーザーと紫外レーザーによる新規質量分析手法を確立するために、中赤外波長可変レーザーを利用し、レーザー波長と分子の相互作用の関係から MALDI のイオン化メカニズムを探り、タンパク質の修飾・代謝と赤外レーザー波長との関係を明らかにすることを旨とする。

### 2. 研究の進捗状況

これまでの研究により、中赤外レーザーによるタンパク質のイオン化効率がレーザーの波長に強く依存していること、およびその波長依存性がイオン化補助剤であるマトリックスの化学構造と深く関わっていることを明らかにした。具体的には、マトリックス分子に含まれるカルボキシル基の C=O 伸縮振動の励起、およびカルボキシル基周辺に存在する水素イオンの存在が効率的なイオン化に寄与することを明らかにした。この知見をもとに、マトリックスの添加が不要で迅速

な分析を可能とするサンプルプレートを新たに考案し、特許出願を行った。

また、試料作成に用いられる溶媒に注目し、試料溶媒によるイオン化効率の変化について検討した。用いた溶媒は、水、重水、アセトニトリル、メタノール、エタノール、*t*-ブタノール、テトラヒドロフランの7種である。ペプチドには bradykinin fragment 1-7 を、マトリックスには 2,5-dihydroxybenzoic acid を用いた。窒素レーザーを用いた MALDI により試料をイオン化させ、飛行時間型質量分析計で分析した結果、マトリックスイオンとペプチドイオンの量の間に関係が見られなかった。この結果から、マトリックスのイオン化はペプチドのイオン化に直接関与しておらず、溶媒と試料との水素結合がペプチドのイオン化に大きく寄与している可能性が示唆された。

### 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

本研究課題ではこれまでに、中赤外レーザーによるタンパク質のイオン化効率がレーザーの波長に強く依存していること、およびその波長依存性がイオン化補助剤であるマトリックスの化学構造と深く関わっていることを明らかにした。具体的には、マトリックス分子に含まれるカルボキシル基の C=O 伸縮振動の励起、およびカルボキシル基周辺に存在する水素イオンの存在が効率的なイオン化に寄与することを明らかにした。

また、従来はイオン化に無関係と考えられていた試料溶媒がペプチドのイオン化効率に関与していることを明らかにし、マトリッ

クスのイオン化はペプチドのイオン化に直接関与しておらず、溶媒と試料との水素結合がペプチドのイオン化に大きく寄与している可能性を示した。

以上のように、現時点までは当初計画どおり進んでおり、当初の期待以上の成果も得られ、特許出願も行っている。

#### 4. 今後の研究の推進方策

当初計画では中赤外レーザーでイオン化させた生体分子の質量分析を行い、レーザー波長やマトリックスなどイオン化の初期条件によって検出されるイオンがどのように変化するかを調べることでイオン化メカニズムの解明を目指していた。その結果、当初目標としていた範囲での成果は得られている。しかし、これまでの研究によってイオン化過程には様々な時間スケールで起こる複数の現象が関与しており、様々な過程を経て最終的に検出されたイオンのみからでは得られる情報が極めて限られていることがわかった。

そこで、今後は、これまで行ってきた実験手法に加えて、短パルスレーザープローブを用いたレーザー誘起蛍光法などの能動的分光診断手法により化学反応過程の時間分解測定を行うことでイオン化メカニズムをより詳細に調べる予定である。

#### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計6件)

- ① H. Hazama, S. Yamada, K. Matsumoto, K. Awazu, Mid-infrared spectroscopy with a high-energy pulsed tunable laser using difference-frequency generation, Proc. 2nd Int. Multi-Conference on Engineering and Technological Innovation 3, 26–29 (2009) 査読有
- ② T. Kanai, S. Suzuki, K. Awazu, Free-electron-laser-induced shock wave control and mechanistic analysis using pulse control, Appl. Opt. 47, 5862–5870 (2009) 査読有
- ③ H. Hazama, H. Nagao, R. Suzuki, M. Toyoda, K. Masuda, Y. Naito, K. Awazu, Comparison of mass spectra of peptides in different matrices using matrix-assisted laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, MULTUM-IMG, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 1461–1466 (2008) 査読有
- ④ S. Yoshihashi-Suzuki, I. Sato, K. Awazu, Wavelength dependence of matrix-assisted laser desorption and ionization using a tunable mid-infrared laser, Int. J. Mass Spectrom. 270,

134–138 (2008) 査読有

- ⑤ S. Yoshihashi-Suzuki, I. Sato, K. Awazu, Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a mid-Infrared tunable laser for direct protein analysis, IEEE J. Selected Topics Quant. Electronics 14, 113–117 (2008) 査読有
- ⑥ 鈴木幸子, 藤田珠美, 粟津邦男, 赤外レーザーマトリックス支援レーザー脱離イオン化法の波長依存性に関する研究と応用, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn. 56, 235–240 (2008) 査読有

[学会発表] (計13件)

- ① H. Hazama, S. Yamada, K. Matsumoto, K. Awazu, Mid-infrared spectroscopy with a high-energy pulsed tunable laser using difference-frequency generation, 7th Int. Conf. Computing, Commun. and Control Technologies: CCCT 2009, The Rosen Centre Hotel, Orlando, Florida, USA (13 Jul. 2009).
- ② K. Awazu, H. Hazama, S. Furukawa, K. Ishii, Measurement of organic metabolism using low-energy photons, The 3rd Symposium on Molecular Science for Supra Functional Systems, Digital Multi-purpose Hall, Tokyo Institute of Technology, Meguro, Tokyo (5 Jun. 2009).
- ③ S. Suzuki, T. Fujita, S. Fukumoto, H. Horiike, K. Awazu, Proton source of matrix-assisted laser desorption/ionization using an infrared laser, 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA, USA (2 Jun. 2009).

[図書] (計1件)

- ① 粟津邦男, 赤外レーザー医工学、大阪大学出版会 (2008)

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

- ①  
名称：分析法  
発明者：金澤進一，中田元巳，中林誠，粟津邦男，間久直  
権利者：住友電気工業株式会社、住友電工フ  
ァインポリマー株式会社  
種類：特許権  
番号：特願 2009-063063  
出願年月日：2009年3月16日  
国内外の別：国内