

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：14401

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

研究成果の概要（和文）：マトリックス支援レーザー脱離イオン化（matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI）は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、そのイオン化機序は未だ解明には至っていない。イオン化機序の解明によってイオン化効率や再現性が向上すれば、バイオ・医療分野での更なる発展が期待できる。通常のMALDIでは紫外レーザーが用いられるが、本研究では中赤外レーザーを用いることで従来困難であった難溶性試料のイオン化に成功した。また、ペプチドのイオン化効率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、試料溶媒である水がイオン化に大きく寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry is widely used in the analysis of biomolecules such as proteins. However, the mechanism of MALDI has not been fully understood. If the MALDI process is elucidated and controlled, further progress in the biomedical fields is expected. In this study, we have used a mid-infrared laser instead of a conventional ultraviolet laser for MALDI and have succeeded in ionizing an insoluble analyte which has been hard to ionize. In addition, we have found that the wavelength dependence of the ionization efficiency of peptides is correlated with the chemical structure of the matrix and that the water solvent has influence on the ionization with MALDI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,400,000	0	8,400,000
2008年度	7,000,000	0	7,000,000
2009年度	7,000,000	0	7,000,000
2010年度	7,000,000	0	7,000,000
2011年度	5,600,000	0	5,600,000
総計	35,000,000	0	35,000,000

研究分野：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. 研究開始当初の背景

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間相互作用

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にもかかわらず、そ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、バイオ・医療分野での更なる発展が期待できる。本研究課題では、MALDI のイオン化機序の解明に向けた検討を行うとともに、通常 MALDI で用いられる紫外レーザーの代わりに中赤外レーザー (低エネルギーフォトン) を用いた新規 MALDI 法の開発を行った。

## 2. 研究の目的

上述のとおり MALDI のイオン化機序は未だ解明には至っていないが、MALDI を用いた質量分析の利用者からはイオン化効率や再現性の向上が強く求められており、そのためにイオン化機序の解明が望まれている。

本研究課題では通常 MALDI で用いられる紫外レーザーの代わりに中赤外レーザーを用いることで通常 MALDI ではイオン化が困難な難溶性試料などのイオン化が可能な新規イオン化手法の開発を行った。また、MALDI のイオン化機序の解明に向けてイオン化効率のレーザー波長依存性、試料溶媒依存性の観点からイオン化機序について検討を行った。

## 3. 研究の方法

イオン化用の紫外レーザーには波長 337 nm の窒素レーザーを、中赤外レーザーとしては波長を 5.5~10  $\mu\text{m}$  で連続的に変えることができる差周波発生型小型中赤外波長可変レーザーを用いた。レーザー照射によって生成したイオンを飛行時間型質量分析計によって分析した。

### (1) 中赤外レーザーMALDI の波長依存性の測定によるイオン化機序の検討

ペプチド (アンジオテンシン II) を試料とし、様々なマトリックス (2,5-ジヒドロキシ安息香酸など) を用いて中赤外レーザーMALDI によりイオン化させ、飛行時間型質量分析計で分析した。中赤外レーザーの波長を変化させることでレーザーの波長によるイオン化効率の違いを評価した。

### (2) MALDI の試料溶媒依存性の測定によるイオン化機序の検討

MALDI で試料を作製する際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。溶媒として水、メタノール、エタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランを用いた。各溶媒を用いてペプチド (ブラジキニンフラグメント 1-7 またはアンジオテンシン II) を 1 pmol/ $\mu\text{L}$ 、マト

リックス (2,5-ジヒドロキシ安息香酸) を 10 mg/mL の濃度で溶解させ、両溶液を 1:1 (v/v) の割合で混合した。この試料溶液 1  $\mu\text{L}$  をサンプルプレートに滴下し、乾燥させた後、窒素レーザーによりイオン化させて飛行時間型質量分析計で分析した。

中赤外レーザーの光子エネルギーは紫外レーザーの光子エネルギーと比べて 1/10 程度であるため、中赤外レーザーを用いた MALDI と紫外レーザーを用いた MALDI とではイオン化機序が全く異なることが予想される。しかし、実際には両者で類似した質量スペクトルが得られることが多く、共通したイオン化機序も関与していると考えられる。そこで、中赤外レーザーを用いた MALDI でも上記と同じ方法で試料溶媒の影響を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 中赤外レーザーMALDI の波長依存性の測定によるイオン化機序の検討

中赤外レーザーによるペプチドのイオン化効率の波長依存性を測定した結果、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。

### (2) MALDI の試料溶媒依存性の測定によるイオン化機序の検討

紫外レーザーを用いた 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、溶媒に水を用いた場合に最もイオン化効率が高くなることがわかった。

同様の測定を中赤外レーザーでも行った結果、中赤外レーザーを用いた場合も試料溶媒に水を用いた場合に最もイオン化効率が高くなることがわかった。これらの結果から、ペプチドのイオン化に溶媒の水が大きく寄与していることが確認された。

MALDI のイオン化機序についてこれまでに報告されてきた理論モデルでは試料溶媒の影響が無視されていたが、本研究の成果より試料溶媒の影響が無視できないことがわかった。

本研究課題の実施によって得られた知見は MALDI のイオン化機序の解明、さらにはバイオ・医療分野における研究において大きな役割を持つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

- ① Hisanao Hazama, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Toshio Tashima, Yasuhide Naito, Kunio Awazu, Development of a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, *J. Biomed. Opt.* **16**, 046007 (2011). 査読有  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1117/1.3561091>
  - ② Hidetoshi Yoshimura, Hisanao Hazama, Jun Aoki, Michisato Toyoda, Yasuhide Naito, Kunio Awazu, Evaluation of a delay-line detector combined with analog-to-digital converters as an ion detection system for stigmatic imaging mass spectrometry, *Jpn. J. Appl. Phys.* **50**, 056701 (2011). 査読有  
DOI: 10.1143/JJAP.50.056701
  - ③ Jun Aoki, Hisanao Hazama, Michisato Toyoda, Novel ion extraction method for imaging mass spectrometry, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **59**, 57–61 (2011). 査読有  
DOI: 10.5702/masspec.11-20
  - ④ Hirofumi Nagao, Shuichi Shimma, Shigeo Hayakawa, Kunio Awazu, Michisato Toyoda, High-energy electron transfer dissociation using a tandem time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ionization ion source, *Eur. J. Mass Spectrom.* **16**, 551–556 (2010). 査読有  
DOI: 10.1255/ejms.1075
  - ⑤ Hirofumi Nagao, Shuichi Shimma, Shigeo Hayakawa, Kunio Awazu, Michisato Toyoda, Development of a tandem time-of-flight mass spectrometer with an electrospray ionization ion source, *J. Mass Spectrom.* **45**, 937–943 (2010). 査読有  
DOI: 10.1002/jms.1787
  - ⑥ Sachiko Yoshihashi-Suzuki, Izuru Sato, Kunio 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  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijms.2007.12.003>
  - ⑦ Sachiko Yoshihashi-Suzuki, Izuru Sato, Kunio 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  
DOI: 10.1109/JSTQE.2007.913399
  - ⑧ Hisanao Hazama, Hirofumi Nagao, Ren Suzuki, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Yasuhide Naito, Kunio 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  
DOI: 10.1002/rcm.3531
  - ⑨ Hisanao Hazama, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Ren Suzuki, Toshio Tashima, Ken-ichi Fujii, Katsuyoshi Masuda, Kunio Awazu, Michisato Toyoda, Yasuhide Naito, Construction of a novel stigmatic MALDI imaging mass spectrometer, *Appl. Surf. Sci.* **255**, 1257–1263 (2008). 査読有  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.05.058>
  - ⑩ 佐藤出, 鈴木一吉橋幸子, 間久直, 粟津邦男, 中赤外波長可変固体レーザーを用いた新規質量分析装置によるタンパク質のイオン化, *レーザー研究* **35**, 382–387 (2007). 査読有
- [学会発表](計31件)
- ① Kunio Awazu, Hisanao Hazama, Tomonori Hamanaka, Jun Aoki, Michisato Toyoda, Yasuhide Naito, Tissue imaging with a stigmatic mass microscope using laser desorption/ionization, *SPIE Photonics West, BiOS 2012* (San Francisco, CA, USA, Jan. 23, 2012).
  - ② Hisanao Hazama, Masaki Yumoto, Takayo Ogawa, Satoshi Wada, Kunio Awazu, Development of a mid-infrared tunable optical parametric oscillator pumped by a Q-switched Tm,Ho:YAG laser, *SPIE Photonics West, LASE 2011* (San Francisco, CA, USA, Jan. 22–27, 2011).
  - ③ Kunio Awazu, Hisanao Hazama, Hirofumi Nagao, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Kenichi Fuji, Katsuyoshi Masuda, Toshio Tashima, Michisato Toyoda, Yasuhide Naito, Development of a stigmatic imaging mass spectrometer using laser desorption/ionization, *SPIE Photonics West, BiOS 2011* (San Francisco, CA, USA, Jan. 22–27, 2011).
  - ④ Hisanao Hazama, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Yasuhide Naito, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Toshio Tashima, Kunio Awazu, Observation of tissue sections using a stigmatic mass microscope with a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, *59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics* (Denver, CO, USA, Jun. 7, 2011).
  - ⑤ Jun Aoki, Hisanao Hazama, Michisato Toyoda, Kunio Awazu, Katsuyoshi Masuda,

Kenichi Fujii, Yasuhide Naito, Development and evaluation of new stigmatic mass microscope with high mass and spatial resolving power using multi-turn time-of-flight mass spectrometer, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Denver, CO, USA, Jun. 7, 2011).

- ⑥ (Invited) Hisanao Hazama, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Yasuhide Naito, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Toshio Tashima, Kunio Awazu, Development of a stigmatic mass microscope with laser ionization and a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, Saratov Fall Meeting (Saratov, Russia, Oct. 5–8, 2010).
- ⑦ Hisanao Hazama, Hidetoshi Yoshimura, Jun Aoki, Hirofumi Nagao, Yasuhide Naito, Michisato Toyoda, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Toshio Tashima, Kunio Awazu, Observation of tissue sections stained with dyes using a stigmatic imaging mass spectrometer, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Salt Lake City, UT, USA, May 23–27, 2010).
- ⑧ Hidetoshi Yoshimura, Hisanao Hazama, Jun Aoki, Michisato Toyoda, Yasuhide Naito, Kunio Awazu, Development of a fast position- and time-sensitive ion detector for stigmatic mass microscopy, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Salt Lake City, UT, USA, May 23–27, 2010).
- ⑨ Satoshi Furukawa, Hisanao Hazama, Kunio Awazu, Dependences of ionization efficiencies of peptide on solvent in matrix-assisted laser desorption/ionization, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Salt Lake City, UT, USA, May 23–27, 2010).
- ⑩ Jun Aoki, Hisanao Hazama, Michisato Toyoda, Kunio Awazu, Katsuyoshi Masuda, Kenichi Fujii, Yasuhide Naito, Development of a stigmatic mass microscope with high mass and spatial resolving power using a multi-turn time-of-flight mass spectrometer, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (Salt Lake City, UT, USA, May 23–27, 2010).

[図書] (計 4 件)

- ① 間久直, 粟津邦男, 臨床プロテオミクスーバイオマーカー探索から個別化医療へー, 第 8-3 節 レーザーイオン化を用いた新規質量分析イメージング技術, pp. 299–308, 日本臨床プロテオーム研究会編, 金原出版 (2012).

- ② 粟津邦男, 間久直, 次世代光医療ーレーザー技術の臨床への橋渡しー, 第 3 章 光と生体組織との相互作用, pp. 24–33, シーエムシー出版 (2010).
- ③ 粟津邦男, バイオメディカルフォトンクス, 3.2 プロテオミクスへの応用, pp.91–97, 電気学会次世代バイオメディカル・レーザー応用技術調査専門委員会編, オーム社 (2009).
- ④ 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 2 件)

①

名称: イオン源、質量分析装置、制御装置、制御方法、制御プログラムおよび記録媒体  
発明者: 青木順, 間久直  
権利者: 大阪大学  
種類: 特許権  
番号: 特願 2009-100686  
出願年月日: 2009 年 4 月 17 日  
国内外の別: 国内

②

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、住友電工フラ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

[その他]

領域ホームページ

<http://www.res.titech.ac.jp/~kiso/koujikei.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

間 久直 (HAZAMA HISANAO)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 70437375

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 20512073