

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659016  
 研究課題名（和文）負イオンではいけませんか？プロテオミクスの本質的問題点の克服を意図した挑戦  
 研究課題名（英文）Why don't you try negative ionization? Alternative challenge to solve inherent problems in proteomics  
 研究代表者  
 大江 知行 (OE TOMOYUKI)  
 東北大学・大学院薬学研究科・教授  
 研究者番号：10203712

## 研究成果の概要（和文）：

## 【MALDI における負イオン検出の検討および活用】

- 負イオン化のためのマトリクス条件を最適化した。
- 負イオン化を併用した新規 peptide mass fingerprinting 法を開発した。
- ヒト血清アルブミン上の網羅的化学修飾スクリーニング法を開発した。

## 【ESI における負イオン検出の検討および活用】

- 負イオンのための溶媒条件を最適化した。
- 各種化学修飾ペプチドのフラグメンテーションを精査した。
- 負イオンの特徴的フラグメンテーションを利用する化学修飾スクリーニング法を開発した。

## 研究成果の概要（英文）：

## 【Optimization and application of negative ionization MALDI】

- MALDI conditions have been optimized for negative ionization.
- Novel peptide mass fingerprinting method has been developed using negative ionization.
- Novel screening method for chemical modifications on HSA has been developed

## 【Optimization and application of negative ionization ESI】

- ESI conditions have been optimized for negative ionization.
- Fragmentation pattern has been investigated for each chemically modified peptide.
- A screening method for chemical modifications has been developed using the specific fragmentations.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、プロテオミクス、質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

マトリクス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法などのソフトイオン化法は、質量分析法 (MS) によるタンパク質の同定を可能とした。しかしながら、そのイオン化は、専

ら酸性条件下の正イオン生成に限られ、ペプチドを敢えて積極的に負イオン化してプロテオミクスに活用する発想は国内外、例が無かった。しかし、正イオン検出を用いる限り、『定量分析に不向き』、『同定信頼性が低い』、『翻訳後修飾解析が困難』などの問題が避け

られないと言った問題も有った。

## 2. 研究の目的

質量分析 (MS) におけるペプチドの負イオン化条件を確立し、そのイオン化・フラグメント特性を戦略的に活用した新技術、即ち『次世代型プロテオミクス』の創生を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) MALDIにおける負イオン検出の検討および活用

### ①ペプチドの効率的負イオン生成条件の検討

- 各種タンパク質消化物 (アルブミン、カゼイン等) をモデルとして用いた。
- マトリクス候補としてMALDI法のレーザー波長 ( $\lambda_{\max}$  337 nm) に極大吸収を持つピリジン、ピリミジン誘導体、芳香族アミン類を検討した。
- 感度のみならず、結晶化の再現性・容易さ、結晶の形状も結晶化溶媒と共に検討した。
- 問題となるアルカリ金属の捕捉剤として、リン酸化合物、クラウンエーテル類を検討した。

### ②同定精度を向上した peptide mass fingerprinting (PMF) 法の開発

- 各種モデルタンパク質を、定法により DTT/IAA で還元アルキル化後、トリプシン消化に付し、モデルとした。
- 正イオン検出と比較し、タンパク質中の酸性ペプチドの検出効率を精査した。

### ③新規PMF法の実用化

- 負イオンと正イオンの PMF データからのタンパク質同定結果を比較検討し、誤同定を排除出来る事を確認した。

(2) ESIにおける負イオン検出の検討および活用

### ①ペプチドの効率的負イオン生成条件の検討

- 各種ペプチド、タンパク質消化物をモデルとして用いた。
- 溶媒に加える揮発性塩基 (アンモニア、トリエチルアミン等) を検討した。
- 有機溶媒 (アセトニトリル、メタノール) の影響も検討した。
- LC/MSへの利用を念頭に、カラムの安定性、ペプチド類の分離特性も考慮した条件を検討した。

### ②負イオン化ペプチドのフラグメンテーションの解析

- 化学修飾ペプチドのフラグメンテーションパターンを、ペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖、化学修飾構造との観点で精査した。
- 種々衝突誘起解離 (CID) 条件を、用いる CIDガスの異なる (Ar, He, N<sub>2</sub>) 四重極型、イオントラップ型それぞれで精査した。

### ③特徴的フラグメンテーションを活用した翻

訳後解析スクリーニング法の構築

- 化学修飾部位のみに選択的なフラグメンテーションを用い、リンクドスキャンを駆使した化学修飾スクリーニング法の可能性を示唆した。

## 4. 研究成果

(1) MALDI における負イオン検出の検討および活用

- MALDI 法におけるマトリクスを精査し、感度・再現性よく負イオンを生成する条件として、150 mM 2,5-dihydroxybenzoic acid と 1%リン酸の条件を見出した。
- 本条件は、正イオン検出でも十分な感度を示し、両イオン化に利用できることを見出した。
- 負イオン化を併用した新規 PMF 法を開発し、酸性ペプチドの検出効率を著しく向上させ、タンパク質の同定精度を著しく改善する事を明らかにした。また、本法ではタンパク質のご同定を回避出来る事も明らかにした。
- 方法により本法をヒト血清アルブミン (HSA) の精密解析に応用した所、100%の配列カバー率が可能であり、HSA 上の網羅的化学修飾解析に活用できる事も見出した。

(2) ESI における負イオン検出の検討および活用

- 溶媒に加える揮発性塩基、有機溶媒を精査し、感度・再現性よく負イオンを生成する条件を見出した。
- 各種化学修飾ペプチド (酸化、糖化、脂質化、薬物付加など) をアンジオテンシン II あるいはインシュリンをモデルに調製し、これらのフラグメンテーションを精査した。
- 負イオンにおいて、化学修飾ペプチドから特徴的フラグメンテーションが効率よく見られる事を明らかにした。
- とりわけ、活性化薬物等とのマイケル付加生成物が、効率良くレトロマイケル付加したフラグメントイオンを確認した。
- 特徴的なフラグメンテーションをパターン化する事により、MS/MS による化学修飾ごとのスクリーニング技術を開発した。

## 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 1 件)

2012 年度

1. Takaaki Goto, Shota Kojima, Shohei Shitamichi, Seon Hwa Lee, Tomoyuki Oe: Chemical modificomics: a novel strategy for efficient biomarker

discovery through chemical modifications on a target peptide, *Anal. Methods*, 4, 1945-1952 (2012). DOI: 10.1039/C2AY05841C.

[学会発表] (計 13 件)

2012 年度

1. **大江知行**: 効率的バイオマーカー探索を目指した『化学修飾オミクス』, 微量生体成分評価研究会, 2013 年 2 月 11 日, 福岡. (招待講演)
2. **Tomoyuki Oe**: Chemical modificomics: alternative analytical platform for efficient biomarker discovery, Sendai Symposium on Analytical Sciences 2012, Nov. 9~10, 2012, Sendai, Japan. (招待講演)
3. 吉泉玲央奈, **李宣和**, **後藤貴章**, **大江知行**: 化学修飾スクリーニングを目的とした修飾ペプチドのフラグメンテーション解析, 第 51 回日本薬学会東北支部大会, 2012 年 10 月 7 日, 青森.
4. **Tomoyuki Oe**, **Takaaki Goto**, **Shota Kojima**, **Shohei Shitamichi**, **Kazuyuki Murata**, **Kohei Miyamoto**, **Seon Hwa Lee**: Chemical modificomics ~ Alternative analytical platform for efficient biomarker discovery ~ , 19th International Mass Spectrometry Conference, Sep. 15-21 2012, Kyoto, Japan.
5. **大江知行**: バイオマーカー探索を指向した化学修飾オミクス, 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会, 2012 年 9 月 6 日~8 日, 盛岡. (依頼講演)
6. 村田和之, **後藤貴章**, **李宣和**, **大江知行**: 血清アルブミン上の非酵素的翻訳後修飾解析による新規バイオマーカー探索のための消化ペプチド検出法, みちのく分析科学シンポジウム 2012, 2012 年 7 月 21 日, 米沢.
7. 吉泉玲央奈, **李宣和**, **後藤貴章**, **大江知行**: 化学修飾オミクス構築のための修飾ペプチドの系統的フラグメンテーション解析, みちのく分析科学シンポジウム 2012, 2012 年 7 月 21 日, 米沢.
8. 村田和之, **後藤貴章**, **李宣和**, **大江知行**: 化学修飾オミクスに基づく新規病態マーカー探索を目的とした化学修飾アルブミン解析法の検討, 平成 24 年東日本分析若手交流会, 2012 年 6 月 29 日~30 日, 銚田.
9. 吉泉玲央奈, **李宣和**, **後藤貴章**, **大江知行**: 化学修飾オミクスへの応用を目的とした修飾ペプチドのフラグメンテーション解析, 平成 24 年東日本分析若手交流会, 2012 年 6 月 29 日~30 日, 銚

田.

2011 年度

10. **大江知行**: バイオマーカー探索基盤としての『化学修飾オミクス』, 2012 年 2 月 18 日, 第 13 回機能構造と分析化学シンポジウム, 仙台. (招待講演)
11. **Tomoyuki Oe**: Chemical modificomics: alternative analytical platform for efficient biomarker discovery, 2011 International Symposium on Recent Advances in Drug Discovery and development, November, 18 2011, Cheongju, Korea. (招待講演)
12. 武田純平, **後藤貴章**, **李宣和**, **大江知行**: MALDI-MS による代謝活性化評価のためのアミノ酸型新規プローブの検討, 第 50 回日本薬学会東北支部大会, 2011 年 10 月 29 日~30 日, 仙台.
13. 村田和之, **後藤貴章**, **李宣和**, **大江知行**: 血清アルブミンの化学的ストレスによる被修飾部位解析, 第 50 回日本薬学会東北支部大会, 2011 年 10 月 29 日~30 日, 仙台.

[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

日本語ウェブサイト:

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki.html>

英語ウェブサイト:

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki-e.shtml>

東北大学研究者紹介 (研究代表者):

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/4c4>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大江 知行 (OE TOMOYUKI)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号 : 10203712

(2) 研究分担者

後藤 貴章 (GOTO TAKAAKI)  
東北大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号 : 40344684

李 宣和 (LEE SEONHWA)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号 : 60519776

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :