

学位論文要旨

学 位 申 請 者 加 藤 洋 介

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOFMS) と四重極イオントラップ (QIT) を組み合わせた MALDI-QIT-TOFMS は、タンパク質やペプチド等の生体高分子の測定可能なソフトイオン化法であり、タンパク質を中心に生命現象を理解するプロテオームとプロテオミクスの分野で汎用されている。MALDI-TOFMS の分析では、matrix と呼ばれる低分子有機化合物が必須である。Matrix は、測定試料がレーザー光から直接照射されるのを防ぐ保護作用、凝集を防ぐ分散剤、イオン化を促進させるイオン化補助剤の働きをしている。現在、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB)、シナピン酸 (SA)、および α -シアノ-4-ヒドロキシケイヒ酸 (CHCA) の 3 種類はペプチドのイオン化に優れ、代表的な matrix として汎用されている。しかし、これら化合物のペプチドに対するイオン化能力は万能ではなく、測定できないペプチドも存在する。また、分析装置間によっても matrix のイオン化能力は大きく異なり、同一の matrix で MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の分析は不可能である。そのため、実際のプロテオーム解析では、分析装置毎に matrix と測定試料を調整しなければならないという問題点がある。この 2 種類の matrix を用いる方法では、微量な試料の消費量の増大や matrix 変更による解析結果の不一致などが起こり、MALDI によるプロテオーム解析の効率化を妨げる主な要因の一つとなっている。

Matrix のイオン化機構は熱平衡モデルなど様々なモデルで検討されているが、未だ不明である。この様な背景から、これまでの matrix は構造情報に基づく合理的な設計を基盤として開発されたのではなく、経験則に基づいた探索により見出された化合物である。つまり、新規 matrix の開発の最大の問題点は matrix の化学構造とペプチドのイオン化機構の相関が不明瞭であり、論理的な分子設計ができない点にある。代表的な matrix において、化学構造を基盤に誘導体が検討されているのは DHB のみであり、Schlunegger らは DHB のヒドロキシ基の 2 位と 5 位の置換位置が測定試料のイオン化に重要であると報告している。この知見は他の matrix においても置換基と置換位置が matrix の機能に大きな影響を与える可能性があることを示唆しており、既存の matrix を基本骨格として化学構造を変換した誘導体の網羅的探索は、matrix 開発に有益な情報を与えるかと推測した。

網羅的探索の対象となる基本骨格は matrix の機能を有し、化学的な修飾位置の多いものが適していると考えられる。フェルラ酸 (FA) は代表的な matrix の SA の基本骨格であり、matrix としての使用実績も有る。また、SA より合成原料となるバニリン誘導体が数多く存在することから網羅的探索の基本骨格に適していると思われる。そこで、本研究は FA を基本骨格として誘導体を網羅的に化学合成し、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両方でタンパク質同定が可能な matrix の開発を目的とした。

最初に、既存の matrix を参考にしたメトキシ基置換体とハロゲン基置換体の計 14 種類合成し、matrix としての FA 誘導体の検討を始めた。FA 誘導体の代表的な合成方法は Knoevenagel 反応であるが、網羅的な合成のために、反応条件がより緩和な Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応や合成原料の入手が容易な Heck 反応で合成方法を検討した。HWE 反応は Knoevenagel 反応より緩和な反応条件を可能とし、副生成物が少なく誘導体の精製が容易だった。また、HWE 反応で収率が 18%の誘導体に対して、Heck 反応に変更する事で 45%に収率が改善した。結果、平均収率 25%で各々の誘導体の合成に成功した。そのため、HWE 反応と Heck 反応による合成方法は、目的とする FA 誘導体の構造に応じて使い分けることにより、簡便且つ網羅的に誘導体合成が可能となった。これら誘導体は matrix として、市販のペプチドの混合物

の MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の分析に使用した。ハロゲン基置換体はメトキシ基置換体と比較すると、両方の質量分析装置でペプチドの分子イオンとフラグメントイオンを検出した。この結果より、FA 誘導体は置換基の種類によって matrix の特徴が大きく変化する事が明らかになり、置換基の種類や置換箇所の変更を検討することを決めた。FA の 2 位、5 位と 6 位をハロゲン基やメトキシ基の他に、ニトロ基置換体の誘導体を合成し、matrix として、市販のペプチドの混合物の MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の分析に使用した。ニトロ基置換体とヨード基置換体は、ペプチドのイオン強度が低く matrix として不適切だった。6 位のメトキシ置換体は、MALDI-TOFMS によるペプチドの感度が誘導体の中で優れていたが、MALDI-QIT-TOFMS ではフラグメントイオンを検出することはできなかった。一方、6 位のブロモ置換体 (6BFA) は、MALDI-TOFMS のペプチド感度はメトキシ基置換体よりは劣っていたが、その他の誘導体より良好な感度を示した。また、6BFA は MALDI-QIT-TOFMS によるペプチドのフラグメントイオンの強度を評価すると、メトキシ置換体および代表的な matrix である DHB より高い強度を示した。そのため、6BFA が FA 誘導体の中で matrix として優れており、タンパク質同定に応用させることを決めた。

次に、6BFA の matrix としての有用性を確認するため、MALDI の代表的なタンパク質同定法の PMF 法と MS/MS ion search に matrix として応用させた。MALDI-TOFMS の PMF 法で代表的な matrix の CHCA と 6BFA を比較した結果、6BFA は CHCA と異なり、酸性ペプチドに対して感度を示したがタンパク質同定の精度を示すスコア評価は同等かそれ以上の結果が得られた。また、MALDI-QIT-TOFMS の MS/MS ion search の代表的な matrix である DHB と比較すると、6BFA はアミノ酸配列の解析に優位な b と y フラグメントイオンを DHB より多く検出し、高いスコアでタンパク質を同定した。これらの結果より、6BFA は PMF 法と MS/MS ion search によるタンパク質同定法が可能であり、matrix として有用であることが明らかになった。また、matrix としての機能向上の目的のために、6BFA を基本骨格とした新たな誘導体を合成し化学構造と matrix の機能の相関性について検討した。結果、6BFA の 6 位のブロモ基は FA のプロトン親和性 (PA) を低下させる置換基効果があることがあきらかになった。しかし、酸性ペプチドに対する高い感度は不明のままであり、6BFA を上回る誘導体を見出すこともできなかった。

最後に、6BFA は両方のタンパク質同定法によるプロテオーム解析に matrix として応用させた。プロテオーム解析のタンパク質同定は市販ペプチドやタンパク質と比較すると、夾雑物は多くタンパク質の濃度は不均一であり低い場合が多い。そのため、プロテオーム解析の前段階として、6BFA のペプチド濃度とイオン強度の関係性をサブスタンス P の検量線を用いて検討した。その結果、6BFA は CHCA と比較するとイオン強度は低かったが、ペプチド濃度とイオン強度の相関係数は優れており、低濃度の分析に問題ないことが明らかになった。そこで、PMF 法によるタンパク質同定はより低濃度のプロテオーム解析が可能な Auto2D を用いた。この方法でも、6BFA はタンパク質同定をしたため、微量なタンパク質に対しても分析が可能であると思われる。次に、6BFA は MS/MS ion search によるラット副腎のプロテオーム解析に応用させた。二次元電気泳動で分離したタンパク質のうち、8 種類のタンパク質を測定試料とした。DHB は 8 種類のうち 6 種類のタンパク質の同定に成功した。一方の 6BFA は 8 種類のうちすべてのタンパク質において同定または候補を 1 つに絞る事に成功した。これらの結果より、6BFA は matrix として実際のプロテオーム解析に応用できることが明らかになった。

以上、網羅的な誘導体の合成による新規 matrix の開発によって、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両方でタンパク質同定が可能な matrix の開発に成功した。

学位論文要旨

学位申請者氏名 加藤 洋介

MALDI-QIT-TOFMS, which combines a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) and a quadrupole ion trap (QIT), is a soft ionization technique that enables measurement of biological macromolecules such as proteins and peptides. This technique is widely used in the field of proteome and proteomics to understand life phenomena centered on proteins. A low molecular organic compound called a matrix is essential for MALDI-TOFMS analysis. The matrix exerts a protective effect to prevent the sample being irradiated directly by the laser beam, is a dispersant that prevents coagulation, and an auxiliary agent for ionization that promotes ionization. Three types of matrix, 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), sinapinic acid (SA), and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), currently have excellent ionization of peptides and are widely used as typical matrices. However, these compounds do not have universal ionization ability for all peptides, and are unable to measure some peptides. In addition, the ionization ability of matrices differs greatly between analyzers, and it is impossible to conduct analysis with MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS using the same matrix. Therefore, actual proteome analysis is often problematic in the known matrices and the measurement sample must be adjusted for each analyzer. In order to obtain a reliable analysis result, it is desirable to use both of the devices. Therefore, when analyzing one sample with two devices, it is necessary to select the optimal matrix for each analyzer. Each device uses a different matrix, which increasing sample requirements. However, at the small-scale sample, this is undesirable, and using different matrices can lead to inconsistent results. This is one of the main factors reducing the efficiency of proteome analysis.

The Matrix ionization mechanism has been studied in various models, including the thermal equilibrium model, but the mechanism is still unknown. Against this background, existing matrices have not been developed on a foundation of rational design based on structural information, but instead are compounds that were discovered through searches based on empirical rules. That is, the greatest problem with the development of novel matrices is that the correlation between the chemical structure of the matrix and the ionization mechanism of the peptide is unknown, which makes logical molecular design impossible. In a typical matrix, DHB is the only matrix where its derivative is examined based on its chemical structure. Schlunegger et al. reported that the substitution positions at the 2- and 5-positions of the DHB hydroxy group are important for ionization of measured samples. This finding suggests that substituents and substitution positions may have a significant effect on the function of the matrix in other matrices. It was assumed that an exhaustive search for derivatives with chemical structures converted using existing matrices as the basic structure would provide useful information for matrix development.

The basic skeleton targeted for exhaustive search must have the function of matrix, and those with a large number of chemical modification positions were considered suitable. Ferulic acid (FA) is the basic skeleton of the typical matrix SA and has been used as a matrix in the past. Furthermore, the existence of a large number of vanillin derivatives that can be used as raw materials for synthesis from SA, suggests the suitability of FA as a basic skeleton for exhaustive search. Therefore, the purpose of this study was to conduct exhaustive chemosynthesis of derivatives using FA as a basic structure and develop a matrix capable of protein identification with both MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS.

At first, total of 14 FA derivatives which a methoxy group substitute and the halogen group substitute, referred to existing matrix, were synthesized and began examination of matrix. The Knoevenagel reaction, a typical synthesis method, the Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) reaction, with more moderate reaction conditions, and the Heck reaction, for which synthesis raw materials are easily available, were investigated to investigate different methods of synthesizing FA derivatives. The HWE reaction enabled the synthesis of derivatives under milder reaction conditions than the Knoevenagel reaction and the purification of the derivatives was easy. In addition, the Heck reaction

improved the yield of 45% from 18% of the HWE reaction. Therefore, synthesis methods using the HWE reaction and Heck reaction can synthesize derivatives simply and comprehensively by using different methods depending on the structure of the target FA derivative. These derivatives were applied as matrix to peptide ionization tests to search for FA derivatives able to detect peptide molecular ions and fragment ions with MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS mass spectrometers. The halogen basis substitute detected a molecular ion and fragment ion of the peptide in both mass spectrometry in comparison with a methoxy group substitute. As a result, it was revealed that a characteristic of matrix greatly changed by the kind of the substituent as for the FA derivative. Next the kind of the substituent and the substituted position was considered. The derivative that the second, fifth, sixth place of the FA were replaced with a halogen, methoxy group and a nitro group was synthesized and developed a matrix capable of protein identification with both MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS. The nitro-substituted derivative and iodine-substituted derivative were unsuitable as matrices due to the low ionic strength of the peptides. The methoxy-substituted derivative had superior peptide sensitivity among the derivatives used in MALDI-TOFMS, but this derivative was unable to detect fragment ions in MALDI-QIT-TOFMS. Conversely, the position 6 bromo-substituted derivative (6BFA) had inferior peptide sensitivity in MALDI-TOFMS than the methoxy-substituted derivative, but better sensitivity than other derivatives. When the strength of 6BFA for detecting peptide fragment ions with MALDI-QIT-TOFMS was evaluated, it was stronger than the methoxy-substituted derivative and DHB, which is a typical matrix. Therefore, it was found that 6BFA can detect peptide molecular ions and fragment ions in MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS.

Next, 6BFA was applied as a matrix to the PMF method and MS/MS ion search, which are typical MALDI protein identification methods, to confirm the usefulness of peptide molecular ions and fragment ions generated via 6BFA. Comparison of 6BFA and CHCA, a typical matrix used in the PMF method, showed that 6BFA showed sensitivity to peptides different to those detected with CHCA, and the score evaluation indicating protein identification accuracy was equivalent or better. In an MS/MS ion search, 6BFA detected significantly more b and y fragment ions than the typical matrix DHB in analysis of the amino acid sequence, and identified proteins at a higher score. These results demonstrate that 6BFA generates ions useful for protein identification using the PMF method and the MS/MS ion search. Moreover, a new derivative using 6BFA as the basic skeleton was synthesized to improve its function as a matrix, and the correlation between the chemical structure and the matrix function was examined. As a result, it became clear a certain thing that the substituent effect of the bromo basis of the sixth place of 6BFA reduced proton affinity (PA) of the FA. However, the high sensitivity for the acidic peptide remained unidentified and was not possible to find a derivative more than 6BFA.

Finally, it was examined whether 6BFA is a matrix that can be applied to both protein identification methods in actual proteome analysis. As for the protein identification of the proteome analysis, there are more cases that the density of protein is heterogeneous as for a lot of foreign elements, and are low than commercial peptide and protein. Therefore, as a stage before proteome analysis, the peptide concentration and the relationship of the ionic strength were examined by internal standard method substance P. As a result, 6BFA was lower in the ionic strength of the peptide than CHCA, but peptide concentration and the coefficient of correlation of the ionic strength were superior, and it was revealed that low-concentrated analysis did not have any problem. Therefore 6BFA was applied to low-concentration proteome analysis using Auto2D in PMF method. It was also possible to apply 6BFA to low-concentration proteome analysis using Auto2D; hence, it is considered to have practical applicability. Then, 6BFA was applied to rat adrenal proteome analysis by MS/MS ion search. The measurement sample assumed eight kinds of discrete protein by two-dimensional electrophoresis. DHB succeeded in identification of six of eight kinds of protein. 6BFA succeeded in narrowing down identification or a candidate to one in all protein in eight kinds. These results demonstrate that 6BFA was applied to actual proteome analysis as a matrix.

As above, this study succeeded in developing a novel matrix applicable for protein identification in both MALDI-TOFMS and MALDI-QIT-TOFMS by developing new matrices based on comprehensive synthesis of derivatives.

論文審査の結果の要旨

加藤洋介氏から提出された論文「フェルラ酸誘導体を基盤とする新規 MALDI マトリックスの開発」は、フェルラ酸 (FA) を基本骨格として、その誘導体を網羅的に化学合成し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) である MALDI-飛行時間型質量分析装置 (MALDI-TOFMS) と MALDI-四重極イオントラップ-飛行時間型質量分析装置 (MALDI-QIT-TOFMS) の両者に適応可能なタンパク質同定に適した実用性の高いマトリックスの開発を行ったものである。

ゲノム研究の飛躍的な発展により、疾病に関与する遺伝子とタンパク質の特定が可能となり、タンパク質研究が質的に大きく変化してきている。特に病態に関するプロテオーム解析は、疾病の原因解明に繋がることから、医学および薬学分野において注目されており、診断ツールとなる新たなバイオマーカー、タンパク性医薬品、分子標的薬、低分子薬の創薬標的などを見出すのに有意義な情報を提供するものと期待されている。プロテオーム解析を遂行するためには、ハイスループットなタンパク質同定法を用いてタンパク質を同定すること、その機能およびタンパク質間における相互作用を迅速に明らかにすることなどが必要である。質量分析法では、タンパク質の同定法としてペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法や MS/MS ion search などのデータベース検索が用いられており、マススペクトル自体がタンパク質データベースの極めて重要な情報を構成している。

これらを背景として、本論文では、FA を基本骨格として誘導体を網羅的に化学合成し、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両者に適応可能なマトリックスの検索について、3 章にわたり論述している。

第 1 章では、FA の部分構造である芳香環の化学構造を修飾することによって、系統的にマトリックス機能の改善並びに化学構造との相関を明らかにしている。すなわち、まず FA の芳香環に、メトキシ基、ヒドロキシ基、ハロゲンなどを導入する方法について検討を行い、それらを用いて、8 種類の市販ペプチドの混合物を作製して試料とし、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両者について分析を行っている。MALDI-TOFMS の場合、既存の代表的なマトリックスである α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) と比較して、ペプチドの検出可能数において同等であり、特にプロモ基置換体である 6-プロモフェルラ酸 (6BFA) は、CHCA とは異なる興味深い特性を示した。MALDI-QIT-TOFMS によるペプチドのフラグメントイオン生成に関する検討の場合、一般的なマトリックスである 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) と比較して、ほとんどの FA 誘導体において、高いフラグメントイオンの強度が示され、この場合でも 6BFA がその特性において優れていた。そこでさらに、電子求引性基のニトロ基を含む誘導体についても合成するとともに、等電点に関する違いも考慮してペプチド混合物を作製して試料とし、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両者について分析を行っている。MALDI-TOFMS の場合、メトキシ基置換体は、CHCA と比較して高い検出能を示したが、N 末端領域にアルギニンなどの塩基性アミノ酸を含むペプチドでは、CHCA の方が優れており、この傾向は 6BFA でも認めている。また MALDI-QIT-TOFMS によるペプチドのフラグメントイオン生成に関する検討の場合、メトキシ基置換体ではフラグメントイオンの生成が十分ではなく、6BFA が、メトキシ基置換体および DHB よりフラグメントイオンの生成において優れていた。これらの結果より、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両方の質量分析装置でペプチドの分子とフラグメントイオ

ンを検出可能な誘導体として、6BFA は有用であり、貴重な微量の試料を 1 回の試料調製で両方の装置に供することができる点で優れたマトリックスになることを示している。

第 2 章では、bovine serum albumin (BSA) と transferrin (TF) をトリプシン処理した消化物を用いて、PMF 法および MS/MS ion search によるタンパク質同定法への 6BFA の応用について検討している。PMF 法の場合、CHCA での同定スコアが BSA と TF について 100 と 144 であった一方、6BFA でのスコアは、BSA と TF で 120 と 144 であり、6BFA が CHCA と同等以上であることを確認している。CHCA と 6BFA の BSA を解析したマススペクトルを比較すると、ペプチド断片の感度に違いがあり、6BFA で感度が高い m/z 1567.0 のピークが N 末端領域に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸を含んでいることに起因すると考察している。MS/MS ion search の場合、DHB と 6BFA で共通して検出された m/z 2044.5 を親イオンとして評価した結果、BSA と TF の両方において DHB と比較して高いスコアでの同定を 6BFA で確認している。これらの優れた 6BFA の特性をさらに高めることを志向し、FA 誘導体の構造最適化に向けた検討もさらに行っている。すなわち、ヒドロキシ基とメトキシ基の結合部位やその有無が 6BFA と異なる誘導体や、不飽和カルボン酸部分に修飾を加えた誘導体を合成し、6BFA と比較している。結果として、6BFA がもっとも優れた成績であったが、その過程で得られた知見は、今後のマトリックスの研究において有効なものと判断できる。

第 3 章では、6BFA が FA 誘導体の中で PMF 法と MS/MS ion search によるタンパク質同定に優れた能力を有する化合物であるとの判断のもと、実際のプロテオーム解析に応用している。6BFA は PMF 法と MS/MS ion search の両方において、タンパク質同定に応用可能なマトリックスであるが、特に MALDI-QIT-TOFMS のフラグメントイオンの検出数と強度が良好なため、アミノ酸配列の解析が容易であり、MS/MS ion search によるタンパク質同定に優れていた。ラット副腎のプロテオーム解析においては、ラット副腎の組織中に含まれているタンパク質の抽出、および二次元電気泳動で分離したスポットのトリプシン処理試料について、6BFA の使用で TF や 78 kDa glucose regulated protein (GRP) などの複数のタンパク質の同定に成功したが、DHB の使用では GRP の同定ができないなど、6BFA の優位性をここでも確認している。PMF 法によるプロテオーム解析においては、ハイスループット化が可能な全自動二次元電気泳動装置を利用し、ラット大脳皮質試料について、CHCA の使用では不可能だった heat shock protein 70K を同定している。これらの結果は、6BFA の高い実用性を示すものであると結論に述べられている。

以上に記載の通り、本研究では、MALDI-TOFMS と MALDI-QIT-TOFMS の両方の質量分析装置でペプチドの分子とフラグメントイオンを検出可能な FA 誘導体として 6BFA を見出しており、そのマトリックスとしての性能は、既存の CHCA および DHB と比較して、タンパク質の同定において優れていることを示している。また、一連の化合物の合成とそれらの評価から、化学構造とマトリックスの性能の間の相関を完全に明らかにしているわけではないが、それに近づくための幾つかの有用な知見を得ており、さらに優れたマトリックスを開発するための足がかりとしても意味や意義は大きい。これらのことから、本論文は、博士（薬学）を与える価値を十分に有するものと判断した。