



# ビデオーマススコープ法開発による ポスト・プロテオーム解析法の確立

(課題番号 13470479)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2))

研究成果報告書

平成15年3月



研究代表者 マス シマ ヲトシ  
升 島 努

(大学院医歯薬学総合研究科 教授)

ビデオ-マススコープ法開発による  
ポスト・プロテオーム解析法の確立

(課題番号 13470479)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金  
(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書



平成15年3月

研究代表者 升 島 努  
(広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授)

## はしがき

ヒトゲノムの解読が終わり、現在その遺伝子の発現形であるタンパク質の解析つまりプロテオームが主流となっているが、我々は、仮にその蛋白質の発現条件とその構造が分かっても、その機能は簡単には解明できないと考え、ポストプロテオーム解析の重要性を認識している。そこで、例えば、生命体である細胞が外界の変化や刺激に対してある応答を行ったとして、その様子をビデオで捉えながら、その瞬間に放出あるいは、細胞内で変化した分子を質量分析で捉えられないかと考えた。生命科学者のある意味では夢とも考えられるこの手法を、細胞内の分子変化追跡には、光ファイバーを用いた1細胞光照射ビデオ追跡法（ピンファイバービデオスコープ法を開発し、更に分子解析には、1細胞-MALDI-TOF質量分析法を確立、そして最終的に、細胞外へ放出した分子の検出・解析に有用な、ナノスプレーTOF質量分析法を用いた、ビデオマススコープ法の確立に成功した。

### 研究組織

研究代表者：升島 努（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）  
研究分担者：平川靖之（広島大学大学院医歯薬学総合研究科 講師）  
研究分担者：新垣知輝（広島大学医学部教務員）

### 交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	8,300	0	8,300
平成14年度	6,600	0	6,600
総計	14,900	0	14,900

研究発表

1) 学会誌等

(1) 升島 努

視覚による細胞動態解析と創薬

化学と教育、**543-547 (2001)** .

(2) N.Ojima, T.Shingaki, T. Yamamoto, T.Masujima

**Droplet Electro-coupling between capillary electrophoresis and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy and its application**  
**Electrophoresis, 22(6),3478-3482 (2001).**

(3) M.Shimizu, F.Levi-Scheffer, N.Ojima, T.Shingaki, T.Masujima

**A Single-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectroscopic Assay of the Cell-Maturation Process**  
**Anal. Sciences, 18, 107-108 (2002).**

(4) Y.Hirakawa, M.Suzutoh, H.Ohnishi, T.Shingaki, E.M.Eyring, M.Tokunaga,  
T.Masujima

**Analysis of the Nano-Kinetic Movement of a Single DNA by a Pin-Fiber Video Scope**

**Anal. Sciences, 18, 1293-1294 (2002).**

(5) M.Suzutoh, Y.Hirakawa, H.Ohnishi, T.Shingaki, E.M.Eyring, M.Tokunaga,  
T.Masujima

**Nano-Kinetics of Probe-Particles in Solution Visualized by a Pin-Fiber Video Scope**

**Anal. Sciences, 19, 43-47 (2003).**

(6) M.Shimizu, N.Ojima, H.Ohnishi, T.Shingaki, Y.Hirakawa, T.Masujima

**Development of the Single-Cell MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) Mass-Spectroscopic Assay**  
**Anal. Sciences, 19, 49-53 (2003).**

## 2) 口頭発表

### (1) 清水正和、新垣知輝、尾島典行、升島努

ビデオ-マイクロスコープ法はポストプロテオーム解析法となるか

第14回バイオメディカル分析化学シンポジウム、2001.7.11 (仙台市)

### (2) 清水正和、大西仁志、山本高大、新垣知輝、尾島典行、升島努

シングルセルMALDI-TOF/MS質量分析法の開発

第14回バイオメディカル分析化学シンポジウム、2001.7.11 (仙台市)

### (3) 谷幸平、Anusak Sirikatitham、山本高大、清水正和、新垣知輝、升島努

LC-MSビデオマイクロスコープ法による細胞分子動態解析

第40回日本薬学会・日本病院薬剤師会中四国支部学術大会、2001.11.18

(徳島市)

### (4) 稲垣祥子、清水正和、新垣知輝、升島努、富永明、フランチェスカ レヴィ・

シェファー (ヘブライ大学)

ビデオマイクロスコープ法による創傷治癒影響因子の解析

第40回日本薬学会・日本病院薬剤師会中四国支部学術大会、2001.11.18

(徳島市)

### (5) 升島 努

観るサイエンスービデオ分析の世界

基礎化学講習会、2001.12.2 (松江市)

### (6) 升島 努

生命科学における分析技術の最先端

広島地区科学講演会、2002.1.25 (広島市)

(7) 稲垣祥子、清水正和、新垣知輝、升島 努

長時間追跡・ビデオ分析法による創傷モデルにおける繊維芽細胞の動態解析

日本薬学会第122年会、2002.3.26 (千葉市)

(8) ガリ サラザール、平川靖之、升島努

QP/TOF-MS開発のためのイオン分子挙動シミュレーション解析

日本薬学会第122年会、2002.3.26 (千葉市)

(9) 谷幸平、アヌサク シリカティタム、清水正和、紅露崇、新垣知輝、尾島典行、  
平川靖之、升島努

LS/MSビデオマススコープ法による細胞内成分同時解析

日本薬学会第122年会、2002.3.26 (千葉市)

(10) 清水正和、大西仁志、山本高大、升島努、フランチェスカ レヴィ シェファ  
ー、新垣知輝、尾島典行、平川靖之、升島努

シングルセルMALDI-TOF/MSによる細胞内分子解析

日本薬学会第122年会、2002.3.26 (千葉市)

(11) アヌサク シリカティタム、谷幸平、清水正和、木下博敬、新垣知輝、  
尾島典行、平川靖之、升島努

長LC-MSビデオマススコープ法による細胞外放出分子動態

日本薬学会第122年会、2002.3.26 (千葉市)

(12) 升島 努

アレルギー・免疫の細胞分子メカヲ「視る」には

第31回広島大学第二外科同門会研修会、2002.6.15 (広島市)

- (13) 山本高大、アヌサク シリカティタム 紅露崇、清水正和、新垣知輝、  
平川靖之、升島努

NanoESI法を用いたビデオマススコープ法の開発

日本薬学会第123年会、2003.3.26 (長崎市)

- (14) 長谷川朝美、鈴藤正史、大西仁志、平川靖之、升島努

シングルファイバービデオマイクロスコープ法によるDNA一分子解析

日本薬学会第123年会、2003.3.26 (長崎市)

- (15) ガリ サラザール、木下博敬、紅露崇、平川靖之、升島努

Computer Simulation for Improving the Performance and Designing of an  
Ion Trap-Time-of-Flight Mass Spectrometer

日本薬学会第123年会、2003.3.26 (長崎市)

- (16) 清水正和、大西仁志、新垣知輝、平川靖之、升島努

シングルセルMALDI-TOF質量分析法の開発

フィジカルファーマフォーラム2003、2003.3.30 (長崎市)

(若手奨励賞受賞)

### 3) 出版物

升島 努、尾島典行

楽しい科学実験 II 試みから想像へ ----侵入者から命を守る-----

丸善株式会社 (津田孝雄 編) 160p、2001年

## 研究成果



# 研究成果

## 1. nanoESI-MS イオン源の作製とその評価

### 1-1 緒言

ビデオマススコープを開発するにあたり、ビデオマイクロスコープの方は、すでに教室に長い歴史があるので、今回の開発では、特に質量分析法の開発に注力した。質量分析装置はイオン化された試料を、質量分析部で測定し、試料の  $m/z$  を求める装置である。しかし、質量分析部は一般的に真空条件下となっており、ESI 法や nanoESI 法などの大気圧イオン化 (atmospheric pressure ionization, API) 法によりイオン化された試料は、イオン化された後、大気圧のイオン化室から真空条件下である質量分析部に導入される必要がある。その際、多くの質量分析装置では、電気的引力を働かせることによって、イオンのみを質量分析部に引きこんでいる。イオンの導入が電気的に行われるため、質量分析装置の電気系は慎重に扱う必要がある。今回、使用する nanoESI 法では非常に短い電極間距離で、微細な先端部に高電圧を加えることによりイオン化を行う方法であるので、放電の発生する可能性が高い。前章において、放電を起こさず、スプレーのみを起こす電圧についての検討を行ったが、それはあくまでも目に見える範囲での検討である。実際に質量分析に適用した場合、装置各部に加えられる電気信号により、ノイズを与えられるかもしれないし、イオン化自体がうまく起こらない可能性もある。本章では、QP 型の質量分析計をもつ、ESI-QP/MS (LC-MS2010 $\alpha$ , SHIMADZU) に対する nanoESI イオン源を作製し、実際に測定を行い、前章において作製した各ニードルの検討、電圧の設定、スプレー流速、感度などの検討を行った。

### 1-2 QP 型質量分析計について

QP 型質量分析計は、QP マスフィルターを利用する装置である。図 1-1 に ESI-QP 型質量分析装置の概略図を示す。

4 本の円柱電極を平行に並べ、直流電圧 ( $U$ ) と交流電圧 ( $V_0 \cos \omega t$ ) を同時にかける。この場合、対向する短絡された一対の電極間に同じ電圧 ( $U + V_0 \cos \omega t$ ) をかけ、他の対には正負が逆の電圧 [ $-(U + V_0 \cos \omega t)$ ] をかける。この場合、 $U < V_0$  なので、隣り合う電極の電位は交流の周波数により正負が逆転する。このためにイオンは QP の端から長軸方向に電極の間を振動しながら通過する。特定の条件 (通常、数 kV の直流、交流の電圧と MHz 程度の周波数が用いられる) では、特定の  $m/z$  をもつイオンだけが安定な軌道を取り、通過できるが、他のイオンの軌道は不安定で、振幅が大きくなり、やがては電極に衝突するか、電極の間から飛び出していく。このようにして QP はマスフィルターとして働く。QP にかける電圧を変化させ、スキャンすることでマススペクトルを得る。

QP 型質量分析計は、マススペクトルを得るには、電圧をスキャンする必要があるが、そのために感度が低い、測定範囲が狭い ( $m/z$  が数千以下)、さらに分解能が低い (およそ 1 質量単位程度) という欠点をもつ。しかし、QP 型質量分析計は比較的小型であり、さらに、それほど高真

空を必要としないという特徴から、ESI 法や nanoESI 法などの API 法と組み合わせて用いることが容易である。また、1 質量単位程度の幅で特定のイオンを容易に、かつ効率良く選択でき、定量性が良く、測定感度のダイナミックレンジが広いという大きなメリットも持つ。

また、QP 型質量分析計は既知の物質を測定する際には電圧を固定することで選択イオンモニタリング (SIM) モードと呼ばれる高感度分析が行うこともできる。それとは逆に、電圧をスキャンすることで未知の物質の  $m/z$  を測定することのできるモードを Scan モードと呼ぶ。今回使用した島津製作所製 LC-MS2010 $\alpha$ では SIM モード、Scan モードを同時に行うことも可能である。

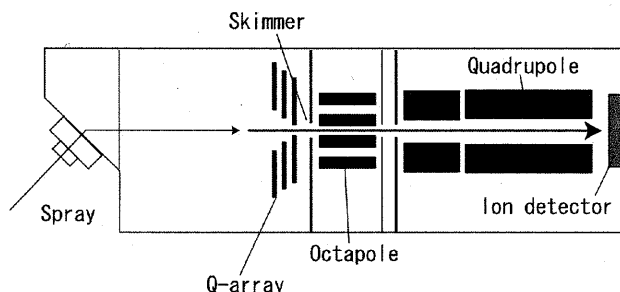


図 1-1 ESI-QP 型質量分析装置の概略図

### 1-3 nanoESI-QP/MS イオン源の作製

実際に nanoESI 法を用いて質量分析を行うにあたって、質量分析装置として、ESI-QP/MS を用いた。LC-MS2010 $\alpha$ は nanoESI イオン源が存在しないので、LC-MS2010 $\alpha$ 用 nanoESI イオン源を作製した。

#### 1-3-1 nanoESI-QP/MS イオン源の作製

作製にあたって、イオン源の構造、ニードルとイオン導入口の距離、ニードルの向きなど、様々な点を検討した。実際に測定を行いながらイオン源に改良を加えていったが、その際、ニードルはポリマーニードルを用いた。ポリマーニードルはガラスニードルに比べて操作が非常に行いやすいため、細かい操作においてもニードルを壊すことなく実験を行うことができた。

作製した nanoESI イオン源の全体図を図 1-2 に示す。LC-MS2010 $\alpha$ は、質量分析装置のイオン化室にイオン源が接続されていること及びイオン源が質量分析装置の電源プラグへ接続されていることをモニターしており、接続されていない状態では装置が停止するようなインターロック機構を有する。そこで、既製の ESI イオン源を元に、質量分析装置との接続を考えて作製した。また、質量分析装置にカメラを固定し、図 1-3 に示すように、イオン化室内部をカメラで映せるようにした。あらかじめモニターに距離を書きこむことで、イオン導入部とニードル先端のおおまかな距離を確認できるようにした。質量分析装置と nanoESI イオン源を接続した後でも、ニードルの位置の微調整が行えるように、イオン源の調整用ネジにはマイクロメーターを採用した。

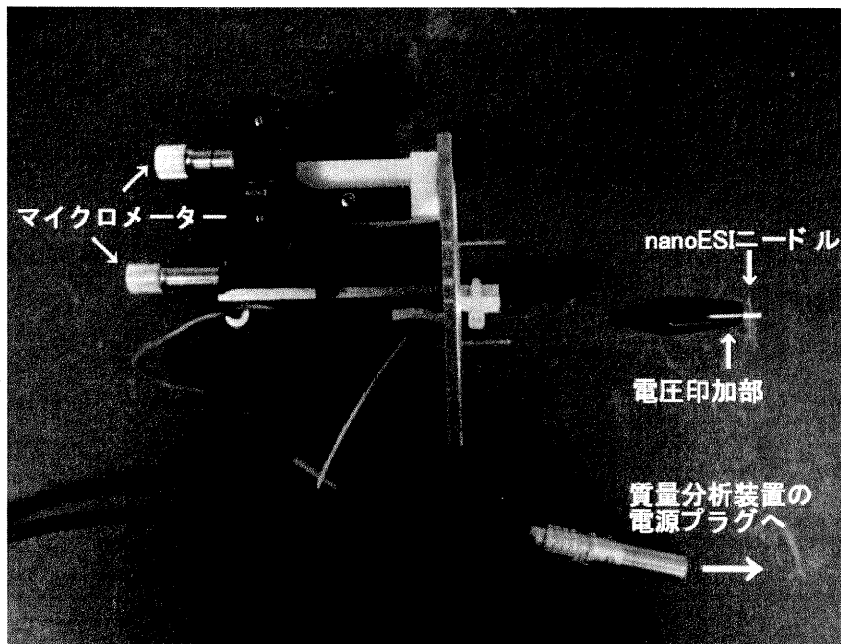


図 1-2 LC-MS2010αに対する nanoESI イオン源

マイクロメーターによりニードル位置の微調整を行うことが可能。

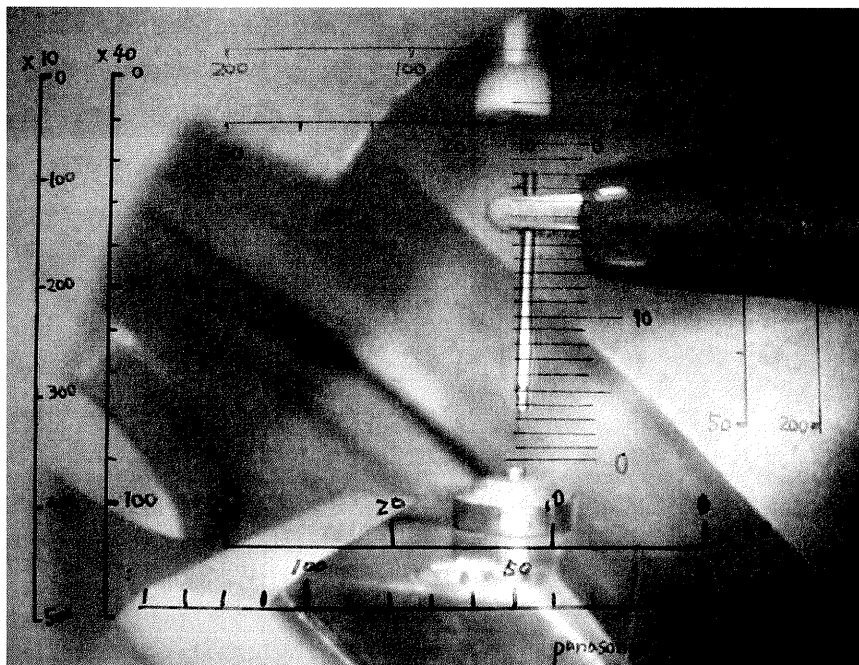


図 1-3 モニターに映したイオン化室

質量分析装置にカメラを固定し、イオン化室内部を映し出せるようにした。

### 1-3-2 ポリマーニードルによる nanoESI-QP/MS

nanoESI イオン源の作製により、ポリマーニードルを用いた nanoESI-QP/MS の測定を行うことができるようになった。試料には histamin dihydrochloride (FW = 184.07、シグマアルドリッチジャパン株式会社; A6261) を用い、超純水と methanol、acetic acid の混合水溶液 (49.5 : 49.5 : 1, v : v : v) に 100 ng/ $\mu$ L になるように溶かした。その水溶液をポリマーニードルに導入し、nanoESI-QP/MS で測定を行った。その際、ニードル先端とイオン導入口の距離は約 6 mm とし、4.1 kV の電圧を印加した。測定は SIM と Scan の両モードを同時に行った。SIM モードでは、histamine 由来のピークである  $m/z=112.00$ 、 $95.00$ 、 $130.00$  を測定した。

### 1-3-3 結果と考察

ポリマーニードルによる nanoESI-QP/MS の測定を行った結果、そのマスクロマトグラムは非常に不安定であった。そのマスクロマトグラムを図 1-4 に示す。これを見ると、時間によってイオン強度が大きく変化していることがわかる。クロマトグラムでのイオン強度の変化は、イオンの供給が一定でないことを意味し、即ちスプレーが安定でないことを意味する。スプレーが不安定である理由として、ポリマーニードルの先端口が滑らかでないことが考えられる。ポリマーニードルは作製方法上、最後にチップ先端を切り取ることで先端エッジを形成するために、先端口にエッジが残ってしまう。ポリマーニードルの先端口の写真を図 2-5 に示す。写真より、先端口の内側のエッジが滑らかではないことがわかる。また、ポリマーニードルは先端のみが細くなった形状を取るため、少量の試料を導入することが難しく、最低でも 10  $\mu$ L が必要であった。これではいくらゆっくりとスプレーを行うことができて、試料の消費量は多くなってしまい、極微量の試料で分析のできる nanoESI 法のメリットが半減してしまう。

次に、マスクロマトグラムに示す各グラフのイオン強度を比較してみた。その結果、Scan モードで測定されたイオンのイオン強度の和（黒で示される）と、SIM モードで測定されたイオンのイオン強度の和（灰で示される）に大きな差が見られることがわかった。これは、histamine 以外に由来するイオンが多く検出されていることを示す。つまり、溶媒イオンのピークが多く出ていること、ノイズが多く出ていることが考えられる。

以上より、ポリマーニードルにより nanoESI 法を行うには、ニードル全体を細くする、先端径をよりきれいに微細にするなど、ニードルの作製法に更なる改良が必要であることがわかった。

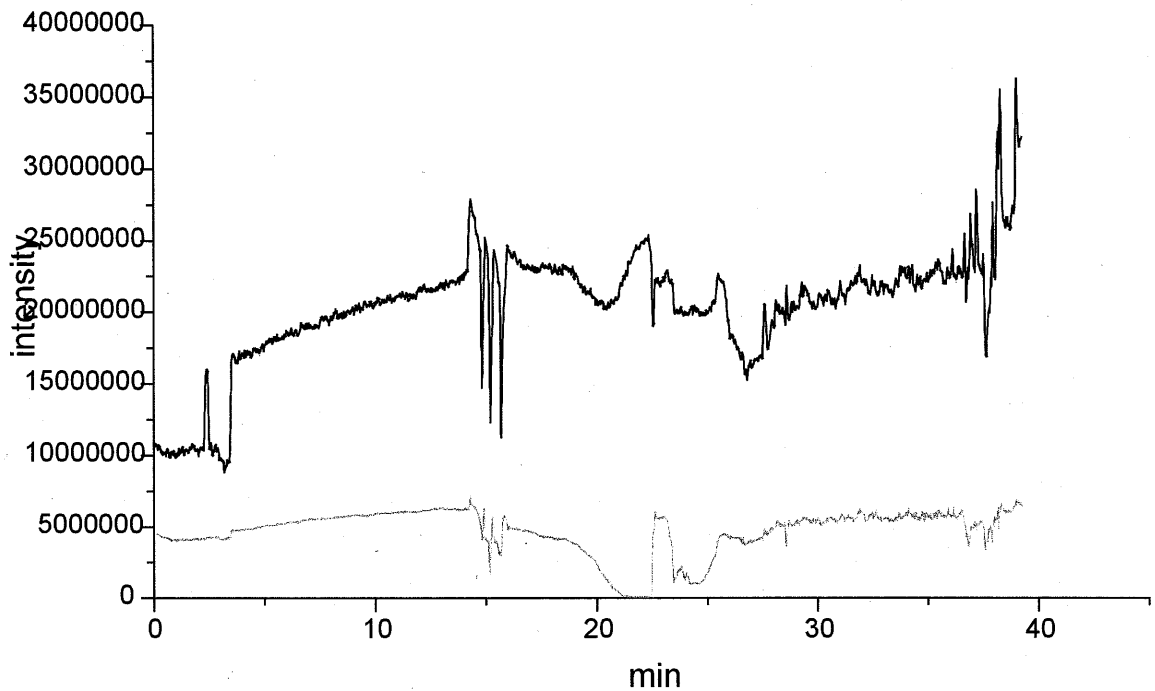


図 1-4 ポリマーニードルを用いた nanoESI-QP/MS のマスククロマトグラム

試料には 100 ng/μL histamin dihydrochloride (超純水 : methanol : acetic acid = 49.5 : 49.5 : 1) を用いた。横軸は時間 (min)、縦軸はシグナル強度を示す。グラフは、Scan モードで測定されたイオンのイオン強度の和 (黒)、SIM モードで測定されたイオンのイオン強度の和 (灰) を示す。

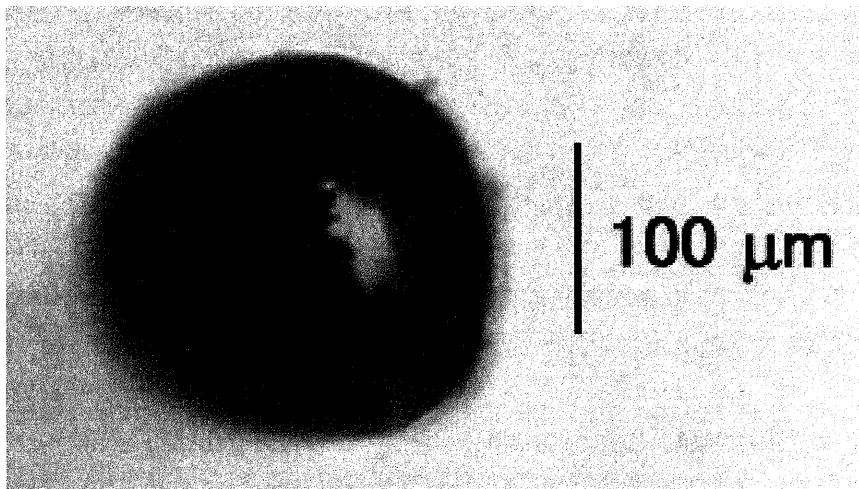


図 1-5 ポリマーニードル先端の顕微鏡像

ポリマーニードルの先端の穴を上から実体顕微鏡でとらえた像。先端口の内側が非常に汚く、形も歪であることがわかる。

## 1-4 ガラスニードルによる nanoESI-QP/MS

nanoESI 法の利点として、微量の物質を長時間にわたってゆっくりと効率良くスプレーし続けることができる点が挙げられる。しかし、安定にスプレーを行うことができなければ、同じ濃度の試料でも測定を開始して終了するまでにイオン強度が大きく変化してしまい、正確な分析は難しい。

実際に、ポリマーニードルを用いて作製した nanoESI イオン源は、操作しやすいものとなったが、先端径が大きいため、スプレーが安定しないと言う欠点が見られた。そこで、ポリマーニードルに比べて、微細な先端径を持つガラスニードルを用いて測定を行い、その評価を行った。

### 1-4-1 実験

ポリマーニードルの場合と同じく、試料には histamin dihydrochloride (FW = 184.07、シグマアルドリッチジャパン株式会社 ; A6261) を用い、超純水と methanol、acetic acid の混合水溶液 (49.5 : 49.5 : 1, v : v : v) に 100 ng/μL になるように溶かしたものをを用いた。先端外径 26.9 μm のニードルを用い、ニードル先端とイオン導入口の距離は約 4 mm とし、2.0 kV の電圧を印加した。また、前章ではスプレーを確認することのできなかった、先端外径 20 μm 以下の微細なニードルについても測定を行った。その際の試料には既述した、histamine を溶媒に溶かしたものと、その溶媒 (超純水 : methanol : acetic acid = 49.5 : 49.5 : 1) のみの二種類を用いた。測定は SIM と Scan の両モードを同時に行った。SIM モードでは、histamine 由来のピークである  $m/z=112.00$ 、 $95.00$ 、 $130.00$  を測定した。

### 1-4-2 結果と考察

実験の結果得られたマスクロマトグラムを図 1-6 に示す。これを見ると、ポリマーニードルの場合に比べて、格段に安定したスプレーを行えていることがわかる。ポリマーニードルによる nanoESI-QP/MS のマスクロマトグラム (図 1-4) と、ガラスニードルによる nanoESI-QP/MS のマスクロマトグラムの比較を行うと、ガラスニードルによるマスクロマトグラムでは、Scan モード測定されたイオンのイオン強度の和 (黒で示される) と SIM モードで測定されたイオンのイオン強度の和 (灰で示される) の差が、ポリマーニードルのものに比べて小さいことがわかる。これは、histamine 以外の分子に由来するイオンがあまり検出されていないことを意味する。よって、ガラスニードルによる nanoESI はポリマーニードルによるものに比べて、イオン化効率がよいことがわかる。

ガラスニードルは既述したように、ポリマーニードルに比べて、形状も滑らかで、かつ先端径も小さい。これにより、ガラスニードルはポリマーニードルに比べて、低い電圧で、ゆっくりとしたスプレーを行うことが可能となっている。スプレーを行うのに必要な電圧が低いことから、ノイズの生じる可能性はポリマーニードルに比べて低いと考えられる。また、スプレーをゆっくりと行うことができ、その際の液滴はポリマーニードルによるものに比べて小さくなっていると考えられるので、histamine 溶液を効率よくスプレーすることができ、効率良くイオン化が行われていると考えられる。

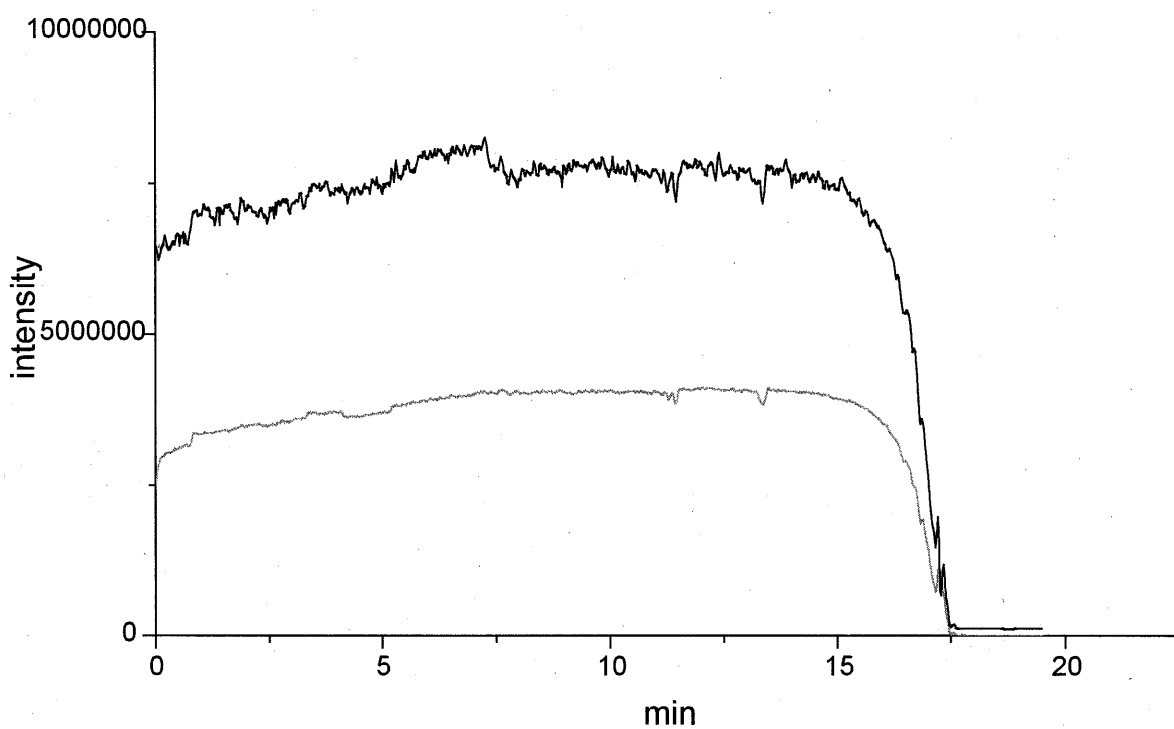


図 1-6 ガラスニードルを用いた nanoESI-QP/MS のマスクロマトグラム

試料には 100 ng/ $\mu$ L histamin dihydrochloride (超純水 : methanol : acetic acid = 49.5 : 49.5 : 1) 50  $\mu$ L を用いた。横軸は時間 (min)、縦軸はシグナル強度を示す。グラフは、Scan モードで測定されたイオンのイオン強度の和 (黒)、SIM モードで測定されたイオンのイオン強度の和 (灰) を示す。

## 1-5 nanoESI-QP/MS によるスプレーの評価

目的に応じたニードル径、また、それに対するスプレー電圧を簡単に設定できることは今後 nanoESI 法による質量分析を行っていく上で、とても重要である。また、実験条件を一定に近づけることで、実験における再現性も増大する。ガラスニードルを用いることで、nanoESI 法によるイオン化を安定して行うことが可能となり、QP/MS と接続することによって、前章では確認できなかった先端外径 20  $\mu\text{m}$  以下の微細なニードルでのスプレーの確認も可能となった。そこで、先端外径 20  $\mu\text{m}$  以下の部分も含めて、実際に nanoESI-QP/MS を用いて評価実験を行った。

### 1-5-1 実験

試料として、試料には histamin dihydrochloride (FW = 184.07、シグマアルドリッチジャパン株式会社 ; A6261) を用い、超純水と methanol、acetic acid の混合水溶液 (49.5 : 49.5 : 1、v : v : v) に 100 ng/ $\mu\text{L}$  になるように溶かした。その水溶液 1  $\mu\text{L}$  を用いて、nanoESI-QP/MS の測定を行った。ニードルの各先端外径ごとに、スプレー開始電圧を測定した。また、試料が入っていないニードルに対して、同じ条件で電圧を印加し、マススペクトルに変化が生じるか調べた。その際、ニードルは先端外径 2  $\mu\text{m}$  のものを使用し、2~11 mm の間で距離を変化させて、電圧を印加、マススペクトルの観察を行った。同時に、距離と電圧の関係も測定した。実験は SIM と Scan の両モードを同時に行った。SIM モードでは、histamine 由来のピークである  $m/z=112.00$ 、95.00、130.00 を測定した。

### 1-5-2 結果と考察

スプレーを行うため、印加電圧を少しずつ上昇させて、マススペクトルを測定したが、その際、三通りのスペクトルが見られた。一つ目は電圧の低い時、スプレーが起こっていないときである。そこから、徐々に電圧をあげていくと、ごくわずかに histamine 由来のピークが出現する。その際のスプレーは非常に不安定で、このスペクトルが二つ目のパターンで、これが見られ始める電圧を 1st voltage と呼ぶことにした。さらに、電圧をあげていくと、安定したスプレーが見られ、ピークも強くなり、これまで認識していた通常のスプレーが見られる。これが第三のスペクトルで、これが見られ始める電圧を 2nd voltage と呼ぶことにした。

結果をまとめ、1st voltage、2nd voltage とニードル先端外径の関係をグラフにしたものを図 1-7 に示す。図を見ると、先端外径が小さくなれば、1st voltage、2nd voltage 共に低くなるのがわかる。先端外径 20  $\mu\text{m}$  以上の結果については、前章にて述べた実験の結果とよく一致した。先端外径 20  $\mu\text{m}$  以下については、先端外径 5  $\mu\text{m}$  では、先端外径 20  $\mu\text{m}$  以上のものと同じような関係が得られた。先端外径が 5  $\mu\text{m}$  より小さくなると、1st voltage、2nd voltage 共に、急激に小さくなる。また、小さくなればなるほど、1st voltage が明確でなくなり、2nd voltage のみしか確認できなくなった。1st voltage においては、SIM モードでかろうじてピークを検出できるような場合が多く、ほとんどスプレーが起こっていないこともわかった。おそらく、完全な形ではないが、少しだけスプレーが起こっている電圧ではないかと思われる。さらに電圧をあげることで 2nd voltage に達し、完全なスプレーが起こるので、安定してピークを検出できると考えた。

続いて、ニードルに試料を導入せずに電圧を印加して、その際マススペクトルの観察を行っ



た。その結果、各距離ごとに、一定の電圧で複数のピークが出現した。その際のマススペクトルを図 1-8 に示す。この時、検出することができたピークは nanoESI-QP/MS で常に検出されるもので、当初、溶媒由来のピークと考えていたが、今回の実験により、空気に由来するピークの可能性が出てきた。各距離と、その距離でのピークが出現する電圧の関係をグラフにしたものを図 1-9 に示す。スプレーにおける電圧と同じく、距離が小さければピークは低い電圧で出現し、距離が大きければピークは高い電圧で出現する。また、ピークが出現する電圧は、スプレーを開始するのに必要な電圧よりも高いことがわかった。つまり、スプレーが起こりにくい場合、電圧を上げすぎると、バックグラウンドのピークが増大してしまう恐れがある。

以上の結果から、nanoESI では、電圧のコントロールがマススペクトルに大きな影響を与えることがわかった。電圧が低すぎれば、スプレーは不安定で、感度も悪い。しかし、逆に電圧が高すぎると空気由来と思われるピークが増えてしまう。よって、nanoESI を行う際は、実験で明らかとなった 2nd voltage 付近に電圧を設定してスプレーを行うのが一番良いと考えられる。その際用いるニードルは、1st voltage と 2nd voltage の差が小さく、低い電圧でスプレーを行うことができる、先端外径 2  $\mu\text{m}$  程度のニードルを用いるのが最適であると思われる。また、先端外径 2  $\mu\text{m}$  程度になると、ほとんど個体差なしに、安定して同じ径のニードルを作ることができることから、この条件は望ましいと思われる。よって、以降の実験では、特に記載がない限り、先端外径 2  $\mu\text{m}$  のニードルを用いた。

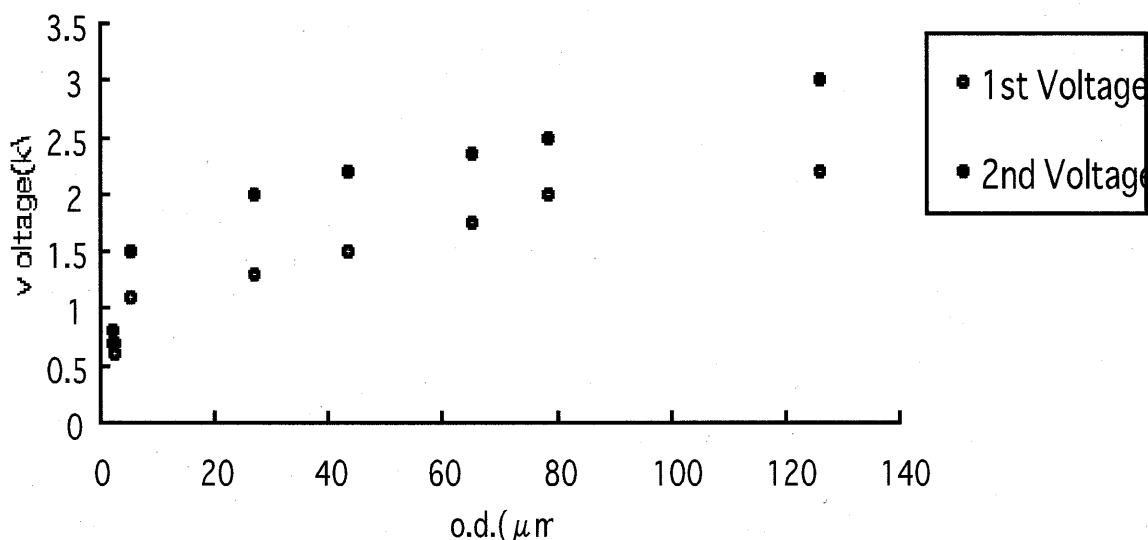


図 1-7 ニードル先端外径とスプレー開始電圧の関係

縦軸は各電圧、横軸はニードルの先端外径。1st voltage はわずかにピークを確認できた電圧、2nd voltage は完全にスプレーが起きたと確認できた電圧を示す。

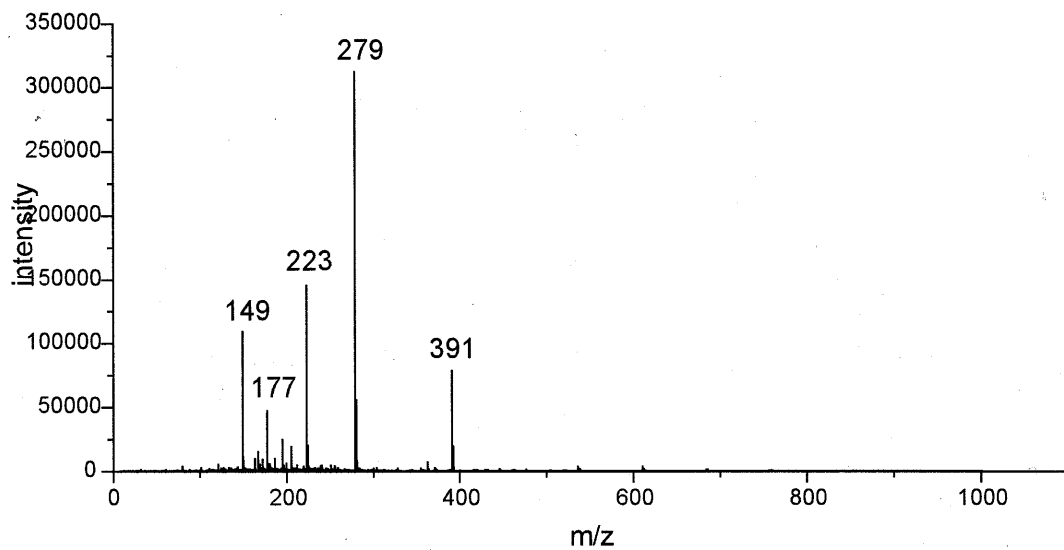


図 1-8 試料導入していないニードルによる nanoESI-QP/MS のマススペクトル  
縦軸はシグナル強度、横軸は  $m/z$  を示す。一定電圧以上で複数のピークが検出される。

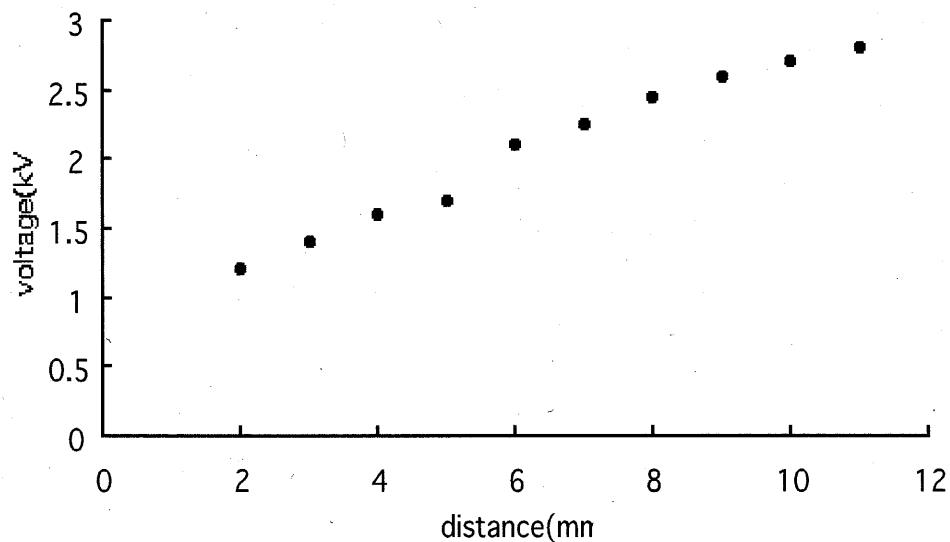


図 1-9 電圧を印加する距離と空気由来のピークが出現する電圧の関係  
先端外径  $2 \mu\text{m}$  のニードルを用いて実験を行った。横軸は電圧印加距離、縦軸はピークが出現する最小の電圧。距離が大きくなればピークが出現し始める電圧も大きくなる。

## 1-6 nanoESI- MS の評価

これまでの実験で、nanoESI イオン源、ニードルを自作し、電圧、距離、ニードル先端外径、ニードルの素材などの最適条件を明らかにし、安定した nanoESI を行うことができるようになった。次に、この nanoESI を用いて質量分析測定を行い、スプレー速度、感度などについて詳細に調べた。

### 1-6-1 実験

試料として bradykinin (MW = 1059.56、株式会社ペプチド研究所;450428) を超純水、acetonitrile、acetic acid の混合水溶液 (49.5 : 49.5 : 1、v : v : v) に溶かしたものをを用いた。10~0.1 ng/ $\mu$ L の bradykinin を nanoESI-QP/MS にて測定し、検出感度の検討を行った。また、導入する試料溶液の量は 1  $\mu$ L とし、スプレーの持続する時間から、スプレーの流速を求めた。測定は SIM と Scan の両モードを同時に行った。SIM モードでは、bradykinin 由来のピークである  $m/z=531.00$  を測定した。

### 1-6-2 結果と考察

nanoESI-QP/MS で測定を行った結果、0.1 ng/ $\mu$ L という希薄な濃度の bradykinin を 20min の間、測定することができた。その際のマスクロマトグラムを図 1-10 に示す。この結果から流速を求めると、約 50 nL/min の流速でスプレーを行っていることがわかる。つまり、bradykinin のスプレーされる流速は、5 pg/min となる。また、この実験で得られたマススペクトルと、溶媒のみを測定した場合のマススペクトルを図 1-11 に示す。どちらのマススペクトルも、1 回の scan のみで得られたものである。これはつまり、図 1-10 のマスクロマトに示される 20 min の間、どの時点においても、図 1-11 のようなマススペクトルが得られたということである。この結果を見ると、溶媒のみでは検出できない、bradykinin の二価イオンのピークである  $m/z=531$  がはっきりと検出されていることがわかる。scan は 0.025 min ごとに行われるので、図 1-11 に示されるマススペクトルは、125 fg、つまり、約 125 amol の bradykinin から得たものであることがわかる。ここで、ESI 法で同じ量の試料を測定した場合を考える。シリンジポンプを使用した場合、流速は 5  $\mu$ L/min、つまり、nanoESI 法に比べて、100 倍の速度でスプレーが行われる。よって、ESI 法では同様の測定に約 12.5 fmol の bradykinin が必要であるということがわかる。以上のように、今回作製した nanoESI 法は ESI 法に比べ、100 分の 1 の量の試料を感度良く測定することが可能であることがわかった。よって、nanoESI 法を用いることで、ESI 法では測定することができなかった微量の試料を、十分な時間、安定して測定することが可能となる。

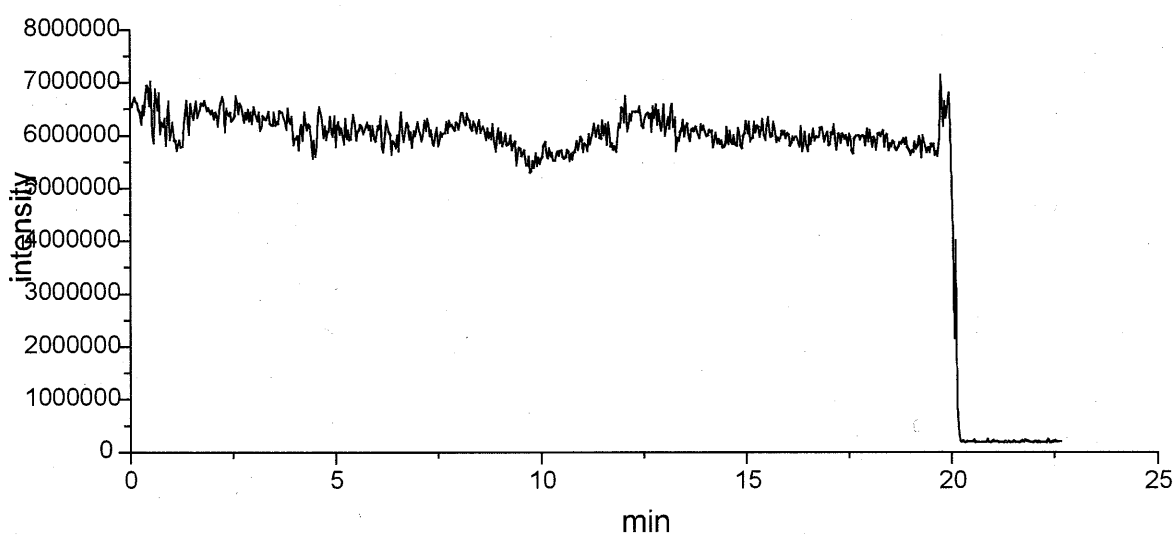


図 1-10 bradykinin のマスクロマトグラム

1  $\mu\text{L}$  の 0.1 ng/ $\mu\text{L}$  bradykinin (超純水 : acetonitrile : acetic acid = 49.5 : 49.5 : 1) から得られたマスクロマトグラム。20 min の間、安定したスプレーを行うことができているのがわかる。

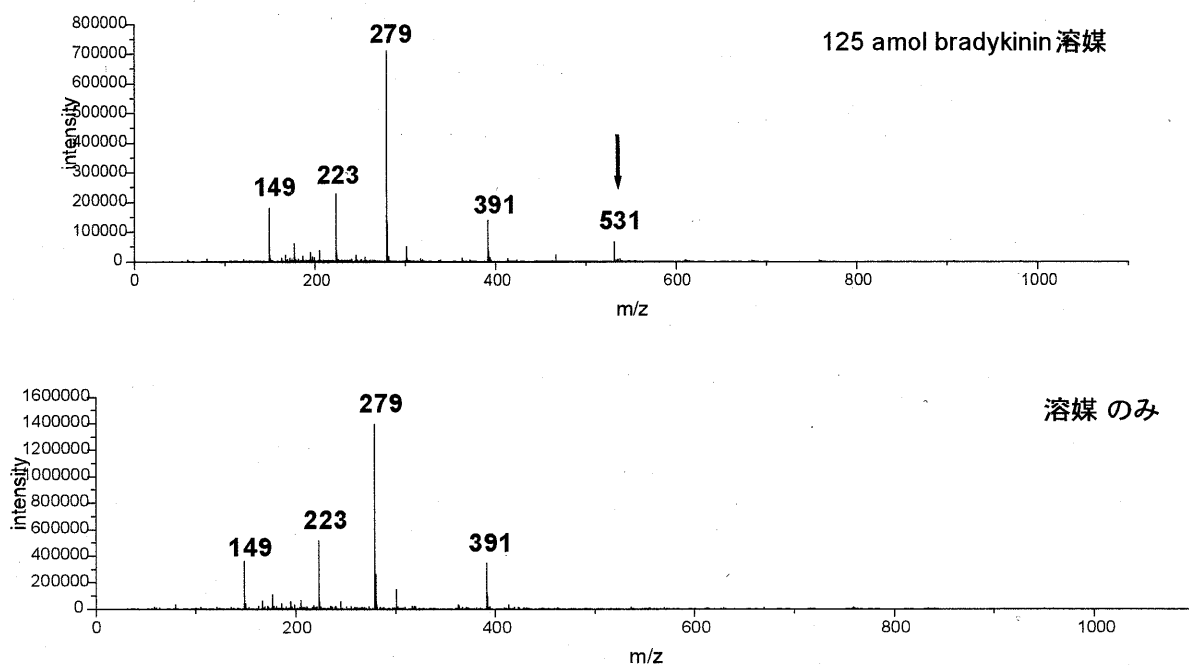


図 1-11 bradykinin のマススペクトル

上が 0.1 ng/ $\mu\text{L}$  bradykinin (超純水 : acetonitrile : acetic acid = 49.5 : 49.5 : 1) のマススペクトル。下が溶媒のみのマススペクトル。どちらも、積算は行っておらず、1 回の scan によるものである。上のスペクトルでのみ、 $m/z=531$  のピークが検出されていることが確認できる。

## 1-7 小括

本章では、nanoESI- MS の作製を行うべく、nanoESI イオン源の作製と作製した nanoESI-QP/MS に関する様々な検討を行った。

イオン源の作製にあたっては、前章において作製したポリマーニードルにて検討を行った。ポリマーニードルはガラスニードルにくらべ丈夫であり、金コーティングも不要であることから、製品など量産品に向けた優れたニードルであることがわかった。しかし、現状の製法では、先端口が滑らかでないため、スプレー性能はガラスニードルに劣ると考えられる。そのため、今後改良を加えることで優れた nanoESI ニードルになると評価した。

続いて、安定するイオン化を目指し、ポリマーニードルとガラスニードルの比較、検討を行った。その結果、ガラスニードルの方が安定してイオンを供給することができることがわかった。また、電圧とニードルの先端外径との関係を調べる過程で、電圧によってごくわずかなスプレーを起こす場合と、安定したスプレーを起こす場合があることがわかった。この実験より、先端外径 2  $\mu\text{m}$  のものが、最も安定したスプレーを行いやすく、必要とする電圧も低い。さらに、作製上、先端外径 2  $\mu\text{m}$  のものは個体差がほとんどなく安定して作製可能であった。これらの点から先端外径 2  $\mu\text{m}$  のものが最も nanoESI /MS に適しているという結論を得た。

また、125 amol という微量で bradykinin のピークをはっきりと検出することができ、その際、スプレーは 50 nL/min という非常にゆっくりとした速度で、しかも安定して行うことができた。このように、ゆっくりとした速度でスプレーを行いつつ、高感度の測定が可能なので、少ない試料量でも十分に測定を行うことが可能である。よって、nanoESI 法を用いることで、ESI 法では測定を行うことのできない、微量の試料でも感度良く測定を行うことが可能である。

## 2. インソースフラグメンテーションによるペプチド構造解析への応用

### 2-1 緒言

質量分析法は素早く、簡便に、極微量の物質の質量電荷比を求めることのできる、優れた分析法である。この利点を生かし、生体中に存在する物質の同定に幅広く用いられている。しかし、質量電荷比を求めることができても、求めた質量電荷比が示す物質が一つとは限らない。そういう場合の解析法として、フラグメンテーションを用いた解析法がある。質量分析を行う際、何らかの形で、イオン化に必要とするエネルギー以上のエネルギーを加えることにより、フラグメンテーションを引き起こす。フラグメンテーションを引き起こすと、物質は不安定な部分から壊れていく。その壊れる結合は物質により固有であるので、物質を同定する際の一つの指標となる。

ヒトゲノム計画の完了が発表された現在、研究は次なるステージ、プロテオームへと発展している。しかし、ゲノムによる遺伝子情報が解明された現在においても、その遺伝子より発現されるタンパク質の構造を解明することは容易でない。その現在において、タンパク質の構造解析を素早く行うことはひとつの重要な技術である。そこで、ペプチドに対してフラグメンテーションを誘発させることにより、その一次構造解析を試みた。ペプチド構造解析を行うために、まず、ペプチド結合を構成する最小単位であるジペプチドの解析を行い、その後、ペプチドの構造解析を行った。さらに、その解析に対して、nanoESI 法を適用することで、極微量におけるペプチド構造解析を試みた。

### 2-2 原理

#### ・ In-source fragmentation (インソースフラグメンテーション) について

ESI によるイオン化は非常にソフトなイオン化法で、通常、MALDI 法におけるポストソース分解 (PSD) のような現象は見られない。そこで、ESI などにおいてフラグメンテーションを誘発する技術として、インソースフラグメンテーションが存在する。インソースフラグメンテーションとは PSD に対して使用される言葉で、イオン化と同時にイオン化室内で行われるフラグメンテーションのことを示す。

ESI においてインソースフラグメンテーションを誘発させるには、イオン化室直後のイオンガイドの電圧を上昇させることによって行われる。イオンガイドの電圧を上昇させることで、イオン化途中、つまりはスプレーされて水滴状態にある試料は中心に向かって力を受ける。その結果、分子同士の衝突が起こりやすくなり、衝突を起こした試料の弱い結合は切断される。その後、結合の切断を受けた分子がイオン化される。その結果、元の分子より切断を受けた部分を除いた分子のピークが検出されることになる。

PSD や、通常の MS/MS と異なる点として、イオン化を受ける前に、結合が切断される点である。PSD や、MS/MS では、イオン化の完了している試料に対して、エネルギーを与えて、フラグメントを起こすため、現実には取り得ない構造を取ったイオンが作られる。しかし、インソースフラグメンテーションにおいては、イオン化が完了する前に、フラグメントが起こるので、結合が切断され、比較的安定な形を取った後にイオン化を受ける。

今回使用した、API-TOF/MS、Mariner™ (PerSeptive Biosystems) においては、Nozzle Potential と呼ばれるイオン導入直後の部分の電圧を上昇させることにより、インソースフラグメンテーションを誘発することができる。

・ESI-TOF 型質量分析計について

TOF 型質量分析計は、試料イオンを特定の長さのフライトチューブの中を飛ぶのに要する時間により分離する装置である。そこでのイオン速度  $v$  は、エネルギー保存の法則より、次式で求められる。

$$zeV_0 = \frac{1}{2}muv^2$$
$$\therefore v = \sqrt{2V_0 \left(\frac{e}{u}\right) \left(\frac{z}{m}\right)}$$

$z$ : イオンの電荷数、 $e$ : 素電荷、 $m$ : イオンの質量数

$u$ : 原子量単位、 $V_0$ : 電位差、 $v$ : 加速終了後のイオン速度

一定の長さ  $L$  のフライトチューブの中を速度  $v$  で飛行する試料イオンの飛行時間  $t$  は  $L/v$  であり、物質の質量電荷比  $m/z$  により飛行時間  $t$  が異なる。ここで、電位差  $V_0$  とフライトチューブの長さ  $L$  は一定であるため、飛行時間  $t$  を測定することによってイオンの質量分析が行われる。

$$t = \frac{L}{v} = L \sqrt{\frac{m}{2zeV_0}}$$
$$m/z = \frac{2eV_0 t^2}{L^2}$$

すべての試料イオンに一定の運動エネルギーを与えると、飛行速度は質量電荷比  $m/z$  の平方根に反比例する。つまり、軽いものほど速く飛ぶ。したがって、いっせいにすべてのイオンをスタートさせると、検出器には質量の小さいイオンから順番に到着するので、飛行時間を測定することで逆に質量電荷比を求めることができる。この場合の飛行時間は、分子量数百万程度でもミリ秒のオーダーなので、原理的には長く待つだけで、いくらでも大きい質量のイオンを測定できることになる。

ESI-TOF 型質量分析計では、ESI 法によってイオン化された試料を、まず、quadrupole によって収束する。その後、skimmer などを用いてさらなる収束を行う。収束の結果、イオン団は非常に小さい球状の形をとる。最後に、deflector によって上下方向に電圧を加えることでイオン団は球状から、平面の形に変わり、フライトチューブ内部に入る。その後、加速電圧を加えることでイオン団は検出器に向かって、一斉にフライトチューブの中を飛行し始める。最終的に、イオン化の方向と垂直方向に飛行を開始するため、TOF における飛行開始位置を常に一定にすることが可能である。このため、MALDI-TOF に比べて、ESI-TOF は正確な  $m/z$  を求めることが可能である。

飛行時間型質量分析計には、リニア型とリフレクター型がある。しかし、今回使用した、Mariner™ (PerSeptive Biosystems) はリフレクター型のみに固定されている。リフレクタ

一型では、一度飛行させたイオンをリフレクトロン電極により、イオン源方向に引き戻す。このイオン反射電界を付加することにより、イオン飛行開始時の初期エネルギーのバラツキが解消される。結果、リニア型よりも分解能は高くなる。

#### ・多価イオンピークについて

今回使用した TOF 型は非常に高い分解能を持っている。その結果、同位体による  $m/z$  のずれも完全に検出することが可能である。これを利用することで、あるピークがどの程度の価数を持っているかを、簡単に判別することが可能である。具体的な例を挙げると、一価のイオンの場合、同位体によるピークは  $m/z$  で 1 の開きをもって現れる。しかし、二価のイオンの場合、 $m/z$  としての開きは 0.5 となる。三価の場合は、0.3 となる。(図 2-1) TOF 型を用いれば、これらの同位体ピークをはっきりと確認できることで、その値の差をとってやるだけで、簡単に価数を求めることが可能である。

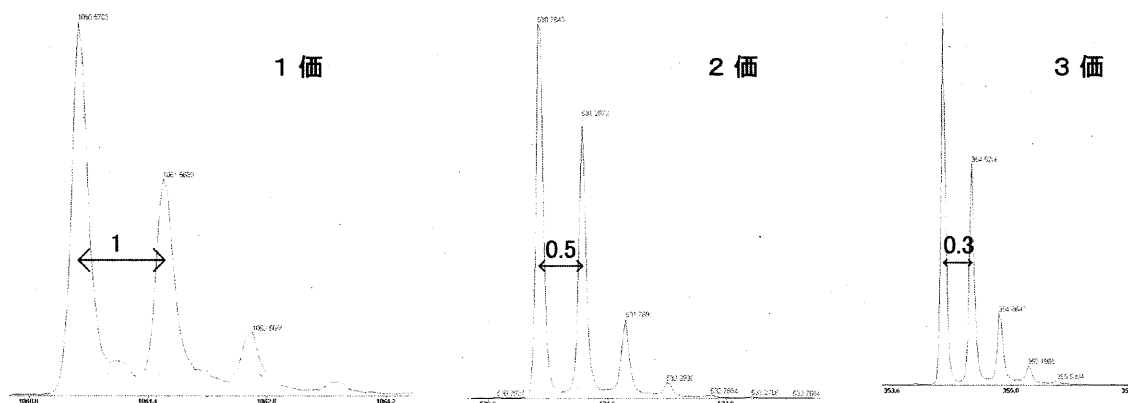


図 2-1 多価イオンピークの見分け方

TOF 型は分解能が非常に高いため、同位体によるピークの差もはっきりと確認することができる。このことを利用して、それらのピークが何価のピークなのかを判断できる。

### 2-3 ジペプチドのフラグメンテーション解析

ジペプチドはペプチド結合を構成する最小の単位であり、その解析を行うことはペプチド結合の切断、つまりはペプチドの構造解析を行うことにあたって重要であると考えた。そこで、ペプチドの構造解析を行うにあたって、まず、ESI 法を用いてジペプチドに対してインソースフラグメンテーションを行えるかどうかの確認を行った。また、それらのフラグメントについての解析を行った。

#### 2-3-1 実験

ジペプチド、Asp-Phe、Leu-Phe、Gly-Leu をそれぞれ 10 $\mu$ g/mL になるように、50% acetonitrile、1% acetic acid 溶液に溶かした。それらのサンプルをそれぞれ ESI-TOF/MS にて測定した。親イオンピークを確認後、Nozzle Potential の設定を変更、試料にエネルギー



を加え、フラグメンテーションを起こし、フラグメントイオンピークを測定した。

### 2-3-2、結果と考察

図 2-2a, b に、Asp-Phe を測定した際の、マススペクトルを示す。図 2-2a が Nozzle Potential 100 V と Nozzle Potential 150 V の場合のマススペクトル、図 2-2b が Nozzle Potential 200 V と Nozzle Potential 250 V の場合のマススペクトルである。Nozzle Potential 100 V では、 $m/z = 281.13$  の Asp-Phe のピークのみしか確認できなかった。そこで、Nozzle Potential を 150 V まで上昇させると、わずかではあるが、Phe のピーク、 $m/z = 166.10$  を確認できた。さらに、Nozzle Potential を 200 V まで上昇させることで、Phe のピークをはっきりと確認することができた。しかし、Asp のピークは 134.0 に検出されるはずだが、まったく確認できなかった。そこで、Nozzle Potential をさらに上昇させて、250 V としたが、Asp のピークを確認することはできなかった。

同じように、Leu-Phe、Gly-Leu についても実験を行った。Leu-Phe については図 2-3 に、Gly-Leu については図 3-4 に、そのマススペクトルを示す。まず、Leu-Phe についてだが、Asp-Phe の場合と同様に、Nozzle Potential 100 V では図 2-3 の上部に示すように、 $m/z = 279.19$  のピークのみしか確認できなかった。そこで、Nozzle Potential を 200 V まで上昇させると、図 2-3 の下部に示すような、 $m/z = 166.10$  に Phe のピークを確認することができた。しかし、これも Asp-Phe のときと同様に、Leu に由来する  $m/z = 132.11$  のピークは確認することができなかった。Gly-Leu の場合は、Nozzle Potential 100 V で  $m/z = 189.12$  の Gly-Leu 由来のピークに加えて、 $m/z = 132.11$  のピークもわずかではあるが確認することができた。そこで、Nozzle Potential を 150 V まで上昇させると、 $m/z = 132.11$  のピークをはっきりと確認することができた。しかし、この場合も Gly 由来の、 $m/z = 76.10$  のピークを確認することはできなかった。

以上の結果より、ジペプチドに対して、インソースフラグメント解析を行うことによってペプチド結合を切断できることが確認できた。しかし、ペプチド結合を構成するアミノ酸によって、インソースフラグメンテーションに必要な電圧が異なることも確認できた。これは、構成するアミノ酸によってペプチド結合の結合力が異なったり、立体構造的にエネルギーの受け方が異なることによるのではないかと考察した。また、アミノ酸のピークが検出されたことより、ペプチド結合の中心、つまり、C-N の結合が切断されていることがわかる。さらに、どの場合においても、C 末端側のアミノ酸のピークしか確認できなかった。つまり、 $\gamma$  シリーズのピークのみしか検出することができなかった。このことを逆に利用することにより、ペプチドに対して、インソースフラグメンテーションを行うことで、N 末端側からの一次構造配列の解析が行えられるのではないかと考えた。Asp-Phe の場合を例に挙げる。 $m/z = 281.13$ 、 $166.10$  のピークを検出することができた。これらのピークの差を取ると、 $m/z = 115.03$  となる。これは Asp の残基質量にほぼ等しいことより、Asp-Phe から Asp が遊離して、 $m/z = 166.10$ 、つまり Phe のピークが現れたことがわかる。これをペプチドに応用すれば、同じようにフラグメントピークの差をとっていくことで、アミノ酸配列を求めることができる。

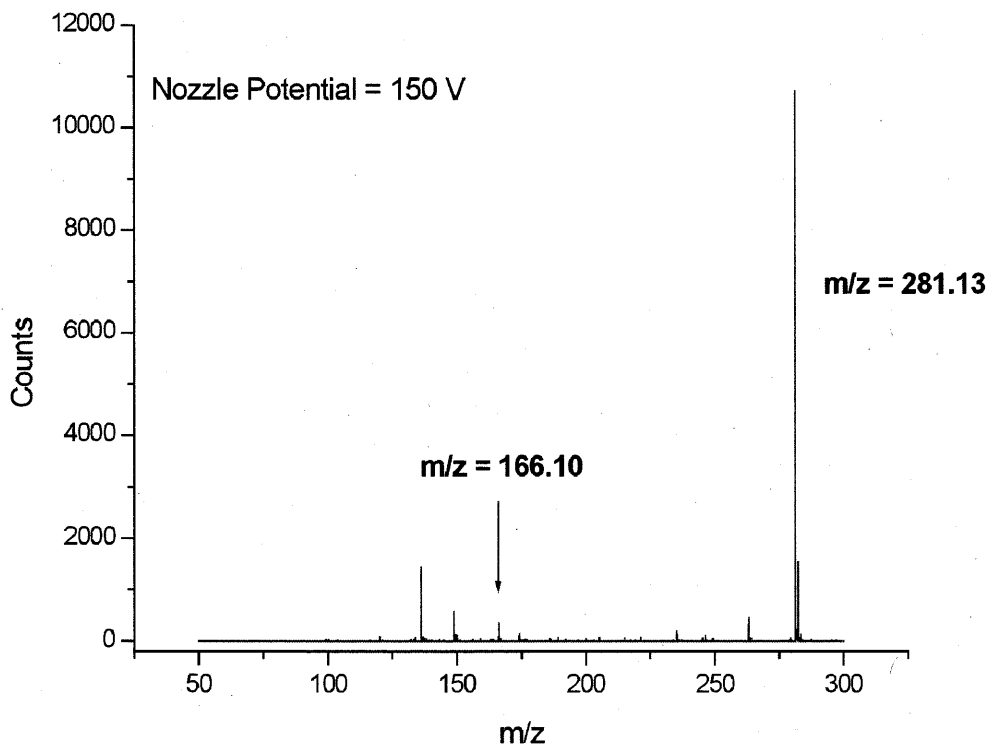
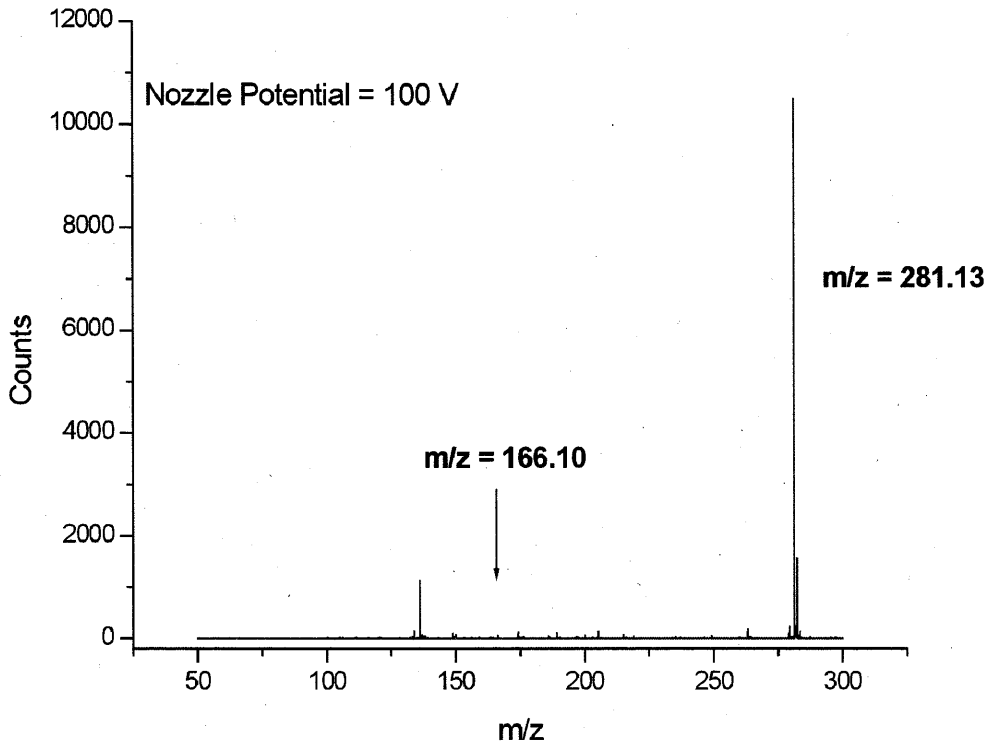


図 2-2a、Asp-Phe のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL Asp-Phe (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、150、200、250 V と変化させた。

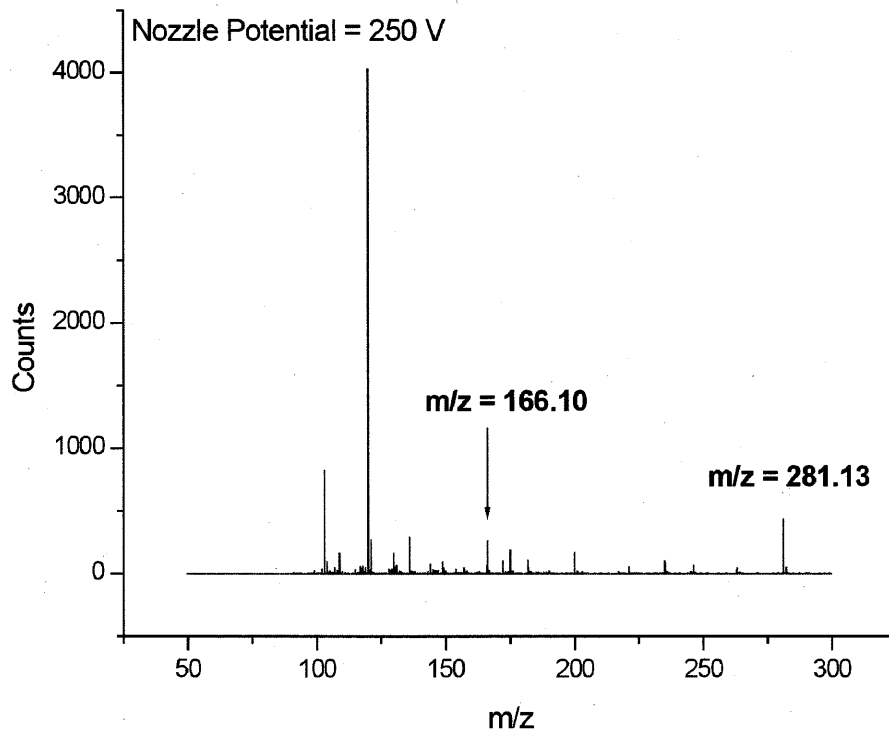
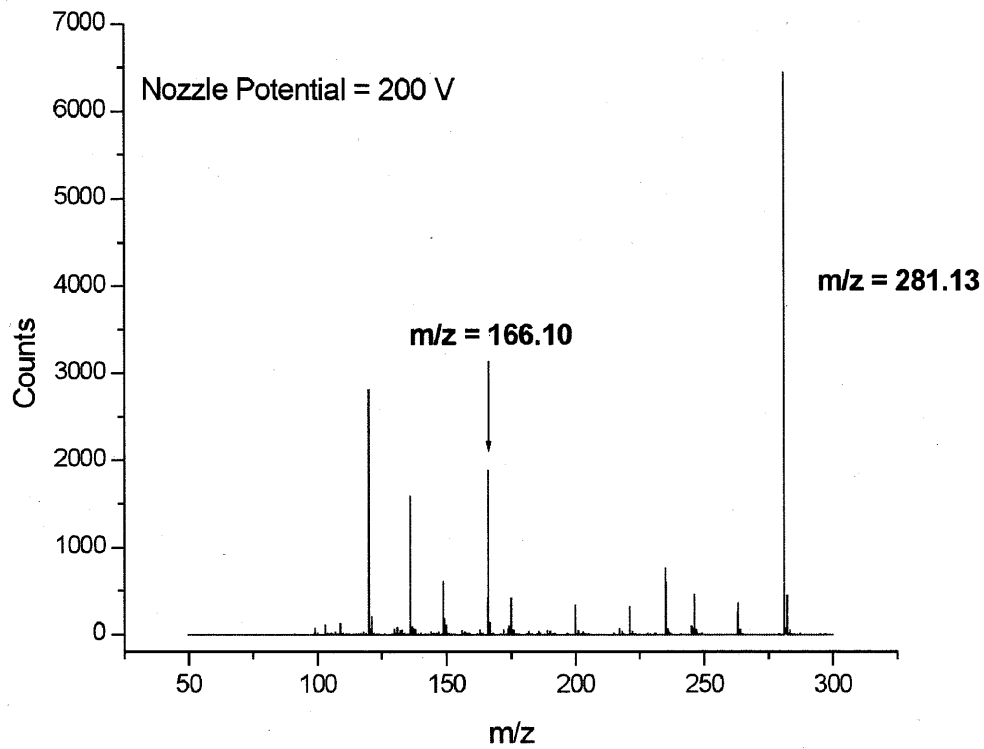


図 2-2b、Asp-Phe のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL Asp-Phe (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、150、200、250 V と変化させた。

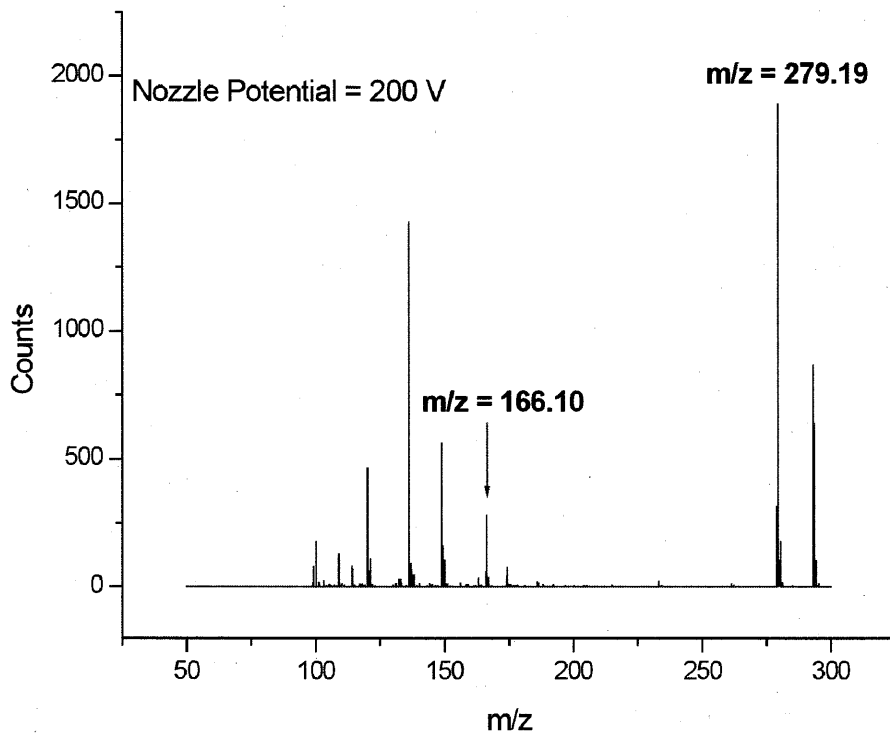
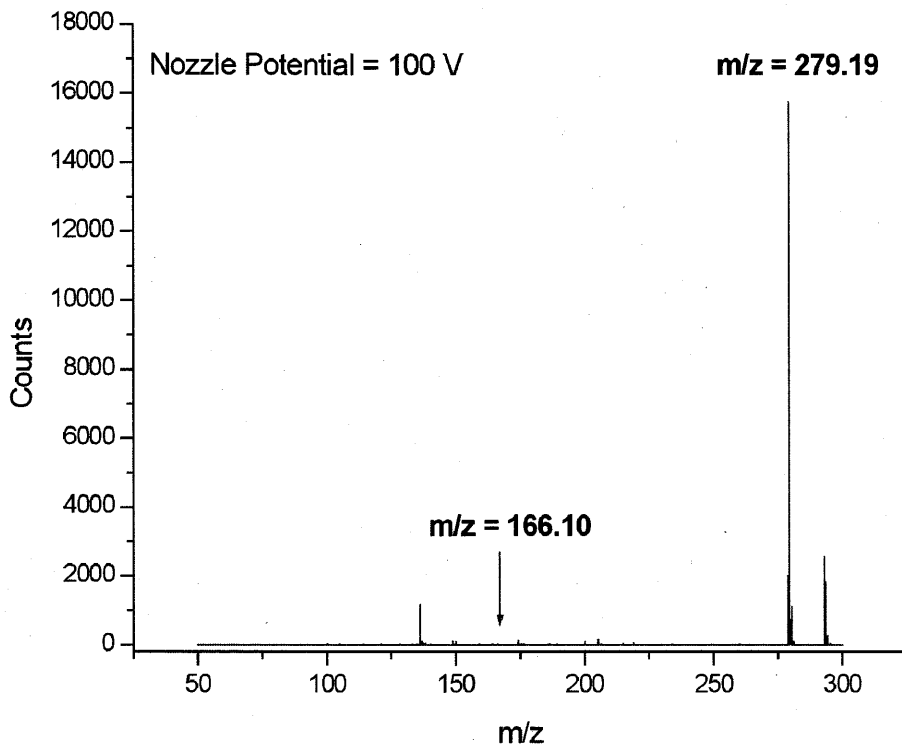


図 2-3、Leu-Phe のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL Leu-Phe (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、200 V と変化させた。

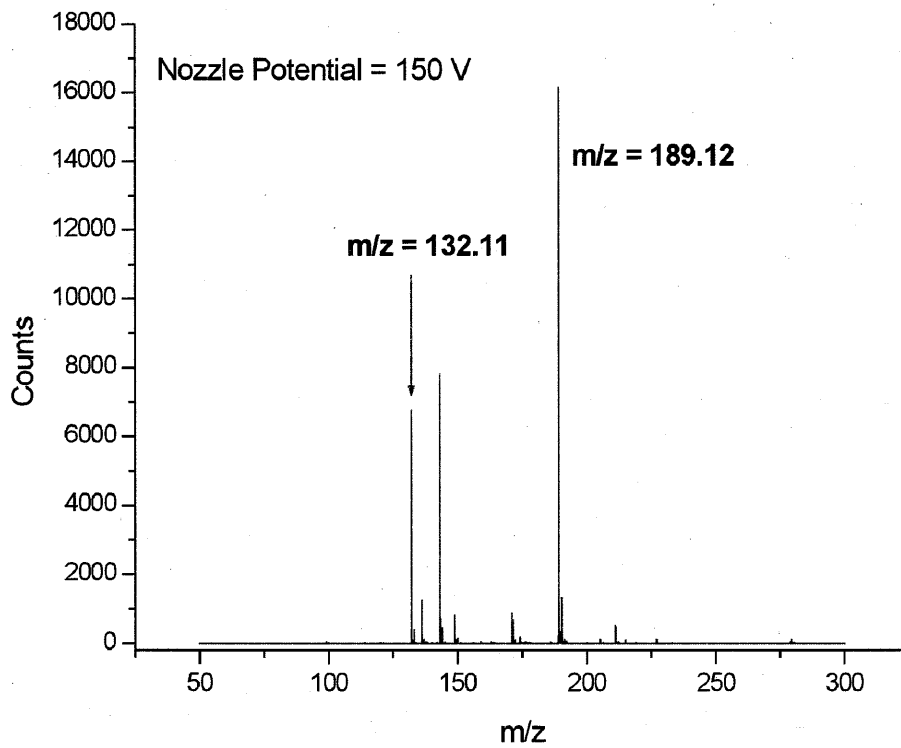
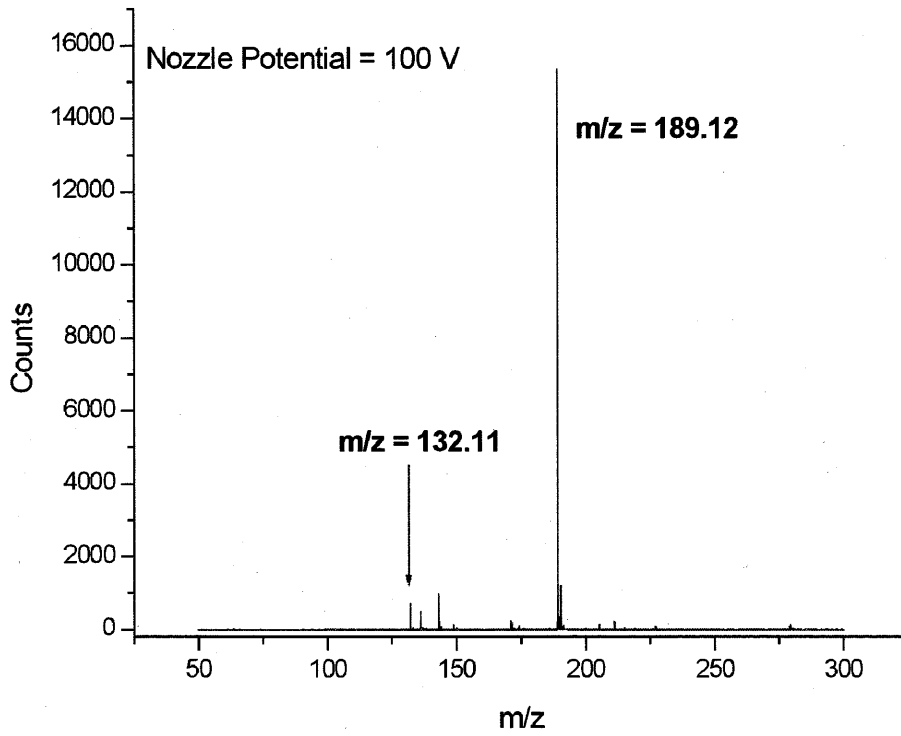


図 2-4、Gly-Leu のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL Gly-Leu (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、150 V と変化させた。

## 2-4、bradykinin のインソースフラグメンテーション

ジペプチドにおけるインソースフラグメンテーション解析を行った結果より、ペプチドに対してインソースフラグメンテーションを行い、フラグメントピークの差を求めていくことで、一次構造配列を N 末端側から解析することができるのではないかと考えた。そこで、bradykinin に対して、インソースフラグメンテーションを行い、その解析を試みた。

### 2-4-1、実験

bradykinin を 10 $\mu$ g/mL になるように 50% acetonitrile、1% acetic acid 溶液に溶かした。このサンプル 150  $\mu$ L を ESI-TOF/MS にて測定した。親イオンピークを確認後、Nozzle Potential の設定を変更、試料にエネルギーを加え、フラグメンテーションを起こし、フラグメントイオンピークを測定した。

### 2-4-2、結果と考察

図 2-5a、b に bradykinin に対して、インソースフラグメンテーション解析を行った際のマススペクトルを示す。図 2-5a 上部に示すように、Nozzle Potential 100 V で測定を行うと、bradykinin の一価のピークである  $m/z = 1060.56$ 、二価のピークである  $m/z = 530.78$ 、三価のピークである  $m/z = 354.19$  を確認することができた。しかし、フラグメントだと思われるピークはまったく確認することができなかった。そこで、Nozzle Potential を 250 V まで上昇させると、図 2-5b 下部に示すようなフラグメントのピークを含むマススペクトルを得ることができた。そこで、このマススペクトルの解析を行った。

ジペプチドにおける実験で、ペプチドに対してインソースフラグメンテーションを行うと、y シリーズが検出されやすいことがわかっている。このことを踏まえて解析を行った。まず、 $m/z = 1060.56$  に最も近いピークとして、 $m/z = 904.46$  のピークを検出することができた。これらのピークの  $m/z$  の差を求めると、156.1 となり、 $m/z = 1060.56$  から Arg が遊離して  $m/z = 904.46$  のピークが検出されたことがわかる。同じように、 $m/z = 807.41$ 、710.36、653.34、506.27、419.24、322.20、175.13 についても解析を行うと、順番に、Pro、Pro、Gly、Phe、Ser、Pro、Phe と遊離していつていることがわかる。そして、最後の  $m/z = 175.13$  は Arg のピークと一致することから、bradykinin のアミノ酸配列は、N 末端から、RPPGFSPFR となっていることがわかる。

しかし、Nozzle Potential 250 V では bradykinin 由来のピークに比べて、フラグメントのピークが小さく、フラグメントが十分に行われていないことがわかる。そこで、より解析を行いやすくするために、Nozzle Potential を 300 V、350 V と上昇させた。その結果、図 2-5b 上部に示すように、Nozzle Potential を 300 V とすると、フラグメントのピークは大きくなる。しかし、それとともに、y シリーズ以外のフラグメント。つまり、多くエネルギーを受けたことにより、様々な部位で切断を受けるために生じたフラグメントのピークが出現する。これにより、かえって解析は困難になってしまう。また、図 2-5b 下部に示すように Nozzle Potential を 350 V まで上昇させると、さらに多くのフラグメントが出現し、Nozzle Potential 300 V では判別できた y<sub>2</sub>、y<sub>3</sub>、y<sub>4</sub> が判別できなくなってしまう。変わりに、多大なエネ

ルギーにより、**bradykinin** がバラバラになって生じたであろうと考えられるピークが出現した。**y2**、**y3**、**y4** が判別できなくなった理由についてだが、図 2-5a の下部、**Nozzle Potential 250 V** とした場合のマススペクトルを見ると、比較的、**y2**、**y3**、**y4** のピークが強く検出されていることがわかる。これはつまり、**Phe-Ser (y4)**、**Ser-Pro (y3)**、**Pro-Phe (y2)** の結合が切断されやすいことを示している。つまり、これらの結合は弱いエネルギーでも切断を受けるのだが、強いエネルギーを受けることにより、これらの結合で切れるだけでなく、他の箇所でも切断を受けてしまう。つまり、一つの分子内で複数の箇所での切断を受けてしまうからであろう、と考えた。

これらの結果より、インソースフラグメンテーション解析を行うにあたっては、その分子ごとに最適な設定値があるのだろうと考えられる。しかし、その設定値を探すには装置の操作上の問題もあるが、ある程度の時間がかかる。また、**Nozzle Potential** の設定を上昇させるほど、マススペクトルにおける **Counts** が低下する。これはつまり、検出感度の低下を意味する。よって、**Nozzle Potential** の設定を上昇させた場合、ある程度時間をかけて測定を行い、積算平均を取らないと、解析を行うことのできるようなデータを得ることができない。よって、**ESI-TOF/MS** において、インソースフラグメントを用いて、ペプチドの一次構造解析を行うには、今回の場合、マイクロポンプを用いて試料を連続で流し続けて、**150  $\mu$ L** 以上の試料が必要であった。

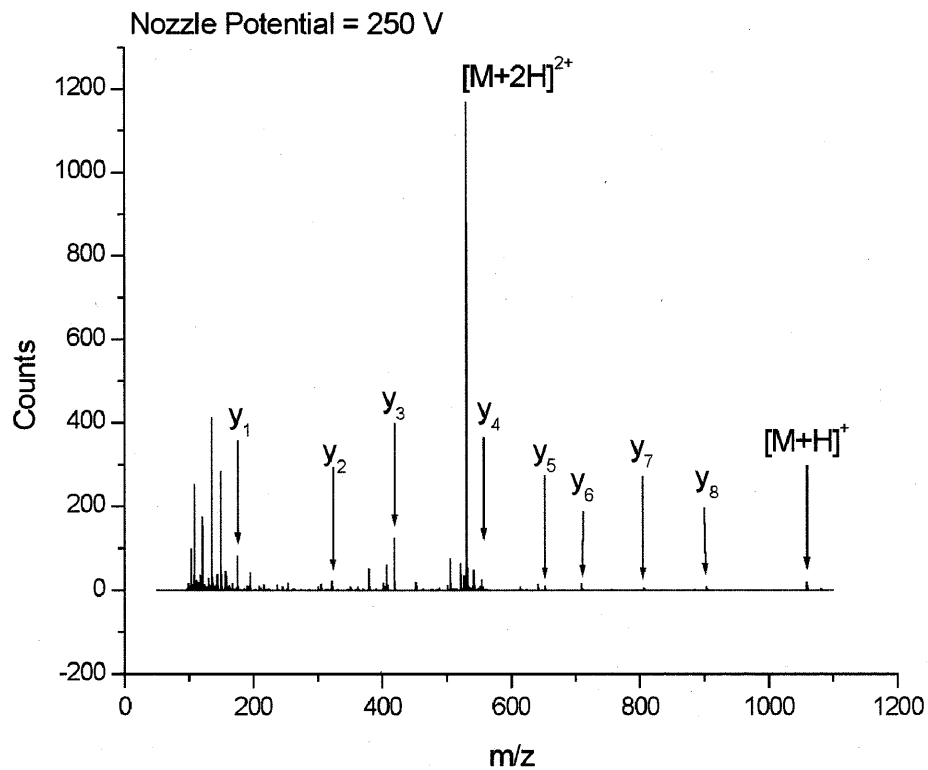
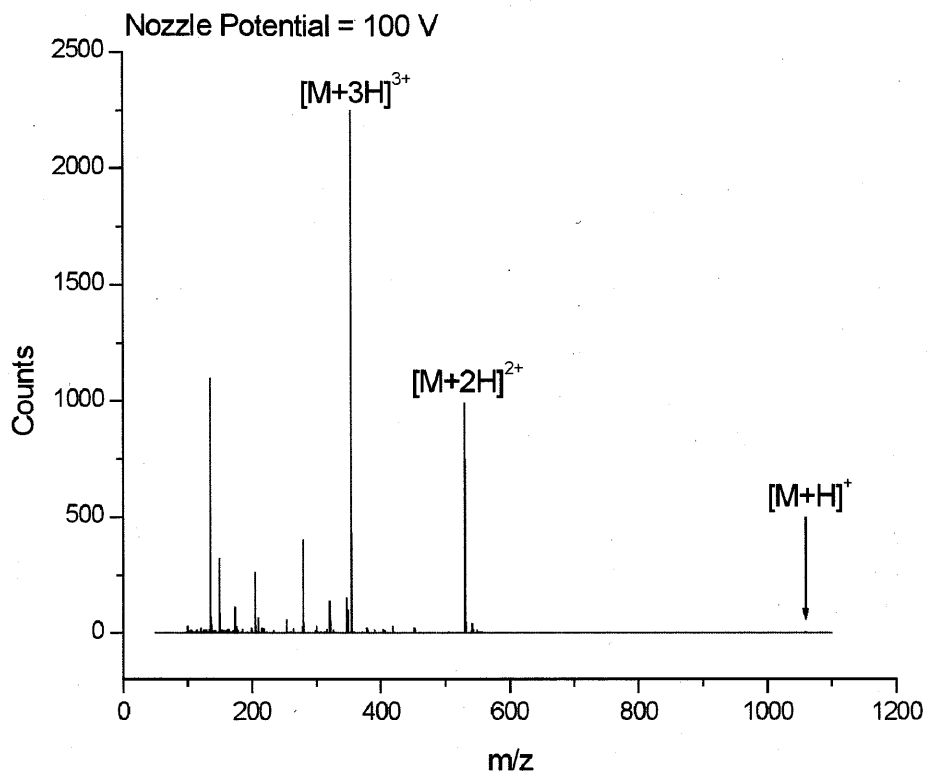


図 2-5a、bradykinin のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL bradykinin (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、250、300、350 V と変化させた。



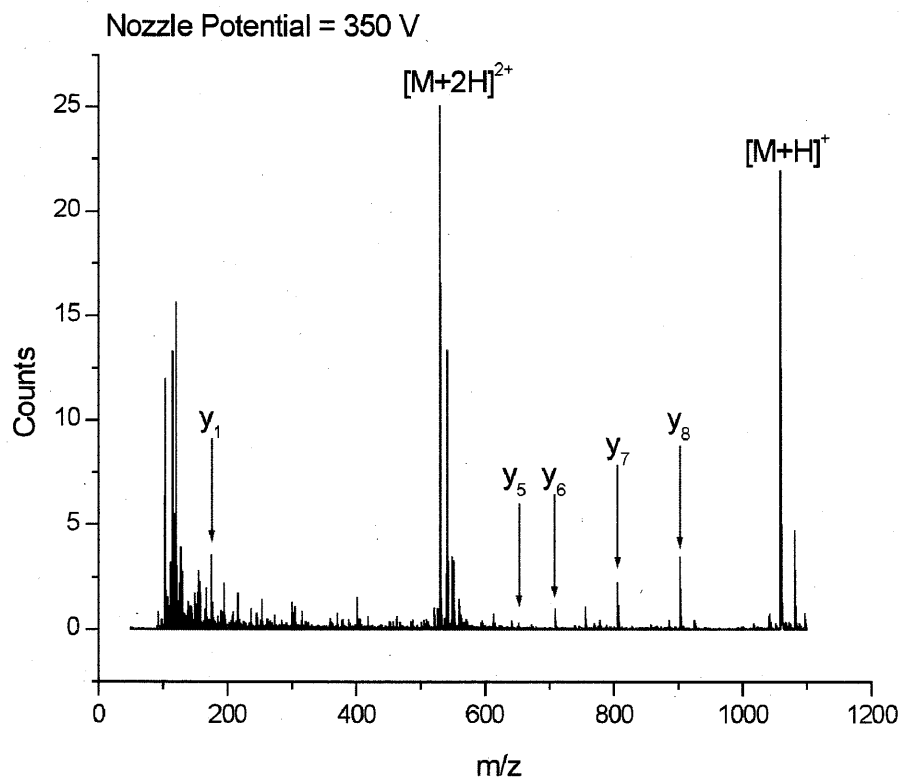
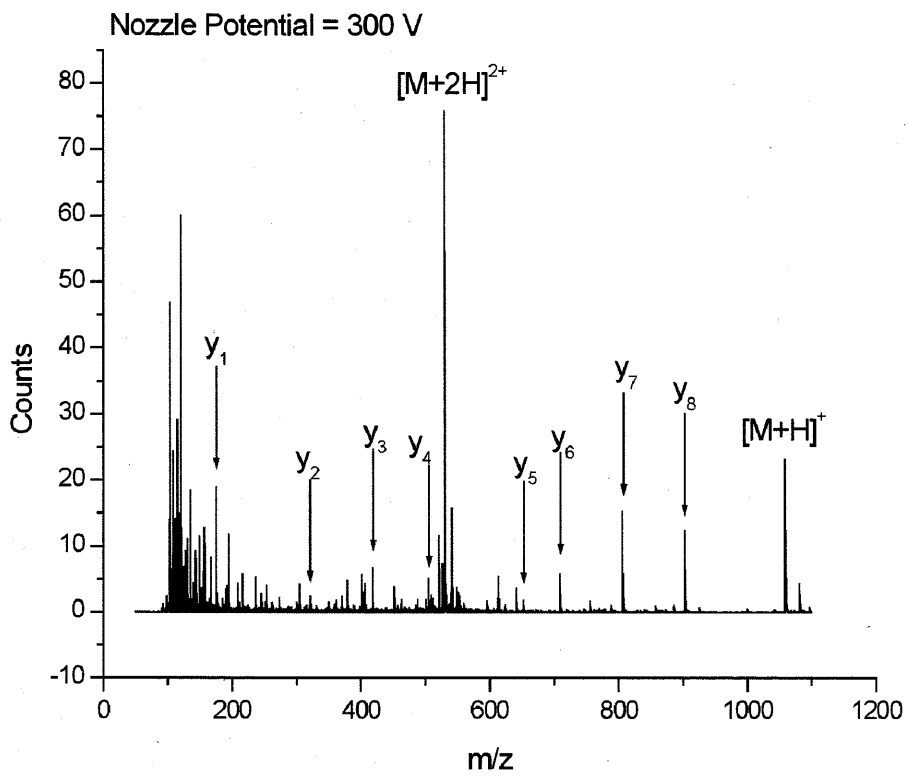


図 2-5b、bradykinin のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL bradykinin (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、250、300、350 V と変化させた。

## 2-5 nanoESI 法によるインソースフラグメンテーション解析

nanoESI 法の利点として、微量の試料を感度良く、長時間にわたって測定できるという点が挙げられる。ESI 法ではなく、nanoESI 法を用いてインソースフラグメンテーション解析を行うことで、少ない試料量でペプチドの一次構造解析が行えるのでは、と考えた。

### 2-5-1 実験

bradykinin を 10  $\mu\text{g/mL}$  になるように 50% acetonitrile、1% acetic acid 溶液に溶かした。このサンプル 1  $\mu\text{L}$  を nanoESI-TOF/MS にて測定した。親イオンピークを確認後、nozzle voltage の設定を変更、試料にエネルギーを加え、フラグメンテーションを起こし、フラグメントイオンピークを測定した。

### 2-5-2 結果と考察

図 2-6a、b に bradykinin に対して、インソースフラグメンテーション解析を行った際のマススペクトルを示す。図 2-6a 上部に示すように、Nozzle Potential 100 V で測定を行うと、bradykinin の二価のピークである  $m/z = 530.78$ 、三価のピークである  $m/z = 354.19$  を確認することができた。しかし、フラグメントだと思われるピークはまったく確認することができなかった。そこで、Nozzle Potential を 250 V まで上昇させると、図 2-6b 下部に示すようなフラグメントのピークを含むマススペクトルを得ることができた。そこで、このマススペクトルの解析を行った。

NanoESI 法によりインソースフラグメンテーションを行った場合の、Nozzle Potential 250 の場合のマススペクトルは、ESI 法の場合と異なるスペクトルを示した。ESI 法の場合と比べて、あまりフラグメント化が進んでいないように見え、はっきりとフラグメントだと確認できるピークは、切れやすい、y2、y3、y4 のみである。そこで、図 2-6b 上部に示す、Nozzle Potential 300 V の場合のマススペクトルを見る。すると、y2、y3、y4 は先ほどよりもさらにはっきりとしたピークとなる。加えて、y1、y6、y7、y8 の存在も確認できる。さらに Nozzle Potential の電圧を上昇させ、図 2-6b 下部に示すように、350 V まで上昇させると、y1、y6、y7、y8 ははっきりとしたピークとなり、y5 の存在も確認できる。しかし、この場合では、フラグメントが増え、y2、y3、y4 の存在はわかりにくくなってしまう。このように、ESI 法と比べて、nanoESI 法ではペプチドの一次構造解析を行う前、つまり、フラグメントピークを抽出すると言う段階が多少困難になる。しかし、それは Nozzle Potential の設定の変化を行うことによって、可能である。フラグメントピークを抽出した後は、ESI 法での場合と同じように  $m/z$  の差を取っていき、構造解析を行った。その結果、ESI 法の場合と同じように、RPPGFSPFR と言う、bradykinin の一次構造を求めることができた。

nanoESI 法においては、インソースフラグメンテーションによって検出されるフラグメントのピークが ESI 法と異なり、少ないことがわかった。おそらくこれは、nanoESI 法におけるスプレーの水滴が ESI 法におけるものと比べて、極めて小さいことが影響しているのではないかと考えた。既述したように、インソースフラグメンテーションはイオン化途中、もしくは直後の試料にエネルギーを加えることによって、フラグメンテーションを引き起こすと

いうものである。**ESI** 法において、それはスプレー直後のイオン導入口にて行われる。イオン導入口における電圧を上昇させること、つまり、電気によるイオンの絞込みを強くすることにより、分子と分子の衝突を誘発し、分子を破壊する。しかし、**nanoESI** においては、スプレーの水滴は非常に小さく、一つの水滴に一つの試料分子が入る程度といわれている。そのような小さい水滴においては、**ESI** 法に比べて、分子と分子の衝突が起きる可能性が低くなる。その結果、**ESI** 法に比べて、多少ではあるが、フラグメントのピークが検出されにくいのではないかと考えた。

しかし、**Nozzle Potential** の設定の変化を行うことで、ペプチドの一次構造解析に必要なフラグメント、つまりは切れやすいペプチド結合のみが切断されたピークを抽出することは可能である。**NanoESI** 法の利点である、長時間測定によるメリットを考えれば、**Nozzle Potential** の設定の変化を行うことは、さほど問題ではない。今回、実際に  $1 \mu\text{L}$  の試料から構造解析を行うことが可能であった。実際には、より少ない量でも可能であると考えられる。

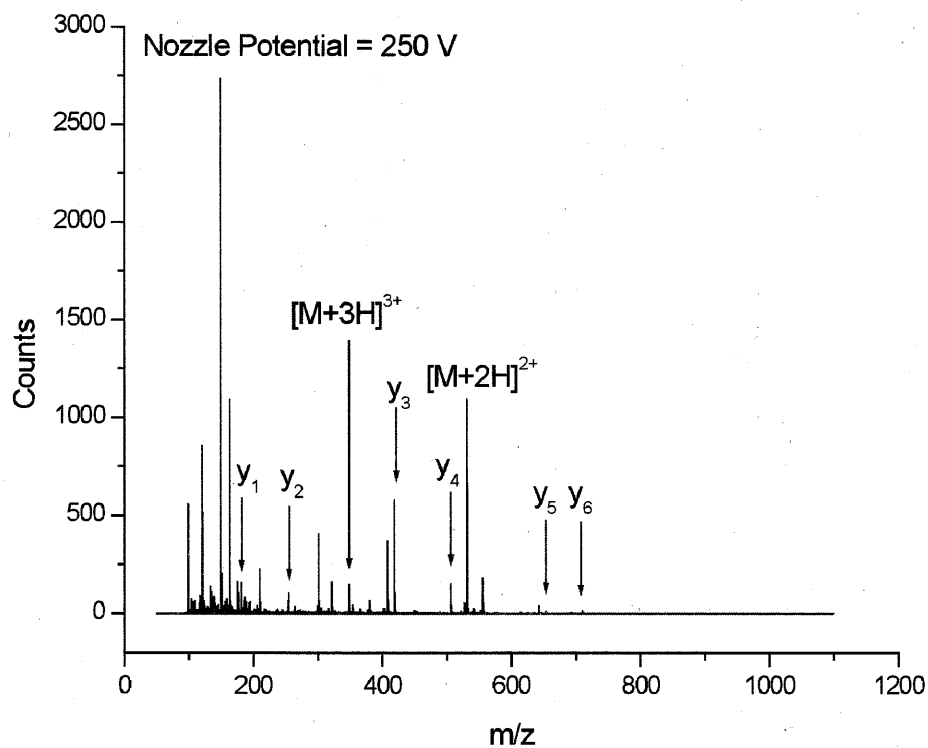
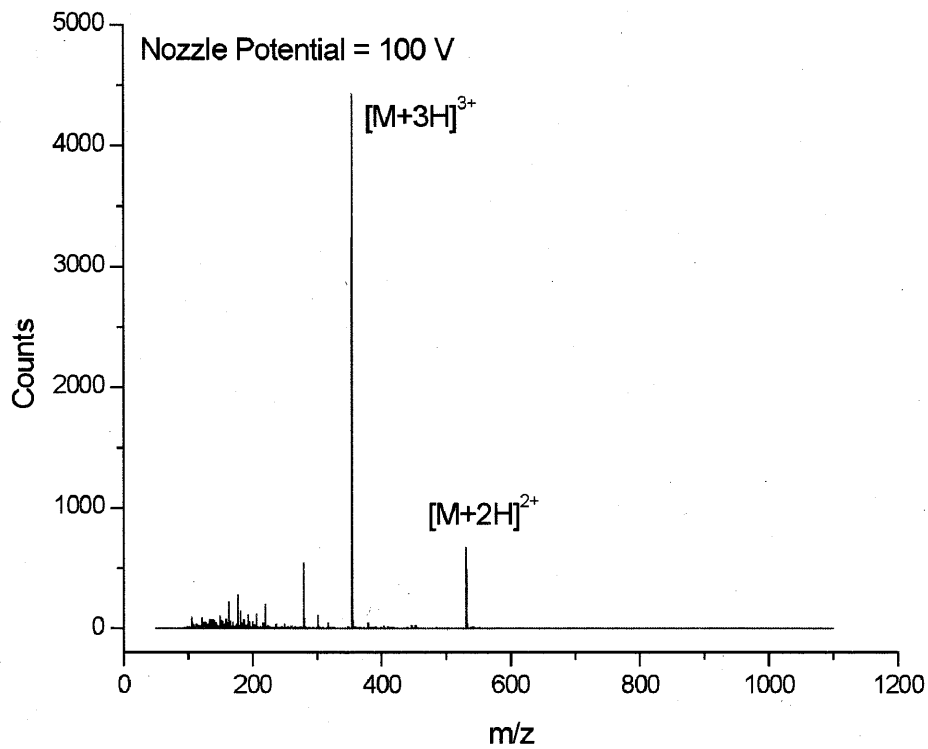


図 2-6a、nanoESI 法での bradykinin のインソースフラグメンテーション解析  
 10 $\mu$ g/mL bradykinin (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、250、300、350 V と変化させた。

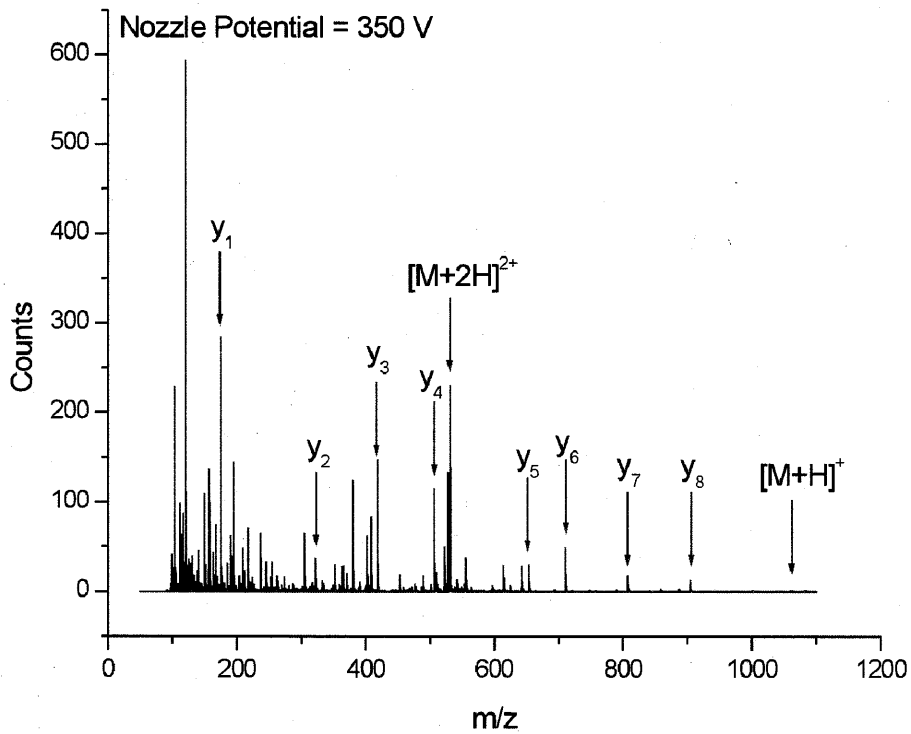
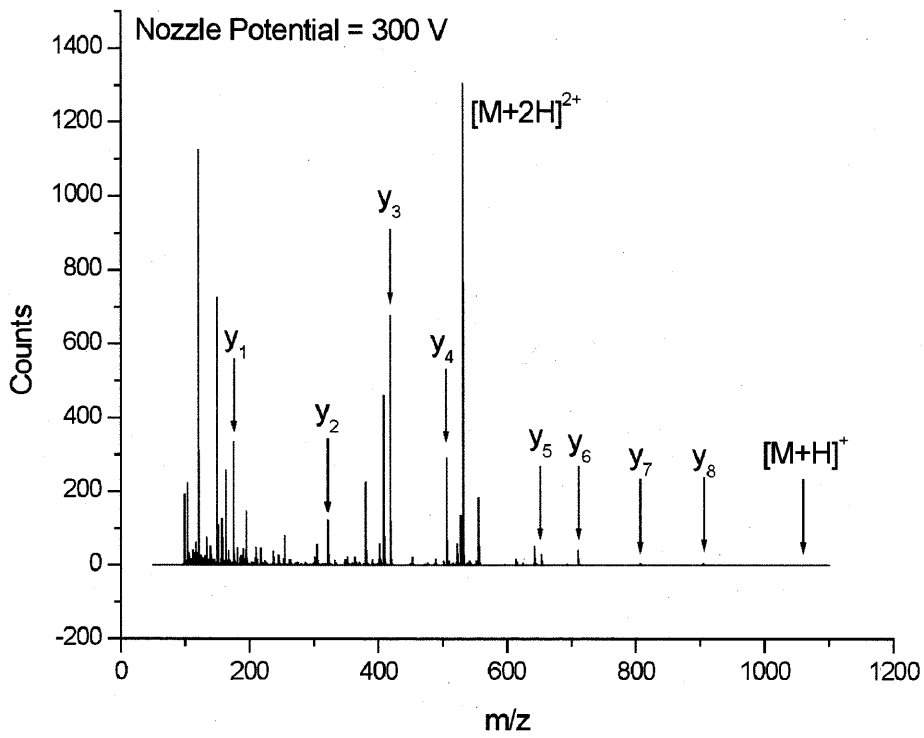


図 2-6b、 nanoESI 法での bradykinin のインソースフラグメンテーション解析  
 10 $\mu$ g/mL bradykinin (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、250、300、350 V と変化させた。

## 2-5 nanoESI 法によるペプチドの一次構造解析

前節での実験により、bradykinin の一次構造解析を nanoESI で行うことができた。nanoESI 法により微量の試料より、ペプチドの一次構造解析を行うことができることがわかったが、この方法を他の試料についても適用し、その結果を考察した。

### 2-5-1 実験

neurotensin、chromogranin A をそれぞれ、10  $\mu\text{g/mL}$  になるように 50% acetonitrile、1% acetic acid 溶液に溶かした。このサンプルそれぞれ、1  $\mu\text{L}$  を nanoESI-TOF/MS にて測定した。親イオンピークを確認後、nozzle voltage の設定を変更、試料にエネルギーを加え、フラグメンテーションを起こし、フラグメントイオンピークを測定した。

### 2-5-2 結果と考察

neurotensin、chromogranin A についてインソースフラグメンテーションを行い、得られたマススペクトルより、一次構造解析を行った。最初に、neurotensin の結果について述べる。図 2-7 に、neurotensin に対してインソースフラグメンテーションを行った際のマススペクトルを示す。上部に示すように、Nozzle Potential 100 V の場合は、neurotensin の三価のである  $m/z = 558.31$  のピークと、二価である  $m/z = 836.96$  のピークのみが検出された。そこで、Nozzle Potential の設定を上昇させていき、350 V とすると、下部に示すようなマススペクトルが得られた。このマススペクトルの中で、二価のものに注目をして、解析を行った。その結果、y7~y12 までのフラグメントピークを抽出することができた。これらを用いて、これまで行ってきたのと同じように、 $m/z$  の差をとり、アミノ酸の残基質量と照らし合わせていくことで、一次構造の解析を行った。ただし、今回は二価のピークより求めるので、 $m/z$  の差を 2 倍したものが残基質量となる。その結果、N 末端のみ、対応するアミノ酸が存在しなかった。N 末端のアミノ酸の残基質量は、 $(836.96 - 781.43) \times 2 = 55.53 \times 2 = 111.06$  となるが、この、111.06 にあてはまるアミノ酸は存在しない。しかし、neurotensin の N 末端のグルタミン酸は特殊な構造を取っており、ピログルタミン酸と呼ばれる。ピログルタミン酸は、グルタミン酸の内部でアミド結合を形成して、閉環が起こったもので、このことを考えて、ピログルタミン酸の残基質量を求めると、111.04 となる。よって、N 末端はピログルタミン酸 (pGlu、pE) であることがわかった。以上より、neurotensin の一次構造のうち、N 末端から数えて 6 個、pELYENK の配列を求めることができた。neurotensin のアミノ酸の配列は、pELYENKPRRPYIL である。よって、N 末端から 6 個のアミノ酸の確認を行うことができた。

また、今回、neurotensin の N 末端のグルタミン酸がピログルタミン酸になる、という形で修飾を受けていた。通常の質量分析では、ペプチド全体の分子量の変化しか求められないので、どこが修飾を受けたかはわからない。しかし、インソースフラグメンテーションによる解析を行うことで、構造のうち、どの部分が修飾を受けたのかということまで、確認することができる。

次に、chromogranin A の結果について述べる。図 2-8a、b に chromogranin A に対してイ

ソースフラグメンテーションを行った際のマススペクトルを示す。図 2-8a 上部に示すように、Nozzle Potential 100 V の場合は、chromogranin A の三価のである  $m/z = 607.29$  のピークと、二価である  $m/z = 910.43$  のピークのみが検出された。そこで、Nozzle Potential の設定を上昇させていき、300 V とすると、下部に示すようなマススペクトルが得られた。この場合、y5、y6、y7 については比較的是っきりと確認することができたが、そのほかについては、はっきり確認できるピークはなかった。そこで、Nozzle Potential の設定をさらに上昇させ、350 V とした。その結果、図 2-8b 上部に示すようなマススペクトルを得ることができた。y5、y6、y7 についてはさらにはっきりとし、y4、y8~y12 のピークも確認することができた。そこで、もう一度、電圧を上昇させ、400 V とした結果、図 2-8b 下部に示すようなマススペクトルを得た。Y4、y8~y12 はさらにはっきりとなったが、y5、y6 についてはフラグメントが進みすぎて、わかりにくくなってしまった。以上より、y4~y12 までのピークを確認することができた。これらの結果を用いて、これまで行ってきたのと同じように、 $m/z$  の差をとり、アミノ酸の残基質量と照らし合わせていくことで、一次構造の解析を行った。すると、EMAVPQG という配列を求めることができた。chromogranin A の一次構造は EEEEEEMAVPQGLFRG なので、部分的ではあるが、一次構造を求めることができた。

今回、neurotensin、chromogranin A、共に、部分的な配列しか求められなかった。その理由を考察する。まず、neurotensin についてだが、二つの点が考えられる。一つは、ある程度大きい構造を持っているという点である。Bradykinin は 9 個のアミノ酸によって構成されているが、neurotensin は 13 個のアミノ酸によって構成される。よって、bradykinin に比べて切れにくいのではないかとということが考えられる。もう一つの点として、フラグメントイオンも全て、二価もしくは三価（今回の結果では考察しなかった）の形を取ると言うことを考えた。多価イオンになることによって、ピークはばらつき、その感度は低下する。よって、切れにくい、部分はますます検出されにくかったのではないかと考えた。chromogranin A についても二つの点を考えた。一つは、neurotensin の場合と同じく、構造の大きさである。chromogranin A は 16 個のアミノ酸からなる。もう一つの点として、注目したのが、N 末端の EEEEE の構造である。このうち、最初の 4 つ、つまり、EEEE の部分はほとんど検出することができなかった。（y13 については、拡大すればかろうじて、それらしきピークが見える）これは、EE の結合の切れやすさが同じであることが原因であると考えた。例えば、N 末端側からペプチド結合に p1、p2 と名前をつけていく。p1 のみが切れれば y15 が検出され、p2 のみが切れれば y14 が検出される。しかし、実際に検出されたのは、p4 の切れた y12 である。つまり、p1 だけ、p2 だけで切れることはほとんどなく、同じような場所、この場合はつまり N 末端のに、同じ配列を持つが故に、一つが切断される場合は、同じようにほかも切断されてしまうと考えられる。その結果、y12 のみが検出されるのではないかと考えた。

本実験での結果より、nanoESI-TOF/MS でソースフラグメンテーションを利用すれば、微量のサンプルで、じっくりと、ペプチドの構造解析を行うことができる、ということがわかった。質量分析法を用いたペプチドの構造解析には、MS/MS を用いたものや、酵素法が挙げられる。しかし、MS/MS は装置自体が非常に高く、購入しないと行えない。また、酵

素法はペプチドマスフィンガープリンティングなどの方法があるが、操作が非常に困難である。よって、今回用いた、**nanoESI** インソースフラグメンテーション法が、最も簡単に解析を行うことができるのではと考えた。ただし、酵素法と異なり、全ての配列を完全に解析できるわけではないし、ペプチド結合以外で切断されたものによるピークも生じるので、解析は決して安易ではない。しかし、既知のものであれば、非常に簡単に解析を行うことができる。よって、この方法を用いれば、質量だけでなく、アミノ酸の配列から、同定を行うことも可能である。



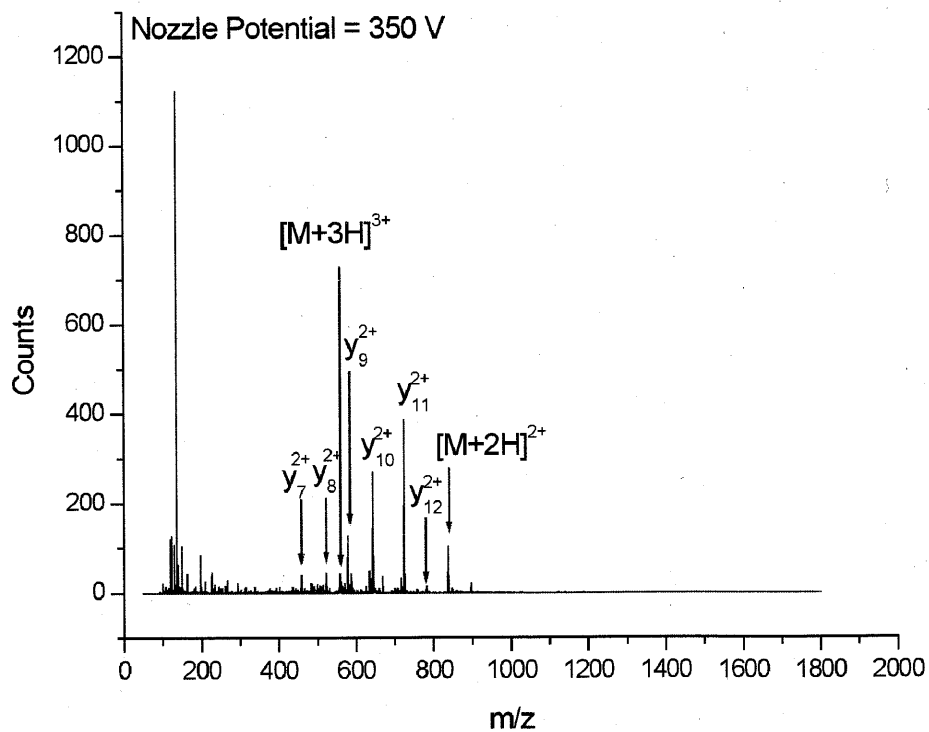
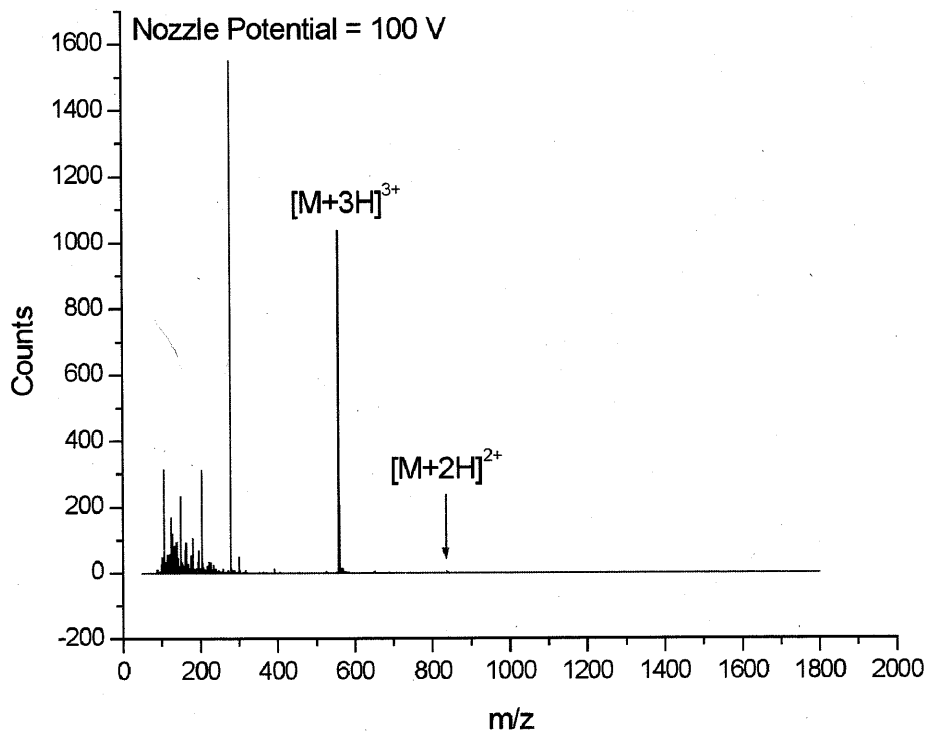


図 2-7、neurotensin のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL neurotensin (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、350 V と変化させた。

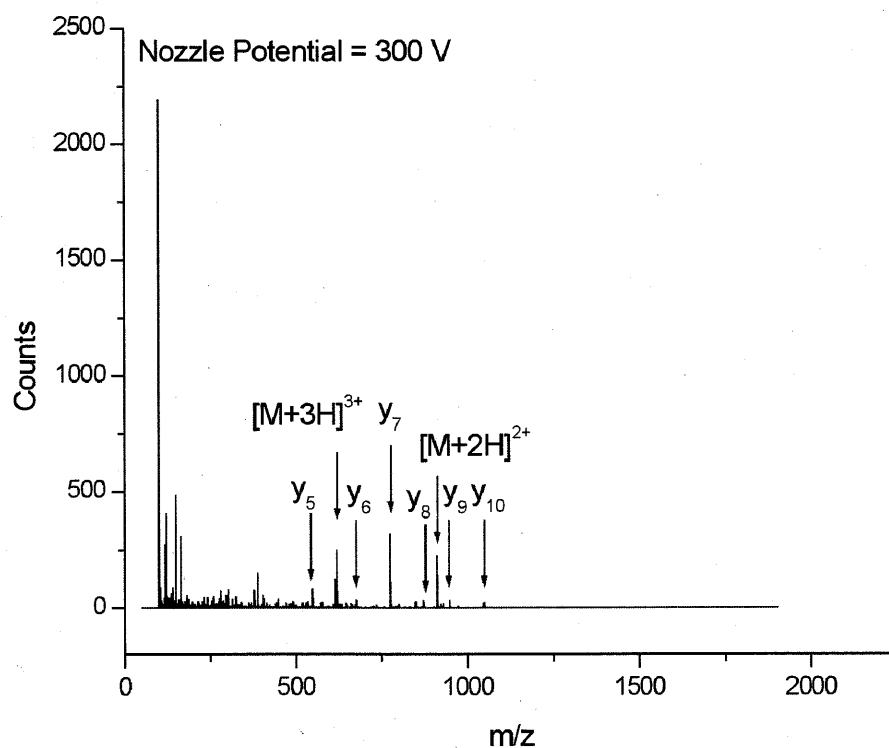
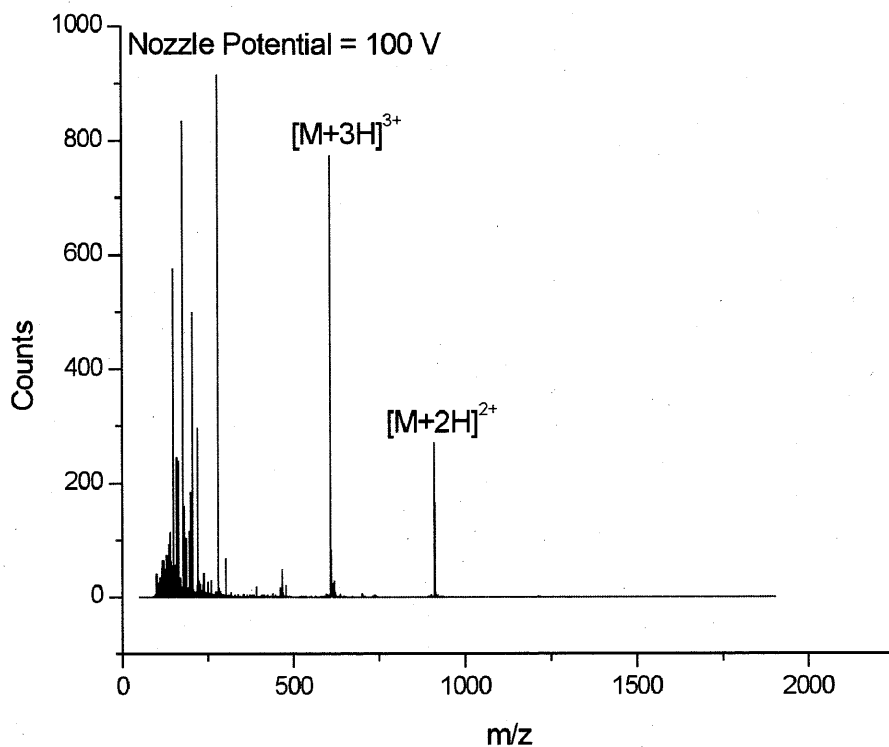


図 2-8a chromogranin A のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL chromogranin A (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、300、350、400 V と変化させた。

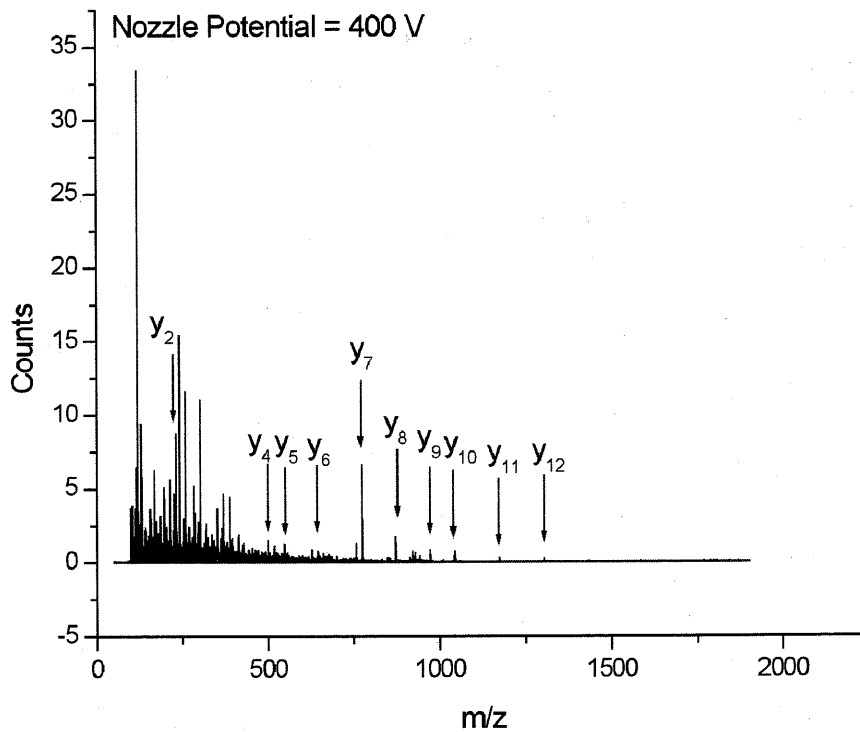
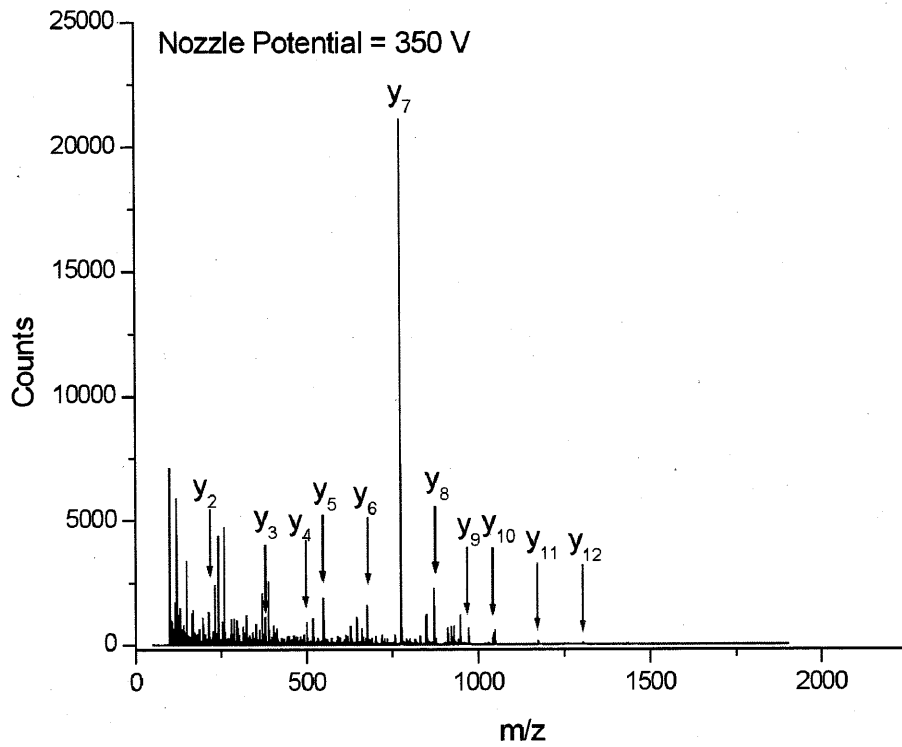


図 2-8b、chromogranin A のインソースフラグメンテーション解析

10 $\mu$ g/mL chromogranin A (50% acetonitrile、1%acetic acid 溶液) に対して、インソースフラグメンテーションを行った。Nozzle Potential は 100、300、350、400 V と変化させた。

## 2-6 小括

本章では、ESI-TOF/MS による、インソースフラグメンテーションを用いて、ペプチドの構造解析を行った。ESI 法で行った結果、一次構造解析が可能であったので、nanoESI 法を用いて実験を行った。nanoESI 法を用いることにより、1) 試料が微量で良い、2) 長い時間の測定が可能、という二つのメリットを手に入れた。インソースフラグメンテーションを行うには、どうしても長い測定時間を要する。その際、最も問題となるのが、試料の量であり、nanoESI 法を用いることで、その点を改善することができた。

また、ESI 法と nanoESI 法、それぞれでインソースフラグメンテーションを行った結果を比較すると、フラグメントの進み具合に違いがあることがわかった。これは、ESI 法、nanoESI 法のスプレーの粒子径の大きさの違いによるものではないか、と考察した。

複数のペプチドについて、解析を行ったが、その構造によって、切断されやすい部位、切断されにくい部位が異なることがわかった。また、この技術を応用することで、ペプチドの構造の内、どの部分が修飾を受けているかを確認することも可能であると思われる。

既知のペプチドに関しては、非常に簡単に解析を行うことができるので、あるペプチドに対して、分子量だけでなく、構造からも同定を行いたいという場合、非常に簡単に、素早く行うことができる。

以上の点より、インソースフラグメンテーション解析は、ペプチドの一次構造解析を非常に有用なツールであると考えられる。また、それに nanoESI 法を適用することによって、感度良く、微量の試料で解析を行うことができる。これは、生体分子などの極微量の試料を測定するにあたって非常に重要な課題である。よって、nanoESI 法によるインソースフラグメンテーション解析は、生体分子分析において、非常に有用なツールであるといえる。

## 3 nanoESI 法によるビデオマス・スコープ法の開発

### 3-1 緒言

細胞の形態、位置情報、それらの時系列変化に沿った変化を同時に得ることのできる解析手段として、ビデオマイクロスコープ法がある。ビデオマイクロスコープ法は光学顕微鏡に、ビデオカメラや画像解析装置を組み合わせることによって、「1 細胞レベルでの経時的な現象の解析」を可能とする優れた解析法である。このビデオマイクロスコープ法に質量分析法を組み合わせ、ビデオマス・スコープ法はビデオマイクロスコープ法によって得られる多くの情報に加え、さらに、直接目で見ることが困難である、分子の動きなどをリアルタイムで追跡することのできる手法である。ビデオマス・スコープ法を用いることで、例えば、1 細胞を刺激することによる、その細胞の形態変化、位置情報、様々な情報に加え、その際細胞内外で起こる分子的变化をリアルタイムで追跡することが可能となる。

しかし、細胞外液など、生体試料内の分子を解析するには、アルカリ金属イオンをはじめとする、検出感度の低下を引き起こす塩の除去と、目的分子の濃縮が必要となってくる。そこで、nanoESI 法に着目した。極微量の試料を長時間にわたって、感度良く測定できる nanoESI-MS をビデオマス・スコープ法に用いることで、生体分子の検出が可能となるのではないかと考えた。

そこで、本章では、nanoESI 法を用いたビデオマス・スコープ法に適用した研究について述べる。細胞に薬物刺激を与え、刺激後の変化を nanoESI-TOF/MS (Mariner) とビデオマイクロスコープ法で追跡した。

### 3-2 実験

#### 3-2-1 マスト細胞の分離

エーテル麻酔したトランスジェニックマウス (C3H/HeN-TgN (IL-5) Imeg) を頸椎脱臼にて致死させ、アルミ箔をかけた保冷剤の上に仰向けに静置して、70 % (w/v) エタノールを用いて腹部を消毒した。腹腔に、10 mL シリンジ、23 G の注射針を用いてヘパリン含有 0.1 % (w/v) BSA in modified tyrode-HEPES buffer (MTBSA++) を 9 mL 注射した。約 30 sec、軽くマッサージを施した後、腹膜を露出して小さく切込みをいれ、そこからスポイト (尿沈査用スポイト 12350-SPOIT, 岩城硝子株式会社) で緩衝液を先細スピッツ (SPC-SC-10, イワキ) に回収した。これを、1,600 rpm (150×g)、3 min、5 °C (himac CR5B2, HITACHI) で遠心し、沈殿した細胞を約 1 mL の MTBSA++ で再懸濁した後、20 % (w/v)、23 % (w/v) の metrizamide (SIGMA ; M-3383) をそれぞれ 1 mL 界面を乱さないように順次重層した。これを 1,200 rpm (150×g)、15 min、室温 (himac CR5B2, HITACHI) で遠心し、上層はアスピレーターで除去し、pellet に MTBSA++ を約 1 mL 加えて懸濁し、1.5 mL エッペンドルフチューブに回収した。遠心して上清を除去し、新しい MTBSA++ で懸濁する操作を 2 度繰返して洗浄し、適量の MTBSA で懸濁した。この細胞懸濁液を適量サンプリングし、セルカウントと染色をおこなった。

サンプリングした細胞懸濁液 10 µL に 0.32 % (w/v) トリパンブルー 10 µL を加えて穏やかに pipetting にて混和し、直ちに血球計算盤 (Improved NEUBAUER; 03-202-3, Erma) を用いて細

胞数を計測し、生存率を求めた。また、サンプリングした細胞懸濁液 10 $\mu$ L にトリジンブルー染色液 90  $\mu$ L を加えて穏やかにピペッティングし、10 min 後にトリパンブルーと同様にセルカウントを行い、マスト細胞の純度を求めた。さらに、適量の細胞懸濁液をカバーガラス上にとり、微分干渉顕微鏡 (IX70, OLYMPUS) にセットし、100 倍対物レンズ (Plan-NEOPLUAR100 $\times$ /1.30) でマスト細胞の大きさや形を記録した。

### 3-2-2 ビデオマス・スコープ法によるマスト細胞刺激反応解析

得られたマスト細胞を MTBSA++ の入ったディッシュに混和し、全量 2 mL、細胞数  $6 \times 10^3$  cells/mL とし、実験を行った。まず、刺激剤を加えていない条件で、ディッシュより細胞外液のみを 400  $\mu$ L 採取、ディッシュには MTBSA++ 400  $\mu$ L を加えた。採取した上清はフィルター処理後、0 min 時の試料とした。その後、刺激剤として、CALCIUM IONOPHORE A23187 (SIGMA ; 111K4012)、PMA (12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate, SIGMA ; 42K1555) をそれぞれ、ディッシュ内での濃度が 1  $\mu$ M、30 nM となるように加え、同時に微分干渉顕微鏡を用いて、ビデオマイクロスコープ法による細胞の追跡を開始した。刺激剤を加えてから 1 min 後にディッシュより上清のみを 400  $\mu$ L 分取、ディッシュには同濃度の刺激剤を含む MTBSA++ 400  $\mu$ L を加えた。分取した細胞外液はフィルター処理後、1 min 時の試料とした。その後、同じように 5 min、15 min、30 min、60 min と分取を行い、試料とした。また、MTBSA++ に CALCIUM IONOPHORE A23187 を 1  $\mu$ M、PMA を 30 nM としたものを刺激剤試料とした。

脱塩・濃縮を行うため、zip tip C<sub>18</sub> (Millipore ; L2NN6767P) を使用した。試料をそれぞれ、0.1 % TFA (trifluoroacetic acid、関東化学 ; 205P4391) とし、zip tip C<sub>18</sub> でピペッティングを行った。溶出は超純水と methanol、acetic acid の混合水溶液 (49.5 : 49.5 : 1、v : v : v) 10  $\mu$ L にて行った。こうして、脱塩、濃縮された試料を nanoESI-TOF/MS にて測定し、解析を行った。

### 3-3 結果と考察

ビデオマイクロスコープで得られた映像と、各時間ごとの細胞外液より得られたマススペクトルを用いて解析を行った。ビデオマイクロスコープによる映像より、刺激後、細胞の様子を観察すると、図 3-1 に示すように変化が見られた。刺激後、5 min までの映像は刺激前 (0 min) とさほど変化ない。しかし、刺激後 15 min あたりから、細胞内の顆粒がはじけるのが確認された (図中矢印に示す)。その後、顆粒はどんどんはじけ、刺激後 30 min が経過すると、細胞外への顆粒の放出が見られはじめる (図中矢印)。60 min くらいになると、顆粒放出はほとんど起こらなくなるが、細胞溶液中には顆粒が浮遊して残っている状態が見られる。

これと同時に、採取した細胞上清の解析を行った。まず、刺激剤のみから得られたマススペクトルと 0 min の細胞外液から得られたマススペクトル、そして十分に脱顆粒が起こっている 30 min 後の細胞外液から得られたマススペクトルの比較を行った。 $m/z = 500$  以上の領域はほとんど差が見られなかったため、図 3-2 のように  $m/z = 100 \sim 500$  の領域で比較を行った。その結果、刺激剤のみからはほとんど検出されなかった  $m/z = 200.0$  のピークが、30 min 後の試料では強く見られることが確認された。そこで、図 3-3 に示すように、全ての試料について、 $m/z = 180 \sim 220$

の範囲を拡大し、比較を行った。その結果、刺激剤のみや、刺激後 0~15 min ではほとんど見られない、 $m/z = 200.0$  のピークが、刺激後 30 min で最大になることが確認できた。その後、60 min では逆にピークは小さくなる。

以上の結果をまとめる。まず、刺激剤のみ、または刺激を行う前のマスト細胞上清には、 $m/z = 200.0$  の分子は含まれていない。そこで、マスト細胞に刺激剤を与え、薬物刺激を引き起こす。1 min、5 min ではマスト細胞は反応を示さず、 $m/z = 200.0$  の分子も出現しない。しかし、15 min になるとマスト細胞内に含まれる顆粒がはじけはじめる。しかし、このときでもまだ、 $m/z = 200.0$  の分子は出現しない。30 min になると、マスト細胞から顆粒が放出される様子を観察することができる。このとき、細胞外液中には  $m/z = 200.0$  の分子が出現する。つまり、 $m/z = 200.0$  の分子は顆粒と共に、マスト細胞内から細胞外液に放出されたのではないかと考えられる。その後、60 min になると  $m/z = 200.0$  の分子は存在しないことから、代謝、分解などを受けやすい分子であることが考えられる。

また、 $m/z = 200.0$  のピークがどのような物質を示すのか、その分子式の予想を行った。分子式の予想は、Mariner のソフトウェアにて行った。その結果、ピークより表 4-1 に示すような分子が予想されることがわかった。今回、測定することのできた、 $m/z = 200.0$  の分子を単離することが可能になれば、インソースフラグメンテーションによる構造解析法と、表 3-1 に示す結果を組み合わせ、構造を予想することも可能である、と思われる。今後、脱塩、濃縮法などをさらに検討していくことによって、今回検出した  $m/z = 200.0$  の分子だけでなく、様々な分子をリアルタイムに追跡していくことが可能になるであろう。また、nanoESI ニードル自体で脱塩・濃縮を行うことのできるようにすれば、ニードルとマニピュレーター等を接続することで、細胞内成分、細胞外液を直接、ニードルで吸い取り、そのまま測定することも可能となる。

このように、nanoESI 法を用いることで、ビデオマイクロスコープ法によって今細胞に起こっている事の視覚的情報と、マススペクトルから得られる分子の情報を組み合わせることが世界で初めて可能となった。この方法により、ビデオマイクロスコープ法を使用し、細胞の反応を観察、細胞が顆粒を放出したとき、細胞の動きに変化があったとき、という風に、リアルタイムで、必要なときに細胞、もしくは細胞外液に含まれる分子を検出することが可能となり、今後のポストプロテオーム解析を推進する為の強力な手法が実際可能である事が分かった。

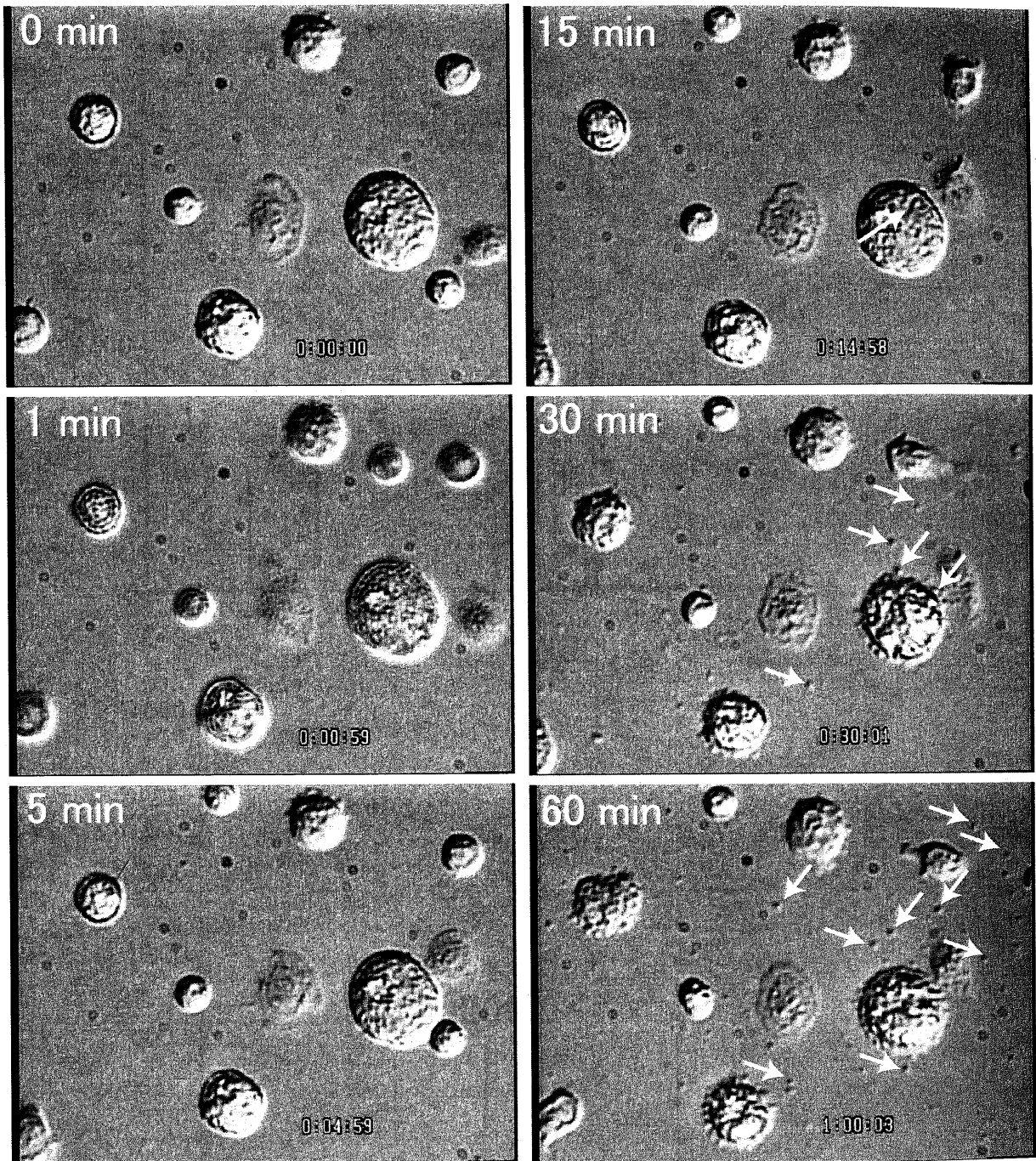


図 3-1 ビデオマイクロスコープ法によって捉えた薬物刺激後マスト細胞

微分干渉顕微鏡を用いたビデオマイクロスコープ法によって、薬物刺激後のマスト細胞を観察した。左側上段より、薬物混入を行ってから 0 min、1 min、5 min 後、右側上段より、薬物混入を行ってから 15 min、30 min、60 min 後の画像である。15 min くらいから、マスト細胞内で顆粒がはじける様子が観察される（図中矢印）。30 min になると、細胞外に放出された顆粒を確認することができる（図中矢印）。60 min では、顆粒の放出などは見られないが、細胞の周辺には放出された顆粒が浮遊しているのが確認される（図中矢印）。



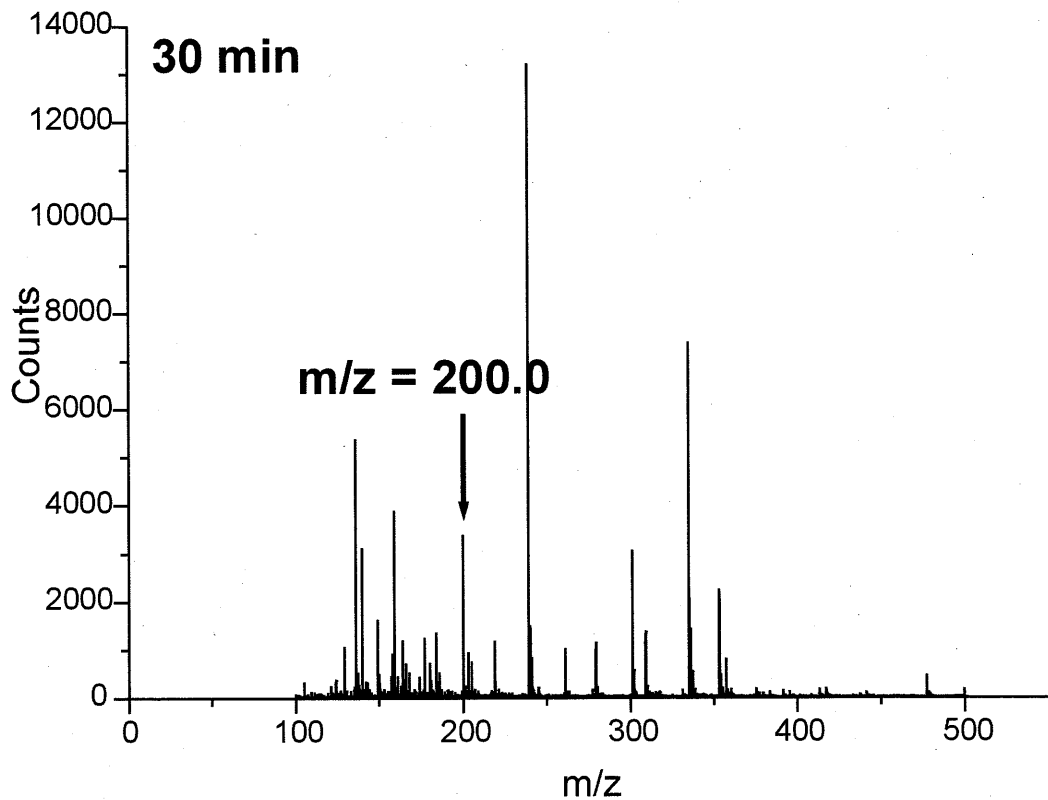
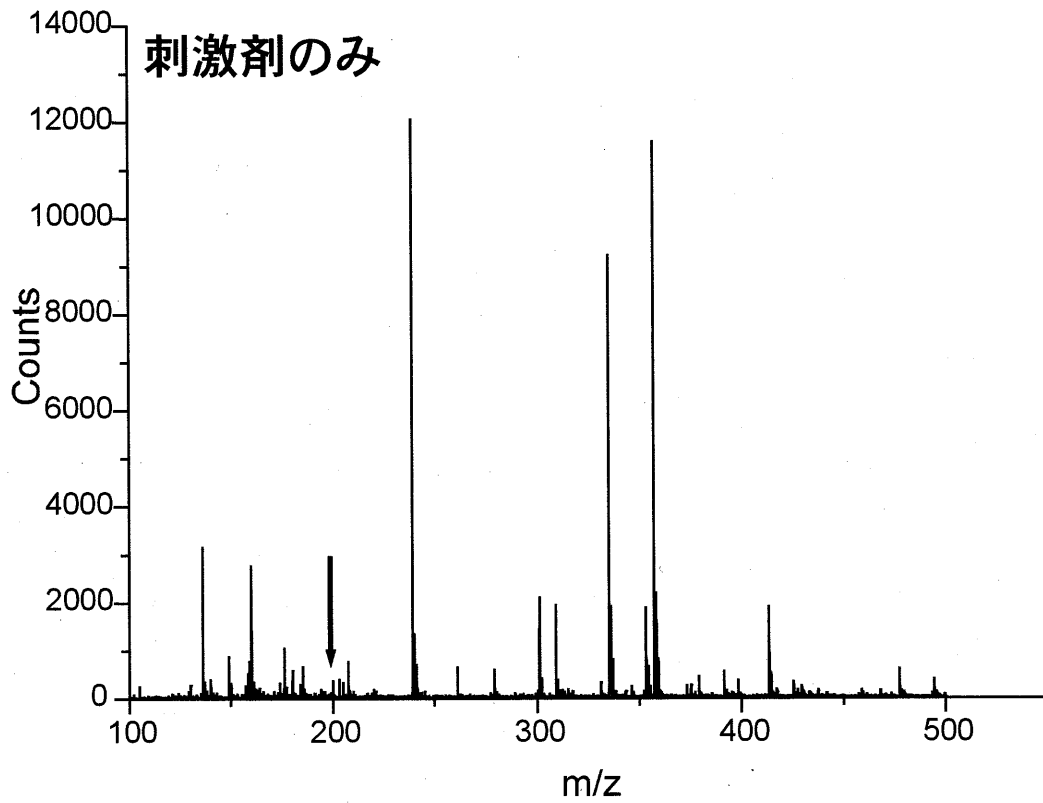


図 3-2 刺激剤由来のマススペクトルと刺激後細胞上清マススペクトルの比較  
 刺激剤から得られたマススペクトルと 30 min 後のマススペクトルの比較を行った。その結果、 $m/z = 200.0$  のピークの変化が見られた。

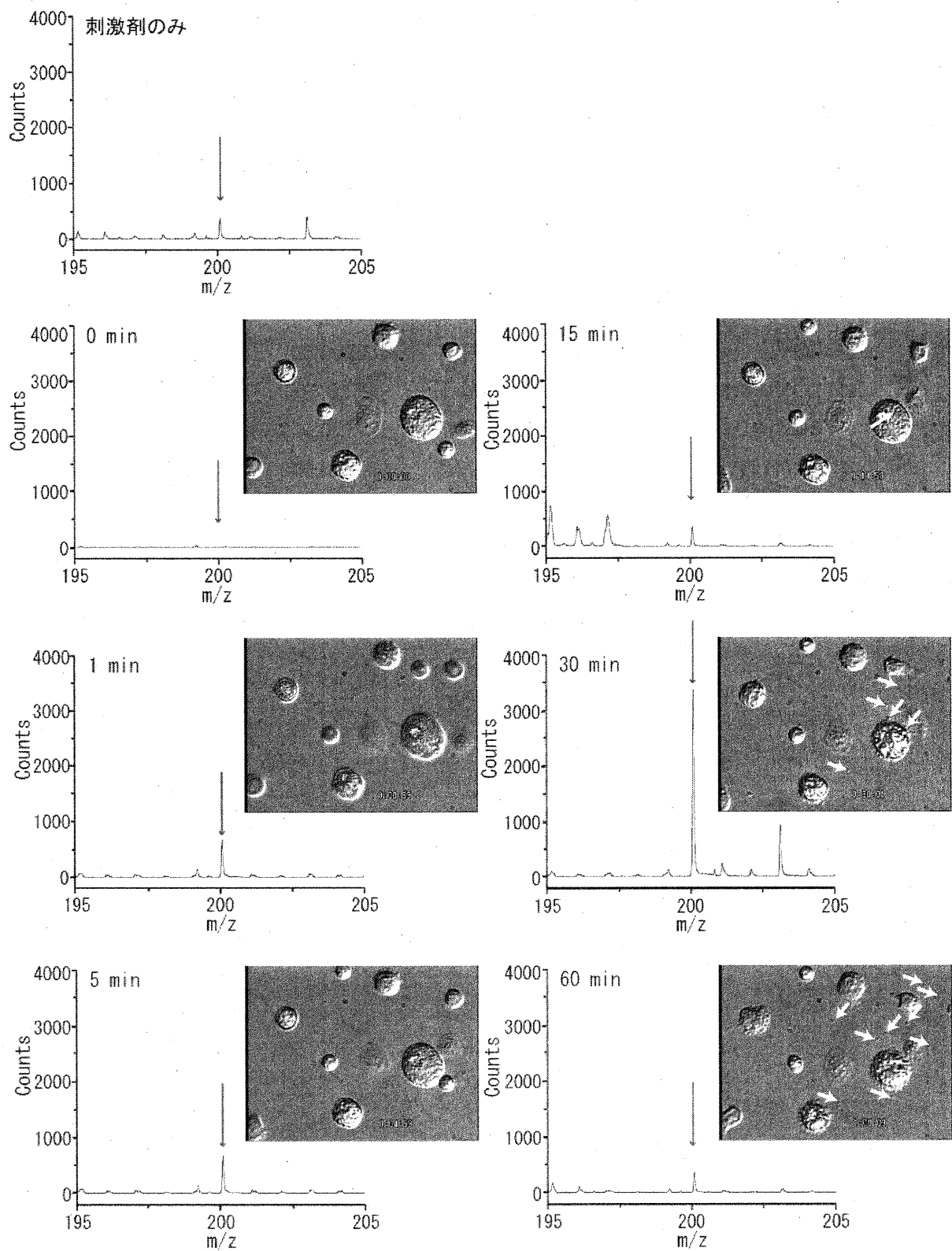


図 3-3 各条件での  $m/z = 200$  のピーク

時間に沿って、 $m/z = 200$  のピークを追跡すると時間と共に変化する、30 min で最も強くなることがわかった。

Index	Input $m/z$	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	Formula
23	200.0224	200.03903	-16.645	-83.2154	C3 H7 N5 O4 Na
25	200.0224	200.04143	-19.0503	-95.2404	C5 H6 N5 O4
20	200.0224	200.03721	-14.8321	-74.1521	C10 H7 N3 P
1	200.0224	200.02196	0.424	2.1196	C6 H7 N3 O3 P
2	200.0224	200.02357	-1.1935	-5.9667	C9 H8 N O Na P
3	200.0224	200.01955	2.8292	14.1445	C4 H8 N3 O3 Na P
4	200.0224	200.01896	3.4165	17.0805	C7 H6 N O6
5	200.0224	200.02598	-3.5987	-17.9917	C11 H7 N O P
6	200.0224	200.01793	4.4467	22.2308	C H7 N5 O5 P
7	200.0224	200.0179	4.4844	22.4197	C6 H3 N5 O2 Na
8	200.0224	200.02779	-5.4116	-27.055	C4 H7 N3 O5 Na
9	200.0224	200.01656	5.8218	29.1054	C5 H7 N O6 Na
10	200.0224	200.0302	-7.8169	-39.0799	C6 H6 N3 O5

表 3-1 Mariner により求めた、 $m/z = 200.0$  より予想される分子式

$m/z = 200.0224$  という情報のみから、計算される分子式。この分子を単離することができれば、インソースフラグメンテーションを用いた解析法で、構造式を予測することが可能となる。

#### 4 総括

以上の様に、ナノスプレーイオン化質量分析法とビデオ顕微観察を同時に用いて、細胞の実際の形態変化などの時間変化を追跡しながら、その時の分子動態を同時に追跡・解析する。世界的にも初めての“ビデオ-マススコープ”（我々の造語）法が実際に可能であることを証明し、今後のプロテオーム時代の後、ポストプロテオーム時代の解析手法として、極めて有望な可能性を提示することが出来た。

同時に、1ケの細胞内分子群の解析には、1細胞MALDI-TOF質量分析法が有用であり、それは実際可能であることも、また、細胞を光照射で痛めつけないで、長い時間選択的にビデオ顕微観察することもできる光ファイバー照射法（ピンファイバービデオマイクロスコープ法（我々の造語））も開発することに成功した。これら後者の研究成果については、次ページ以後に示す論文に既に発表しているので、ご覧戴きたい。

本研究費により、この様に我々の長年の目標であるビデオマススコープ法が確立出来たのみならず、周辺のいずれも世界で初めての手法開発が可能となったことに深く感謝する。