

Preparatory Problems IChO 2012

Theoretical Problems



問題22 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) によるペプチドの質量スペクトル

John Fenn (2002年ノーベル化学賞受賞 訳注：同時に田中耕一氏も受賞している。田中氏の功績はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) の原理の発見) は質量分析法に新しくエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) を導入し、生物学的に重要ではあるけれども不揮発性の分子 (例えばタンパク質) の質量分析を初めて可能にした。それ以来、ESIは数多くの生物学的な研究に幅広く利用され、生体に含まれるタンパク質の大規模な解析を目指したプロテオミクス (プロテオーム解析：生物が発現するタンパク質についての総合解析のこと) の諸問題を解決してきた。

ある生体分析化学者がいた。彼は2つのタンパク質混合物に含まれるミオグロビン (タンパク質の一種) の含有量の比 (どちらがどれだけ多くのミオグロビンを含むか) を測定するのに、ESI質量分析法を利用することを考えた。全タンパク質解析 (タンパク質を分離せずに混合物のままで全て解析すること) に挑戦するために、彼はペプチドのレベルに問題を簡素化することにした。2つの試料の中に含まれるペプチドの濃度の比は、同位体でタグを付けることで測定することができる。以下に示す分析のスキームについて考えよ。

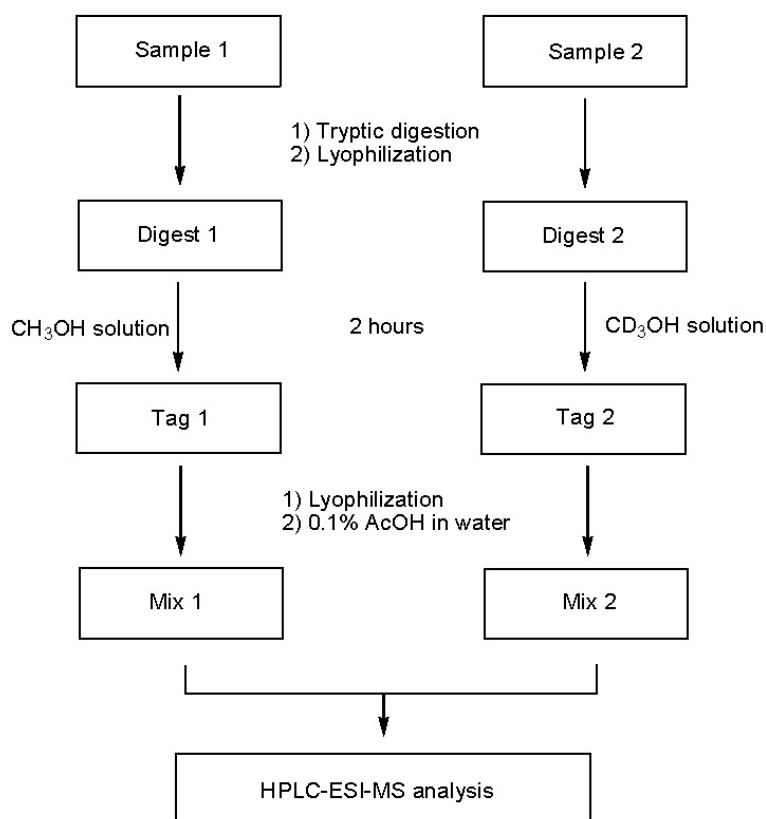
まず、2つの試料の中のタンパク質をトリプシン (タンパク質加水分解酵素) で加水分解し、加水分解された試料を凍結乾燥 (水を凍結状態で蒸発させ、ペプチドを残す操作) した。一方、ペプチドを同位体でタグ付けするために、氷浴で冷やしたメタノールに160 μL の塩化アセチルを滴下して、2種類のメタノール溶液を調製した。1つは1 cm^3 の CH_3OH を用い、もう1つは1 cm^3 の CD_3OH を用いた。

a) 塩化アセチルのメタノール溶液を調製する時に起こる化学反応 (複数であるかもしれない) を反応式で書け。

CH_3OH から調製した溶液を、加水分解して凍結乾燥したペプチド試料1に加えた。 CD_3OH から調製した溶液は、加水分解して凍結乾燥したペプチド試料2と合わせた。2時間後、両メタノール溶液から溶媒を留去して乾燥させた。10 μL の0.1%酢酸水溶液でそれぞれの残渣を溶解し、得られた溶液を混ぜ合わせた。次に、混合物を高速液体クロマトグラフィー-ESI質量分析装置 (訳注：高速液体クロマトグラフィーの検出部にESI質量分析装置を使い、高速液体クロマトグラフィーで分離されて溶出してきたそれぞれの化合物の質量 (正確には質量を電荷で割った値である質量電荷比 m/z) と量を測定する装置) にかき、タグ付けされ

たペプチドを分離して質量分析装置で検出した。

一連の操作を図にまとめて次に示す：



訳注：Tryptic digestion（トリプシンによる消化：加水分解）、Lyophilization（凍結乾燥）、HPLC-ESI-MS analysis（高速液体クロマトグラフィーESI質量分析装置による分析）

b) 同位体でタグ付けする反応（Tag 1とTag 2を与える反応）で、ペプチドにはどのような化学的な修飾が施されるか？ 塩化アセチルの役割は何か？

ペプチドは、ESIによるイオン化過程で多重のプロトン化を受け、全電荷が+1、+2、+3などのカチオンを生成する。その結果、単一同位体質量（それぞれの元素の最も存在量の多い同位体を元にした分子質量）がMのペプチドはESI質量スペクトルでは $[M+H]^+$ 、 $[M+2H]^{2+}$ 、 $[M+3H]^{3+}$ といったイオンのシグナルを与える。質量スペクトルで観測されるピークがどの電荷のイオンに相当するか(荷電状態)は、同位体ピークの間隔から決めることができる。

2つの試料（Mix 1とMix 2）の混合物の質量スペクトルで、あるタグ付けされたペプチドに相当する一連のピークが、 m/z 値で703.9 (100)、704.4 (81)、704.9 (36)、705.4 (61)、705.9 (44)、706.4 (19)に観測された。ここで、カッコ内の数字はピーク面積の比である。

- c) この一連のピークで、タグ付けされたペプチドの荷電状態はどうなっているか？
- d) 軽い方の同位体でタグ付けされたペプチドに相当する単一同位体質量ピークを同定せよ。さらに、このピークを元に、タグ付けされたペプチドの単一同位体質量を計算せよ。
- e) 重い方の同位体でタグ付けされたペプチドに由来する m/z 値はどれか？
- f) タグ付けされていないペプチドの単一同位体質量を計算せよ。

この実験を行った化学者は、ペプチドの質量とフラグメンテーションのパターンを解析することで、この一連のピークがミオグロビン由来のペプチドにタグ付けされたものを示していると結論した。

- g) 同位体による置換はイオン化の効率に影響しないと仮定し、一連のピークのピーク面積比を用いて、2つのタンパク質試料中のミオグロビンの含有量の比を計算せよ。
- h) この化学者が（タグを付けるのに） CD_3OH ではなく $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ を使ったならば、ピーク強度比はどうであったか？ ただし、 $^{12}\text{CH}_3\text{OH}$ と $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ でタグ付けされたペプチドでは、同位体の分布パターンは、質量スペクトル測定の実験誤差範囲内で同じであると仮定せよ。
- i) $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$ と CD_3OH では、試料の相対的な定量分析（含有量の比を求めること）を行なうのにどちらの試薬を用いる方が良いか？