

2016年度日本質量分析学会

## 学会賞



高山光男 氏 [横浜市立大学教授, 薬学博士]

〔業績〕 MALDI イソース分解の機構モデル構築と応用に関する研究

高山光男氏は、1976年より東邦大学薬学部質量分析室に勤務しながら、1980年に工学院大学工学部化学工学コースを卒業、その後、同大学助教授を経て、2001年に横浜市立大学へ転出後も一貫して質量分析に携わっている。高山氏の研究は、電子イオン化、化学イオン化、熱表面イオン化、高速原子衝撃 (FAB)、気相粒子衝突、エレクトロスプレーイオン化 (ESI)、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)、大気圧コロナ放電など原理の異なる種々イオン化法を用いているだけでなく、扱う試料もフラレンからタンパク質まで極めて広範である。一方で、その研究業績のほとんどが「イオン化」と「フラグメンテーション」に集中していることが特筆される。これは、「イオン化法と試料の組み合わせから生じる多様な現象の解明こそが、質量分析学の中心課題である」とする氏の研究姿勢からきている。高山氏は、質量分析装置を単なる道具ではなく“コンパクトで高度な実験室”として捉え、その中で起こるイオン反応現象そのものを研究課題としている。とりわけ氏の業績で注目すべきは、マトリックスを使う脱離イオン化法、MALDIとFABに関する研究である。

高山氏の推薦理由のなかで、とりわけ国際的評価の高い顕著な業績は、MALDI イソース分解に関する研究である。氏は、1995年より次田 皓教授 (東理大・生命研) と共同でタンパク質の化学分解の研究に取り組み、その途上1997年、MALDIによるペプチド主鎖のN-C<sub>α</sub>結合の特異的分解を独自に見いだしたが、この発見はすでに米国のBrownらが報告しており、イソース分解 (In-source decay; ISD) と名づけられていた (*Anal. Chem.*, **67**, 2990, 1995)。しかし氏は、当時誰も着手しなかったISDの原理の解明に向かい、1998年、イオン化とISDはイオン源内で独立に起こることを証明、2000年には、観測されるフラグメントイオンが構成アミノ酸に強く影響されることを見いだした。2001年、ISDのマトリックス依存性を調べ、2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) が最も優れていること、その反応はイオン源内で数十ns以内に起こる非エルゴード過程であることを報告した。注目すべきは、直後に提出した“水素結合を通じた分子間水素移動”の機構である。氏は、重水素化ペプチドと重水素化マトリックスを用いてMALDI-ISD実験を実施、さらにペプチドをドーブした2,5-DHBの結晶表面の原子間力顕微鏡像を得ることにより、ISDは、マトリックスからペプチドへの分子間水素移動によって起こるラジカル反応であることを証明した。その際、2,5-DHB結晶表面から露出した5位水酸基がペプチド主鎖のカルボニル酸素と水素結合しているといった明確な描像を論文中に示したことは、優れた洞察力と言わざるをえない。この発表以降、氏が提出した機構は、とりわけ海外研究者に取り上げられ、2003年、M. KarasがMALDIのイオン化機構の総説で (*Chem. Rev.*, **103**, 427, 2003)、2007年にはJ. HardouinがMALDI-ISDの総説で全面的に紹介している (*Mass Spectrom. Rev.*, **26**, 672, 2007)。さらにF. Hillenkampもその著書中で取り上げている (MALDI MS, Wiley-VCH, 2007, pp.15-16)。これらの国際的評価を受け、MALDI-ISDの機構が、氏の名前を冠して“Takayama's model”と名づけられたことは、本邦の質量分析学者として異例のことと言える (*Anal. Chem.*, **79**, 8678, 2007; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **20**, 326, 2009)。しかし、氏の提出したモデルの妥当性が真に認められるに至ったのは、R. Zubarevのグループが追実験を行い、分子間水素移動の正しさを再確認してからである (*Anal. Chem.*, **77**, 172, 2005)。氏の言によれば、当時、ZubarevはESIを使うelectron capture dissociation (ECD) の機構解明の最中で、高山氏のISDモデルには懐疑的であり、むしろMALDIイオン源で発生した自由電子が多価イオンのプロトンに付加するECD機構を考えていたとのことである。しかし、2005年の追実験によって分子間水素移動の機構が正しかったことを、質量分析総合討論会 (広島, 2007) に招待されたZubarev本人から直接伺ったとのことである。上記の国際的評価以前、高山氏が米国質量分析学会ASMS (Long Beach, 2000) で発表したMALDI-ISDの研究は、ほかに先んじてすでに英国雑誌で紹介されていたことは特記すべきことと言える (*Yeast*, **17**, 322, 2000)。

MALDI分析一般に言えることであるが、MALDI-ISDもマトリックスの選択が重要であり、特にベンゼン環上の各種官能基の位置がマトリックスの機能に影響を与える。高山氏は、MALDI-ISDの原理解明とモデル構築を通じ、水素原子放出の機能部位として5位水酸基の重要性を指摘している。実際、氏は、その後も各種位置異性体の中でも5位にアミノ基、アルデヒド基、ニトロ基などを有するマトリックスには、分子間水素移動反応に伴うISD現象が顕著に起こることを報告している。

近年の高山氏のMALDI-ISDのタンパク質科学への応用は際立っている。氏は、ISDの解析プログラム開発やトップダウンプロテオミクスへの応用も行っているが、一方で、従来の質量分析がなしえなかった二次構造解析への道を開拓している。氏は2002年、動物種の異なる3種のアミノ酸を用い、ISDスペクトル中に特別に高いフラグメントイオンピーク

が再現性良く出現することに注目し、そのピークが二つのヘリックスに挟まれたターン構造のグリシン残基 (Gly) の分解に由来することを突き止めた。本研究は上記Hardouinの総説でも取り上げられているが、10年が経過した2012年、氏特有のユニークな視点から同研究を再開している。すなわち、タンパク質が翻訳後修飾を受けたり薬物と相互作用したりする際、主鎖の柔軟性が重要な役割を負っていることに着目し、X線結晶構造解析やNMRによって共通に得られている柔軟アミノ酸残基 (Asp, Asn, Gly) をMALDI-MSDで特別に高いピークを与えるアミノ酸残基 (Asp, Asn, Gly) と比較し、よく一致することを世界に先駆けて発表している。X線解析では、Asp, Asn, Gly残基は柔軟な $\beta$ -ヘアピン構造部位に現れることが知られ、NMRでは、主鎖アミド水素と重水素溶媒とのH/D交換相互作用の速度定数で柔軟性を評価する。このことから、MALDI-MSDにおけるマトリックスの移動性水素 (-OHまたは-NH<sub>2</sub>) とタンパク質主鎖のカルボニル酸素との水素結合相互作用は、水素交換か水素移動かの違いはあるが、NMRにおける相互作用と共通している。このことより氏は、MALDI-MSDが、X線やNMRに継ぐタンパク質の柔軟性アミノ酸残基の新しい解析法になりうるとして挑戦的な研究を現在も展開中である。

最後に、高山氏のFABに関する業績も挙げておきたい。氏の学位論文は「プレニルフラボノイド類のFAB質量分析法, 1990」、本学会奨励賞も「高速原子衝突によるイオン生成機構, 1994」で受賞している。受賞後もFABのイオン化機構の解明に取り組み、各種試料イオン ( $M^+$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M-H]^-$ ,  $M^-$ ) の生成を、マトリックスと試料の構造・物性から精緻に解析している。特に、10 eV以上の電子励起が必要な分子イオン $M^+$ の生成については、化合物を変えて繰り返しその生成機構の解明に挑み、電荷交換反応であることを突き止めている。FABの機構解明やマトリックス研究に基づき、氏が提出した“Cavity model”は、M. VestalやG. Cooksの脱離イオン化モデルと並びFABの有力モデルとして国際的に評価されている (*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 1781, 2003)。また、FABのイオン収量の実験結果を、Cavity modelと衝突論に基づいて導出したイオン収量の式でその傾向を再現することに成功している。その際、氏はイオン収量の基本式をイオン化確率と気体試料濃度の積で表したが、その後、イオン化効率と気化流束の積に改良し、構成式 (Constitutional equation) としてFAB, MALDI, ESIのイオン収量の解析に利用し、ほかのイオン化法にも適用可能であることを詳説している。

高山光男氏は、上に挙げた直接推薦対象とする業績以外に、質量分析に関連する原著論文100報近くを有し、単著・共著・分担などを含めた著書 (15冊) や邦文解説記事 (18報) などもあり、幅広く質量分析学に貢献してきたことがうかがえる。とりわけ、上に記載したマトリックスを使う脱離イオン化の国際的な研究業績は、その内容からも、未解明課題に対する徹底した追求姿勢からも際立っており、日本質量分析学会・学会賞に相応しいと認められた。

### 授賞対象業績リスト

#### A. 受賞の対象となる研究成果を著した本学会誌に掲載の原著論文

- 1) M. Takayama, “Ionization efficiency of matrix surface bombarded with Xe, Ar and He beams,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 33-36 (1998).
- 2) M. Takayama, “Susceptible region of myoglobins to in-source decay using matrix-assisted laser desorption/ionization coupled with reflectron time-of-flight mass spectrometer,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 304-310 (2003).
- 3) M. Takayama, I. Osaka, and M. Sakakura, “Influence of secondary structure on in-source decay of protein in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry,” *Mass Spectrom.* (Tokyo), A0001 (2012).
- 4) M. Takayama, “Flexible Xxx-Asp/Asn and Gly-Xxx residues and formation of c-/z-ion pair of equine cytochrome c in matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry,” *Mass Spectrom.* (Tokyo), A0007 (2012).

#### B. 学会誌に掲載されたその他の著作

- 1) M. Takayama, “Suitable matrices for various compounds in fast atom bombardment mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **42**, 11-23 (1994).
- 2) M. Takayama, “Formation of  $[M-H]^-$  ions under fast-atom bombardment conditions: Which is reflected, gas-phase or solution chemistry?,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **43**, 279-291 (1995).
- 3) M. Takayama, T. Kosaka, and T. Kinoshita, “Formation of  $[M-H]^+$  ions under fast atom bombardment conditions: Trolox and  $\alpha$ -tocopherol,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **44**, 473-481 (1996).
- 4) M. Takayama, “Fast atom bombardment mass spectrometry: Ionization mechanism,” *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **44**, 501-530 (1996).
- 5) 高山光男, 高橋利枝, “高速原子衝撃質量分析法におけるマトリックスの選択基準”, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **44**, 493-497 (1996).
- 6) 高山光男, “各種質量分析分解法におけるインソース分解の特徴”, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **50**, 337-349 (2002).

C. 上に記載した以外で受賞の対象となる研究成果を著した代表的な原著論文等の著作および関連資料

- 1) M. Takayama, "Formation of deprotonated molecules  $[M-H]^-$  of  $\alpha$ -tocopherol under fast-atom bombardment conditions," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 309-312 (1994).
- 2) M. Takayama, M. Iwamura, and S. Fuchibe, "Formation of  $M^+$  ions produced under matrix fast atom bombardment conditions: Does charge exchange reaction occur?," *Org. Mass Spectrom.*, **29**, 601-606 (1994).
- 3) M. Takayama, "Formation and collision-induced dissociation of adduct ions  $[\text{matrix} + C]^+$  ( $C = \text{Li, Na, Cs and NH}_4$ ) produced under fast atom bombardment conditions," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **136**, 35-44 (1994).
- 4) M. Takayama, "Formation of  $M^+$  ions and electronic excitation under fast-atom bombardment conditions by using a liquid matrix," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 114-119 (1995).
- 5) M. Takayama, "How is the molecular ion of  $\alpha$ -tocopherol formed under fast-atom bombardment conditions?," *J. Mass Spectrom.*, **30**, 1352-1358 (1995).
- 6) M. Takayama and A. Tsugita, "Does in-source decay occur independent of the ionization process in matrix-assisted laser desorption?," *Int. J. Mass Spectrom.*, **181**, L1-L6 (1998).
- 7) M. Takayama, and A. Tsugita, "Sequence information of peptides and proteins with in-source decay in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry," *Electrophoresis*, **21**, 1670-1677 (2000).
- 8) M. Takayama, "In-source decay characteristics of peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 420-427 (2001).
- 9) M. Takayama, "N-C $_{\alpha}$  bond cleavage of the peptide backbone via hydrogen abstraction," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 1044-1049 (2001).
- 10) J. Gao, A. Tsugita, M. Takayama, and L. Xu, "A programmable fragmentation analysis of proteins by in-source decay in MALDI-TOF mass spectrometry," *Anal. Chem.*, **74**, 1449-1457 (2002).
- 11) 高山光男, "マトリックス支援レーザー脱離イオン化法を使うタンパク質の構造研究", *レーザー研究*, **31**, 9-12 (2003).
- 12) 高山光男, "質量分析装置のためのイオン化法 総論", *ぶんせき*, **1**, 2-7 (2009).
- 13) M. Takayama, S. Sekiya, R. Imuro, S. Iwamoto, and K. Tanaka, "Selective and nonselective cleavages in positive and negative CID of the fragments generated from in-source decay of intact proteins in MALDI-MS," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **25**, 120-131 (2014).
- 14) M. Takayama, K. Nagoshi, R. Imuro, and K. Inatomi, "Access of hydrogen-radicals to the peptide-backbone as a measure for estimating the flexibility of proteins using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry," *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 8428-8442 (2014).