

Fig.19 肝臓から得られた PIM-MS の主成分プロット  
主成分 1-2-3

●: Control, ●: APAP 500mg/kg, ●: APAP 800mg/kg,  
●: PB, ●: PB+APAP 500mg/kg, ●: PB+APAP 800mg/kg

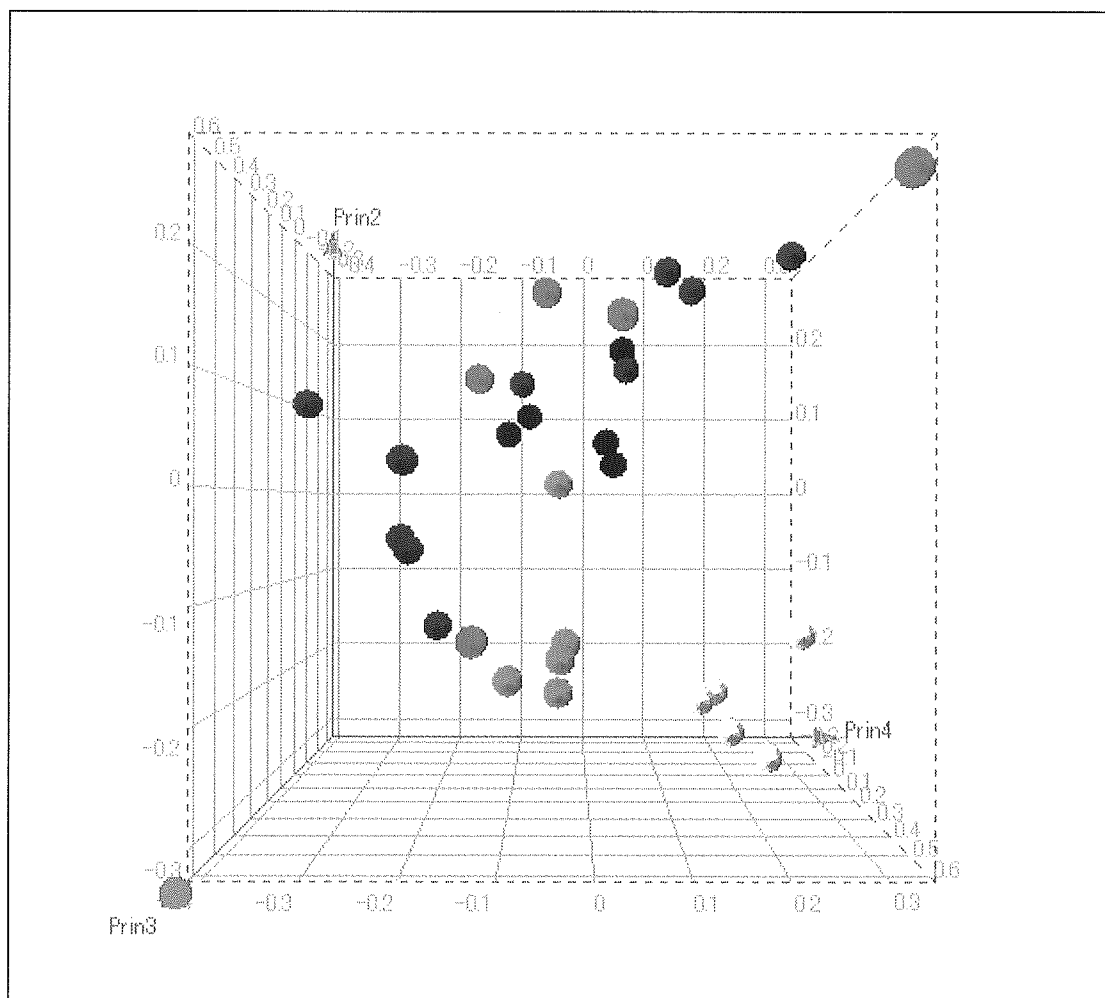


Fig.20 肝臓から得られた PIM-MS の主成分プロット  
主成分 4-2-3

● : Control, ● : APAP 500mg/kg, ● : APAP 800mg/kg,  
● : PB, ● : PB+APAP 500mg/kg, ● : PB+APAP 800mg/kg

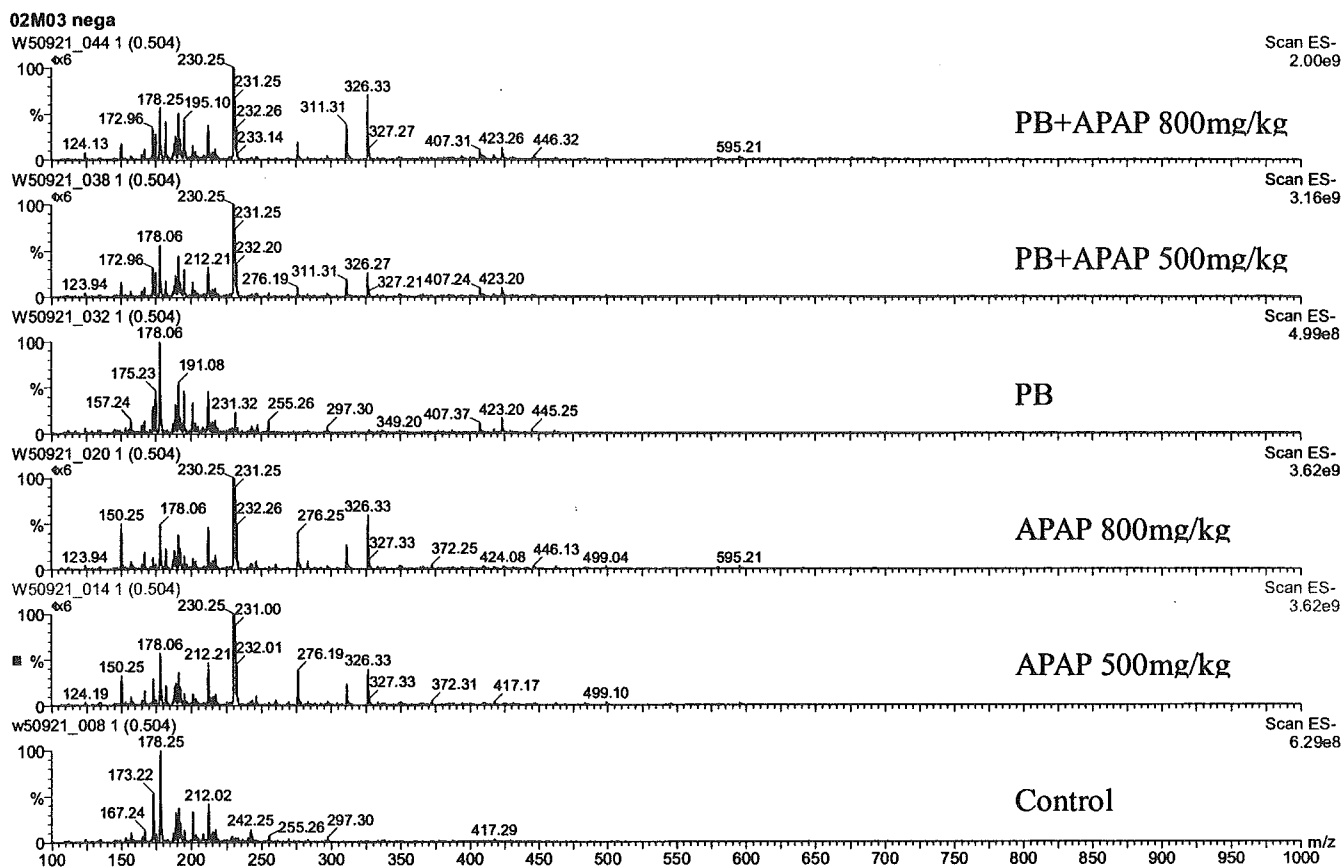


Fig.21 尿の代表的な NIM-MS スペクトル

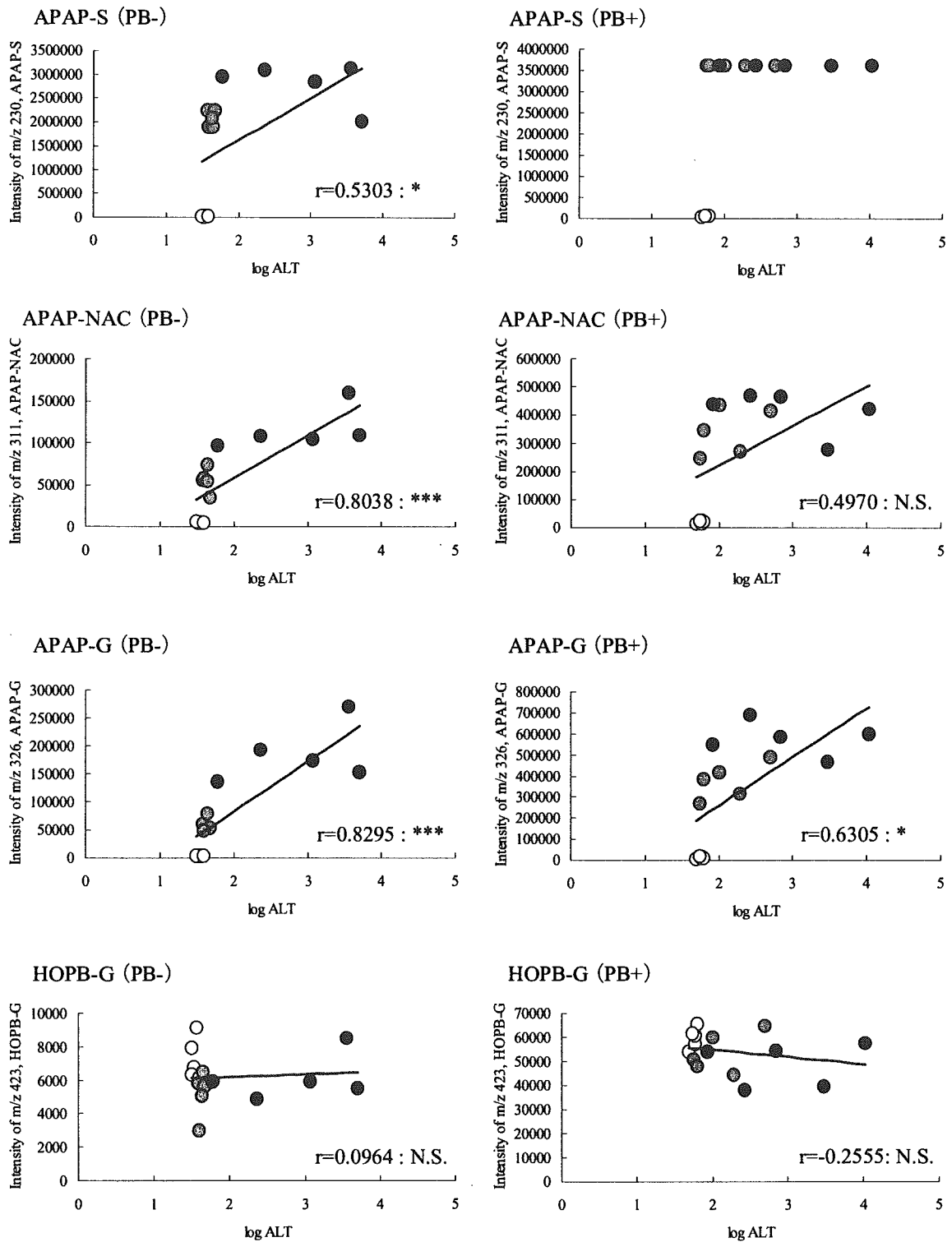


Fig.22 肝障害マーカーと尿中 APAP 代謝物および PB 代謝物との相関性  
に対する PB 処置の影響

左 : PB 前処置なし, 右 : PB 前処置あり, ○ : Control, ● : AP 500, ● : AP 800

N.S.: not significant, \*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001

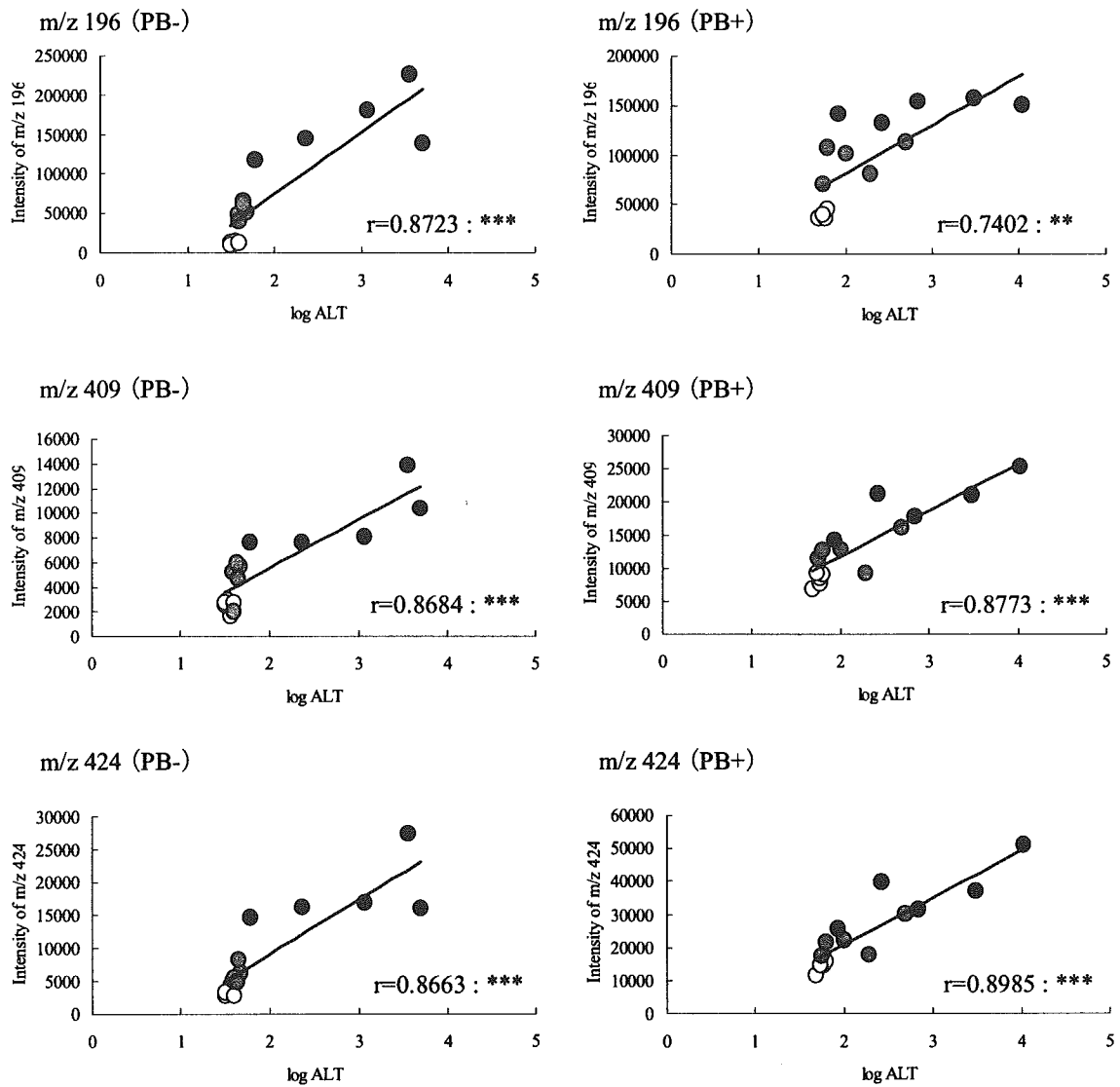


Fig.23 肝障害マーカーと代表的な NIM-MS との相関性に対する  
PB 処置の影響

左 : PB 前処置なし, 右 : PB 前処置あり, ○ : Control, ● : AP 500, ● : AP 800

N.S.: not significant, \*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001

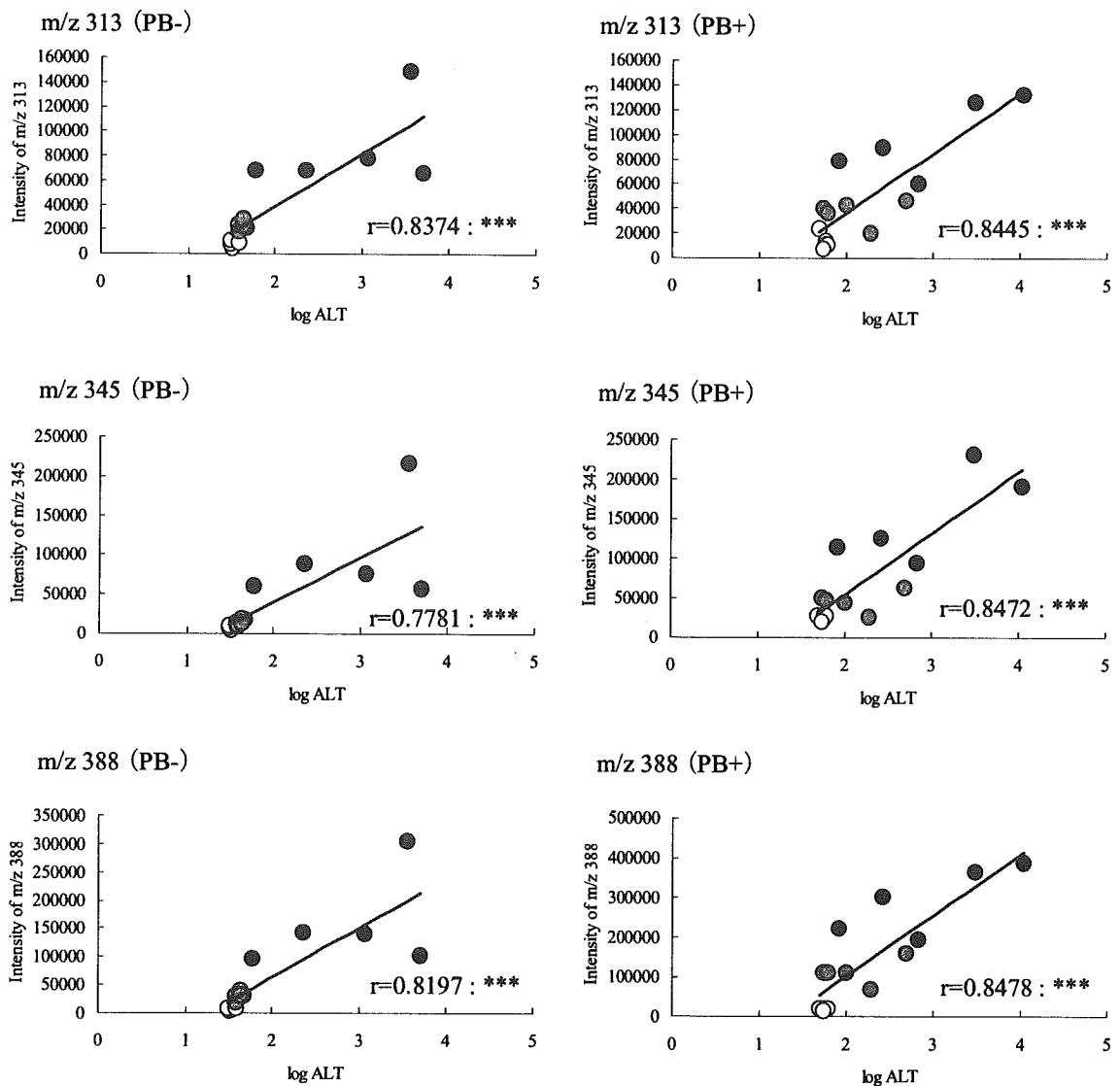
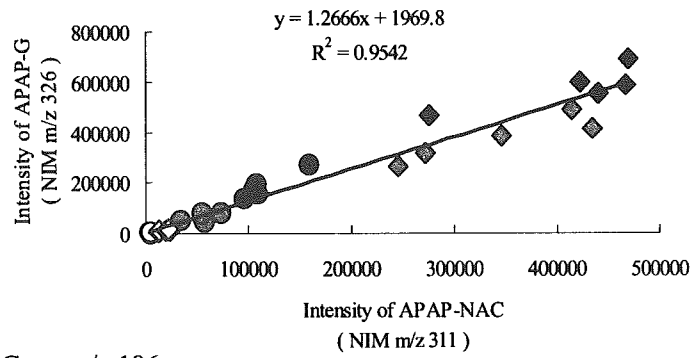


Fig.24 肝障害マーカーと代表的な PIM-MS との相関性に対する  
PB 処置の影響

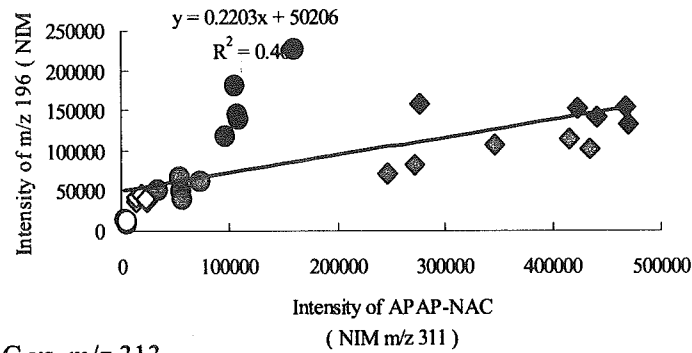
左 : PB 前処置なし, 右 : PB 前処置あり, ○ : Control, ● : AP 500, ● : AP 800

N.S.: not significant, \*:p<0.05, \*\*:p<0.01, \*\*\*:p<0.001

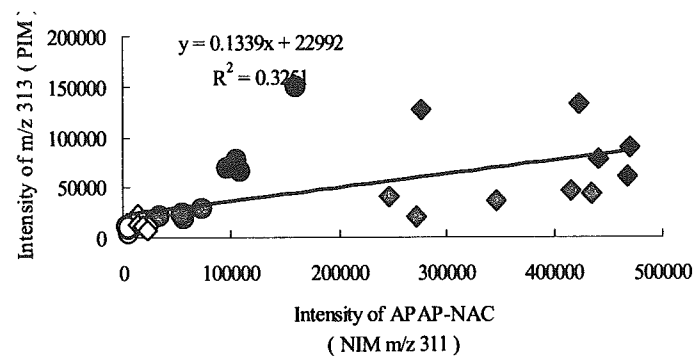
APAP-NAC vs. APAP-G



APAP-NAC vs. m/z 196



APAP-NAC vs. m/z 313



m/z 196 vs. m/z 313

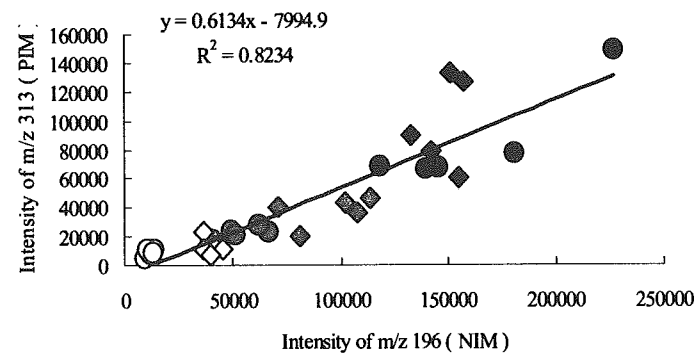


Fig.25 代謝物とバイオマーカー候補の相関性

○ : Control, ● : AP 500, ● : AP 800, ◇ : PB, ◆ : PB+AP 500, ◆ : PB+AP 800

Appendix 1 Pathological and urinary data of combined administration of PB and APAP in the rat

PB mg/kg	APAP mg/kg	Sample No.	Body g	Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL
				g	g%	g	g%	g	g%	
0	0	01M01	205	7.47	3.64	0.79	0.38	0.81	0.39	13.05
		01M02	192	6.61	3.44	0.72	0.37	0.68	0.35	11.11
		01M03	188	6.09	3.23	0.76	0.41	0.70	0.37	10.85
		01M04	192	5.88	3.05	0.72	0.37	0.71	0.37	8.65
		01M05	192	6.00	3.13	0.66	0.35	0.71	0.37	10.53
		Mean	193.9	6.409	3.301	0.730	0.376	0.722	0.372	10.838
		S.D.	6.4	0.655	0.240	0.048	0.021	0.051	0.015	1.569
500	500	02M01	198	6.77	3.42	0.81	0.41	0.79	0.40	11.35
		02M02	187	6.15	3.29	0.76	0.41	0.76	0.40	14.62
		02M03	186	6.21	3.34	0.70	0.38	0.75	0.41	10.23
		02M04	175	5.67	3.23	0.72	0.41	0.69	0.39	12.58
		02M05	174	5.54	3.19	0.68	0.39	0.66	0.38	10.36
		Mean	183.9	6.067	3.296	0.735	0.400	0.728	0.396 *	11.828
		S.D.	10.0	0.489	0.088	0.053	0.014	0.054	0.011	1.823
800	800	03M01	175	6.71	3.85	0.75	0.43	0.76	0.44	16.46
		03M02	177	6.56	3.70	0.73	0.41	0.72	0.41	14.44
		03M03	172	5.46	3.18	0.71	0.41	0.68	0.40	11.18
		03M04	173	6.05	3.50	0.72	0.42	0.72	0.42	13.85
		03M05	161	5.92	3.68	0.65	0.40	0.64	0.40	14.75
		Mean	171.4 **	6.140	3.582	0.711	0.415 **	0.705	0.411 **	14.136 *
		S.D.	6.3	0.506	0.258	0.038	0.009	0.045	0.016	1.916

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnnett's test)



Appendix 1 (Continued)

PB mg/kg	APAP mg/kg	Sample No.	Body g	Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL
				g	g%	g	g%	g	g%	
100	0	04M01	210	10.17	4.84	0.76	0.36	0.79	0.38	9.14
		04M02	204	9.45	4.62	0.79	0.39	0.76	0.37	7.95
		04M03	218	10.71	4.92	0.86	0.40	0.81	0.37	9.28
		04M04	210	10.11	4.81	0.81	0.38	0.79	0.38	9.42
		04M05	205	9.65	4.72	0.79	0.39	0.76	0.37	9.21
		Mean	209.4	10.018	4.781	0.803	0.383	0.783	0.374	9.000
		S.D.	5.5	0.494	0.113	0.038	0.013	0.022	0.004	0.596
500	500	05M01	210	9.73	4.63	0.82	0.39	0.78	0.37	16.38
		05M02	200	9.51	4.75	0.81	0.40	0.82	0.41	10.37
		05M03	203	9.50	4.67	0.79	0.39	0.78	0.38	11.83
		05M04	198	9.63	4.87	0.76	0.39	0.73	0.37	8.94
		05M05	193	9.25	4.80	0.79	0.41	0.73	0.38	10.38
		Mean	200.9	9.525	4.743	0.794	0.395	0.767	0.382	11.580
		S.D.	6.5	0.181	0.097	0.021	0.011	0.039	0.016	2.871
800	800	06M01	212	9.52	4.48	0.82	0.39	0.81	0.38	14.66
		06M02	201	9.83	4.89	0.81	0.40	0.81	0.40	12.21
		06M03	193	10.57	5.47	0.88	0.46	0.82	0.42	35.83
		06M04	192	9.21	4.80	0.82	0.43	0.78	0.41	32.82
		06M05	193	8.70	4.52	0.78	0.41	0.78	0.40	8.63
		Mean	198.1 *	9.566	4.835	0.821	0.415 *	0.799	0.404 **	20.830 *
		S.D.	8.8	0.701	0.399	0.036	0.027	0.019	0.016	12.550

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \*\* p < 0.01 (Dunnett's test)

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

メタボロミクス・プロテオミクス解析技術の高度化試薬の開発  
ならびに毒性軽減構造修飾法の開発

分担研究者：宮田直樹 名古屋市立大学大学院 薬学研究科教授

**研究要旨**

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行っている。フラールレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラールレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラールレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラールレンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘導体化体が効率良く検出できることを確認した。

また、化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響を解析し、メタボロミクス・プロテオミクス研究に役立つ知見を得る目的で、毒性が報告されている化合物としてエダラボン（脳梗塞急性期治療薬、腎毒性）をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成を開始した。

**研究協力者**

中川秀彦 名古屋市立大学大学院  
薬学研究科助教授  
鈴木孝禎 名古屋市立大学大学院  
薬学研究科助手  
津元裕樹 武蔵野大学薬学部助手  
名古屋市立大学大学院  
薬学研究科研究員

題「メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発」および「メタボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究」を担当している。

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、LC/MS/MS や MALDI TOF/TOF-MS/MS などのソフトイオン化質量分析に利用可能なペプチド誘導体化試薬の開発を行っている。フラールレン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイ

**A. まえがき**

本研究事業「非侵襲試料を用いた新規高感度安全性予測系の開発」の分担研究課

オン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラーレンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラーレン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体（アミノ基修飾試薬）を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体反応が完結するための条件を確立するとともに、誘導体化試薬を用いてフラーレンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘導体化が効率良く検出できることを確認した。

メタボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究化学物質の構造修飾が毒性発現に及ぼす影響を解析する研究では、毒性が報告されている化合物としてエダラボン（脳梗塞急性期治療薬、腎毒性）をモデル化合物として選び、脂溶性/水溶性を制御した一連の化合物の合成を開始した。

本年度は、メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発に関する研究成果を報告する。

## B. 研究目的

生体内の機能はタンパク質の量的変動だけでなく、リン酸化等の翻訳後修飾による質的変動によっても調節される。翻訳後修飾に関する情報はゲノム解析では得られないため、実際に機能しているタンパク質を解析するプロテオーム解析が盛んに行われている。ペプチドやタンパク質の同定には Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) や Electrospray Ionization (ESI) といったソフトイオン化法を用いた質量分析法 (mass

spectrometry; MS) が用いられるが、リン酸化ペプチドは強い負イオンを有するため、感度の良い正イオン検出モードで測定した場合、他のペプチド鎖に比べて感度が著しく下がってしまう。それゆえ、検出感度を向上させることが大きな課題となっている。また、MS は安定同位体標識を利用して正常と異常など異なった状態にある組織や細胞でのタンパク質発現の定量研究においても重要な役割を果たす。

そこで、すべてのペプチドに存在する N 末端のアミノ基にイオン化効率を向上させるような化合物を化学修飾させれば、イオン化効率の悪いリン酸化ペプチドなどの検出を容易にするが可能になる。また、N 末端を修飾することにより、MS/MS によりアミノ酸配列を解析する際、N 末端由来のピークが C 末端由来のピークに対して相対的に大きくなること、また、N 末端由来のピークのみ分子量が変化することから MS/MS によるアミノ酸配列解析が容易になることが期待できる。さらに、分子量の異なる試薬を用いることにより、発現量に差のあるタンパク質の同定や相対的定量を行うことも可能になる。

### 図 1

すでに我々は、ペプチドの N 末端修飾試薬として、活性ニコチン酸誘導体がソフトイオン化に適した誘導体化試薬であることを報告している (*Chem. Pharm. Bull.*, 51(12), 1399(2003))。

今回、我々は、フラーレンの物理化学的特性に着目し、ペプチドにフラーレン構造を導入すれば、イオン化効率が向上

し、ソフトイオン化による質量分析が容易になると考え研究に着手した。

### C. 研究方法と結果

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発は、分担研究代表者 宮田が指導し、名古屋市立大学薬学研究科の中川秀彦助教授、鈴木孝禎助手、津元裕樹研究員、および、大学院生の協力のもとで研究を遂行した。

#### 1. フラーレンの物理化学的特性

$C_{60}$  に代表されるフラーレンは、グラファイト（黒鉛）とダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同素体であり、1985年にその存在が初めて実験的に示され、5年後の1990年に多量合成が報告された。フラーレンはまったく新しい形をもつ炭素の物質群であり、その魅力的な球状幾何学により、フラーレン研究は多くの科学者の興味を集めている。

#### 図 2

$C_{60}$  は、炭素 60 原子からなる直径約 7 Å の球状化合物で、表面は 60 個の p 軌道 (30 個の共役した  $\pi$  結合) で覆われている。フラーレンの物理化学的性質としては、電子欠損性、光増感作用、ラジカル補足作用などが知られている。このような物性に起因して、 $C_{60}$  の TOF-MS 測定では、matrix (気化補助剤) 支援なしで測定が可能であること、アニオン検出 (ネガティブモード測定) が容易であることが知られている。よって、 $C_{60}$  をペプチドに結合させれば、ソフトイオン化による質量分析が容易になると考えられ、フラーレ

ン構造をペプチドに導入する化合物は、ユニークなソフトイオン化用の誘導体化剤になると考えられる。

#### 図 3

そこで、我々は、 $C_{60}$  をペプチドのアミノ基に緩和な条件で効率良く導入することのできる誘導体化試薬の開発に着手した。

#### 図 4

アミノ基修飾官能基としてはカルボン酸を、また、カルボン酸の活性化はヒドロキシコハク酸 (NHS) エステルおよびペンタフルオロフェニル (PFP) エステル化を考えた。

#### 図 5

NHS エステルとして化合物 1、2a、2a-d<sub>5</sub>、2b、2c を、また、PFP エステルとして化合物 4a、4a-d、4b を合成した。

#### 図 6

#### 図 7

合成したフラーレン構造を有する活性カルボン酸を用いて、アミノ酸やペプチドの誘導体化反応を行った。誘導体化実験の手法を図 8 に示す。

#### 図 8

誘導体化反応は、図 9 に示すアミノ酸およびペプチドを用いて行った。その結

果、図に示す化合物のアミノ基へのフラーレンカルボン酸の導入反応が、室温下収率良く進行することがわかった。

図 9

次に、フラーレンカルボン酸が付加した化合物のイオン化しやすさを確認するために、マトリックスの影響を調べた。その結果、予想通り、フラーレンカルボン酸が付加したアミノ酸やペプチドでは、マトリックス非存在下でも効率良くネガティブモードで TOF-MS 測定できることがわかった。図 10 には、 $\beta$ -アラニン、4-アミノブタン酸、6-アミノヘキサン酸、N-Z 化ロイシンについて、マトリックスなし (LD) で測定した結果を示す。このように低分子では、マトリックスなしで優れたイオン化能が確認できた。ただし、ペプチドを誘導体化した化合物などの測定では、シアノヒドロキシ桂皮酸などのマトリックスを共存させた方が良い結果が得られることもあった。

図 10

また、図 11 には、ペンタペプチド (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) を、ネガティブモードとポジティブモードで測定した結果を示す。ネガティブモードの結果の方が感度良く分子イオンピークが観測できる。

図 11

さらに分子量の大きなペプチドの測定

に使用できることを確認するために、分子量 1819 の Bradykinin を用いて誘導体化後 TOF-MS 分析を行った。その結果を図 12 に示す。

図 12

次に、複数のペプチド混合物の測定に適用したときの定量性を調べるための実験を行った。

図 13 に示すように、誘導体化試薬 1、2a、2b のいずれを用いた場合でも、Gly、 $\beta$ -Ala、Gly-Gly、Leu-Gly、Tyr-OEt を含む混合物の TOF-MS 測定により、それぞれの分子イオンピークを確認することができた。

図 13

次に分子量が5異なる誘導体化試薬 2a と 2a-d<sub>5</sub> を用いてこの混合物を TOF-MS 測定における定量性を調べた。その結果、濃度が2倍異なる混合物溶液をそれぞれ誘導体化試薬 2a と 2a-d<sub>5</sub> で誘導体化した後、両液を混合してそれぞれの化合物の誘導体化体の比率を調べた結果、5化合物すべてにおいて、期待値 0.5 にほぼ一致する値が得られた。この結果は、混合物においても定量的測定が可能であることを示す。

図 14

次に、今回開発した誘導体化剤の定量的測定範囲を確かめるために、濃度の異なる Gly と、誘導体化試薬 2a と 2a-d<sub>5</sub> を用いて実験を行った。その結果、20 倍の範囲で定量性のある測定が可能であるこ

とが示唆された。

#### 図 15

最後に、分子量 554 のロイシンエンケファリンを用いて、検出限界を調べた。その結果を図 16 に示す。

#### 図 16

その結果、検出限界は現時点で約 6pmol であることがわかり、TOF-MS 測定のための誘導体化試薬として十分な感度が得られることがわかった。

#### D. 結論と考察

本研究事業では、「メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発」および「タボロミクス・プロテオミクス解析情報を利用した化学物質の毒性軽減構造修飾研究」を担当している。

メタボロミクス・プロテオミクス解析に利用可能な高感度誘導体化試薬の開発研究では、フラールン骨格の物理化学的特性がペプチドのソフトイオン化に有用と考え、ペプチドのアミノ基にフラールンを温和な条件で導入する試薬の設計を行い、フラールン構造を有する活性カルボン酸誘導体の合成を達成した。合成した一連の活性カルボン酸誘導体(アミノ基修飾試薬)を用いてアミノ酸類、ペプチド類の誘導体化反応を行い、定量的に誘導体化反応が完結するための条件を確立した。また、フラールンを導入したペプチド類の TOF-MS 分析を行い、誘導体化体が効率良く検出できることを確認した。

これらの結果は、フラールン構造導入試

薬がペプチドのソフトイオン化測定に有用であることを示す。

今後の研究課題として、リン酸化や硫酸化など翻訳後修飾されたペプチド類の検出への応用、ペプチドを加水分解産物の検出への応用を行い、メタボロミクス・プロテオミクス解析への活用性を調べていく予定である。特に、誘導体化体の分子量が、フラールン分子量720を上乗せされたものになる特性を利用して、マトリックスを使ったソフトイオン化法では、いままで測定が難しかったペプチドの小分子断片の効率的な測定にも利用できる可能性についても検討する予定。

#### E. 健康危険情報

なし。

#### F. 研究発表

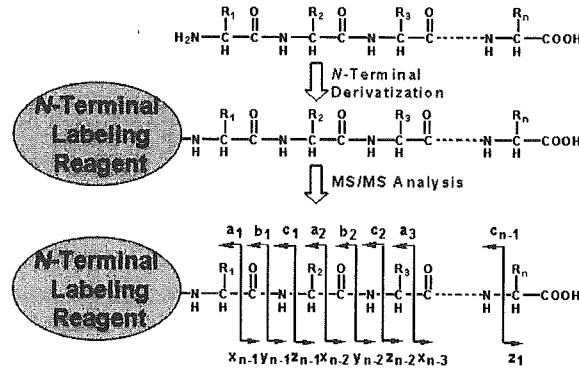
##### 1. 論文発表

- 1) Takayoshi Suzuki, Osamu Nagae, Yuka Kato, Hidehiko Nakagawa, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Photo-induced Nitric Oxide Release from Nitrobenzene Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* **127(33)**, 11720-11726 (2005).
- 2) Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyasu Kouketsu, Sinya Hisakawa, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Design and synthesis of non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors; identification of a selective histone acetylating agent, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13**, 4332-4342 (2005).
- 3) Takayoshi Suzuki, Yuki Nagano, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis,

- enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates, *J. Med. Chem.*, **48**(4), 1019-1032 (2005).
- 4) Uhinya Usui, Takayoshi Suzuki, Yoshifumi Hattori, Kazuma Etoh, Hiroki Fujieda, Makoto Nishizuka, Masayoshi Imagawa, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, Design, synthesis and biological activity of novel PPAR $\gamma$  ligands based on rosiglitazone and 15d-PGJ<sub>2</sub>, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 1547-1551 (2005).
- 5) Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyoshi Kouketsu, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Identification of a potent non-hydroxamate histone deacetylase inhibitor by mechanism-based drug design, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 331-335 (2005).
- 6) Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Molecularly targeted approach to cancer therapy: design, synthesis and biological activity of non-hydroxamate histone deacetylase inhibitors, *J. of Syn. Org. Chem.*, **63**(10), 1004-1015 (2005).
- 7) T. Suzuki, N. Miyata, Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors, *Curr. Med. Chem.* **12**, 2867-2880 (2005).
- 8) Fukuhara, K. i, Nagakawa, M., Nakanishi, I., Ohkubo, K., Imai, K., Urano, S., Fukuzumi, S., Ozawa, T., Ikota, N., Mochizuki, M., Miyata, N., Okuda, H., Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II), *Bioorg. & Medicinal Chem.* **14**(5), 1437-1443 (2006).
- 9) T. Suzuki, N. Miyata, Rational Design of Non-hydroxamate Histone Deacetylase Inhibitors, *Mini Rev. Med. Chem.*, **5**, in press (2006).
- 10) T. Suzuki and N. Miyata, Epigenetic Control Using Natural Products and Synthetic Molecules, *Curr. Med. Chem.* **13**, in press (2006).
- 11) Shinya Usui, Hiroki Fujieda, Takayoshi Suzuki, Naoaki Yoshida, Hidehiko Nakagawa and Naoki Miyata, Identification of novel PPAR $\gamma$  ligands by the structural modification of a PPAR $\gamma$  ligand, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**, in press (2006).
2. 関連する学会発表 (2005.4-2006.3)
- 1) 津元裕樹, 高橋克昌, 幸田光復, 鈴木孝禎, 中川秀彦, 宮田直樹, MALDI-TOF MS 分析に利用できる C60 誘導体化試薬の合成、第 31 回反応と合成の進歩シンポジウム。2005 年 11 月 7-8 日(神戸)。
- 2) 高橋克昌, 津元裕樹, 幸田光復, 鈴木孝禎, 中川秀彦, 宮田直樹, C60 誘導体化試薬の MALDI-TOF MS 分析への応用、第 31 回反応と合成の進歩シンポジウム。2005 年 11 月 7-8 日(神戸)。
- 3) Hiroki Tsumoto, Katsumasa Takahashi, Kohfuku Koda, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Application of C60-based amine-labeling reagents to MALDI-TOF MS analysis The 30th Fullerene-Nanotubes General Symposium. 2006 年 1 月 7-9 日 (Nagoya)。
- 4) 津元裕樹, 高橋克昌, 幸田光復, 鈴木孝禎, 中川秀彦, 宮田直樹, フラーレン C<sub>60</sub> の特性を利用したタンパク質の MALDI-TOF MS 分析、日本薬学会第 126 年会、2006 年 3 月 28 日から 30 日(仙台)。

図 1

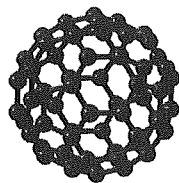
## 質量分析に利用できる ペプチドのN末端修飾試薬の開発



1. 修飾によるイオン化効率の向上.
2. N末端由来のピークの判定性の向上  
C末端由来のピークに対して相対的に  
N末端由来のピークのみ分子量が変化

図 2

## $\text{C}_{60}$ の構造と物理化学的性質



フラーレン ( $\text{C}_{60}$ )

炭素60原子からなる  
直径約7 Åの球状化合物

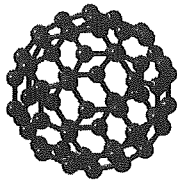
表面は60個のp軌道 (30個の共役した  
 $\pi$ 結合) で覆われている

電子欠損性  
光増感作用  
ラジカル捕獲作用



図 3

# $C_{60}$ の物性を ペプチドのMALDI質量分析に 利用する



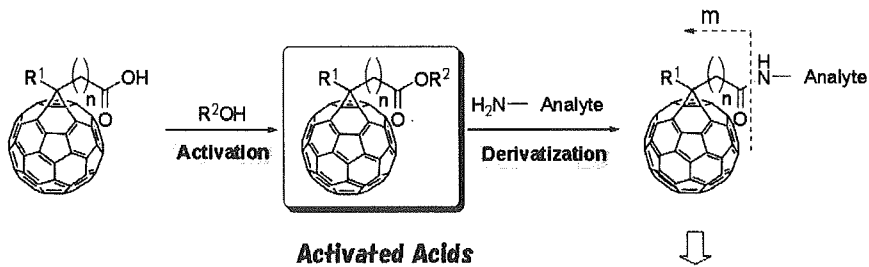
- $C_{60}$ は、Matrixなしで TOF MASS測定が可能
- 一電子還元体が安定  
→ ネガティブモードでの測定が容易



フラーレン ( $C_{60}$ )

フラーレンをペプチドに結合させれば、  
ペプチドの質量分析が可能?

図 4



1. Improved ionization efficiency
2. Increase of molecular weight

5

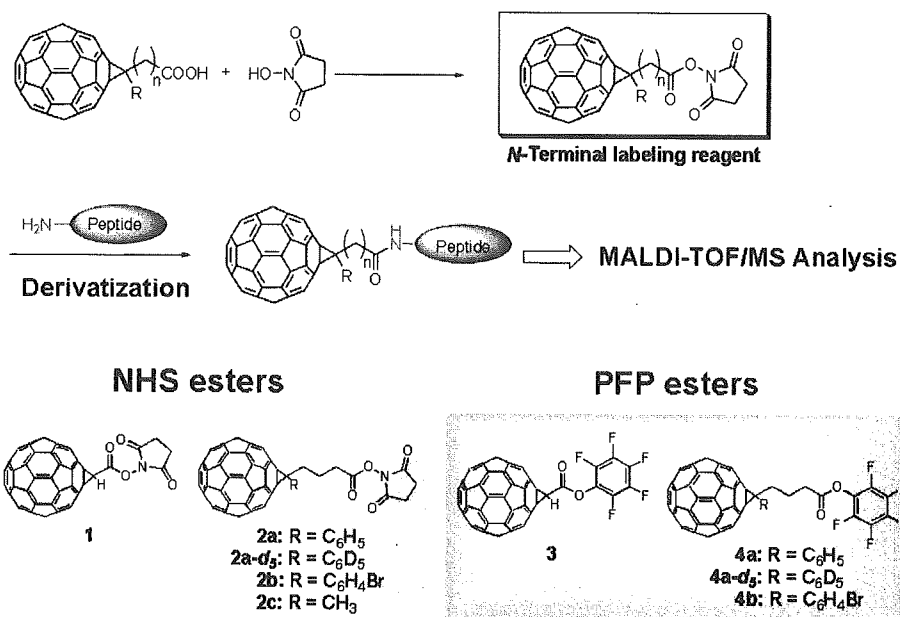
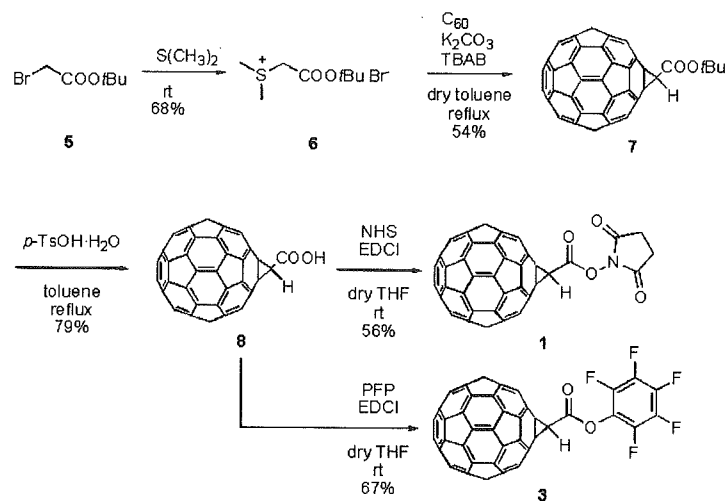


Figure. Structures of amine labeling reagents.

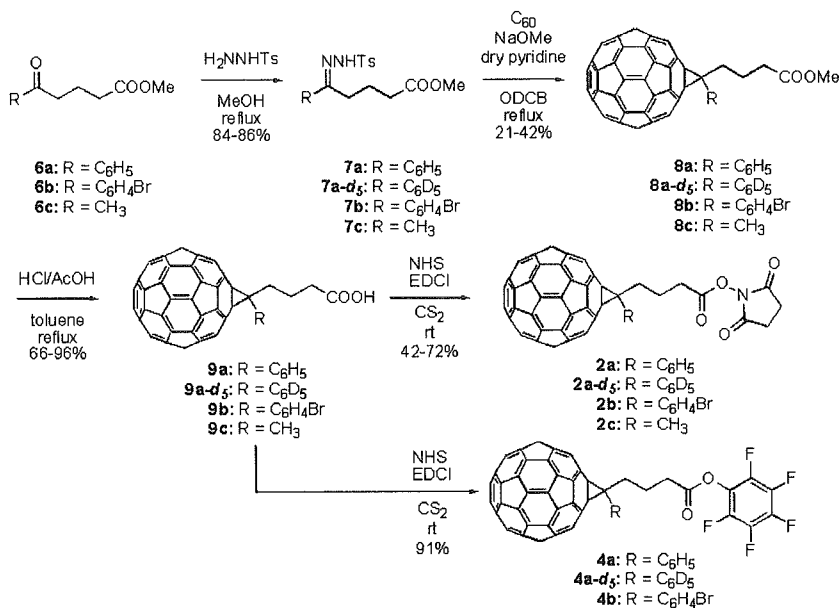
6

### Synthesis of amine labeling reagents containing C<sub>60</sub> moiety (1)



7

### Synthesis of amine labeling reagents containing C<sub>60</sub> moiety (Z)

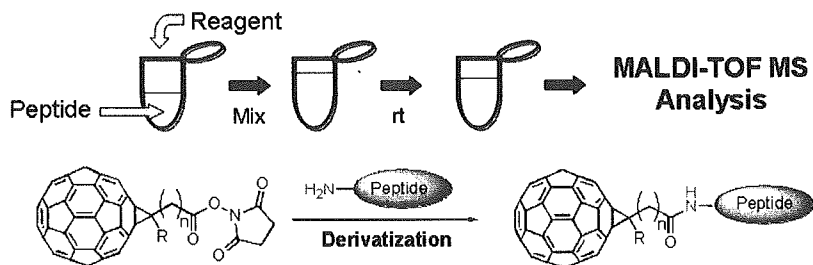


8

### Derivatization method and instrumentation

#### Derivatization

Peptide solution and reagent solution were mixed and left at room temperature. The reaction mixture was subjected to MALDI-TOF MS analysis.



#### MALDI-TOF MS Measurement

All MALDI-TOF mass spectra were acquired with an AXIMA-CFR plus instrument (Shimazu/Kratos, Manchester, UK). CHCA was used as the MALDI matrix throughout this study without further purification. It was dissolved in 60% ethanol, 36% acetonitrile, and 4% water at a concentration of 10 mg/mL. Samples for mass spectrometry were prepared by mixing 0.5  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture with the 0.5  $\mu\text{L}$  of the matrix solution on a stainless steel target plate. The applied samples were allowed to dry at room temperature before transferring into the mass spectrometer.

图 9

### Structures of analytes

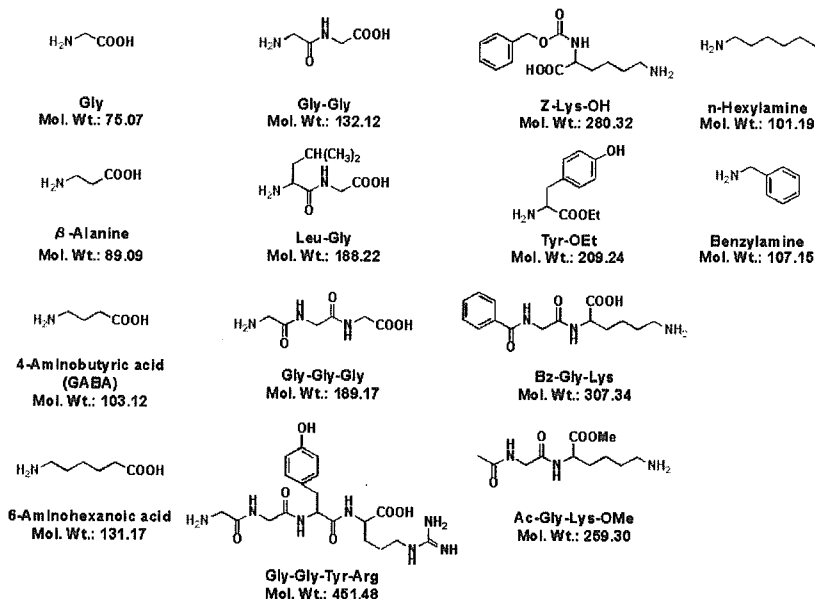
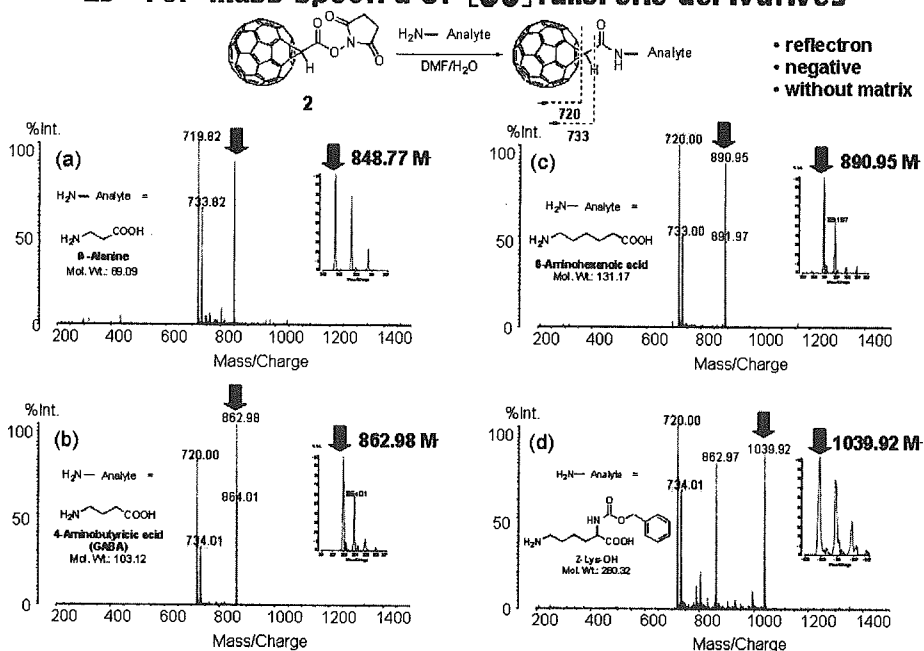


图 10

### LD-TOF mass spectra of [60]fullerene derivatives



**M<sup>-</sup> ions of all the derivatized analytes were observed without using matrix.**