薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
117 (10-11)715-728(1997)

マスマスプロメトリーによるクモ毒の解析-分析システムの構築

板垣又丕, 直木秀夫, 藤田剛司, 久田美貴, 中嶋暉躬*

(財)サントリー生物有機科学研究所,

〒618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1

Characterization of Spider Venom by Mass Spectrometry, Construction of Analytical System

Yasuhiro ITAGAKI, Hideo NAOKI, Tsuyoshi FUJITA,

Miki HISADA, and Terumi NAKAJIMA

Suntory Institute for Bioorganic Research, 1-1-1 Wakayamadai,

Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan

(Received July 1, 1997)

Spiders belonging to the genera, *Nephila*, *Nephilengys*, *Araneus*, etc., possess various polyamine toxins in their venom glands which paralyze insects by blocking the nerve-muscle signal transduction of glutaminergic synapses. More than 50 kinds of polyamine toxin analogs have been characterized which consist, in general, of the aromatic or heteroaromatic moiety connected with the combination of various types of polyamine chains.

We are developing a new analytical system by means of a modern mass spectrometric technique which satisfies more rapid, highly sensitive and simple clean-up procedure without complicated chromatographic treatment. The trial of such approach has been performed by employing crude spider venom as the model material.

This review article concerns with such proceeding of mass spectrometric analysis by microcolumn HPLC hyphenated FAB-MS system, continuous flow FAB-MS/MS system with high energy collision charge-remote fragmentation, solid and liquid matrix assisted laser desorption ionization (MALDI- and liquid MALDI-) technique connected with tandem mass spectrometer performing in the institute and in addition, femto-molar characterization of new spider venom spider polyamine toxins as a result of the application of such new techniques is addressed.

Key words—spider polyamine toxin; LC FAB/MS; tandem mass spectrometry; MALDI-MS/MS; LMALDI-MS/MS

1. はじめに

ヘビ毒 α -ブングロトキシンやある種のサソリ毒がアセチルコリン受容体, 及び, ナトリウムチャンネルの機能解明に果たした役割の重要性はいうに及ばず, このような小動物の神経科学解明のための有効な手段物質として位置付けられようとしている。

我々はこれまで膜結合性 GTP 結合蛋白質 (Gi, Go) の非特異的活性化剤としてのハチ毒ペプ

チドマストパラン,あるいは,キスカレート-AMPA型グルタミン酸受容体の特異的阻害物質としてのジョロウグモ毒素 JSTX などをはじめとしていろいろな小動物毒素の解析を行ってきた。さて,この種の毒素本態の化学的解明には種々微量分析的手法が駆使され,それなりの成果は挙がってきたが,今後ますます迅速化,簡易化,微量化が叫ばれる今日,粗毒からのクロマトグラフィーなどによる精製,単離,解析と複雑なステップを踏む従来の手法では物足りなさを感じてきた。そこで我々は,クモ毒ポリアミントキシンを対象として,質量分析法を駆使するクモ粗毒からの直接一斉分析システムの構築を試みた。

以下にマイクロカラム LC/FRIT-FAB/MS 法を最初の足掛かりとして, charge-remote fragmentation を用いる連続注入 FRIT-FAB MS/MS 法,さらに, liquid MALDI MS/MS 法へと,より精密にして迅速簡便な分析システム構築を試行し, fmol レベルでのクモ毒解析に挑んできたので,その変遷について述べてみたい。

2. クモ毒ポリアミントキシンの構造

クモ毒腺からペプチドや蛋白質以外に低分子クモ毒として多数のポリアミンが発見されており,その構造は Fig. 1 の A, B, C 及び D に区分される一般式で示すことが出来る。すなわち,ジヒドロキシベンゼンやインドールなどの脂溶性部分 (A) 及びポリアミン骨格 (C) からなる主要構造部分,これらを接続する役割を持つアミノ酸部分 (B) 及びアルギニンやプトレアニンなどからなる末端部 (D) である。これら A, B, C, D 各部には複数の異なる基本構造単位があり,それらが任意に組み合わせられ多数のポリアミンが作られている。この基本構造単位も研究が進むにつれ新しいユニットが見つかり,ポリアミントキシン類の構造解析や生理活性の解明に更なる手掛かりを与えてくれている。

後に毒腺粗抽出液から成分を精製,単離せず直接高感度一斉分析を行った詳細を述べるが,マダガスカル及びブラジル産の *Nephilengys borbonica*, *Nephila madagascariensis* 及び *Nephilengys cruentata* クモ毒腺中に含まれるほぼすべてのポリアミントキシン類の構造解析を行い,それらの構造を6種の基本構造 type A から F の6種に分類・帰属した。¹⁻³⁾ *Nephilengys borbonica* より type-A から -D の非アルギニン型を検出, *Nephilengys cruentata* からはそれらのアルギニ

Fig. 1. General Construction of Polyamine Toxins

Fig. 2. Generalized Structures of Polyamine Toxins Obtained from *Nephilengys borbonica*, *Nephilengys cruentata* and *Nephila madagascariensis*

ン及び非アルギニン型、*Nephila madagascariensis* からは type E と F のアルギニン及び非アルギニン型を検出した (Fig. 2)。細かくいえば、微量ではあるが基本構造の一部が交差するハイブリット型の成分などいくつかのバリエーションもあり、毒腺はまだまだ多くの未知領域を持つことを示している。一方、既知のポリアミントキシンでこれらの構造分類に入らない多数のポリアミントキシンが当然存在しており、本高感度分析法を用い近縁クモ毒腺の精査を行えば、未帰属ポリアミントキシンの体系化や、さらに進んで、ポリアミントキシンの構造活性相関の解明、クモの種・属決定、食餌行動、老若による毒成分の変化などの研究が可能になることも考えられよう。

3. クモ毒ポリアミントキシンの分析手法

3-1. 一般的な分析法の問題点とその解決法 クモ毒腺中に含まれるポリアミントキシン類はその構造類似性から HPLC を用いても、全成分を完全に分離し精製することの困難な化合物である。⁴⁾ したがって、ポリアミントキシン分析の常法である加水分解その他の化学反応で得られるアミン・アミノ酸などの生成物を NMR や MS スペクトルで測定し構造解析を行う方法も、未分離成分の影響で解析を難しくするだけでなく、微量不分離成分は解析対象から外されてしまう可能性もある。しかも、化学反応を伴う操作は MS が必要とする量から見れば数 100 倍もの試料量であり、マイナーな成分の構造決定を行うにはそれに見合う数 100 頭もの個体を集めなければならない。⁵⁾

これらの問題を解決し、可能であればクモ1頭の毒腺で全ポリアミントキシンの高感度・迅速・一斉分析を行うために、HPLCによる完全分離や、誘導体の調製、分解反応などを必要と

Fig. 3. Analytical Procedures of Spider Venom Crude Extracts

a) Analytical Method to Use Capillary Column LC/MS. b) Direct Mixture Analysis Based on MALDI-MS

しない方式, すなわち, 質量差を化合物識別に用いる MS を中心にした分析法を構築し Fig. 3 に示した. 分析法としては a) の流れによるキャピラリーカラム LC FAB/MS 法及び連続試料注入 FRIT-FAB MS/MS 構造解析法と, b) のクロマトグラフィー法を採用せず, 混合物のまま直接 MALDI もしくは LMALDI 法と MS/MS 法により構造解析を行う方式を構築し検討を加えた.

まず, これらポリアミノキシン分析に用いた各種 MS 手法の特長を概説する.

3-2. FAB 及び MALDI などの MS 関連技法の特長 FAB 及び MALDI 法におけるイオン化の機構であるが, 基本的には, 高速中性粒子やフォトン衝撃によって生成するマトリックスイオンと試料分子との間で起こるイオン-分子反応により, $(M+H)^+$ イオン (プロトン付加分子イオン) や $(M+X)^+$ イオン (アルカリ金属付加分子イオン; X: アルカリ金属) の生成が行われるソフトなイオン化方式である. したがって, フラグメントイオンの生成が少なく, 熱不安定, 難揮発性である生体高分子, さらに混合物などの測定に適するイオン化法である.

a) FRIT-FAB LC/MS—FAB 法は試料をグリセロールなどの液体マトリックスに溶かしターゲットと呼ばれる金属板上に塗布する. この液面を高速中性粒子で衝撃しイオン化を行うものであり, 液体マトリックスが試料イオン化のためのプロトン供給源になる.

通常は試料を塗布したターゲットをイオン源に導入して測定を行うが, HPLC カラムなどで溶出する成分にマトリックスを加えフューズドシリカカラムでイオン源に導き, フリット (金属多孔板: FRIT) 上で連続的にイオン化する FRIT-FAB LC/MS の方式が混合物分析に用いられる.

キャピラリーカラム LC/MS 法は試料の損失なく高感度で分離される各成分をオンラインで分析を行うことが出来るが, 各成分の溶出時間が短く, 構造解析を行うための MS/MS 法や時間のかかる測定操作は習熟した技能を必要とすることがある.

b) 連続試料注入 FRIT-FAB/MS—LC/MS 法と異なり成分分離を目的とせず, シリンジポンプを用い数 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で試料を長時間安定してイオン源に導入する方法. 目的成分の質量イオンを長時間保持・検出することが出来, MS/MS や高分解能組成決定などに有用な手法で, 混合物一斉分析にも応用できる. 金属板ターゲットを使用した FAB 法より, マトリックス添加量が少なく済み, ケミカルバックグラウンドの生成も少ない.

c) MALDI 法と LMALDI 法——MALDI 法は、FAB とは逆にマトリックスと試料の混合溶液を金属板ターゲット上で乾燥し結晶を作る。この結晶面をレーザー照射し、含まれる試料のイオン化をはかる。したがって、試料は気散することなく、レーザー照射のイオン化により失われるのみで、装置条件設定なども時間の制約がなくゆっくり行え、操作も簡単である。ただし、試料はマトリックスがその化学的性質で針状、柱状など異なる結晶状態をとるので、それによって不均一に分散・局在化する。このため、試料イオン強度を強く与える場所、いわゆる、hot spot をレーザー照射位置を動かし探す必要がある。

このイオン化は、パルス状に発生するレーザーでイオン化を行うので、イオン生成は不連続であり、一般には飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) と組み合わせて使用する。磁場走査を行うセクター型質量分析計を使用する場合は、アレイ検出器など同時イオン検出機能を持つ必要がある。

Kolli 及び Orlando らはこれら装置使用上の制約を打破し、MALDI 法を更に有効利用出来る新しい方式を発見した。^{6,7)} すなわち、3-aminoquinoline (3AQ) と α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) を混合した複合マトリックスを使用すると、このマトリックスはイオン源導入後も液体状態を保つことから、FAB と同様マトリックスの流動性が保持され、レーザー照射によって損傷を受けた場所に新しいマトリックス及び試料が補給される。したがって、レーザー照射位置の移動なしに長時間安定して試料イオンビームの検出が出来る。これは、磁場走査型の質量分析計でもスキャンを繰り返し積算すれば、TOF-MS で得られる MS スペクトルと同じものを得ることが出来、従来の磁場型質量分析計の機能向上がはかれ、既存の磁場型質量分析計でも MALDI 法が容易に使用出来ることになる。

d) 高エネルギー衝突開裂法 (High Energy Collision Dissociation) と低エネルギー衝突開裂法 (Low Energy Collision Dissociation)——FAB 及び MALDI イオン源内で生成した $(M+H)^+$ 及び $(M+X)^+$ イオンの中から、構造解析に必要なイオンを第 1MS で選択し (precursor ion の選択)、第 2 段 MS イオン源部に置いたガス衝突室に導く。ここにヘリウムやキセノンなどの不活性ガスを満たし、第 1MS で選択したイオンと通常 1 回の衝突を行わせる。

イオンは keV のエネルギーを持って衝突するので、高エネルギー CID と呼ばれ、電子励起 (electronic excitation) による、転位反応を伴わない単純開裂を主体としたイオン群 (product ion) を生成する。この衝突によって分子量が ~ 2000 Da 位までであれば炭素-炭素間結合の切断を行うに必要なエネルギーを与えることが出来るので、ラジカル及びイオンの位置に関係なく開裂を起こすことが出来る。

特に、ポリアミン鎖部分の結合するメチレン数と NH の位置の違いで異なるポリアミントキシンが作られるが (例えば、4-3-3, 3-4-3, 3-3-4 などの結合鎖を持つポリアミン)、この部分の NH の位置決定は性質が類似する水素のため、NMR による解析も比較的困難な化合物である。しかし、タンデム型質量分析計を用い高エネルギー CID スペクトルを測定すると、このメチレン及びアミン間の C-C 並びに C-N 開裂が起き、 $14\text{ U}(\text{CH}_2)$ 及び $15\text{ U}(\text{NH})$ 質量差のあるプロダクトイオンが観測されるので、容易にメチレン鎖の長さや-NH の位置を知ることが出来る。⁸⁾

この方法と関連して低エネルギー衝突によって product ion を作る方式があるが、この場合は、数 eV のエネルギーを持つイオンを衝突室内で振動させ反応ガスとの複数回衝突で内部エネルギーを次第に高くしていく振動励起 (vibrational excitation) 型であり、低いエネルギーでも開裂が起きる転位反応とか、電荷のごく近傍の結合が開裂に関与するプロダクトイオンを生

成する。

e) チャージ・リモート フラグメンテーション (Charge-remote Fragmentation)——Adams 及び Gross ら^{9, 10)}によって新しい開裂様式として報告され、その有用性が認められ、構造解析の重要な手法として広く使われるようになった。

イオン-分子反応で $(M+H)^+$ イオンが生成するが、数種の極性官能基が存在する場合、それらの塩基性度に従い水素は数カ所の異なる場所に付加する。これらのイオンは共鳴構造をとり、電荷が非局在化され安定化する。したがって、 $(M+H)^+$ イオンの CID スペクトルを測定すると、異なる場所に電荷を持つプロダクトイオンが生成する。また、数多くのイオンが生成することは、一定量の $(M+H)^+$ イオンから、開裂が数多く起きれば、プロダクトイオン当たりのイオン数が減少することで、感度低下の原因にもなる。これらの不都合を取り除く方式が、チャージ・リモート フラグメンテーション法である。すなわち、極性官能基-COOH などアルカリ金属付加を行い、電荷が局在化されたイオン種 $(M+X)^+$ イオンを作る。このことは、高エネルギー CID で生成するプロダクトイオンは常に-COONa など局在化された電荷部分の構造を含み、他の部分は、中性分子ないしラジカルとして系外に除かれ、MS スペクトルとして観測されない。しかも高エネルギー CID では、電荷のある位置から遠く離れた結合部も、電荷とは無関係に単純開裂を行うので、本来の構造を保ったプロダクトイオンであり、未知物の構造解析に重要な手法となる。

高エネルギー CID によって生成するスペクトルは 50 eV で行われる電子衝撃法 (electron impact, EI) に類似するとも言われ、そのスペクトルパターンの再現性も良く、異なる装置間や時間を置いた後でも再現性のあるデータを得ることが出来る。

4. ポリアミントキシンの同定

既に、キャピラリーカラム LC/MS によるポリアミントキシンの分析法について報告を行ったが、¹⁾ LC では単一成分に見えるピークでも、5—6 成分が未分離の状態で観測され (Fig. 4)、従来方式の抱えていた問題点を明らかにすると同時に、LC/MS 法がクモ毒腺中に含まれるポリアミントキシンを検出するシステムとして有効な手法であることを示した。しかし、LC/MS 法では HPLC の条件を整えたり、それぞれの成分を分離溶出するまでに時間がかかり、誰にでも扱え、短時間に結果が出せるシステムとは言い難い所がある。一方、MALDI 法では試料精製、サンプリングのわずらわしさが除け、試

Fig. 4. UV and Mass Chromatogram of Protonated Molecular Ions $(M+H)^+$ Obtained from *Nephilengys borbonica* Spider Venom Crude Extracts Using on-Line μ -Column HPLC-FAB Mass Spectrometer. Unresolved Polyamine Toxins by HPLC were Distinguished by Mass Chromatogram

料をターゲット上で調製すれば、数分以内に MS スペクトルが得られ、短時間でポリアミノキシンの成分数及びその分子量が正確に決定出来る。したがって、MALDI-MS を混合物一斉分析のシステムとした。ただし、毒腺粗抽出液をそのまま直接イオン化した場合にマイナーなポリアミノキシンの主成分に抑えられて検出されなかったり、化合物間のイオン化効率の違いにより、その存在を見過ごしてしまう可能性があることから、本分析法の検討を行った。

4-1. クロマトグラフィー法と混合物直接質量分析法の比較 連続注入 FRIT-FAB/MS と MALDI-MS 法——マダガスカル産 *Nephilengys borbonica* クモ毒腺より得られた粗抽出液をキャピラリーカラム LC/MS 法で分析し多数の新しいポリアミノキシンを検出したが (Fig. 4), 同一試料で MS による粗毒直接分析を行い, LC/MS で同定された成分がすべて検出されるか否かを調べた。

連続注入 FRIT-FAB/MS 法——シリンジポンプを用いて 50% メタノール-水 (0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)) に 1% グリセロールマトリックスを加えた混合試料溶液を 5 μ l/min でイオン源に送液し, FAB スペクトルを測定した。ナトリウム付加イオンの検出は, 混合溶液に Na_2CO_3 を 5 mmol 加えた。FAB イオン化法に特長的なこととして, 測定質量範囲全般にマトリックス由来のバックグラウンドピークが検出されるが, 同一イオン化法でもあり, LC/MS で得られたピークに対応するプロトン付加分子イオンはもれなく検出されており同定可能であった (Fig. 5a)。しかし, GC/MS や LC/MS 測定データをコンピュータで処理する場合, バックグ

Fig. 5. a) FRIT FAB-MS Spectrum of *Nephilengys borbonica* Venom Crude Extracts b) FRIT FAB-MS Spectrum of Sodium Added Crude Venom Extracts

ラウンドを除去したスペクトル表示が出来、成分由来のピークをより鮮明な形で示せるが、混合物直接分析では GC や LC 法と異なり、常に試料が流出しているので、ベースラインを使用しているのバックグラウンド除去が出来ない。したがって、ここで観察されたピークがマトリックス由来の成分でなくポリアミントキシンであることを確実にするために、MS 技法の一つであるシフト法を採用する必要があった。ナトリウムなどのアルカリ金属 (X) を加え $(M+X)^+$ イオンを作り、対応する質量数のシフト (例えば、それぞれ Na 及び K 付加で 22 U 並びに 38 U 差) の有無により成分確認を行った (Fig. 5b)。しかし、本質的に FAB イオン化法ではマトリックス由来のイオンがポリアミントキシン測定に使用した全質量領域で観測され、微量成分の同定を難しくするので、LC/MS 法が同定能力に関しては操作性を除けば優れている。ただし、これら観測されたイオンから更に構造解析を進めるには、ポリアミントキシンの $(M+H)^+$ 及び $(M+X)^+$ から CID 法により構造情報を持つプロダクトイオンを作ることが必要であり、数 10 秒間は安定したイオン強度のプリカーサーイオンの検出時間が欲しい。キャピラリー LC/MS で各成分をこれだけの時間安定したイオンビームを確保し続けることは難しく、混合試料連続注入法の使用が必要となる。

普及度が高く、簡単な操作でデータを得ることが出来る FAB-MS 法であるが、ケミカルバックグラウンドが高いこと、試料が常に消費されることなどの問題があり、広く一般的な手法とするには、更に進んだ分析システムの構築が必要であった。

MALDI-MS 法—Electrospray ionization (ESI) 法¹¹⁾ に引き続き開発された MALDI 法^{12, 13)} は、試料をマトリックス結晶内に取り込み、長時間質量分析計の中に置いても試料の損失が無く、FAB と比較しマトリックス由来のケミカルバックグラウンド生成が少ないことから、本法をポリアミントキシンの同定に用いた。

クモ毒腺粗抽出液 (50% メタノール溶液) 1 μ l を 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) 飽和水溶液 (9 μ l) に加え、FAB プローブ上に 5 μ l 塗布風乾後、イオン源に導入し MALDI スペクトルを

Fig. 6. MALDI-MS Spectrum of *Nephilengys cruentata* Venom Crude Extracts a) DHB Matrix with Potassium b) After Addition of Sucrose to (a) Matrix

測定した。まず、マトリックスにカリウムを加え測定を行い、引き続き糖を加え再度測定したスペクトルをそれぞれ (Fig. 6a, b) に示した。各スペクトルで、ポリアミントキシン由来の $(M+H)^+$ 及び $(M+K)^+$ のイオンを検出しているが、Fig. 6a から明らかなように、マトリックス中にカリウムだけが存在する場合は、カリウム付加イオンが相対的にプロトン付加分子イオンより強度が強い。これに蔗糖を添加すると、ポリアミンと蔗糖がカリウム付加イオン体を競争的に生成する。結果的にポリアミントキシンの $(M+K)^+$ イオン強度が減少し $(M+H)^+$ イオンが強く観測される (Fig. 6b)。したがって、最初カリウムによる質量差 38 U を持つ対になったイオン群を探し、蔗糖を添加した後、 $(M+H)^+$ に相当するイオン強度が増加する対を確認すればよい。例えば、 m/z 996^{*1}と 958^{*1}, 982^{*2}と 944^{*2}, 966^{*3}と 928^{*3} など対をなす組み合わせの質量数の肩に*と数字を入れて表示したが、20 成分以上のポリアミントキシンと考えられる分子イオン群を識別することが出来た。もっと確実に分子イオンを確認するには、蔞酸などの酸を加えると、すべてのカリウムはポリアミンに付加せず、蔞酸塩となるのでポリアミン由来の $(M+H)^+$ イオンだけが観測されて来る。この混合物直接分析法は、試料調製が容易で、短時間で測定が行え、試料もレーザー照射で失われるだけで、ターゲット上に試料を残しておけば、必要に応じ、いつでも再測定が出来る。

5. ポリアミントキシンの構造解析法

加水分解などによる構造決定法では、大量の試料が必要になるので、MS のみを用いる高感度構造解析法の確立を試みた。

FAB 及び MALDI 法でクモ毒腺粗抽出液から直接ポリアミントキシンの存在確認を行ったが、同じ試料をタンデム型質量分析計による高エネルギー CID を用い構造解析を進めた (Fig. 7)。

5-1. タンデム型質量分析計高エネルギー CID 法の特長 チャージ・リモート フラグメンテーションによる構造解析——ポリアミントキシンの CID スペクトル: ジョロウグモ

Fig. 7. Schematic Diagram of Tandem Mass Spectrometer Equipped with MALDI Source at MS-1

Fig. 8. High Energy CID Spectra of Protonated Molecular Ion (a) and Sodiated Molecular Ion of JSTX-3 (b)

Chart 1. (a) Acyl Moiety Charge-Retained Product Ions and (b) Polyamine Side Chain Charge-Retained Product Ions from Sodiated JSTX-3

Fig. 9. CID Spectra of NPTX-687 (a) and NPTX-10(b). Due to the Arginine Moiety, the Charge of Product Ions is Localized on a Polyamine Chain Terminal

(*Nephila clavata*) 毒腺より得られ、構造既知の,¹⁴⁾ JSTX-3 ($(M+H)^+$ 及び $(M+Na)^+$ イオンから得られた CID スペクトルを Fig. 8a, b に示し開裂機構を Chart 1a, b に示した。($M+H$)⁺ イオンの CID スペクトルでは m/z 129 及び 84, 高質量部では m/z 492 のイオンが主要ピークとして得られるだけであるが, ($M+Na$)⁺ イオンでは電荷位置がアシル基側に固定され, チャージ・リモートフラグメンテーションにより m/z 216, 259, 287, 301, 330, 344 と詳細な構造情報を示すプロダクトイオンが観測出来た。一部の Na はポリアミン鎖に付加し m/z 109, 123, 137 などのイオンを与えるが, 関連化合物とのスペクトル比較でその帰属は容易である。

ポリアミン鎖末端にアルギニンがある場合は, アルギニン部分にプロトンが直接付加した形で ($M+H$)⁺ が生成しており, そのまま CID スペクトルを測定してもチャージ・リモートフラグメンテーションの効果が期待出来る。ブラジル産クモ (*Nephilengys cruentata*) より得られた NPTX-687 を構造類似の NPTX-10 と比較したが, その CID スペクトルはヒドロキシインドールとインドールの質量差を示す m/z 146 (NPTX-687) 並びに m/z 130 (NPTX-10) が観測される以外はアルギニンに電荷を持ったプロダクトイオンが優先的に生成し, イオン強度は測定時が異なっても再現性よく検出できる (Fig. 9a, b)。このことは, アシル部分の違いは開裂イオン生成に影響を与えず, ポリアミン部分の構造を正確に反映するイオン生成がなされていることを示す。構造を更に詳しく調べるためには, ナトリウムを加え, ($M+Na$)⁺ イオンから再度 CID スペクトルを測定すると, ピーク本数が増え複雑なパターンになるが, アルギニン側とアシル側の両方からの開裂が見られ, 相補的情報を持つプロダクトイオンとしてより正確な構造解析が行える。

5-2. LMALDI 法による構造解析の特長 構造解析は高エネルギー CID スペクトルから, 一義的に進められることを確認したが, 選択したポリアミントキシンのイオン上に FAB

Fig. 10. FAB (a) and LMALDI (b) Molecular Weight Region Spectra of NPTX-657

イオン化法ではケミカルバックグラウンドが妨害成分として重なり、CID スペクトルの解析を妨げる。FAB 及び LMALDI で得られた NPTX-657 の分子イオン $(M+H)^+$ 並びに $(M+Na)^+$ 領域の MS スペクトル拡大図を示したが (Fig. 10a, b), FAB では、分子イオンに相当量のケミカルバックグラウンドが質量分離されず重なっている。一方、液体マトリックスを使用した LMALDI ではバックグラウンドが観測されない。LMALDI 法では、ターゲットを移動し hot spot を探すことなく、レーザーを照射し続けて 10—20 分間は安定して分子イオンを観測出来るが、これはタンデム型質量分析計で CID スペクトルを測定するのに十分な時間である。Fig. 11a, b に FAB と LMALDI で観測された NPTX-657 $(M+Na)^+$ イオンからの CID スペクトルを示すが、FAB-CID では、グリセロール由来のプロダクトイオン m/z 588, 566 及び低質量領域における *印を付したイオン群などが観測されるのに対して、LMALDI 法ではそれらのピークは消失しており、観測されたイオンは選択したプリカーサー由来のプロダクトイオンであり、未知物の構造解析を行う場合に検討するイオン質量がアーティファクトピークであることの可能性を除外できる。クモ毒腺中に含まれるポリアミノトキシン高感度一斉分析システムの最終段階である構造解析の手法として LMALDI-CID 法が有用な手法であることを確認した。

Fig. 11. CID Spectra of Sodiated NPTX-657 (a) Glycerol Matrix FAB (b) LMALDI

* were marked on the matrix origin product ions.

結 論

クモ毒腺中には数10成分ものポリアミノトキシンが含まれている。毒腺粗抽出液からそれぞれの成分を検出し構造決定を行うまでの、混合物一斉分析システムをMS各種技法を用い構築した。HPLCで分離が困難であったり、微量で分取困難な成分でもFAB及びMALDI-MS法で存在確認が出来ることを、LC/MSデータと混合物直接FAB及びMALDI-MSスペクトルの比較で確認した。検出されたポリアミノトキシンの構造も高エネルギーCIDスペクトルから決定できる。末端にアルギニンを含まない場合は、アルカリ金属付加イオンからのチャージ・リモートフラグメンテーションを行えば構造情報を多数持ったプロダクトイオンが感度良く検出され構造解析が行える。末端にアルギニンを持つポリアミノトキシン類は $(M+H)^+$ イオンからのCIDスペクトルからでも構造決定可能であるが、アルカリ金属付加イオンからのCIDスペクトル結果を併用すれば相補的なイオンが観測されるので一層正確な構造解析が出来る。

LMALDI法を用いると、レーザー照射位置の移動なしに、長時間安定したイオンが得られる。本イオン化法で得られたスペクトルはマトリックス由来のケミカルバックグラウンドが少なく、質の高いCIDスペクトルを与える。

したがって、MALDI法により毒腺粗抽出液中からポリアミンをトキシンの分子量を確認した後、直ちに選択したイオンのCIDスペクトル測定を行えば構造決定が行える。LMALDI法は、既存のFAB銃をMALDIユニットに置き換えるだけで、アレイ検出器のない通常の磁場型質量分析計で使用出来る、一般性のある方式である。Fig. 3に示した(b)の方式は最も単純

で、短時間にポリアミントキシンを検出し同定できる方式であったが、本法は広く一般の化合物、混合成分分析などに使用できる方式と考えられる。

謝辞 本研究に当たり、*Nephilengys borbonica* 及び *Nephila madagascariensis* の採集に協力を頂いた、東京農業短期大学安原義助 教授並びに Antanarivo 大学 (Madagascar) Marta Andriantsiferana 教授、*Nephilengys cruentata* の採集及び研究に協力を頂いた前(財)サントリー生物有機科学研究所客員研究員 (現 Universidade Estadual Paulista Institute de Biociencias de Rio Claro Brazile) の Mario S. Palma 教授に深謝致します。また、構造確認に当たりポリアミントキシンを合成並びに提供をして頂いた前長崎大学入江 寛教授及び北海道大学宮下正昭教授に感謝いたします。

引用文献

- 1) Itagaki Y., Fujita T., Naoki H., Yasuhara T., Andriantsiferana M., Nakajima T., *Natural Toxins*, **5**, 1 (1997).
- 2) Palma M. S., Itagaki Y., Fujita T., Hisada M., Naoki H., Nakajima T., *Natural Toxins*, **5**, 47 (1997).
- 3) Fujita T., Itagaki Y., Hisada M., Naoki H., Nakajima T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1115 (1997).
- 4) Schäfer A., Benz H., Fiedler W., Guggisberg A., Bienz S., Hesse M., "The Alkaloids Chemistry and Pharmacology," Vol. 45, eds. by Cordell G. A., Brossi A., Academic Press, 1994, pp. 1—125.
- 5) Chiba T., Akizawa T., Matsukawa M., Pan-Hou H., Kawai N., Yoshioka M., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2177 (1995).
- 6) Kolli V.S.K., Orlando R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 923 (1996).
- 7) Kolli V.S.K., Orlando R., *Anal. Chem.*, **69**, 327 (1997).
- 8) Fujita T., Itagaki Y., Naoki H., Nakajima T., Hagiwara K., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 365 (1995).
- 9) Adams J., Gross M., *Anal. Chem.*, **59**, 1576 (1987).
- 10) Adams J., *Mass Spectrom. Review*, **9**, 141 (1990).
- 11) Yamashita M., Fenn J. B., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
- 12) Karas K., Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 13) Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 14) Aramaki Y., Yasuhara T., Shimazaki K., Kawai N., Nakajima T., *Biomedical Res.*, **8**, 241 (1987).