

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 10 月 27 日 (27.10.2005)

PCT

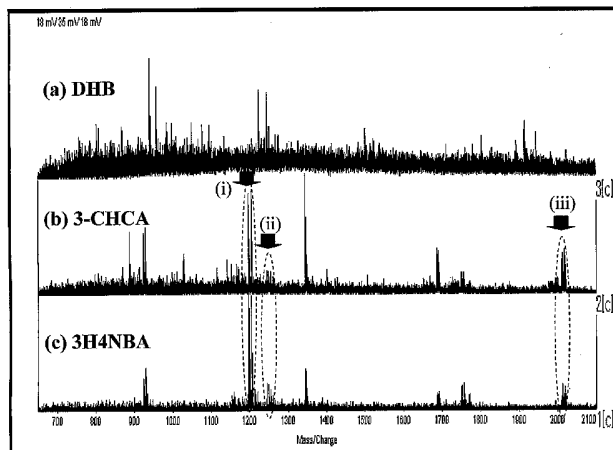
(10) 国際公開番号
WO 2005/100975 A1

- (51) 国際特許分類: **G01N 27/64, 27/62** 特 願 2004-368508
2004 年 12 月 20 日 (20.12.2004) JP
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006890 特 願 2004-368510
2004 年 12 月 20 日 (20.12.2004) JP
- (22) 国際出願日: 2005 年 4 月 1 日 (01.04.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特 願 2004-118343 2004 年 4 月 13 日 (13.04.2004) JP
特 願 2004-153484 2004 年 5 月 24 日 (24.05.2004) JP
特 願 2004-259855 2004 年 9 月 7 日 (07.09.2004) JP
特 願 2004-368507 2004 年 12 月 20 日 (20.12.2004) JP
- (71) 出願人: 株式会社島津製作所 (SHIMADZU CORPORATION) [JP/JP]; 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 松尾 英一 (MATSUO, Eiichi); 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 渡辺 真 (WATANABE, Makoto); 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 尾島 典行 (OJIMA, Noriyuki); 〒604-8511 京都府 京都市 中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津製作所内 Kyoto

/ 続葉有 /

(54) Title: METHOD OF MEASURING SUBSTANCE BY MASS SPECTROMETRY AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: 質量分析を用いる物質の測定方法及びキット



(57) **Abstract:** A method of measuring a substance by mass spectrometry; and a kit therefor. In particular, there are provided a method of measuring a hydrophobic peptide by a MALDI mass spectrometer; a method of selectively measuring a specified substance from a mixture by MALDI mass spectrometry; and a method of quantitative analysis for protein and a kit therefor. Further, there is provided a method of measuring a peptide by a MALDI mass spectrometer with the use of α -cyano-3-hydroxycinnamic acid or 3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid as a matrix. Still further, there is provided a method of mass spectrometry, comprising specifically ionizing a given substance contained in a mixture of given substance to be measured and other substances with the use of a matrix capable of ionizing the given substance more easily than the other substances and measuring the given substance selectively from the mixture. Furthermore, there are provided a relevant method of quantitative analysis for protein and kit therefor.

(57) 要約: 質量分析を用いた物質の測定方法及びキットを提供する。より詳しくは、MALDI質量分析装置による疎水性ペプチドの測定方法。MALDI質量分析によって混合物から特定の物質を選択的に測定する方法、及びタンパク質の定量解析方法及びキットを提供する。MALDI質量分析装置によって、ペプチドを α -シアノ-3-ヒドロキシベンズ酸又は3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸をマトリックスとして用いて測定する方法。質量分析において、測定すべき特定の物

/ 続葉有 /

WO 2005/100975 A1



(JP). 戸田 千香子 (TODA, Chikako); 〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 九山 浩樹 (KUYAMA, Hiroki); 〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP). 西村 紀 (NISHIMURA, Osamu); 〒604-8511 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 岡田 正広 (OKADA, Masahiro); 〒540-0010 大阪府大阪市中央区材木町1番6号第12新興ビル10階 岡田正広特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,

NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

質とそれ以外の物質とを含む混合物に含まれる、特定の物質を、特定の物質をそれ以外の物質よりもイオン化させやすいマトリックスを用いることによって特異的にイオン化し、混合物から特定の物質を選択的に測定する質量分析方法。タンパク質の定量解析方法及びキット。

明 細 書

質量分析を用いる物質の測定方法及びキット

技術分野

本発明は、質量分析を用いる物質の測定方法及びキットに関し、第 1、第 2 及び第 3 の発明が含まれる。

第 1 の発明は、MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization））質量分析装置による疎水性ペプチドの測定方法であり、質量分析装置を用いたプロテオーム解析の分野に関する。

第 2 の発明は、MALDI 質量分析によって混合物から特定の物質を選択的に測定する方法であり、MALDI 法による質量分析、及び定量的プロテオーム解析に関する。

第 3 の発明は、タンパク質の定量解析方法及びキットであり、安定同位体を用いたプロテオーム解析（タンパク質の網羅的解析）分野に関する。

背景技術

第 1 の発明についての背景技術を以下に述べる。

＜定量解析＞

プロテオーム解析（タンパク質の網羅的解析）分野において、これまで二次元電気泳動と質量分析装置とを組み合わせた PMF（ペプチドマスフィンガープリンティング）解析法が主流であったが、これに代わる次世代のプロテオーム解析法として、安定同位体を用いた手法が考案されている。例えば、Salvatore Sechi and Yoshiya Oda, Quantitative proteomics using mass spectrometry, Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7, 70-77 には、ICAT(Isotope-Coded Affinity Tag)試薬を用いた、マスペクトロメトリーを用いた定量的プロテオミク

スが記載されている。さらに、Hiroki Kuyama, Makoto Watanabe, Chikako Toda, Eiji Ando, Koichi Tanaka and Osamu Nishimura, An Approach to Quantitative Proteome Analysis by Labeling Tryptophan Residues, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003, 17, 1642-1650 及び国際公報第 2 0 0 4 / 0 0 2 9 5 0 号パンフレットには、本発明者らによって開発された、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド(NBSCI)の安定同位体標識体と非標識体とをラベル化試薬として用い、タンパク質又はペプチドのトリプトファン残基を修飾し、これらをトリプシンで酵素消化して得られるペプチド混合物中から疎水クロマトグラフィーカラムを用いてニトロベンゼンスルフェニル (NBS)ラベル化トリプトファンを含有するペプチドを濃縮し、定量解析を行う方法（以下、NBS 法と表記する。）が記載されている。

<MS/MS 解析による配列同定>

PMF 法においては、1つのタンパク質を酵素消化して得られる複数のペプチド断片のマス値を質量分析装置によって検出し、これらをデータベース上の理論断片のマス値と比較することでタンパク質の同定を行う。一方、NBS 法ではラベル化・濃縮されたペプチドを MS/MS 解析して配列を決定し、データベース上でそのような配列を含むタンパク質の検索を行うことで、元のタンパク質の同定を行う。従って、NBS 法においては、通常の質量分析による定量解析と同時に、MS/MS 解析による配列決定がタンパク質同定のための必須の工程となる。

MS/MS 解析は、1) プレカーサーイオンと呼ばれる、配列を決定したいペプチドの選択、2) 選択したプレカーサーイオンのフラグメント化、及び、3) 生じたフラグメントイオンのマス値の検出、の三段階を経て行われる。このような MS/MS 解析を行うことができる質量分析装置としては、プレカーサーイオン選択・フラグメントイオン検出のための二台の質量分離部が連結されたタンデム型、イオン自身の持つ内部エネルギーによる分解 (PSD; post-source decay) を利用するもの、イオンを補足することによって複数回の MS 解析 (MSⁿ解析) を

行うことができるイオントラップ型、及び、イオンサイクロトロン共鳴 (ICR; Ion Cyclotron Resonance) 技術を用いて得られたデータをフーリエ変換 (FT; Fourier Transform) してマススペクトルの信号とする FTICR 型が挙げられる。

MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)) 型質量分析装置では、試料に混ぜられたマトリックスと呼ばれる分子 (一般的に有機化合物) がレーザー光のエネルギーを吸収することで加熱され、気化するとともにイオン化される。試料分子を取り囲んでいたマトリックスが瞬時に気化することで、結果として試料分子もほぼ同時に気相に放出されることになる。この時、試料分子とマトリックスとの間で電子やプロトンの受け渡しが行われ、試料分子のイオン化が達成される。また、これと同時にエネルギーの一部が内部エネルギーとして試料分子に受け渡される。

このように、マトリックスは試料分子の気化・イオン化を補助するだけでなく、試料分子の分散剤としても働いているので、試料分子の効率良いイオン化にはマトリックスと試料分子との親和性が重要であると考えられている。そのため、測定する試料ごとに最適とされる有機化合物が検索され、用いられてきた。例えば、ペプチドを測定する際には、 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸 (4-CHCA) が広く一般的に用いられている。

一方、MALDI-IT (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-イオントラップ) 型、MALDI-IT-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-イオントラップ-飛行時間) 型 (例えば AXIMA-QIT (島津製作所製)) や MALDI-FTICR (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴) 型の質量分析装置では、MALDI 法によってイオン化した試料分子を一度セル内に閉じ込めてから、イオンの検出や選択、或いは MS/MS 解析を行っていく。このため、一度生成したイオンが検出器に到達して測定されるまでの時間が、通常の MALDI-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間) 型装置に比べ、2~3 桁以上長くなる。イオン化された試料分子は余剰の内部エネルギー

一を持っているため、徐々に自己崩壊が起こることが知られている。実際に、MALDI-TOF 型質量分析装置の PSD 測定においては、この原理を利用して擬似 MS/MS 解析を行っている。

従って、MALDI-IT 型、MALDI-IT-TOF 型や MALDI-FTICR 型の質量分析装置においては、イオン化の際に大きな内部エネルギーを受け取ると、測定時に望まないフラグメントイオンがたくさん検出されてしまい不都合である。この点から、4-CHCA をマトリックスとして用いることは、イオン化の際に試料に過剰の内部エネルギーを与えることとなるため、MALDI-IT 型、MALDI-IT-TOF 型や MALDI-FTICR 型の質量分析装置において好ましくない。そのため、AXIMA-QIT 装置で実際にデフォルトとして設定されているマトリックスは、イオン化の際に試料分子に与えるエネルギーが比較的小さいとされている 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) である。

第 2 の発明についての背景技術を以下に述べる。

<MALDI 法による質量分析>

MALDI 型質量分析装置では、試料に混ぜられたマトリックスと呼ばれる分子（一般的に有機化合物）がレーザー光のエネルギーを吸収することで加熱され、気化すると共にイオン化される。試料分子を取り囲んでいたマトリックスが瞬時に気化することで、結果として試料分子もほぼ同時に気相に放出されることになる（この時、試料分子とマトリックスとの間で電子やプロトンの受け渡しが行われ、試料分子のイオン化が達成される）。MALDI 法による質量分析においては、測定する試料ごとに最適とされる有機化合物が検索され、用いられている。例えば、ペプチドを測定する際には、 α -シアノー-4-ヒドロキシ桂皮酸 (4-CHCA) や 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) が一般的に用いられている。

<プロテオーム解析>

プロテオーム解析（タンパク質の網羅的解析）分野においては、これまで二次元電気泳動と質量分析装置とを組み合わせた PMF（ペプチドマスフィンガープリンティング）解析法が主流であった。これに代わる次世代のプロテオーム解析法として、例えば、Steven P. Gygi, Beate Rist, Scott A. Gerber, Frantisek Turecek, Michael H. Gelb and Ruedi Aebersold, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, *Nature Biotechnology*, 994-999, 17, 1999 ; Kirk C. Hansen, Gerold Schmitt-Ulms, Robert J. Chalkley, Jan Hirsch, Michael A. Baldwin and A. L. Burlingame, Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ^{13}C -Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography, *Molecular & Cellular PROTEOMICS*, 299-314, 2, 2003 ; 及び Salvatore Sechi and Yoshiya Oda, Quantitative proteomics using mass spectrometry, *Current Opinion in Chemical Biology*, 70-77, 7, 2003 に記載されているような、安定同位体を用いた手法が考案されている。

また、Hiroki Kuyama, Makoto Watanabe, Chikako Toda, Eiji Ando, Koichi Tanaka and Osamu Nishimura, An Approach to Quantitative Proteome Analysis by Labeling Tryptophan Residues, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1642-1650, 17, 2003 ; 及び国際公報第 2 0 0 4 / 0 0 2 9 5 0 号パンフレットには、本発明者らによって開発された手法（NBS 法）が記載されている。NBS 法においては、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド(NBSCI)の安定同位体標識体（2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）及びその非標識体（2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）を用いる。すなわち、(1)解析すべきタンパク質試料 I とその対照タンパク質試料 II との 2 種類の状態のタンパク質試料を用意し、(2)前記タンパク質試料 I を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか一方を用いてラベル化し、別途、前記タンパク質試料 II を、2-ニトロ [^{13}

C₆] ベンゼンスルフェニルクロリド及び2-ニトロ [¹²C₆] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか他方を用いてラベル化し、(3)ラベル化されたタンパク質試料Ⅰ及びラベル化されたタンパク質試料Ⅱを混合し、(4)脱塩カラムを用いて未反応の試薬を除き、(5)得られたラベル化タンパク質混合物を還元・アルキル化した後、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片とを含むペプチド混合物へ消化し、(6)ペプチド混合物からラベル化ペプチド断片を、疎水クロマトグラフィーカラムを用いて濃縮分離し、(7)質量分析を行う。

<ニトロチロシン>

生体内において、一酸化窒素 (NO) や、それから生じるより反応性の高い窒素酸化物 (パーオキシナイトライトなど) が、タンパク質や核酸と反応してニトロ化物を生成することが知られている。例えばタンパク質の場合には、チロシンの側鎖であるフェニル基に対して反応し、3-ニトロチロシンが生成する。チロシン残基は生体内でしばしばリン酸化を受けるが、リン酸化はシグナル伝達や細胞死など生体内の重要なイベントにおけるスイッチ的役割を果たしている。このような理由から、ニトロチロシンを有する生体関連物質は、生体内における反応性窒素酸化物生成の指標 (バイオマーカー) としてのみならず、生物活性という視点からも注目されている。

なお、タンパク質のチロシン残基のニトロ化の方法は、A reagent for the nitration of tyrosine and tyrosyl residues of proteins, Journal of the American Chemical Society, 1966, 88, 4104-4105 や、A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins, Biochemistry, 1966, 5, 3582-3589 に記載されている。

第3の発明についての背景技術を以下に述べる。

プロテオーム解析 (タンパク質の網羅的解析) 分野においては、これまで二次元電気泳動と質量分析装置とを組み合わせた PMF (ペプチドマスフィンガープリンティング) 解析法が主流であった。これに代わる次世代のプロテオーム

解析法として、例えば、Steven P. Gygi, Beate Rist, Scott A. Gerber, Frantisek Turecek, Michael H. Gelb and Ruedi Aebersold, Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags, Nature Biotechnology, 994-999, 17, 1999 ; Kirk C. Hansen, Gerold Schmitt-Ulms, Robert J. Chalkley, Jan Hirsch, Michael A. Baldwin and A. L. Burlingame, Mass Spectrometric Analysis of Protein Mixtures at Low Levels Using Cleavable ^{13}C -Isotope-coded Affinity Tag and Multidimensional Chromatography, Molecular & Cellular PROTEOMICS, 299-314, 2, 2003 ; 及び Salvatore Sechi and Yoshiya Oda, Quantitative proteomics using mass spectrometry, Current Opinion in Chemical Biology, 70-77, 7, 2003 に記載されているような、安定同位体を用いた手法が考案されている。

また、Hiroki Kuyama, Makoto Watanabe, Chikako Toda, Eiji Ando, Koichi Tanaka and Osamu Nishimura, An Approach to Quantitative Proteome Analysis by Labeling Tryptophan Residues, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1642-1650, 17, 2003 ; 及び国際公報第 2 0 0 4 / 0 0 2 9 5 0 号パンフレットには、本発明者らによって開発された手法（NBS 法）が記載されている。NBS 法においては、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド(NBSCI)の安定同位体標識体（2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）及びその非標識体（2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）を用いる。すなわち、(1)解析すべきタンパク質試料 I とその対照タンパク質試料 II との 2 種類の状態のタンパク質試料を用意し、(2)前記タンパク質試料 I を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか一方を用いてラベル化し、別途、前記タンパク質試料 II を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか他方を用いてラベル化し、(3)ラベル化されたタンパク質試料 I 及びラベル化されたタンパク質試料 II を混合し、(4)得られたラベル化タンパ

ク質混合物を還元・アルキル化した後、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片とを含むペプチド混合物へ消化し、(5)ペプチド混合物からラベル化ペプチド断片を、疎水クロマトグラフィーカラムを用いて濃縮分離し、(6)質量分析を行う。

NBS 法のプロトコルの一例を、以下に挙げる。

- ・ テスト試料とコントロール試料との 2 系統のタンパク質試料を、それぞれ 0.1w/v % SDS を含む溶液で可溶化し、熱変性 (100°C、3 分間) させる
- ・ 一方の試料に対して NBS (Heavy)試薬を溶解した酢酸溶液を加え、他方の試料に対して NBS (Light)試薬を溶解した酢酸溶液を加え、それぞれ NBS ラベル化反応を行う (室温、終夜)
- ・ 両方の試料を混合し、脱塩カラム (LH-20) を用いて未反応の試薬を除く
- ・ 脱塩後の試料を乾燥し、0.01w/v % SDS を含む溶液に再懸濁する
- ・ TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride ; トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン塩酸塩)を加えて、還元反応を行う (37°C、30 分)
- ・ ヨードアセトアミド溶液を加えてアルキル化反応を行う (室温、45 分)
- ・ トリプシンを加え、部位特異的切断を行う (37°C、16 時間)
- ・ 濃縮カラム (LH-20) を用いて、NBS ラベル化ペプチドを濃縮する
- ・ 濃縮画分を質量分析装置を用いて解析する

発明の開示

第 1 の発明の目的及び概要について、以下に述べる。

発明の目的

上述のように、MALDI-IT 型、MALDI-IT-TOF 型や MALDI-FTICR 型の質量分析装置においてはマトリックスとして主に DHB を用いている。しかし、疎水性のペプチドを含む試料の測定を行う場合は、DHB を用いても疎水性ペプチドを効率よくイオン化することができない。

そこで本発明の目的は、MALDI 型質量分析装置、特に MALDI-IT 型、MALDI-IT-TOF 型や MALDI-FTICR 型の質量分析装置において、疎水性のペプチドを効率よくイオン化することができる方法を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、鋭意検討した結果、マトリックスとして α -シアノー 3-ヒドロキシケイ皮酸又は 3-ヒドロキシ 4-ニトロ安息香酸を用いることによって上記本発明の目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、以下の発明を含む。

(1) MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) イオン源を有する質量分析装置によって、ペプチドを α -シアノー 3-ヒドロキシケイ皮酸又は 3-ヒドロキシ 4-ニトロ安息香酸をマトリックスとして用いて測定する方法。

(2) 前記マトリックスとして 3-ヒドロキシ 4-ニトロ安息香酸を用いる場合に、前記 3-ヒドロキシ 4-ニトロ安息香酸と α -シアノー 4-ヒドロキシケイ皮酸とを組み合わせた混合マトリックスを用いて測定する、(1)に記載のペプチドの測定方法。

(3) 前記ペプチドが、疎水性化合物により化学修飾されたペプチドである、(1) 又は (2) に記載のペプチドの測定方法。

(4) 前記ペプチドが、スルフェニル化合物によって修飾されたアミノ酸残基を含有するペプチドである、(1) ~ (3) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(5) 前記ペプチドが、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドによって誘導体化されたペプチドである、(1) ~ (4) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

ここで、本明細書においてペプチドとは、オリゴペプチド、ポリペプチ

ド及びタンパク質を含む意味で用いる。

(6) MALDI-IT (マトリックス支援レーザー脱離イオン化ーイオントラップ) 型質量分析装置による、(1) ~ (5) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(7) MALDI-IT-TOF (マトリックス支援レーザー脱離イオン化ーイオントラップー飛行時間) 型質量分析装置による、(1) ~ (5) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(8) MALDI-FTICR (マトリックス支援レーザー脱離イオン化ーフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴) 型質量分析装置による、(1) ~ (5) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(9) 前記マトリックスを、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いる、(1) ~ (8) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(10) 前記 α -シアノー4-ヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いる、(2) ~ (9) のいずれかに記載のペプチドの測定方法。

(11) 前記 3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸の溶液と、前記 α -シアノー4-ヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、1:10 ~ 10:1 の体積比で組み合わせて用いる、(10) に記載のペプチドの測定方法。

本発明によると、MALDI 型質量分析装置、特に MALDI-IT 型、MALDI-IT-TOF 型や MALDI-FTICR 型の質量分析装置において、疎水性のペプチドを効率よくイオン化することができる方法を提供することができる。

第2の発明の目的及び概要について、以下に述べる。

発明の目的

MALDI 法ではレーザー光の照射で試料・マトリックス混合物の気化およ

びイオン化を行うが、一回（1 ショット）でイオン化できる分子の数には限度がある。そのため、測定する試料に複数の分子種が混在している場合、存在量の多い分子種が確率的に多くイオン化し、存在量の少ない分子は、たとえ検出限界以上の試料が存在していても、確率的に検出されにくくなってしまう。また、測定する試料分子間に「イオン化されやすさ」の差がある場合も、イオン化されにくい分子は測定の感度が下がってしまうことになる。このように、イオン化されにくい分子種や存在量の少ない分子種を検出するためには、あらかじめ目的とする分子の濃縮を行っておくことが重要である。

定量性が必要となるような解析の中でも NBS 法の場合、濃縮せずに目的分子である NBS 修飾分子の検出は可能であるが、関係のない分子と重なってしまうと定量性が下がってしまうことがある。従って、この場合でも、定量性の向上という観点から、濃縮によりあらかじめ NBS で修飾されていない分子種を除いておく方が好ましいと考えられる。

本発明の目的は、質量分析において目的の物質を主として検出することができる、より簡便、安価で且つ感度の良い検出方法を提供することにある。

発明の概要

本発明は以下の発明を含む。

（１２）質量分析において、測定すべき特定の物質と前記特定の物質以外の物質とを含む混合物サンプルに含まれる、前記特定の物質を、

前記特定の物質以外の物質よりも、前記特定の物質をよりイオン化させやすいマトリックスを用いることによって特異的にイオン化し、混合物から特定の物質を選択的に測定する質量分析方法。

すなわち、本発明におけるマトリックスは、特定の物質を主としてイオン化し、且つ前記特定の物質以外の物質をイオン化しにくいため、特定の物質を特異的にイオン化することができる。

(13) 前記特定の物質が生体関連物質である、(12)に記載の質量分析方法。

(14) 前記生体関連物質が、タンパク質、ペプチド、糖及び脂質から選ばれる、(13)に記載の質量分析方法。

(15) 前記特定の物質が同位体標識されている、(12)～(14)のいずれかに記載の質量分析方法。

(16) 前記マトリックスが、前記特定の物質とファンデルワールス相互作用することができる物質である、(12)～(15)のいずれかに記載の質量分析方法。

(17) 前記特定の物質が π 電子含有物質であり、且つ前記マトリックスが π 電子含有物質である、(12)～(16)のいずれかに記載の質量分析方法。

すなわち本発明のこの形態においては、測定すべき特定の物質とマトリックスとの π - π 電子相互作用を利用する。

(18) 前記特定の物質が親水性物質であり、且つ前記マトリックスが親水性物質である、(12)～(16)のいずれかに記載の質量分析方法。

すなわち本発明のこの形態においては、測定すべき特定の物質とマトリックスとの親水性相互作用を利用する。

(19) 前記特定の物質が疎水性物質であり、且つ前記マトリックスが疎水性物質である、(12)～(17)のいずれかに記載の質量分析方法。

すなわち本発明のこの形態においては、測定すべき特定の物質とマトリックスとの疎水性相互作用を利用する。

以下は、上記(19)の形態についての発明である。

(20) 前記特定の物質が、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質である、(19)に記載の質量分析方法。

(21) 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、ベンゼン環及び/又はベンゼン環以外の芳香環を有する、(20)に記載の質量分析方法。

(22) 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、さらにニトロ基を有する、(20) 又は (21) に記載の質量分析方法。

(23) 前記疎水性ペプチド又はタンパク質が、ニトロベンゼンスルフェニル基又はニトロフェニル基を有する、(20) ~ (22) のいずれかに記載の質量分析方法。

(24) 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、ベンゼン環、ベンゼン環以外の芳香環、及び/又はニトロ基を有する疎水性化合物を用いて、前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質に対応するペプチド又はタンパク質を化学修飾することによって得られる、(20) ~ (23) のいずれかに記載の質量分析方法。

ここで、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質に対応するペプチド又はタンパク質としては、それ自体が疎水性である場合も含まれる。すなわち、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、疎水性化合物を用いた化学修飾によって、より疎水性の高いペプチド又はタンパク質に誘導体化される場合も含まれる。

(25) 前記疎水性化合物が、スルフェニル化合物である、(24) に記載の質量分析方法。

(26) 前記スルフェニル化合物が2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドである、(25) に記載の質量分析方法。

(27) 前記マトリックスが、前記特定の物質との間で電荷の授受を行うための官能基と、前記マトリックス自身に疎水性を与えるための官能基とを有する、ベンゼン環又はベンゼン環以外の芳香環の置換体である、(19) ~ (26) のいずれかに記載の質量分析方法。

(28) 前記電荷の授受を行うための官能基がカルボキシル基、水酸基、アミノ基、硫酸基、硝酸基及びアルデヒド基から選ばれる、(27) に記載の質量分析方法。

(29) 前記疎水性を与えるための官能基がニトロ基である、(27) 又は (28) に記載の質量分析方法。

(30) 前記マトリックスがニトロ安息香酸誘導体又はニトロフェノール誘導体である、(19)～(29)のいずれかに記載の質量分析方法。

(31) 前記マトリックスがヒドロキシニトロ安息香酸誘導体である、(19)～(30)のいずれかに記載の質量分析方法。

(32) 前記マトリックスがヒドロキシニトロ安息香酸の位置異性体から選ばれる、(19)～(31)のいずれかに記載の質量分析方法。

(33) 前記マトリックスが、4-ニトロアニリン、2,4-ジニトロアニリン、2-ブロモ-4,6-ジニトロアニリン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、2,5-ジニトロフェノール4-ニトロ安息香酸、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、及び3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸から選ばれる、(19)～(29)のいずれかに記載の質量分析方法。

(34) 前記マトリックスに α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を組み合わせた混合マトリックスを用いる、(19)～(33)のいずれかに記載の質量分析方法。

(35) 前記マトリックスを、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として用いる、(19)～(34)のいずれかに記載の質量分析方法。

(36) 前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として用いる、(34)又は(35)に記載の質量分析方法。

(37) 前記マトリックスの溶液と、前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、1:10～10:1の体積比で用いる、(36)に記載の質量分析方法。

本発明によると、測定すべき目的の物質の濃縮工程を行わなくとも、質量分析において目的の物質を主として検出することができる方法を提供することができる。

第3の発明の目的及び概要について、以下に述べる。

発明の目的

本発明者らによって開発された従来の NBS 法は、モデルタンパク質のような精製された標品を用いた場合に特に効果的に用いることができる。本発明者らは、このような精製試料だけでなく生体由来試料など非精製の試料についても効果的に用いることができ、なおかつ、従来の NBS 法よりも検出感度及び定量性に優れたタンパク質の網羅的定量解析方法を提供するために、本発明を完成させた。

発明の概要

本発明は以下の発明を含む。

(38) (i) 解析すべきタンパク質試料 I とその対照タンパク質試料 II との 2 種類の状態のタンパク質試料を用意する工程と、

(ii) 前記タンパク質試料 I を、尿素を変性剤として含む溶液中で可溶化するか、又はグアニジン塩酸塩を変性剤として含む溶液中で可溶化することによって、可溶化されたタンパク質試料 I を得て、

別途、前記タンパク質試料 II を、尿素を変性剤として含む溶液中で可溶化するか、又はグアニジン塩酸塩を変性剤として含む溶液中で可溶化することによって、可溶化されたタンパク質試料 II を得る工程と、

(iii) 前記可溶化されたタンパク質試料 I を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか一方を用いてラベル化反応させることによって、ラベル化タンパク質試料 I を得て、

別途、前記可溶化されたタンパク質試料 II を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか他方を用いてラベル化反応させることによって、ラベル化タンパク質試料 II を得る工程と、

(iv) 前記ラベル化タンパク質試料Ⅰ及びラベル化タンパク質試料Ⅱを、混合及び脱塩することによって、脱塩タンパク質試料混合物を得る工程と、

(v) 前記脱塩タンパク質試料混合物を、尿素又はグアニジン塩酸塩を用いて再可溶化することによって、再可溶化されたタンパク質試料混合物を得る工程と、

(vi) 前記再可溶化されたタンパク質試料混合物を還元・アルキル化することによって、還元・アルキル化されたタンパク質試料混合物を得る工程と、

(vii) 前記還元・アルキル化されたタンパク質試料混合物を、尿素又はグアニジン塩酸塩の存在下でトリプシン消化することによって、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片とを含むペプチド混合物を得る工程と、

(viii) 前記ペプチド混合物を、フェニル基を有する担体を用いて分離することによって、濃縮されたラベル化ペプチド断片を得る工程と、

(ix) 前記濃縮されたラベル化ペプチド断片を質量分析する工程とを含む、タンパク質の網羅的定量解析方法。

(39) 前記工程 (ix) において、 α -シアノー-3-ヒドロキシ桂皮酸又は3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸をマトリックスとして用いて質量分析する、(38)に記載の方法。

(40) 前記工程 (ix) において、前記マトリックスとして3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸を用いる場合に、前記3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸と α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸とを組み合わせた混合マトリックスを用いて質量分析する、(38)に記載の方法。

(41) 前記マトリックスを、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として用いる、(39)又は(40)に記載の方法。

(42) 前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として用いる、(40)又は(41)に記載の方法。

(43) 前記3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸の溶液と、前記 α -

シアノー４－ヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、１：１０～１０：１の体積比で組み合わせて用いる、（４２）に記載の方法。

（４４）２－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２－ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むキット。

（４５）前記（３８）～（４３）のいずれか１項に記載の方法を行うための、２－ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２－ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むキット。

（４６）変性剤をさらに含む、（４４）又は（４５）に記載のキット。

（４７）マトリックスとして α －シアノー３－ヒドロキシ桂皮酸、３－ヒドロキシ－４－ニトロ安息香酸、 α －シアノー４－ヒドロキシ桂皮酸、又は混合マトリックスとして３－ヒドロキシ－４－ニトロ安息香酸と α －シアノー４－ヒドロキシ桂皮酸との混合物をさらに含む、（４４）～（４６）のいずれかに記載のキット。

（４８）前記変性剤が尿素又はグアニジン塩酸塩である、（４６）又は（４７）に記載のキット。

（４９）脱塩用カラム、脱塩用カラム充填ゲル、還元試薬、アルキル化試薬、トリプシン、及び前記担体を充填するためのカラムからなる群から選ばれる少なくとも１つをさらに含む、（４４）～（４８）のいずれかに記載のキット。

本発明によると、生体由来試料から目的のペプチドを質量分析においてより感度良く、且つより定量性高く検出することができる方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

図１～図３は、第１の発明に関するものである。

図 1 は、実施例 A-1 において、従来の方法によって得られた比較用の MS スペクトル(a)と、本発明の方法によって得られた MS スペクトル(b)及び(c)である。

図 2 は、実施例 A-1 において得られた MS/MS スペクトルである。

図 3 は、実施例 A-2 (a) において、イオントラップを持つ AXIMA-QIT で測定することによって得られた MS スペクトル(a-1)、及びイオントラップを持たない AXIMA-CFR plus で測定することによって得られた MS スペクトル(a-2)、及び、実施例 A-2 (b) において、マトリックスとして 3H4NBA と 4-CHCA とを混合して用いることによって得られた MS スペクトル(b-1)、及びマトリックスとして 3H4NBA を用いることによって得られた MS スペクトル(b-2)である。

図 4～図 13 は、第 2 の発明に関するものである。

図 4 は、測定サンプルを、ACTH ペプチドと、NBS Reagent (light)でラベル化した ACTH ペプチドとの混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル ((a)及び(b))、及び、本発明によって得られたマスペクトル ((c)及び(d)) である。

図 5 は、測定サンプルを、精製タンパク質 4 種類 (オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン) の NBS Reagent (heavy)による標識ラベル化物と NBS Reagent (light)による非標識ラベル化物との 1 : 1 混合物を消化したものとした場合の従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル(b)である。

図 6 は、測定サンプルを、DSIP ペプチドと NBS Reagent (light)でラベル化した DSIP ペプチドとの混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル(b)である。

図 7 は、測定サンプルを、リゾチームをニトロ化しトリプシン消化して

得られた混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル(b)である。

図 8 は、図 7 の部分拡大図である。

図 9 は、測定サンプルを、NBS Reagent (light)でラベル化したペプチド IRRP1 とラベル化していないペプチド IRRP1 との混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル(b)である。

図 10 は、測定サンプルを、p-ニトロフェニルアラニンを含むペプチド HIV subIII とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル(b)である。

図 11 は、測定サンプルを、NBS Reagent (light)でラベル化した ACTH とラベル化していない ACTH との混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル ((b)及び(c)) である。

図 12 は、測定サンプルを、NBS Reagent (light)でラベル化した ACTH とラベル化していない ACTH との混合物とした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(a)、及び本発明によって得られたマスペクトル ((b)、(c)、(d) 及び(e)) である。

図 13 は、測定サンプルを、精製タンパク質 4 種類 (オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン) の NBS Reagent (heavy)によるラベル化物と NBS Reagent (light)によるラベル化物との 1 : 1 混合物を消化したものとした場合の、従来法によって得られたマスペクトル(f)、及び本発明によって得られたマスペクトル ((a)、(b)、(c)、(d)、(e)及び(g)) である。

図 14 ~ 図 23 は、第 3 の発明に関するものである。

図 1 4 は、実験例 C-1 で得られた電気泳動図である。

図 1 5 は、実験例 C-2 で得られた電気泳動図である。

図 1 6 は、実験例 C-3 で得られた MS スペクトルである。

図 1 7 は、実験例 C-5 で得られた MS スペクトルである。

図 1 8 は、実験例 C-6 で得られた MS スペクトルである。

図 1 9 は、実験例 C-6 で得られた MS スペクトルである。

図 2 0 は、実験例 C-7 で得られた MS スペクトルである。

図 2 1 は、実験例 C-7 で得られた MS/MS スペクトルである。

図 2 2 は、実験例 C-8 で得られた MS スペクトルである。

図 2 3 は、実験例 C-9 で得られた MS スペクトルである。

発明を実施するための形態

第 1 の発明を実施するための形態について、以下に述べる。

本発明の方法は、MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）イオン源を有する質量分析装置を用いて、疎水性のペプチド試料を測定する方法である。なお、現在に至るまで、MALDI 法のイオン化機構については完全に解明されているとはいえない。本明細書の記載は、現在最も多く受け入れられている解釈に基づく。

本発明において疎水性ペプチド・疎水性タンパク質とは、ペプチド・タンパク質の組成アミノ酸残基のうち、疎水性のアミノ酸、特に疎水性の高いアミノ酸の含量が比較的高いもの、下記の基を有するもの、及び下記の化学修飾を受けたものをいう。疎水性の高いアミノ酸としては、例えば、トリプトファン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、メチオニンなどを挙げることができる。さらに、アラニン、グリシン、プロリンなども疎水性のアミノ酸とみなすこともある。

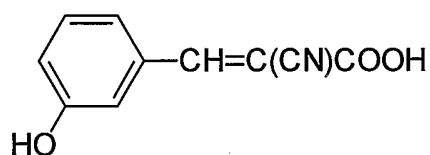
特に本発明は、ニトロベンゼンスルフェニル基（NBS 基： NO_2PhS 基（Ph：フェニレン基））やニトロフェニル基などを有している疎水性ペプチドを測定する場合に有用に用いられる。このような疎水性ペプチドとしては、ニトロチロシン残基、ニトロフェニルアラニン残基、NBS 基を置換基として有するトリプトファン残基、NBS 基を置換基として有するシステイン残基などを含むペプチドが挙げられる。

疎水性ペプチドは、対応するペプチドを疎水性化合物によって化学修飾することによって得たものでもよい。ここで、対応するペプチドとしては、それ自体が疎水性である場合も含まれる。すなわち、疎水性ペプチドが、疎水性化合物を用いた化学修飾によって、より疎水性の高いペプチドに誘導体化される場合も含まれる。疎水性化合物は、スルフェニル化合物であることが好ましい。なお、スルフェニル化合物は、ペプチド又はタンパク質中のトリプトファン残基及びシステイン残基を特異的に修飾する化合物である。スルフェニル化合物の特に好ましい例として、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド（NBS 試薬）が挙げられる。すなわち、本発明において好ましい疎水性ペプチドの一例としては、トリプトファン残基やシステイン残基を有するペプチドを NBS 試薬を用いて化学修飾することによって得たものが挙げられる。

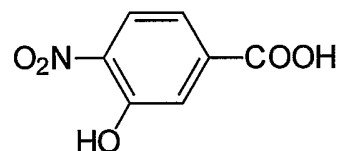
本発明の方法は、MALDI イオン源と組み合わされる質量分析計として、生成したイオンが検出器に到達して測定されるまでの時間が通常の MALDI-TOF 型のものに比べて長いものに特に有用に用いることができる。このような質量分析装置としては、MALDI-IT（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－イオントラップ）型質量分析装置、MALDI-IT-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－イオントラップ－飛行時間）型質量分析装置、MALDI-FTICR（マトリックス支援レーザー脱離イオン化－フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴）型質量分析装置などが挙げられる。

本発明においては、マトリックスとして、 α -シアノ- β -ヒドロキシ

ケイ皮酸（3-CHCA; 下記式 A-I）又は 3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸（3H4NBA; 下記式 A-II）を用いる。



(A-I)



(A-II)

これらの化合物は、質量分析用マトリックスとして用いるという目的において、当業者が適宜その使用形態を決定することができる。たとえば、これらの化合物は、溶液として用いることが好ましい。溶液の濃度としては特に限定されないが、例えば、1 mg/ml ～飽和濃度の溶液として用いることができる。

このような溶液の調製に用いられる溶媒としては、アセトニトリル水溶液、トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液、又はアセトニトリル-トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液を用いることが好ましい。アセトニトリル水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を用いる場合、アセトニトリルの濃度は特に限定されないが、90%以下、好ましくは50%程度用いることができる。TFA 水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を用いる場合、TFA の濃度も特に限定されないが、1%以下、好ましくは0.1%程度用いることができる。

そして、マトリックスとして 3-CHCA を用いる場合は、上述の溶媒に溶解させることにより、特に限定されないが例えば 1 mg/ml ～飽和濃度、好ましくは 10 mg/ml のマトリックス溶液として用いることができる。また、マトリックスとして 3H4NBA を用いる場合は、このような溶媒に溶解させることにより、特に限定されないが例えば 1 mg/ml ～飽和濃度のマトリックス溶液として、好ましくは、飽和濃度のマトリックス溶液として用いることができる。

なお、本明細書における、%で表された量の基準に関しては、特に断りのない限り v/v%とする。

上記のマトリックスを用いることにより、以下のような利点がある。

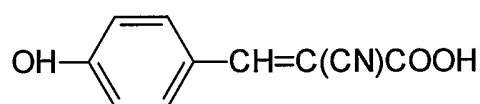
まず、先に述べたように、MALDI-IT 型質量分析装置、MALDI-IT-TOF 型質量分析装置 MALDI-FTICR 型質量分析装置などは、生成したイオンが検出器に到達して測定されるまでの時間が通常の MALDI-TOF 型のものに比べて長い。また、マトリックスは、受け取ったレーザーのエネルギーにより加熱され気化・イオン化するが、そのエネルギーの一部は試料分子の内部エネルギーとなり、徐々にイオンの自己崩壊をもたらす。すなわち、生成したイオンが検出器に到達して測定されるまでの時間が長いほど自己崩壊が進み、結果として望まないフラグメントイオンがたくさん検出されることとなる。本発明において用いられるマトリックスは、従来法（例えば 4-CHCA が単独でマトリックスとして用いられる方法）におけるマトリックスに比べ、イオン化の際に測定分子に対して与える内部エネルギーが小さいと考えられる。そのため、上述のように、生成したイオンが検出器に到達して測定されるまでの時間が長い質量分析装置において用いられても、生成したイオンの自己崩壊の進行を抑えることができる。

このような理由で、本発明は、イオントラップ型質量分析装置のようにイオン化からイオンの検出までの時間が比較的長い質量分析装置において特に有用に用いられる。従って、イオントラップを持たない質量分析装置においても有用に用いられることはいうまでもない。

さらに、先に述べたように、マトリックスと試料分子との親和性は、イオン化の際の重要なファクターである。従って、疎水性度の高い試料には疎水性度の高いマトリックスが、親水性度の高い試料には親水性度の高いマトリックスが合うと考えられる。本発明において用いられるマトリックス 3-CHCA や 3H4NBA は、従来のマトリックス（例えば DHB）に比べ、疎水性度が高いと考えられる。一方、本発明において測定されるペプチド試料分子も疎水性度が高いため、マトリックスとしての 3-CHCA や 3H4NBA との親和性が高いと考えられる。その結果、ペプチド試料とマトリックスとが均一な微小結晶を作りやすく、効率

良いイオン化を達成することができると考えられる。

本発明においては、マトリックスとして3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸（3H4NBA）を用いる場合に、3H4NBAを α -シアノー-4-ヒドロキシヘイ皮酸（4-CHCA; 下記式 A-III）と組み合わせた混合マトリックスとして用いることが好ましい。4-CHCAは、ペプチドを質量分析測定する際に広く一般的にマトリックスとして用いられている化合物である。（以下本明細書において、4-CHCAを組み合わせて用いずに単独で使用するマトリックスと、4-CHCAを組み合わせて用いる混合マトリックスとを、単にマトリックスと記載することがある。）



(A-III)

3H4NBAと4-CHCAとの組み合わせの比率は、特に制限はないが、例えば以下のような量的関係で組み合わせることができる。

例えば、3H4NBAは、すでに述べたような濃度で調製することができる。すなわち、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として、例えばアセトニトリル水溶液、TFA水溶液又はアセトニトリル-TFA水溶液を溶媒とした場合、1 mg/ml～飽和濃度、好ましくは飽和濃度の3H4NBA溶液として調製することができる。

一方、4-CHCAは、従来から用いられてきた濃度で調製することができる。例えば、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として調製することができる。上記3H4NBAを用いる場合と同様の、アセトニトリル水溶液、TFA水溶液又はアセトニトリル-TFA水溶液を溶媒として用いる場合は、1 mg/ml～飽和濃度、好ましくは10 mg/mlの4-CHCA溶液として調製することができる。

以上のように調製された双方の溶液を、好ましくは1:10～10:1、より好ましくは1:3～3:1、例えば1:1の体積比で混合して用いる。

従来のマトリックス 4-CHCA は、MALDI-IT、MALDI-IT-TOF、MALDI-FTICR 装置など、イオン化からイオンの検出までの時間が長い MALDI 装置での測定において、測定試料の自己崩壊を生ぜしめるという欠点はあるが、測定の感度には優れており、また、質量分析試料においてレーザーを当てる最適スポットを探すのが容易であるという利点を有する。

一方、本発明のマトリックス 3H4NBA は、すでに述べたように、測定試料の自己崩壊の進行を抑えることができるとともに、疎水性の試料の効率的なイオン化を達成することができるという利点を有する。そして、本発明のマトリックス 3H4NBA が、4-CHCA と組み合わされることによって、双方のマトリックスが有する利点の相乗効果が奏される。すなわち、3H4NBA が単独で有する測定試料の自己崩壊の抑制と疎水性試料のイオン化達成という利点を確保したまま、4-CHCA が有する高感度検出能がさらに伴い、より解析効率に優れた質量分析を行うことが可能になる。

本発明によると、疎水性ペプチド（例えば NBS ラベル化ペプチド）の配列同定を行うことが可能な方法の範囲が大幅に広まった。従来の技術では、ESI（エレクトロスプレーイオン化法）を利用した質量分析装置による MS/MS 解析、MALDI 型質量分析装置の PSD 解析が用いられていたが、本発明により、CID（衝突誘起解離）を起こすことができる、MALDI-IT 型質量分析装置、MALDI-IT-TOF 型質量分析装置 MALDI-FTICR 型質量分析装置などによる MS/MS 解析が新たに可能となった。さらに、PSD よりも CID のほうが効率的にフラグメント化を起こすことができるため、ペプチドの同定率を向上させることが可能となった。

第 2 の発明を実施するための形態について、以下に述べる。

なお、MALDI 法のイオン化機構は完全に解明されているとはいえない。本明細書において示す考え方は現在有力に支持されている考え方に基づいているが、あくまで推定の域を出ない。

本発明において質量分析の対象となるサンプルは、測定すべき特定の物質とそれ以外の物質とを含む混合物である。そして、測定すべき特定の物質を、それ以外の物質よりもイオン化しやすいマトリックスを用いる。好ましくは、主として測定すべき特定の物質をイオン化し、それ以外の物質はほとんどイオン化しないマトリックスを用いる。(以下において、それ以外の物質をその他の物質と表記することがある。)

MALDI 法においては、試料分子とマトリックスとがほぼ同時に気化・イオン化される。すなわちマトリックスには、試料分子のイオン化を補助する働きと同時に、試料分子を分子レベルで分散させる働きもある。試料分子の効率良い気化・イオン化にはマトリックスと試料分子との親和性が重要であると考えられている。両者の親和性が高いと、マトリックスに試料分子が分子レベルで一様に分散されやすい、あるいは一様な混合結晶を形成しやすいと考えられる。

従って、イオン化と親和性との関係という観点からいうと、本発明においては、マトリックスは、特定の物質と親和する構造を有するものであり、特定の物質は、マトリックスと親和する構造を有するものであり、その他の物質は、そのような構造を有しないものであることが好ましい。本発明においては、このように特定の物質とマトリックスとの親和性という観点から両者を組み合わせることによって、特定の物質を特異的にイオン化する。

特定の物質としては、特に限定されないが、タンパク質、ペプチド、糖、脂質などの生体関連物質が挙げられる。特定の物質に対してその他の物質は、マトリックスと親和する構造を有しないものであれば特に限定されない。本発明においては通常、特定の物質が生体関連物質であれば、その他の物質は上記構造を有しない以外は特定の物質と同様のカテゴリーの生体関連物質である。例えば、特定の物質がペプチドである場合、その他の物質は、上記構造を有しないペプチドであることが多い。また本発明においては、その他の物質には、特定の物質の調製過程において混在した物質や副生成物などが含まれることもある。

なお、本明細書においてタンパク質、ペプチド、糖、及び脂質には、これらの修飾体も含まれる。また修飾体には、化学修飾体も含まれる。修飾体が特定の物質に相当する場合、上記修飾体は、マトリックスと親和する構造を含む基を有するものであり、上記化学修飾体は、上記構造を有する基で化学修飾することにより得られるものである。

また、特定の物質は、同位体標識されていても良い。さらにこの場合は、特定の物質は、同位体標識された物質とそれに対応する非標識体との混合物であっても良い。

質量分析の対象となる混合物サンプルの一例としては、従来技術において述べた NBS 法などで得られるような、ラベル化ペプチドと非ラベル化ペプチドとの混合物が挙げられる。この混合物サンプルにおいては、ラベル化ペプチドを特定の物質として選択的に検出する。上述のように、NBS 法では、検出すべき特定の物質としてのラベル化ペプチドは、基本的に安定同位体(^{13}C)標識化合物でラベル化されたペプチド及び非標識化合物でラベル化されたペプチドとの混合物である。本発明においては、ラベル化ペプチドを主としてイオン化し、非ラベル化ペプチドをほとんどイオン化しないマトリックスを用いることによって、ラベル化ペプチドを特異的にイオン化させることができる。このように本発明を用いると、ラベル化ペプチドと非ラベル化ペプチドとを分離することなく混合物の状態であっても、質量分析でラベル化ペプチドを選択的に検出することができる。

すでに述べたように、本発明は、マトリックスと試料分子との親和性を利用する。すなわち、このような親和性をもたらす相互作用として、ファンデルワールス相互作用、 $\pi-\pi$ 電子相互作用、親水性相互作用、疎水性相互作用などを利用する。そして、測定するサンプルに応じ、サンプル中の特定の物質と上記相互作用することが可能な物質をマトリックスとして選択する。例えば、特定の物質が π 電子含有化合物である場合には、マトリックスとして π 電子含有化合物を選択し、両者の $\pi-\pi$ 電子相互作用を利用することができる。また、特定の物

質が疎水性化合物である場合、マトリックスとして疎水性化合物を選択し、両者の疎水性相互作用を利用することができる。さらに、特定の物質が親水性化合物である場合、マトリックスとして親水性化合物を選択し、両者の親水性相互作用を利用することができる。上述の相互作用が組み合わされるように測定すべき特定の物質及びマトリックスの種類を選択すると良い。このようにして選択されたマトリックスは、特定の物質と上記相互作用を介して一様に混ざり合うか、あるいは一様な混合結晶を形成し、自身の気化・イオン化とともに特定の物質を優先的に気化・イオン化することが可能となると考えられる。

以下に、測定すべき特定の物質が疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質である場合を挙げて、測定すべき特定の物質について説明する。本発明において疎水性ペプチド・疎水性タンパク質とは、ペプチド・タンパク質の組成アミノ酸残基のうち、疎水性のアミノ酸、特に疎水性の高いアミノ酸の含量が比較的高いもの、下記の基を有するもの、及び下記の化学修飾を受けたものをいう。疎水性の高いアミノ酸としては、例えば、トリプトファン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ロイシン、バリン、メチオニンなどを挙げるることができる。さらに、アラニン、グリシン、プロリンなども疎水性のアミノ酸とみなすこともある。疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質は、ベンゼン環及び/又はベンゼン環以外の芳香環を有していることが好ましく、ニトロ基を有していることが好ましい。

特に本発明は、ニトロ基を置換基として有するベンゼン及び/又はベンゼン環以外の芳香環を含有する疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質に有用に用いられる。より具体的には、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質は、ニトロベンゼンスルフェニル基（NBS基：NO₂PhS基(Ph：フェニレン基)）やニトロフェニル基などを有していることがより好ましい。例えば、ニトロチロシン残基、ニトロフェニルアラニン残基、NBS基を置換基として有するトリプトファン残基、NBS基を置換基として有するシステイン残基などを含むタンパク質又はペプチ

ドが挙げられる。

疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質は、対応するペプチド又はタンパク質を疎水性化合物によって化学修飾することによって得たものでもよい。ここで、対応するペプチド又はタンパク質としては、それ自体が疎水性である場合も含まれる。すなわち、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、疎水性化合物を用いた化学修飾によって、より疎水性の高いペプチド又はタンパク質に誘導体化される場合も含まれる。疎水性化合物としては、ベンゼン環、ベンゼン環以外の芳香環、及び/又はニトロ基を有する疎水性化合物が挙げられる。本発明においては、疎水性化合物がスルフェニル化合物であることが好ましい。なお、スルフェニル化合物は、ペプチド又はタンパク質中のトリプトファン残基及びシステイン残基を特異的に修飾する化合物である。スルフェニル化合物の特に好ましい例として、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリド（NBS 試薬）が挙げられる。すなわち、本発明において好ましい疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質の一例としては、トリプトファン残基やシステイン残基を有するペプチド又はタンパク質を NBS 試薬を用いて化学修飾することによって得たものが挙げられる。

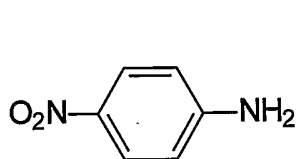
また、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質は、対応するペプチド又はタンパク質を、ニトロ化することによって得たものでも良い。すでに述べたように、対応するペプチド又はタンパク質としては、それ自体が疎水性である場合も含まれる。本発明において好ましい疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質の他の一例として、ベンゼン環及び/又はベンゼン環以外の芳香環を有するペプチド又はタンパク質に対し、通常行われる方法を用いた芳香族求電子置換反応によるニトロ化によって得たものが挙げられる。

このような疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質とともに用いられるマトリックスとしては、測定すべき特定の物質との間で電荷の授受を行うための官能基とマトリックス分子自体に疎水性を与えるための官能基とを有する芳香族置換体が好ましい。芳香族置換体としては、ベンゼン置換体が好ましい。電荷の授

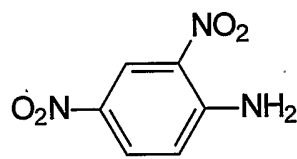
受を行うための官能基とは、電子やプロトンの受け渡しを行うための官能基であり、このような官能基としては、カルボキシル基、水酸基、アミノ基、硫酸基、硝酸基、アルデヒド基などが挙げられる。疎水性を与えるための官能基としては、ニトロ基などが挙げられる。

このような芳香族置換体の中でも、本発明においてはニトロ安息香酸誘導体、ニトロフェノール誘導体、ヒドロキシニトロ安息香酸誘導体が好ましい。特に、ヒドロキシニトロ安息香酸（HNBA）の10個の芳香族位置異性体から選ばれるものが好ましい。

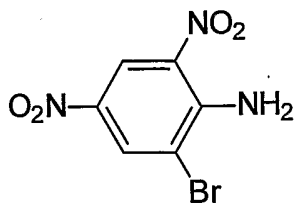
本発明のマトリックスの具体例としては、4-ニトロアニリン（4NA；下記式(B-I)）、2,4-ジニトロアニリン（2,4DNA；下記式(B-II)）、2-ブロモ-4,6-ジニトロアニリン（2B4,6DNA；下記式(B-III)）、4-ニトロフェノール（4NP；下記式(B-IV)）、2-ニトロフェノール（2NP；下記式(B-V)）、2,5-ジニトロフェノール（2,5DNP；下記式(B-VI)）、4-ニトロ安息香酸（4NBA；下記式(B-VII)）、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸（3H4NBA；下記式(B-VIII)）、3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸（3H2NBA；下記式(B-IX)）などが挙げられる。これらの構造式を以下に示す。



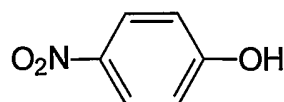
(B-I) 4NA



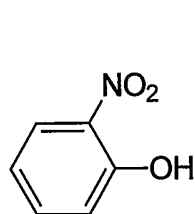
(B-II) 2,4-DNA



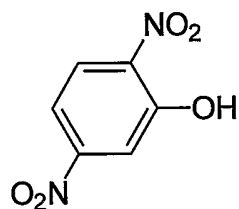
(B-III) 2B4,6-DNA



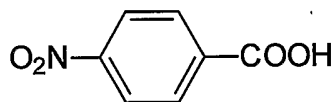
(B-IV) 4NP



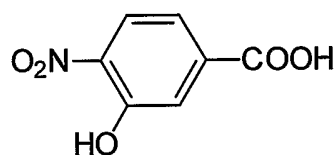
(B-V) 2NP



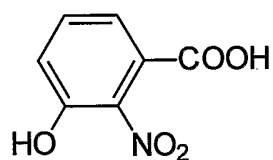
(B-VI) 2,5-DNP



(B-VII) 4NBA



(B-VIII) 3H4NBA



(B-IX) 3H2NBA

これらの化合物は、質量分析用マトリックスとして用いるという目的において、当業者が適宜その使用形態を決定することができる。たとえば、これらの化合物は、溶液として用いることが好ましい。例えば、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いることができる。

このような溶液の調製に用いられる溶媒としては、アセトニトリル水溶液、トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液、又はアセトニトリル-トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を用いることが好ましい。アセトニトリル水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を用いる場合、アセトニトリルの濃度は特に限定されないが、

90%以下、好ましくは50%程度用いることができる。TFA水溶液又はアセトニトリル-TFA水溶液を用いる場合、TFAの濃度も特に限定されないが、1%以下、好ましくは0.1%程度用いることができる。

そして、2,4-ジニトロアニリン、2-ブロモ-4,6-ジニトロアニリン、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、4-ニトロ安息香酸、及び3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸は、このような溶媒に溶解させることにより、特に限定されないが例えば1mg/ml～飽和濃度、好ましくは10mg/mlのマトリックス溶液として用いることができる。

また、4-ニトロアニリン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、2,5-ジニトロフェノール、及び3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸は、このような溶媒に溶解させることにより、特に限定されないが例えば1mg/ml～飽和濃度のマトリックス溶液として、好ましくは、飽和濃度のマトリックス溶液として用いることができる。

なお、本明細書における、%で表された量の基準に関しては、特に断りのない限りv/v%とする。

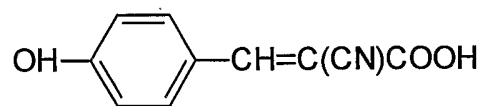
本発明において、測定すべき特定の物質とマトリックスとの特に好ましい組み合わせは、NBS試薬で修飾されたペプチド又はタンパク質と、ニトロ基を有する芳香族置換体との組み合わせである。ここに挙げた測定すべき特定の物質とマトリックスとは、双方がニトロベンゼン構造を有する。

すでに述べたように、MALDI法では試料はマトリックスとほぼ同時に気化・イオン化されるため、試料の検出においては、試料とマトリックスとの様な混合結晶形成に必要とされる両者の親和性が関わっていると考えられている。ニトロ基を有する芳香族置換体をマトリックスとして用いた、NBS修飾ペプチド又はタンパク質の特異的検出においては、このような試料とマトリックスとの組み合わせは、両者の疎水性相互作用及び π - π 電子相互作用に起因する親和力に加え、ニトロ基の存在も関わっていると考えられる。

このように測定すべき特定の試料とマトリックスとが好ましく組み合わせられるため、本発明は、濃縮分離などの処理を行わない測定サンプルに対して特に有用に用いられる。濃縮分離は、時として困難であったり不十分であったりすることもあり、測定までの処理工程の増加及びそれに伴う試料のロスの増加や、時間、費用などの増加につながることもあるため、本発明の方法は非常に簡便且つ安価な方法といえる。なお、感度の良い特異的検出を行うことが可能な本発明の方法が、濃縮分離などの処理を行った測定サンプルに対しても有用に用いられることはいうまでもない。

さらに、本発明においては、以上に述べたような化合物をそれぞれ単独でマトリックスとして用いることのほかに、以下のような混合マトリックスを用いることも好ましい。

本発明の混合マトリックスは、以上に述べたマトリックスと α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸(4-CHCA; 下記式(B-X))とを混合させたものである。 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸は、従来からペプチドを測定する際に広く一般的に用いられるマトリックスである。(以下本明細書において、4-CHCA を組み合わせて用いずに単独で使用するマトリックスと、4-CHCA を組み合わせて用いる混合マトリックスとを、単にマトリックスと記載することがある。)



(B-X) 4-CHCA

マトリックスと 4-CHCA との組み合わせの比率は、特に制限はないが、例えば以下のような量的関係で組み合わせることができる。

マトリックスは、すでに述べたような量で調製することができる。すな

わち、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として調製することができる。例えば、2, 4-ジニトロアニリン、2-ブロモ-4, 6-ジニトロアニリン、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、4-ニトロ安息香酸、及び3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸は、アセトニトリル水溶液、TFA 水溶液、又はアセトニトリル-TFA 水溶液を溶媒として用いた場合、1 mg/ml ~ 飽和濃度、好ましくは飽和濃度のマトリックス溶液として調製することができる。また例えば、4-ニトロアニリン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、2, 5-ジニトロフェノール、及び3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸は、上記水溶液を溶媒として用いた場合、1 mg/ml ~ 飽和濃度、好ましくは10 mg/ml マトリックス溶液として調製することができる。

一方、4-CHCA は、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として調製することができる。上記マトリックスとして用いられるときと同様の、アセトニトリル水溶液、TFA 水溶液、又はアセトニトリル-TFA 水溶液を溶媒として用いた場合、1 mg/ml ~ 飽和濃度、好ましくは10 mg/ml の4-CHCA 溶液として調製することができる。

以上のように調製された双方の溶液を、好ましくは1:10 ~ 10:1、より好ましくは1:3 ~ 3:1、例えば1:1の体積比で混合して用いる。

従来のマトリックス 4-CHCA は、例えば濃縮処理を行っていない測定試料の質量分析測定において、必ずしも特定の物質を特異的に検出することはできない。しかしながら、測定の感度には優れており、また、質量分析試料においてレーザーを当てる最適スポットを探すのが容易であるという利点を有する。

一方、4-ニトロアニリン、2, 4-ジニトロアニリン、2-ブロモ-4, 6-ジニトロアニリン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、2, 5-ジニトロフェノール、4-ニトロ安息香酸、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、及び3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸として例示される、ニトロベンゼン誘導体などの本発明のマトリックスは、すでに述べたように、本発明の測

定試料中の特定の物質との親和性に優れていると考えられ、そのため、特定の物質の効率的なイオン化を達成することができるという利点を有する。そして、これらのマトリックスが、混合マトリックスとして 4-CHCA と組み合わせられることによって、双方のマトリックスが有する利点の相乗効果が奏される。すなわち、これらのマトリックスが単独でも有する特異的検出能を実用レベルで損ねることなく、4-CHCA が有する高感度検出能が相伴い、より解析効率に優れた質量分析を行うことが可能になる。

本発明によると、目的の物質を選択的に検出することができる。本発明は特に、上述の NBS 法において、NBS ラベル化ペプチドと非ラベル化ペプチドを含む混合サンプルから目的の NBS ラベル化ペプチドを検出するときに有用に用いられる。この場合、基本的に、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドでラベル化されたペプチドと 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドでラベル化されたペプチドとに由来するペアピークが特異的に検出される。

本発明によると、元の解析すべきサンプル又は対照サンプルのどちらか片方にのみ含まれていたタンパク質も容易に認識することが可能である。例えば、上述の NBS 法の (6) の工程において本発明の方法を用いると、以下のようにして片方にのみ含まれていたタンパク質を認識することができる。直前の (5) の工程を行うことによって得られた質量分析用サンプルには、解析すべきタンパク質試料 I 及び II の両方のサンプルに含まれるタンパク質に由来するラベル化ペプチド（それぞれを A、A' とする。）と、どちらか片方に含まれるタンパク質に由来するラベル化ペプチド（B とする。）とが含まれる。ここで、質量分析用サンプルには、濃縮分離が不十分だと除かれ損ねたラベル化されていないペプチド（C とする。）がさらに含まれる。従来におけるマトリックス（例えば 4-CHCA）を用いて質量分析すると、A 及び A' はペアピークとして検出されるが、B 及び C のペプチドはシングルピークとして検出され、なおかつ B と C とでラベル化・非ラベル化の区別がつかない。しかし、本発明におけるマトリックスを用いると、ラベル化された

A、A'及びBが優先的に検出され、Cについてはほとんど検出されなくなる。そして、優先的に検出されたピークの中でも、ペアピークは両方のサンプルに含まれていたタンパク質に由来するラベル化ペプチドA及びA'であり、シングルピークは片方のサンプルに含まれていたタンパク質に由来するラベル化ペプチドBということが分かる。つまり、従来におけるマトリックスを用いた質量分析の結果、シングルピークとして検出されたもののうち、本発明におけるマトリックスを用いた質量分析においても検出されたBは、片方のサンプルにのみ含まれていたタンパク質に由来するラベル化ペプチドであり、ほとんど検出されなかったCは、非ラベル化ペプチドである、という区別をつけることができる。

また、従来法のようにたとえばNBSラベル化ペプチドを4-CHCAをマトリックスとして用いて解析すると、目的のペプチドのピークから $m/z=16$ 小さい位置にもピークが観察される。また、目的のペプチドのピークから $m/z=32$ 小さい位置にも微小なピークが観察されることもある。さらに、測定するペプチドによっては、目的のペプチドのピークから $m/z=155$ (NBSCI (light) (島津製作所製) でラベル化した場合) 小さい位置にもピークが検出される。本発明を用いると、これらのピークがほとんど見られなくなり、マスピークがシンプルになるため、解析が容易になる。

第3の発明を実施するための形態について、以下に述べる。

本発明の方法は、試料の準備工程(i)、可溶化工程(ii)、ラベル化工程(iii)、脱塩工程(iv)、再可溶化工程(v)、還元・アルキル化工程(vi)、消化工程(vii)、濃縮分離工程(viii)、及び質量分析工程(xi)を含む。

(i: 試料の準備工程)

まず、2種類の異なる状態のタンパク質試料I、IIを用意する。例えば、タンパク質試料Iを解析すべきタンパク質試料、タンパク質試料IIを、試料Iに

含まれるタンパク質の対照タンパク質を含む試料とすることができる。より具体的には、解析すべきタンパク質試料Ⅰを病態試料のタンパク質試料、対照タンパク質試料Ⅱを正常試料のタンパク質試料とすることができる。本発明においては、これらタンパク質試料Ⅰ及びタンパク質試料Ⅱの間での発現プロテオームの定量的な解析を行う。なお本発明においては、試料となるタンパク質試料としてペプチドのような比較的低分子量のものも含まれる。

(ii：可溶化工程)

本工程は、タンパク質試料Ⅰ及びタンパク質試料Ⅱについて、同じ条件でそれぞれ別個に行う。

本工程においては、変性剤である尿素又はグアニジン塩酸塩を用いて、タンパク質試料を可溶化する。変性剤の濃度は特に限定されず、タンパク質試料の可溶化及び変性が起こるように、タンパク質試料の種類やその他の条件等を考慮して当業者が適宜決定すればよい。例えば、尿素は2M～飽和濃度、好ましくは2～10Mの濃度の水溶液で用いることができる。より好ましくは、8Mの濃度で用いる。グアニジン塩酸塩は1.5M～飽和濃度、好ましくは1.5～8Mの水溶液で用いることができる。より好ましくは、6Mの濃度で用いる。さらに変性剤は、5mM程度のEDTAとともに用いることができる。

さらに、上述の変性剤は、タンパク質試料100 μ gに対して5～50 μ lとなるように用いることができる。好ましい量としては、25 μ l程度である。例えばタンパク質試料が凍結乾燥した粉末状態のものであれば変性剤を25 μ l用いればよく、タンパク質試料が溶液状の場合は、全量で25 μ lとなるように変性剤の濃度を調整して用いればよい。

可溶化の温度としては、尿素を用いる場合は0～30℃、好ましくは室温程度である。また、グアニジン塩酸塩を用いる場合は0～100℃、好ましくは室温程度である。

(iii: ラベル化工程)

本工程においては、上述のように可溶化されたタンパク質試料に、2種類のラベル化試薬、すなわち同位体標識された2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBSCl(heavy)) と、同位体非標識の2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBSCl(light)) とを用いてラベル化を行う。本発明のラベル化試薬によって、タンパク質中のトリプトファン残基が選択的に修飾すなわちラベル化される。タンパク質試料 I については、(NBSCl(heavy)) 及び (NBSCl(light)) のいずれか一方を用いてラベル化する。これとは別に、タンパク質試料 II については、(NBSCl(heavy)) 及び (NBSCl(light)) のいずれか他方を用いてラベル化する。

ラベル化試薬は、酢酸溶液として用いることが好ましい。例えば、酢酸 25 μl に 2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドを 0.17mg 溶解させた溶液として用いることができる。このようなラベル化試薬はタンパク質試料の 20 倍当量程度の大過剰を用いることができる。例えば、タンパク質試料 100 μg に対し、溶液中の 2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドが 0.17mg となるように用いると良い。これにより、タンパク質試料中のトリプトファン残基は、限りなく 100% 近くラベル化されることになる。

なお、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドは、厳密には NBSCl(light) と NBSCl(heavy) とで 3% 程度分子量に差が生じる。しかしながら、本明細書において 2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドの質量を記載する場合、同物質における両者の質量差は計算的に無視できる量とする。従って、両者は同じ質量を用いれば良い。

ラベル化反応は、タンパク質試料にラベル化試薬を加え、インキュベートすることによって行うことができる。反応時間は 4 時間程度で十分である。すなわち、反応開始直後～4 時間以内に反応を終了させて良い。標準プロトコルとしては、反応時間は 1 時間とすると良い。

このように本発明においては、従来の NBS 法に比べてラベル化反応時間が大幅に短縮される。このため、プロトコル全体を通した作業時間を通算 3 日間から 2 日間に短縮することが可能になる。

(iv : 脱塩工程)

本工程では、上述の工程 (iii) によって得られたラベル化タンパク質試料 I 及びラベル化タンパク質試料 II を混合する。そして、得られたタンパク質試料混合物を脱塩する。脱塩方法としては、従来からの方法を特に限定することなく用いることができる。例えば、セファデックス LH-20 カラムを用い、アセトニトリル水溶液を用いて行うとよい。

(v : 再可溶化工程)

本工程においては、変性剤である尿素又はグアニジン塩酸塩を用いて、上述の工程 (iv) によって得られた脱塩タンパク質試料混合物を再可溶化する。変性剤の濃度は特に限定されず、タンパク質試料の可溶化及び変性が起こるように、タンパク質試料の種類やその他の条件等を考慮して当業者が適宜決定すればよい。例えば、尿素は 2M～飽和濃度、好ましくは 2～10M の濃度の水溶液で用いることができる。より好ましくは、8M の濃度で用いる。グアニジン塩酸塩は 1.5M～飽和濃度、好ましくは 1.5～8M の水溶液で用いることができる。より好ましくは、6M の濃度で用いる。本工程においては、さらに 50 mM 程度の Tris HCl (pH8.8 程度) を緩衝剤として加えておき、後の還元・アルキル化工程における pH 調整のために用いる。

本発明において、可溶化工程 (ii) 及び再可溶化工程 (v) において上述のような条件にすることによって、従来多くのタンパク質試料に起きていたアグリゲーションの問題を回避することができる。したがって、試料をほとんどロスすることなく、後述の消化工程 (vii) まで可溶性を保つことができる。このよう

な効果が実際に示された例を、後述の実験例 C-1 及び実験例 C-2 に示した。

上述のように、本発明の方法によると従来の NBS 法に比べてサンプルのロス著しく低減することができるため、質量分析において NBS ラベル化ペプチドイオン検出率が大きく改善される。この効果によって、本発明は、特に血清や臓器の抽出液などの生体由来の試料を解析する場合に有用に用いることが可能になった。このような効果が実際に示された例を、後述の実験例 C-3 に示した。

さらに本発明によると、従来の NBS 法に比べて定量性も大きく改善された。このような効果が実際に示された例を後述の実験例 C-4 に示した。

(vi: 還元・アルキル化工程)

本工程においては、従来の試薬及び反応条件を特に限定することなく用いると良い。なお、アルキル化反応は主にスルフヒドリル基に対して起こるが、イミダゾリル基やアミノ基などに対しても起こりうる。したがって、従来の NBS 法では、システインのようにスルフヒドリル基を有するアミノ酸残基だけでなく、他のアミノ基を有するアミノ酸残基に対しても一部アルキル化反応が起こることがある。この結果、マスペクトルにおいて目的のペプチドのピークより $m/z=57$ 大きいピーク ($+57(m/z)$ のピーク) が見られることがある。一方本発明においては、本工程の反応溶液に尿素又はグアニジン塩酸塩が含まれている。これらはアミノ基を有する。そして、従来他のイミダゾリル基やアミノ基などを有するアミノ酸残基に対して起こっていた一部アルキル化反応が、本発明では反応系中に存在する尿素又はグアニジン塩酸塩のアミノ基に対して起こると考えられる。すなわち、従来法において起こっていた副反応のアルキル化が競合的に阻害されると考えられる。この結果、本発明によるとマスペクトルにおいて上記の $+57(m/z)$ のピークがほとんど検出されなくなる。このような効果が実際に示された例を後述の実験例 C-5 に示した。

(vii : 消化工程)

本工程においては、トリプシン消化を行う。本工程においては、変性剤である尿素又はグアニジン塩酸塩の存在下で行う。変性剤の濃度としては、尿素は0.08～4 M、好ましくは0.8 M～1.6 Mとすることができる。また、グアニジン塩酸塩は0.06～3 M、好ましくは0.6 Mとすることができる。本工程においては、トリプシンの構造安定化ならびに活性化のため、さらに5 m M程度の CaCl_2 を加えておくことが望ましい。

本工程における変性剤は、前記再可溶化工程で用いられたものの試料中残存分を利用することができる。例えば、再可溶化工程及び還元・アルキル化工程終了後の試料にトリプシン消化バッファーを加え、所望の濃度になるようにすれば良い。消化のための他の条件として、pH はトリプシン酵素の至適 pH 近傍となるように調整する。また反応時間は、通常 37℃で4～16 時間程度でよい。このようにして、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片とを含むペプチド混合物が得られる。

(viii : 濃縮分離工程)

本工程においては、フェニル基を有する担体を用いることによって、上記ペプチド混合物から、ラベル化ペプチドを選択的に濃縮する。本工程は、 π 電子性化合物間に働く π - π 電子相互作用に起因する固有の選択性を利用している。すなわち、ラベル化ペプチドにおけるトリプトファンのインドール基及びニトロフェニルチオ基が有する π 電子と、担体におけるフェニル基が有する π 電子との相互作用によって、担体はラベル化ペプチドに対して優れた保持能力を発揮し、選択的な濃縮分離が可能になる。このような担体としては、Hi-Trap phenyl FF、Hi-Trap phenyl HP、Phenyl Sepharose 6 Fast Flow、Phenyl Sepharose High Performance、(以上、アマシャムバイオサイエンス社製)、YMC*GEL Ph (ワイエムシ社製) などから適宜選択し、フェニルカラム(phenyl column)として使用

することができる。

一方、LH-20 カラムを用いる従来の NBS 法では、溶出画分に相当数の非ラベル化ペプチドが混在していた。本発明によると、混在する非ラベル化ペプチドの数が少なくなり、特に従来の NBS 法で多数見られた 1200-1700(m/z)近辺の非ラベル化ペプチドについては、ほとんど見られない。さらに従来の NBS 法では、濃縮分離の際に、各ペプチドは溶出画分のほぼ全体に亘って溶出されていたが、本発明によると、各ペプチド同士もある程度分離が可能である。この結果、検出されるペプチドのカバー率も従来法に比べて優れている。このような効果が実際に示された例を、後述の実験例 C-6 に示した。

(ix : 質量分析工程)

上記工程 (viii) によって濃縮分離されたラベル化ペプチドは、質量分析に供される。本発明における測定に MALDI 型質量分析装置を用いる場合は、従来の NBS 法において用いられていた MALDI-TOF 型質量分析装置 (例えば島津製作所製 AXIMA-CFR) 等に加え、MALDI-IT-TOF 型質量分析装置 (例えば島津製作所製 AXIMA-QIT) 等も用いられる。

MALDI-TOF 型質量分析装置を用いる場合、マトリックスとしては 4-CHCA (α -シアノー 4-ヒドロキシ桂皮酸; α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) 等を用いる。一方、MALDI-IT-TOF 型質量分析装置を用いる場合、マトリックスとしては 3-CHCA (α -シアノー 3-ヒドロキシ桂皮酸; α -cyano-3-hydroxycinnamic acid) 又は 3H4NBA (3-ヒドロキシ 4-ニトロ安息香酸; 3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid) を用いる。

これらの化合物は、質量分析用マトリックスとして用いるという目的において、当業者が適宜その使用形態を決定することができる。たとえば、これらの化合物は、溶液として用いることが好ましい。例えば、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いることができる。

このような溶液の調製に用いられる溶媒としては、アセトニトリル水溶液、トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液、又はアセトニトリル-トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液を用いることが好ましい。アセトニトリル水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を用いる場合、アセトニトリルの濃度は特に限定されないが、90%以下、好ましくは50%程度用いることができる。TFA 水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を用いる場合、TFA の濃度も特に限定されないが、1%以下、好ましくは0.1%程度用いることができる。

4-CHCA の場合は、このような溶媒に溶解させることにより、1 mg/ml ～飽和濃度、好ましくは10 mg/ml のマトリックス溶液として用いることができる。

そして、3-CHCA は、このような溶媒に溶解させることにより1 mg/ml ～飽和濃度、好ましくは10 mg/ml のマトリックス溶液として用いることができる。

また、3H4NBA は、このような溶媒に溶解させることにより、1 mg/ml ～飽和濃度のマトリックス溶液として、好ましくは、飽和濃度のマトリックス溶液として用いることができる。

なお、本明細書における、%で表された量の基準に関しては、特に断りがない限り v/v%とする。

試料間で存在量に差があるペプチドの配列を同定するためには、感度の点から考えると、AXIMA-CFR（島津製作所製）のPSD解析よりも、四重極型イオントラップ（QIT）を搭載した質量分析装置例えばAXIMA-QIT（島津製作所製）を用いたMS/MS解析の方が望ましい。このようなイオントラップ型の質量分析装置の測定では標準的にDHB（2,5-ジヒドロキシ安息香酸：2,5-dihydroxy benzoic acid）がマトリックスとして使用されていた。しかしながら、DHBをマトリックスとして用いた場合は、NBSラベル化ペプチドはほとんど検出されない。そこで、本発明においてイオントラップ型の質量分析装置による測定を行う場合

は、マトリックスとして 3-CHCA 又は 3H4NBA を用いる。このことによって、NBS ラベル化ペプチドの効率良いイオン化が可能になった。従って、本発明の NBS ラベル化ペプチドの MS/MS 解析効率は、従来の NBS 法に比べて大きく改善された。このような効果が実際に示された例を、後述の実験例 C-7 に示した。

本発明においては、マトリックスとして 3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸 (3H4NBA) を用いる場合に、3H4NBA を α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (4-CHCA) と組み合わせた混合マトリックスとして用いることが好ましい。(以下本明細書において、4-CHCA を組み合わせて用いずに単独で使用するマトリックスと、4-CHCA を組み合わせて用いる混合マトリックスとを、単にマトリックスと記載することがある。)

3H4NBA と 4-CHCA との組み合わせの比率は、特に制限はないが、例えば以下のような量的関係で組み合わせることができる。

3H4NBA は、すでに述べたような量で調製することができる。すなわち、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として、例えばアセトニトリル水溶液、TFA 水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を溶媒とした場合、1 mg/ml ~ 飽和濃度、好ましくは飽和濃度の 3H4NBA 溶液として調製することができる。

一方、4-CHCA も、すでに述べたような量で調製することができる。すなわち、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として、アセトニトリル水溶液、TFA 水溶液又はアセトニトリル-TFA 水溶液を溶媒として用いる場合は、1 mg/ml ~ 飽和濃度、好ましくは 10 mg/ml の 4-CHCA 溶液として調製することができる。

以上のように調製された双方の溶液を、好ましくは 1 : 10 ~ 10 : 1、より好ましくは 1 : 3 ~ 3 : 1、例えば 1 : 1 の体積比で混合して用いる。

従来のマトリックス 4-CHCA は、MALDI-IT、MALDI-IT-TOF、MALDI-FTICR 装置など、イオン化からイオンの検出までの時間が長い MALDI 装置での測定において、測定試料の自己崩壊を生ぜしめるという欠点はあるが、測定の感度には優れており、また、質量分析試料においてレーザーを当てる最適ス

ポットを探すのが容易であるという利点を有する。

一方、本発明のマトリックス 3H4NBA は、すでに述べたように、測定試料の自己崩壊の進行を抑えることができるとともに、疎水性試料、特に NBS でラベル化されたペプチドの特異的なイオン化を達成することができるという利点を有する。そして、本発明のマトリックス 3H4NBA が、4-CHCA と組み合わせられることによって、双方のマトリックスが有する利点の相乗効果が奏される。すなわち、3H4NBA が単独でも有する特異的検出能を確保したまま、4-CHCA が有する高感度検出能がさらに伴い、より解析効率に優れた質量分析を行うことが可能になる。このような効果が実際に示された例を、後述の実験例 C-8 及び C-9 に示した。

以下に、具体的な本発明のプロトコルを示す。このプロトコルは、状態 1 及び状態 2 の試料各々 100 μ g の処理について記載する。(NBSCI 及び NBS ラベル化ペプチドは、本プロトコルを通してできる限り遮光する。) なお、このプロトコル及び後に示す実験例において % で表された量の基準に関しては、すでに述べたように、特に断りのない限り v/v% とする。

[試料の可溶化 (状態 1 及び状態 2 の試料について別々に行う)]

1. “状態 1” 及び “状態 2” の試料をそれぞれ 100 μ g 用意する。
2. 両試料を凍結乾燥する。(或いは、真空濃縮機を用いて乾固する。)
3. 両試料を変性バッファー (5mM EDTA を含む 8M 尿素水溶液、又は 5mM EDTA を含む 6M グアニジン塩酸塩水溶液) 25 μ l に溶解する。
4. ボルテックスミキサーでよく攪拌する。

[NBSCI によるトリプトファン残基のラベル化 (状態 1 及び状態 2 の試料について別々に行う)]

1. NBS 試薬(light)溶液 (0.17mg の NBSCl(light)を含む酢酸溶液) 25 μ l を“状態 1”の試料に加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。

別途、NBS 試薬(heavy)溶液 (0.17mg の NBSCl(heavy)を含む酢酸溶液) 25 μ l を“状態 2”の試料に加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。

2. 両試料について、静かに攪拌しながら 1 時間インキュベートする。

[反応溶液の脱塩及び過剰の NBS 試薬の除去 (本工程で、2 種のラベル化試料を混合する)]

1. LH-20 カラム (LH-20 500 μ l を 30% アセトニトリル水溶液であらかじめ平衡化する。)を用意し、上澄をレジン層の高さまで自然落下させる。

2. 混合試料 (NBSCl(light) によってラベル化された試料と NBSCl(heavy)によってラベル化された試料との混合物、合計 100 μ l) を静かにカラムにアプライする。(素通り画分は廃棄する。)

3. カラムを 30% アセトニトリル水溶液 100 μ l で洗浄する。

4. 脱塩された試料を 30% アセトニトリル水溶液 200 μ l で溶出する。

5. 溶出画分を凍結乾燥する。

[還元・アルキル化]

1. 50mM Tris HCl (pH8.8)を含む 8M 尿素水溶液、又は 50mM Tris HCl (pH8.8)を含む 6M グアニジン塩酸塩水溶液 48 μ l 中に試料を溶解する。

2. 還元溶液 (200mM TCEP 水溶液) 1 μ l を加え、静かに攪拌する。

3. 37℃で 30 分インキュベートする。

4. アルキル化溶液 (500mM ヨードアセトアミド水溶液) 1 μ l を加え、静かに攪拌する。

5. 室温で 45 分インキュベートする。

[トリプシン消化]

1. 10 μ g のトリプシン（プロメガ社製、sequencing grade）を、消化バッファー（50mM Tris HCl (pH7.8)、5mM CaCl₂）450 μ l に溶解する。
2. トリプシン溶液を試料に加えてピペティングして静かに混ぜる。
3. 37℃で4～16時間インキュベートする。
4. カラムにロードする前に 1% TFA 水溶液を 50 μ l（終濃度 0.1%）加える。或いは、TFA の代わりに塩酸を用いても良い。この場合、塩酸の終濃度が 10mM となるように調整すると良い。

[ラベル化ペプチドの濃縮]

1. Phenyl Sepharose™ High Performance（アマシャムバイオサイエンス社製）などのフェニルカラム（phenyl column）1ml をオープンカラムに充填する。
2. 水 5ml、その後に 0.1% TFA 水溶液 5ml によってカラムを平衡化する。
3. 消化した試料 550 μ l をカラムにアプライする。（この際の溶出液を“Flow-through”画分として分取する。）
4. カラムを 0.1% TFA 水溶液 1ml で洗浄する。（この際の溶出液を“Wash”画分として分取する。）
この操作を後 2 回繰り返す。（全部で 3 回行う。）
5. 溶出バッファー（10% アセトニトリルを含む 0.1% TFA 水溶液）0.5ml で溶出し、（この際の溶出液を“Elute”画分として分取する。）この操作をもう一度繰り返す。
6. 工程 5 を、アセトニトリルの濃度を 5% ずつ上げながら 40% になるまで繰り返す。
7. （任意工程：必要に応じて行う。）MS 分析のために、“Flow-through”

画分及び“Wash”画分から ZipTip を用いてペプチドを脱塩及び濃縮する。

8. “Elute”画分を真空濃縮機によって乾固する。MS 分析又は HPLC 等を用いた更なる分離のために、乾固した試料を 5~50 μ l 程度の量の 0.1% TFA 水溶液に懸濁する。

なお、ラベル化ペプチドの濃縮において用いられる 0.1% TFA 水溶液の代わりに塩酸を用いても良い。この場合、塩酸の濃度は 10mM となるように調整すると良い。

[質量分析]

試料はこのまま MS 解析に用いても良いし、HPLC などを利用してさらに分画しても良い。MALDI-MS 測定を行う場合は、試料をマトリックス溶液と混ぜ、MS 測定を行う。

さらに本発明は、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むキットを提供する。ここで、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドは、例えば上記ラベル化工程 (iii) を実施するためのラベル化試薬として用いることができる。フェニル基を有する担体は、上記濃縮分離工程 (viii) を実施するために用いることができる。

従って、本発明のキットは、タンパク質の網羅的定量解析を行うための、例えば上述のプロトコルを実施するために使用することができる。

すなわち、本発明のキットは、上記ラベル化工程 (iii) を実施するためのラベル化試薬である 2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド

(NBSCI(heavy) ; NBS(heavy)試薬) 及び 2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBSCI(light) ; NBS(light)試薬) と、上記濃縮分離工程 (viii) を実施するためのフェニル基を有する担体を含み、好ましくは、変性剤及び/又はマ

トリックスをさらに含む。また、本発明のキットは、上述の本発明の方法において用いられる各種溶媒を含んでも良い。

変性剤は、上記可溶化工程 (ii) 及び再可溶化工程 (v) を実施するために用いることができる。従って変性剤としては、上記可溶化工程 (ii) 及び再可溶化工程 (v) で述べたような、尿素又はグアニジン塩酸塩が好ましい。また変性剤は、上記可溶化工程 (ii) 及び再可溶化工程 (v) で述べたような溶媒に溶解していても良い。例えば変性剤をグアニジン塩酸塩とする場合など、溶媒に溶解させたものとして提供することができる。このとき、1.5M～飽和濃度、好ましくは1.5～8M、より好ましくは6Mの濃度のグアニジン塩酸塩水溶液とすることができる。変性剤として尿素を溶媒に溶解させたものとする場合は、2M～飽和濃度、好ましくは2～10M、より好ましくは8Mの濃度の尿素水溶液とすることができる。

マトリックスは、上記質量分析工程 (ix) を実施するために用いることができる。従ってマトリックスとしては、上記質量分析工程 (ix) で述べたような、4-CHCA (α -シアノー4-ヒドロキシ桂皮酸)、3-CHCA (α -シアノー3-ヒドロキシ桂皮酸)、及び3H4NBA (3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸) から選ばれることが好ましい。また、混合マトリックスとして用いるための、3H4NBAと4-CHCAとのセットであることも好ましい。

またこれらマトリックス及び補助マトリックスは、上記質量分析工程 (ix) で述べたような溶媒に溶解していても良い。例えば、1mg/ml～飽和濃度の溶液とすることができる。アセトニトリル水溶液、TFA水溶液又はアセトニトリル-TFA水溶液を溶媒とした場合は、 α -シアノー3-ヒドロキシ桂皮酸は、1mg/ml～飽和濃度、好ましくは10mg/ml、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸は、1mg/ml～飽和濃度、好ましくは飽和濃度、 α -シアノー4-ヒドロキシ桂皮酸は、1mg/ml～飽和濃度、好ましくは10mg/mlの溶液とすることができる。また、これら溶液のうち、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安

息香酸の溶液と、 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸の溶液とが、好ましくは 1 : 10 ~ 10 : 1、より好ましくは 1 : 3 ~ 3 : 1、例えば 1 : 1 の体積比で混合された混合溶液とすることもできる。

さらに本発明のキットは、脱塩用カラム及び脱塩用カラム充填ゲル、還元試薬及びアルキル化試薬、トリプシン、及び、上記フェニル基を有する担体を充填するカラムをさらに含んでも良い。脱塩用カラム及び脱塩用カラム充填ゲルは、例えば上述の脱塩工程 (iv) を実施するために用いることができる。還元試薬及びアルキル化試薬は、例えば上記還元・アルキル化工程 (vi) を実施するために用いることができる。トリプシンは、例えば上記消化工程 (vii) を行うために用いることができる。上記フェニル基を有する担体を充填するカラムは、例えば上記濃縮分離工程 (viii) のために用いることができる。すなわち、上記フェニル基を有する担体を充填するカラムを濃縮用カラムとして、上記フェニル基を有する担体を濃縮用カラム充填ゲルとして用いることができる。

本発明のキットによって、上述した本発明のタンパク質の網羅的定量解析を行うことができ、したがって、本発明の方法においてすでに述べたような以下の効果が得られる。

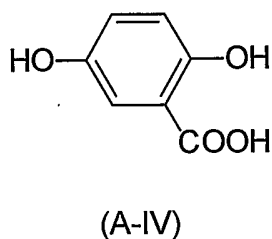
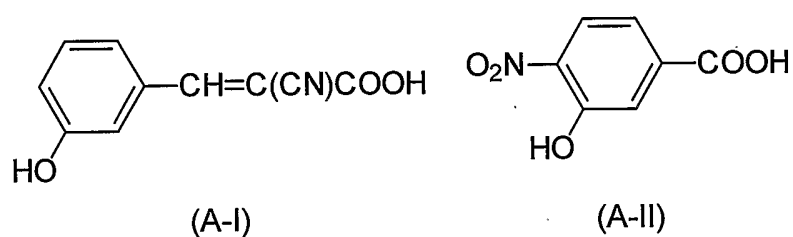
- ・ 試料ロスの低下
- ・ +57(m/z)バンドの減少
- ・ 非ラベル化ペプチド混入率の低下
- ・ 各ペプチドの分離効率の向上
- ・ QIT を用いた MS/MS 解析の実現
- ・ 検出できるペアピーク数の増加
- ・ プロトコル通算での作業時間の短縮
- ・ 定量性の改善

実施例

以下に実施例 A-1 及び A-2 により第 1 の発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。すでに述べたように、% で表された量の基準に関しては、特に断りのない限り v/v% とする。なお、実施例においては、NBS 試薬によるラベル化を修飾又は NBS 修飾と表記することがある。

[実施例 A-1]

本実施例においては、NBS ラベル化ペプチド（安定同位体元素 ^{13}C 6 つで標識された NBS(heavy) 試薬によって修飾されたペプチドと非標識の NBS(light) 試薬によって修飾されたペプチドとの混合物）を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3-CHCA（ α -シアノー-3-ヒドロキシケイ皮酸、式 A-I）及び 3H4NBA（3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、式 A-II）と、比較用の従来のマトリックス DHB（2, 5-ジヒドロキシ安息香酸、式 A-IV）とを用いて、質量分析装置にて測定を行った。



測定サンプルは、以下のように調製した。

精製タンパク質 4 種類（オボアルブミン、グリセルアルデヒド 3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン；全て SIGMA 社製）を 25 μ g ずつ混合し合計 100 μ g としたものを 2 つ用意した。変性剤として終濃度 8M の尿素を用いて、それぞれの混合物についての可溶化及び NBS 修飾試料混合物の再可溶化を行ったこと以外は、「 ^{13}C NBS Isotope Labeling キット」（島津製作所製）のプロトコルに従って測定サンプルを調製した。すなわち、2 つの混合物のうち一方を NBS Reagent (heavy)（2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）で、他方を NBS Reagent (light)（2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）で修飾し、両修飾試料の混合、脱塩、尿素による再可溶化、還元・アルキル化、及びトリプシン消化を行った。

その後、試料を凍結乾燥し、500 μ l の 0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液に懸濁し、0.1%の TFA 水溶液で平衡化した HiTrap Phenyl FF (high sub) column（アマシャムバイオサイエンス社製）にロードした。このカラムを 3ml の 0.1%TFA 水溶液で洗浄し、その後、10%のアセトニトリルを含む 0.1%の TFA 水溶液 1ml を用いて溶出した。続いて、溶出に用いる TFA 水溶液のアセトニトリル濃度を順に 15、20、25、30、35、40%と変え、同様に溶出を行った。溶出後、10%のアセトニトリルを含む 0.1%TFA 水溶液で溶出した画分を、凍結乾燥し、50 μ l の 0.1%TFA 水溶液に再懸濁し、ZipTip(μ C18)で脱塩処理した。このようにして、測定サンプルを得た。

マトリックスとしては、本発明の 3-CHCA（ α -シアノ- β -ヒドロキシケイ皮酸、式 A-I）及び 3H4NBA（3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、式 A-II）、及び比較のために従来のマトリックス DHB（2, 5-ジヒドロキシ安息香酸、式 A-IV）の 3 種を用意した。

マトリックスとしては、以下のように調製したものをを用いた。0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液を溶媒とし、3-CHCA、3H4NBA 及び DHB を

それぞれ溶解させた。DHB と 3-CHCA とはそれぞれ 10mg/ml の溶液、3H4NBA は飽和溶液とした。

上述のようにして得られた測定サンプルの溶液とマトリックスの溶液とを、それぞれ 0.5 μ l ずつとって混合し、マスプレート上に滴下した。溶液を乾燥させた後、AXIMA-QIT 装置 (MALDI-IT-TOF 型質量分析装置、島津製作所製) にて測定した。

AXIMA-QIT 装置による MS スペクトルを、図 1 に示す。図 1 中、横軸は質量/電荷(Mass/Charge)、縦軸はイオンの相対強度を表す。また、(a)は、DHB をマトリックスに用いたときの NBS 修飾ペプチドのスペクトル、(b)は、3-CHCA をマトリックスに用いたときの NBS 修飾ペプチドのスペクトル、(c)は、3H4NBA をマトリックスに用いたときの NBS 修飾ペプチドのスペクトルである。図中、(i)、(ii)及び(iii)は、NBS で修飾されたペプチドのペアピークを示す。それぞれのペアピークは、2つのラベル化試薬 NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) と NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) との質量差に相当する、 $m/z=6$ の差を有するピークの組として検出された。それぞれのペアピークに相当する理論マス値、配列、及び由来するタンパク質は次のとおりである。

(i)1198.53, 1204.55 (m/z)、GTDVQAWIR (配列番号 1)、リゾチーム

(ii)1244.51, 1250.53 (m/z)、LDQWLCEK (配列番号 2)、 α -ラクトアルブミン

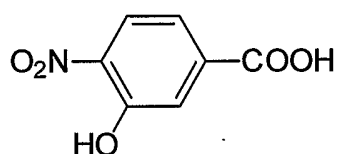
(iii)2011.95, 2017.97 (m/z)、ELINSWVESQTNGIIR (配列番号 3)、オボアルブミン

図 2 は、図 1 中のペアピーク (i) の 1198.53 m/z に相当するイオン (GTDVQAWIR) を選択的にトラップした後、MS/MS 解析したときのフラグメントスペクトルである。図 2 中、横軸は質量/電荷(Mass/Charge)、縦軸はイオンの相対強度を表す。

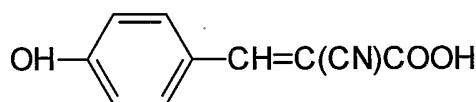
[実施例 A-2]

(a) イオントラップを持つ質量分析装置とイオントラップを持たない質量分析装置とによる質量分析測定

NBS 試薬によって修飾されたペプチドと非修飾ペプチドとの混合物を測定サンプルに用い、本発明の混合マトリックス、すなわち 3H4NBA (3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、式 A-II) と従来のマトリックス 4-CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸、式 A-III) との混合物を用い、質量分析装置にて測定を行った。



(A-II)



(A-III)

測定サンプルは、以下のように調製した。

精製タンパク質 4 種類 (オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン; 全て SIGMA 社製) を 25 μ g ずつ混合し合計 100 μ g としたものを 2 つ用意した。変性剤として終濃度 8M の尿素を用いてそれぞれの混合物について変性を行った以外は、「 ^{13}C NBS Isotope Labeling キット」(島津製作所製) のプロトコルに従った。すなわち、一方を NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で標識修飾し、他方を NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で非標識修飾し、両修飾試料の混合、脱塩、尿素による再可溶化、還元、アルキル化、及びトリプシン消化を行った。消化後のサンプルを ZipTip μ -C18 で脱塩処理し、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液 4 μ l により溶出したものを、測定サンプルとした。このうち、0.5 μ l をマスプレ

ート上に塗布した。

マトリックスとしては、以下のように調製したものをを用いた。0.1%TFAを含む50%アセトニトリル水溶液を溶媒とし、3H4NBA及び4-CHCAをそれぞれ溶解させた。3H4NBAは飽和溶液、4-CHCAは10mg/mlの溶液とした。このように調製した溶液を、1:1の体積比で混合し、マトリックス混合溶液を得た。あらかじめ用意しておいた測定サンプル塗布を行ったマスプレート上に、マトリックス混合溶液0.5 μ lを添加し、乾燥した後、イオントラップを持つMALDI-IT-TOF型質量分析装置（AXIMA-QIT、島津製作所製）及びイオントラップを持たないMALDI-TOF型質量分析装置（AXIMA-CFR plus、島津製作所製）にて測定を行った。

このとき得られたMSスペクトルを、図3(a-1)及び図3(a-2)に示す。これらの図において、横軸は質量/電荷(m/z)、縦軸はイオンの相対強度(%Int.)を表す。また、(a-1)は、イオントラップを持つAXIMA-QITで測定することによって得られたスペクトル、(a-2)は、イオントラップを持たないAXIMA-CFR plusで測定することによって得られたスペクトルである。さらにこれらの図において、矢印でマークされたピーク対は、NBS修飾されたペプチドのものであることを示している。それぞれのペアピークは、2つの修飾試薬NBS Reagent (heavy)（2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）とNBS Reagent (light)（2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド）との質量差に相当する、 $m/z=6$ の差を有する。

図3(a-1)及び図3(a-2)のスペクトルを互いに比較してわかるように、両者でほとんど同じスペクトルが得られた。イオントラップを持つ質量分析装置とイオントラップを持たない質量分析装置とで、ほとんど同じスペクトルが得られるということは、イオントラップを持つ質量分析装置の測定において測定試料の自己崩壊が抑制されていることを示す。すなわち、本発明のマトリックス混合物を用いると、従来4-CHCAを単体でマトリックスとして用いたイオントラップ型

質量分析装置（すなわちイオン化からイオンの検出までの時間が比較的長い質量分析装置）での測定において起こっていた、測定試料の自己崩壊が抑制されていることがわかった。

（b）3H4NBA 単独使用のマトリックスと、3H4NBA 及び 4-CHCA の混合マトリックスとによる質量分析測定

上記（a）と同じ測定サンプルを用い、本発明のマトリックスである 3H4NBA 単独使用のマトリックス、及び 3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスを用いて、質量分析装置にて測定を行った。

上記（a）と同じ測定サンプルを、0.1%TFA 水溶液により 1000 倍希釈し、そのうちの 0.5 μ l をマスプレート上に塗布した。

マトリックスとしては、3H4NBA 単独使用のマトリックス、及び 3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスを用いた。

3H4NBA 単独使用のマトリックスについては、3H4NBA を、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液に溶解し、飽和溶液とした。

3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスについては、上記（a）と同様の方法によって調製した。

あらかじめ用意しておいた測定サンプル塗布を行ったマスプレート上に、3H4NBA 溶液及び 3H4NBA と 4-CHCA との混合溶液をそれぞれ添加し、乾燥させた後、MALDI-TOF 型質量分析装置（AXIMA-CFR plus、島津製作所製）にて測定を行った。

このとき得られた MS スペクトルを、図 3 (b-1)及び図 3 (b-2)に示す。これらの図において、横軸は質量／電荷(m/z)、縦軸はイオンの相対強度(%)を表す。また、(b-1)は、マトリックスとして 3H4NBA と 4-CHCA とを混合して用いることによって得られたスペクトル、(b-2)は、マトリックスとして 3H4NBA を用いることによって得られたスペクトルである。さらにこれらの図において矢印でマークされたピーク対は、NBS 修飾されたペプチドのものであることを示している。

それぞれのペアピークは、2つのラベル化試薬 NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) と NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) との質量差に相当する、 $m/z=6$ の差を有する。

図3の(b-1)及び(b-2)のスペクトルを互いに比較してわかるように、NBS修飾ペプチドのペアピークが、(b-1)において、(b-2)よりも感度良く検出されている。このことは、マトリックスとして 3H4NBA に 4-CHCA をさらに混合することによって、より感度良く検出することができることを示す。すなわち、3H4NBA の、「質量分析において疎水性試料の検出ができる」という特長はそのままに、さらに、4-CHCA の、「レーザーを当てる最適スポットを容易に探すことができる」状態で、「感度の良い測定をおこなうことができる」という特長が付加されたことが確認できた。すなわち、3H4NBA の特長である、「イオン化からイオンの検出までの時間が比較的長いイオントラップ型 MALDI 質量分析装置で測定してもサンプルの自己崩壊を抑制することができる」ことと、4-CHCA の特長である、「レーザーを当てる最適スポットを容易に探すことができる」状態で、「感度の良い測定をおこなうことができる」ことが同時に達成されたことが確認できた。

上記実施例 A-1 及び A-2 では、本発明の範囲における具体的な2つの形態について示したが、本発明は、これらに限定されることなく他のいろいろな形態で実施することができる。そのため、上記実施例はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。さらに、クレームの均等範囲に属する変更は、すべて本発明の範囲内である。

以下に実施例 B-1 ~ B-8 により第2の発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。すでに述べたように、%で

表された量の基準に関しては、特に断りのない限り v/v%とする。また、実施例においては、NBS 試薬によるラベル化を修飾又は NBS 修飾と表記することがある。

[実施例 B-1]

本実施例においては、ACTH(5-10)ペプチド(BACHEM 社から購入)と、2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBS Reagent (light); 島津製作所製)でラベル化したACTH(5-10)ペプチドとの混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA (3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸) 及び 4H3NBA (4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸)、及び比較用の従来のマトリックスとして DHB (2, 5-ジヒドロキシ安息香酸) 及び 4-CHCA (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸) を用いて、質量分析装置にて測定を行った。

以下に測定サンプルの調製方法を述べる。

ペプチドのラベル化は、ACTH 10 μg を、50 μl の 70%酢酸水溶液中に 20 当量の NBS Reagent (light)を加えた試薬溶液中で 1 時間反応させることにより行った。反応後、ZipTip(μC18)を用いて脱塩し、ラベル化体のサンプルとした。一方、ACTH 10 μg を NBS Reagent (light)を含まない 50 μl の 70%酢酸水溶液中で 1 時間攪拌する処理を行ったものを、上述と同様に脱塩し、非ラベル化体のサンプルとした。得られたラベル化体サンプルと非ラベル化体サンプルとを等量混ぜ合わせ、質量分析用サンプルとした。

マトリックスとして、DHB、4-CHCA、及び、HNBA の異性体 2 種すなわち 3H4NBA 及び 4H3NBA の 4 種を用意した。これらマトリックスは、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液に溶解し、4-CHCA、DHB 及び 4H3NBA は 10 mg/ml、3H4NBA は飽和溶液としたものを用いた。

上記測定サンプルを 0.5 μl とってマスプレート上に滴下し乾燥させ、次に、マトリックス溶液を 0.5 μl とって、先に乾燥させたサンプルの上に滴下し、乾燥

させた。(以下、すべての実施例において同じ操作を行った。)これを、4種のマトリックスについて同様に行った。このようにして得られたマスプレートを用い、AXIMA-CFR 装置(島津製作所製)にて測定を行った。

このとき得られたスペクトルを図4に示す。図4中、横軸は質量/電荷(Mass/Charge)、縦軸はイオンの相対強度を表す(以下、すべての図において横軸は質量/電荷(Mass/Charge; m/z)、縦軸はイオンの相対強度を表す)。(a)は、DHB をマトリックスに用いたときのスペクトル、(b)は、4-CHCA をマトリックスに用いたときのスペクトル、(c)は、3H4NBA をマトリックスに用いたときのスペクトル、(d)は、4H3NBA をマトリックスに用いたときのスペクトルである。また、太矢印は NBS ラベル化された ACTH ペプチドすなわち目的のペプチド、細矢印はラベル化されていない ACTH ペプチドのピークの位置を表す。図4が示すように、本発明のマトリックスを用いた(c)及び(d)において、選択的に目的のラベル化ペプチドが検出された。

[実施例 B-2]

本実施例においては、標識修飾されたタンパク質と非標識修飾されたタンパク質との混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA 及び比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を用いて、質量分析装置にて測定を行った。

精製タンパク質4種類(オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン; 全て SIGMA 社製)を 25 μ g ずつ混合し合計 100 μ g としたものを2つ用意した。「 ^{13}C NBS Isotope Labeling キット」(島津製作所製)のプロトコルに従って、2つの混合物のうち一方を2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBS Reagent (heavy); 島津製作所製)で、他方を2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド (NBS Reagent (light); 島津製作所製)で修飾した。修飾された2つの試料を混合し、脱塩した後、還元アルキル化・トリプシン消化を行った。サンプル

を凍結乾燥し、50 μ l の 0.1%TFA 水溶液に再懸濁したものを ZipTip(μ C18)で脱塩処理した。これを測定サンプルとし、マトリックスとして実施例 B-1 と同じ 4-CHCA 溶液及び 3H4NBA 溶液を用い、実施例 B-1 と同様にして質量分析装置にて測定を行った。

このとき得られたスペクトルを図 5 に示す。図 5 中、(a)は、4-CHCA をマトリックスに用いたときのスペクトル、(b)は、3H4NBA をマトリックスに用いたときのスペクトルである。図 5 においては、(a)で検出されたピークのうち、修飾に用いた 2 つの試薬 NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) と NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) との質量差又はその倍数の差に相当する、 $m/z=6$ 又は $m/z=12$ の差を有する目的の修飾ペプチドのペアピークが、本発明のマトリックスを用いた(b)において選択的に検出された。

[実施例 B-3]

本実施例においては、DSIP ペプチド (delta sleep-inducing peptide(ペプチド研究所製); 500 fmol) と NBS Reagent (light)でラベル化した DSIP ペプチド (500 fmol) との混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA 及び比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を用いて、質量分析装置にて測定を行った。

ラベル化のためのサンプルとして DSIP ペプチドを用いた以外は、実施例 B-1 と同様にラベル化を行い、測定サンプルを得た。マトリックスとして実施例 B-1 と同じ 3H4NBA 溶液及び 4-CHCA 溶液を用いて、実施例 B-1 と同様にして質量分析装置にて測定を行った。このとき得られたスペクトルを図 6 に示す。図 6 中、(a)は、4-CHCA をマトリックスに用いたときのスペクトル、(b)は、3H4NBA をマトリックスに用いたときのスペクトルである。また、太矢印は、NBS ラベル化された DSIP ペプチドの位置を表し、楕円で囲んだ部分は、矢印が示すピークよりそれぞれ $m/z=16$, 32, 155 小さいピークを表す。(a)において見ら

れるこれらのピークは、本発明のマトリックスを用いた(b)においてはほとんど検出されず、これによって、目的のペプチドのピークが選択的に検出されたことが示された。

[実施例B-4]

本実施例においては、リゾチーム (Lysozyme) を還元・アルキル化し、さらにニトロ化した後、トリプシン消化した。これにより得られた消化物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA、及び比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を用いて質量分析装置にて測定を行った。

以下に測定サンプルの調製方法を述べる。

まず、1 mg の Lysozyme を定法に従って還元・アルキル化処理した。次に、Riordan J.F. et al., 1966; Sokolovsky M. et al., 1966 に記載の方法に従い、テトラニトロメタンを用いてニトロ化を行った。その後、定法に従ってトリプシンを加えてペプチド断片へと消化した。得られた消化物のうちの 14 μ g 相当を分取して凍結乾燥させた。これを 50 μ l の 0.1% の TFA 水溶液に再溶解させた後、ZipTip μ -C18 を用いて脱塩した。このようにして得られた消化物を、測定サンプルとした。この測定サンプルにおいて、ペプチドフラグメントのチロシン残基は、一部がニトロ化されている。つまり、ニトロチロシンを含むペプチドフラグメント、ニトロ化されていないチロシンを含むペプチドフラグメント、及びチロシンを含まないペプチドフラグメントの混合物となっている。

マトリックスとしては、比較用の従来の 4-CHCA (α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid ; SIGMA 社から購入)、又は 3H4NBA (3-hydroxy-4-nitrobenzoic acid ; ALDRICH 社から購入) を用いた。これらマトリックスは、0.1% TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液に溶解し、4-CHCA は 10 mg/ml、3H4NBA は飽和溶液としたものを用いた。

上記マトリックスを用いて、上記測定サンプルを質量分析装置

AXIMA-CFR（島津製作所製）を用いてリフレクトロンモードでの MS 測定を行った。（以下のすべての実施例においても、AXIMA-CFR を用いたリフレクトロンモードでの MS 測定を行った。）このとき得られたスペクトルを、図 7 及び図 8（A 及び B）に示す。図 8 の A は、図 7 の $m/z=850-960$ の部分の拡大図、図 8 の B は図 7 の $m/z=1740-1820$ の部分の拡大図である。図 7 及び図 8（A 及び B）において、(a)は、マトリックスとして 4-CHCA を用いて測定したスペクトル、(b)は、マトリックスとして 3H4NBA を用いて測定したスペクトルである。

さらに、黒矢印で示されたピーク（(2*）： $m/z=1798.83$ ；
Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr*-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg（配列番号 4）、
及び(8*）： $m/z=919.41$ ；His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr*-Arg（配列番号 5）、ここで Tyr* は、ニトロ化されたチロシン残基を示す）は、目的のニトロ化されたチロシン残基を含むトリプシン消化ペプチドのピークである。

白矢印で示されたピーク（(2）： $m/z=1753.84$ ；
Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg（配列番号 6）
及び(8）： $m/z=874.42$ ；His-Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr-Arg（配列番号 7））は、ニトロ化されなかった以外は上記目的の消化ペプチドと同じ配列を有する消化ペプチドである。

矢印が付されていない(3）： $m/z=1675.80$ ；
Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asn-Gly-Met-Asn-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-Arg（配列番号 8）、
(5）： $m/z=1268.61$ ；Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly-Asn-Trp-Val-Cys-Ala-Ala-Lys（配列番号 9）
及び(6）： $m/z=1045.54$ ；Gly-Thr-Asp-Val-Gln-Ala-Trp-Ile-Arg（配列番号 10）
は、Lysozyme 由来のトリプシン消化ペプチドのピークである。

破線の楕円で囲まれたピークは、上記目的の消化ペプチドのピークより $m/z=16$ 又は $m/z=32$ 小さいピークである。

これらの図が示すように、マトリックスとして 3H4NBA を用いた場合にのみ、目的のニトロ化されたチロシン残基を含むペプチドフラグメントのピーク

がはっきりと検出され、ニトロ化されていないチロシン残基を含むペプチドフラグメントのピークや前記の $m/z=16$ 、 $m/z=32$ 小さいピークがほとんど検出されなくなった。つまり、3H4NBA をマトリックスとして用いることで、選択的に目的のピークのみが検出された。

[実施例 B-5]

本実施例においては、NBS 試薬 (2-nitrobenzenesulfonyl chloride (MW = 189.62); 島津製作所製) でシステインをラベル化したペプチドと、ラベル化していないペプチドとの混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA、及び比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を用いて質量分析装置にて測定を行った。

以下に測定サンプルの調製方法を述べる。

まず、ペプチド IRRP1 (Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp (配列番号 11)); BACHEM 社から購入) 10 μg を、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液を用いて分注し、凍結乾燥させた。これを 15 μl の Milli-Q 水 (ミリポア社製) に溶解し、これと 35 μl の NBS 試薬溶液 (NBS 試薬 0.17 mg を 35 μl の酢酸に溶解したもの) とを混合して室温で一時間反応させた。これを ZipTip $\mu\text{-C}_{18}$ を用いて脱塩したものを、ラベル化ペプチドサンプルとした。

別途、10 μg のペプチド IRRP1 を 15 μl の Milli-Q 水に溶解し、35 μl の酢酸と混合して室温で一時間静置し、ZipTip $\mu\text{-C}_{18}$ を用いて脱塩したものを、非ラベル化ペプチドサンプルとした。

ラベル化ペプチドサンプルと非ラベル化ペプチドサンプルとを等量混合し、測定サンプルとした。

マトリックスとしては、実施例 B-4 と同じものを調製して用い、上記測定サンプルを質量分析装置にて測定を行った。このとき得られたスペクトルを、図 9 に示す。図 9 において、「 $\times 5$ 」で示した $m/z=845-940$ に相当する範囲は、縦方向に 5 倍に拡大表示している。図 9 中、(a) は、マトリックスとして 4-CHCA を

用いて測定したスペクトル、(b)は、マトリックスとして 3H4NBA を用いて測定したスペクトルである。さらに、黒矢印で示されたピーク ($m/z=1038.40$) は、目的のラベル化ペプチドサンプルのピーク、白矢印で示されたピーク

($m/z=886.42$) は、非ラベル化ペプチドサンプルのピーク、破線の楕円で囲まれたピークは、目的のペプチドのピークより $m/z=16$ 小さいピークである。

これらの図が示すように、マトリックスとして 3H4NBA を用いた場合にのみ、目的のラベル化ペプチドサンプルのピークがはっきりと検出され、4-CHCA を用いた場合に検出されていた非ラベル化ペプチドのピーク及び上記の $m/z=16$ 小さいピークが検出されなくなった。つまり、3H4NBA をマトリックスとして用いることで、選択的に目的のピークのみが検出された。

[実施例 B-6]

本実施例においては、p-ニトロフェニルアラニンを含むペプチドを測定サンプルに用い、本発明のマトリックス 3H4NBA、及び比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を用いて質量分析装置にて測定を行った。

以下に測定サンプルの調製方法を述べる。

ペプチド HIV subIII

(His-Lys-Ala-Arg-Val-Leu-Phe*-Glu-Ala-nLeu-Ser-NH₂ (配列番号 12)); Phe* = p-ニトロフェニルアラニン、nLeu = ノルロイシン、Ser-NH₂ = カルボキシル基がアミド化されたセリン; BACHEM 社から購入) 10 μ g を、0.1%TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液を用いて分注し、凍結乾燥させた。これを 50 μ l の 0.1% TFA 水溶液に溶解し、ZipTip μ -C₁₈ を用いて処理したものを、測定サンプルとした。

マトリックスとしては、実施例 B-4 と同じものを調製して用い、上記測定サンプルを質量分析装置にて測定を行った。このとき得られたスペクトルを、図 10 に示す。図 10 中、(a)は、マトリックスとして 4-CHCA を用いて測定したスペクトル、(b)は、マトリックスとして 3H4NBA を用いて測定したスペクトル

である。さらに、黒矢印で示されたピーク ($m/z=1314.73$) は、目的のペプチド HIV subIII のピーク、破線の楕円で囲まれたピークは、目的のペプチドのピークより $m/z=16$ 小さいピークである。

これらの図が示すように、マトリックスとして 3H4NBA を用いた場合にのみ、目的の HIV subIII のピークのみが検出され、4-CHCA を用いた場合に検出されていた $m/z=16$ 小さいピークが検出されなくなった。つまり、3H4NBA をマトリックスとして用いることで、選択的に目的のピークが検出された。

[実施例 B-7]

本実施例においては、NBS 試薬 (2-nitrobenzenesulfonyl chloride (MW = 189.62); 島津製作所製) でラベル化した ACTH と、ラベル化していない ACTH との混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックスである 2,4DNA (2, 4-ジニトロアニリン)、2B4,6DNA (2-ブロモ-4, 6-ジニトロアニリン)、4NA (4-ニトロアニリン)、4NBA (4-ニトロ安息香酸)、2NP (2-ニトロフェノール)、及び 2,5DNP (2, 5-ジニトロフェノール) と、比較用の従来のマトリックス 4-CHCA とを用いて、質量分析装置にて測定を行った。

以下に測定サンプルの調製方法を述べる。測定サンプルは、濃度の違うものを 2 種用意した。

ZipTip μ -C₁₈ による脱塩処理の代わりに C18 カラム (YMC-Pack Pro C18; YMC 社製) を用いたクロマトグラフィーによる精製を行った以外は、実施例 B-1 と同様にしてラベル化ペプチドサンプル (ラベル化 ACTH) を調製した。このラベル化ペプチドサンプルと、非ラベル化ペプチドサンプル (ラベル化していない ACTH) とを等モルずつ混合して、それぞれの濃度が 0.5 pmol/ μ l 又は 5 pmol/ μ l となるように 0.1% TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液に溶解させて調製した測定サンプルを得た。

マトリックスとしては、2,4DNA、2B4,6DNA、4NA、4NBA、2NP、及び

2,5DNP (4NA は SIGMA 社から、その他は全て ALDRICH 社から購入した) をそれぞれ、0.1% TFA を含む 50% アセトニトリル水溶液に溶解させた。4NA、2NP、2,5DNP はそれぞれ 10 mg/ml、2,4DNA、2B4,6DNA、4NBA は飽和溶液としたものを用いた。比較用の従来の 4-CHCA は、10 mg/ml としたものを用いた。

上記マトリックスを用いて、上記測定サンプルを質量分析装置にて測定を行った。このとき得られたスペクトルを、図 1 1 及び図 1 2 に示す。

図 1 1 中(a)は、マトリックスとして 4-CHCA を用いて測定したスペクトル、(b)は、マトリックスとして 2,4DNA を用いて測定したスペクトル、(c)は、マトリックスとして 2B4,6DNA を用いて測定したスペクトルである。これらのスペクトルは、ラベル化ペプチド及び非ラベル化ペプチドの濃度をそれぞれ 0.5 pmol/μl に調製した測定サンプルのものである。

図 1 2 中、(a)は、マトリックスとして 4-CHCA を用いて測定したスペクトル、(b)は、マトリックスとして 4NA を用いて測定したスペクトル、(c)は、マトリックスとして 4NBA を用いて測定したスペクトル、(d) は、マトリックスとして 2NP を用いて測定したスペクトル、(e) は、マトリックスとして 2,5DNP を用いて測定したスペクトルである。これらのスペクトルは、ラベル化ペプチド及び非ラベル化ペプチドの濃度をそれぞれ 5 pmol/μl に調製した測定サンプルのものである。

さらに、黒矢印で示されたピーク ($m/z=983.37$) は、目的のラベル化ペプチドサンプルのピーク、白矢印で示されたピーク ($m/z=831.39$) は、非ラベル化ペプチドサンプルのピーク、破線の楕円で囲まれたピークは、目的のペプチドのピークより $m/z=16$ 又は $m/z=32$ 小さいピークである。

これらの図が示すように、本発明のマトリックスとして用いた場合はいずれも、4-CHCA を用いたときに検出されていた非ラベル化ペプチドのピークや、目的のペプチドのピークより $m/z=16$ 及び $m/z=32$ 小さいピークが検出されなくなり、主にラベル化ペプチドのピークのみが検出されるようになった。つまり、

本発明のマトリックスを用いることで、選択的に目的のピークのみが検出されるようになったことがわかる。

[実施例 B-8]

本実施例においては、NBS 試薬によって修飾されたペプチドと非修飾ペプチドとの混合物を測定サンプルに用い、本発明のマトリックスである、4-CHCA と 3H4NBA との混合マトリックス、4-CHCA と 3H2NBA (3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸) との混合マトリックス、4-CHCA と 2,4DNA との混合マトリックス、4-CHCA と 4NA との混合マトリックス、4-CHCA と 4NP (4-ニトロフェノール) との混合マトリックス、及び 3H4NBA 単独使用のマトリックスと、比較用の従来のマトリックス 4-CHCA とを用いて、質量分析装置にて測定を行った。

精製タンパク質 4 種類 (オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン; 全て SIGMA 社製) を 25 μ g ずつ混合し合計 100 μ g としたものを 2 つ用意した。変性剤として終濃度 8M の尿素を用いてそれぞれの混合物について変性を行った以外は、

「 ^{13}C NBS Isotope Labeling キット」(島津製作所製) のプロトコルに従い、一方を NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で標識修飾し、他方を NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で非標識修飾し、両修飾試料の混合、還元、アルキル化、及びトリプシン消化を行った。消化後のサンプルを ZipTip μ -C18 で脱塩処理し、0.1% TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液により溶出し、得られた溶出液を測定サンプルとした。この溶出液を 0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液を用いて 10 倍に希釈し、そのうち 0.5 μ l を、マスプレート上に塗布した。

マトリックスとしては、以下のように調製したものをを用いた。0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液を溶媒とし、4-CHCA、3H4NBA、3H2NBA、2,4DNA、4NA、4NP をそれぞれ溶解させた。4-CHCA、3H2NBA、4NA、及び 4NP

はそれぞれ 10 mg/ml の溶液、3H4NBA 及び 2,4DNA はそれぞれ飽和溶液とした。混合マトリックスについては、このように調製した溶液を、1 : 1 の体積比で混合して使用した。3H4NBA 単独使用のマトリックスと、比較用の従来のマトリックス 4-CHCA とについては、このように調製した溶液をそのまま用いた。

あらかじめ用意しておいた、測定サンプルの塗布を行ったマスプレート上に、上記マトリックスの溶液 0.5 μ l を添加し、乾燥した後、質量分析装置にて測定を行った。このとき得られたスペクトルを、図 13 に示す。図 13 中、(a) は 4-CHCA と 3H4NBA との混合マトリックス (+3H4NBA) を、(b) は 4-CHCA と 3H2NBA との混合マトリックス (+3H2NBA) を、(c) は 4-CHCA と 2,4DNA との混合マトリックス (+2,4DNA) を、(d) は 4-CHCA と 4NA との混合マトリックス (+4NA) を、(e) は 4-CHCA と 4NP との混合マトリックス (+4NP) を、(f) は比較用の従来のマトリックス 4-CHCA を、(g) は 3H4NBA 単独使用のマトリックスをそれぞれ用いて測定したスペクトルである。さらに、黒矢印で示されたピーク対は、目的の NBS 修飾ペプチドのものであることを示している。なお、この目的の修飾ペプチドフラグメントのペアピークは、修飾に用いた 2 つの試薬 NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) と NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) との質量差又はその倍数の差に相当する、 $m/z=6$ 又は $m/z=12$ の質量差を有する。

図 13 が示すように、(a)~(e)のように混合マトリックスを用いた場合は、(f)のように 4-CHCA を単独で用いた場合に比べて目的のピークが特異的に検出されていることがわかる。さらに、混合マトリックスを用いた(a)~(e)においては、(g)のように 3H4NBA を単独で用いた場合よりも、目的のピークの検出感度がより良くなっていることもわかる。つまり、本発明のマトリックスの中でも混合マトリックスを用いた(a)~(e)は、(g)のように本発明のマトリックスの中でも単独の化合物を用いる場合に達成されるような目的物質に対する特異的イオン化能力を残しつつ、従来から用いられてきた 4-CHCA と同程度に検出感度が向上する、

という好ましい測定条件であるといえる。

上記実施例 B-1 ~ B-8 では、本発明の範囲における具体的な 8 つの形態について示したが、本発明は、これらに限定されることなく他のいろいろな形態で実施することができる。そのため、上記実施例はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。さらに、クレームの均等範囲に属する変更は、すべて本発明の範囲内である。

上述した第 3 の発明のプロトコルの一部の工程又は全部の工程を用いて、本発明の効果を示した実験例を、以下の実験例 C-1 ~ C-9 に示す。

<実験例 C-1>

モデルタンパク質として精製タンパク質 4 種類（オボアルブミン ovalbumin(Ova)、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(G3P)、リゾチーム lysozyme(Lys)、及び α -ラクトアルブミン α -lactalbumin(α -lact)、すべて SIGMA 社製) を各 25 μ g 用意し、混合して合計 100 μ g としたものをコントロールサンプル(C)とした。

別途、サンプル(S)を 2 種類調製した。サンプル(S)のうち一方は、以下のようにして調製した。すなわち、上述のサンプル(C)と同じタンパク質混合物 100 μ g を、従来の NBS プロトコルのように、5mM EDTA を含む 0.1w/v % SDS 水溶液で可溶化した後 100°C で 3 分間加熱し、NBS(light)試薬を用いたラベル化及び LH-20 カラムを用いた脱塩を行うことにより得た。なお、本実験例及び以下の実験例において記載する可溶化とは、SDS-PAGE のサンプル調製のために一般的に行われる可溶化とは別の工程である。

サンプル(S)のうちもう一方は、以下のようにして調製した。サンプル(C)と同じタンパク質混合物 100 μ g に対し、上述と同様の SDS 可溶化を行い、

NBS(light)試薬を用いたラベル化を行った。また別途、サンプル(C)と同じタンパク質混合物 100 μ g に対し、上述と同様の SDS 可溶化を行い、上述の NBS(light)試薬と等量の NBS(heavy)試薬を用いたラベル化を行った。そして、得られた NBS(light)ラベル化物と NBS(heavy)ラベル化物とを混合し、LH-20 カラムによる脱塩を行った。

別途、サンプル(G)を 2 種類調製した。いずれも、本発明のプロトコルのように 5mM EDTA を含む 6M グアニジン塩酸塩水溶液を用いて可溶化した以外は上述のサンプル(S)の調製と同様に行うことにより得た。

別途、サンプル(U)を 2 種類調製した。いずれも、本発明のプロトコルのように 5mM EDTA を含む 8M 尿素水溶液を用いて可溶化した以外は上述のサンプル(S)の調製と同様に行うことにより得た。

上述のようにして得られたサンプル(C)、(S)、(G)及び(U)について、電気泳動を行った。サンプル(C)については、その 10 μ g に相当する量をレーン 1 に展開した。一方、サンプル(S)、(G)及び(U)の各々については、その 1/20 に相当する量を展開した (レーン 2 ~ 7)。

電気泳動の結果を図 1 4 に示す。図 1 4 中、レーン 1 はコントロールサンプル(C) ; レーン 2 は NBS(light)ラベル化タンパク質のみを含むサンプル(S) ; レーン 3 は NBS(light)ラベル化タンパク質のみを含むサンプル(G) ; レーン 4 は NBS(light)ラベル化タンパク質のみを含むサンプル(U) ; レーン 5 は NBS(light)ラベル化タンパク質と NBS(heavy)ラベル化タンパク質とを等量混合したサンプル(S) ; レーン 6 は NBS(light)ラベル化タンパク質と NBS(heavy)ラベル化タンパク質とを等量混合したサンプル(G) ; レーン 7 は NBS(light)ラベル化タンパク質と NBS(heavy)ラベル化タンパク質とを等量混合したサンプル(U)についてのものである。図 1 4 のレーン 3、4、6 及び 7 の結果が示すように、可溶化のために変性剤であるグアニジン塩酸塩や尿素を用いると、サンプルをほとんどロスすることなく可溶性を保つことができることが示された。

<実験例 C-2>

マウス(C57BL)の血清 100 μ g を、コントロールサンプル(C)とした。

別途、サンプル(S)を2種類調製した。サンプル(S)のうち一方は、以下のようにして調製した。すなわち、上述のサンプル(C)と同じマウス血清 100 μ g を、従来の NBS プロトコルのように、0.5mM EDTA を含む 0.1w/v % SDS 水溶液で可溶化した後 100°C で3分間加熱し、NBS(light)試薬を用いたラベル化を行った。また別途、サンプル(C)と同じマウス血清 100 μ g を、上述と同様の SDS 可溶化を行い、上述の NBS(light)試薬と等量の NBS(heavy)試薬を用いたラベル化を行った。そして、得られた NBS(light)ラベル化物と NBS(heavy)ラベル化物とを混合し、ラベル化混合物を得た。

サンプル(S)のうちもう一方は、以下のようにして調製した。すなわち、マウス血清 100 μ g に対し、上述と同様にしてラベル化混合物を調製し、さらに LH-20 カラムによる脱塩を行うことにより得た。

別途、サンプル(G)を2種類調製した。いずれも、本発明のプロトコルのよう に5mM EDTA を含む6M グアニジン塩酸塩水溶液を用いて可溶化した以外は上述のサンプル(S)の調製と同様に行うことにより得た。

別途、サンプル(U)を2種類調製した。いずれも、本発明のプロトコルのよう に5mM EDTA を含む8M 尿素水溶液を用いて可溶化した以外は上述のサンプル(S)の調製と同様に行うことにより得た。

得られたサンプル(C)、(S)、(U)及び(G)について、電気泳動を行った。なお、サンプル(C)については、その 10 μ g に相当する量をレーン2に、2 μ g に相当する量をレーン3に展開した。サンプル(S)、(U)及び(G)についてはいずれも、その 1/20 に相当する量を展開した(レーン4～9)。

電気泳動の結果を図15に示す。図15中、レーン1は分子量マーカー、レーン2及び3はコントロールサンプル(C)；レーン4はラベル化後のサンプル

(S) ; レーン 5 はラベル化及び脱塩後のサンプル(S) ; レーン 6 はラベル化後のサンプル(U) ; レーン 7 はラベル化及び脱塩後のサンプル(U) ; レーン 8 はラベル化後のサンプル(G) ; レーン 9 はラベル化及び脱塩後のサンプル(G)についてのものである。図 15 のレーン 6、7、8 及び 9 の結果が示すように、可溶化のために変性剤であるグアニジン塩酸塩や尿素を用いると、サンプルをほとんどロスすることなく可溶性を保つことができることが示された。

<実験例 C-3>

解析試料としてマウス肝臓の抽出液を用いた。この解析試料に対し、従来の NBS プロトコルに従って、SDS による可溶化、ラベル化、脱塩、SDS による再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。別途、解析試料に対し、本発明プロトコルに従って、尿素による可溶化、ラベル化、脱塩、尿素による再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。なお、いずれのラベル化操作においても、一方で、可溶化試料に対し NBS(light)試薬を用いてラベル化し ; 他方で、等量の可溶化試料に対し NBS(light)試薬と等量の NBS(heavy)試薬を用いてラベル化し ; その後、得られた両ラベル化物を混合した。以下の実験例においても、ラベル化操作についてはこれと同様の操作を行う。得られたそれぞれの試料に対し、phenyl column (アマシャムバイオサイエンス社製カラム ; HiTrap phenyl) を用いて NBS ラベル化ペプチドの分離を行った。溶出は、アセトニトリルの段階濃度勾配により行い (具体的には、10~40%の間で 5%毎の 7 段階の濃度について行った。)、各濃度において 2 フラクションを分画した。

各溶出フラクション (EL1~EL14) について AXIMA-CFR を用いて解析し、観察されたペアピークの数を表 1 にまとめた。表中、(a) は SDS を用いた方法、(b) は尿素(Urea)を用いた方法についての結果を示す。

表 1

	(a)	(b)
	SDS	Urea
EL1	2	8
EL2	2	11
EL3	2	17
EL4	3	20
EL5	2	25
EL6	3	16
EL7	4	18
EL8	5	24
EL9	4	12
EL10	4	10
EL11	2	5
EL12	1	1
EL13	0	3
EL14	2	4
合計	14	76

この表が示すように、従来の NBS プロトコルのように SDS を用いた方法では合計 14 のペアピークしか観察されなかったものが、本発明のプロトコルのように尿素を用いた方法では合計 76 のペアピークが観察された。また、表中の EL5 のフラクション（すなわちアセトニトリル濃度 20%）についてのマスペクトルを図 16（a）及び（b）に示す。図中、矢印で示されるピークがラベル化ペプチドのペアピークである。

<実験例 C-4>

モデルタンパク質として精製タンパク質 3 種類（G3P、Lys 及び α -lact）の混合物を用いた。この混合物に対し、従来の NBS プロトコルに従って、SDS

による可溶化、ラベル化、脱塩、SDS による再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。別途混合物に対し、本発明のプロトコルに従って、塩酸グアニジンによる可溶化、ラベル化、脱塩、塩酸グアニジンによる再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。さらに別途混合物に対し、可溶化のために尿素を用いた以外は、上述の本発明のプロトコルに従った操作と同様の操作を行った。得られたそれぞれの試料に対し、phenyl column を用いて NBS ラベル化ペプチドの分離を行い、MS 解析を行った。

得られた MS スペクトルについて、ペアピークそれぞれのモノアイソトピックピーク (monoisotopic peak) の面積比を定量し比較した。具体的には、ペアピークのうち、ピークが大きいほうの面積を 100 としたときの、ピークが小さいほうの相対面積を求め、これを定量性の指標として双方のスペクトルを比較した。その結果を表 2 に示す。表 2 が示すように、従来の NBS プロトコルのように SDS を用いた方法ではピークの相対面積の平均値が 80.3 であるのに対し、本発明のプロトコルのようにグアニジン塩酸塩 (GdnHCl) 及び尿素 (Urea) を用いた方法ではそれぞれ 90.0、92.6 であった。このことから、本発明によって定量性が大きく改善されたことが示された。

表 2

	m/z	ピーク面積比		
		GdnHCl	Urea	SDS
G3P	627	92.5	93.1	96.5
	1916	83.7	93.1	61.8
a-lact	759	91.5	93.8	98.2
	1244	81.5	96.4	92.5
	1353	97	96.1	90.7
Lys	1198	97.3	98.9	72.3
	1299	93.8	80.2	78.7
	1478		95.6	63.0
	1981	82.3	86	68.9
平均		90.0	92.6	80.3
分散		37.1	30.5	186.4
標準偏差		6.1	5.5	13.7

さらに、ペアピークの面積比分散及び標準偏差を求めた。その結果も表 2 に示す。表 2 が示すように、分散については、従来のプロトコルのように SDS を用いた方法では 186.4 であるのに対し、本発明のプロトコルのようにグアニジン塩酸塩及び尿素を用いた方法ではそれぞれ 37.1、30.5 であった。一方、標準偏差については、従来のプロトコルのように SDS を用いた方法では 13.7 であるのに対し、本発明のプロトコルのようにグアニジン塩酸塩及び尿素を用いた方法ではそれぞれ 6.1、5.5 であった。分散及び標準偏差は値が小さいほど、データのばらつきが小さい。従って、本発明の方法によってこのようなばらつきも大きく改善されたことが示された。

<実験例 C-5>

モデルタンパク質として精製タンパク質 4 種類 (Ova、G3P、Lys 及び α -lact) の混合物を用い、従来の NBS プロトコルに従って可溶化、ラベル化、脱塩、再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。一方、同じモデルタンパク質を用い、本発明のプロトコルに従って尿素による可溶化、ラベル化、脱塩、尿素による再可溶化、還元・アルキル化及び消化の操作を行った。さらに、両方のサンプルについてそれぞれ phenyl column を用いて分画し、従来の NBS プロトコルに従って操作を行うことによって調製されたものについて一画分を回収し、本発明のプロトコルに従って操作を行うことによって調製されたものについては、前記一画分に相当する画分を回収した。回収したそれぞれの画分を、AXIMA-CFR を用いて解析した。このとき得られた結果を図 17 (a) 及び (b) に示す。図 17 中、(a) は従来の NBS プロトコルによる結果、(b) は本発明のプロトコルによる結果を表し、それぞれの図は、横軸に質量/電荷 (Mass/Charge)、縦軸にイオンの相対強度を表す。図 17 の結果が示すように、従来法においては副反応のアルキル化が起こったことを示す +57(m/z) のピークが検出されるが、本発明の方法においてはそのようなピークは検出されない。

<実験例 C-6>

モデルタンパク質として精製タンパク質 4 種類 (Ova、G3P、Lys 及び α -lact) の混合物を用い、従来の NBS プロトコルに従って可溶化、ラベル化、脱塩、再可溶化、還元・アルキル化、消化、及び濃縮カラム (LH-20) を用いた NBS ラベル化ペプチド分離の操作を行った。代表的な溶出フラクションのマスペクトルを図 18 に示す。一方、同じモデルタンパク質を用い、本発明プロトコルに従って尿素による可溶化、ラベル化、脱塩、尿素による再可溶化、還元・アルキル化、消化、及び phenyl column (アマシャムバイオサイエンス社製カラム; HiTrap phenyl) を用いた NBS ラベル化タンパク質分離の操作を行った。代表的な溶出フラクションのマスペクトルを図 19 に示す。

それぞれの図は、横軸に質量／電荷 (Mass/Charge)、縦軸にイオンの相対強度を表す。図 18 は、LH-20 による全 10 フラクシオンのうち、1、3、5、7 及び 9 番目のフラクシオン (Fr.1、Fr.3、Fr.5、Fr.7 及び Fr.9) についての結果である。図 19 は、phenyl column による全 18 フラクシオンのうち、1、4、7、10、12 及び 14 番目のフラクシオン (Fr.1、Fr.4、Fr.7、Fr.10、Fr.12 及び Fr.14) についての結果である。図 18 及び図 19 の結果が示すように、本発明の方法においては、従来の NBS 法において多数見られた 1200-1700(m/z) 近辺の非ラベル化ペプチドがほとんど検出されなかった。また、図 18 では 1、2、4、9、10、12 及び 13 番目のペプチド (図中に矢印で表記) が、測定対象となった溶出画分のほぼ全体にわたって溶出されていたが、図 19 では、それらのペプチドがある程度分離されて溶出された。

<実験例 C-7>

モデルタンパク質として精製タンパク質 4 種類 (Ova、G3P、Lys 及び α -lact) の混合物を用い、本発明のプロトコルに従って尿素による可溶化、ラベル化、脱塩、尿素による再可溶化、還元・アルキル化、消化、及び phenyl column を用いた NBS ラベル化ペプチド分離の操作を行った。次に、phenyl column によって分画溶出した 1 フラクシオンを質量分析用試料として調製し、以下の 3 種のマトリックスについてそれぞれ AXIMA-QIT による質量分析を行った。マトリックスとしては、従来用いられていた DHB、本発明において用いられる 3-CHCA 及び 3H4NBA の 3 種を、それぞれ 0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液を溶媒として、DHB と 3-CHCA とはそれぞれ 10mg/ml、3H4NBA は飽和溶液として用いた。調製した試料とマトリックス溶液とを等量混ぜ合わせ、AXIMA-QIT にて測定した。このとき得られた結果を図 20 (a) ~ (c) に示す。

それぞれの図は、横軸に質量／電荷 (Mass/Charge)、縦軸にイオンの相対強度を表し、図 20 (b) 及び (c) において矢印(i)~(iii)で示されるピークは、

ラベル化ペプチドのペアピークである。図 20 (a) ~ (c) が示すように、マトリックスとして DHB を用いた場合 (a) は、NBS ラベル化ペプチドはほとんどイオン化されないためマスペクトル上で検出されないが、3-CHCA (b) や 3H4NBA (c) を用いた場合は、NBS ラベル化タンパク質が効率よくイオン化されたため、マスペクトル上での検出が可能になった。さらに、図 20 (b) で得られた矢印(i)で示されるペアピークのうち NBS(light)ラベル化ペプチドに相当する 1198.53(m/z)に相当するイオンについて MS/MS 解析した結果を図 21 に示す。

<実験例 C-8>

本実験例においては、NBS 試薬によって修飾されたペプチドと非修飾ペプチドとの混合物を測定サンプルに用い、3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスを用い、質量分析装置にて測定を行った。

測定サンプルは、以下のように調製した。

精製タンパク質 4 種類 (オボアルブミン、グリセルアルデヒド-3-ホスフェイトデヒドロゲナーゼ、リゾチーム、 α -ラクトアルブミン; 全て SIGMA 社製) を 25 μ g ずつ混合し合計 100 μ g としたものを 2 つ用意した。変性剤として終濃度 8M の尿素を用いて、それぞれの混合物についての可溶化及び NBS 修飾試料混合物の再可溶化を行った以外は、「 ^{13}C NBS Isotope Labeling キット」(島津製作所製)のプロトコルに従って測定サンプルを調製した。すなわち、一方を NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で標識修飾し、他方を NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) で非標識修飾し、両修飾試料の混合、脱塩、尿素による再可溶化、還元、アルキル化、及びトリプシン消化を行った。消化後のサンプルを ZipTip μ -C18 で脱塩処理し、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液 4 μ l により溶出したものを測定サンプルとした。このうち、0.5 μ l をマスプレート上に塗布した。

マトリックスとしては、以下のように調製したものをを用いた。0.1%TFAを含む50%アセトニトリル水溶液を溶媒とし、3H4NBA及び4-CHCAをそれぞれ溶解させた。3H4NBAは飽和溶液、4-CHCAは10mg/mlの溶液とした。このように調製した溶液を、1:1の体積比で混合し、マトリックス混合溶液を得た。あらかじめ用意しておいた測定サンプル塗布を行ったマスプレート上に、マトリックス混合溶液0.5 μ lを添加し、乾燥した後、イオントラップを持つMALDI-IT-TOF型質量分析装置（AXIMA-QIT、島津製作所製）及びイオントラップを持たないMALDI-TOF型質量分析装置（AXIMA-CFR plus、島津製作所製）にて測定を行った。

このとき得られたMSスペクトルを、図22に示す。図22中、横軸は質量/電荷(m/z)、縦軸はイオンの相対強度(%Int.)を表す。また、(a)は、イオントラップを持つAXIMA-QITで測定することによって得られたスペクトル、(b)は、イオントラップを持たないAXIMA-CFR plusで測定することによって得られたスペクトルである。図22において、矢印でマークされたピーク対は、NBS修飾されたペプチドのものであることを示している。それぞれのペアピークは、2つの修飾試薬NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド)とNBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド)との質量差に相当する、 $m/z=6$ の差を有する。

図22の(a)及び(b)のスペクトルを互いに比較してわかるように、両者でほとんど同じスペクトルが得られた。イオントラップを持つ質量分析装置とイオントラップを持たない質量分析装置とで、ほとんど同じスペクトルが得られるということは、イオントラップを持つ質量分析装置の測定において測定試料の自己崩壊が抑制されていることを示す。すなわち、本発明のマトリックス混合物を用いると、従来4-CHCAを単体でマトリックスとして用いたイオントラップ型質量分析装置（すなわちイオン化からイオンの検出までの時間が比較的長い質量分析装置）での測定において起こっていた、測定試料の自己崩壊が抑制されているこ

とがわかった。また、検出されたピークは、そのほとんどが NBS 修飾されたペプチドのペアピークであることから、マトリックス 3H4NBA が単独で有する特異的検出能は、混合マトリックスを用いた場合でも保持されていることがわかった。

<実験例 C-9>

本実験例では、実験例 C-8 と同じ測定サンプルを用い、3H4NBA 単独使用のマトリックス、及び 3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスを用いて、質量分析装置にて測定を行った。

実験例 C-8 と同じ試料を用い、同じ操作により 4 μ l の溶出液を測定サンプルとして得た。このうち 1 μ l を、0.1%TFA 水溶液により 1000 倍希釈し、そのうちの 0.5 μ l をマスプレート上に塗布した。

マトリックスとしては、3H4NBA 単独使用のマトリックス、及び 3H4NBA と 4-CHCA とを組み合わせた混合マトリックスを用いた。

3H4NBA 単独使用のマトリックスについては、3H4NBA を、0.1%TFA を含む 50%アセトニトリル水溶液に溶解し、飽和溶液とした。あらかじめ用意しておいた測定サンプル塗布を行ったマスプレート上に、この 3H4NBA 溶液を添加し、乾燥した後、MALDI-TOF 型質量分析装置 (AXIMA-CFR plus、島津製作所製) にて測定を行った。

3H4NBA と 4-CHCA との混合マトリックスについては、実験例 C-8 と同様の方法によって調製した。あらかじめ用意しておいた測定サンプル塗布を行ったマスプレート上に、この混合溶液を添加し、乾燥した後、MALDI-TOF 型質量分析装置 (AXIMA-CFR plus、島津製作所製) にて測定を行った。

このとき得られた MS スペクトルを、図 23 に示す。図 23 中、横軸は質量/電荷(m/z)、縦軸はイオンの相対強度(%Int.)を表す。また、(a)は、マトリックスとして 3H4NBA と 4-CHCA とを混合して用いることによって得られたスペクトル、(b)は、マトリックスとして 3H4NBA を用いることによって得られたス

ペクトルである。さらに図 2 3 において矢印でマークされたピーク対は、NBS 修飾されたペプチドのものであることを示している。それぞれのペアピークは、2 つのラベル化試薬 NBS Reagent (heavy) (2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) と NBS Reagent (light) (2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド) との質量差に相当する、 $m/z=6$ の差を有する。

図 2 3 の(a)及び(b)のスペクトルを互いに比較してわかるように、NBS 修飾ペプチドのペアピークが、(a)において、(b)よりも感度良く検出されている。このことは、マトリックスとして 3H4NBA に 4-CHCA をさらに混合することによって、より感度良く検出することができるということを示す。すなわち、3H4NBA の、「質量分析において NBS 修飾ペプチドの特異的検出ができる」という特長はそのままに、さらに、4-CHCA の、「レーザーを当てる最適スポットを容易に探すことができる」状態で、「感度の良い測定をおこなうことができる」という特長が付加されたことが確認できた。

以上の実験例 C-8 と実験例 C-9 との結果を合わせると、3H4NBA の特長である、「質量分析において NBS 修飾ペプチドの特異的検出ができる」こと及び「イオン化からイオンの検出までの時間が比較的長いイオントラップ型 MALDI 質量分析装置で測定してもサンプルの自己崩壊を抑制することができる」ことと、4-CHCA の特長である、「レーザーを当てる最適スポットを容易に探すことができる」状態で、「感度の良い測定をおこなうことができる」ことが同時に達成されたことが確認できた。

上記実験例のうち実験例 C-3、C-4、C-5 及び C-7 では、本発明の範囲における具体的な形態について示したが、本発明は、これらに限定されることなく他のいろいろな形態で実施することができる。そのため、上記実験例はあらゆる点で単なる例示に過ぎず、限定的に解釈してはならない。さらに、クレームの均等範囲に属する変更は、すべて本発明の範囲内である。

請 求 の 範 囲

1. MALDI（マトリックス支援レーザー脱離イオン化）イオン源を有する質量分析装置によって、ペプチドを α -シアノー-3-ヒドロキシケイ皮酸又は3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸をマトリックスとして用いて測定する方法。
2. 前記マトリックスとして3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸を用いる場合に、前記3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸と α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸とを組み合わせた混合マトリックスを用いて測定する、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
3. 前記ペプチドが、疎水性化合物により化学修飾されたペプチドである、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
4. 前記ペプチドが、スルフェニル化合物によって修飾されたアミノ酸残基を含有するペプチドである、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
5. 前記ペプチドが、2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドによって誘導体化されたペプチドである、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
6. MALDI-IT（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-イオントラップ）型質量分析装置による、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
7. MALDI-IT-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-イオントラップ-飛行時間）型質量分析装置による、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
8. MALDI-FTICR（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴）型質量分析装置による、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
9. 前記マトリックスを、1 mg/ml～飽和濃度の溶液として用いる、請求の範囲第1項に記載のペプチドの測定方法。
10. 前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml～飽和濃

度の溶液として用いる、請求の範囲第 2 項に記載のペプチドの測定方法。

11. 前記 3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸の溶液と、前記 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、1 : 10 ~ 10 : 1 の体積比で組み合わせて用いる、請求の範囲第 10 項に記載のペプチドの測定方法。

12. 質量分析において、測定すべき特定の物質と前記特定の物質以外の物質とを含む混合物サンプルに含まれる、前記特定の物質を、

前記特定の物質以外の物質よりも、前記特定の物質をよりイオン化させやすいマトリックスを用いることによって特異的にイオン化し、混合物から特定の物質を選択的に測定する質量分析方法。

13. 前記特定の物質が生体関連物質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

14. 前記生体関連物質が、タンパク質、ペプチド、糖及び脂質から選ばれる、請求の範囲第 13 項に記載の質量分析方法。

15. 前記特定の物質が同位体標識されている、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

16. 前記マトリックスが、前記特定の物質とファンデルワールス相互作用することができる物質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

17. 前記特定の物質が π 電子含有物質であり、且つ前記マトリックスが π 電子含有物質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

18. 前記特定の物質が親水性物質であり、且つ前記マトリックスが親水性物質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

19. 前記特定の物質が疎水性物質であり、且つ前記マトリックスが疎水性物質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

20. 前記特定の物質が、疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質である、請求の範囲第 12 項に記載の質量分析方法。

21. 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、ベンゼン環及び/又はベンゼン環以外の芳香環を有する、請求の範囲第 20 項に記載の質量分析方法。

22. 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、さらにニトロ基を有する、請求の範囲第 20 項に記載の質量分析方法。

23. 前記疎水性ペプチド又はタンパク質が、ニトロベンゼンスルフェニル基又はニトロフェニル基を有する、請求の範囲第 20 項に記載の質量分析方法。

24. 前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質が、ベンゼン環、ベンゼン環以外の芳香環、及び/又はニトロ基を有する疎水性化合物を用いて、前記疎水性ペプチド又は疎水性タンパク質に対応するペプチド又はタンパク質を化学修飾することによって得られる、請求の範囲第 20 項に記載の質量分析方法。

25. 前記疎水性化合物が、スルフェニル化合物である、請求の範囲第 24 項に記載の質量分析方法。

26. 前記スルフェニル化合物が 2-ニトロベンゼンスルフェニルクロリドである、請求の範囲第 25 項に記載の質量分析方法。

27. 前記マトリックスが、前記特定の物質との間で電荷の授受を行うための官能基と、前記マトリックス自身に疎水性を与えるための官能基とを有する、ベンゼン環又はベンゼン環以外の芳香環の置換体である、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

28. 前記電荷の授受を行うための官能基がカルボキシル基、水酸基、アミノ基、硫酸基、硝酸基及びアルデヒド基から選ばれる、請求の範囲第 27 項に記載の質量分析方法。

29. 前記疎水性を与えるための官能基がニトロ基である、請求の範囲第 27 項に記載の質量分析方法。

30. 前記マトリックスがニトロ安息香酸誘導体又はニトロフェノール誘導体である、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

31. 前記マトリックスがヒドロキシニトロ安息香酸誘導体である、請求

の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

32. 前記マトリックスがヒドロキシニトロ安息香酸の位置異性体から選ばれる、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

33. 前記マトリックスが、4-ニトロアニリン、2, 4-ジニトロアニリン、2-ブロモ-4, 6-ジニトロアニリン、4-ニトロフェノール、2-ニトロフェノール、2, 5-ジニトロフェノール、4-ニトロ安息香酸、3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸、及び3-ヒドロキシ-2-ニトロ安息香酸から選ばれる、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

34. 前記マトリックスに α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を組み合わせた混合マトリックスを用いる、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

35. 前記マトリックスを、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いる、請求の範囲第 19 項に記載の質量分析方法。

36. 前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml ~ 飽和濃度の溶液として用いる、請求の範囲第 34 項に記載の質量分析方法。

37. 前記マトリックスの溶液と、前記 α -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、1 : 10 ~ 10 : 1 の体積比で用いる、請求の範囲第 36 項に記載の質量分析方法。

38. (i) 解析すべきタンパク質試料 I とその対照タンパク質試料 II との 2 種類の状態のタンパク質試料を用意する工程と、

(ii) 前記タンパク質試料 I を、尿素を変性剤として含む溶液中で可溶化するか、又はグアニジン塩酸塩を変性剤として含む溶液中で可溶化することによって、可溶化されたタンパク質試料 I を得て、

別途、前記タンパク質試料 II を、尿素を変性剤として含む溶液中で可溶化するか、又はグアニジン塩酸塩を変性剤として含む溶液中で可溶化することによって、可溶化されたタンパク質試料 II を得る工程と、

(iii) 前記可溶化されたタンパク質試料 I を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか一方を用いてラベル化反応させることによって、ラベル化タンパク質試料 I を得て、

別途、前記可溶化されたタンパク質試料 II を、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド及び2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリドのいずれか他方を用いてラベル化反応させることによって、ラベル化タンパク質試料 II を得る工程と、

(iv) 前記ラベル化タンパク質試料 I 及びラベル化タンパク質試料 II を、混合及び脱塩することによって、脱塩タンパク質試料混合物を得る工程と、

(v) 前記脱塩タンパク質試料混合物を、尿素又はグアニジン塩酸塩を用いて再可溶化することによって、再可溶化されたタンパク質試料混合物を得る工程と、

(vi) 前記再可溶化されたタンパク質試料混合物を還元・アルキル化することによって、還元・アルキル化されたタンパク質試料混合物を得る工程と、

(vii) 前記還元・アルキル化されたタンパク質試料混合物を、尿素又はグアニジン塩酸塩の存在下でトリプシン消化することによって、ラベル化ペプチド断片と非ラベル化ペプチド断片とを含むペプチド混合物を得る工程と、

(viii) 前記ペプチド混合物を、フェニル基を有する担体を用いて分離することによって、濃縮されたラベル化ペプチド断片を得る工程と、

(ix) 前記濃縮されたラベル化ペプチド断片を質量分析する工程とを含む、タンパク質の網羅的定量解析方法。

39. 前記工程 (ix) において、 α -シアノー-3-ヒドロキシ桂皮酸又は3-ヒドロキシ-4-ニトロ安息香酸をマトリックスとして用いて質量分析する、請求の範囲第 38 項に記載の方法。

40. 前記工程 (ix) において、前記マトリックスとして3-ヒドロキシ

ー４ーニトロ安息香酸を用いる場合に、前記３ーヒドロキシー４ーニトロ安息香酸と α ーシアノー４ーヒドロキシケイ皮酸とを組み合わせた混合マトリックスを用いて質量分析する、請求の範囲第 38 項に記載の方法。

41. 前記マトリックスを、1 mg/ml ～飽和濃度の溶液として用いる、請求の範囲第 39 項に記載の方法。

42. 前記 α ーシアノー４ーヒドロキシケイ皮酸を、1 mg/ml ～飽和濃度の溶液として用いる、請求の範囲第 40 項に記載の方法。

43. 前記３ーヒドロキシー４ーニトロ安息香酸の溶液と、前記 α ーシアノー４ーヒドロキシケイ皮酸の溶液とを、1 : 10 ～ 10 : 1 の体積比で組み合わせて用いる、請求の範囲第 42 項に記載の方法。

44. ２ーニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２ーニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むキット。

45. 請求の範囲第 38 項に記載の方法を行うための、２ーニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、２ーニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むキット。

46. 変性剤をさらに含む、請求の範囲第 44 項に記載のキット。

47. マトリックスとして α ーシアノー３ーヒドロキシ桂皮酸、３ーヒドロキシー４ーニトロ安息香酸、 α ーシアノー４ーヒドロキシ桂皮酸、又は混合マトリックスとして３ーヒドロキシー４ーニトロ安息香酸と α ーシアノー４ーヒドロキシ桂皮酸との混合物をさらに含む、請求の範囲第 44 項に記載のキット。

48. 前記変性剤が尿素又はグアニジン塩酸塩である、請求の範囲第 46 項に記載のキット。

49. 脱塩用カラム、脱塩用カラム充填ゲル、還元試薬、アルキル化試薬、トリプシン、及び前記担体を充填するためのカラムからなる群から選ばれる少なくとも 1 つをさらに含む、請求の範囲第 44 項に記載のキット。

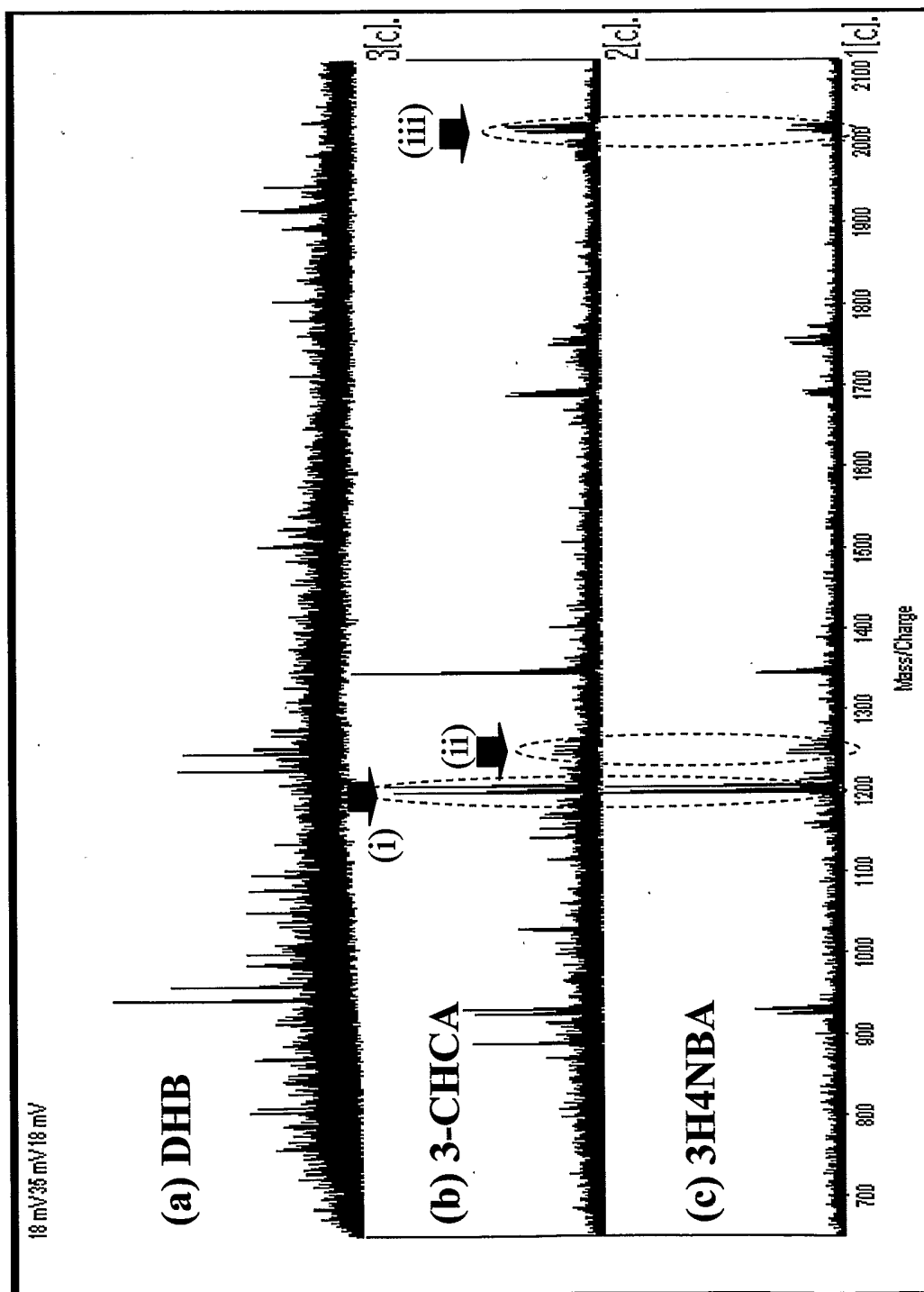


Fig. 1

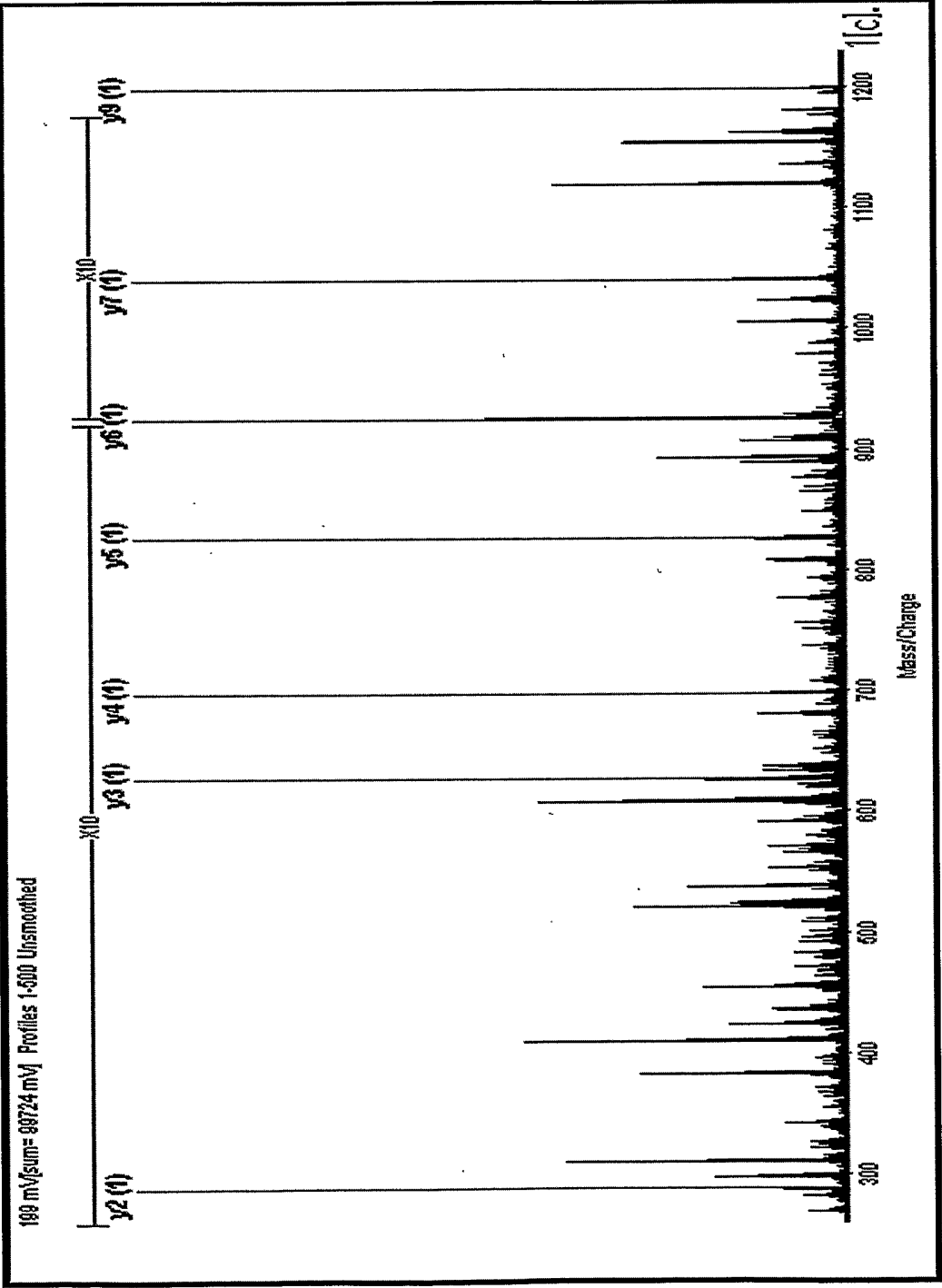


Fig. 2

3 / 22

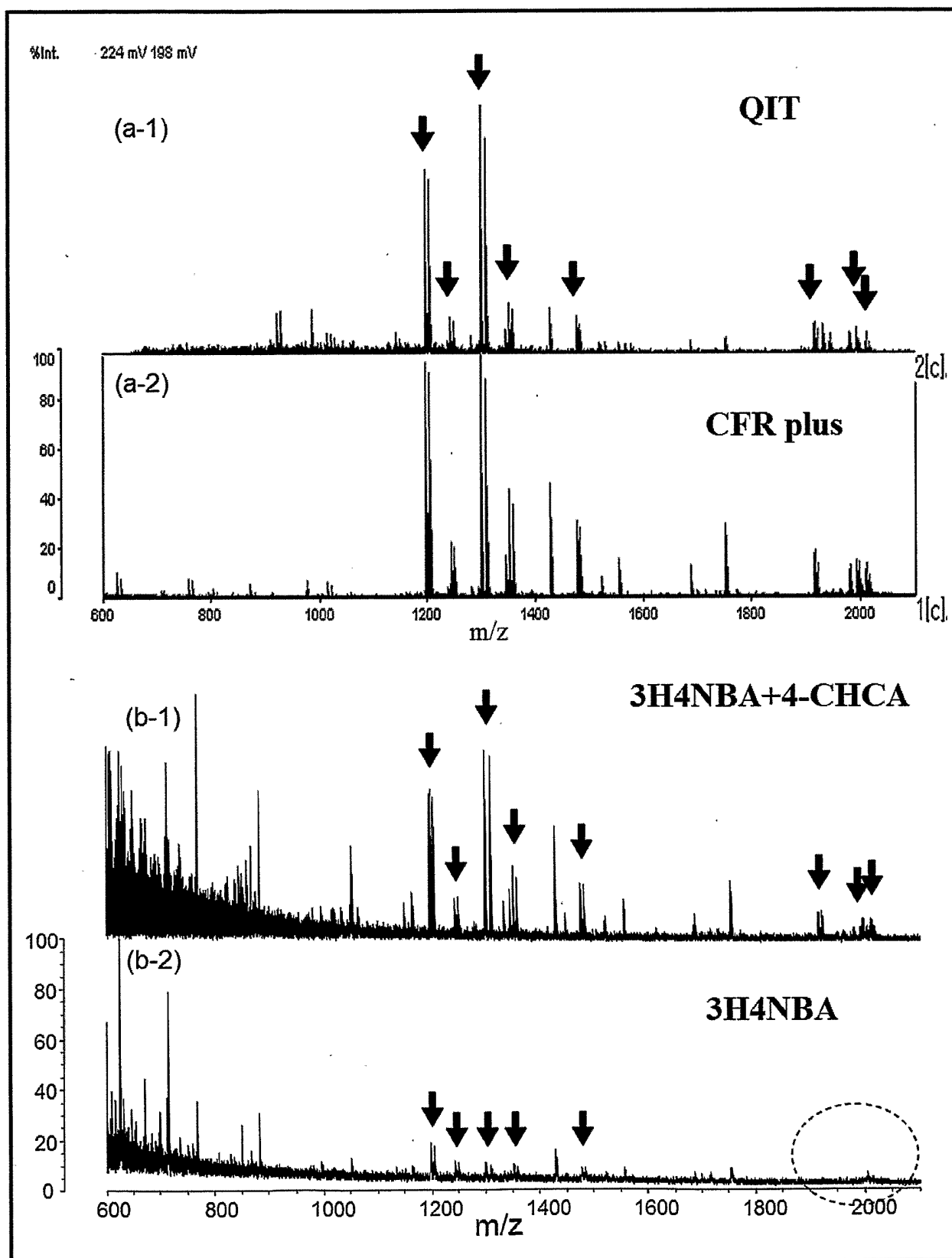


Fig. 3

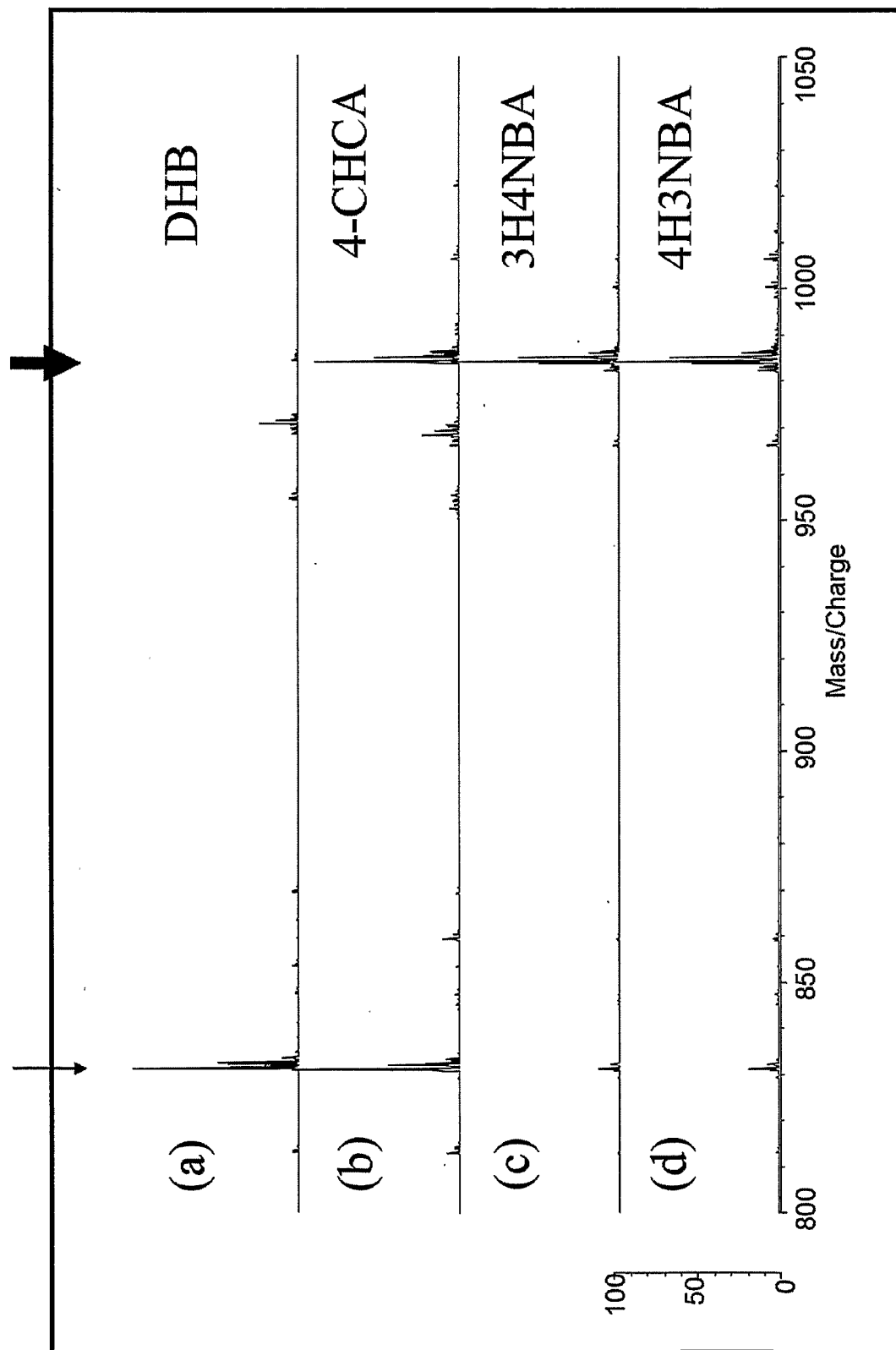


Fig. 4

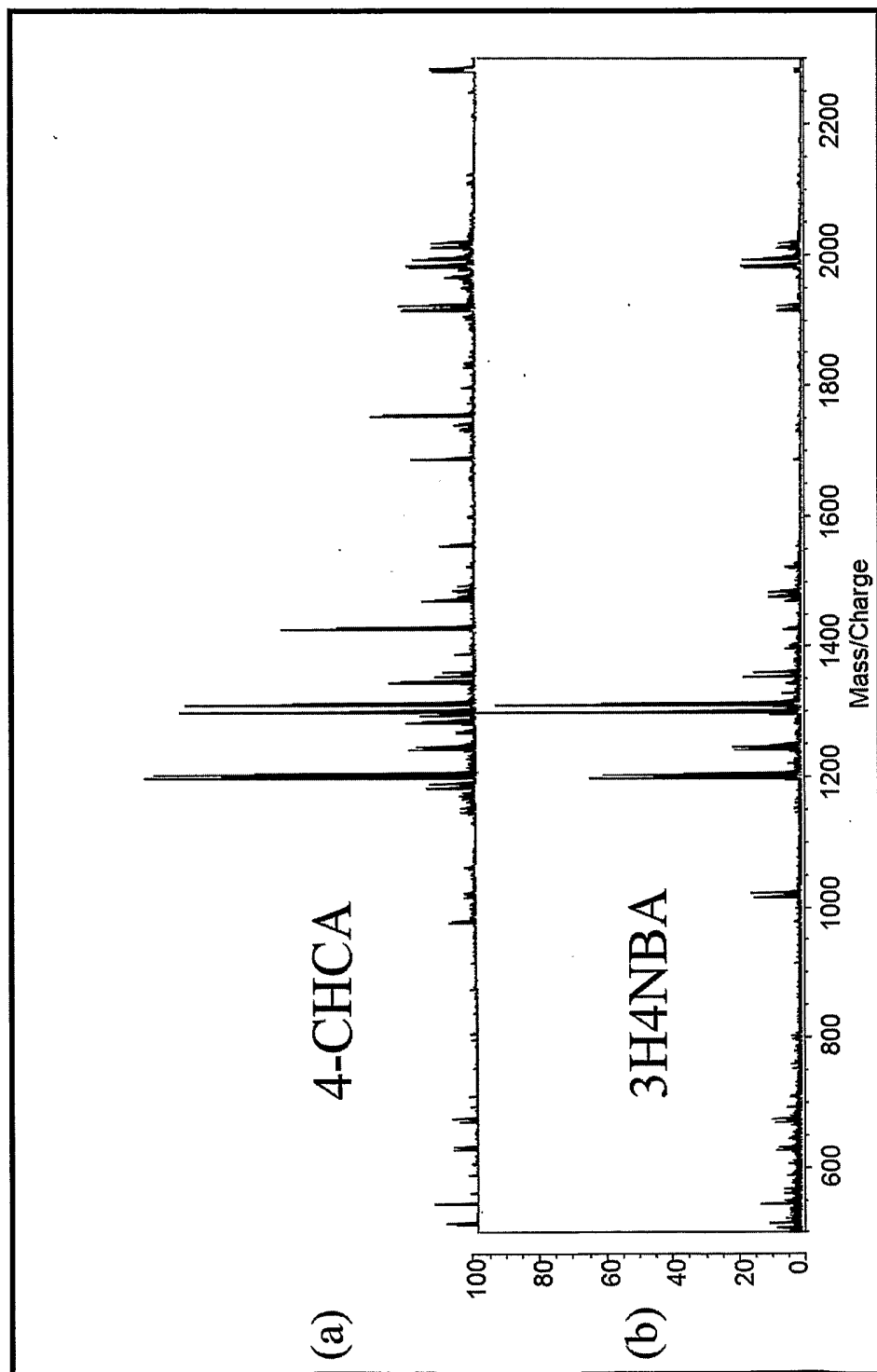


Fig. 5

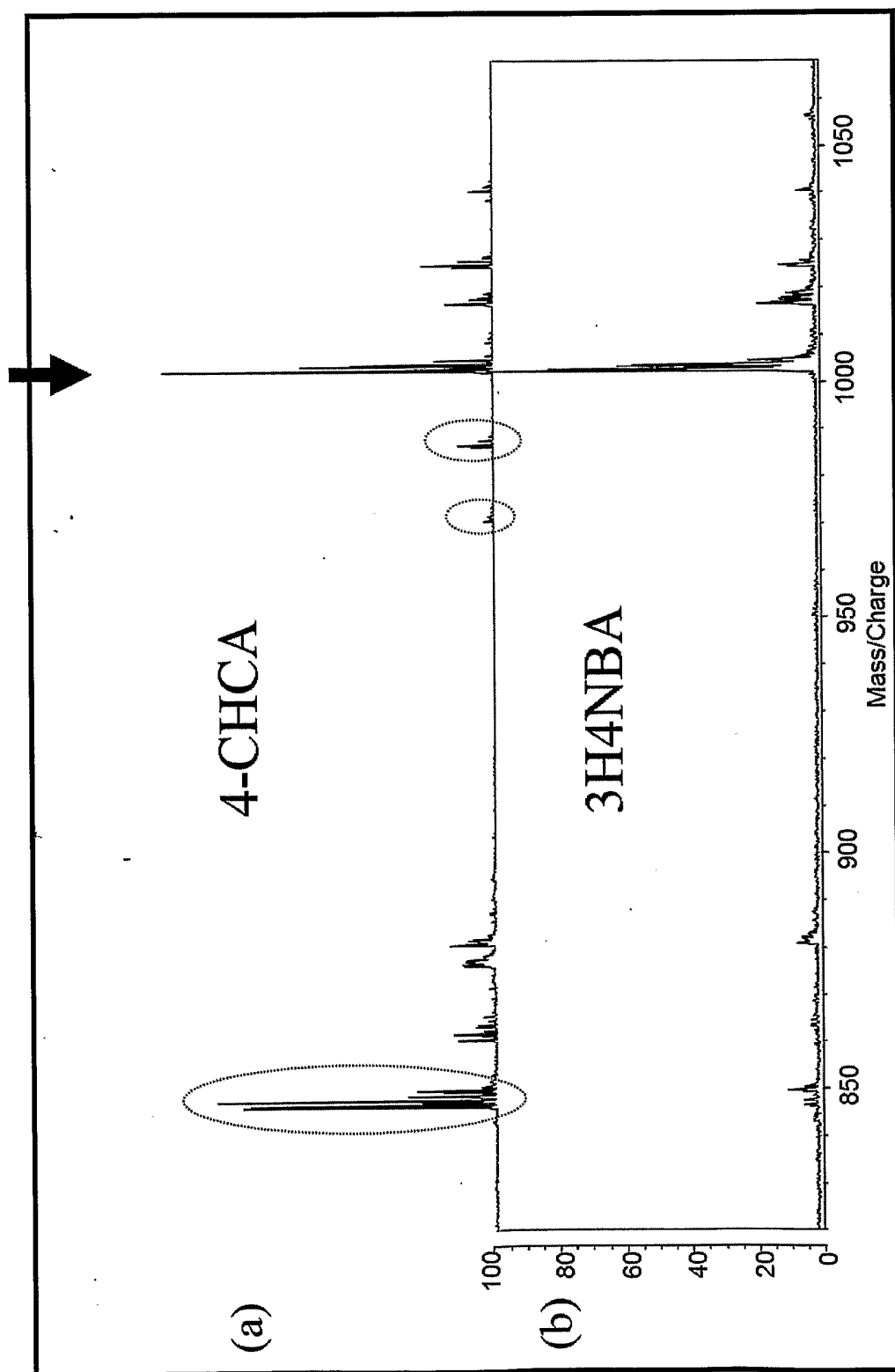


Fig. 6

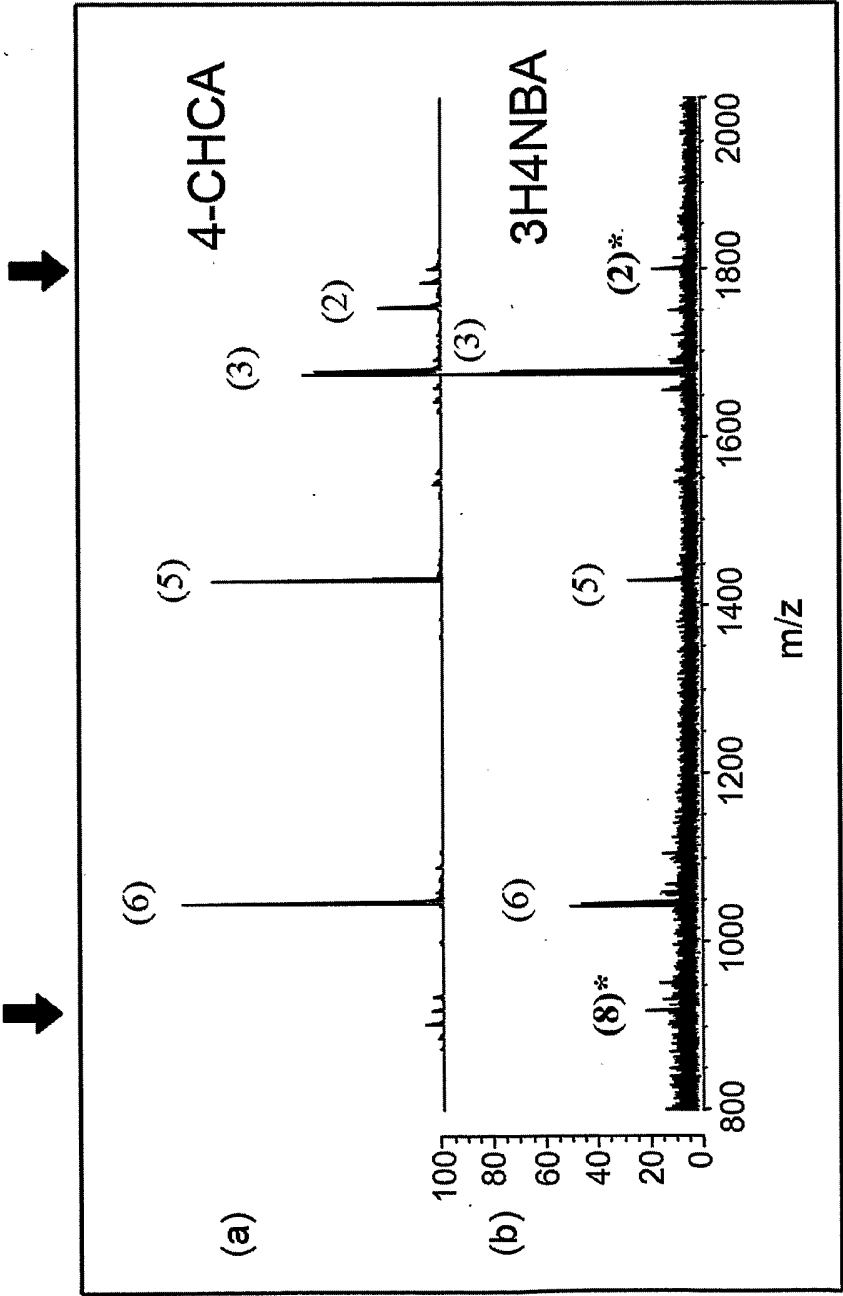


Fig. 7

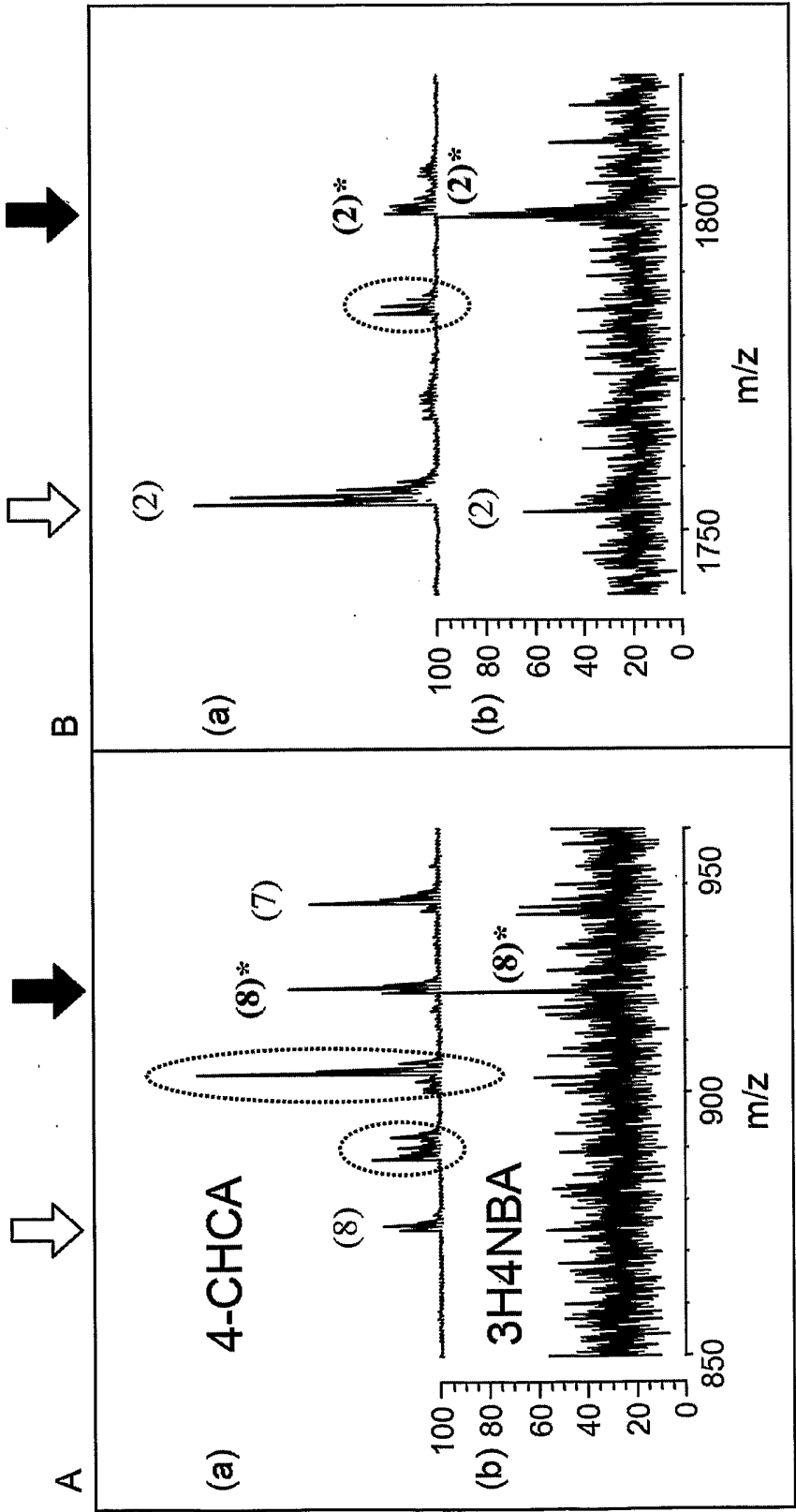


Fig. 8

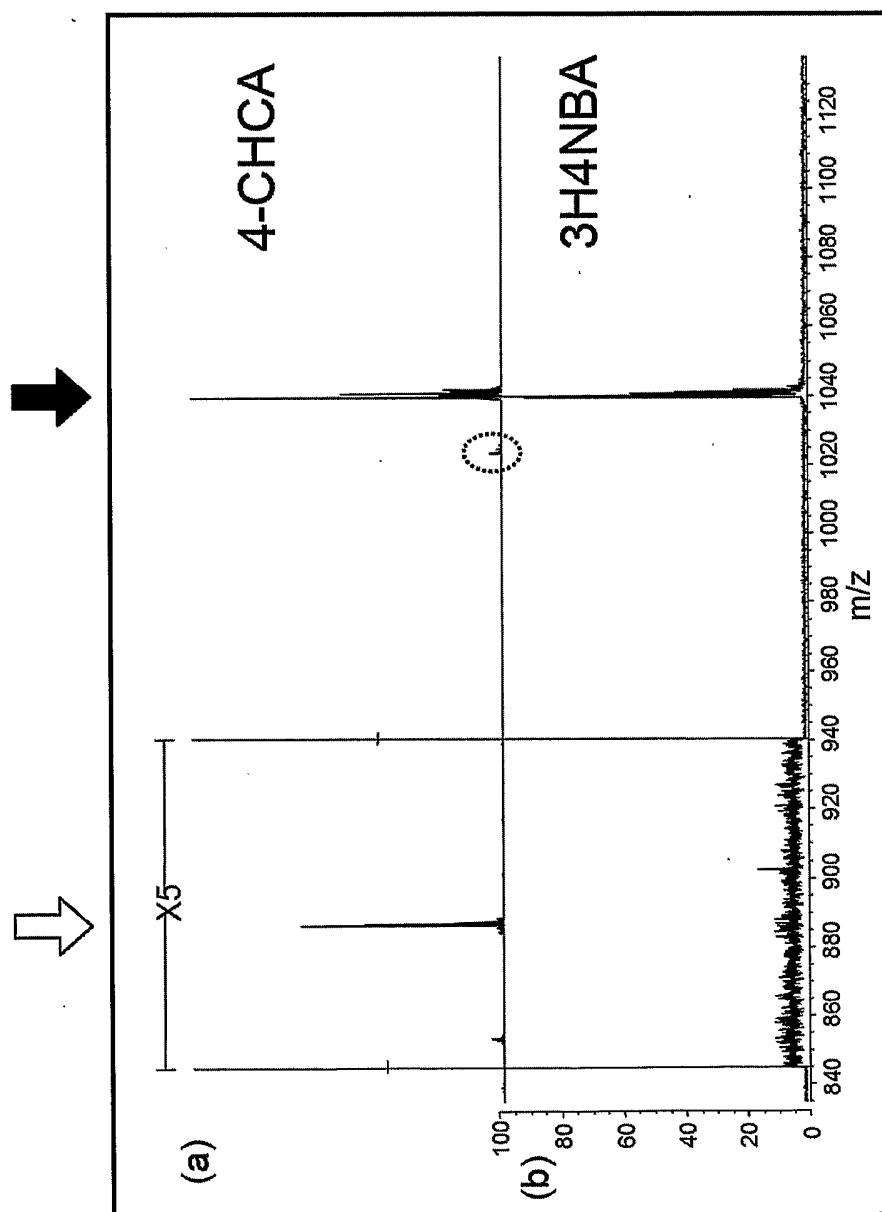


Fig. 9

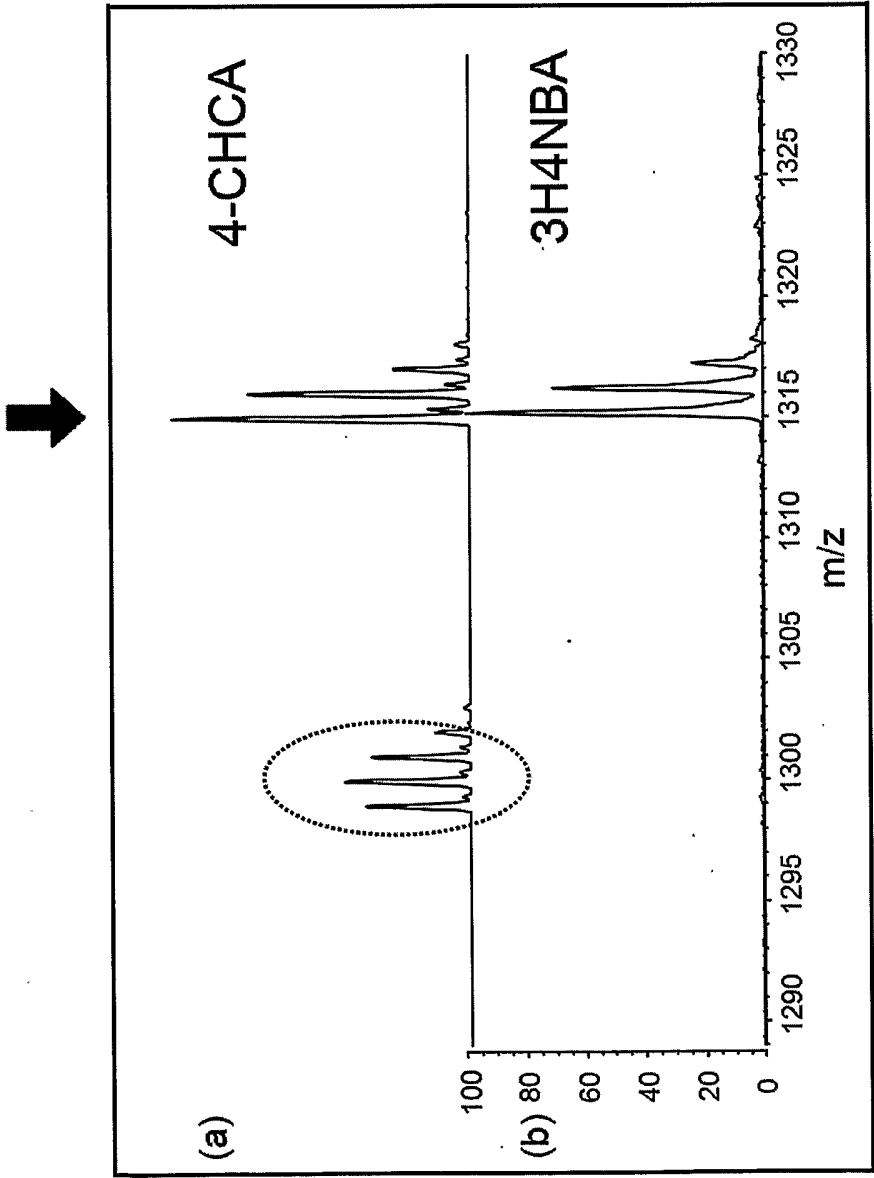


Fig. 10

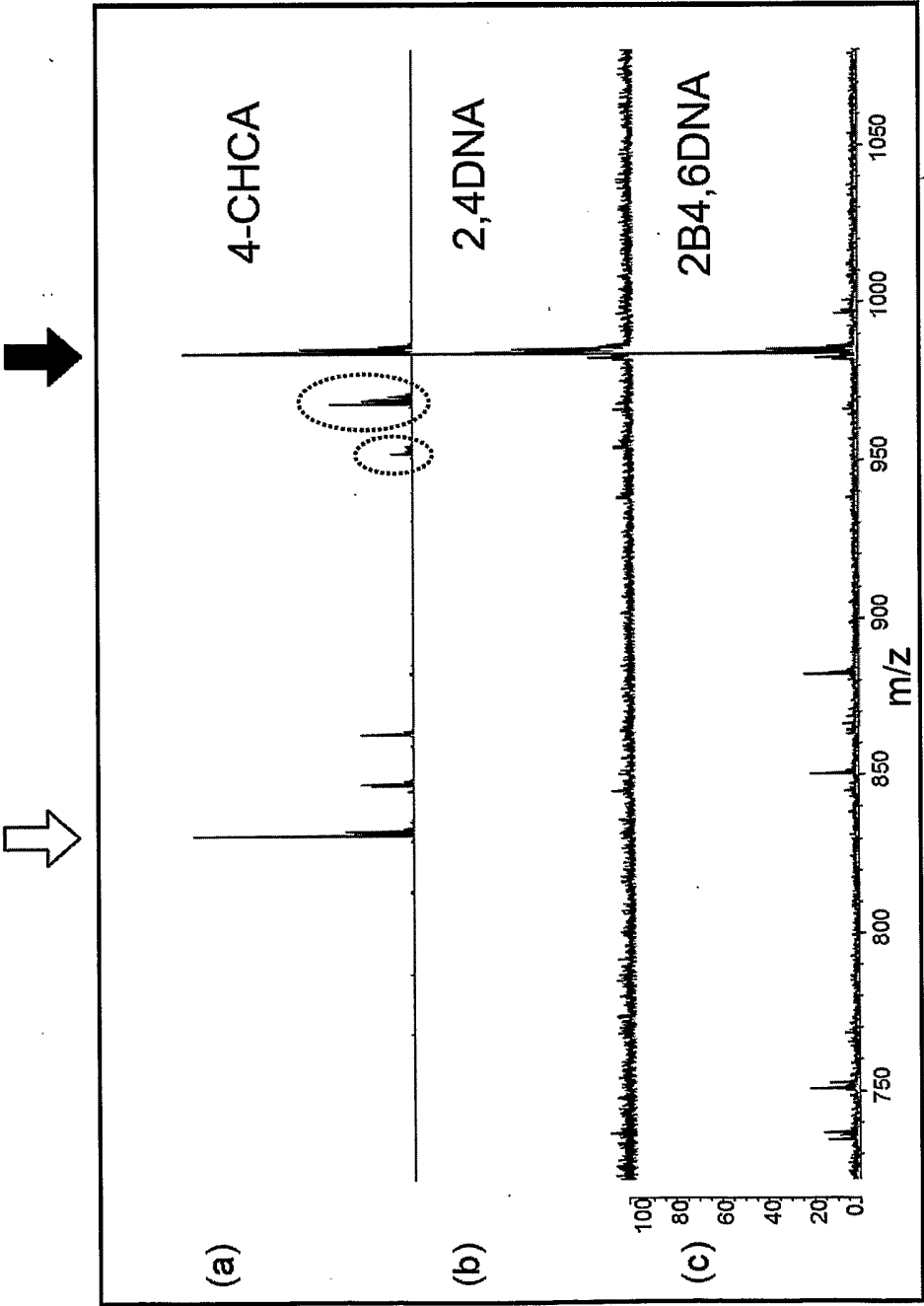


Fig. 11

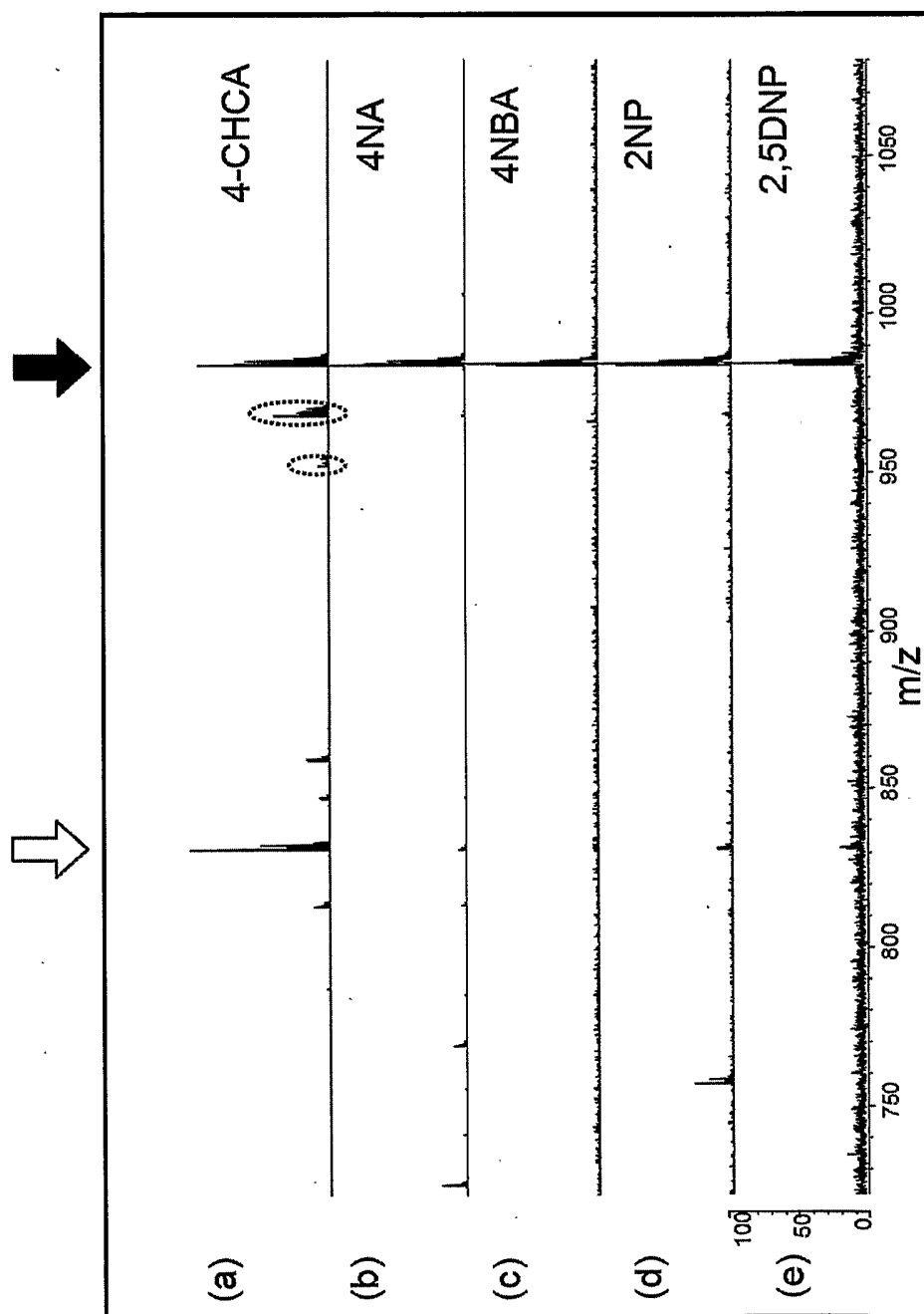


Fig. 12

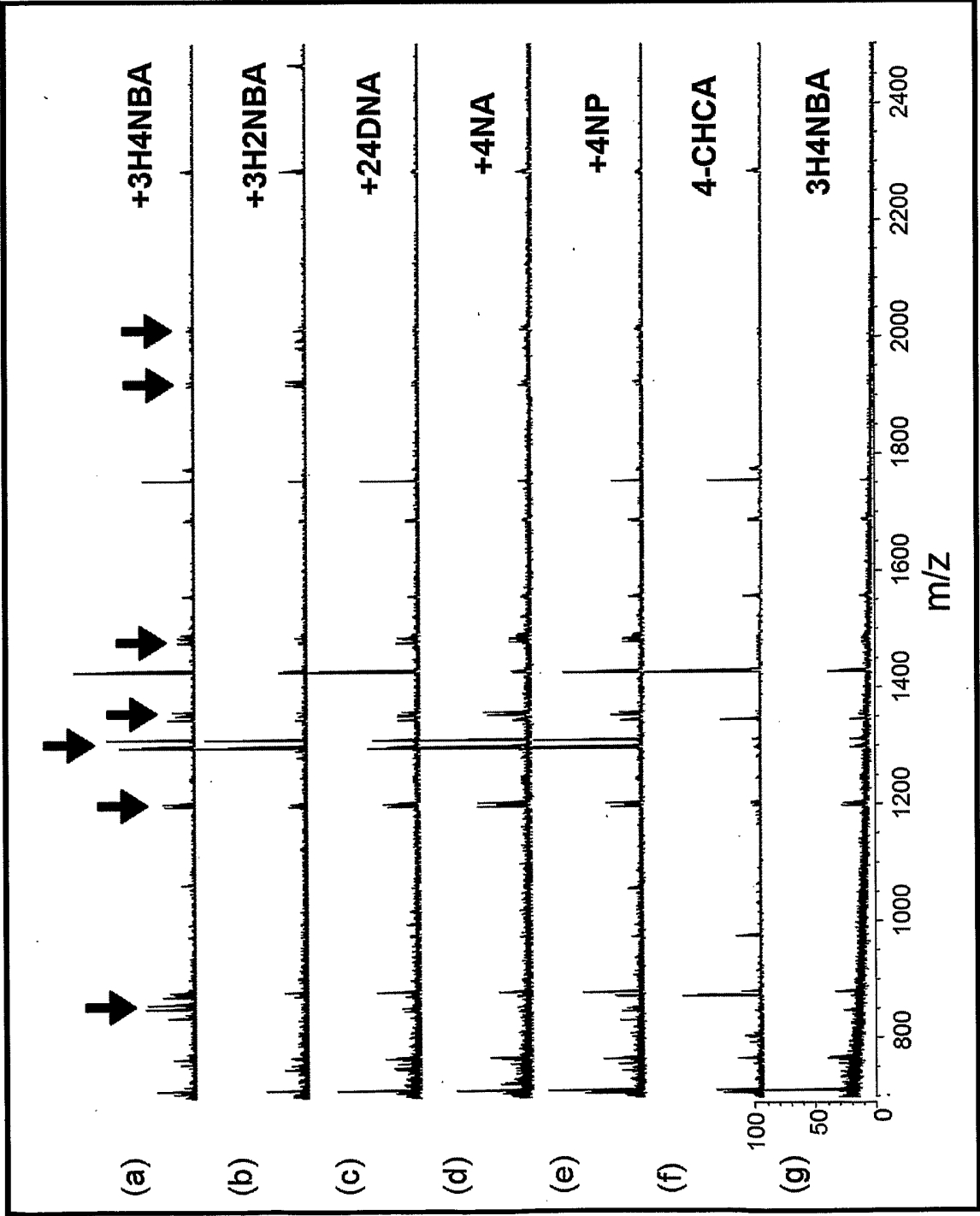


Fig. 13

14 / 22

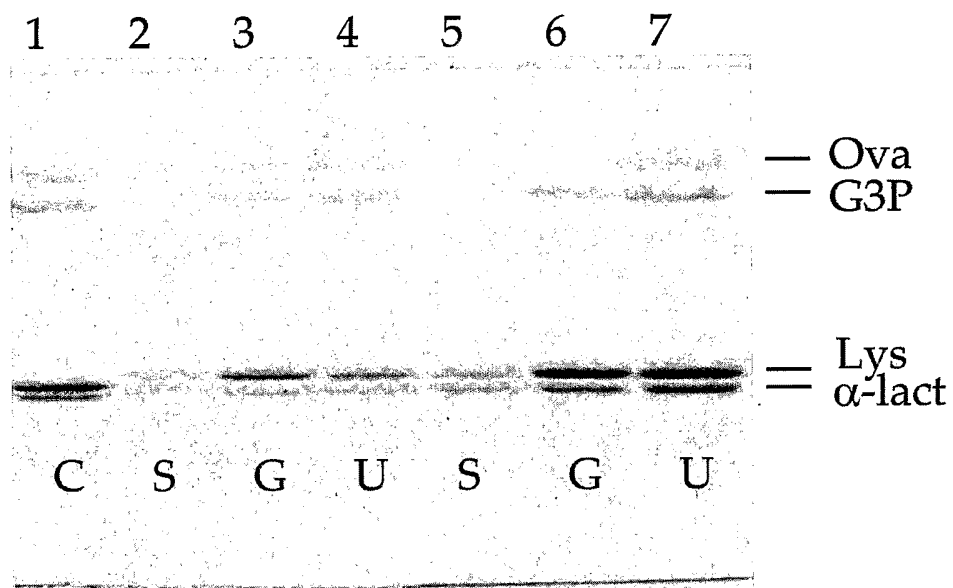


Fig. 14

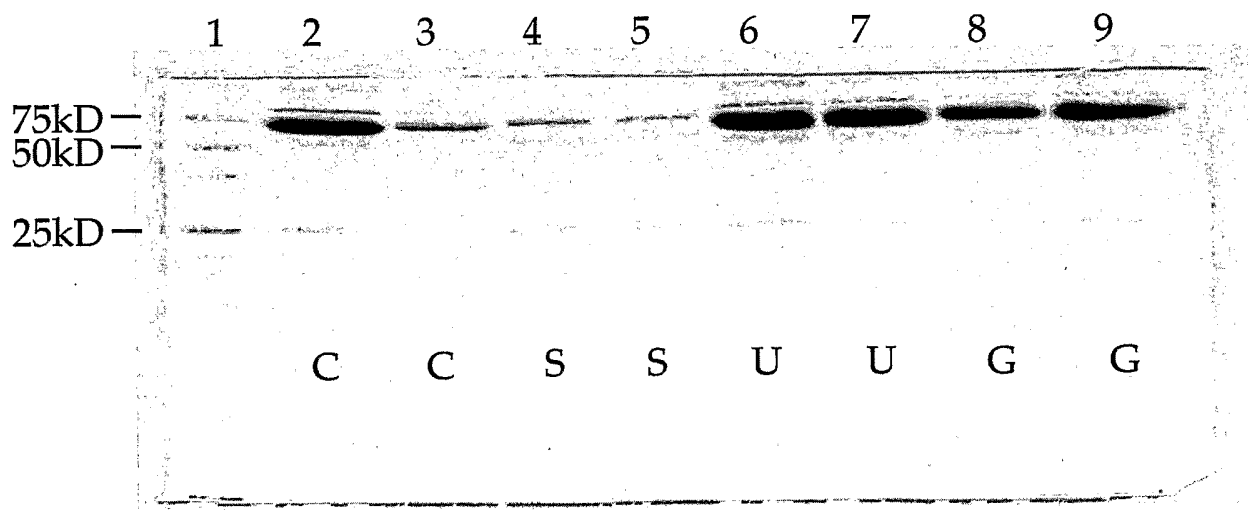


Fig. 15

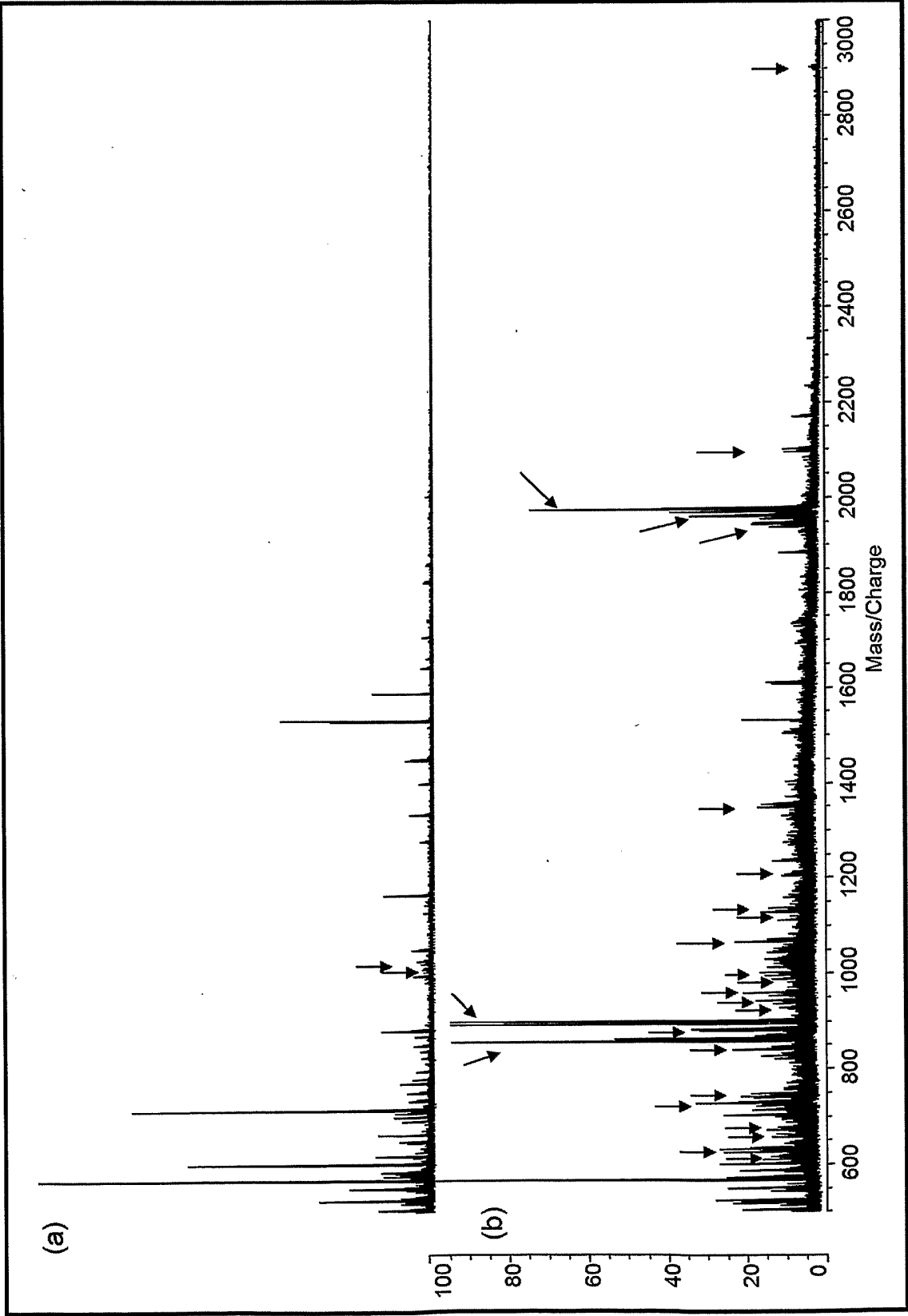


Fig. 16

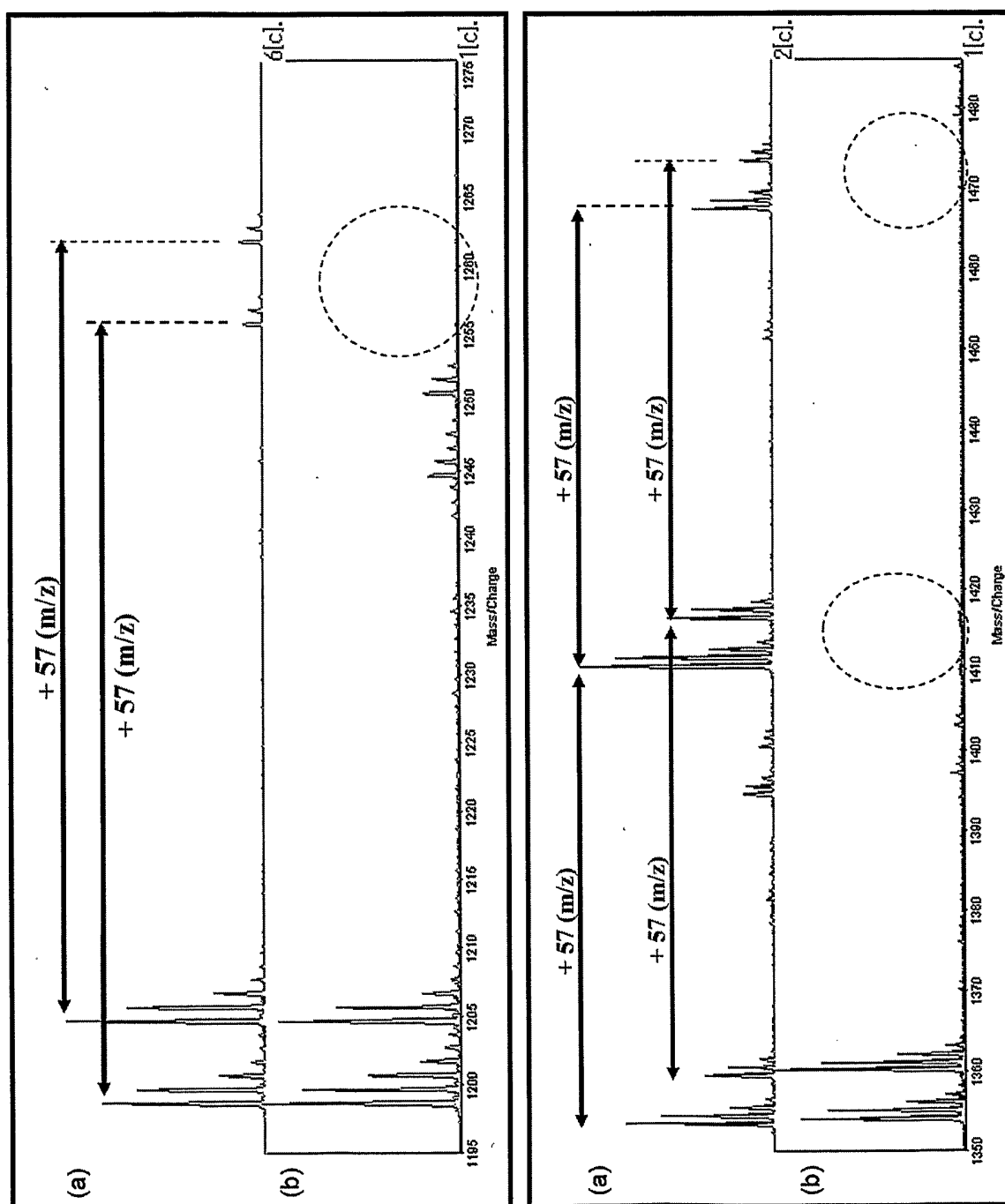


Fig. 17

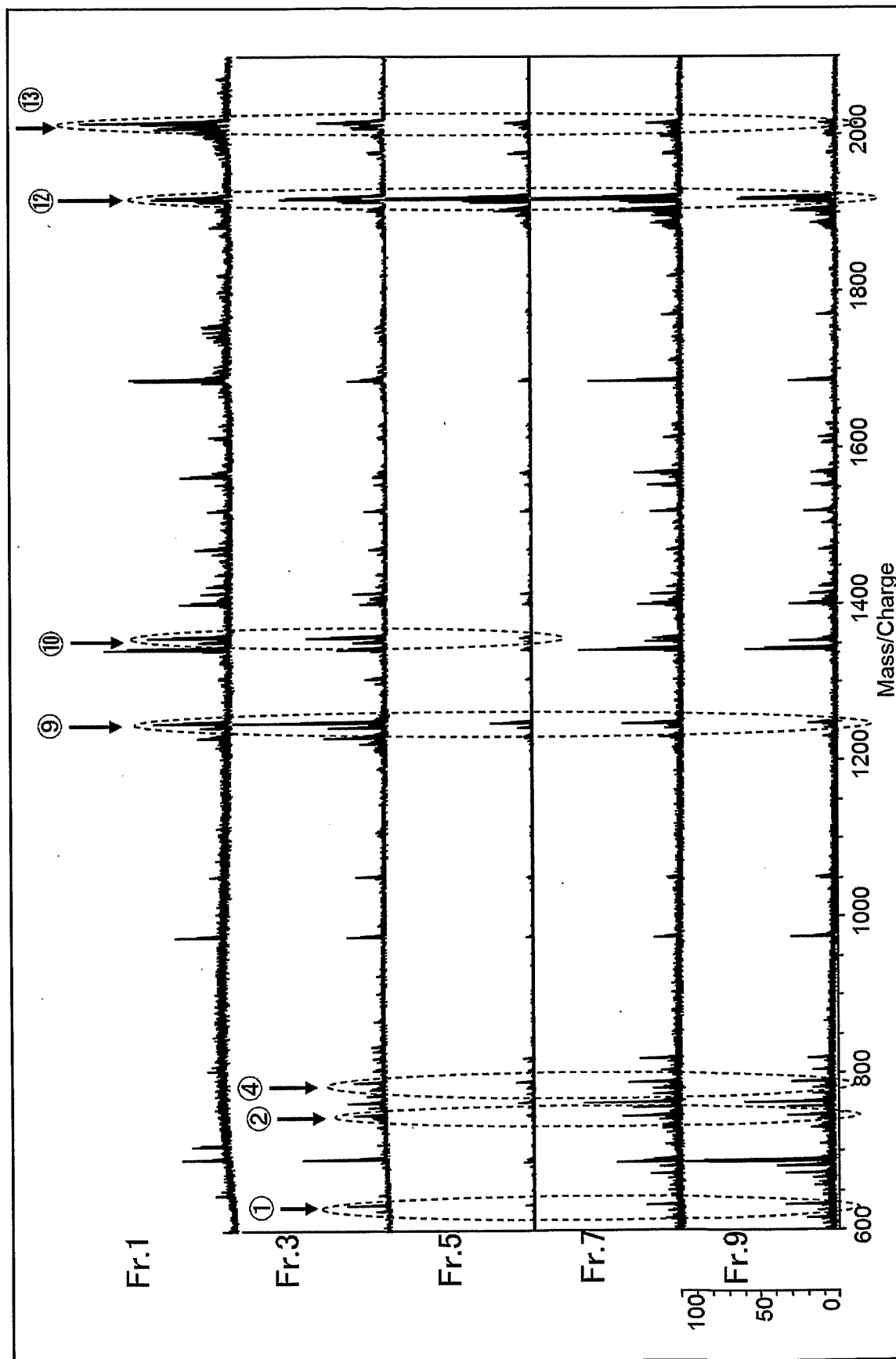


Fig. 18

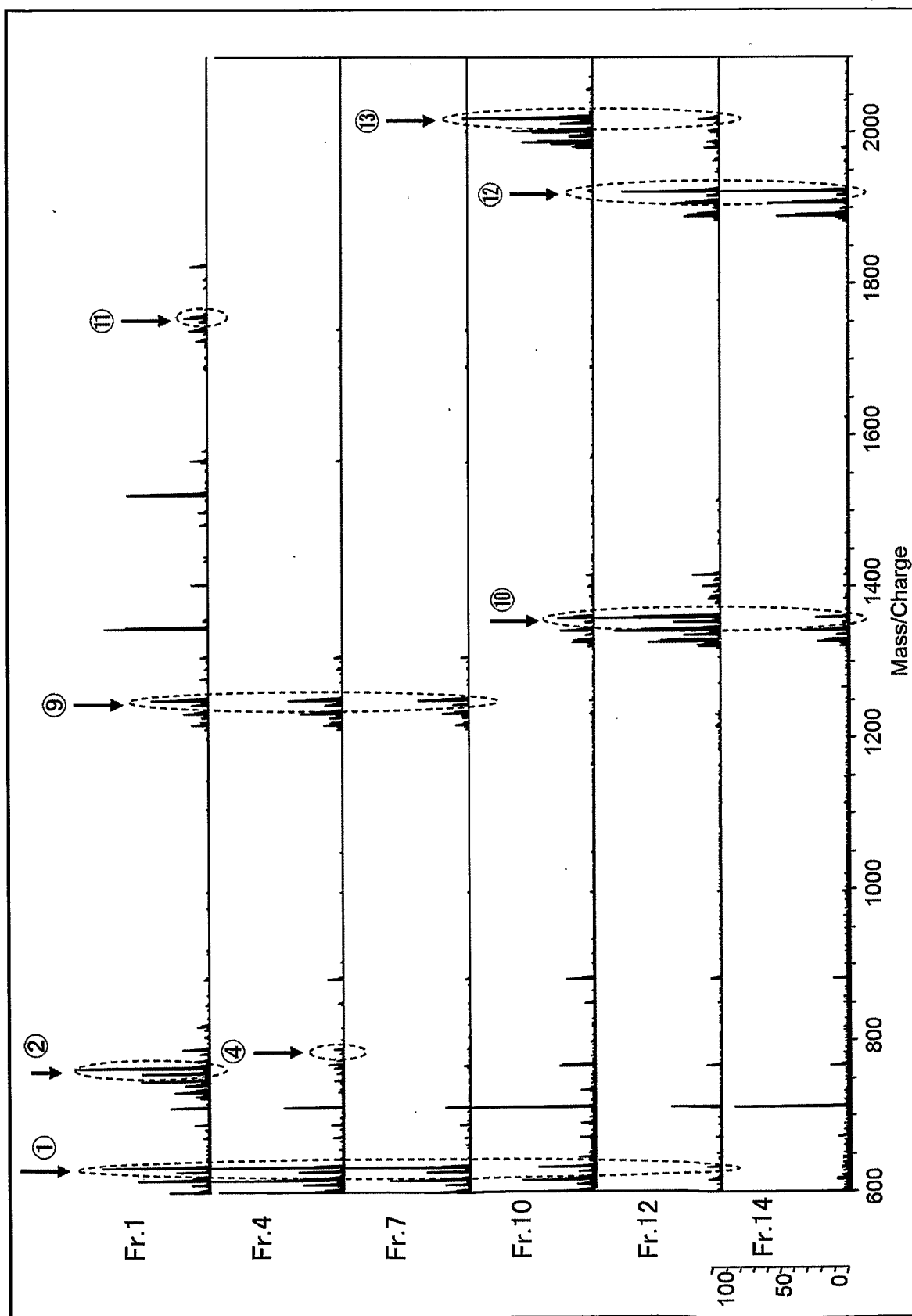


Fig. 19

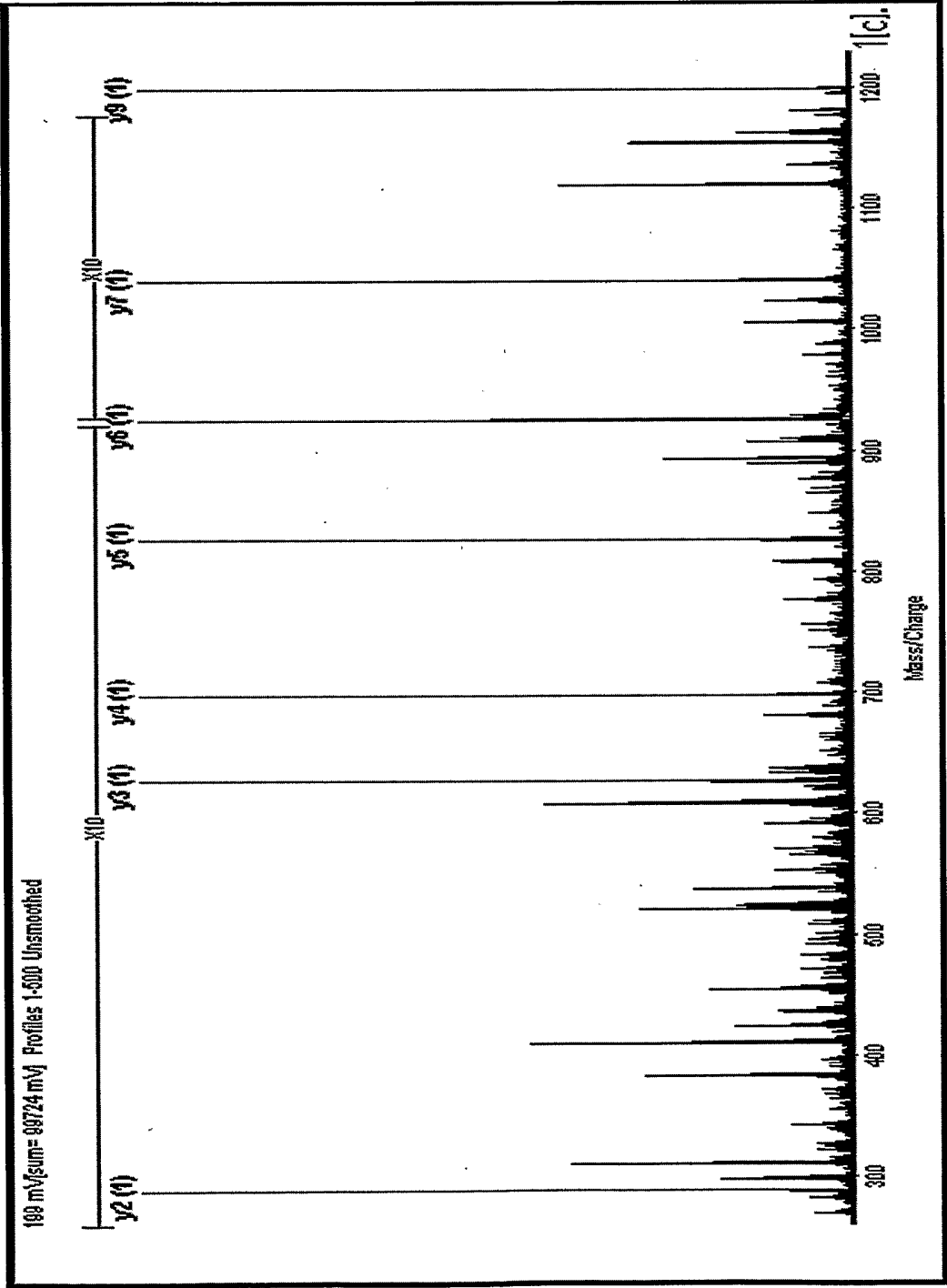


Fig. 21

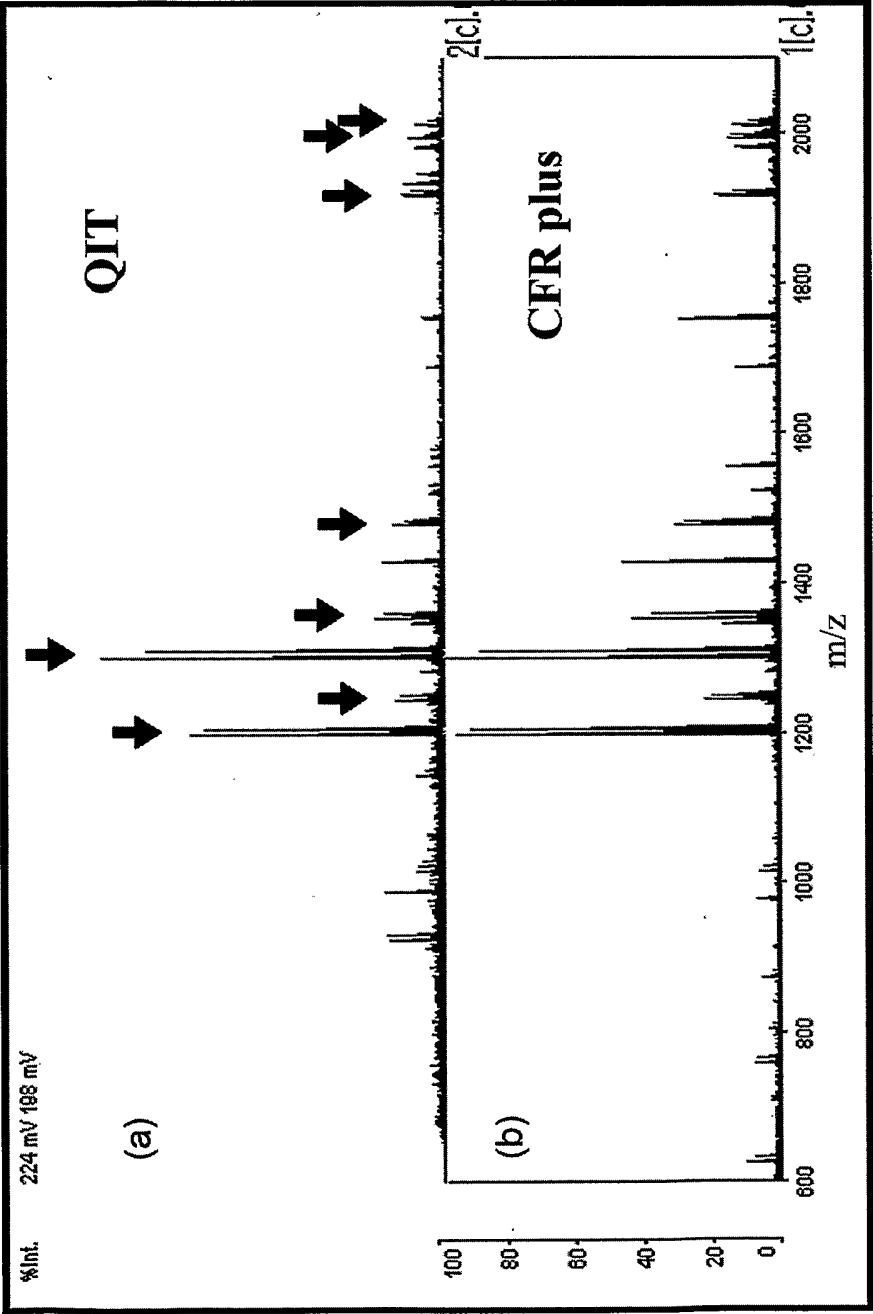


Fig. 22

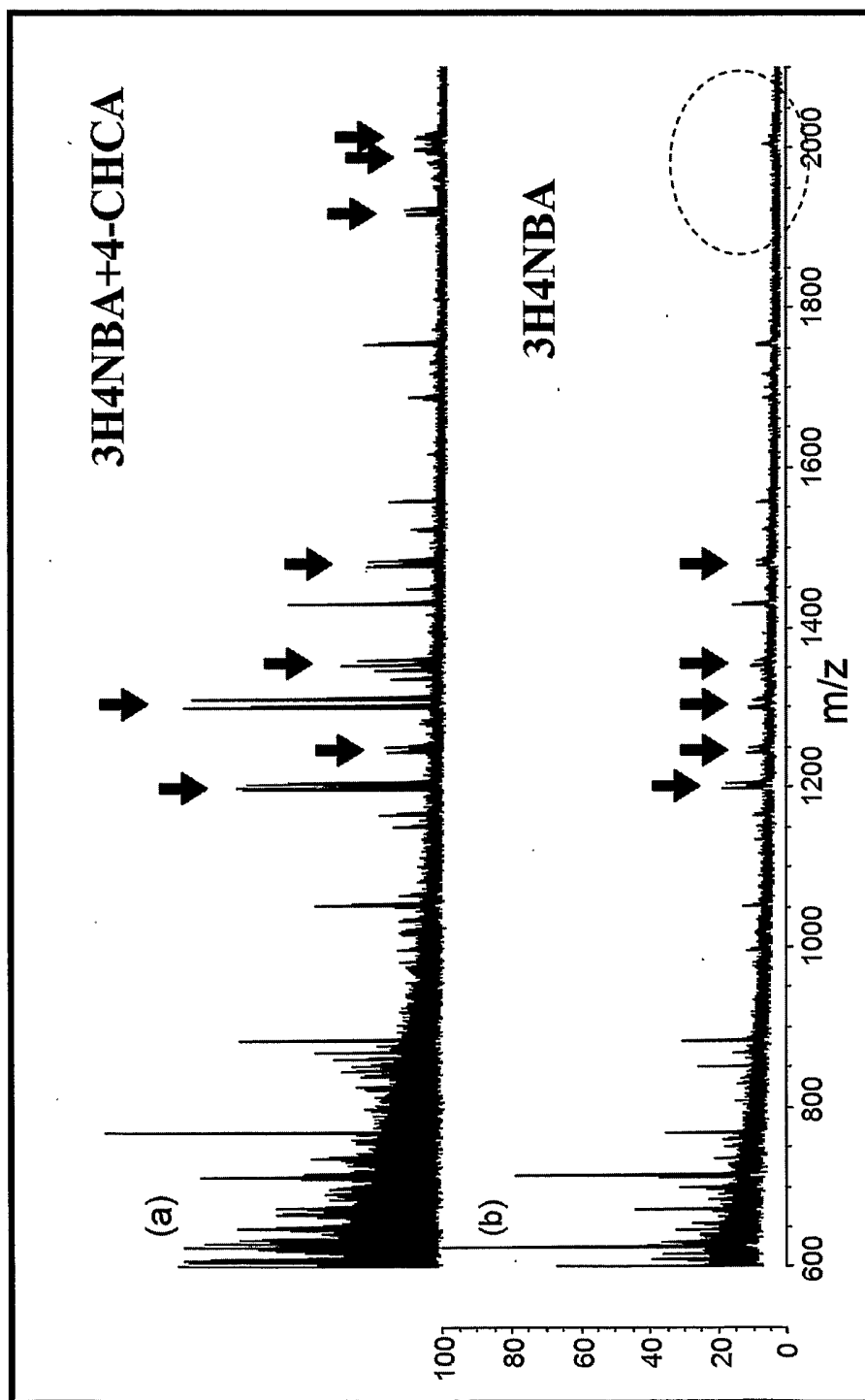


Fig. 23

SEQUENCE LISTING

<110> SHIMADZU CORPORATION

<120> Method and Kit for Measuring Substance Using Mass Spectrometry

<130> G104106 WO

<150> JP 2004-118343

<151> 2004-04-13

<150> JP 2004-368507

<151> 2004-12-20

<150> JP2004-153484

<151> 2004-05-24

<150> JP2004-368508

<151> 2004-12-20

<150> JP 2004-259855

<151> 2004-09-07

<150> JP2004-368510

<151> 2004-12-20

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 1

Gly Thr Asp Val Gln Ala Trp Ile Arg

1

5

<210> 2

<211> 8

2 / 5

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Leu Asp Gln Trp Leu Cys Glu Lys

1

5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 3

Glu Leu Ile Asn Ser Trp Val Glu Ser Gln Thr Asn Gly Ile Ile Arg

1

5

10

15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> BINDING

<222> 8

<223> NITRATION

<400> 4

Asn Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg

1

5

10

15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220>

<221> BINDING

<222> 6

<223> NITRATION

3 / 5

<400> 5

His Gly Leu Asp Asn Tyr Arg

1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 6

Asn Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg

1 5 10 15

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 7

His Gly Leu Asp Asn Tyr Arg

1 5 10 15

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 8

Ile Val Ser Asp Gly Asn Gly Met Asn Ala Trp Val Ala Trp Arg

1 5 10 15

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 9

Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys Ala Ala Lys

4 / 5

1 5 10 15

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 10

Gly Thr Asp Val Gln Ala Trp Ile Arg

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 11

Cys Leu Lys Asp Arg His Asp

1 5 10 15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<220>

<221> BINDING

<222> 7

<223> NITRATION

<220>

<221> BINDING

<222> 10

5 / 5

<223> Nie

<220>

<221> BINDING

<222> 11

<223> AMIDATION

<400> 12

His Lys Ala Arg Val Leu Phe Glu Ala Leu Ser

1

5

10

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006890

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ G01N27/64, 27/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus (JOIS), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	M.E. GIMON et al., "Are Proton Transfer Reactions of Excited States Involved in UV Laser Desorption Ionization?", Organic Mass spectrometry, 1992, Vol.27, No.7, pages 827 to 830	12-21,33,35 1-11,22-32, 34,36,37
X A	Michael C. fitzgerald et al., "Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides", Analytical Chemistry, 1993, Vol.65, No.22, pages 3204 to 3211	12-21,33,35 1-11,22-32, 34,36,37
X A	Green-Church K B and Limbach P A, "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Hydrophobic Peptides", 15 December, 1998 (15.12.98), Analytical Chemistry, Vol.70, No.24, pages 5322 to 5325	12-16,20,35 1-11,17,19, 21-34,36,37
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June, 2005 (29.06.05)		Date of mailing of the international search report 12 July, 2005 (12.07.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006890

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X <u>A</u>	JP 2003-098151 A (Nippon Paka Raijingu Hiroshima Kojo Kabushiki Kaisha), 03 April, 2003 (03.04.03), Full text; all drawings (Family: none)	12-16 <u>1-11, 17,</u> <u>19-37</u>
Y <u>A</u>	WO 2004/002950 A1 (Shimadzu Corp.), 08 January, 2004 (08.01.04), Full text; all drawings & EP 1533296 A1	44, 46-49 <u>38-43, 45</u>
Y <u>A</u>	JP 2000-023684 A (Boehringer Mannheim Corp.), 25 January, 2000 (25.01.00), Par. No. [0065] & EP 0419081 A2	44, 46-49 <u>38</u>
Y <u>A</u>	JP 2004-081042 A (Osaka Industrial Promotion Organization), 18 March, 2004 (18.03.04), Par. No. [0021] (Family: none)	46, 48 <u>38</u>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006890

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of the invention of claims 1-37 is, in mass spectrometry, using of a matrix capable of ionizing a given substance to be measured more easily than the other substances, while the "special technical feature" of the invention of claims 38-49 is containing of 2-nitro[¹³C₆] benzenesulphenyl chloride, 2-nitro[¹²C₆] benzenesulphenyl chloride and phenyl-having carrier.

Thus, among these inventions, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features. Therefore, it does not appear that these inventions are linked with each other so as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N27/64, 27/62

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS), CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	M. E. GIMON, et. al, “Are Proton Transfer Reactions of Excited States Involved in UV Laser Desorption Ionization?”, Organic Mass spectrometry, 1992, Vol. 27, No. 7, pp. 827-830	12-21, 33, 35 <u>1-11, 22-32, 3</u> <u>4, 36, 37</u>

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.06.2005

国際調査報告の発送日

12.7.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高場 正光

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2W

3311

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Michael C. fitzgerald, et. al, “Basic Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins and Oligonucleotides” , Analytical Chemistry, 1993, Vol.65, No.22, pp.3204-3211	12-21, 33, 35 <u>1-11, 22-32, 3</u> <u>4, 36, 37</u>
X A	Green-Church K B and Limbach P A, “ Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Hydrophobic Peptides” , 1998.12.15, Analytical Chemistry, Vol.70, No.24, pp.5322-5325	12-16, 20, 35 <u>1-11, 17, 19, 2</u> <u>1-34, 36, 37</u>
X A	JP 2003-098151 A (日本パーカーライジング広島工場株式会社) 2003.04.03, 全文, 全図 (ファミリーなし)	12-16 <u>1-11, 17,</u> <u>19-37</u>
Y A	WO 2004/002950 A1 (株式会社島津製作所) 2004.01.08, 全文, 全図 & EP 1533296 A1	44, 46-49 <u>38-43, 45</u>
Y A	JP 2000-023684 A (ベーリンガー マンハイム コーポレイション) 2000.01.25, 【0065】 & EP 0419081 A2	44, 46-49 <u>38</u>
Y A	JP 2004-081042 A (財団法人大阪産業振興機構) 2004.03.18, 【0021】 (ファミリーなし)	46, 48 <u>38</u>

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-37に係る発明の「特別な技術的特徴」は、質量分析において、測定すべき特定の物質以外の物質よりも、該特定の物質をイオン化させやすいマトリックスを用いることであり、請求の範囲38-49に係る発明の「特別な技術的特徴」は、2-ニトロ [$^{13}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、2-ニトロ [$^{12}\text{C}_6$] ベンゼンスルフェニルクロリド、及びフェニル基を有する担体を含むことである。

以上から、これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。