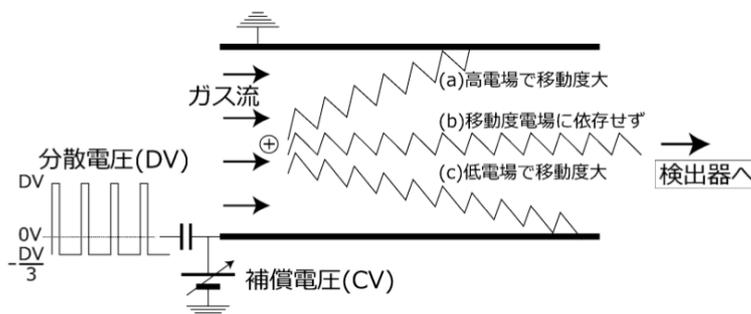


§1, §2

Q. IM-MS を用いた論文が近年伸びてきた理由は何か。

生体分子およびナノマテリアルへの応用がさかんになされているためです。生体分子への応用がさかんなのは、タンパク質の動的な構造変化を捉えることができる点などに起因しています。一方ナノマテリアルですが、 $\text{A}\beta$ などの凝集性ペプチドと性質が似ていて、生成直後から構造が動的に変化し種々の混合物を与えるため、純物質が必須である X 線や NMR などによる構造解析は困難だそうです。それゆえ、混合試料に対して網羅的に構造解析を行える IM-MS が用いられているようです。

Q. FAIMS で余計な分子のみを電極で捕捉するというのはどういう仕組みなのか。



(図は T. Sugai, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2010**, *58*, 47 より引用)

高電場で移動度が大きいイオン(a)、移動度が電場に依存しないイオン(b)、低電場で移動度が大きいイオン(c)の3種類が系中に存在しているとします。

系には**非対称な電圧(分散電圧)**がかけられており、印加される電場の大きさが時間によって変化します。

**正の高電場は短時間、負の低電場は長時間**印加されており、電場の時間平均は0になります。

高電場印加時にはイオン(a)が、低電場印加時にはイオン(c)が、それぞれ移動度が大きくなり、電極に向かって移動していくことになります。一方イオン(b)は、移動度が電場に依存しないため、このような電極に向かう移動は起こしません。この結果、分散電圧のみがかけられている条件では、イオン(b)がドリフトセル中をまっすぐ通過し検出器に向かうことができますが、イオン(a)、(c)は、高電場あるいは低電場が印加されている時間帯に電極に向かって移動していくため、いずれは電極にぶつかって中和されてしまい、検出されないということになります。

**イオン(a)、(c)を検出したい場合は、補償電圧(CV)を系に印加します。**正の CV を印加すれば、負の低電場が中和されるため、イオン(c)が検出できるようになります。負の CV を印加すれば、正の高電場が中和されるため、イオン(a)が検出できるようになります。

Q. DTIMS に対する TWIMS の長所は何なのか。

DTIMS だと、セル中でのイオンの拡散を抑えることができず、それが検出効率の低さの1つの原因になっ

ています。これに対し TWIMS では、サインカーブ状の高周波電圧が印加されていることで、イオンの拡散が抑えられており、検出効率が向上しています。

Q. ガス分子の大きさで分解能が変わることはあるのか。

ありえると思います。バッファーガスとして He の代わりに Xe を使うなどすると、分極率やファンデルワールス半径が大きくなり、CCS が増加します。これは、CCS を過大評価することにつながるだけでなく、小さいガス分子を使っていた場合は検出できていた、イオン構造の微細な違いを検出できなくなることにつながる考えられますので、分解能が下がることは十分にありえるはずです。

Q. ドリフトセルの長さを変えることで分解能は上がるのはどういう原理か。

スライド 56 (Appendix・3 スライド目)に詳しく示していますので、そちらをご覧ください。

Q. DTIMS の装置が大きくなりがちということだが、どのくらいになるのか。

ドリフトセルの長さが 2 m に達するものもあるそうです。

Q. IM-MS の分離能はゲルろ過とくらべてどうなのか。

実際に使ってみないとはっきり言えないです、申し訳ありません。

Q. 装置のメンテナンスの大変さはあるか。

これもまた、実際に使ってみないとはっきり言えないです、申し訳ありません。

Q. 電気泳動を利用した MS は、biology では需要がありそうだが、開発されていないのか。

キャピラリー内で行う電気泳動(キャピラリー電気泳動)と質量分析計をあわせた CE/MS というものがあるそうです。

Q. 1 回の解析に必要な具体的なサンプル量はどのくらいか。

具体的な値は示されていませんでしたが、たとえば JACS 2005, 127, 2075 においては、1 回のサンプル調製において、30-50  $\mu$ M の A $\beta$ 42 水溶液を 100  $\mu$ L 調製していますので、このレベルの濃度・スケールで測定が行えるのだと思います。

Q. DTIMS ですべての大きさのイオンを等速にできる原理が分からない。

手元にあるどの資料を見ても、すべてのイオンを等速にできている証拠は示されていませんでした、申し訳ありません。「低電場極限ではすべてのイオンが等速である」と仮定しているのだと思います。

## §3.2

Q. [スライド 22] 著者らが A $\beta$ <sub>42</sub> の Phe<sup>19</sup> を Pro に変えた理由は何か。また、その凝集性がない理由は二次構造の変化によるものなのか。

Phe<sup>19</sup> を Pro に置換すると A $\beta$  の繊維形成が抑制されるという報告(S. Wood *et al.*, *Biochemistry* 1995, 34, 724)があったためです。凝集が抑制されるのは、 $\beta$ -シートをとりづらくなるためだと考えられます。

Q. Injection energy を変えると検出されるオリゴマーが変わることから、サンプルを打ち込んで解析しているあいだに decomp する可能性があると思うが、どのくらい fragile な構造が検出できるのか。

どの程度 fragile な構造が decomp せずに検出できるのかについては、手持ちの論文からは情報は得られませんでした、申し訳ありません。

## §3.3

Q. [スライド 36] テトラマー以上になると、様々な重合度があり得るため、示されているもの以外のオリゴマー構造を考慮しないのは unfair ではないのか。たとえば、ヘキサマーと帰属したものが、実は少し広がったテトラマーあるいは少し丸まったオクタマーであるなどの可能性はないのか。

表に示しているのは対称性を有する構造のみです。それ以外の構造に対し CCS 予測を行ったかどうか記載はありませんが、おっしゃる通り、非対称なものも考慮すべきだと思います。もし、これらを考慮せずに帰属を行っていたのなら、ご指摘のとおり、誤帰属の可能性は十分ありえます。

Q. [スライド 33] モノマーを剛体球近似するところについて、

- (1) その根拠はどこにあるのか。また、無視される要素はどういうものか。
- (2) この近似をベースに推察された構造はどのくらい正確なのか。
- (3) 他にはどのような近似がありえるのか。

(1)：テトラマー、ヘキサマー、ドデカマーの theoretical CCS が、observed CCS とよく一致したことが、結果的に、この近似の妥当性を示唆していると思います。無視される要素としては、オリゴマー化にともなうモノマー単位の構造変化が代表的かと思います。

(2)：この近似の正確性については議論がなされていなかったもので、申し訳ないですがお答えできません。

(3)：手持ちの論文では、これ以外の近似法は見つかりませんでした。申し訳ありません。

Q. [スライド 34] CCS 理論値の算出方法はどのようなものか。

最も簡単な計算方法は、タンパク質の 3 次元構造をある平面に正射影し、できる影の面積を計算するというものです。タンパク質の 3 次元構造は様々に回転させ、それぞれに対して正射影の面積を計算するとします。こうして得られた面積の平均値が theoretical CCS と定義されます。

なお、この計算手法ではガス分子との相互作用が完全に無視されているため、計算結果が不正確になってしまいます。そこで Bowers らは、イオン-誘起双極子相互作用と誘起双極子-誘起双極子相互作用を考慮に入れた計算アルゴリズムを独自に開発し、これを使って theoretical CCS を算出しています。

Q. トリマー、テトラマーが凝集の原因であると示唆されているが、これを安定化することはひとつの戦略になるのだろうか。

なりえると思います。§3.3 で示した論文では、他の生化学的な論文で提唱されている毒性オリゴマーの質量情報との対比から、彼らが観測しているドデカマーが高毒性凝集体であるとしていますが、これが正しいなら、ドデカマーを構成するダイマー・テトラマーの安定化は、毒性抑制につながるかと思います。

Q. [スライド 36]  $A\beta_{40}$  と  $A\beta_{42}$  でテトラマーの角度が異なる理由は何か。

論文では、 $A\beta_{40}$  と  $A\beta_{42}$  では、テトラマーの構成要素たるダイマーの構造が微妙に違っているため、角度が違っているのだらうと記されていましたが、それ以上の追究はしていないようです。

Q.  $A\beta_{40}$  と  $A\beta_{42}$  はそれぞれ  $120^\circ$ 、 $30^\circ$ の開き方で固まっていると考えていいのか。その証拠はあるのか。

固まっているわけではないと思います。論文中では、なぜ  $120^\circ$ 、 $30^\circ$ なのかについての議論はなされていませんでしたので、その証拠もない(theoretical CCS からの推測にすぎない)のだと思います。

## §3.4

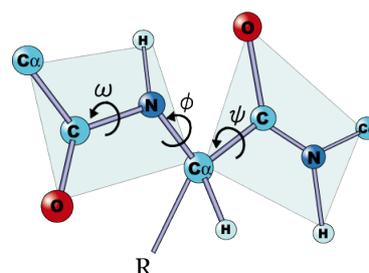
Q. EGCG はどんなデザインによって見つかった化合物なのか。

デザインされた化合物ではなく、緑茶の成分をスクリーニングして発見された天然物です。もともとは、ハンチントン病の原因物質であるハンチンチンのミスフォールディングを制御する化合物として発見されましたが(D. Ehrnhoefer *et al.*, *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 2743), その後の研究で、 $A\beta$ の繊維形成を抑制することが見出されました(D. Ehrnhoefer *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 558)。

Q. [スライド 44]  $\beta$ -シート構造をとっているかどうかは、どのような特徴をもとに判断しているのか。

ペプチド鎖が $\beta$ -シート構造をとると、右図の $\phi$ 、 $\psi$ が特徴的な値をとることが知られています。おそらく彼らは、シミュレーションで導き出された構造のペプチド鎖においてこれら2つの二面角を計算し、その値から、 $\beta$ -シート構造をとっているか否かを判断したものと考えられます。

(図は <http://www.bi.a.u-tokyo.ac.jp/~tak/wiki/index.php> より引用)



## 全体に対して

Q. 分析時間が短いことを利用して、 $A\beta$ 凝集体の毒性と大きさの相関をなぜとらないのか。あるいは、どうやったらとれるのか。

検出された多くのオリゴマーがいわゆる中間体であり、溶液中では短時間しか存在していないことが予想されるので、**大きさと毒性の相関は極めて取りづらい**かと思います。また、推定された凝集体の構造は、あくまで気相中での構造ですので、それと毒性の相関をとることにどれほどの意味があるかについては、慎重な議論が必要だと考えます。

一方で Bowers らは、§3.3 で示した論文中で、他の生化学的な論文で提唱されている毒性オリゴマーの質量情報との対比から、彼らが観測しているドデカマーが高毒性凝集体であるとしています。このドデカマーは比較的安定だとされており、こういう凝集体であれば毒性との関連も見られると思います。

Q. 気相での解析であると共に、かなり多くのことを仮定している中、MS 解析だけからこういう結果を主張するのは無理がある気がする。

Bowers らは IM-MS 解析をベースに議論を展開していますが、これは、対象が  $A\beta$  だから、というのが大きいと思います。本来は、他のアッセイ・構造解析から得られた結果と総合して議論されるべきです。

Q. 他の分子と比較をしないと(たとえば、 $A\beta_{40}$  と  $A\beta_{42}$ 、あるいはリガンドの有無)、CD など他の装置以上の構造情報はわからないのか？

単一分子であっても、分子動力学シミュレーションとの対比から、構造情報を推定することは可能です。しかしながら、シミュレーションに頼る構造情報はどうしても曖昧さを残すため、同じ IM-MS という土俵で他の分子と比較をすることで、得られる情報の信ぴょう性を増やす努力が必要になるのだと考えます。

以上です。