

病気を質量で診断する

Development of Δm Diagnostics

和田芳直

Yoshinao Wada

大阪府立母子保健総合医療センター

〒594-1101 大阪府和泉市室堂町 8 4 0

Tel 0725-56-1220

E-mail: waday@mch.pref.osaka.jp

私は 2012 年の日本質量分析学会の学会賞を業績「分子病の質量分析に関する先駆的研究」に対して頂いた。分子病 molecular disease は、タンパク分子の質的变化を一義的な原因とする疾患や疾患概念のことで、Linus Pauling (1901-1994 ; 1954 年ノーベル化学賞) の造語である。1949 年、Pauling らは鎌状赤血球症患者の血色素 hemoglobin にアミノ酸置換があることを発見し、そのような分子構造異常を原因とする疾患が多数存在するであろうこと、そして、この発見が医学を（真の）科学に変えることを確信して論文タイトルを”Sickle cell anemia a molecular disease”とした[1]。分子病の概念は、わずか数年後（1953 年）に James Watson と Francis Crick（ともに 1962 年ノーベル医学生理学賞）が引き金を引いた遺伝子や遺伝の分子基盤解明の流れの中で、例えば、発癌と関連する遺伝子変異や個別化医療など遺伝子・分子情報に基づく医学・医療を導いたが、分子病という概念はすべての病気に関連する基本概念であるためにこの語は使われなくなってしまった。しかし、分子の質的分析、つまりタンパク質分子の構造変化やそのもとにある遺伝子変異を分析することは今や疾患の本質理解に必須である。

1979 年、私たちは分子病の分析対象分子としての生体高分子や遺伝子の構造変化の解析に質量分析法 (MS) を先駆的に導入した。それはタンパク質の構造変化を質量変化としてとらえる、つまり「疾患を Δm で記述する」ことであり、この手法をはじめの 3 年間に確立した。その成果は、従来法では解決できなかった異常血色素例の構造解明、すなわち図 1 のマスペクトルに凝縮している。その後の発展と展開、つまり遺伝子の MS や先天性グリコシル化異常症の病因に対する MS によるブレークスルーはすべてこの分析手法の応用に過ぎない。それらの研究経緯は日本質量分析学会誌(Vol. 61, No.4)に書いた。本稿のはじめにある、方法の起源に関する記述は会誌の内容と重複しているが、糖ペプチドの MS、社会還元、最近の研究に関しては書き下ろしである。

構造変異タンパク質の MS

遺伝子解析を現在のように簡便に行えるようになる 1990 年代前半まで、タンパク質の分子構造変化（変異）の解析はかなり骨の折れる作業であった。具体的にはタンパク質をトリブ

シンなどの酵素によって分解して得られるペプチドを電気泳動とクロマトグラフィーによって2次元に展開し (peptide mapping)、得られたペプチドマップ上での各ペプチドの位置を対照と比較することで構造変化のあるペプチド、つまりタンパク質配列における領域を特定する。次に、ペプチドを抽出・回収し、エドマン分解等の配列解析を行って構造変化部位あるいはアミノ酸置換の部位と種類を決定する。

1969年に Beckey が電解脱離イオン化法 Field Desorption (FD)法を発表し[2]、メチル化のような修飾を加えずともペプチドのプロトン付加分子イオンを生成できるようになり[3]、ペプチドの質量測定が可能となった。大阪大学教養部の松田久と松尾武清は短寿命原子核の精密質量を目的として1976年に製作した二重収束質量分析計 CQH を生体分子分析に用いることを試みた。この装置は収差をおさえ二重収束も実現するとともに自由空間を短く設計した「明るい」装置であった。イオン光学系の「明るさ」は高感度につながることから、CQH は試料量 (モル量) に制限のある生体分子分析に有効であった。FD 法では微細な whisker (髭) 構造をもつ電線 (エミッター emitter) に試料を塗布し、高電圧下で電流を流して次第に温度を上昇させることで分子をソフトに脱離イオン化する。松尾らは良好な強度をもち安定にイオン化を行えるエミッターをシリコン蒸着によってつくることを考案した[4]。そして、大阪大学蛋白質研究所の下西らと FD イオン源と CQH を使った MS によるペプチド分析について共同研究を行い、エドマン分解と MS を組み合わせた新しいアミノ酸配列解析法を発表した[5]。

やや遅れて、大阪大学医学部において家族性の貧血や多血症など遺伝性の血液疾患の臨床においてその病因を特定する必要から血色素の構成タンパク分子であるグロビンの二次元マッピングを行っていた私は、MS によってアミノ酸置換を同定するとともに、その構造変異の種類や部位を決定することをめざして松尾らと 1979 年から共同研究を開始した。質量マッピングによる変異解析である。FD マススペクトルにおいてペプチドは1価あるいは2価のプロトン付加分子 $[M+H]^+$ が検出される。このようにしてヒト血色素を酵素で加水分解して得られるペプチド混合物を質量によって記述するペプチドマップを作成した[6]。鎌状赤血球血色素などアミノ酸置換がわかっているグロビンのペプチドマップでは変異のあるペプチドのみが計算通りの質量変化分だけシフトして検出された。アミノ酸置換などの一次構造変化の分析方法論としてはこれで完成であるが、実際に未知構造試料におけるアミノ酸置換を決定できてこそ有用性が証明されたことになる。また、従来法である電気泳動とクロマトグラフィーでは検出が難しい変異の構造を決定することはこの方法の真価を示すためには必須であったが、なかなか成果を挙げられなかった。

当時、英国ケンブリッジは血色素研究のメッカであり、Max Perutz (1962 年ノーベル化学賞) の構造機能関係 structure-function relationship に関する研究では、患者から得た構造異常血色素の酸素結合能 (正しくは、酸素親和性に関わるアロステリック効果 allosteric effect) が重要な研究資源であった。研究の基本情報としてのアミノ酸置換の同定が必須で、同大学の Hermann Lehmann は世界中から構造変異血色素 (異常ヘモグロビン) を集め、その構造を二次元マップにより決定していたが、中に構造決定できないまま残された血色素もあった。電気泳動で異常な挙動をする血色素が検出できず、グロビンの二次元マッピングに

においても構造変異を疑わせるペプチドを検出できなかったからである。私たちはそのうちのひとつをニュージーランド経由で入手し、トリプシン消化ペプチドの FD/MS を行ったが質量変化を示すシグナルを容易には見つけれなかった。これは、患者がヘテロ接合体 heterozygote であるために正常血色素と変異血色素が混在していることと、FD マススペクトルではペプチド以外に由来するシグナルやイオン源内での放電等によるノイズが混在するために対照となるべき健常者からの試料でさえ測定毎に異なるマススペクトルを与えるというふたつの理由のためであった。FD エミッターを当時大学院生であった桜井達が作り、交久瀬五雄と3人で測定を数ヶ月にわたって繰り返すうち、再現性よく検出される異常ピークがあることに気づいた。(図1)。測定分解能はわずか300程度であったが、健常者にもみられる m/z 1274 から計算すれば異常シグナルは m/z 1278 であることがわかった。 β グロビン全長146残基のうち点変異によってこの質量を与え、かつ、荷電変化を伴わないアミノ酸置換の組み合わせは、P36T (36Pro $\rightarrow$ Thr) と G136W のみであった。しかし、後者の変異には遺伝子に2塩基置換が必要であることから答えは前者であると推測できた。 m/z 1274 は変異を持たないペプチドのプロトン付加分子イオンである。最終的にはキモトリプシンによる質量マップによって P36T を決定(確認)し、1982年の第9回国際質量分析会議(ウィーン)で発表した[7]。

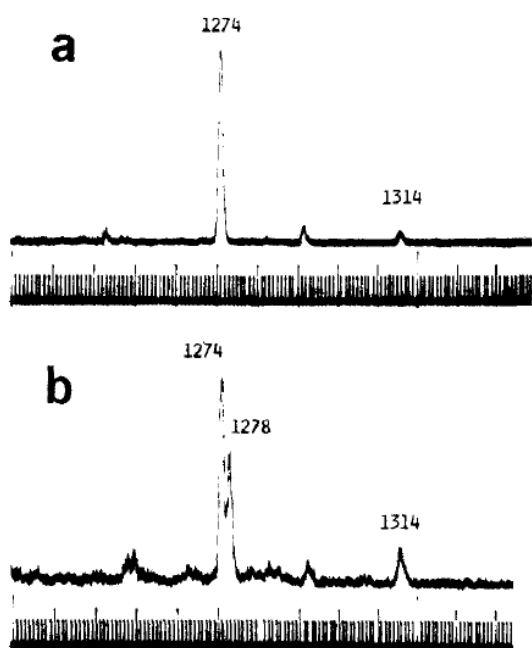


図1 MSによる構造変異タンパク質の解析(世界初)

健常者(a)と多血症患者(b)のFDマススペクトルにおいて、患者では健常者にもみられる m/z 1274 の横にシグナルがある。分解能300程度であったが、それらの質量差4Daは明確であった。

(Mass Spectrom Rev 8: 379, 1989より転載)

その後、高速原子衝突Fast atom bombardment (FAB)イオン化法¹が登場し、再現性の良好なマススペクトルを得ることができるようになって、次々と新しいアミノ酸置換を決定し[8]、そこで用いた酵素の組み合わせや測定質量からの構造決定を類型化してMSによるアミノ酸置換の同定法としてまとめた[9]。その頃には、欧州でもこの手法による異常血色素の構造解析が報告されるようになった[10,11,12]。著者らは8万人の新生児における血色素構造異

¹ 私たちはCsイオンビームを用いたので液体二次イオン質量分析法 Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry (Liquid SIMS あるいは Molecular SIMS)と呼んでいたが、原理的にも得られるマススペクトルにおいてもArやXe原子ビームを用いるFABと同一である

常を調査し、胎児型血色素を構成する γ グロビンにおける構造変異を 55 名について短期間に決定し[13]、MSによる本手法の高効率を証明した。その後、1988 年に大阪大学教養部に完成した大型質量分析計GEMMYによって分解能 5,000 をこえる測定が可能になり、分子量 2,000 以上のペプチドにおける 1 Daの質量変化を確実に検出できるようになってこの手法の信頼度が高まった[14]。また、マサチューセッツ工科大学MITのKlaus Bieman教授と高エネルギーCIDによる配列解析を用いた構造決定の共同研究を行った[15]。さらに、血色素以外では家族性アミロイドポリニューロパチーの原因となるトランスサイレチン変異同定を行った[16]。

このようにして、MS によればアミノ酸置換の部位、加えて多くの場合アミノ酸置換の種類も決定できることを明らかにした[9]。この手法は遺伝子解析が容易になった現在でも、血色素のようにタンパク質試料を比較的豊富に得られる場合には有効かつ実用的である。

アミノ酸置換の検出と測定分解能

ヒトのタンパク質を構成する基本アミノ酸は 20 種類であるから、アミノ酸置換には 190 種類の組み合わせが存在する (図 2)。実際に存在するアミノ酸置換はほぼすべてアミノ酸をコードする 3 塩基コドンのうちの 1 塩基の置換で起こり、そのようなアミノ酸置換は 75 種類 (図 2 の B 群) である。そのうちの 21 種類 (図 2 の F 群) については、例えば Asp→Glu や Gly→Ala がいずれも C1H2 (14.0157 Da) の変化であることでわかるように、質量変化量を精密かつ正確に決定しても一義的 (ユニーク) にアミノ酸置換の種類を決定することはできない。残りの 54 種類のうち Ile と Leu は質量が同じであるためそれらの間のアミノ酸置換は質量変化を伴わない (図 2 の C 群)。それ以外の 53 種類については質量変化量を計測することでアミノ酸置換の種類を特定できる (図 2 の G 群)。53 種類のうち 25 種類は整数質量においてユニークである (図 2 の D 群)。例えば 3 Da の質量増加を 1 塩基置換によって起こすのは Lys→Met のみであり、整数質量差を決定すれば最有力アミノ酸置換が一義的に決まる。残りの 28 種類については質量変化を正確かつ精密に計測すればユニークにアミノ酸置換の種類を決定できる (図 2 の E 群)。

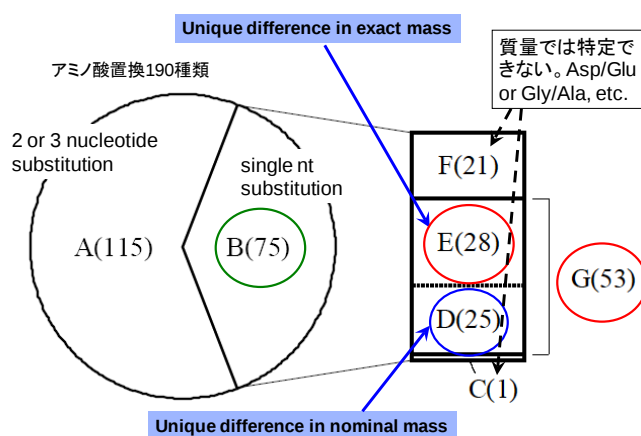


図 2 質量変化量からみたアミノ酸置換の分類

具体例を図3に示す。このマスペクトルでアミノ酸変異をもつペプチド(mutant)と健常ペプチド(wild)の質量差は 26.0045 ± 0.0029 (mean $\pm$ SD) Daである。整数質量 26 Daの変化を起こすアミノ酸置換は5種類、うち1塩基置換によるものはHis→TyrとAla→Proで、質量変化量は前者が+ 26.0044 Da、後者が+24.0157 Daであることからアミノ酸置換は統計的に前者と判断できる [(99%信頼区間) 26.004094–26.004686] [17]。²

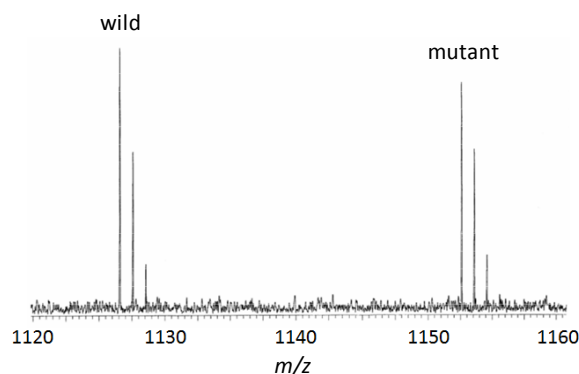


図3 フーリエ変換イオンサイクロトロンマスペクトル

分解能約 20 万のこのスペクトルでは2つのペプチドの質量差が 26.0045 ± 0.0029 と計算された。

では、本法にはどれだけの分解能が必要であろうか？ 質量変化量からユニークにアミノ酸置換の種類を決定できる 28 種類のうちで最小の質量変化を伴うのは Gln→Lys による 0.0364 Da であるが、トリプシン消化によって通常得られる 1,000-2,000 Da 程度のペプチドにおけるこの質量差は約 20 万程度の高分解能があれば確実に検出できる。その程度の分解能があれば、異なるアミノ酸置換同士で最小の質量差である Glu-Val ($\Delta 29.9743$ Da)と Trp-Arg ($\Delta 29.9782$ Da)の違い $\Delta 0.0040$ Da を識別することも可能である。

私たちはMSによるペプチド測定で行うタンパク質構造変異解析について先鞭をつけたが、ペプチドに分解せずタンパク質をそのままエレクトロスプレーイオン化法 electrospray ionization (ESI)によって測定することで構造変異を検出することについては Green らが 1990 年に発表した[18]。この場合、MS によってヘテロ接合体の構造変異タンパク質を検出できるかどうかは試料となるタンパク質の質量と分解能に依存する[19]。

遺伝子の MS

1997 年から 1999 年にかけて遺伝子に対して同じ手法を適用した。ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction (PCR)によってコピーを増幅した DNA をマトリックスレーザー脱離イオン化質量分析法 matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS で分析した。増幅された DNA は互いに非共有結合でペアとなった 2 本鎖であるが、MALDI MS の正イオン検出によって各鎖のプロトン化分子あるいはカチオン化分子を検出することで、DNA の各鎖の分別測定のためのプライマー修飾[20]、塩基置換と塩基欠失の同定[21]、制限酵素断片サイズ測定(DNA の restriction fragment length polymorphism: RFLP に相当) [22]、トリプレット反復数の算出法[23]を発表した。それらのいくつかは世界初であった。

² 本来、測定質量にはこのような統計学的記述が必要であろう

先天性グリコシル化異常症 CDG

単糖がグリコシル結合で直鎖状につながったポリマーを糖鎖(oligosaccharide あるいは glycan)という。この糖鎖が酵素的にタンパク質側鎖と共有結合するのが糖鎖付加修飾 glycosylation である。糖鎖付加修飾のうちアスパラギン結合型糖鎖(N型糖鎖とも呼ばれる)は、小胞体において膜にアンカーしたドリコール脂質上に合成された糖鎖が、リボソームによる合成直後のタンパク質に対して一括転移することで始まる。このようにしてできた糖タンパク質はゴルジ体において糖鎖末端(非還元末端)からの糖鎖脱離や糖鎖末端への糖付加(これらを糖鎖プロセッシングと呼ぶ)によって成熟した糖鎖をもつ糖タンパク質となる。

糖鎖の分解酵素の障害で起こる疾患は古くから知られていたのに対し、糖鎖合成異常疾患はほとんど知られていなかったが、1980年代に入り、精神運動発達遅滞の他、骨格異常や肝機能異常、血液凝固因子の低下など多彩な症状をもつ患者の血清トランスフェリンの等電点がアルカリ側にシフトした電気泳動像を示す症例が欧州で報告され、この変化はトランスフェリンに付加する糖鎖の異常によると推定されていた。1991年、私が勤務する医療機関でこの報告と似た症状をもつ兄妹例が見つかり電気泳動において報告に類似した変化があった。トランスフェリンの糖鎖構造を明らかにするため、定法に従ってトランスフェリンから糖鎖を遊離し還元末端を蛍光ラベルして高速液体クロマトグラフィーで解析するなど半年余り生化学的な分析を続けたが、糖鎖には構造異常を検出できなかった。著者はこれに先立つ同年2月に、松尾の助言により米国ボストン近郊のJEOL-USA(当時、田村淳、Robert Cody、Brian Musselmanらが在籍)を訪問し、磁場型質量分析計に装着されたESイオン源(当時、わが国では自作以外のESイオン源はなかった)によるグロビンやトランスフェリン等のESI/MSを知ることができた[24]。同年夏に著者の所属機関に設置された二重収束質量分析計SX-102(JEOL)によって患者のトランスフェリンを測定したところ、健常者にはないピークが観測され、健常者のトランスフェリンとの質量差はN型糖鎖1本分の欠失に相当する約2,200Da(正確には2,204 Da)と計算された[25]。このことは糖鎖異常が糖鎖生合成の初期過程でおこっていることを意味していた。トランスフェリンには2カ所にN型糖鎖が付加する。患者のトランスフェリンには健常者と同じ2本の糖鎖を持つ分子と、1本あるいは2本とも欠損した分子が混在しているが、残存する糖鎖は構造的に異常がないため、それまで著者を含め多くの研究者が追究していた糖鎖を遊離して行う糖鎖構造解析法では解決できなかったのである³。

この発見は先天性グリコシル化異常症(Congenital Disorders of Glycosylation; CDG)の分子病としての位置づけを明確にし、糖鎖生合成初期過程に限らない新しいタイプ(責任遺伝子)のCDGが多数発見されるきっかけになった。著者の知る限り、糖鎖修飾の異常をMSによって解析した世界最初である。

糖ペプチドを試料とするグライコプロテオミクス glycoproteomics

21世紀ポストゲノムの時代に入って翻訳後修飾への関心が高まり、糖鎖修飾に注目が集ま

³ 患者にも健常者と同じ2本の糖鎖をもつ正常分子が存在している。糖鎖付加が全く起こらなければ胎生致死である

っている。糖タンパク質における糖鎖修飾の種類を表 1 に示す。

表 1	糖タンパク質糖鎖の種類とタンパク質への結合構造
	N 結合型
	-GlcNAc β -N-Asn
	O 結合型
	-GalNAc α -O-Ser/Thr (ムチン型)
	-Xyl β -O-Ser (プロテオグリカン)
	-Gal β -O-hydroxylysine (コラーゲンなど)
	GlcNAc β -O-Ser/Thr
	-Man α -O-Ser/Thr (ジストログリカンなど)
	Fuc α -O-Ser/Thr (凝固因子など)
	C 結合型
	Man-C-C-Trp (補体など)

糖鎖はタンパク質の特定箇所に結合し、同じ結合部位に付加した糖鎖にも構造多様性がある。これを糖鎖の **microheterogeneity** と呼ぶ。いくつかの特定の糖鎖構造に特有の機能が見出されていることから、糖鎖分析には糖鎖の種類（構造）と各構造の存在比を出すことが要求される。構造とその存在比をあわせて糖鎖プロファイルという。従来の糖鎖分析ではタンパク質から遊離した糖鎖の還元末端を標識（蛍光標識など）し、クロマトグラフィーで各構造を分離してその吸光度や蛍光強度によって定量し糖鎖プロファイルを得ていた。一方、MS でもイオン化に適した標識を利用する等で高感度に糖鎖分析が可能になったが、MS による定量（糖鎖プロファイル）は「半定量 **semi-quantitation**」と呼ばれ、その信頼性に疑問符が付けられていた。そこで、著者らは国際組織であるヒトプロテオーム機構 **HUPO (Human Proteome Organisation)**の活動として糖鎖定量に関する国際共同研究を行い、N 型糖鎖および O 型糖鎖については、酸性糖の存在など一定の条件を考慮すれば MS による定量は従来法であるクロマトグラフィーに比べ遜色ないことを証明した[26,27]。

タンパク質機能への糖鎖の関与を考える時、部位特異的な糖鎖プロファイルの取得が必要である。糖ペプチドを分析試料とすればタンパク質のどのアミノ酸にどのような糖鎖が付加しているかといった情報を一挙に取得できる。われわれはグライコプロテオミクス視点から糖ペプチドを試料とする糖鎖解析アプローチを行ってきた。それは上に述べた **CDG** による糖タンパク質のトップダウン解析がきっかけになっている。最近では糖鎖生物学の専門家からもグライコミクスを超えたグライコプロテオミクスの重要性が声高に叫ばれ、分析試料としての糖ペプチドに注目が集まるようになった。実は糖ペプチドを試料とする質量分析は **FAB** の時代にごく一部の研究者が行っていたが、ソフトイオン化の時代になっても普及する兆しはなかった。それは、ひとつには遊離糖鎖とペプチド（あるいはタンパク質）をともに分析する必要に迫られた研究者が極めて少なかったことにもよっている。一方、MS やクロマトグラフィーでは、糖鎖分析の感度を上げるために還元末端標識がさまざまに工夫され、まさに化学の勝利であるかのうように誇らしげに報告されているが、糖ペプチドから糖鎖を遊離して化学標識する際には標識・精製といった余分な操作が加わるのであるから結局のところ実効感度は必ずしも上がらないのである。一方、糖タンパク質や糖ペプチドの糖鎖はす

でタンパク質やペプチドによって還元末端が標識されているのだから、それによって糖鎖分析の感度はすでに上がっている。これにはペプチドの疎水性も貢献しているが、いずれにしても糖鎖を遊離することはせっきくの修飾を捨てているようなものである。

糖ペプチドを試料とする際の最大の問題は、糖タンパク質をトリプシンなど酵素消化して得られるペプチド混合物のなかで糖ペプチドがマイナー成分であるために糖ペプチドにフォーカスした分析が難しいことである。イオンサプレッションも問題となる（イオン化効率については後述する）。この点を解決するためにさまざまな濃縮法が開発されている。私は 50 年程前にペプチドと糖ペプチドを分離するのに濾紙クロマトグラフィーが使われていたことを参考にして、それと同じ原理でセルロースなど糖ポリマーを固定相とする糖ペプチド濃縮法を開発した[28]。これは簡便で極めて安価に実施できるので糖ペプチドの MS を容易にした。実際、巨大分子であるフィブロネクチンやアポリポタンパク質 B100 における多数の糖鎖付加部位について糖鎖プロファイルを明らかにし、この方法の実用性・効率性を証明した[29]。

成果の社会還元

糖タンパク質糖鎖合成の初期障害では糖タンパク質に糖鎖欠損が起こることは先に述べた。そのような分子を見つけるには糖タンパク質分子全体の MS を行えばよい。分子量 8 万のタンパク質における 2,200 Da の変化は 2.75% の変化に相当するから、検出に高い分解能は不要であり、MALDI 法のリニア TOFMS によって高スループット分析ができる[30]。一方、糖鎖合成後期にあたる糖鎖プロセッシングの障害が原因の CDG では健常者には見られない構造の糖鎖が出現する。それを検出・解析するには糖鎖構造を詳細に観測できる分析が必要である。糖ペプチドの MS はそのことを可能にした。そして、2005 年から原因不明の精神運動発達遅滞患者に対する分子診断支援活動を開始した。研究成果の社会還元である。2012 年からは次に述べる O 型糖鎖解析を加えて分析の幅を広げ、2013 年 6 月末までに 900 名余りを検査し、9 名の CDG 患者を診断した。すなわち、わが国の原因不明の精神運動発達遅滞患者の約 1 % が本症であることがわかった。

超簡便な O 型糖鎖解析法

血清を 0.1% トリフルオロ酢酸 50 μL に血清を 1 μL 添加して 5 分間攪拌し、そのまま脱塩した試料の MALDI マススペクトルのうち m/z 8700-10000 領域を図 4 に示す。ここにアポリポタンパク質 C-III (apoC3) の糖鎖構造の違いに基づくアイソフォーム分子がすべて観測できる。apoC3 は主として肝臓で合成されるので、肝臓由来のタンパク質に付加するムチン型 (O 型) 糖鎖の解析はこれでできてしまう。以前、MALDI の一種である Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) が血清を試料とする大胆なバイオマーカー探しに使われていた。この質量域にこれらのイオンを観測していた者は多いはずだが、糖鎖解析への利用を思いついた者はいなかったようである。

糖ペプチドの MS に関する常識のまちがい

糖ペプチドはペプチドに比べて検出感度が低いと信じられている。根拠なくそのように語

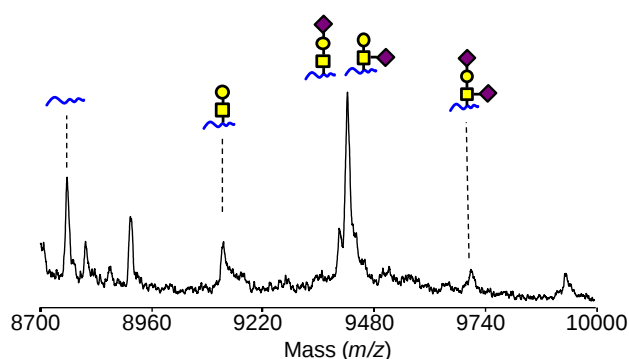


図4 血清タンパク質の MALDI マススペクトル

これはARCL2という骨格異常を来す疾患患者血清のマススペクトルである。 m/z 8764はO型糖鎖を持たない apoC3 であるが、健常者ではこのピークはずっと小さい。つまり、本症ではO型糖鎖付加率が減少している。

る者が多く、大抵の研究者がそう信じている。結論から言うと、それはほぼ間違いであり、酸性糖が含まれないなど一定の条件がそろえば、同じペプチド骨格をもつ糖ペプチドはペプチドと同じ数のイオンを生成し検出器に到達する[31]。図5のマススペクトルがこのことを証明している。ペプチド骨格が小さければ糖ペプチドとペプチドでは質量差が大きくなって質量差による検出器応答と同位体分布が原因でマススペクトル上の糖ペプチドピークは見かけ上小さい。さらに、糖鎖にはミクロ不均一性があるために、ペプチド骨格が同じであっても異なる糖鎖構造をもつ分子は異なる質量をもつために、マススペクトル上に分散して検出されるので小さく見えるのである。

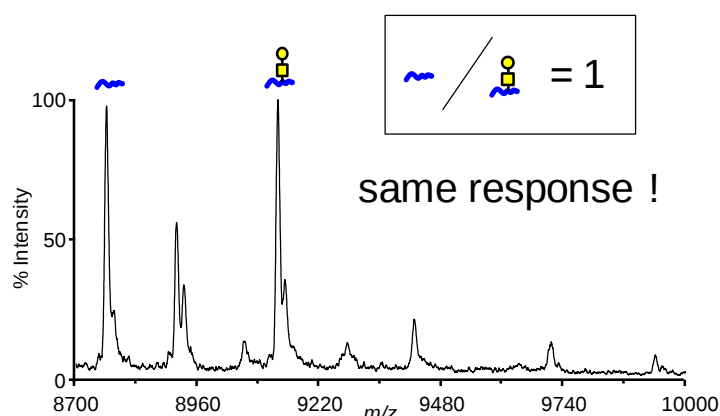


図5 ペプチドと糖ペプチドの等モル混合物（いずれも apoC3）の MALDI マススペクトル

両者（ m/z 8764 と m/z 9130）が同じ強度で観測される。

異分野に入ることの難しさ

MSの世界では研究者は質量というわかりやすい言語で会話する。MSを単なるツールとしてでなく、それを発展させることに喜びを感じる者達は、Vestalが言う inventor, innovator, user のうちの前2者である[32]。inventor は装置やイオン化を造る人たちであり、innovator はMSの応用を新たに創出し、またそのアイデアを inventor にフィードバックする人たちである。日本において前2者はマイノリティであり、MSがこれほど普及しても user だけが増えた。user の多くは自らをMSの専門家と思っているし、MS以外の分野ではそのように振る舞い、また、そのように見られている。user は高性能の新規装置を次々と購入するが、装置に使われているようなもので、MSをさらに発展させるアイデアを提出することはない。いや、提出した時点で innovator になるが、そのような者は非常に少ない。わが国の inventor,

innovator 達は概ね欲深くない。自らの業績を誇らず、またそれを誇張して語ろうとしない。その結果、年々市場に投入される最新鋭の質量分析計を自らの力で備える財力はなく出世もそこそこである。守るべき虚構がないから他者に寛容で、新参者に対しても優しい。日本質量分析学会は概ねそのような人たちの集まりである。user は入会してもいずれ退会してゆく。そして、日本質量分析学会の会員数は 1,000 人程度で、MS の普及によっても期待したほどは増加していない。学会の運営も極めて真面目で民主的である。

私は医学部出身者として MS の世界に入ったが、日本質量分析学会では常に友情をもって接して頂いた。そして、何故か私が IMSC 招致の先頭に立つことになった。誰かが善意をもって仕組んだのだろう。すると何故かアジアの人々や「IMSC イコール欧州」という伝統を守るはずのひとたちからも後押しを得て招致に成功した。先人達の国際的な交誼のお陰である。その後、会長を 2 期 4 年間つとめた。会長としても IMSC 組織委員長としても頼りないと自覚していたが、支えてくれる人たちが適材適所に現れ、その人たちが立派にやり遂げてくれた。感謝の言葉もない。

上で糖鎖解析における MS の地位向上のことを書いた。MS による定量に関して根拠ない差別にも似た抵抗はようやく無くなったようである。一方、MS が懸命に進めようとしている構造生物学では、(少なくともわが国では) 異端児扱いと聞く。異なる方法論を受け入れようとせず、MS によって何かを奪われると思っているのであろうか？ 気相という特殊世界で分析を行うことに懸念があるにしても、構造生物学の専門家がほとんど MS に入り込んで来ないのは何故なのか？ このような状況は世代が変わらないと改善しないのか？ このような現象は、MS の進歩が他の分析法に比べて圧倒的に早いからなのだろうか？

引用文献

- [1] L. Pauling, H.A. Itano, et al., Sickle cell anemia a molecular disease, **Science** 110:543-548 (1949)
- [2] H.D. Beckey, Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility, **Int J Mass Spectrom Ion Phys** 2:500-502 (1969)
- [3] H.U. Winkler, H.D. Beckey, Field desorption mass spectrometry of peptides, **Biochem Biophys Res Commun** 46:391-398 (1972)
- [4] T. Matsuo, H. Matsuda, I. Katakuse, Silicon emitter for field desorption mass spectrometry, **Anal Chem** 51:69-72 (1979)
- [5] Y. Shimonishi, Y.M. Hong, T. Kitagishi, T. Matsuo, H. Matsuda, I. Katakuse, Sequencing of peptide mixtures by Edman degradation and field-desorption mass spectrometry, **Eur J Biochem** 112:251-264 (1980)
- [6] Y. Wada, A. Hayashi, T. Fujita, T. Matsuo, I. Katakuse, H. Matsuda, Structural analysis of human hemoglobin variants with field desorption mass spectrometry, **Biochim Biophys Acta** 667:233-241 (1981)
- [7] Y. Wada, A. Hayashi, T. Fujita, T. Matsuo, I. Katakuse, H. Matsuda, Structural analysis of human hemoglobin variants by mass spectrometry, **Int J Mass Spectrom Ion Phys** 48:209-212 (1983)
- [8] Y. Wada, A. Hayashi, F. Masanori, I. Katakuse, T. Ichihara, H. Nakabushi, T. Matsuo, T. Sakurai, H. Matsuda, Characterization of a new fetal hemoglobin variant, Hb F Izumi A gamma 6Glu replaced by Gly, by molecular secondary ion mass spectrometry, **Biochim**

- Biophys Acta** 749:244-248 (1983)
- [9] Y. Wada, T. Matsuo, T. Sakurai, Structure elucidation of hemoglobin variants and other proteins by digit-printing method, **Mass Spectrom Rev** 8:379-434 (1989)
 - [10] P. Pucci, C. Carestia, G. Fioretti, A.M. Mastrobuoni, L. Pagano, Protein fingerprint by fast atom bombardment mass spectrometry: characterization of normal and variant human haemoglobins, **Biochem Biophys Res Commun** 130:84-90 (1985)
 - [11] S. Rahbar, T.D. Lee, J.A. Baker, L.T. Rabinowitz, Y. Asmerom, K. Legesse, H.M. Ranney, Reverse phase high-performance liquid chromatography and secondary ion mass spectrometry. A strategy for identification of ten human hemoglobin variants, **Hemoglobin** 10:379-400 (1986)
 - [12] D. Prome, J.C. Prome, F. Prathernou, Y. Blouquit, F. Galacteros, C. Lacombe, J. Rosa, J.D. Robinson, Identification of some abnormal haemoglobins by fast atom bombardment mass spectrometry and fast atom bombardment tandem mass spectrometry, **Biomed Environ Mass Spectrom** 16:41-44 (1988)
 - [13] Y. Wada, T. Fujita, K. Kidoguchi, A. Hayashi, Fetal hemoglobin variants in 80,000 Japanese neonates: high prevalence of Hb F Yamaguchi (A gamma T 80 Asp->Asn), **Hum Genet** 72:196-202 (1986)
 - [14] Y. Wada, T. Fujita, A. Hayashi, T. Sakurai, T. Matsuo, Structural analysis of protein variants by mass spectrometry: Characterization of haemoglobin providence using a grand-scale mass spectrometer, **Biol Mass Spectrom** 18:563-565 (1989)
 - [15] Y. Wada, T. Matsuo, I.A. Papayannopoulos, C.E. Costello, K. Biemann, Fast atom bombardment and tandem mass spectrometry for the characterization of hemoglobin variants including a new variant, **Int J Mass Spectrom Ion Processes** 122:219-229 (1992)
 - [16] Y. Wada, T. Matsuo, I. Katakuse, T. Suzuki, T. Azuma, S. Tsujino, S. Kishimoto, H. Matsuda, A. Hayashi, Mass spectrometric detection of the plasma prealbumin (transthyretin) variant associated with familial amyloidotic polyneuropathy, **Biochim Biophys Acta** 873:316-319 (1986)
 - [17] K. Tanaka, S. Takenaka, S. Tsuyama, Y. Wada, Determination of unique amino acid substitutions in protein variants by peptide mass mapping with FT-ICR MS, **J Am Soc Mass Spectrom** 17:508-513 (2006)
 - [18] B. Green, R. Oliver, A. Falick, C. Shackleton, E. Roitmann, H. Witkowska, Electrospray MS, LSIMS, and MS/MS for the rapid detection and characterization of variant hemoglobins, Elsevier, Amsterdam, 1990, pp. 129-146.
 - [19] Y. Wada, Mass spectrometry in the integrated strategy for the structural analysis of protein variants, **Biol Mass Spectrom** 21:617-624 (1992)
 - [20] Y. Wada, Molecular mass tagging to one strand of polymerase chain reaction products, **J Mass Spectrom** 32:124-125 (1997)
 - [21] Y. Wada, M. Yamamoto, Detection of single-nucleotide mutations including substitutions and deletions by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, **Rapid Commun Mass Spectrom** 11:1657-1660 (1997)
 - [22] Y. Wada, Separate analysis of complementary strands of restriction enzyme-digested DNA. An application of restriction fragment mass mapping by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, **J Mass Spectrom** 33:187-192 (1998)
 - [23] Y. Wada, K. Mitsumori, T. Terachi, O. Ogawa, Measurement of polymorphic trinucleotide repeats in the androgen receptor gene by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, **J Mass Spectrom** 34:885-888 (1999)
 - [24] Y. Wada, J. Tamura, B.D. Musselman, D.B. Kassel, T. Sakurai, T. Matsuo, Electrospray ionization mass spectra of hemoglobin and transferrin by a magnetic sector mass spectrometer. Comparison with theoretical isotopic distributions, **Rapid Commun Mass**

Spectrom 6:9-13 (1992)

- [25] Y. Wada, A. Nishikawa, N. Okamoto, K. Inui, H. Tsukamoto, S. Okada, N. Taniguchi, Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome, **Biochem Biophys Res Commun** 189:832-836 (1992)
- [26] Y. Wada, P. Azadi, C.E. Costello, A. Dell, R.A. Dwek, H. Geyer, R. Geyer, K. Kakehi, N.G. Karlsson, K. Kato, N. Kawasaki, K.H. Khoo, S. Kim, A. Kondo, E. Lattova, Y. Mechref, E. Miyoshi, K. Nakamura, H. Narimatsu, M.V. Novotny, N.H. Packer, H. Perreault, J. Peter-Katalinic, G. Pohlentz, V.N. Reinhold, P.M. Rudd, A. Suzuki, N. Taniguchi, Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study, **Glycobiology** 17:411-422 (2007)
- [27] Y. Wada, A. Dell, S.M. Haslam, B. Tissot, K. Canis, P. Azadi, M. Backstrom, C.E. Costello, G.C. Hansson, Y. Hiki, M. Ishihara, H. Ito, K. Kakehi, N. Karlsson, C.E. Hayes, K. Kato, N. Kawasaki, K.H. Khoo, K. Kobayashi, D. Kolarich, A. Kondo, C. Lebrilla, M. Nakano, H. Narimatsu, J. Novak, M.V. Novotny, E. Ohno, N.H. Packer, E. Palaima, M.B. Renfrow, M. Tajiri, K.A. Thomsson, H. Yagi, S.Y. Yu, N. Taniguchi, Comparison of methods for profiling O-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1, **Mol Cell Proteomics** 9:719-727 (2010)
- [28] Y. Wada, M. Tajiri, S. Yoshida, Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics, **Anal Chem** 76:6560-6565 (2004)
- [29] M. Tajiri, S. Yoshida, Y. Wada, Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment, **Glycobiology** 15:1332-1340 (2005)
- [30] Y. Wada, J. Gu, N. Okamoto, K. Inui, Diagnosis of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, **Biol Mass Spectrom** 23:108-109 (1994)
- [31] Y. Wada, Label-Free Analysis of O-glycosylation Site-Occupancy Based on the Signal Intensity of Glycopeptide/Peptide Ions, **Mass Spectrometry** 1:A0008-A0008 (2012)
- [32] M.L. Vestal, The future of biological mass spectrometry, **J Am Soc Mass Spectrom** 22:953-959 (2011)

第19回国際質量分析会議 (IMSC)へのご参加・ご協力をありがとうございました<IMSC2012組織委員会>

参加者数:1,819(海外976)
参加国数:52
発表演題数:1,015

