

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6319716号

(P6319716)

(45) 発行日 平成30年5月9日(2018.5.9)

(24) 登録日 平成30年4月13日(2018.4.13)

(51) Int. Cl.	F 1		
<b>GO 1 N 27/62 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/62		V
	GO 1 N 27/62		D

請求項の数 17 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2013-171583 (P2013-171583)	(73) 特許権者	504157024 国立大学法人東北大学 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
(22) 出願日	平成25年8月21日(2013.8.21)	(73) 特許権者	000173924 公益財団法人野口研究所 東京都板橋区加賀一丁目9番7号
(65) 公開番号	特開2015-40757 (P2015-40757A)	(74) 代理人	110001243 特許業務法人 谷・阿部特許事務所
(43) 公開日	平成27年3月2日(2015.3.2)	(72) 発明者	高羽 洋充 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内
審査請求日	平成28年8月22日(2016.8.22)	(72) 発明者	天野 純子 東京都板橋区加賀一丁目8番1号 公益財 団法人野口研究所内
特許法第30条第2項適用 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (June 9-13, 2013) 開催		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 スペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

糖分子の各部位における脱プロトン化確率と、経験的なフラグメンテーションパターンとを用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測するステップと、

前記脱プロトン化確率と、前記予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、前記糖分子のMS<sup>+</sup>スペクトルを予測するステップとを含むことを特徴するスペクトル予測方法。

【請求項2】

前記糖分子の構造に関する情報を用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化のシミュレーションを行うことにより、前記糖分子の各部位における脱プロトン化確率を算出するステップを備え、前記フラグメント種を予測するステップは、前記算出された脱プロトン化確率を用いることを特徴とする請求項1に記載のスペクトル予測方法。

【請求項3】

前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の位置情報を含むことを特徴とする請求項2に記載のスペクトル予測方法。

【請求項4】

前記糖分子の構造に関する情報は、糖分子について実験的に観測されたMS<sup>+</sup>スペクトルの情報を含むことを特徴とする請求項2または3に記載のスペクトル予測方法。

10

20

**【請求項 5】**

前記脱プロトン化のシミュレーションは、前記糖分子の構造に関する情報に基づく理論計算を含むことを特徴とする請求項 2 ないし 4 のいずれかに記載のスペクトル予測方法。

**【請求項 6】**

前記理論計算は、量子計算を含むことを特徴とする請求項 5 に記載のスペクトル予測方法。

**【請求項 7】**

前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に関する物理量を含むことを特徴とする請求項 2 ないし 6 のいずれかに記載のスペクトル予測方法。

**【請求項 8】**

前記物理量は、前記糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の原子間相互作用エネルギーまたは構造安定化エネルギーを含むことを特徴とする請求項 7 に記載のスペクトル予測方法。

**【請求項 9】**

糖分子の各部位における脱プロトン化確率と、経験的なフラグメンテーションパターンとを用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測する手段と、

前記脱プロトン化確率と、前記予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、前記糖分子のMS<sup>+</sup>スペクトルを予測する手段とを含むことを特徴とするスペクトル予測装置。

**【請求項 10】**

前記糖分子の構造に関する情報を用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化のシミュレーションを行うことにより、前記糖分子の各部位における脱プロトン化確率を算出する手段を備え、前記フラグメント種を予測する手段は、前記算出された脱プロトン化確率を用いることを特徴とする請求項 9 に記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 11】**

前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の位置情報を含むことを特徴とする請求項 10 に記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 12】**

前記糖分子の構造に関する情報は、糖分子について実験的に観測されたMS<sup>+</sup>スペクトルの情報を含むことを特徴とする請求項 10 または 11 に記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 13】**

前記脱プロトン化のシミュレーションは、前記糖分子の構造に関する情報に基づく理論計算を含むことを特徴とする請求項 10 ないし 12 のいずれかに記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 14】**

前記理論計算は、量子計算を含むことを特徴とする請求項 13 に記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 15】**

前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に関する物理量を含むことを特徴とする請求項 10 ないし 14 のいずれかに記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 16】**

前記物理量は、前記糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の原子間相互作用エネルギーまたは構造安定化エネルギーを含むことを特徴とする請求項 15 に記載のスペクトル予測装置。

**【請求項 17】**

請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載のスペクトル予測方法をコンピュータに実行させるプログラム。

**【発明の詳細な説明】**

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、スペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラムに関し、より詳細には、質量分析において取得されるスペクトルを、計算により予測するスペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラムに関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

生体分子の構造を決定する質量分析の1つとして試料のイオン化法が知られている。MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)) - MS<sup>n</sup> (多段階質量分析(multiple stage Mass Spectrometry)) は、MS<sup>n</sup>スペクトルにおける特徴的なフラグメンテーションパターンから、タンパク質やオリゴ糖を含む様々なクラスの生体分子を特徴付ける上で不可欠な試料のイオン化法である。

10

## 【0003】

MALDI - MS<sup>n</sup>では、衝突誘起解離(Collision induced dissociation (CID))による糖分子のフラグメンテーションが分子中の化学結合の性質に依存することを利用し、CIDによる糖分子のフラグメンテーションを繰り返した結果として得られるMS<sup>n</sup>スペクトルを観測することにより、糖分子の異性体構造を識別することができる。

## 【0004】

MS<sup>n</sup>スペクトルによる分子構造の決定では、スペクトルの実測データに基づいて糖鎖構造の公開データベースを検索し、該当する構造を見つけ出す。該当するデータがない場合には、実測データのm/z値 (m=質量,z=電荷数) から組成を推定する。次いで、組成の組み合わせを推定して、組成の絞込みを行う。次いで、フラグメントデータベースに記録された情報を用いて、推定された組成のスペクトルを予測する。そして、予測されたスペクトルと、実測スペクトルとの一致性を判断することにより、構造を決定する。

20

## 【0005】

近年、組成の組み合わせからスペクトルを予測するための、種々の手法が研究されている。

## 【0006】

例えば、質量分析で糖鎖構造を解析する方法として、あらゆる種類の糖鎖を実際にフラグメント化することによりフラグメント化パターンを得て、これをデータとして蓄積し、蓄積されたフラグメント化パターンのデータと被検糖鎖のフラグメント化パターンとを比較して、糖鎖構造を予測する方法がある(例えば、特許文献1参照)。

30

## 【0007】

しかし、観測されたMS<sup>n</sup>スペクトルから糖分子の糖鎖構造を予測するためには、統計学的分析のような面倒で複雑な処理が必要である。そして、たとえ、MALDI - MS<sup>n</sup>の適用対象である糖分子の分子構造が既知であっても、既知の糖分子の分子構造からMS<sup>n</sup>スペクトルを予測することは困難である。

## 【0008】

このようなMS<sup>n</sup>スペクトルの予測の困難性を解消する方法として、糖分子のフラグメンテーションのシミュレーションにおいて、所与の糖分子に含まれる化学結合の切断確率を用いることによって、所与の糖分子のMS<sup>n</sup>スペクトルを予測する方法が提案されている(特許文献2)。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0009】

【特許文献1】国際公開第WO2006/112343号公開パンフレット

【特許文献2】特開2011-220733号公報

## 【非特許文献】

## 【0010】

【非特許文献1】Harvey DJ. " Fragmentation of negative ions from carbohydrates:

50

part 2. Fragmentation of high mannose N linked glycans ", J Am Soc Mass Spectrom  
. 2005 May;16(5):631-46

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、所与の糖分子に含まれる化学結合の切断確率を用いてMS<sup>s</sup>スペクトルを予測する従来の方法は、計算が複雑であり、また切断確率を精度よく求めることが難しいという問題があった。

【0012】

本発明はこのような問題に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、簡易な計算により、精度よくMS<sup>s</sup>スペクトルを予測するスペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラムを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者は、所与の糖分子のフラグメンテーションのシミュレーションにおいて、所与の糖分子に含まれる水酸基またはアミノ基の脱プロトン確率と経験的フラグメンテーションパターンとを用いることによって、所与の糖分子のMS<sup>s</sup>スペクトルを精度良く予測できることを見いだした。そして、この知見により、所与の糖分子のMS<sup>s</sup>スペクトルを予測するためのスペクトル予測方法、スペクトル予測装置、およびプログラムを完成させた。

【0014】

すなわち、本発明では、データベースや切断確率からMS<sup>s</sup>スペクトルを予測するのではなく、糖分子の脱プロトン化確率に基づいて、MS<sup>s</sup>スペクトルを予測する。

【0015】

本発明に係るスペクトル予測方法は、糖分子の各部位における脱プロトン化確率と、経験的なフラグメンテーションパターンとを用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測するステップと、前記脱プロトン化確率と、前記予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、前記糖分子のMS<sup>s</sup>スペクトルを予測するステップとを含む。

【0016】

ここで、前記糖分子の構造に関する情報を用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化のシミュレーションを行うことにより、前記糖分子の各部位における脱プロトン化確率を算出するステップを備え、前記フラグメント種を予測するステップは、前記算出された脱プロトン化確率を用いるものとすることができる。

【0017】

ここで、前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の位置情報を含むものとすることができる。

【0018】

また、前記糖分子の構造に関する情報は、糖分子について実験的に観測されたMS<sup>s</sup>スペクトルの情報を含むものとすることができる。

【0019】

また、前記脱プロトン化のシミュレーションは、前記糖分子の構造に関する情報に基づく理論計算を含むものとすることができる。

【0020】

ここで、前記理論計算は、量子計算を含むものとすることができる。

【0021】

また、前記糖分子の構造に関する情報は、前記糖分子に関する物理量を含むものとすることができる。

【0022】

また、前記物理量は、前記糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の原子間相互作用エネルギーまたは構造安定化エネルギーを含むものとすることができる。

## 【0023】

本発明の別の態様によれば、本発明に係るスペクトル予測装置は、糖分子の各部位における脱プロトン化確率と、経験的なフラグメンテーションパターンとを用いて、前記糖分子の各部位における脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測する手段と、前記脱プロトン化確率と、前記予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、前記糖分子のMS<sup>+</sup>スペクトルを予測する手段とを含む。

## 【0024】

本発明の他の態様によれば、本発明に係るプログラムは、上記のスペクトル予測方法をコンピュータに実行させる。

## 【発明の効果】

10

## 【0025】

本発明によれば、所与の糖分子の分子構造から、簡易な計算方法で精度よくMS<sup>+</sup>スペクトルを予測することが可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0026】

【図1】所与の分子構造からスペクトルを予測する基本原理について説明する図である。

【図2】フラグメントの生成パターンに関する経験則の一例を示す図である。

【図3】本発明の一実施形態に係るスペクトル予測装置の構成を示すブロック図である。

【図4】本発明の一実施形態に係る糖鎖構造の例を概略的に示す図である。

【図5】本発明の一実施形態に係るフラグメント種の予測シミュレーション結果を示す図である。

20

【図6】本発明の一実施形態に係るスペクトル予測装置が実行する処理のフローチャートを示す。

【図7】本発明の一実施形態に係るGUIを示す図である。

【図8】Laminaripentaose PBHの構造最適化計算を行った後の糖鎖構造を示す図である。

【図9】Laminaripentaose PBHの構造最適化計算を行った後の糖鎖構造を示す図である。

【図10】本発明の第1実施例によるフラグメント種の予測シミュレーションの計算結果を示す図である。

【図11】Laminaripentaose PBHに対して脱プロトン化をシミュレートした場合の糖鎖構造を示す。

30

【図12】(a)はLaminaripentaose PBHのMS<sup>+</sup>スペクトルの実験値を、(b)は本発明の第1実施例により予測されたMS<sup>+</sup>スペクトルの予測結果を示す。

【図13】AHSGの糖鎖構造を示す図であり、(a)は各ユニットを記号化した図、(b)は各ユニットを名称で示した図である。

【図14】本発明の第2実施例による計算結果を示す。

【図15】(a)MS<sup>+</sup>スペクトルの実験値を、(b)は本発明の第2実施例により予測されたMS<sup>+</sup>スペクトルの予測結果を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0027】

以下、図面を参照して、本発明に係る実施形態を説明する。

40

## 【0028】

図1を参照し、MALDI-MS<sup>+</sup>において所与の分子構造からスペクトルを予測する基本原理について説明する。試料に紫外レーザーを照射した場合、物理現象としては、ユニット中の水酸基またはアミノ基において脱プロトン化が起こり、次いで、脱プロトン化された位置の電子が移動して、より安定化した構造に変化する。この電子移動の際に結合の一部が切断されてイオンが生成される。このようにして生成されたイオンをフラグメントと呼ぶ。

## 【0029】

従来のスペクトル予測においては、切断される部位ごとに、脱プロトン化 電子移動 結合切断 フラグメント生成というプロセスに対応して、脱プロトン化、結合切断、およ

50

び電子移動という3つの工程の各々の確率を推定していた。

【0030】

ここで、電子移動 結合切断 フラグメント生成という一連の工程には、脱プロトン化される部位に応じて一定のパターンが存在する。すなわち、決定されたフラグメントの生成パターンにより、脱プロトン化されるユニットの部位と、生成されるフラグメント種とが対応付けられる。そこで、本発明では、脱プロトン化確率を推定する一方、電子移動 結合切断 フラグメント生成という工程については、経験則に基づいてフラグメントの生成パターンを決定する。脱プロトン化確率とは、糖分子の分子構造内の所定の位置で脱プロトン化が発生する確率を表す。

【0031】

図2は、フラグメントの生成パターンに関する経験則の一例を示す図である（非特許文献1参照）。同図に示す例では、アミノ基（ $-NHCH_3$ の $-NH$ ）で脱プロトン化が発生する。次いで、電子が移動してより安定な化学構造に変化する際に、グリコシド結合（ $R-O-R_1$ ）が切断され、 $R_1-O^-$ イオン（Yイオン）が生成される。したがって、同図のNの位置における脱プロトン化に対し、生成されるフラグメント種として $R_1-O^-$ イオンが対応付けられる。

【0032】

このようなフラグメントの生成パターンは、論文情報、測定データの解析結果等により知られているものに基づいて定義することができる。このフラグメントの生成パターンは、フラグメント予測装置に予め複数記憶される。

【0033】

次に、図3を参照し、本実施形態に係るスペクトル予測装置の構成について説明する。

【0034】

本実施形態では、スペクトル予測装置400が、脱プロトン化確率というパラメータを用いて、後述する図6に示す処理を実行することにより、所与の糖分子の分子構造からMS<sup>s</sup>スペクトルを予測する。

【0035】

CPU402は、記憶部408からプログラムを読み出して実行する。

【0036】

ここで実行されるプログラムは、脱プロトン化シミュレーションプログラム、フラグメント予測プログラム、およびスペクトル予測プログラムを含む。

【0037】

脱プロトン化シミュレーションプログラムは、糖鎖構造データを用いて糖分子における脱プロトン化のシミュレーションを行うことにより、脱プロトン化確率を算出するためのプログラムである。

【0038】

フラグメント予測プログラムは、糖鎖構造データとフラグメンテーションパターンとを用いて、脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測するためのプログラムである。具体的には、フラグメント予測プログラムは、フラグメンテーションパターンに基づいて、糖分子における脱プロトン化の結果として切断される結合の位置を判定し、その切断により生成されるフラグメント種を予測する。

【0039】

ここで、糖鎖構造データは、後述する入力ファイルに含まれている。一方、フラグメンテーションパターンは、脱プロトン化される部位と、生成されるフラグメント種と、切断位置とが対応付けられたデータであり、フラグメント予測プログラムに書き込まれている。

【0040】

スペクトル予測プログラムは、脱プロトン化確率と、予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、糖分子のMS<sup>s</sup>スペクトルを予測するプログラムである。

【0041】

10

20

30

40

50

C P U 4 0 2 が上記のプログラムを実行する際に、記憶部 4 0 8 に記憶された入力ファイルが用いられる。入力ファイルは、入力部 4 0 4 から入力されて予め記憶部 4 0 8 に蓄積されている。

【 0 0 4 2 】

入力ファイルは、MS<sup>s</sup>スペクトルを予測するためのシミュレーションに必要なパラメータを含む。例えば、入力ファイルは、糖鎖構造データを含む。

【 0 0 4 3 】

糖鎖構造データは、糖分子の構造に関するデータであり、例えば、単糖 (Gal、GlcNAc、Man等のユニット) の種類、およびその繋がり方 (順序)、および結合情報 (何番目の炭素と繋がっているかを番号で表記した情報) を含むことができる。

10

【 0 0 4 4 】

また、糖鎖構造データは、糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の位置情報を含んでもよい。

【 0 0 4 5 】

また、糖鎖構造データは、糖分子について実験的に観測されたMS<sup>s</sup>スペクトルの情報を含んでもよい。

【 0 0 4 6 】

また、糖鎖構造データは、糖分子に関する物理量を含んでもよい。

【 0 0 4 7 】

ここで、物理量は、糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の原子間相互作用エネルギーを含んでもよい。

20

【 0 0 4 8 】

また、物理量は、糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の構造安定化エネルギーを含んでもよい。

【 0 0 4 9 】

上記のプログラムを実行することにより、スペクトル予測装置 4 0 0 は、糖鎖構造データを用いて糖分子における脱プロトン化のシミュレーションを行って、所与の糖分子の水酸基またはアミノ基の位置毎に、脱プロトン化確率を算出する。

【 0 0 5 0 】

次いで、糖鎖構造データとフラグメンテーションパターンとを用いて、脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測する。

30

【 0 0 5 1 】

そして、脱プロトン化確率と、予測されたフラグメント種の情報とに基づいて、糖分子のMS<sup>s</sup>スペクトルを予測する。

【 0 0 5 2 】

図 4 は、本実施形態に係る糖鎖構造の例を概略的に示す。同図に示す糖鎖構造は、P B H ( 1 - ピレンブタン酸ヒドラジド) で標識されている。記号網掛け丸 ( )、網掛け四角 (四角) および白丸 ( ) は糖鎖を構成するユニットを示し、 はMannose、四角はGlcNAc ( N acetyl D glucosamine)、 はGalactoseを示す。また、糖鎖構造の各切断位置には、固有の識別情報 ( Y<sub>s</sub>、<sup>2,4</sup>A<sub>s</sub>等) が割り当てられている。

40

【 0 0 5 3 】

図 5 は、糖鎖構造の一例における脱プロトン化について、フラグメント種の予測シミュレーションを行った結果を示す。同図に示す表は、左から順に、予測されたフラグメント種のm/z(記号mz:で示す)、MS<sup>s</sup>スペクトルの予測値におけるピークの強度 (記号level:で示す)、および可能な切断位置 (ions:で示す) を表している。ここで、複数回の切断は記号「/」により情報を区切っている。

【 0 0 5 4 】

スペクトル予測プログラムに基づく処理の実行結果は、C P U 4 0 2 からの命令により、表示部 4 0 6 に表示されてもよい。

【 0 0 5 5 】

50

図6は、本発明に係るスペクトル予測装置400が、MS<sup>s</sup>スペクトルを予測する際に行う処理のフローチャート500を示している。

【0056】

まず、ステップS502で、スペクトル予測装置400は、脱プロトン化シミュレーションプログラムを実行すると、記憶部408から入力ファイルを読み出す。

【0057】

次に、ステップS504で、スペクトル予測装置400は、ステップS502で読み出した入力ファイルに含まれる糖鎖構造データに基づいて、糖分子内の各部位の脱プロトン化のシミュレーションを行う。このシミュレーションの結果として、脱プロトン化確率が算出される。

【0058】

ここで、脱プロトン化確率は、例えば糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の結合箇所の位置情報(1位、2位等)に基づいて、当該水酸基またはアミノ基の位置毎に算出しても良い。

【0059】

また、糖分子について実験的に観測されたMS<sup>s</sup>スペクトルの情報に基づいて脱プロトン化確率を算出しても良い。例えば、脱プロトン化のシミュレーションによって生成されるものと予測されたフラグメント種に対し、実測値におけるスペクトルの相対的な強度に基づいて脱プロトン化確率を決定しても良い。

【0060】

また、糖分子の構造に関する情報に基づく理論計算により、脱プロトン化確率を算出しても良い。

【0061】

ここで、理論計算として、例えば、密度汎関数(DFT)法等の量子計算を用いても良い。

【0062】

また、糖分子に関する物理量に基づいて脱プロトン化確率を算出しても良い。

【0063】

ここで、物理量として糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の原子間相互作用エネルギーを用いても良い。

【0064】

また、物理量として糖分子の水酸基またはアミノ基における脱プロトン化前後の構造安定化エネルギーを用いても良い。すなわち、脱プロトン化した分子構造に対し、構造最適化計算を施した後の原子間相互作用エネルギー、または構造最適化計算を施す前の原子間相互作用エネルギーを用いて、脱プロトン化確率を算出することとしても良い。

【0065】

さらに、物理量として、水酸基を有する単糖の隣の糖鎖の種類、結合の開裂に要する活性化エネルギー等の情報を用いて、脱プロトン化確率を算出することとしても良い。

【0066】

次に、ステップS506で、スペクトル予測装置400がフラグメント予測プログラムを実行すると、スペクトル予測装置400は、ステップS502において読み出された入力ファイル内の糖鎖構造から、ミュレートされた脱プロトン化により生成されるフラグメント種を予測する。具体的には、脱プロトン化された部位に応じて、フラグメントの生成パターンに基づいて予測される結合の切断位置、その結合の切断によって生成されるフラグメント種、および当該フラグメント種のm/zを予測することができる。

【0067】

次いで、ステップS508において、スペクトル予測装置400は、予測された糖分子のフラグメント種の情報を記憶部408に記憶する。例えば、スペクトル予測装置400は、生成されるフラグメント種の分子量と電荷数とを、記憶部408に記憶してもよい。

【0068】

ステップS510で、スペクトル予測装置400は、スペクトル予測プログラムを実行

10

20

30

40

50

し、記憶部 408 に記憶されている、シミュレーションで生成されたフラグメント種の情報を用いて、フラグメント種の m/z ごとに所与の糖分子の MS<sup>s</sup> スペクトルを予測する。具体的には、予測されたフラグメント種の m/z の値における MS<sup>s</sup> スペクトルの強度を、脱プロトン化確率に応じて決定する。ここで、スペクトル予測装置 400 は、予測した MS<sup>s</sup> スペクトルを表示部 406 に表示してもよい。

【0069】

その後、スペクトル予測装置 400 は処理 500 を終了する。

【0070】

図 7 は、スペクトル予測装置 400 において糖鎖の構造データを作成するための GUI の例を示す。GUI 700 は、スペクトル予測装置 400 内の CPU 402 の命令により、表示部 406 に表示されてもよい。ユーザが入力部 404 を操作して、スペクトルを予測する対象の糖鎖構造を視覚化しながら入力することにより、上述した糖鎖構造データを記述したテキスト形式のファイルが作成される。この際、スペクトル予測装置 400 は、糖分子に含まれる脱プロトン化が起こりうる水酸基またはアミノ基の位置を特定することができる。この情報は、作成された上記ファイル内に記憶される。

【実施例】

【0071】

(実施例 1)

図 8 は、本発明の第 1 実施例に係る脱プロトン化のシミュレートを行う糖分子の糖鎖構造を示す。同図は、Laminaripentaose PBH に対し構造最適化計算を行った後の糖鎖構造を示し、左のユニットから順に C1、C2、C3、C4 および C5 と名づけられる。各ユニットの部位には、図 9 に示すように番号が与えられる。脱プロトン化される部位は、これらの情報に基づく表記により識別される。例えば、図 9 に示すユニット C4 の 2 位の水酸基は C4\_2 と表記される。

【0072】

脱プロトン化確率は、例えば、図 10 に示すフォーマットでデータベース化される。同図は、Laminaripentaose PBH に対し、脱プロトン化のシミュレーションを量子計算により行った場合のデータを示す。

【0073】

同図に示す例では、左から順に脱プロトン化される水酸基の位置(「O-位置」、DFT 計算により脱プロトン化の結合エネルギーを計算した結果の値(「DFT」、単位: kcal/mol)、C2\_2 の DFT 計算結果を基準とした相対値(「dH」、単位: kcal/mol)、脱プロトン化確率、および生成されるフラグメント種をそれぞれ示している。

【0074】

ここで、dH の値は、C2\_2 の位置における DFT 計算結果の絶対値(16362.7)とし、他の値については、C2\_2 の値との差分をとっている。例えば、C5\_4 の脱プロトン化において、 $dH = 16362.7 - 16027.6 = 335.1$  となる。

【0075】

また、脱プロトン化確率は、dH の値に基づいて計算することができる。例えば、dH の値が小さいほどフラグメントが安定して存在すると考えられるため、脱プロトン化確率が高くなるように設定することができる。本実施例では、dH の中で一番小さい値に対応する脱プロトン化確率を 100、一番大きい値に対応する脱プロトン化確率を 0 と定義し、中間値についてはそれに比例させて脱プロトン化確率を決定した。

【0076】

Laminaripentaose PBH の実測値では、フラグメント C4 > フラグメント C3 > フラグメント C2 の強度順で、C イオンの 3 本のピークが観測されている。そこで、フラグメント C2 ~ フラグメント C4 に対する計算結果に着目する。

【0077】

非特許文献 1 に従えば、フラグメント C2、フラグメント C3、フラグメント C4 等の C イオンが生成するのは、3 位で脱プロトン化されたときのみである。しかし、図 8 およ

10

20

30

40

50

び9から明らかなように、Laminaripentaose PBHは、1 - 3結合である（すなわち、一方のユニットの1位と他方のユニットの3位が、Oを介して結合されている）ため、ユニットの3位に水酸基またはアミノ基が存在せず、理論上脱プロトン化は起こらないことになる。

【0078】

そこで、ユニットの2位と4位でも脱プロトン化し、電子移動の結果としてCイオンが生成されると推定し、2位と4位における計算結果も検討対象とした。

【0079】

再び図10を参照すると、フラグメントC2、フラグメントC3、およびフラグメントC4の脱プロトン化確率は、C4\_\_2の位置における脱プロトン化が95%と最も高い。 10

【0080】

同図によれば、C4\_\_2における脱プロトン化に対応して生成が予想されるフラグメント種は、C3である。

【0081】

次に、C4\_\_2における脱プロトン化に対し、その安定化した構造を判断する。

【0082】

図9を参照すると、4位での脱プロトン化では、6位の水酸基と水素結合を形成して、安定化しやすいと考えられる。C4\_\_4の脱プロトン化において、C4\_\_4のOと、C3\_\_6のCH<sub>3</sub>のHとの距離は3.639であり、C4\_\_4のOと、C4\_\_6の水酸基のHとの距離は2.590である。これに対し、C4\_\_2のOとC5\_\_2における水酸基のHとの距離は3.916である。したがって、C4\_\_2のOが脱プロトン化した構造は、C4\_\_4のOが脱プロトン化した構造と比較して、より不安定であると考えられる。 20

【0083】

図11は、C4\_\_2の位置における脱プロトン化をシミュレートした場合の糖鎖構造を示す図である。

【0084】

同図(a)の「初期構造」は、図8の構造のC4\_\_2において脱プロトン化した状態の初期構造を示し、(b)の「安定化後の構造」は、初期構造に対して再度構造最適化計算(DFT計算)を行った後の構造を示す。

【0085】

初期構造において、C4\_\_2の位置におけるOから最も近い水酸基は、ユニットC5の2位、すなわちC5\_\_2の位置である。 30

【0086】

一方、安定化後の構造では、C4\_\_2の位置におけるOとC5\_\_2のHとの距離は1.077と近くなる。この距離をもって、安定化後の構造ではC5\_\_2のHが移動したと判断される。

【0087】

したがって、脱プロトン化のシミュレーション結果はC4\_\_2の位置における脱プロトン化確率が最も高いが、実際にはC5\_\_2のHが移動して、C5\_\_2の脱プロトン化が起こり、その結果、C4イオンが生成したと判断することができる。 40

【0088】

図12(a)は、Laminaripentaose PBHのフラグメントC2、C3およびC4について観測されたMS<sup>2</sup>スペクトルの実測値を示す。同図において、実測値におけるCイオンのピークがC4 > C3 > C2の強度順となることは、上記の判断を支持している。

【0089】

図12(b)は、本実施例に係るシミュレーションにより予測されたMS<sup>2</sup>スペクトルの予測結果を示す。MS<sup>2</sup>スペクトルの予測結果と実験値は、良く一致しており、脱プロトン化確率を用いた予測が妥当であることが示されている。

【0090】

したがって、量子計算により脱プロトン化確率を予測し、電子移動 結合切断 フラグ 50

メント生成というプロセスのパターンを用いて、所与の糖分子の構造に対するMS<sup>i</sup>スペクトルの実験値を、精度良く予測することができた。

【0091】

(実施例2)

図13は本発明の第2の実施例に係るAHSG (Alpha 2 HS Glycoprotein) の糖鎖構造を示す図であり、図13(a)は各ユニットを記号化した図、(b)は各ユニットを名称で示した図である。

【0092】

図14は、AHSGに対し本実施例に係る脱プロトン化確率の計算を行った結果を示す。本実施例では、図13(b)に示す分岐の上側部分を鎖(C6, C5, C4)、下側部分を鎖(C1, C2, C3)と表記している。 10

【0093】

表の3列目(「precursor(前駆体)」)は、脱プロトン化される位置を示す。同列の矢印「」は更なる脱プロトン化が起きることを示し、例えば「C5\_3鎖C6\_4」は、C5\_3で脱プロトン化が起きてから鎖C6\_4で脱プロトン化が起きることを示す。

【0094】

4~8列目は、図13の糖鎖構造情報を入力して、DFT計算により「precursor」の欄に記載の位置で脱プロトン化が起きた場合の結合エネルギーを計算した結果を示し、左から順に、結合エネルギー(「BE」、単位:kcal/mol)、-20043.00を基準(base)とした相対的な結合エネルギー(「dH」)、dH+40、dH+40の規格化後の値(「脱プロトン化確率」)、および2回以上脱プロトン化が発生した場合を考慮した規格化後の値(「脱プロトン化確率(補正後)」)である。 20

【0095】

図14に示す表の「precursor」の欄を見ると、「C5\_3鎖C6\_4」のように、フラグメントの中には2回以上脱プロトン化が発生するものがあるが、物理的には脱プロトン化の回数が多いほどそのフラグメントの発生確率は下がると考えられる。そこで、例えば「precursor」で「」が1つ含まれる場合の脱プロトン化確率は0.1を掛けて、

脱プロトン化確率(補正後) = (1回目の脱プロトン化確率) × (2回目の脱プロトン化確率) × 0.1 30

と計算する。例えば、「precursor」が「C5\_3鎖C6\_4」で示される脱プロトン化については、

C5\_3のdH+40.0(規格後)=0.74

C6\_4のdH+40.0(規格後)=0.85

脱プロトン化確率(補正後) = 0.74 × 0.85 × 0.1 = 0.06

のように計算することができる。

【0096】

3回目以降の脱プロトン化についても同様に、脱プロトン化確率に0.1を乗算する。

【0097】

また、図14に示す表の1、2列目は、それぞれ、「precursor」の欄に記載の位置で脱プロトン化が発生した場合に、経験則によるフラグメンテーションパターンに基づいて生成が予測されるm/zおよびフラグメントを示す。 40

【0098】

図15(a)はMS<sup>i</sup>スペクトルの実測値、図15(b)は予測値を示す。具体的には、図15(b)は図14に示す表の右から1列目の値(2箇所以上の脱プロトン化を考慮した規格化後の値)をグラフ化したものである。予測値の複数のスペクトルにおける相対的な強度の関係は、実測値を精度よく近似している。

【0099】

<他の実施形態>

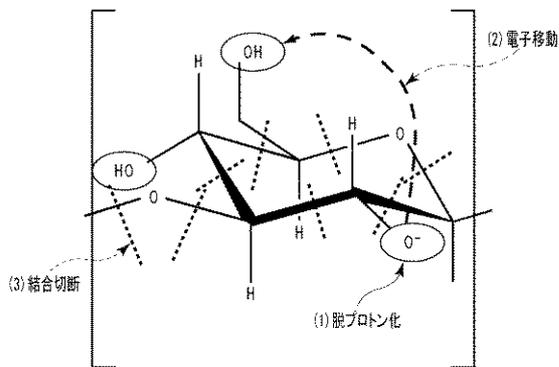
なお、本発明の実施形態に係るスペクトル予測装置400が実行する処理を実行させるプログラムを、コンピュータに実行させることにより、本発明を実施してもよい。

【符号の説明】

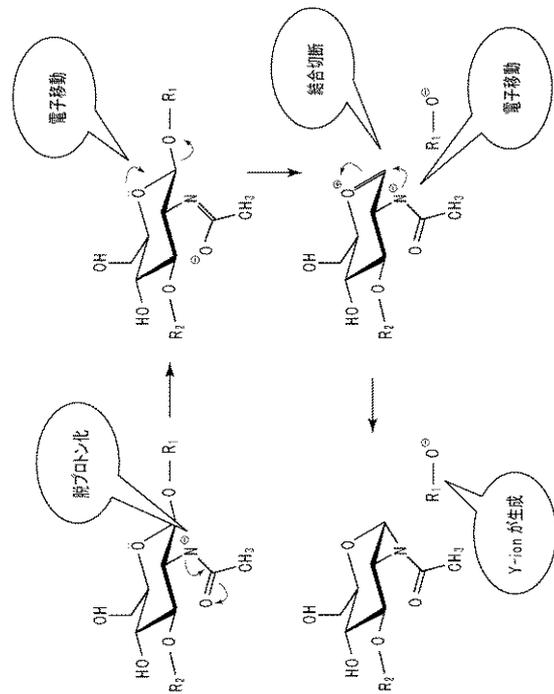
【0100】

- 400 スペクトル予測装置
- 402 CPU
- 404 入力部
- 406 表示部
- 408 記憶部

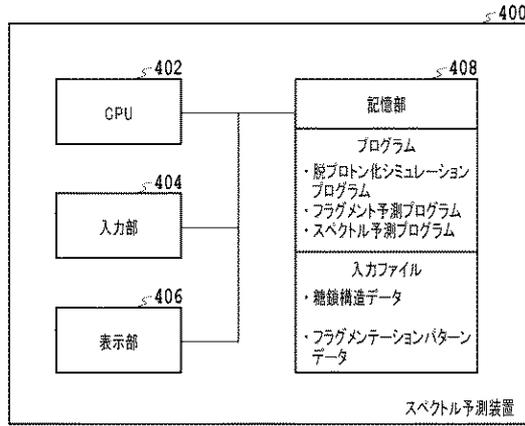
【図1】



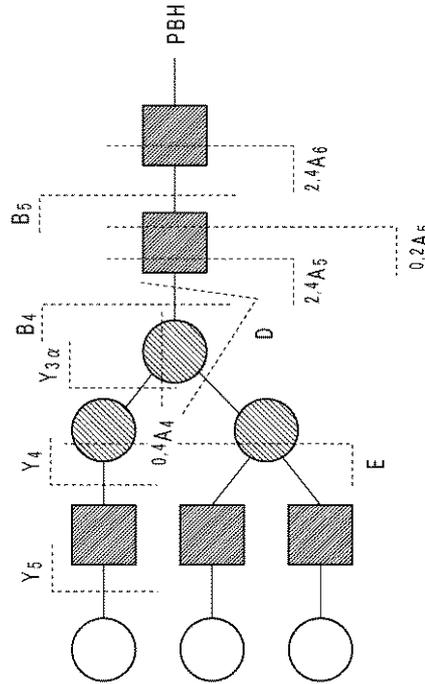
【図2】



【 図 3 】



【 図 4 】



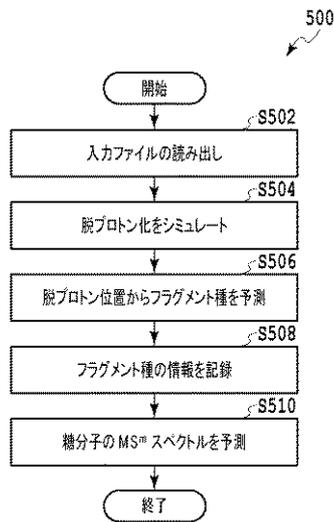
【 図 5 】

detected peaks:

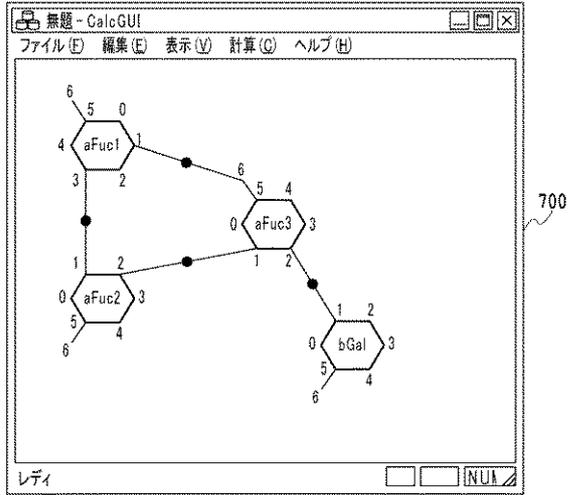
mz	level	ions
364.121	0.02409	B2
365.100	0.00133	ions: 2,4A5 / Y3α / Y4β
382.132	0.01341	ions: C2α
383.111	0.00133	ions: 2,4A5 / Y3α / Y4β
406.130	0.05613	ions: 1,3A3
424.141	0.05613	ions: 1,3A3
453.143	0.00133	ions: 0,3A4 / Y5β
466.150	0.01074	ions: E3
471.154	0.00133	ions: 0,3A4 / Y5β
485.140	0.00007	ions: C4 / Y4α / Y4β
490.157	0.00134	ions: D4 / Y5β
503.151	0.00007	ions: C4 / Y4α / Y4β
508.160	0.01074	ions: B3
526.170	0.02162	ions: C3
527.150	0.00067	ions: 2,4A5 / Y4α / Y4β
545.160	0.00067	ions: 2,4A5 / Y4α / Y4β
550.177	0.00003	ions: 2,4A5 / Y3α / Z5β
568.180	0.05486	ions: 0,4A4
586.190	0.05486	ions: 0,4A4
615.193	0.02669	ions: 0,3A4
628.200	0.00013	ions: 0,2A6 / Y3α / Y4β
633.203	0.02669	ions: 0,3A4
646.210	0.00013	ions: 0,2A6 / Y3α / Y4β
652.207	0.01068	ions: D4
670.217	0.01075	ions: D4
688.228	0.01075	ions: D4

複数回切断の場合は  
"/ で区切っている

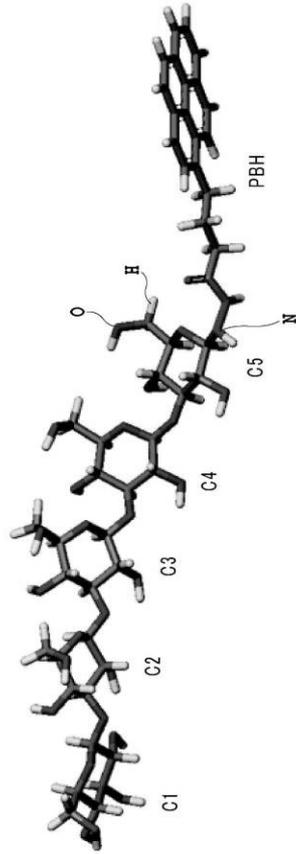
【 図 6 】



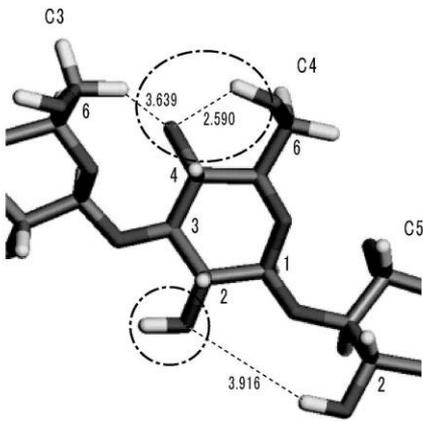
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

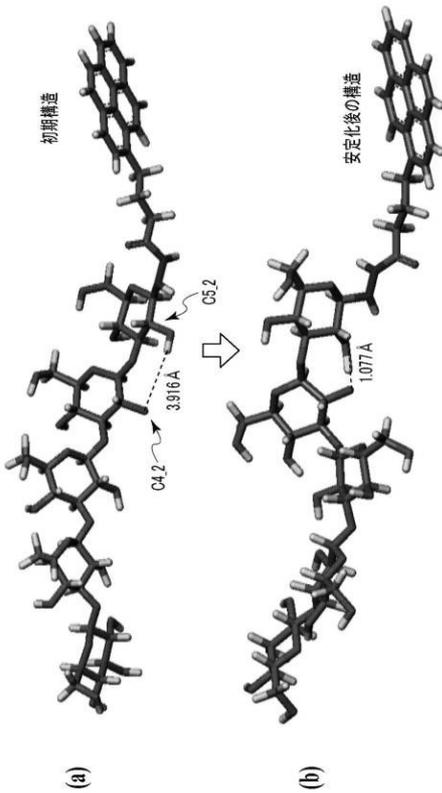


【 図 10 】

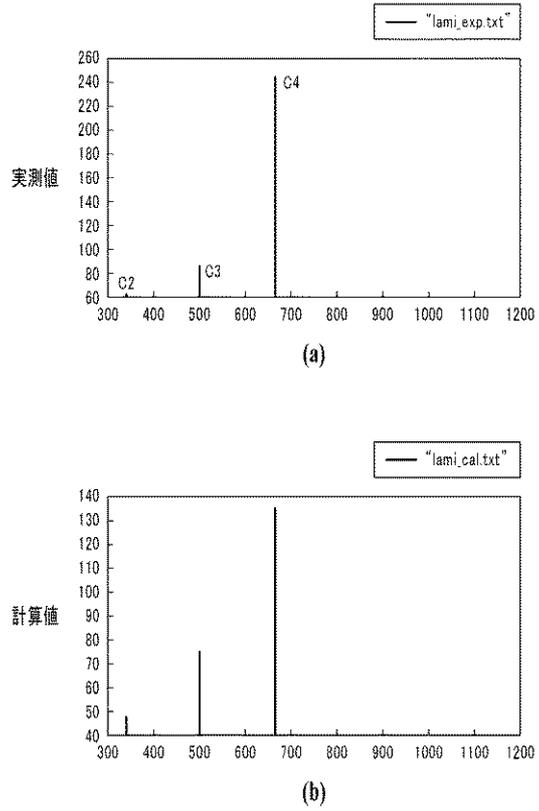
構造から判明には  
C5,2に酸化するので、  
C3→C4となる

O-位置	DFI(kcal/mol)	pH	脱プロトン化 度数	フラグメント 候補
C3,4	-16027.6	335.1	42	C4
C4,4	-16042.4	320.3	75	C3
C3,4	-16030.1	332.6	48	C2
C3,2	-16008.2	354.5	0	C4
C4,2	-16051.8	310.9	95	C3
C3,2	-16008.1	354.6	0	C2
C2,2	0	16362.7	-	C1
C1,3	-16038.2	324.5	66	C1
C1,4	-16044.2	318.5	79	C1
C1,2	-16041.6	321.1	73	C1
C2,4	-16053.9	308.8	100	C1

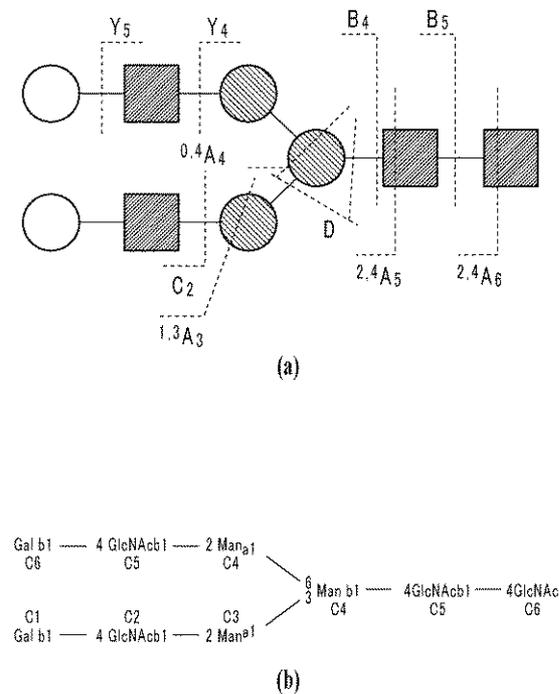
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】

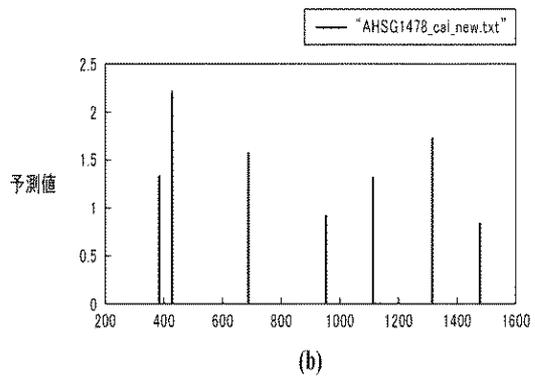
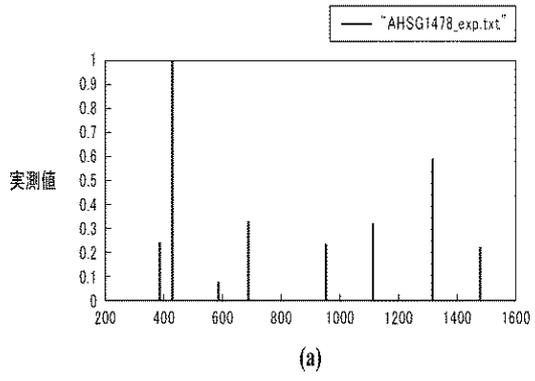


【図 1 4】

α β 鎖の違いも考慮して検討したもの

m/z	フラグメント	precursor	BE kcal/mol	dH	dH+40	脱プロトン化 効率	脱プロトン化 効率(補正後)
383	C2	β 鎖 C3.3	-20050.06	7.06	47.06	1.00	1.00
		α 鎖 C4.3	-20015.69	-27.31	12.89	0.27	0.27
		β 鎖 C3.4				0.77	
		α 鎖 C4.4				0.17	
	C3.3→α 鎖 C6.4					0.63	0.06
	C4.4		-20013.82	-29.18	10.82	0.23	0.23
	C4.4→β 鎖 C1.4					0.20	0.02
424	C3.3	β 鎖 C3.3	-20050.06	7.06	47.06	1.00	1.00
		α 鎖 C4.3	-20015.69	-27.31	12.89	0.27	0.27
		β 鎖 C3.4	-20039.02	-3.98	34.62	0.77	0.77
		α 鎖 C4.4	-20010.92	-32.08	7.92	0.17	0.17
	C4.2→α 鎖 C6.4					0.04	0.00
	C4.2		-20009.34	-37.67	2.33	0.05	0.05
	C3.3		-20037.62	-5.38	34.62	0.74	0.74
	C5.6		-20045.70	2.70	42.70	0.91	0.91
	base					0.85	0.85
586	C4.4	α 鎖 C5.2→β 鎖 C1.4				0.44	0.00
		β 鎖 C2.2→α 鎖 C6.4				0.59	0.00
591	C5.7/5.6/2.4A3	C5.3→α 鎖 C6.4→β 鎖 C1.4				0.56	0.01
	C3.3	β 鎖 C3.4				0.77	0.17
	C4.4	α 鎖 C4.4				0.17	0.17
1113	C4.2	α 鎖 C5.2	-20026.59	-16.41	23.59	0.90	0.90
		β 鎖 C2.2	-20035.45	-7.55	32.45	0.69	0.69
		C3.3→β 鎖 C1.4				0.65	0.06
		C5.3→α 鎖 C6.4				0.63	0.06
1316	C5.7/2.4A5	α 鎖 C6.4	-20043.00	0.00	40.00	0.85	0.85
		β 鎖 C1.4	-20044.40	1.40	41.40	0.88	0.88
1478	base	base	-20043.00	0.00	40.00	0.85	0.85

【 図 1 5 】



---

フロントページの続き

審査官 佐藤 仁美

(56)参考文献 特開2011-220733(JP,A)

特開2009-264966(JP,A)

特開2004-191077(JP,A)

特開2006-058151(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC G01N 27/62、49/00 - 49/42