修　士　論　文

論文題名

ペプチドのポストソース分解における重原子効果

平成３０年　２月　２日

専攻名　　物理学専攻

氏　名　　前田　幸輝

大阪大学大学院理学研究科

ペプチドのポストソース分解における重原子効果

大阪大学大学院理学研究科物理学専攻修士前期課程２年
豊田研究室

前田　幸輝

目 次

第 1 章　はじめに **3**

第 2 章　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 **5**

2.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 5

2.2　ポストソース分解 6

2.3　飛行時間型質量分析法 6

2.4　リフレクトロン 8

第 3 章　タンデム質量分析によるポストソース分解生成物の測定 **11**

3.1　タンデム質量分析 11

3.2　リフレクトロンをタンデム質量分析計として用いる方法 12

3.3　プリカーサーイオンの選択 12

3.4　プリカーサーイオンとプロダクトイオンの分離・検出 13

第 4 章　測定手法 **16**

4.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を用いたポストソース分解生成物の測定 16

4.1.1　使用した質量分析計 16

4.1.2　試料 17

4.1.3　測定手順 17

4.1.4　Biemann 標記 18

4.2　フーリエ変換赤外分光 19

4.2.1　フーリエ赤外分光光度計 19

4.2.2　全反射測定法 19

4.2.3　試料 20

4.2.4　測定手順 20

第 5 章　ポストソース分解によるフラグメントイオンの測定 **21**

5.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計による測定 . . 21

5.2 フーリエ変換赤外分光による測定 28

第 6 章 シミュレーション **32**

6.1 計算手法 32
6.2 一次元ペプチドモデル 33
6.3 各ばねの振幅と周波数 36
6.4 各ばねの弾性エネルギー 37
6.5 各質点の運動エネルギー 38
6.6 エネルギーの変化 39
6.7 シミュレーションのまとめ 41

第 7 章 まとめ **42**

第 8 章 付録 **45**

第1章　はじめに

質量分析とはイオンの m/z（イオンの質量を統一原子質量単位で割り，さらにイオンの電荷数で割って得られる無次元量 [1] ）と存在量を測定する分析手法である．

質量分析計は，イオン源，質量分離部，検出器から構成されている．イオン源で試料からイオンを生成し，質量分離部でイオンを m/z に応じて分離し，検出器でイオンを検出することにより，イオンの m/z と強度を得ることができる．こうして得られたイオンの m/z と相対的な存在量をプロットしたものは，マススペクトル (mass spectrum) と呼ばれる．生体高分子のイオン化には，試料分子を分解させずに測定できるマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assisted laser desorption/ionization: MALDI) やエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization) が主に用いられている．

質量分析はペプチドの構造解析などを含め様々な分野において利用されている [2] ．他のペプチドの構造解析にはエドマン分解によってアミノ酸を分解し，順次液体クロマトグラフィーで分離検出するなどの方法があるが，この手法を行うには一定量の単離精製された試料が必要である．質量分析による構造解析であれば，微量の試料でも測定が可能である．ペプチドの構造解析の手法として，上記のイオン化法にタンデム質量分析 (tandem mass spectrometry: MS/MS) を組み合わせた測定法がある．この手法は二つの質量分離部を備えた質量分析計で行われる．最初に一台目の質量分離部で特定のイオンを選択する．ガスと衝突させるなどし分解させ，その生成物を二台目の質量分離部で分離し，検出することによってマススペクトルを得る．このマススペクトル (プロダクトイオンスペクトル) から選択したイオンの分解パターンが分かるので，ここから選択したイオンの構造を推測することができる．

MS/MS の一手法として，ポストソース分解 (Post Source Decay: PSD) を利用した測定法がある [3] ．ポストソース分解は MALDI などで見られる現象であり，イオンがイオン源の加速領域を出てから，過剰な内部エネルギーによって分解することである．イオンの余剰なエネルギーがイオン内の各自由度に再分配され，イオンのエネルギー蓄積量が化学結合エネルギーを上回ることによって PSD が引き起こされると考えられている [4] ．

上記のように PSD はエネルギーの分配によって分解が起きるため，エネルギーの分配が変われば分解のパターンや解離の効率が変化するかもしれない．例えば，ペプチドに重原

子を結合させると，アミド結合の原子間距離や振動の周期が変化することによって，エネルギーの分配が変化する可能性がある．その結果，ポストソース分解の増加や別の位置での開裂が起きるのではないかと予想される．

そこで本研究では，ペプチドの特定の部位に重原子（金など）を結合させて，ポストソース分解で得られる生成物を測定することによって，ポストソース分解の開裂のパターンや分解の増減の変化を明らかにする．そして，ペプチドに重原子が結合することによるペプチド結合の状態の変化を調べることを目的に，同じサンプルを赤外分光で測定する．さらに，アミノ酸残基を一つの質点と仮定した単純なペプチドモデルを用いてシミュレーションを行い，測定結果と比較する．

本論文の第 2 章ではマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) の原理について説明する．第 3 章ではタンデム質量分析によるポストソース分解生成物の測定の原理について述べる．第 4 章では測定手法について述べる．第 5 章ではポストソース分解によるプロダクトイオンの測定の結果を述べる．第 6 章ではシミュレーションの結果について述べる．第 7 章ではまとめを述べる．

第2章　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法

2.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化法

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: MALDI) は，図 2.1 のようにマトリックス中に存在する試料に，パルスレーザー光を照射することによって試料を脱離・イオン化する手法である [5] ．

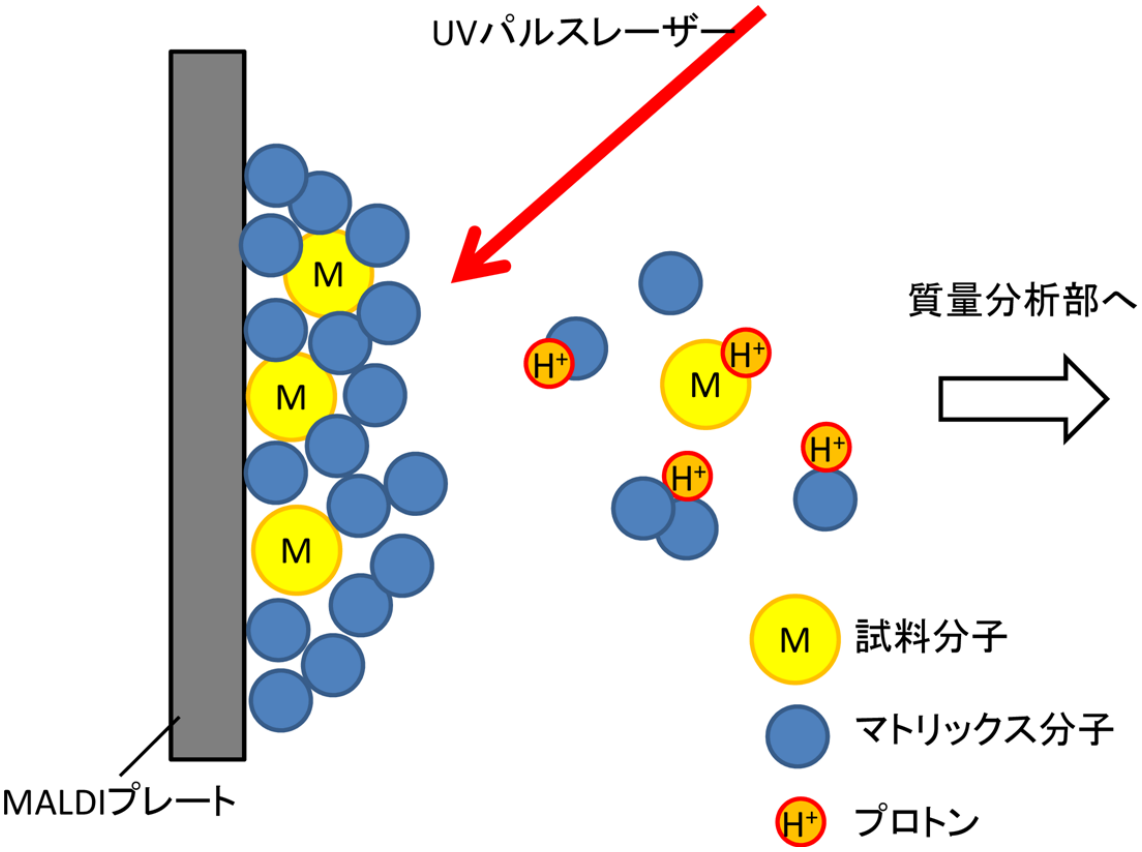

図 2.1: マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization: MALDI) の概略図

紫外線レーザーには，窒素レーザー (波長 337nm) や Nd:YAG レーザーの三倍波 (335nm) が用いられる．マトリックスは，レーザー光を吸収する物質が選ばれる．例えばα-シアノ-4ヒドロキシけい皮酸 (α-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid: CHCA) や 2,5-ジヒドロキシ安息

香酸 (2,5-Dihydroxybenzonic Acid: DHB) などである．イオン化の原理は次の通りであると考えられている．まず最初に，マトリックスはレーザー光を吸収すると急激に加熱され，脱離する．それに伴って試料分子も脱離し，プロトンを受け取ることによってイオン化される．ただし，それは光化学過程やアブレーションなど様々な過程を含むイオン化であるため，その仕組みは複雑であり未だ理解されていない．

2.2 ポストソース分解

ポストソース分解 (Post Source Decay: PSD) は，イオン源で生成されたイオンがイオン源の加速領域を出てから検出器で検出されるまでの間に，不活性ガスとの衝突や光吸収などに因らず自発的に分解する現象である [6] ．

PSD が起こる理由は次の通りであると考えられている．MALDI において，レーザー光強度が強い場合などに，過剰な内部エネルギーを持ったイオンが生成される [7] ．イオン内の過剰なエネルギーは自由空間を飛行している間に，分子内の各結合に再分配される．分配されたエネルギーが化学結合エネルギーを上回ると PSD が起きる．

2.3 飛行時間型質量分析法

質量分析法では，イオン源で生成したイオンを質量分離する仕組みに様々な方法がある．例えば，イオンを磁場で分離する磁場型や，4 つの電極に直流電圧と交流電圧をかけて特定の m/z のイオンを通過させる四重極型など多くの種類があり，その中の一つに飛行時間型が存在する．飛行時間型質量分析法 (Time of flight mass spectrometry: TOF-MS) は，図 2.2 のようにイオン源で生成したイオンを加速電圧でパルス的に加速して，自由空間を飛行させることによって質量電荷比ごとに分離・検出する装置である [8] ．そのため，パルス状にイオンを導入するイオン化法と相性が良い．また，測定できる m/z の範囲に上限がないという特徴がある．以上の理由から，飛行時間型質量分析計はパルスレーザーを用いて生体高分子をパルスイオン化する MALDI に適している．

図 2.2 は，最も簡単な飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) であるリニア型 TOF-MS の原理を示したものである．

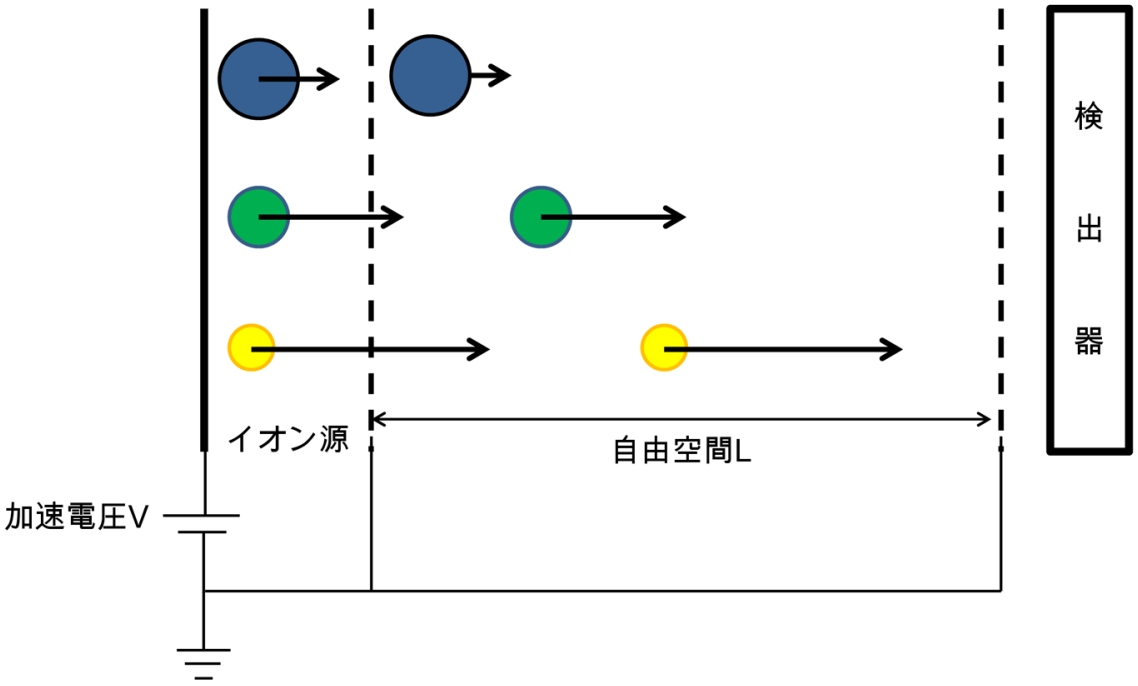

図 2.2: 飛行時間型質量分析計 (Time-Of-Flight Mass Spectrometer: TOF-MS) の概略図

加速電圧を V，電子の素電荷を e，電荷の数を z，イオンの質量を m，自由空間を飛行する速度を v とおくと，エネルギー保存則より

$$zeV = \frac{1}{2}mv^2 \tag{2.1}$$

の関係がある．式 (2.1) より，飛行速度 v は次の式で表される．

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \tag{2.2}$$

長さ L の自由空間を飛行する場合，飛行時間 T は次の式で表され，イオンの質量電荷比 (m/z) の平方根に比例する．

$$T = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{1}{2eV}}\sqrt{\frac{m}{z}} \tag{2.3}$$

また，質量分解能 $m/\Delta m$ は，

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{T}{2\Delta T} \tag{2.4}$$

となる．飛行時間 T は自由空間の長さ L に比例するため，L を大きくすると質量分解能 $m/\Delta m$ も大きくなり，質量差が小さい（Δm が小さい）2 種類の分子同士でも分離検出することが可能になる．

イオン源で生成されたイオンは同じ m/z のイオンであっても，それぞれ初期条件 (位置，速度) が異なる．初期速度の違いによって生じる飛行時間差は，飛行距離 L に比例して大き

くなる．そのため，飛行時間を伸ばしても質量分解能には上限がある．その初期速度差のばらつきによる飛行時間差を収束させる方法の一つとして，次に説明するリフレクトロンが存在する．

2.4　リフレクトロン

リフレクトロンはイオンミラーの一種であり，静電場でイオンを反射することによってイオンの初期速度差のばらつきによる飛行時間差を収束させることができる [9] ．図 2.3 はリフレクトロンの概略である．

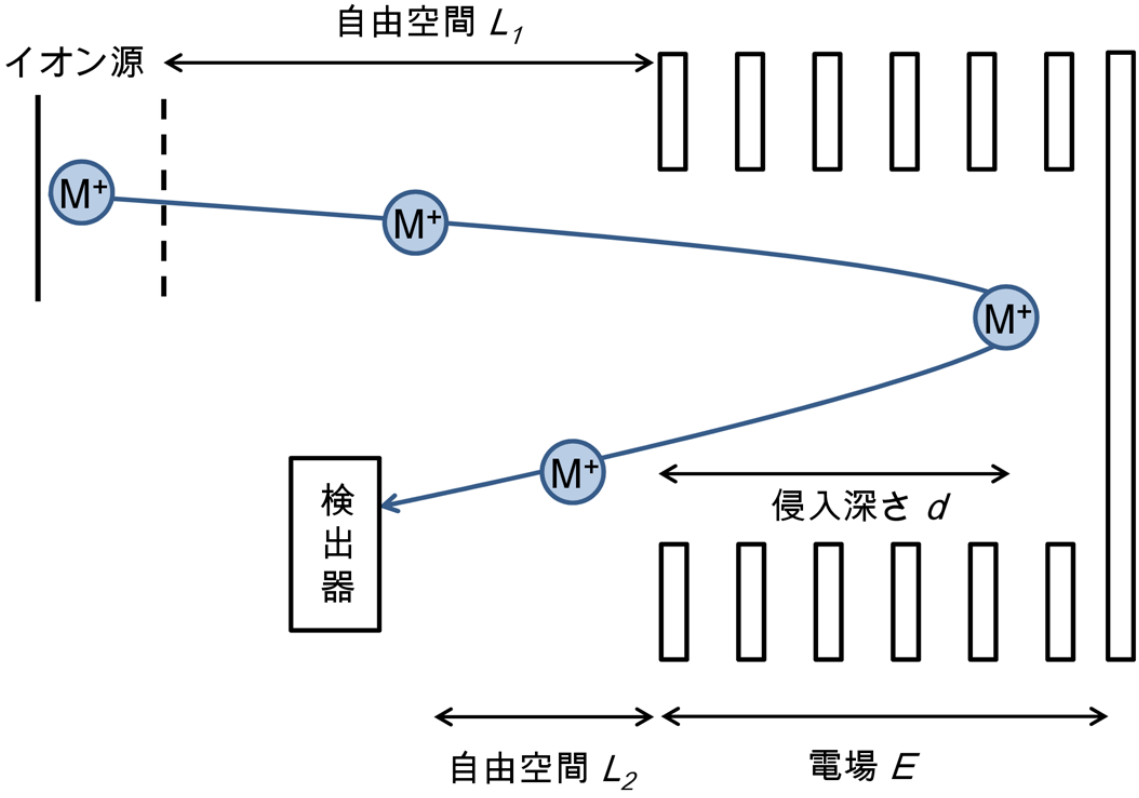

図 2.3: リフレクトロンの概略図

同じ m/z で初期速度の大きいイオンと小さいイオンについて考える．自由空間中では，初期速度の大きいイオンは初期速度の小さいイオンに比べて飛行時間が短い．しかしイオンミラーを用いると，初期速度の大きいイオンはイオンミラーの深いところまで侵入してから検出器に到達するため，初期速度の小さいイオンよりもイオンミラー中の飛行時間は長い．そのためリフレクトロンを用いることで，自由空間での飛行時間差とイオンミラーでの飛行時間差が相殺されて，初期速度の大きいイオンと初期速度の小さいイオンを同時に検出器に到達させることができる．

イオンミラーが一様な静電場である場合を仮定すると，リフレクトロンの原理は次のようになる．イオンの質量を m，速度を v，電荷を q，第一自由空間の長さを L_1，第二自由空間の長さを L_2，リフレクトロン内の電位を E，イオンがイオンミラーに侵入する深さを d とおくと，エネルギー保存則により次の式が成り立つ．

$$qEd = \frac{1}{2}mv^2 \tag{2.5}$$

式 (2-6) から，d は次の式で与えられる．

$$d = \frac{mv^2}{2qE} \tag{2.6}$$

イオンが自由空間 L_1，L_2 を飛行する時間 t_1 は以下の式で表される．

$$t_1 = \frac{L_1+L_2}{v} \tag{2.7}$$

イオンがイオンミラー内を飛行する時間を t_2 とすると，イオンがイオンミラーから受ける力は qE であり，イオンが受ける力に時間をかけた力積は qEt_2 である．イオンミラーに入る前と出た後のイオンの運動量の変化が $2mv$ であることから運動量の変化を次の式で表すことができる．

$$2mv = qEt_2 \tag{2.8}$$

そして，t_2 は (2.8) 式を用いて次のように表される．

$$t_2 = \frac{2mv}{qE} \tag{2.9}$$

そのため，イオンが検出器に到達するまでの時間 t は式 (2.7)，(2.9) の和で速度 v の関数として表される．

$$t(v) = t_1 + t_2 = \frac{L_1+L_2}{v} + \frac{2mv}{qE} \tag{2.10}$$

初期速度の差による到達時間の差が収束する条件は，飛行時間を速度で微分した値が 0 になることである．飛行時間を速度で微分した値を求めると，以下の通りになる．

$$\frac{dt}{dv} = -\frac{L_1+L_2}{v^2} + \frac{2m}{qE} = 0 \tag{2.11}$$

この式を $L_1 + L_2$ について解くと，次のようになる．

$$L_1 + L_2 = \frac{2mv^2}{qE} \tag{2.12}$$

ここで，式 (2.12) の右辺は式 (2.6) を用いて，次のように d で表すことができる．

$$L_1 + L_2 = 4d \tag{2.13}$$

式 (2.13) により，イオンを収束させるのに必要な自由空間と侵入深さの条件が導き出せる．

第3章　タンデム質量分析によるポストソース分解生成物の測定

3.1　タンデム質量分析

タンデム質量分析 (tandem mass spectrometry:MS/MS) は，複数の質量分析部を備えた質量分析計を用いて分子の構造情報などを得る方法である．図 3.1 はタンデム質量分析の装置の構成を示した略図である．

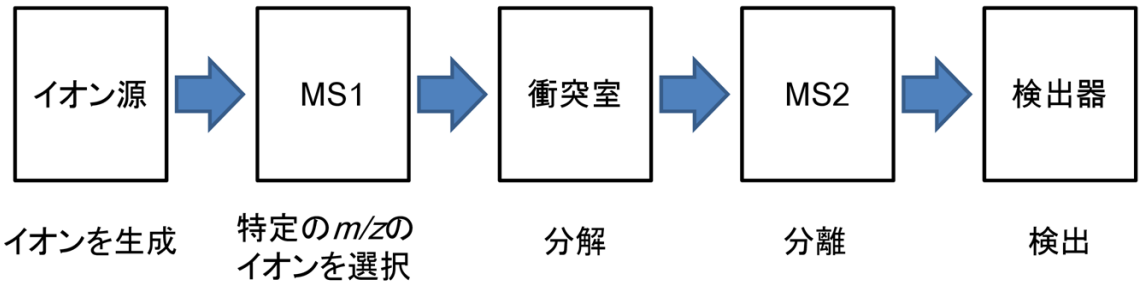

図 3.1: タンデム質量分析の流れ (衝突ガスによってプロダクトイオンを生成する場合)

二つの質量分析部を備えた質量分析計の場合，イオン源で生成されたイオンの中から一段目 (MS1) で特定の m/z のイオンを選択する．次に選択したイオン (プリカーサーイオン) を不活性ガスとの衝突や光吸収を用いて解離させ，より小さい質量のイオン (プロダクトイオン) や中性粒子を生成させる．PSD による生成物の測定も，前述のタンデム質量分析法を用いてフラグメントイオンのパターンを観測することで，イオンの構造情報を得ることができる．そうして得られたイオンを，二段目の質量分析部 (MS2) で分離・検出する．このようにして得られたマススペクトル (プロダクトイオンスペクトル) から，MS1 で選択した分子イオンの構造に関する情報を得ることができる [10] ．イオンの分解 (フラグメンテーション) は多くの要因が関わる過程であり，その仕組みは解明されていない部分が多い．タンデム質量分析計には，四重極質量分析計やイオントラップを用いてプリカーサーイオンの選択をした後に飛行時間型質量分析計でプロダクトイオンを測定する装置や，四重極質量分析計を 3 組直列につないだ三連四重極型質量分析計など，様々な組み合わせが存在する．

3.2　リフレクトロンをタンデム質量分析計として用いる方法

第 2 章で述べたイオンミラーとマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を組み合わせた装置で，ポストソース分解 (Post Source Decay: PSD) による生成物を測定する方法について考える [12] .

衝突解離や PSD によりイオンが解離するとき，質量 m_p，速度 v_p のプリカーサーイオンが質量 m_f，速度 v_f のプロダクトイオンと質量 m_n，速度 v_n の中性分子に分解し，飛行し続けると仮定する．イオンが分解する際の質量に対して，質量保存の法則により次の式が成り立つ.

$$m_p = m_f + m_n \tag{3.1}$$

イオンが分解する際に結合エネルギーの一部が運動エネルギーに変換されるが，ここではその影響は無視すると運動エネルギー保存則により次の式が成り立つ.

$$\frac{1}{2}m_p{v_p}^2 = \frac{1}{2}m_f{v_f}^2 + \frac{1}{2}m_n{v_n}^2 \tag{3.2}$$

また，運動量保存則より次の式が得られる.

$$m_p v_p = m_f v_f + m_n v_n \tag{3.3}$$

式 (3.1)，(3.2)，(3.3) を連立して解くことにより次の式が得られる.

$$v_p = v_f = v_n \tag{3.4}$$

ポストソース分解により生成された，プリカーサーイオンとプロダクトイオンは同じ速度であるため，自由空間では，これらのイオンを分離することはできない.

3.3　プリカーサーイオンの選択

飛行時間型質量分析計を備えたタンデム質量分析において，プリカーサーイオンを選択する手法の一つとしてイオンゲートが用いられている．イオンゲートは図 3.2 のような構造になっている.

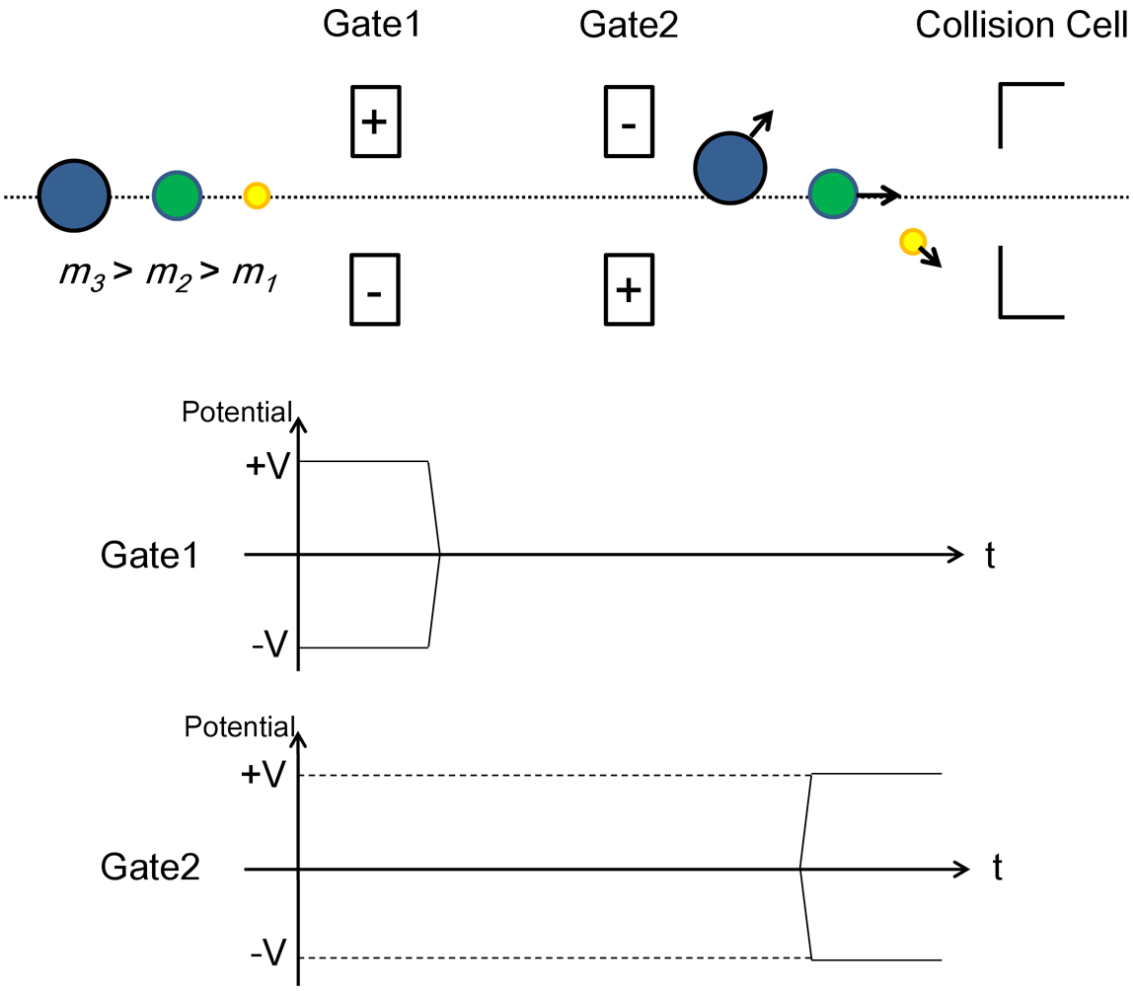

図 3.2: イオンゲートの概略

図 3.2 の m_2 のイオンのみを選択する場合を考える．m_2 のイオンが到着するまで Gate1 に電圧を印加することによって m_2 より軽いイオンが通過できないようにする．次に，Gate2 で m_2 が通過した後に電圧を印加することで m_2 より重いイオンが通過できないようにする．このようにして m_2 の質量のイオンのみを通過させることができる．[11] .

3.4 プリカーサーイオンとプロダクトイオンの分離・検出

プリカーサーイオンとプロダクトイオンが一様な静電場のイオンミラー内に入った場合，自由空間の長さを L，イオンの質量を m，イオンの電荷を q，イオンの速度を v，イオンミラー内の電場を E とおくと，第 2 章で求めた通り，イオンミラーにおけるイオンの収束条件は次の式で表せる．

$$L_1 + L_2 = \frac{2}{E} v^2 \frac{m}{q} \tag{3.5}$$

この条件を満たすイオンしか収束できないため，自由空間の長さやイオンミラーの電圧，イオンの加速エネルギーを固定したままでは，特定の m/z の範囲内のイオンしか収束できない．そこで，イオンミラーの電圧を複数回変えて，各 m/z のイオンが収束するようにしながら測定を行う．そうして，得られたプロダクトイオンスペクトルをつなぎ合わせて，全 m/z の範囲のプロダクトイオンスペクトルを得ている．

また，図 3.3 のようなリフレクトロンを用いると電圧を変えることなく，一度に全 m/z のプロダクトイオンスペクトルを得ることができる．

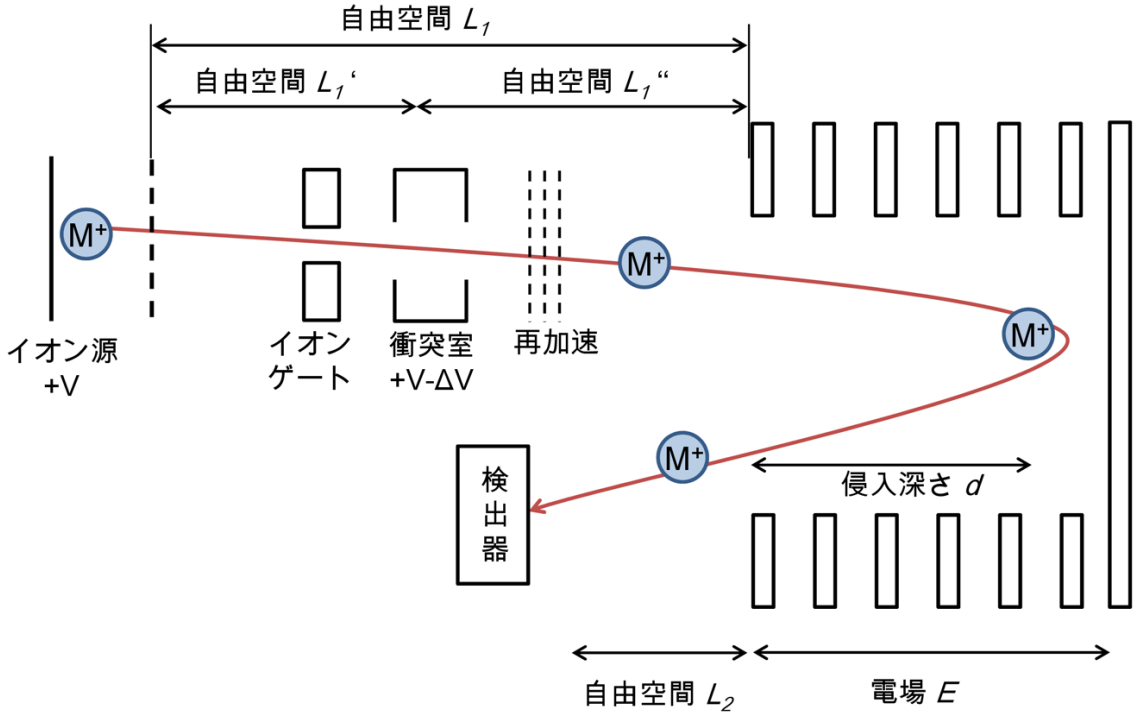

図 3.3: プリカーサーイオンを選択後，イオンを減速するリフレクトロン

この装置では，プロダクトイオンは次のような仕組みで得られる．まずイオンを電圧 $+V$ で加速し，イオンゲートをプリカーサーイオンを選択する．衝突室には $+V - \Delta V$ の電圧がかかっているため，イオンは減速する．その後，衝突室を出たイオンをパルス的に再加速してイオンミラーで分離した後，検出器で検出する．この時のイオン源からイオンミラーまでの電位勾配は図 3.4 のようになっている．

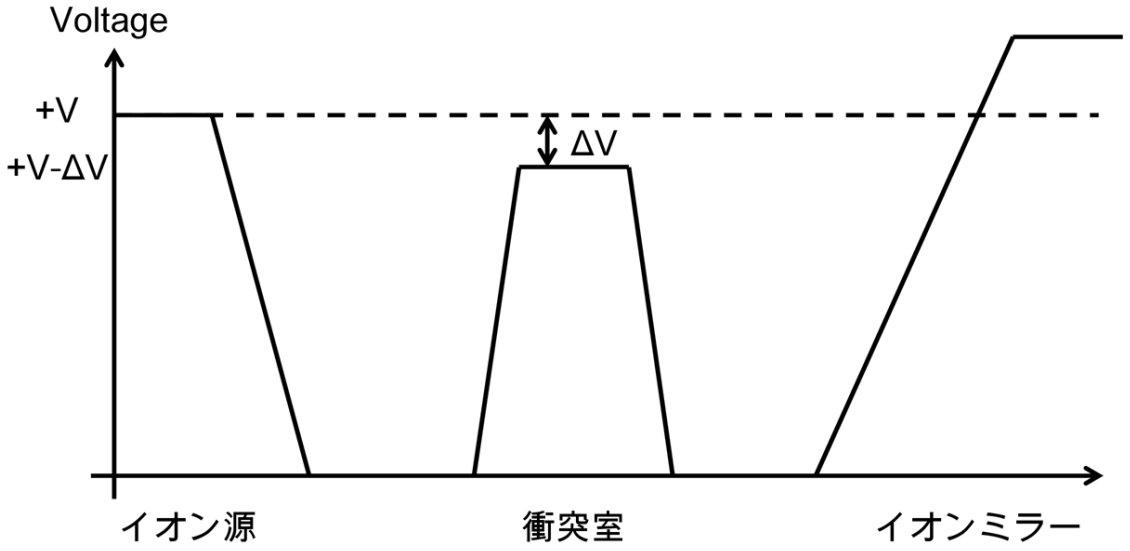

図 3.4: プリカーサーイオンを選択後，イオンを減速するリフレクトロンの電位勾配

図 3.4 の衝突室におけるイオンのエネルギーの分布は 0〜$q\Delta V$ である．この手法により，選択した後のイオンのエネルギーのばらつきを 0〜qV から $qV - q\Delta V$〜qV まで抑えられるため，電圧を変えることなく一度にプロダクトイオンスペクトルが得られる．

第4章　測定手法

この章ではまず，マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF-MS) を用いたポストソース分解 (PSD) 生成物の測定手法について説明する．次に，フーリエ変換赤外分光によるペプチド結合の振動数スペクトルを測定する手法について説明する．

4.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計を用いたポストソース分解生成物の測定

4.1.1　使用した質量分析計

今回使用したマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計は Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer(Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, USA) である．図 4.1 は装置の概略図である [13] ．この装置では，最初にイオン源で $8kV$ で加速した後，イオンゲート (Mass Selection Gate) で特定のプリカーサーイオンを選択する．

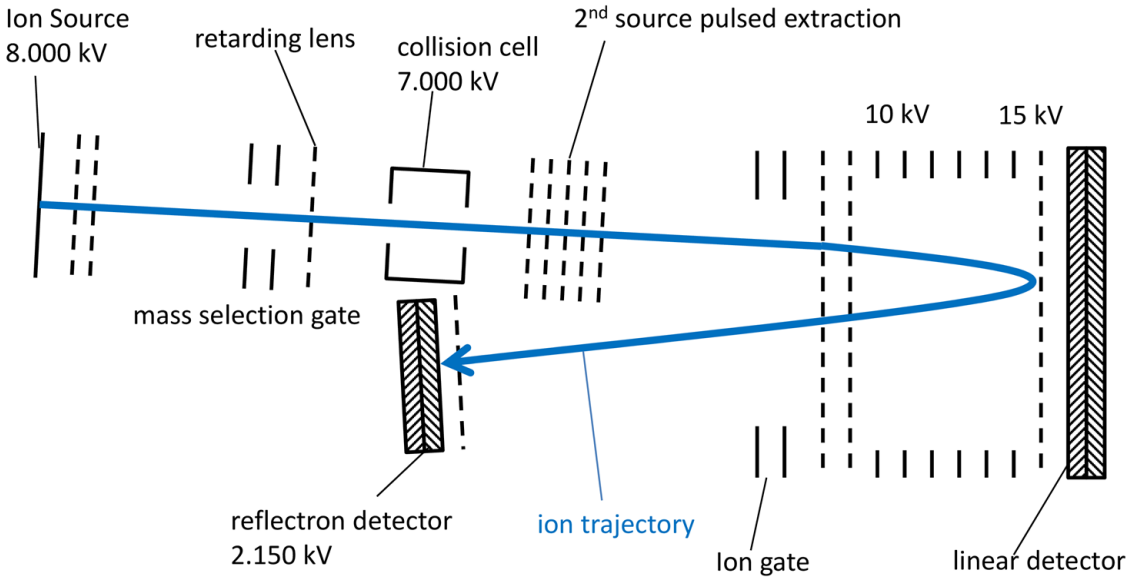

図 4.1: Applied Biosystems 4700 概略図

イオン源 (Ion Source) から衝突室 (Collision Cell) の間に PSD により生成されたイオンは，プリカーサーイオンよりも運動エネルギーが小さいため，衝突室の電圧 ($7kV$) に阻まれ

通過できない．通常は衝突室では，試料ガスと不活性ガスを衝突させてイオンを分解させるが，今回はPSDによる生成物を測定することが目的なので不活性ガスは導入しない．衝突室を出たイオンは，第二加速領域 (2nd Source Plused Extraction) でパルス的に $15kV$ の電位差で加速される．その後，第二加速領域からリフレクトンまでの間およびリフレクトロン内部で分解したイオンは，質量分離されてPSDイオンとして検出器 (Reflectron Detector) で検出される．

4.1.2 試料

本研究では，ペプチドに重原子が結合することによる，ポストソース分解の分解パターンの変化を明らかにすることが目的である．そのため，結合させる原子は質量が大きく，ペプチドと配位結合するものを選ぶ必要がある．そこで，二つの条件を満たす重原子として金原子を用いた．

ヒスチジンは重金属イオンと配位結合しやすい．そこで，ペプチドの一端にヒスチジンを持つペプチドに金イオンを結合させると，ポストソース分解の開裂のパターンや解離率がどのように変化するか調べるためにHis-Gly-Gly-Gly(HG-4)を用意した．さらに，アミノ酸残基の数が異なると，分解パターンがどのように変化するか確かめるため，His-Gly-Gly-Gly-Gly(HG-5)，Ac-His-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-NH_2(HG-9)を用意した．これらのペプチドはPe p tide Institute. Inc(Osaka, Japan)より購入した．

上記の各ペプチドに対して，それぞれペプチド水溶液 (ペプチド: 100 pmol/μ L) とペプチド-塩化金 (III) 水溶液 (ペプチド: 100 pmol/μ L, $AuCl_3$: 815 pmol/μ L) を準備して，MALDI-TOF-MSで測定した．溶媒には純水を用いた．塩化金 (III) はSigma Aldrich Corporation(St. Louis, MO, USA)より購入した．

MALDI-TOF-MSで用いるマトリックスには，α-シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA) を26.4nmol/μ Lになるよう溶媒 (水39.9 %，アセトニトリル60 %，TFA0.1 %) で希釈したものを用いる．CHCA，アセトニトリル，トリフルオロ酢酸はSigma Aldrich Corporation(St. Louis, MO, USA)より購入した．試料の溶媒に用いた純水は，すべて純水製造装置 (PURIC-ω, ORGANO Corporation，Tokyo，Japan) を用いて製造した．

4.1.3 測定手順

MALDIプレートにペプチドサンプルを0.5 μ L，CHCA溶液を0.5 μ L滴下し，乾燥後にマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計で測定した．

最初に質量分析を行い，マススペクトルを得た．次にプロトン付加分子 ($[M+H]^+$) と金イオン付加分子 ($[M+Au]^+$) をプリカーサーイオンとして選択し，プロダクトイオンスペクトルを得た．

この際，通常のプロダクトイオンの測定では，プリカーサーイオンや第 2 加速領域とミラーの間で生成した PSD イオンはイオンゲート（メタステーブルサプレッサー）を用いて除外するが、本実験では PSD イオンの観測を目的としているので，該イオンゲートは OFF に設定して測定した．

測定条件の設定および測定は，4000 Series Explorer (TM) Software(Applied Biosystems Inc., Waltham, MA, USA) を用いて行った．質量分析測定ではレーザーの照射・積算回数は 800 shots/spectrum に設定し，タンデム質量分析ではレーザーの照射・積算回数は 2500 shots/spectrum に設定した．レーザー強度は Laser Intensity 4200 に設定した．

4.1.4 Biemann 標記

ペプチドの質量分析で得られたマススペクトルを解釈する時には，Biemann 標記を用いて各フラグメントイオンを分類する [14] ．図 4.2 のようなペプチド分子イオンが分解して，プロダクトイオンと中性粒子が生成される場合について考える．中性粒子は検出器では検出されず，プロダクトイオンのみが検出される．

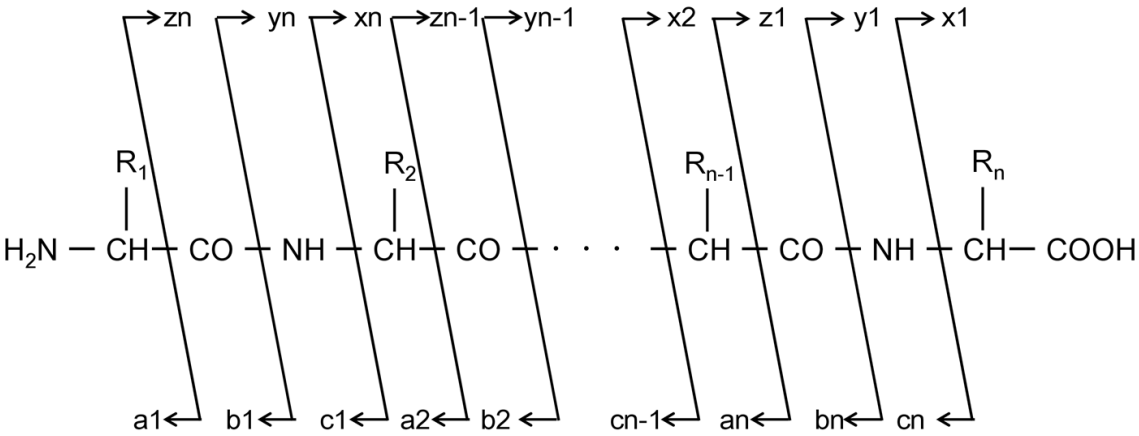

図 4.2: Biemann 標記

まずは，ペプチド主鎖のアミノ基 (N 末端) 側が電荷を持っている場合について述べる．(R)CH-CO 結合間が開裂して生成したイオンは，開裂した位置に合わせて N 末端から順に a1，a2，a3…，an と名付ける．同様に CO-NH のペプチド結合間の開裂により生成したイオンは，開裂した位置に合わせて N 末端から順に b1，b2，b3…，bn と名付ける．NH-(R_{k+1})C 結合間で開裂して生成したイオンは，開裂した位置に合わせて N 末端から順に c1，c2，c3…，

cn と名付ける．

次に，ペプチド主鎖のカルボキシル基 (C 末端) 側が電荷を持っている場合について述べる．(R_{n-k})CH-CO 間の開裂で生成したイオンは，開裂した位置に合わせて C 末端から順に x1，x2，x3…，xn と名付ける．CO-NH 間の開裂により生成したイオンは，開裂した位置に合わせて C 末端から順に y1，y2，y3…，yn と名付ける．NH-(R)CH 間の開裂により生成したイオンは，開裂した位置に合わせて C 末端から順に z1，z2，z3…，zn と名付ける．

4.2　フーリエ変換赤外分光

4.2.1　フーリエ赤外分光光度計

ペプチドに重原子が結合することによるペプチド結合の状態の変化を調べることを目的に，同じサンプルを赤外分光で測定する．

フーリエ変換赤外分光光度計は FT/IR-6100（JASCO Corporation, Tokyo, JPN）を利用し，光源は高輝度セラミック光源を用いた．

全反射測定 (Attenuated Total Reflection: ATR) をするための ATR ユニットとして ATR PRO 410-S(JASCO Corporation, Tokyo, JPN) を用いた．

4.2.2　全反射測定法

赤外分光の測定法には透過法と反射法がある．透過法は固体試料であればフィルム調製や錠剤を用いて，液体試料であれば液体セルを用いて適正な厚さ・濃度に調製し，測定して透過スペクトルを得る手法である．反射法はプリズムに接触した試料表面からの全反射光や拡散反射光を測定することによってスペクトルを得る．透過法に比べると，反射法の試料調整は比較的容易である．本測定では反射法の一つである全反射測定法 (Attenuated Total Reflection: ATR) を用いた [15] ．

ATR 法は次のような手法である．まず，図 4.3 のように吸収のない材質（屈折率 n_1）のプリズムと試料（屈折率 n_2）との接触界面にプリズム側から赤外光が入射する場合を考える．

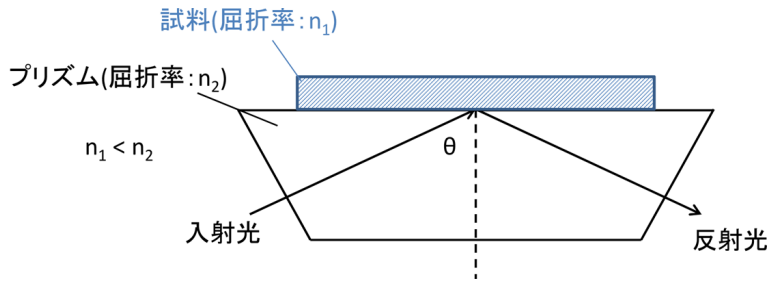

図 4.3: 反射法を用いた赤外分光

このとき，入射角 θ が臨界角 θ_c よりも大きければ，赤外光は界面で全反射する．このとき，赤外光は厳密には反射ではなく，試料側にわずかに侵入する．この侵入する光はエバネセント波と呼ばれる．エバネセント波は，試料に一部吸収されて反射される．ATR 法はこの現象を利用して，試料の吸収スペクトルを検出する方法である [15] ．

4.2.3 試料

金原子がペプチドに結合すると，分子内の種々の官能基（His のイミダゾール基やアミド）の振動や回転といった運動性に変化が生じるのではないかと考えられる．そこで，フーリエ変換赤外分光光度計 (Fourier Transform Infrared spectroscopy: FTIR) を用いて，金イオンが結合したことによるペプチド: His-Gly-Gly-Gly(HG-4) の分子振動の変化を測定した．また，金イオンの配位する位置はヒスチジンの側鎖だと予想される．金イオンの配位する位置を確かめるため，ヒスチジン側鎖と同じ構造を持つイミダゾールも同様に，金イオンが結合したことによる分子振動の変化を測定した．

ペプチド水溶液 (HG-4: 1.67 nmol/ μ L)，ペプチド-塩化金 (III) 水溶液 (HG-4: 1.67 nmol/ μ L, $AuCl_3$: 1.83 nmol/ μ L) を準備してフーリエ変換赤外分光光度計で測定した．イミダゾールについても同様にイミダゾール水溶液 (1.67 nmol/ μ L)，イミダゾール-塩化金 (III) 水溶液 (HG-4: 1.67 nmol/ μ L, $AuCl_3$: 1.83 nmol/ μ L) を準備してフーリエ変換赤外分光光度計で測定した．これらのサンプルの溶媒には純水を用いた．

HG-4 は Peotide Institute. Inc（Osaka, JPN）より購入した．イミダゾールは Sigma Aldrich Corporation（St. Louis, MO, USA）より購入した．試料の溶媒に用いた純水はすべて純水製造装置 (PURIC-ω, ORGANO Corporation，Tokyo，JPN) を用いて製造した．

4.2.4 測定手順

波数範囲は 7800-400 cm^{-1}，積算回数は 128 回，分解能は 4.0 cm^{-1} に設定した．サンプルプレートにサンプルを 5 μ L 滴下して，乾燥後に全反射測定法で測定する．ソフトウェアは Spectra Manager Version2（JASCO Corporation, Tokyo, JPN）を用いた．

第5章　ポストソース分解によるフラグメントイオンの測定

5.1　マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計による測定

プロトンの約 197 倍の質量をもつ金イオンがペプチドに結合すると，プロトンが結合したペプチドに比べてポストソース分解のパターンが変化すると思われる．まずは，用意した中では最も残基数が少ないペプチドである His-Gly-Gly-Gly(HG-4) に $AuCl_3$ を加えて測定した．得られたマススペクトルが図 5.1 である．

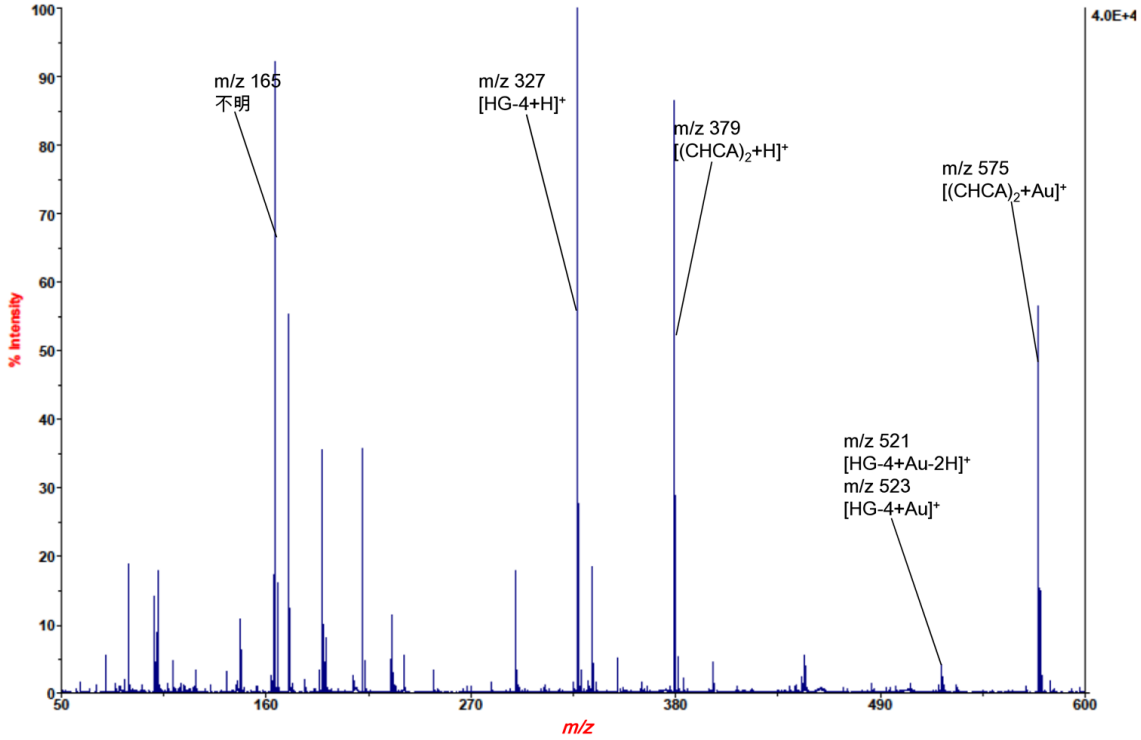

図 5.1: HG-4，$AuCl_3$ 混合溶液のマススペクトル

$[HG\text{-}4+H]^+$(m/z 327) が検出された．$[HG\text{-}4+Au]^+$(m/z 523) がわずかに検出された．m/z 521 のイオンもわずかに検出されたが，$[HG\text{-}4+Au]^+$ からプロトンが二つ脱離した $[HG\text{-}4+Au\text{-}2H]^+$ ではないかと考えられる．m/z 190 のピークは $[CHCA+H]^+$，m/z 327 は $[(CHCA)_2+H]^+$，

m/z 575 のピークは $[(CHCA)_2+Au]$ であり，いずれもマトリックス由来のイオンである．

$[HG\text{-}4+H]^+$ の強度に対して $[HG\text{-}4+Au]^+$ の強度が小さい．期待したより金イオンの付加体が少なかったが，これは試料を測定前に強酸性のマトリックス溶液と混ぜたためと考えられる．しかし，金イオンの効果を見るには十分であり，次の測定に供した．

図 5.1 の $[HG\text{-}4+H]^+(m/z\ 252)$ と $[HG\text{-}4+Au]^+(m/z\ 448)$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトルが図 5.2 である．

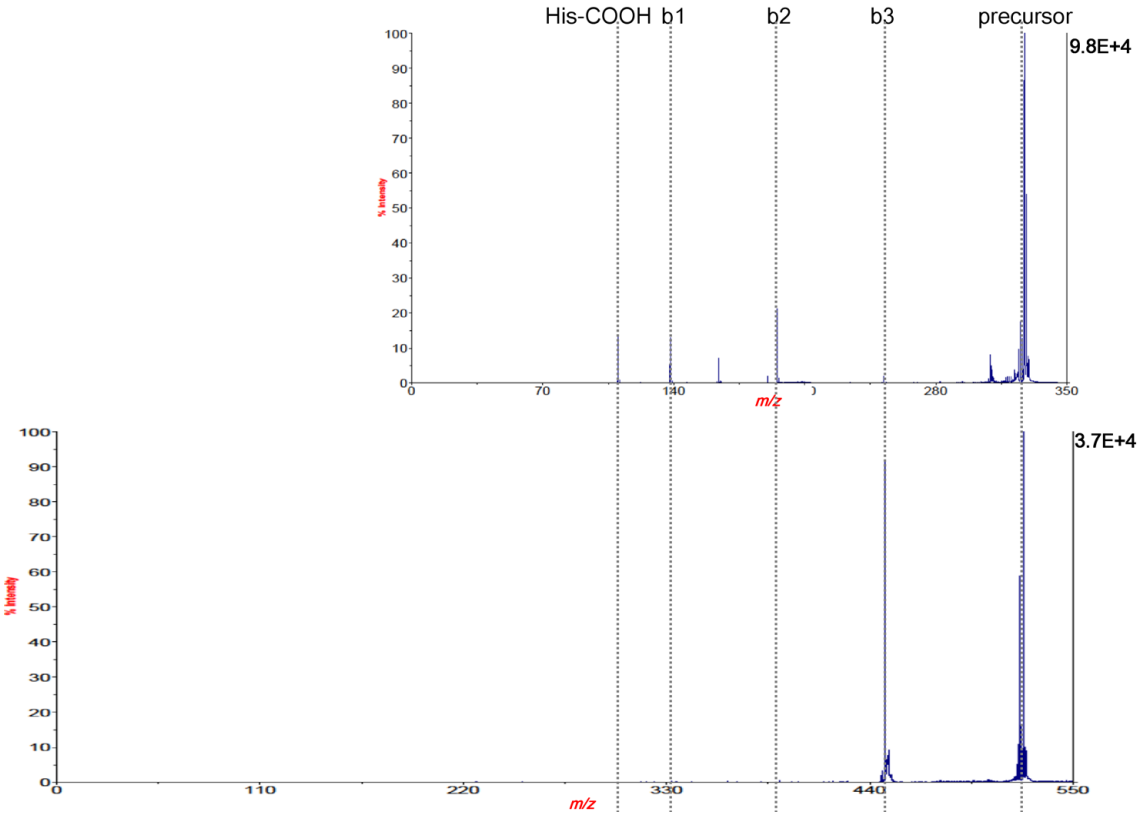

図 5.2: $[HG\text{-}4+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（上），$[HG\text{-}4+Au]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（下）

$[HG\text{-}4+H]^+$ のプロダクトイオンとして $[His\text{-}COOH]^+(m/z\ 110)$，b1($m/z$ 138)，b2(m/z 195)，b3(m/z 252) が検出された．$[HG\text{-}4+Au]^+$ のプロダクトイオンとして b3(m/z 448) が検出された．

$[HG\text{-}4+Au]^+$ のプロダクトイオンスペクトルは $[HG\text{-}4+H]^+$ のプロダクトイオンスペクトルと比べて，b3 の強度が大きく増加したが，それ以外のプロダクトイオンの強度は減少した．

プロダクトイオンスペクトルの b3 付近（$[HG\text{-}4+H]^+$ のプロダクトイオン：m/z 252 の b3，$[HG\text{-}4+Au]^+$ のプロダクトイオン：m/z 448 の b3）を拡大したものが図 5.3 である．

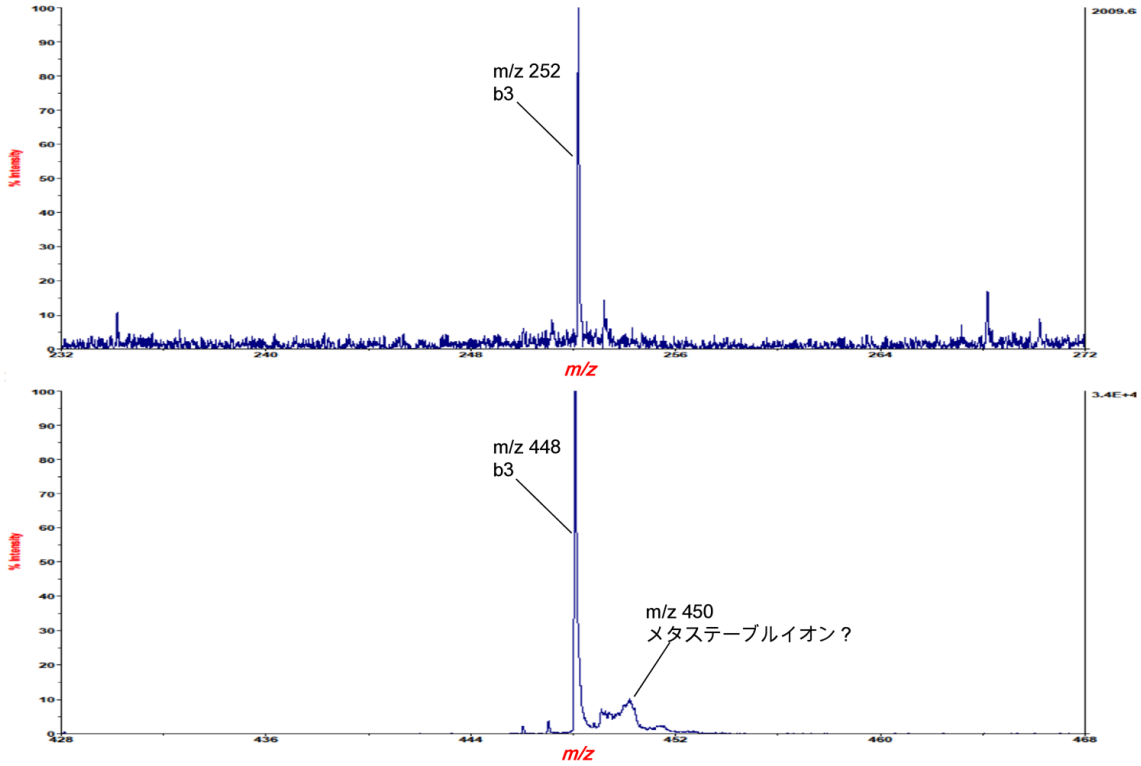

図 5.3: b3 付近を拡大した $[HG\text{-}4+H]^+$ プロダクトイオンスペクトル（上），b3 付近を拡大した $[HG\text{-}4+Au]^+$ プロダクトイオンスペクトル（下）

$[HG\text{-}4+Au]^+$ のプロダクトイオンスペクトルにおいて b3 が強く検出され，b2,b1 は逆に減弱した．イオン化の際に得た内部エネルギーによる自己崩壊過程において，質量数 197 という重原子が付加したことによって分子内の質量分布が大きく偏移したために，分子全振動モードが変化したためだと推測された．そのことにより，分子がどのように分解し，該結果を与えたのかは量子化学計算による分子内の化学結合のエネルギーを調べる等が必要があるが，経験的に，ペプチドの C 末端側は切断され易いため，分子振動モードの変化により C 末端アミノ酸が切断された b3 が他のイオンに比して顕著に検出されたものと考えられる．

アミノ酸残基の数を変えても同様の現象が見られるのか確かめるため，主鎖の長さを変えて測定した．His-Gly-Gly-Gly-Gly(HG-5) に $AuCl_3$ を加えて測定して得られたマススペクトルが図 5.4 である．

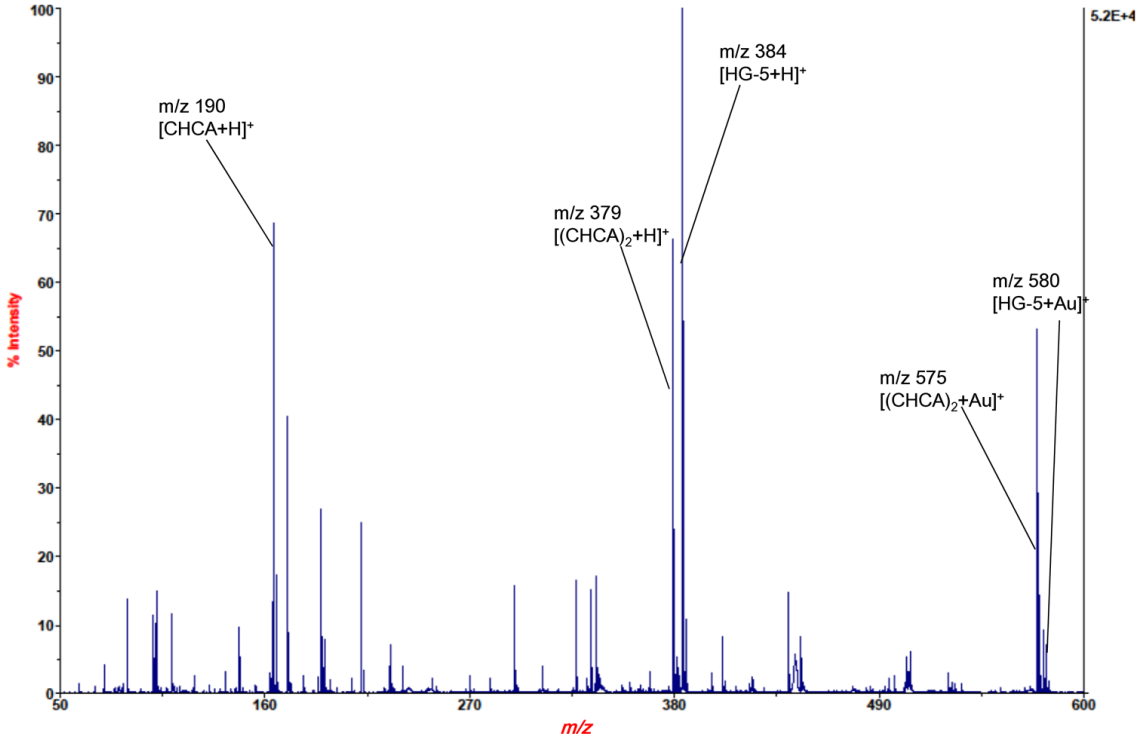

図 5.4: HG-5, $AuCl_3$ 混合溶液のマススペクトル

$[HG\text{-}5+H]^+(m/z\,384)$ が検出された．$[HG\text{-}5+Au]^+(m/z\,580)$ がわずかに検出された．m/z 190 のピークは $[CHCA+H]^+$，m/z 327 のピークは $[(CHCA)_2+H]^+$，m/z 575 のピークは $[(CHCA)_2+Au]$ であり，いずれもマトリックス由来のイオンである．

図 5.4 の $[HG\text{-}5+H]^+$(m/z 383) と $[HG\text{-}5+Au]^+$(m/z 579) をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトルが図 5.5 である．

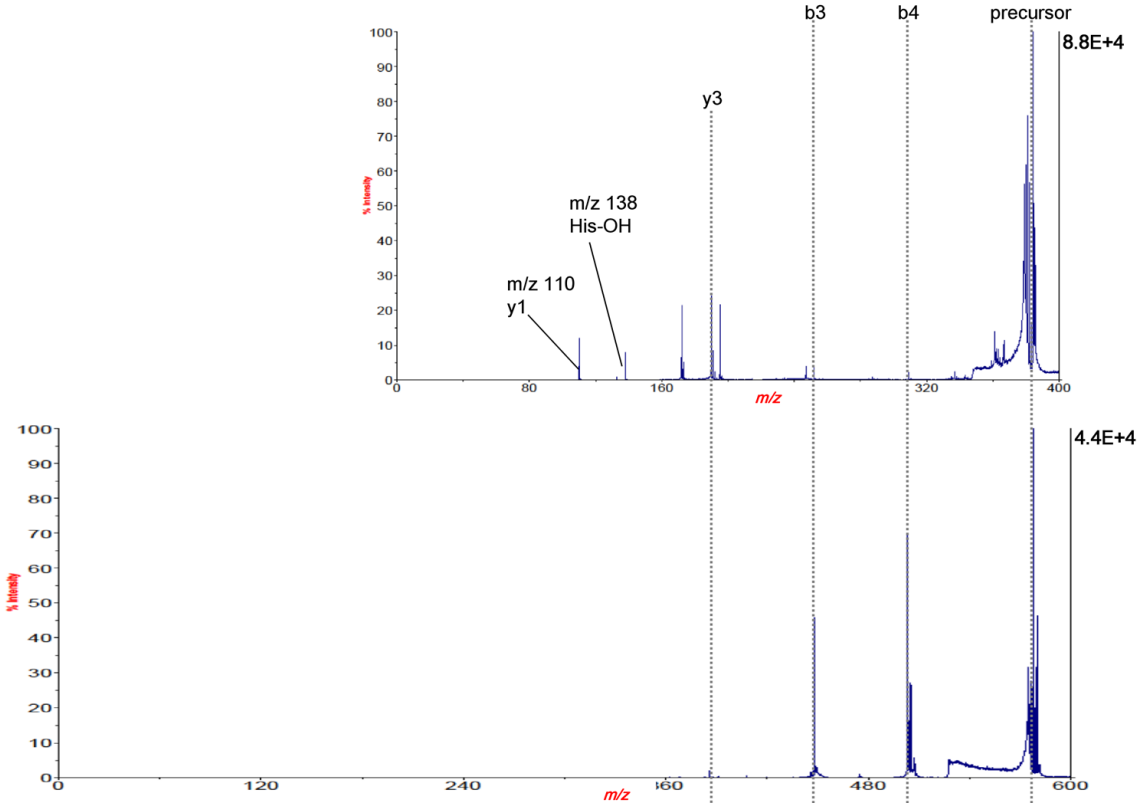

図 5.5: $[HG\text{-}5+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（上），$[HG\text{-}5+Au]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（下）

$[HG\text{-}5+H]^+$ のプロダクトイオンスペクトルにおいては，y1(m/z 110)，$[His\text{-}OH]^+$ と思われるイオン (m/z 138)，y3(m/z 190) などが検出された．$[HG\text{-}5+Au]^+$ のプロダクトイオンスペクトルでは，$[HG\text{-}5+H]^+$ で得られていたプロダクトイオンの強度が減少し，b3(m/z 448) や b4 から水素原子が二つ脱離したイオン (m/z 503)，b4(m/z 505) などが強く検出された．HG-5 についても HG4 と同様に，C 末端が切断された b4 イオン，さらにもう 1 残基切断された b3 イオンに対しては，メタステーブルイオンが顕著に観測されている．

次に，さらに残基数の大きいペプチドに塩化金 (III) を加えて測定した．Ac-His-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-NH_2(HG-9) に $AuCl_3$ を加えて測定したものが図 5.6 である．

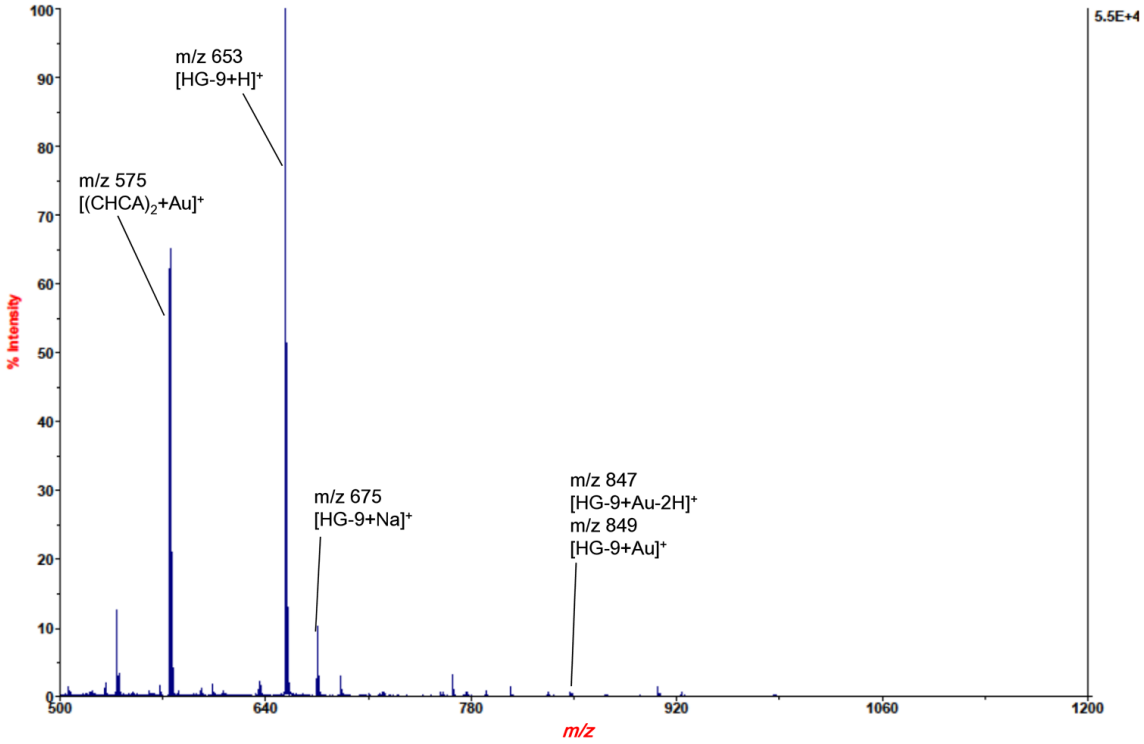

図 5.6: HG-9，$AuCl_3$ 混合溶液のマススペクトル

$[HG\text{-}9+H]^+(m/z\ 653)$ が検出された．$[HG\text{-}9+Au\text{-}2H]^+(m/z\ 647)$ がわずかに検出された．$[HG\text{-}9+Au]^+(m/z\ 649)$ がわずかに検出された．

図 5.6 の $[HG\text{-}9+H]^+$(m/z 653) と $[HG\text{-}9+Au]^+$(m/z 849) をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトルが図 5.7 である．

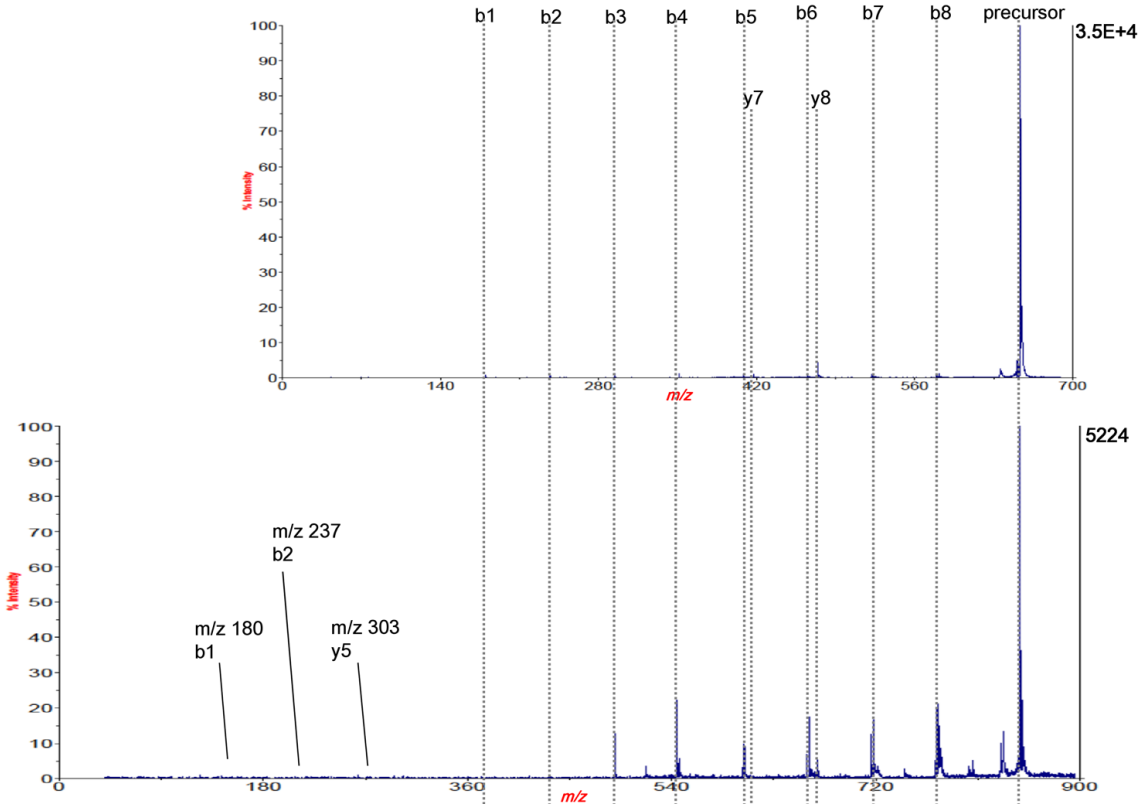

図 5.7: $[HG\text{-}9+H]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（上），$[HG\text{-}9+Au]^+$ をプリカーサーイオンとして選択したプロダクトイオンスペクトル（下）

$[HG\text{-}9+H]^+$ のプロダクトイオンとして，b1〜b8，y7，y8 が検出された．$[HG\text{-}9+Au]^+$ のプロダクトイオンとして，b3〜b8 が検出された．$[HG\text{-}9+Au]^+$ のプロダクトイオンスペクトルでは $[HG\text{-}9+H]^+$ のプロダクトイオンスペクトルと比べて，b3〜b8 の強度が増加した．また，b1，b2，y7，y8 は検出されなくなった．

以上の測定結果から，金イオンはヒスチジンに付加していると考えられ，そこから最も離れた位置で (Chargte-remote site) 開裂が有意に促進されることが示唆されている．さらに，それらのイオンに伴って少しずれた位置に未知のイオンが観測されている．この未知のイオンは，第二加速領域で再加速された後の自由空間での分解により生成されたメタステーブルイオンだと考えられる．イオンミラー内で，所定のエネルギーよりも低いために本来の軌道とは異なる軌道を通過したことによりディフォーカスされ，また，プリカーサーイオンと同速度でミラーに入射したために，所定のイオンよりも少し高 m/z 側に検出されたものと考えられる．

5.2　フーリエ変換赤外分光による測定

MALDI-TOF-MS の結果から，金原子がペプチドに付加することによって，ペプチドの分子振動が変化してペプチド分子イオンの分解が引き起こされている可能性がある．また，金イオン結合しているところでも分子振動が変化する可能性がある．そこで，金イオンがペプチド構造内のどの結合に変化を与えているか調べるため，フーリエ変換赤外分光光度計 (Fourier Transform Infrared spectroscopy: FTIR) を用いて，金原子が付加したことによるペプチドの分子振動の変化を測定した．以下，文献をもとに IR スペクトルのピークの帰属を行った [16] [17] .

アミド結合 (C-N) の吸収波長は 1575-1480 cm^{-1}，1301-1229 cm^{-1} である．この波長域のピークが塩化金 (III) を加えたことによりシフトするかどうかを確認した．アミノ酸を構成する水素・炭素・窒素・酸素に比べて質量が大きい金イオンが結合すれば，ペプチド結合のピークが低い方にシフトするのではないかと予想した．

図 5.8 に His-Gly-Gly-Gly に $AuCl_3$ を加える前後の IR スペクトルの結果を示す．

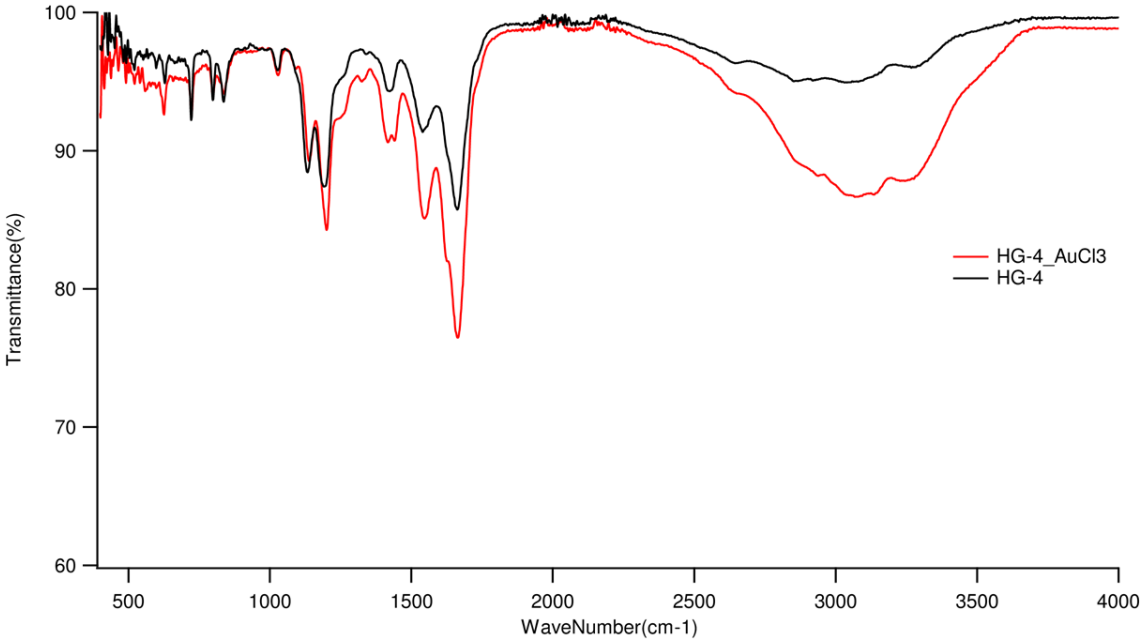

図 5.8: HG-4 の IR スペクトル（黒），HG-4，$AuCl_3$ 混合物の IR スペクトル（赤）

この結果からは，金イオンの付加によるピークのシフトは見られなかった．波数 3500～2500cm^{-1} 付近で相対的に透過率が減少した（波数 3136 cm^{-1} で最大 8.6 %減少している）．この波数範囲に吸収帯を持つ N-H の伸縮運動（波数 3520～3320 cm^{-1}）や O-H の伸縮運動（波数 3300～2500 cm^{-1}）が変化したと思われる．そのため，金イオンがイミダゾール基に結合していることを示唆している．

アミド結合のピークの波数がシフトしていないか調べるために，波数 1800～1000cm^{-1} 付近を拡大した HG-4 の IR スペクトルが図 5.9 である．

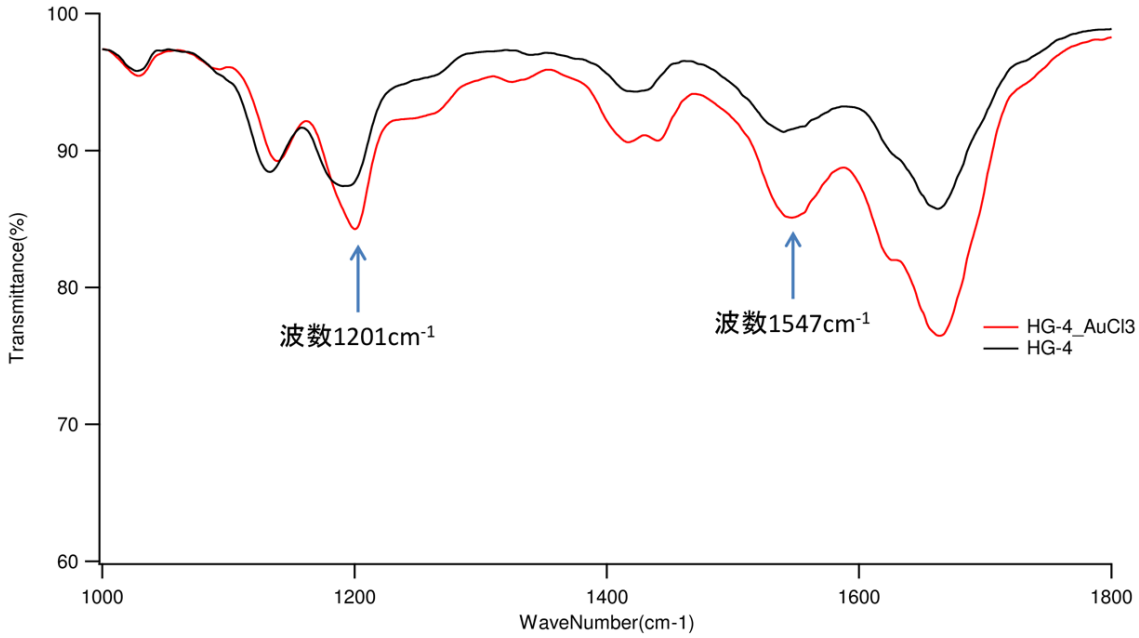

図 5.9: HG-4 の IR スペクトル（黒），HG-4，$AuCl_3$ 混合物の IR スペクトル（赤） （波数 1800～1000cm^{-1}）

アミド結合の吸収帯である 1575-1480 cm^{-1} や 1301-1229 cm^{-1} の波数範囲を確認したところ，塩化金 (III) を加えることにより波数 1540 cm^{-1} にあったピークが波数 1547 cm^{-1} にシフトした．

波数 1191 cm^{-1} にあったピークが，塩化金 (III) を加えると 1201 cm^{-1} にシフトした．その波数範囲にある原子団としては，アミンを含む C-C-N の変角振動（吸収波長 : 1230～1100 cm^{-1}）が考えられる．そのため，金イオンの結合によって C-C-N の構造を含むペプチド主鎖またはイミダゾール環において，変角振動が変化した可能性がある．

金イオンがペプチド内のどの官能基に配位結合しているか，いくつの官能基と配位結合しているかによって，ポストソース分解が起きやすさに違いが出てくる可能性がある．そこで，HG-4 に塩化金 (III) を加えたときに金イオンがどこに結合しているかを確認するため，ヒスチジンの側鎖と同じ構造であるイミダゾールに塩化金 (III) を加えて測定した．金イオンがヒスチジンの側鎖に結合することにより，N-H の吸収波長である 3300 cm^{-1} よりも低い波数範囲に N-Au のピークが現れるのではないかと考えられる．イミダゾールに塩化金を加えて FTIR を用いて測定を行ったものが図 5.10 である．

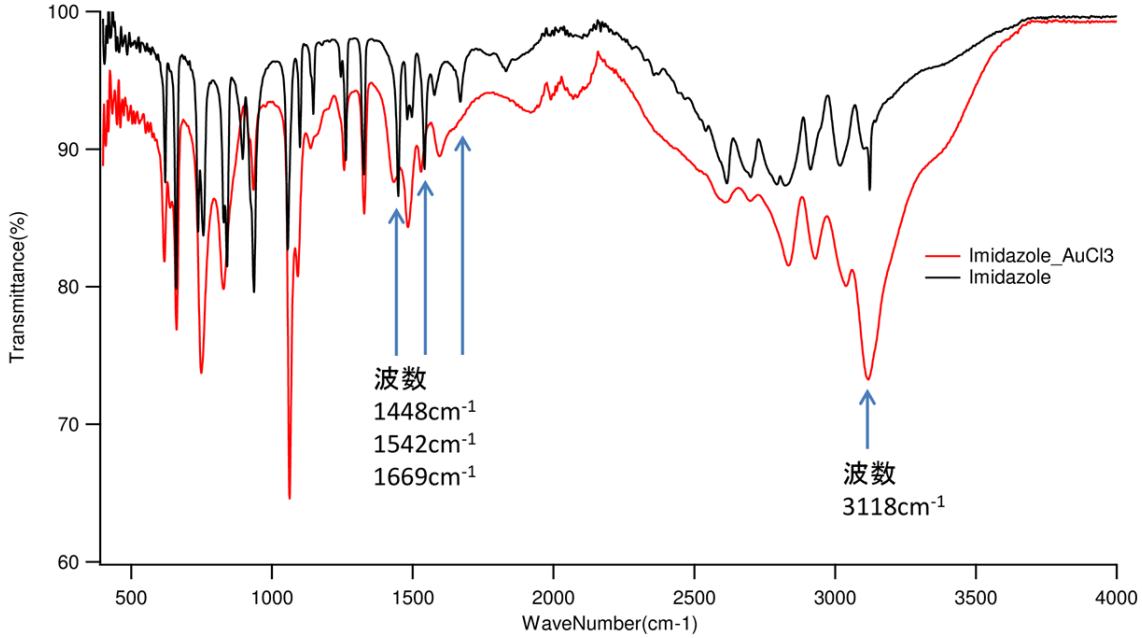

図 5.10: イミダゾールの IR スペクトル (黒)，イミダゾール，$AuCl_3$ 混合物の IR スペクトル (赤)

塩化金 (III) を加えると，波数 3123 cm^{-1} にあったピークが波数 3118 cm^{-1} の位置にシフトした．金イオンが結合することによって，N-H 伸縮運動（波数 3520〜3320 cm^{+}）のピークが波数の小さい方にシフトしたと考えられる．

塩化金 (III) を加えると，波数 1669 cm^{-1}，波数 1542 cm^{-1}，波数 1448 cm^{-1} にあったピークが検出されなくなった．それぞれ，C=C の伸縮運動（波数 1680〜1540 cm^{-1}），C-C 伸縮運動（波数 1560〜1510 cm^{-1}），C-C の伸縮運動（波数 1450〜1400 cm^{-1}）であると思われる．検出されなくなった理由として，金イオンが結合することによってピークが別の波数にシフトした可能性がある．

HG-4 に塩化金 (III) を加えて FTIR で測定すると，ペプチド結合のピークの波数がわずかに大きくなった．予想と異なり，波数が大きくなった理由は不明である．より波数分解能の高い装置を用いて測定を行えば，波数 1301-1229 cm^{-1} にあると思われるペプチド結合のピークの変化を観測できる可能性がある．

金イオンはイミダゾール基に結合していることが示唆された．しかし，金イオンがイミダゾールへの結合したことによるピークのシフトは，残念ながらはっきりと検出できなかった．

イミダゾールでは塩化金 (III) を加えることにより，N-H と思われるピークの波数のシフトが観測された．つまり，イミダゾールの窒素原子に金イオンが結合していた可能性がある．その一方で，HG-4 では塩化金 (III) を加えても N-H のピークのシフトは観測されなかった．その理由として，HG-4 では C=O の吸収が重なって，N-H のピークが見えなくなっていたことが考えられる．

第6章　シミュレーション

6.1　計算手法

測定結果ではペプチドに金イオンが結合すると，金イオンの結合部位の遠くから分解が起きやすくなるという結果が得られた．そこで，なぜ金イオンの結合部位の遠くから分解しやすくなったかを調べるために，シミュレーションを行った．

分子内の原子配置などを求める一般的な計算手法として，分子動力学法がある．分子動力学では物質を多粒子系としてモデル化し，系の力学法則に従って時間発展を求める．そして，原子や分子の一つ一つの動きを追うことで物質の特性を調べる手法である [18] ．特にピコ秒単位での現象の説明や理解，実験で求めにくい量を得ることができる．しかし，力の計算量が粒子数の 2 乗に比例するので，大規模な系では膨大な計算時間が必要になる [19] ．

分子動力学以外の手法には，弾性ネットワークがある．弾性ネットワークはタンパク質を構成するアミノ酸をそれぞれひとつの質点に置き換えて，同じ質量の質点を同じばね定数のばねでつないだモデルを用いて計算を行う手法である [20] ．弾性ネットワークは第一原理からは計算できないミリ秒から秒単位の時間スケールでの生体分子などの働きを，現実的に計算するために作られたモデルである．アミノ酸の種類など化学的な性質を無視して極端に単純化されているが，タンパク分子の性質をよく説明できることが知られている [21] ．しかし，各アミノ酸残基や結合した金属の質量の影響を含めた計算はできない．

分子動力学は原子数が多い分子では計算の手間がかかり，弾性ネットワークでは質点の質量を考慮していないため，本研究の測定結果の考察には適さない．そこで，ペプチドでも計算できるように単純化し，質量の違いも考慮したモデルを考えた．図 6.1 のようにペプチドの各アミノ酸残基を質点に置き換えて，4 つの質点をばねで直列につないだ一次元の His-Gly-Gly-Gly のモデルを用いた．

質点の運動エネルギー，ばねの弾性エネルギー，ばねの振幅と振動数を計算して，二つのモデルに対して比較した．このときに複数の初期条件で確認し，全初期条件に共通してどのような傾向がみられるか確認した．

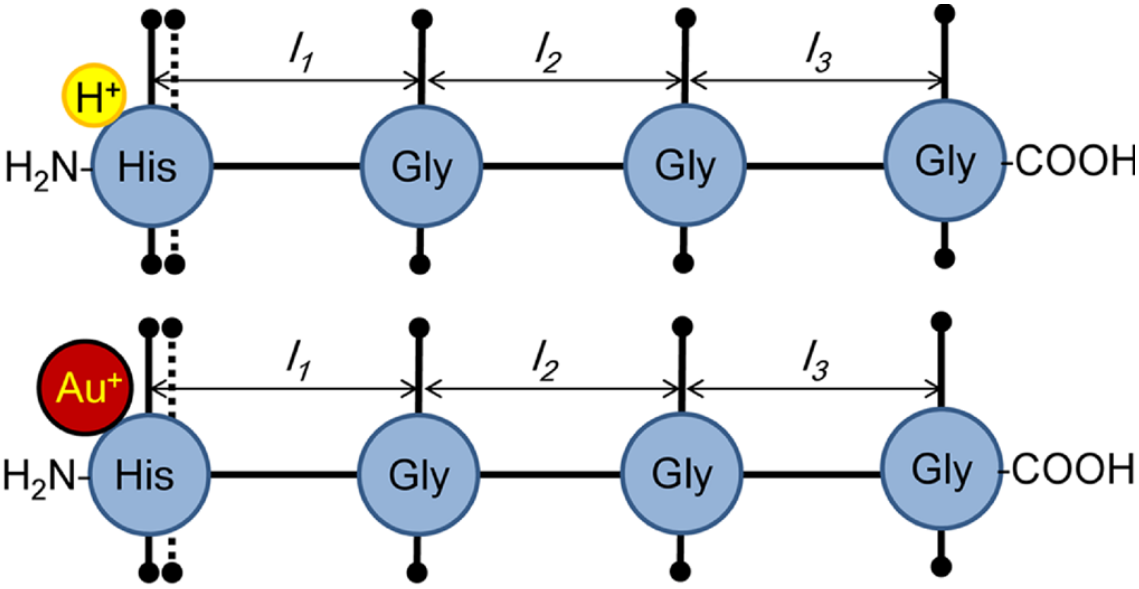

図 6.1: 一次元 His-Gly-Gly-Gly モデル：プロトンが結合したペプチド (上)，金イオンが結合したペプチド (下)

質点の運動エネルギーが増加すればその質点をつなぐばねの部分で分解が起きやすくなり，ばねの弾性エネルギーが増加すればそのばねの部分で分解が起きやすくなるのではないかと考えられる．

6.2 一次元ペプチドモデル

各質点の間のばねを左側からばね 1，ばね 2，ばね 3 とする．各質点を左側から質点 1，質点 2，質点 3，質点 4 とする．

それぞればねの自然長を l_1，l_2，l_3 とおき，各ばねの自然長からのずれを Δl_1，Δl_2，Δl_3 とおく．

それぞれの質点の質量を m_1，m_2，m_3，m_4 とおく．各質点の左側から質点の位置を x_1，x_2，x_3，x_4 とおく．各質点の左側から質点の速度を v_1，v_2，v_3，v_4 とおく．ばね定数を k とおく．図 6.2 のプロトンが結合したペプチドでは各質点の質量を次のように決めた．

$$m_1 = 139 \tag{6.1}$$

$$m_2 = 57 \tag{6.2}$$

$$m_3 = 57 \tag{6.3}$$

$$m_4 = 74 \tag{6.4}$$

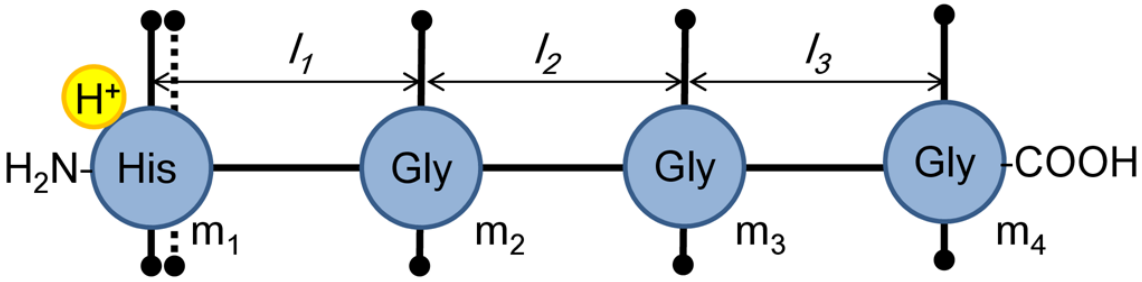

図 6.2: プロトンが結合したペプチドのモデル

図 6.3 の金イオンが結合したペプチドでは各質点の質量を次のように決めた.

$$m_1 = 335 \tag{6.5}$$

$$m_2 = 57 \tag{6.6}$$

$$m_3 = 57 \tag{6.7}$$

$$m_4 = 74 \tag{6.8}$$

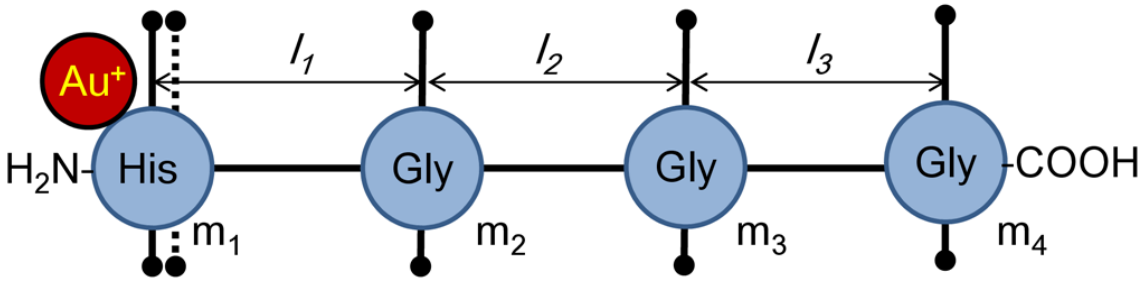

図 6.3: 金イオンが結合したペプチドのモデル

質点の質量の値はそれぞれアミノ酸残基の質量に対応した値を用いた（ヒスチジン (H_2N-His) 138，グリシン (Gly) 57，グリシン (Gly-COOH) 74，プロトン 1，金 197 ）.

一次元モデルに対して次の運動方程式が成り立つ.

$$m_1 {x_1}'' = k\Delta l_1 \tag{6.9}$$

$$m_2 {x_2}'' = k(\Delta l_2 - \Delta l_1) \tag{6.10}$$

$$m_3 {x_3}'' = k(\Delta l_3 - \Delta l_2) \tag{6.11}$$

$$m_4 {x_4}'' = -k\Delta l_3 \tag{6.12}$$

以上の式から，次の常微分方程式が求められる.

$$\frac{dx_1}{dt} = v_1 \tag{6.13}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = v_2 \tag{6.14}$$

$$\frac{dx_3}{dt} = v_3 \tag{6.15}$$

$$\frac{dx_2}{dt} = v_4 \tag{6.16}$$

$$\frac{dv_1}{dt} = \frac{k\Delta l_1}{m_1} \tag{6.17}$$

$$\frac{dv_2}{dt} = \frac{k(\Delta l_2 - \Delta l_1)}{m_2} \tag{6.18}$$

$$\frac{dv_3}{dt} = \frac{k(\Delta l_3 - \Delta l_2)}{m_3} \tag{6.19}$$

$$\frac{dv_4}{dt} = -\frac{k\Delta l_3}{m_4} \tag{6.20}$$

ばね定数 k は $k = 100$ とおいた．質点の質量が 100 程度であるため，振動の周波数 ω は $\omega = \sqrt{\frac{k}{m}}$ より 1 程度のオーダーになると思われる．周期 T は $T = \frac{2\pi}{\omega}$ であることから，T は 6 程度になると思われる．1 周期毎に数百点程度を取るように，時間刻み Δt は $\Delta t = 0.01$ とおいた．数十周期程度の時間変動を見れば，十分に傾向が理解できると考えて時間最大値 t_{max} は $t_{max} = 100$ とおいた．

各ばねの弾性エネルギーを E_{B_1}，E_{B_2}，E_{B_3}，各質点の運動エネルギーを E_{K_1}，E_{K_2}，E_{K_3}，E_{K_4} とする $(n = 1, 2, 3, 4)$．各ばねの弾性エネルギー E_{B_n} は次の式から計算した．

$$E_{B_n} = \frac{1}{2}k\Delta l_n^2 \tag{6.21}$$

各質点の運動エネルギー E_{K_n} は次の式から計算した．

$$E_{K_n} = \frac{1}{2}m_n v_n^2 \tag{6.22}$$

運動の初期条件として，ばねの伸びを $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3)$ = (0.1, 0.0, 0.0), (0.0, 0.1, 0.0), (0.0, 0.0, 0.1), (0.1, 0.1, 0.0), (0.0, 0.1, 0.1), (0.1, 0.0, 0.1), (0.1, 0.1, 0.1) とおいた．

乗微分方程式の解法としてルンゲクッタ法 (Runge-Kutta method) を用いた．ルンゲクッタ法ではある関数 $x = x(t)$ について，初期値 $x(t_0) = x_0$ と，$x(t)$ の常微分方程式 $\frac{dx}{dt} = f(t, x)$ が与えられているときに，連続変数である t を有限個の点列 $t_1, t_2, t_3, \cdots, t_k, \cdots t_n$ で近似して，x_k の近似値を求める．このとき，t の刻み幅を dt とおく．

与えられた条件から，1 段法であるオイラー法では刻み幅 dt に対する変化量 k を求めて，数値計算を行っていく．段数が大きいほど誤差は小さくなるが，求める変化量 k が多くなる．m が 5 より大きくなると公式が急激に複雑になる．そのため，実用的な 4 段法がよく用いられている [22] ．

4 段法については，次のルンゲクッタの公式が有名である．

$$k_1 = tf(t_n, x_n) \tag{6.23}$$

$$k_2 = tf(t_n + \frac{dt}{2}, x_n + \frac{k_1}{2}) \tag{6.24}$$

$$k_3 = tf(t_n + \frac{dt}{2}, x_n + \frac{k_2}{2}) \tag{6.25}$$

$$k_4 = tf(t_n + dt, x_n + k_3) \tag{6.26}$$

$$x_{n+1} = x_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \tag{6.27}$$

4 段法では誤差が Δt の 4 乗に比例する．Δt を $\frac{1}{2}$ にすると誤差は $\frac{1}{16}$ になる．

計算プログラムは C++言語で記述した．コンパイラは Microsoft Visual Studio Express 2013 for Desktop[Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA] を用いた．

上記の手法を用いて，ばねの伸びの時間変化が得られる．求められた結果を用いて，ばねの振幅と振動数をフーリエ変換により計算した．

フーリエ変換は，MATLAB R2012a (7.14.0.739) 64-bit (win64)(MathWorks. Inc., Natics, MA, USA) を用いて行った．

計算プログラムの詳細は第 8 章にて説明する．

6.3 各ばねの振幅と周波数

各ばねがどのような振幅や振動数で振動しているか確かめるため，ばねの自然長からのずれの時間変動を求めた．

各ばねの Δl_1，Δl_2，Δl_3 の時間変動の一例が図 6.4 である．

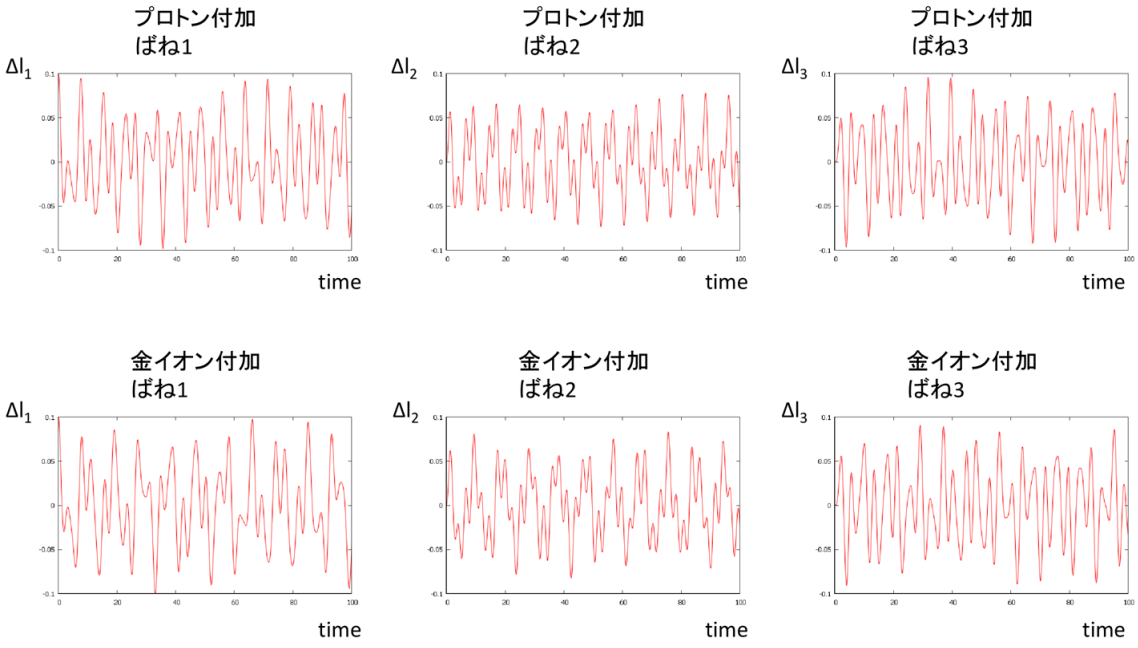

図 6.4: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.0, 0.0)$，各ばねの Δl_1, Δl_2, Δl_3 の時間変動

次に周波数成分や振幅を求めるため，フーリエ変換を用いて各ばねの周波数スペクトルを計算した一例が図 6.5 である．時間最大値 Δt_{max}=1000 までの範囲でばねの自然長からのずれの時間変動を求めて，フーリエ変換を行った．

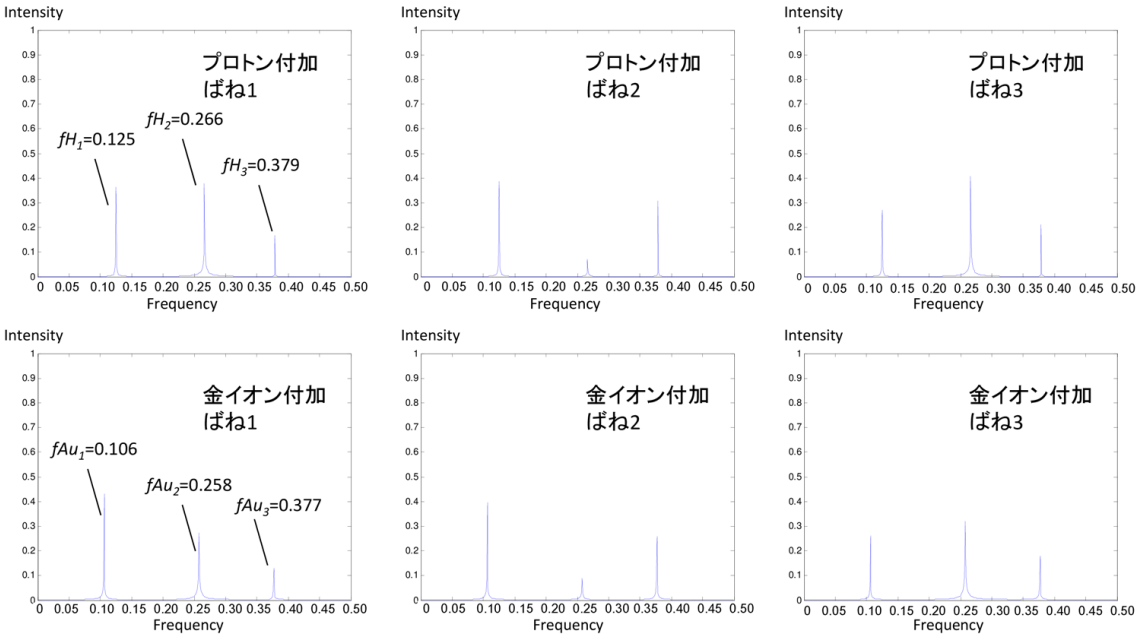

図 6.5: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.0, 0.0)$，各ばねの基準振動の周波数と振幅

各ばねの振動スペクトルが 3 種類の振動モード（基準振動）の重ね合せであることが分かった．

プロトン付加イオンにおける基準振動の周波数を，周波数の低い振動モードから f_{H_1}，f_{H_2}，f_{H_3} とおくと，$f_{H_1} = 0.125$，$f_{H_2} = 0.266$，$f_{H_3} = 0.379$ であった．プロトン付加イオンにおける基準振動の周波数を，周波数の低い振動モードから f_{Au_1}，f_{Au_2}，f_{Au_3} とおくと，$f_{Au_1} = 0.106$，$f_{Au_2} = 0.258$，$f_{Au_3} = 0.377$ であった．金イオンの付加により，3 種類の振動モードがそれぞれ周波数の小さい方にシフトした．ばね 2 においては，f_{H_2}，f_{Au_2} の強度が小さくなる．m_1 を大きく変化させたが，振幅にはあまり変化がなかった．

金イオンの結合によって，ばね 2，ばね 3 の振幅がばね 1 の振幅よりも急激に大きくなったりはしなかった．他の初期条件でも同様であった．

6.4　各ばねの弾性エネルギー

ペプチドモデルのどのばねで分解が起きやすくなるか確かめるため，金イオン結合による各ばねの弾性エネルギーの変化を計算した．特定のばねに弾性エネルギーが集中すれば，そのばねで分解が起きやすくなるのではないかと考えられる．質点をつなぐばね 1，ばね 2，

ばね 3 の弾性エネルギーの時間変化を求めた一例が図 6.6 である．

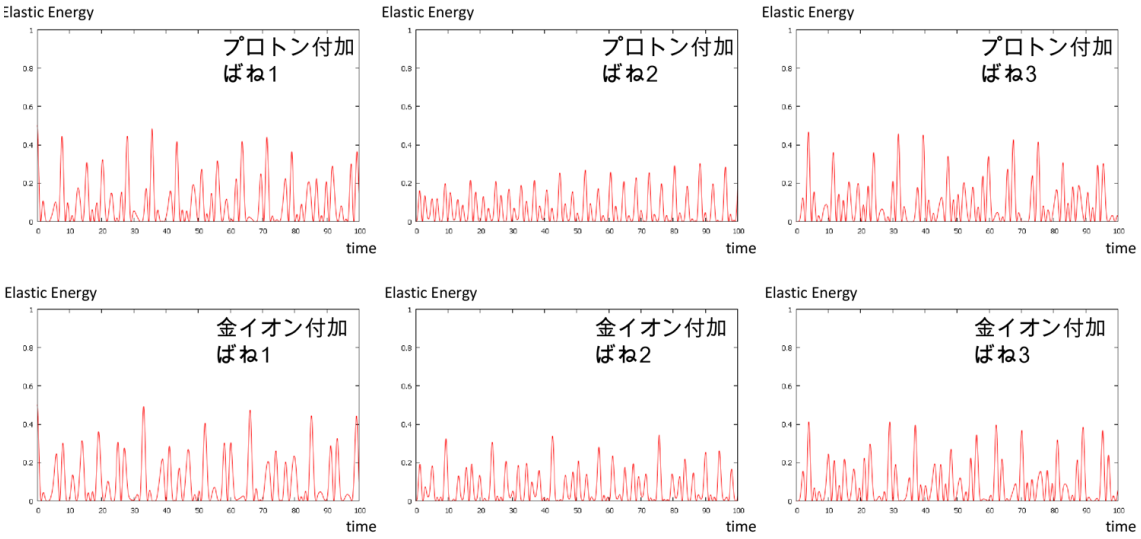

図 6.6: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.0, 0.0)$ での各ばねの弾性エネルギーの時間変化

図 6.6 では，金イオンの結合によって弾性エネルギーに大きな変化はみられなかった．

他のどの初期条件についても，金イオンが結合したことによって弾性エネルギーに大きな変化は見られなかった．以上の結果から，ばねの弾性エネルギーの時間変化からはペプチドの分解が起きやすくなることは示せなかった．

6.5　各質点の運動エネルギー

各ばねの弾性エネルギーに大きな違いがみられなかった．次に各質点の運動エネルギーについて調べた．それぞれの初期条件に対して，質点 1，質点 2，質点 3，質点 4 の運動エネルギーの時間変化を比較した例が図 6.7-6.9 である．

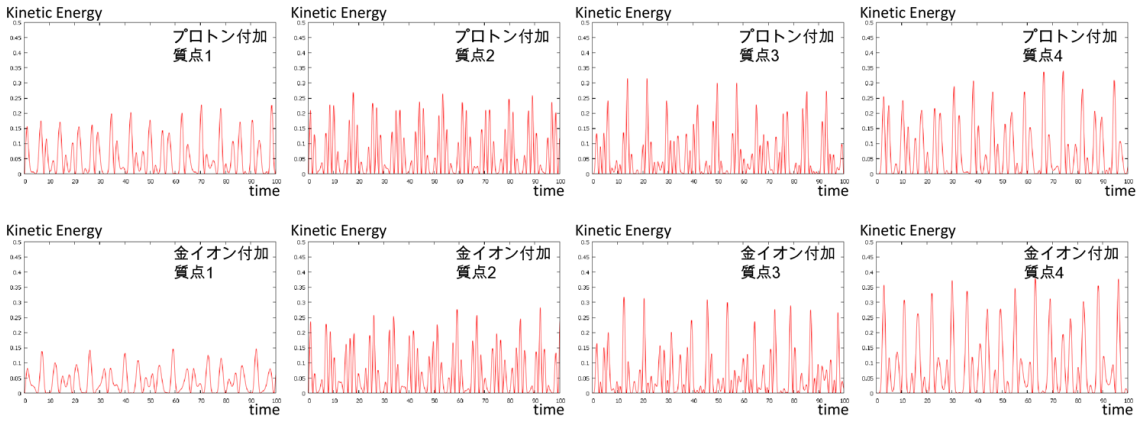

図 6.7: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.0, 0.0)$ での各質点の運動エネルギーの時間変化

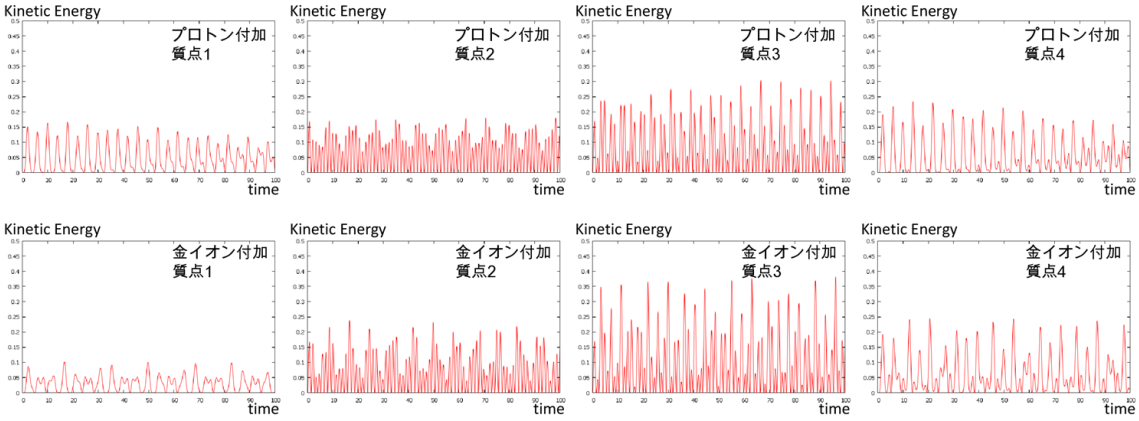

図 6.8: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.0, 0.1, 0.0)$ での各質点の運動エネルギーの時間変化

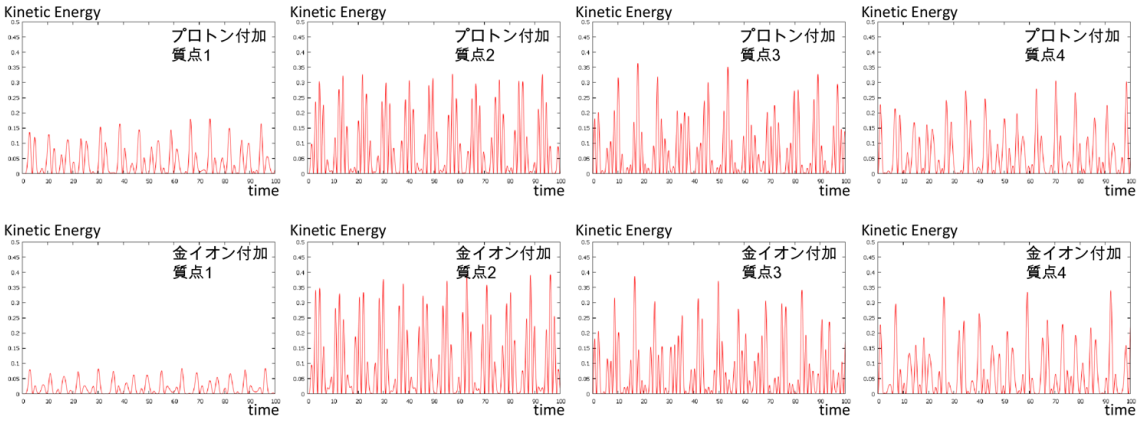

図 6.9: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.0, 0.0, 0.1)$ での各質点の運動エネルギーの時間変化

図 6.3-6.5 において，金原子が結合すると左端の質点 1 は運動エネルギーが減少した．他の質点の運動エネルギーには大きな差はみられなかった．図 6.3-6.5 以外の他の初期条件においても，同じ現象がみられた．

6.6　エネルギーの変化

最後に，エネルギーの変化を見やすくするために各初期条件での質点の運動エネルギーとばねの弾性エネルギーの時間平均を求めた．その後，金イオンが結合したペプチドとプロトンが結合したペプチドでの差をとった．

金イオンが結合したペプチドとプロトンが結合したペプチドの差の例を図 6.10-6.12 に示す．

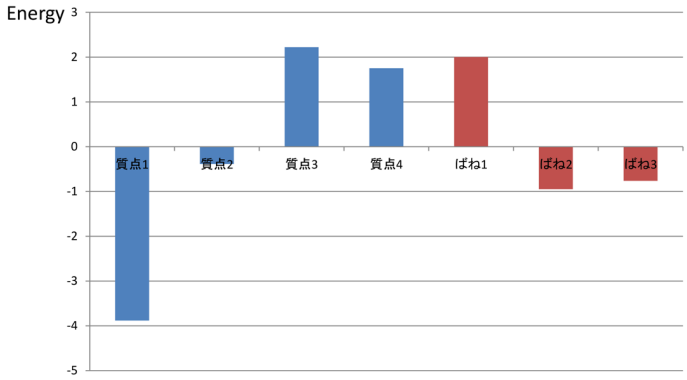

図 6.10: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.0, 0.1)$ における金イオン結合前後のエネルギーの差

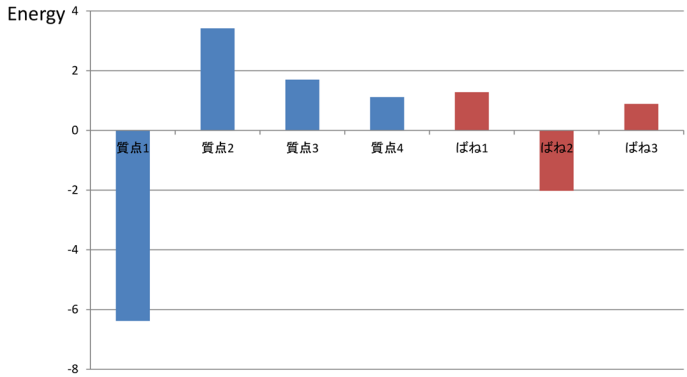

図 6.11: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.0, 0.1, 0.1)$ における金イオン結合前後のエネルギーの差

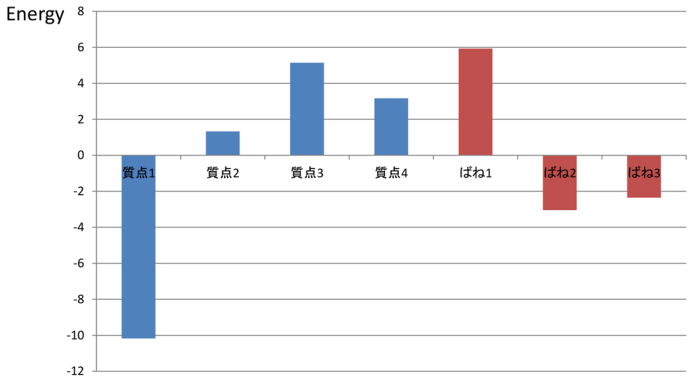

図 6.12: 初期条件 $(\Delta l_1, \Delta l_2, \Delta l_3) = (0.1, 0.1, 0.1)$ における金イオン結合前後のエネルギーの差

図 6.10-6.12 の条件では，金イオンが結合することで質点 1 の運動エネルギーが減少した．質点 2 は初期条件によって増加することも減少することもあった．質点 3 と質点 4 はどの初期条件でも運動エネルギーが増加した．また，ばね 1 の弾性エネルギーが増加し，他のばねの弾性エネルギーは減少した．他の初期条件でも同様の結果が得られた．

6.7　シミュレーションのまとめ

ばねの振幅と振動数の解析では，どのばねの振動も 3 種類の振動モード（基準振動）の組み合わせであった．金イオンが結合するとそれぞれの振動モードの周波数が小さくなった．このとき，最も周波数の低い振動モードでは周波数が 15.0% 低くなったが，次に周波数の小さいモードでは周波数の減少は 3.0% であり，周波数の高いモードでは 0.5% しか周波数は減少しなかった．その一方で，振幅では大きな変化はなかった．基準振動からは金イオンが結合することにより，特定の部位が分解することを示すような結果は得られなかった．

ばねの弾性エネルギーのシミュレーションでは，金イオンが結合すると結合部位の近くのペプチド結合のエネルギーが増加した．従って，その部分では分解が起きやすくなると予想される．しかし，測定結果では金イオンが結合したアミノ酸の隣のペプチド結合は分解しなかった．つまり，このシミュレーション結果ではばねの弾性エネルギーの増減では測定結果を説明することはできなかった．

質点の運動エネルギーのシミュレーションでは，金イオンが結合すると結合部位の質点の運動エネルギーが減少していた．また，他の質点の運動エネルギーが増加していた．このモデルでは運動エネルギーの変化で分解が起きることは示せない．しかし，このことが測定結果において，金イオンが結合すると結合部位の遠くから分解が起きやすくなっていたことと関連があるかもしれない．

今回の単純なモデルを用いたシミュレーションでは，測定結果を説明できる結果は得られなかった．そのため，ばねのモデルでは測定結果を説明することはできなかった．しかし，測定結果で分解が起きやすくなったところでは質点の運動エネルギーが増加した．そのため，金イオンの結合によってアミノ酸残基の速度が変化することによって，結合部位の遠くから分解が起きやすくなっている可能性があるかもしれない．

シミュレーションが測定結果と一致しなかった理由は，ペプチドの構造を単純化しすぎたことであったと思われる．今後シミュレーションを行う場合は，角度やねじれ，各原子の電子配置などを考慮した三次元モデルと比較する必要があると考えられる．また，分子を構成する各原子を質点に置き換えて，原子間の固有振動が得られるようなモデルを作れば，赤外分光の測定結果との比較もできる可能性がある．

第7章　まとめ

本研究では，ペプチドに重原子を結合させると，PSD の解離率が増加したり，別の結合で分解が起きやすくなったりするのではないかと仮定し，その検証を行った．ヒスチジンを含むペプチドに金イオンを結合させて，マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計を用いて PSD により生成したプロダクトイオンの測定を行った．その結果，金イオンの結合部位の遠くから分解が起きることが分かった．さらに，再加速後の自由空間での PSD によって生成されたと思われるプロダクトイオンが検出された．次に単純化したペプチドのモデルを用いたシミュレーションを行った．その結果，金イオンの結合部位に近いペプチド結合で弾性エネルギーが増加するため，測定結果を説明することはできなかった．しかし，金イオンが結合した部位から遠い質点は運動エネルギーが増加しており，金イオン結合部位の遠くからで分解しやすくなったという測定結果と関係している可能性があるかもしれない．

今後，金だけではなく他の金属との比較や量子化学計算を用いた厳密な計算を行うことができれば，より深い知見が得られるのではないかと考えられる．

参考文献

[1] 内藤康秀・吉野健一編, 日本質量分析学会, 「マススペクトロメトリー関係用語集」第 3 版, p65 (2009).

[2] 松田久, 化学と生物, 20, 242-250 (1982).

[3] B. Spengler, J. Mass Spectrom, vol 32, 1019-1036, (1997).

[4] 高山光男, J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., vol50, No. 6, 337-349 (2002).

[5] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Rpid. Commun. Mass. Spectrom., vol. 2, No. 8, p151-153 (1988).

[6] S. Della-Negra and Y. L. Beyec, Anal. Chem., vol57, 2035-2040 (1985)

[7] 豊田岐聡，質量分析装置，豊田岐聡 (編)，質量分析学—基礎編—，国際文献社，p38 (2016)

[8] M. M. Wolff and W. E. Stephens, Rev. Sci. Instrum, vol 24, 616-617 (1953).

[9] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, Sov. Phys. JETP, Vol. 37, p45-48 (1973)

[10] F. W. McLafferty, and F. M. Bockhoff, Anal. Chem., vol. 50, No. 1, p69-75 (1978)

[11] K. F. Medzihradszky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal and

[12] R. Kaufmann, B. Spengler, F. Lutzenkirchen, Rapid. Commun. Mass. Spectrom, vol. 7, p902-910 (1993).

[13] R. J. Cotter, W. Griffith and C. Jelinek, J. Chromatogr. B, vol. 855, p2-13 (2007) A. L. Burlingame, Anal. Chem, vol. 72, p552-558 (2000)

[14] K. Biemann, C. Cone, B. R. Webster and G. P. Arsenault, J. Am. Chem. Soc., vol. ,p5598-5606 (1966).

[15] 岩本令吉, 講談社サイエンティフィック, 近赤外スペクトル法, p20-22 (2008).

[16] J. Kong and S. Yu, Acta. Biochim. Biophys. Sin, vol. 39 p549-559 (2007)

[17] 山崎昶，朝倉書店，やさしい化学３０講シリーズ　4　赤外分光３０講，p46-58 (2016)

[18] 北川浩，日本ゴム協会誌，72 巻，11 号，p632-638 (1999)

[19] 岡田勲，三上益弘，分子動力学計算，岡田勲・大澤映二 (編)，分子シミュレーション入門，海文堂，p40 (1989)

[20] K. Hinsen, Proteins, vol 33, 417-429 (1998).

[21] 冨樫祐一，生物物理，48 巻，2 号，p114-118 (2008)

[22] 一松信, 戸川隼人, 常微分方程式,「計算機よる数値計算法」, 新曜社, p109-116 (1976)

第8章　付録

本研究のシミュレーションで使用したペプチドモデルのC++言語プログラムとその使用方法を示す．以下のプラグラムを実行すると，プログラム内で設定したデータをSpring.dataのファイルに出力する．質点の初期位置や質点の質量に対応するパラメーターを調整し，出力を運動エネルギーやばねのエネルギー，質点の変位の時間変動などのデータに変えて出力し，解析を行う．

以下にプログラムを示す．

```
#include <stdio.h>
#include <math.h>

//質点1，質点2，質点3，質点4の4つの質点をばねでつなげて振動させるシミュレーション
//質点1は固定しない
//ルンゲクッタ法を用いて近似する


#pragma warning(disable:4996)   //fopenを使ったときエラーが出ないように

double a1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //a1: 位置x1をtで微分した関数
double a2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //a2: 速度v1をtで微分した関数
double b1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //b1: 位置x2をtで微分した関数
double b2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //b2: 速度v2をtで微分した関数
double c1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //c2: 速度x3をtで微分した関数
double c2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //c2: 速度v3をtで微分した関数
double d1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //d2: 速度x4をtで微分した関数
double d2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4);   //d2: 速度v4をtで微分した関数


int main()
{
        double t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4, dt, tmax, y;    //各変数
            を定義
        double k1[2], k2[2], k3[2], k4[2], l1[2], l2[2], l3[2], l4[2], m1
            [2], m2[2], m3[2], m4[2], n1[2], n2[2], n3[2], n4[2];   //

        x1 = -0.1;                      //質点1の位置x1の初期値
```

```
x2 = 0.0;                    //質点2の位置x2の初期値
x3 = 0.0;                    //質点3の位置x3の初期値
x4 = 0.0;                    //質点4の位置x4の初期値
v1 = 0.0;                    //質点1の速度v1の初期値
v2 = 0.0;                    //質点2の速度v2の初期値
v3 = 0.0;                    //質点3の速度v3の初期値
v4 = 0.0;                    //質点4の速度v4の初期値
dt = 0.01;                  //刻み幅
tmax = 100;                //繰り返し最大回数
y = 0.0;                     //y軸

FILE *output;
output = fopen("Spring.data", "w");  //計算結果をdataファイルで保存

for (t = 0; t<tmax; t += dt) {
        k1[0] = dt*a1(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        k1[1] = dt*a2(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        l1[0] = dt*b1(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        l1[1] = dt*b2(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        m1[0] = dt*c1(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        m1[1] = dt*c2(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        n1[0] = dt*d1(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);
        n1[1] = dt*d2(t, x1, v1, x2, v2, x3, v3, x4, v4);

        k2[0] = dt*a1(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        k2[1] = dt*a2(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        l2[0] = dt*b1(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        l2[1] = dt*b2(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        m2[0] = dt*c1(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        m2[1] = dt*c2(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        n2[0] = dt*d1(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);
        n2[1] = dt*d2(t + dt / 2.0, x1 + k1[0] / 2.0, v1 + k1[1] /
            2.0, x2 + l1[0] / 2.0, v2 + l1[1] / 2.0, x3 + m1[0] /
            2.0, v3 + m1[1] / 2.0, x4 + n1[0] / 2.0, v4 + n1[1] /
            2.0);

        k3[0] = dt*a1(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
            2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
```

```
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
k3[1] = dt*a2(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
l3[0] = dt*b1(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
l3[1] = dt*b2(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
m3[0] = dt*c1(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
m3[1] = dt*c2(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
n3[0] = dt*d1(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);
n3[1] = dt*d2(t + dt / 2.0, x1 + k2[0] / 2.0, v1 + k2[1] /
    2.0, x2 + l2[0] / 2.0, v2 + l2[1] / 2.0, x3 + m2[0] /
    2.0, v3 + m2[1] / 2.0, x4 + n2[0] / 2.0, v4 + n2[1] /
    2.0);

k4[0] = dt*a1(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
k4[1] = dt*a2(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
l4[0] = dt*b1(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
l4[1] = dt*b2(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
m4[0] = dt*c1(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
m4[1] = dt*c2(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
n4[0] = dt*d1(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);
n4[1] = dt*d2(t + dt, x1 + k3[0], v1 + k3[1], x2 + l3[0],
    v2 + l3[1], x3 + m3[0], v3 + m3[1], x4 + n3[0], v4 + n3
    [1]);

x1 = x1 + (k1[0] + 2.0*k2[0] + 2.0*k3[0] + k4[0]) / 6.0;
v1 = v1 + (k1[1] + 2.0*k2[1] + 2.0*k3[1] + k4[1]) / 6.0;
x2 = x2 + (l1[0] + 2.0*l2[0] + 2.0*l3[0] + l4[0]) / 6.0;
```

```
                v2 = v2 + (l1[1] + 2.0*l2[1] + 2.0*l3[1] + l4[1]) / 6.0;
                x3 = x3 + (m1[0] + 2.0*m2[0] + 2.0*m3[0] + m4[0]) / 6.0;
                v3 = v3 + (m1[1] + 2.0*m2[1] + 2.0*m3[1] + m4[1]) / 6.0;
                x4 = x4 + (n1[0] + 2.0*n2[0] + 2.0*n3[0] + n4[0]) / 6.0;
                v4 = v4 + (n1[1] + 2.0*n2[1] + 2.0*n3[1] + n4[1]) / 6.0;

                fprintf(output, "%f %f %f %f\n", t, x2 - x1, x3 - x2, x4 -
                    x3);

        }
//このコードを書き変えることで運動エネルギー, ばねのエネルギーなど出力する
    データを切り替えることができる

        fclose(output);

        return 0;
}

double a1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return v1;                  //質点1の速度
}

double a2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return ((x2 - x1) * 100 / (138.06674 + 1.00783));
            //質点1の加速度 ここの数値を1.00783から196.96655に変えて, シミ
            ュレーションを行う
}

double b1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return v2;                  //質点2の速度
}

double b2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return (((x3 - x2) - (x2 - x1)) * 100 / 57.02146);
                            //質点2の加速度
}

double c1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return v3;                  //質点3の速度
}

double c2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return (((x4 - x3) - (x3 - x2)) * 100 / 57.02146);
                            //質点3の加速度
}

double d1(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
```

```
    double v3, double x4, double v4)
{
        return v4;                  //質点4の速度
}

double d2(double t, double x1, double v1, double x2, double v2, double x3,
    double v3, double x4, double v4)
{
        return (-(x4 - x3) * 100 / 74.02420);                  //質点4の加
            速度
}
```

謝辞

本研究におきましては，豊田岐聡先生には終始適切な助言を賜り，研究全般に関して多くのことを教えていただきました．深く感謝いたします．

蛋白質研究所機能・発現プロテオミクス研究室の高尾敏文先生には，テーマを提案していただき，測定および考察において丁寧かつ熱心なご指導を賜りました．厚くお礼申し上げます．MALDI-TOF-MS を用いた測定は蛋白質研究所機能・発現プロテオミクス研究室にて行いました．FT-IR を用いた測定は理学研究科の分析器測定室にて行われました．石原盛男先生にはシミュレーション計算において，多くの助言を頂きました．青木順先生からは，研究に関して多くのご指導をいただきました．研究室の先生方には大変お世話になりました．