### §2-1-6 その他関連技術の開発

本章では、これまで述べてきた「次世代MSシステム」を開発する過程で得られた、既存の技術にとらわれない新規開発の分析技術あるいは周辺知見について述べる。

#### 【概要】

- 1 指紋からの体表成分分析
  - ー般に、検査等のために生体から採取する検体としては組織や血液あるいは尿などが用いら れており、本プロジェクトにおいてもこれらの検体を対象とした解析手法を開発してきた。しかしな がらこれらの検体採取過程は被験者に対して苦痛や心理的負担を与えるため、よりストレスの少 ない採取手段が望まれていた。ここでは、ストレスなく採取できる「指紋」に注目した。すなわち、指 先を測定用プレートに押しつけることで体表成分をプレートに写し取り、レーザーイオン化質量分 析法によってその成分を解析したところ主として脂質類が検出された。さらに同手法による測定を ー年間継続し、得られたデータ群を多変量解析することによって特定の個人に特徴的な成分があ ることを明らかにした。
- 2 多様なMALDI 試料 プレートの評価

第1項からの派生として、測定用プレートの表面処理方法に応じてレーザーイオン化質量分析 法で検出される化合物に変化があることを見出した。鏡面加工・メッキ・導電性付与・粗面加工 な どについて検討し、それぞれが適合する化合物群を明らかにした。また、プレート表面に残存する 物質を完全に除去する手法として紫外線照射による光分解(およびそれに付随するオゾン分解) が有効であることを見出した。

3 酸化鉄ナノ粒子加エプレートを用いた脂質の分析

これもまた第1項からの派生として、低分子化合物をイオン化する特徴をもつ「酸化鉄ナノ粒子 加エプレート」を体表成分解析に適用した。結果として、脂質類が優先的にイオン化され、明瞭に 検出できることがわかった。試料プレートは紫外線照射によりクリーニングして再使用できるため、 測定コストの低減が期待される。

4 バックグラウンドサブトラクションを用いた

MALDI-In Source Decay解析の低質量領域への拡張

ペプチドやタンパク化合物において、レーザー照射によるイオン化と同時に開裂が起きる'In Source Decay'現象が知られているが、生成断片と試料中に元からあった成分とが重畳して観測 されるために解析が困難だった。これを解決するため、あらかじめIn Source Decayが起きない条 件で測定したマススペクトルを差し引くことによって生成断片のみの情報を得ることができた。

5 On-Resonance CID法によるリン酸化ペプチド開裂機構の理論的解明

MS/MS測定に際して標的化合物を開裂させるために、ガス状分子を衝突させて開裂を引き起 こすCollision-Induced Dissociation (CID) が一般に用いられる。しかし開裂部位を制御すること が難しいという難点があった。開発したOn-Resonance CID法によれば、CID励起強度や周波数 を最適化することによって開裂を制御できる可能性がある。本プロジェクトにおいては、開裂過程 を詳細にシミュレーションすることによってその機構の理解を深めることができた。

#### 6 マトリックス添加剤によるIR/UV-MALDIの性能向上開発

赤外光を用いるIR-MALDIは、紫外光を用いる一般的なMALDIと比較してイオン化に伴うフラ グメンテーションが少ないことが利点として知られている。他方、感度が低い・レーザー照射による 試料の枯渇が早い、などの欠点があった。本項では、マトリックスにフラーレンを添加することによ って試料枯渇を遅らせることに成功した結果を述べる。

#### 1 指紋からの体表成分分析

【研究目的】

指紋は非侵襲的に、簡便に、そして早く採取でき、加工などせずに保存することが可能な生体サンプル である。その指紋を構成する体表の化学成分の測定手法や情報抽出手法については多くの研究があるが、 後記するような本研究の基礎検討の結果から、MALDI-MSを用いた直接測定によっても簡便・迅速なプロ ファイリングが可能と見込まれる。

本研究では非侵襲的採取が可能な生体試料として「指紋」に着目し、さらにその簡便かつ迅速な測定手 法としてMALDI-MS直接測定を実施した。体表から検出した成分の個人差、および服用薬物や喫煙との相 関を調べるため、長期間にわたる体表成分モニタリングと多変量解析を適用し、各被験者由来のピーク探 索を行った。

【背景】

汗や皮脂などの生体体表成分は非侵襲かつ容易に採取できるため、採血など侵襲的なサンプリングを 必要としない検体として期待できる。生体体表(皮膚、指紋など)成分からアミノ酸、タンパク質、脂質類、代 謝物などの検出および分析は以前から報告されており、これらを用いたリピドミクス、メタボロミクス研究は 近年増えている[1]。脂質代謝物をモニタリングすることにより、病変のバイオマーカー、あるいは原因物質 を明らかにすることが可能である(図1)。生活習慣や生活環境以外にも、遺伝体質や加齢などによる脂質 や代謝物の変動をモニターすることで、健康状態を把握することができる。



図1 疾患のさまざまな要因と関係

【研究成果】

方法

①生体成分を非侵襲でサンプリングする手法の開発

図2は、考案した体表成分非侵襲サンプリングの様子である。指先を試料プレートに複数回押し付けるだけの簡単かつ安全な手法であり、複数回の押しつけによって多量の検体採取を可能にした。のみならず被験者の心理的障壁も低減する効果があり、個人情報保護の観点からも優れた手法である。採取した生体体表成分は、マトリックスを用いずに以下の測定条件を用いてlaser desorption/ionization (LDI)-MSによって測定した。[装置:MALDI-TOFMS(島津製作所)]

- 正イオンリニアモード
- 測定範囲: m/z 1-2,000
- レーザーパワー:120
- ラスター測定: 500 μm x 500 μm, 496ポイント
- 1ポイントに付きレーザー5ショット分を積算
- 各サンプルにつき異なる3ウェルから測定



図2 サンプリング例

人差し指をステンレス試料プレートに押し付けることにより体表成分を採取する。その際、繰り返し(10回程 度)押しつけることによって指紋紋様を意図的にぼかしている。これによって「指紋を採られる」という被験者 の心理的障壁を軽減させるとともに、個人情報保護の問題も回避できる。

本解析法は、マトリックスを用いないLDI測定を行うため、従来のマトリックスを使用した測定法で鍵とな る「スイートスポット探し」の必要がない。採取された指紋から生体体表成分を平均的に測定できるよう、測 定モードにはラスタリングを使用した。各指紋サンプルにつき、3つの異なるウェルから測定を行い、測定結 果はその3回の平均値とした。測定後、Human Metabolome Database (HMDB) および指紋から検出さ れる脂質類を記載した参考文献を参照しながらピーク確認、およびMS/MS解析を行った。また、脂質スタ ンダード標品を用いてマトリックス有・無でのMSおよびMS/MS測定も行った。

#### ②生体体表成分の長期モニタリングと多変量解析

1年間(2012年3月~2013年3月)、被験者3人分の体表成分のマススペクトルを取得した。被験者の性別、年齢層、データ取得日数を表1に示す。体表成分のサンプルは、ステンレス製MALDI試料プレートに人差し指を押すことで取得し、前処理無し・マトリックス不使用のLDI-MSにて測定した。質量較正は、定常的に観測され、かつ化学種を特定できるイオンピークを個人ごとに3つ定め、それらをキャリブラントとして実施した。Mass++を使用して、取得したマススペクトルのピーク群データを作成し、多変量解析ソフトウェアSIMCA ver13 (Umetrics Inc.) によりPCA (Principal Component Analysis: 主成分分析)、あるいは

ID	性別	年齡層	データ取得日数
001	女性	30代	193
002	男性	30代	171
007	男性	40代	206

表1 被験者の情報

OPLS-DA(Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis: 直交部分最少二乗による判別分析)を行った。

### 結果

多変量解析の結果を図3と図4に示す。

PCAではID001とID002のデータにおいては分離の傾向は見られない。つまり両IDのデータの傾向は似 ていることがわかる。一方、OPLS-DAでは3被検者が明確に分離され、各グループ分けに貢献しているピ ーク、つまり各被検者を特徴付けるピークにについて、S-Plotなどの手法を用いて探索した。その結果を表 2に示す。S-plotは強力なバイオマーカー探索手法と認識されており、判別分析の結果を解釈しやすく表示 する。



図3 ID0001 vs. ID002 vs. ID007のPCA(左)とOPLS-DA(右)スコアプロット

被験者3名(ID001、ID002、ID007)の指紋プロファイルモニタリングデータの多変量解析結果。PCA (左)では明確に分離できる境界がはっきりしない。しかしこのデータをさらにOPLS-DA(右)にかけると、 グループ判別に成功した。



図4 OPLS-DA(ID001 vs. ID002)のS-プロット

OPLS-DA (ID001 vs. ID002) ローディングプロットの結果と比較し、データ全体のPC1に貢献している ピークと、グループ分離に貢献かつ信頼度の高いピークとの対応を確認することができる。プロットの第 1象限と第3象限に特徴的なピークが確認できる。

ここで、ID001、ID002は非喫煙者、ID007は喫煙者なので、ID007に対して喫煙の前後で変化する物質 を調べる追加実験を行ったところ、*m/z* 228.3のピークは喫煙後に増加することがわかった。すなわち、 ID001、ID002に対してID007を特徴づけるピークの1つ(*m/z* 228.3)は喫煙に関連する可能性が高いこと を示唆している。

#### 表2 それぞれの被験者に特徴的なピーク

被検者	特徴的な ピーク( <i>m/z</i> )	推定される物質
ID001	368.4	コレステロール
ID002	311.3	(不明)
ID001 ID002	326.4	ジデシルジメチルアンモニウムイオン (夾雑成分と考えられる)
	39.0	カリウム
ID007	228.3	ミリスチン酸 (喫煙関連の可能性あり)

【結論】

本研究で確立したデータ解析(多変量解析)法は、バイオマーカー探索においても有用である。また、体 表成分の非侵襲サンプリング法を、健康診断などに発展・適用できる可能性が示唆された。

# 【成果一覧】

### 学会発表

(1) 草野麻衣子,藤田雄一郎,梶原茂樹,川畑慎一郎,田中耕一,第38回日本医用マススペクトル学会, 2013年

# 【参考文献】

 Beth Emerson, Jennifer Gidden, Jackson O. Lay Jr, Bill Durham, "Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols and other components in fingermark samples", J. Forensic Sci. 2011, 56, pp381–389.

#### 2 多様なMALDI試料プレートの評価

【研究目的】

試料プレート表面の加工方法によって検出される成分が異なることを利用し、注目成分を選択的に検出 するために最適なプレート加工方法を提案する。また、それらの多様な試料プレートに適用できる表面清浄 化処理方法を開発する。

### 【背景】

これまで体表成分の直接MALDI-MS解析は通常のステンレス製試料プレートを用いて行ってきたが、か つて市販の濃縮プレート(例:µFocusプレート, Hudson Surface Technology, Inc.)を使用した場合には通 常のステンレス製プレート使用時に比べてピーク強度が弱く、マトリックス使用によってもイオン強度の向上 は見られなかった。これらのことから体表成分の直接MALDI-MS分析には、プレート表面の物性も成否を 左右する因子であることが考えられた。

多様な性状の試料プレートでの測定検討を進めるにあたっては、汎用的な清浄化手順の開発も必要となった。通常、測定に先立つ試料プレートの清浄化処理として、クロロホルムを含ませた木綿不織布による 拭きとりと溶媒による洗浄を行っているが、ブラスト処理や格子加工によって粗面化されたプレートの場合 は木綿繊維がプレート表面につまるため、このような場合にも適用できる清浄化方法を考える必要があっ た。このような要求を満たす表面処理技術の一つとして、UV照射処理による表面改質&ドライ洗浄法があ る[1]。紫外線照射による炭水化物などの有機化合物の除去法は古くから知られている。分子間の結合エ ネルギーよりも高いエネルギーを与えると分子結合は解離されイオン、中性分子、フリーラジカルなどが生 成される。解離された有機物は紫外線により生成されたオゾンO3により酸化反応が起こり、CO2, H2O, N, O2のような分子となり表面から除去される。われわれが用いた短波長紫外線(185 nm)のエネルギーは 472 kJ/mollに相当し、これより弱い結合エネルギーの有機化合物を分解し、除去することができる。

#### 【研究成果】

方法

①多種加工試料プレートの評価

下記の11種類の加エプレートを評価対象とした。

- (a) 鏡面
- (b) 鏡面+真空熱処理
- (c) 鏡面チタン材
- (d) 鏡面+金メッキ
- (e) ブラスト、アルミナ(細)
- (f) ブラスト、ガラスビーズ(GBB)(細)

- (g) Indium tin oxide (ITO) ガラス
- (h) 格子加工 20 um 間隔
- (i) 格子加工 50 um 間隔
- (j) 格子加工 100 um 間隔
- (k) 格子加工 200 um 間隔

鏡面加エプレートは凹凸のない平滑な表面になっている。ブラストあるいは格子加工されたプレートでは 表面の凹凸が増加し、また表面積も大きくなる。ITOガラスプレートは導電性を有するプレートである。洗浄 された各プレートに女性被験者(ID001)が人差し指を10回押し付ける採取法で指紋サンプルを採取して LDIマススペクトルを取得した。

②プレートUV照射によるプレ洗浄法の確立

従来の洗浄を行ったステンレス製MALDIプレートを乾燥後、卓上型光表面処理装置SSP-110 (セン特殊 光源株式会社)を用いて30分(短時間)と5時間(長時間)のUV照射処理を行った。プレート洗浄前、洗浄 後(UV照射無)、30分UV照射、5時間UV照射のプレート表面上の「汚れ」の比較をLDI-MSで行った。評価 対象として ①何も滴下していないブランクウェル ②DHB滴下ウェル ③フラーレン滴下ウェルおよび④指 紋を押しつけたfingerprint ウェルの4種類のMS測定を行った。

#### 結果

①多種加工試料プレートの評価

図1に示すように、表面の加工方法によって異なるスペクトルが得られた。傾向として、鏡面加工のプレート(a-d) においてはジグリセライド(DG, m/z 570-650) およびトリグリセライド (TG, m/z 770-950) と想定されるイオンが主として検出され、リゾフォスファチジルコリン (LysoPC, m/z 490-550) などのピークはあまり強く見られなかった。他方、ブラスト加工あるいは格子加工などによって表面が粗くざらざらしているプレート (e,f,h-k) は、LysoPCピークが高い強度で検出され、逆にTGピークのイオン強度は低かった。



図1 多種プレートの指紋スペクトル比較



②プレートUV照射によるプレ洗浄法の確立

未洗浄、通常洗浄後、30分UV照射後、5時間UV照射後のステンレス製MALDIプレートのMSイメージを 取得した。図2にサンプルの乗っていないブランクウェル(上)、キャリブラントとして用いているフラーレン (C<sub>60</sub>)を滴下してあるウェル(中)、および固体マトリックスDHBを滴下してあるウェル(下)のMSイメージを 示す。また図3にボランティア被験者の右手人差し指から採取した指紋サンプルの代表的ピーク3つによる MSイメージを示す。通常洗浄後でほとんどの汚れは落とせているが、UV照射によってさらにプレート表面 の汚れが除去されていることがわかる。油性の有機化合物による汚染、指紋など生体由来の有機化合物 も除去することができた。無機物や大きな汚れなどをまず通常の洗浄法で除去し、続いてUV照射処理を施 すことによって高い洗浄効果が得られた。

注意すべき点として、UV照射されたステンレス製試料プレートに液体試料を滴下するとウェル内に留ま らずにウェルの外側にまで拡がってしまう傾向がある。ただ本研究に関しては、被検対象は非流動性物質 であるため、この現象は問題とならない。(キャリブラント溶液をプレートに滴下するときのみ留意した)

また、UV照射処理後のプレートは時間の経過と共に表面上に「汚れ」もまた付着していくため、おおむね 3~4日以上大気にさらされたプレートは改めてUV照射処理による清浄化処理を行うべきである。



図2 ブランクウェル、フラーレン(C60)、DHBのMSイメージ

左から順にプレート洗浄前、従来のプレート洗浄手順後、UV照射30分後、UV照射5時間後のMSイメージ を示す。ブランクウェルの評価基準として体表成分に含まれるコレステロール(*m/z* 369)を用いた。UV照 射直後からほとんどの汚染物が除去されているのがわかるが、長時間UV照射下にプレートを置くことで プレート表面上の有機物はほとんど除去することができる。



図3 指紋サンプルの代表的イオン3種によるMSイメージ

指紋を表面に押し付けたプレートの洗浄前、従来のプレート洗浄手順後、UV照射30分後、UV照射5時間後のMSイメージを示す。通常洗浄後でほとんどの汚れは落とせているが、UV照射によってさらにプレート表面の汚れが除去されていることがわかる。

【結論】

試料プレートの表面加工によって検出される体表成分ピーク(強度)が異なることがわかった。鏡面加工 のプレートはDGやTG成分が強調され、一方でLysoPCなどの成分は検出されにくかった。逆に、格子加工 などで表面を粗くしてあるプレートではLysoPCピークが強く検出され、DGやTG成分は見えにくい傾向にあ った。この結果から、表面加工されているプレートを用途別に選択することによって、選択的化合物検出が できることが示された。また、それらのプレートから得られた結果を組み合わせることで網羅的な解析が可 能になると期待される。また、UV照射処理によって試料プレートの表面加工の有無や種類に関係なく、プレ ートの表面から有機化合物を除去する方法が確立できた。

【参考文献】

[1] セン特殊光源株式会社 Surface Processor Products Catalog. 2013

### 【研究目的】

金属および金属酸化物ナノ粒子を脱離・イオン化支援材料として用いる表面支援レーザー脱離イオン化 質量分析法(SALDI-MS)は低分子量(おおむね2000 Da程度以下)の生体由来分子を検出し、分析する 「マトリックスフリー」LDI-MS法である。金[1]、プラチナ[2]、銀[3]、鉄[4]、酸化亜鉛[5]、酸化チタン[6]、およ び酸化マンガン[7]などはペプチド、脂肪酸、脂質類、多糖類などの小さな生体分子を分析対象とした SALDI-MSに用いられている。様々な金属酸化物を表面支援材料として低分子量の脂質類(植物性脂およ びショートニング、微生物脂質)を分析対象としたマトリックスフリー分析の比較についても発表されている。 酸化鉄ナノ粒子を用いたペプチドおよびタンパク質のMALDI-MS解析についても発表されているが、ここで 用いられた酸化鉄ナノ粒子はオレイン酸修飾されたものである。本研究では、酸化鉄ナノ粒子加エプレート を用いた低分子脂質類および指紋から得られた生体体表成分の検出と解析を実施した。

#### 【研究成果】

方法

図1に、使用した酸化鉄ナノ粒子加エプレートの外観を示す。一般にナノ粒子は広い表面積を持つため、 大気暴露による表面汚染が大きな問題点でもある。この問題を回避するため、本研究ではサンプル測定直 前に各試料プレートを前節で示したUV照射プレ洗浄法を用いて表面洗浄を行った。



図1 酸化鉄ナノ粒子加エプレート

厚さ1.6 mmのスライドガラスサイズ(26 mm x 76 mm)の酸化鉄ナノ粒子加エプレートは測定時には通常 のステンレスプレートと同サイズのプレートホルダーに伝導性テープで固定する。各ウェルは直径2.5 mm で、粒子径50-60 nm の酸化鉄ナノ粒子が滴下されている。

この酸化鉄ナノ粒子プレートは、関西大学・大日本塗料株式会社・島津製作所の共同開発品である。

生体体表由来の脂質類の解析を行うにあたり、標準的な脂質のMSおよびMS/MS測定を行った。対象と したのは図2に示した4種である: 1-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:0 LysoPC)、 1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol (18:1 DG)、1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (18:0 PC)、 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-*rac*-glycerol (TG(16:0/18:1/18:2))。

溶媒は70:30 クロロホルム/メタノール (v/v)を用いた。酸化鉄ナノ粒子加エプレートを用いた脂質標品のMSおよびMS/MS測定が問題なく行えることを確認(後掲)し、続いて生体試料(指紋)を用いた測定を行った。



図2 脂質標品の化学構造



図3に脂質標準品のMS/MS測定結果、また図4に指紋サンプルの測定結果を示す。



a) 18:0 LysoPC, b) 18:1 DG, c) 18:0 PC, d) TG(16:0/18:1/18:2)

ベースピークの*m/z* 184はLysoPCの極性頭部基のフラグメントイオンである。同様のピークが18:0 PCの MS/MSスペクトル (c)にも見られる。このピークはホスファチジルコリンのMS/MSスペクトルに典型的に みられるピークである。(b) 18:1 DGおよび (d) TG (16:0/18:1/18:2) のスペクトルで見られるフラグメント ピークは、脂肪酸アシル基由来のものである。



図4 酸化鉄ナノ粒子加エプレートを用いた男性被験者の指紋サンプルのLDI-MS測定結果

"X"で示されているピークは洗剤などの外部由来のコンタミネーションピークであることが先行文献によっ て確認されている。ピーク強度の差が大きいためスペクトルを3セクションに分けて示す:a) 脂肪酸、モノ グリセライド、およびジグリセライドやトリグリセライドのフラグメントイオンが主に検出される*m/z* 200-460 領域、b) ジグリセライドおよびリソホスファチジルコリンなどが検出される*m/z* 460-740領域、c) 主にトリ グリセライドピークが検出される*m/z* 740-900領域。

### 【結論】

酸化鉄ナノ粒子加エプレートを用いて低分子脂質類のLDI-MS直接測定を行った。酸化鉄ナノ粒子加エ プレートの使用により直接的、簡便、迅速な脂質類のMS測定を可能にし、サンプルの前処理も行う必要も なくマトリックス由来ピークを気にすることもなくスペクトルを得られることを示した。脂質類は主にナトリウム 付加体およびプロトン付加体で検出される(表1)。生体由来サンプル、皮膚表面(本研究においては通常 は視認できない潜在指紋)から、脂質化合物を分析対象とした本研究は有望な結果を示し、ナノ粒子支援 による潜在指紋の可視化および化学組成の同定において有用であることが示された。本研究で得られた 情報は、科学捜査や疾患診断への応用も期待できる。本研究で用いた光学顕微鏡用スライドサイズの酸 化鉄ナノ粒子加エプレートは今後、医療への応用を考慮し使い捨てプレートへの移行を考えている。低コス トの使い捨て試料プレートを用いてこの技術を一般的な健康診断などへの使用へ繋げられると期待する。

Observed m/z	Compound	lon
228.3	Myristic acid	$[M+H]^+$
255.3	Palmitoleic acid	$[M+H]^+$
257.2	Palmitic acid	$[M+H]^+$
283.3	Oleic acid	$[M+H]^+$
309.3	Eicosadienoic acid	$[M+H]^+$
369.4	Cholesterol	$[M+H-H_2O]^+$
382.4	Tetracosadienoic acid	$[M+H]^+$
496.6	LysoPC 16:0	$[M+H]^+$
518.5	LysoPC 16:0	[M+Na] <sup>+</sup>
523.4	TG fragment (C30:0)	$[M-FA+H]^+$
551.6	TG fragment (C32:0)	$[M-FA+H]^+$
591.5	Wax ester (C40:1)	$[M+H]^+$
610.5	Possible lipid	
619.6	DG fragment (18:2/18:3)	(Na+DG fragment)
638.4	Possible lipid (DG 18:1/18:1?)	
640.6	Amino-hexadecanoic acid	$[M+H]^+$
664.6	Possible lipid	
732.8	PC 16:0/16:1	$[M+H]^+$
773.6	TG 14:0/14:0/16:0	[M+Na] <sup>+</sup>
787.6	TG 14:0/15:0/16:0	[M+Na] <sup>+</sup>
801.6	TG 14:0/16:0/16:0 or TG 16:0/15:0/15:0	[M+Na] <sup>+</sup>
815.6	TG 15:0/16:0/16:0	[M+Na] <sup>+</sup>
829.6	TG 16:0/16:0/16:0 or TG 14:0/16:0/18:0	[M+Na]⁺
843.6	TG 15:0/16:0/18:0	[M+Na] <sup>+</sup>
857.6	TG 16:0/16:0/18:0	[M+Na] <sup>+</sup>
872.8	TG 16:0/18:3/18:3	[M+Na] <sup>+</sup>

表1 酸化鉄ナノ粒子加エプレートを用いて検出された男性被験者の指紋サンプルから得られた脂質類

# 【成果一覧】

# 論文発表

 Kusano, M.; Kawabata, S.; Tamura, Y.; Mizoguchi, D.; Murouchi, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R.; Tanaka, K. "Laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) of lipids with iron oxide nanoparticle-coated targets", *Mass Spectrom.*, 2014, 3, A0026. 学会発表

(1) 草野麻衣子,川畑慎一郎,田村祐介,溝口大剛,室内聖人,川崎英也,荒川隆一,田中耕一,第61 回質量分析総合討論会,2013年

# 【参考文献】

- Rosa Pilolli, Francesco Palmisano, Nicola Cioffi, "Gold nanomaterials as a new tool for bioanalytical applications of laser desorption ionization mass spectrometry", Anal. Bioanal. Chem. 2012, 402, pp601-623.
- [2] Hideya Kawasaki, Tetsu Yonezawa, Takehiro Watanabe, Ryuichi Arakawa, "Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules", J. Phys. Chem. C 2007, 111, pp16278-16283.
- [3] Joanna Niziol, Wojciech Rode, Zbigniew Zielinski, Tomasz Ruman, "Matrix-free laser desorption-ionization with silver nanoparticle-enhanced steel targets", Int. J. Mass Spectrom. 2013, 335, pp22-32.
- [4] Wei-Yu Chen, Yu-Chie Chen, "Affinity-based mass spectrometry using magnetic iron oxide particles as the matrix and concentrating probes for SALDI MS analysis of peptides and proteins", Anal. Bioanal. Chem. 2006, 386, 699-704.
- [5] Takehiro Watanabe, Hideya Kawasaki, Tetsu Yonezawa, Ryuichi Arakawa, "Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles", J.Mass Spectrom. 2008, 43, pp1063-1071.
- [6] Kun-Hong Lee, Cheng-Kang Chiang, Zong-Hong Lin, Huan-Tsung Chang. "Determining enediol compounds in tea using surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with titanium dioxide nanoparticle matrices", Rapid Commun.Mass Spectrom. 2007, 21, pp2023-2030.
- [7] Shu Taira, Kenji Kitajima, Hikaru Katayanagi, Eiichiro Ichiishi, Yuko Ichiyanagi, "Manganese oxide nanoparticle-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for medical applications", Sci. Tech. Adv. Mater. 2010, 10, p034602.

### 4 バックグラウンドサブトラクションを用いたMALDI-In Source Decay解析の低質量領域への拡張

### 【研究目的】

MALDI-In-Source Decay (MALDI-ISD) 解析は、イオン源内において対象化合物がマトリックス分子な どと衝突することによって生成する特徴的な開裂断片を利用して、タンパク質などの構造情報を得る手法で ある。利点として、Collision-Induced Dissociation (CID) などの開裂手法では脱離しやすいリン酸基を含 む修飾ペプチド化合物などもその結合を保持したままアミノ酸配列情報を取得することができる。しかしな がら、断片イオンが観測されるべき質量範囲のうち低質量領域にはマトリックス由来などのバックグラウン ドイオンが多く検出されるため、従来は高質量領域のみが解析対象とされてきた。また、MALDI-ISDで生 成した断片イオンに対してさらにMS/MS測定を行うことで配列情報を取得する手法(例:T3 Sequencing) が報告されているが、ピーク強度が微弱であり取り扱いが難しいことやMALDI-ISD測定結果とMS/MS測 定結果とを統合する必要があるなどの課題があった。

本実験においては、これまで解析対象とされなかったMALDI-ISDマススペクトルの低質量領域にも適用 可能な解析手法の開発を試みた。

#### 【研究成果】

方法

本実験のマススペクトルの取得には、マトリックスピークの飽和に強い二次電子増倍管型の検出器を使用した。サンプルと内部標準物質をマトリックスと混合してマススペクトルを取得した後、質量補正を行って精密質量を取得した。その後Mass++の機能を用いて低質量領域の共雑ピークを減算処理することで、MALDI-ISDによって生成したイオンのみを弁別した。具体的には、モデルペプチドACTH18-39に内部標準試料としてペプチドP14Rを加え、マトリックスDHBによってMALDI-TOFMSの正イオンリニアモードを用いてMALDI-ISDマススペクトルを取得した。次に照射レーザー強度を上げ、P14RのみをDHBで調製したサンプルのMALDIマススペクトルを取得した。それぞれのマススペクトルに対してDHBとP14Rの既知イオンを用いて質量キャリブレーションを行った後、Mass++のバックグラウンドサブトラクション機能(あるマススペクトルに検出されたピークを他のマススペクトルから減算して表示する機能)を使用してMALDI-ISDマスペクトル に対してMascot検索エンジンによるMS/MSイオンサーチを行い、Mascot Scoreを比較した。

#### 結果

標準ペプチドであるACTH 18-39 (adrenocorticotropic hormone 18-39) に対して本手法を用いた結果 を図1に示す。バックグラウンドサブトラクション前ではマトリックス由来のピークが極めて強く出現しており、 逆にMALDI-ISDプロダクトイオン自体の強度が弱いためバックグラウンドピークとの区別が困難であった (図1a)。しかしバックグラウンドマススペクトルの減算処理を行うと、低質量のピークが除去されて MALDI-ISDマススペクトルが浮き上がった(図1b)。さらにMascot検索エンジンを用いたMS/MSイオンサ ーチを実施すると、処理前ではScore 84であったが、処理後はScore 99となり同定信頼度を向上させるこ とができた。

【結論】

バックグラウンドを減算する処理によってマトリックス由来などの夾雑イオンを除去する処理は、 MALDI-ISD測定結果のライブラリサーチにおける同定信頼度の向上に有効であることがわかった。



図1 バックグラウンドサブトラクション前後によるACTH 18-39のMALDI-ISDマススペクトルの比較

P14Rを内部標準として加えたACTH 18-39をDHBを用いて調製を行い、MALDI-TOFMS(島津製作所)の正イ オンリニアモードを用いてMALDI-ISDマススペクトルを取得した。次にLaser Powerを少し上げて、P14Rのみ をDHBで調製したサンプルのMALDIマススペクトルを取得する。双方をマトリックスとP14Rのピークを用いて内 部標準キャリブレーションを行った後、Mass++のバックグラウンドサブトラクション処理でMALDI-ISDマススペ クトルからP14Rのスポットから得られたスペクトル成分を除去した。

### 【成果一覧】

特許出願

(1) 谷口謙一, 質量分析方法及び質量分析装置, 特願2013-266265

【参考文献】

- [1] 高山光男, "各種質量分析分解法におけるインソース分解の特徴-Hydrogen-Attachment Dissociation (HAD)-, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.,* 2002, 50, pp337-349
- [2] Daiki Asakawa, Motoshi Sakakura, Mitsuo Takayama, "Matrix Effect on In-Source Decay Products of Peptides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization", *Mass Spectrom.*, 2012, 1, A0002, pp1-9
- [3] Detlev Suckau, Anja Resemann, "T3-Sequencing: Targeted Characterization of the N- and C-Termini of Undigested Proteins by Mass Spectrometry", *Anal. Chem.*,2003, 75, pp5817–5824.
- [4] 田中耕一,吉野健一,林雅宏,内藤康秀,大久保雅隆, "マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行 時間型質量分析計用の検出器", J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 2010, 58, pp111-116
- [5] Daiki Asakawa, David Calligaris, Tyler A. Zimmerman, and Edwin De Pauw, "In-Source Decay during Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Combined with the Collisional Process in an FTICR Mass Spectrometer", Anal. Chem. 2013, 85, pp7809–7817

### 5 On-Resonance CID法によるリン酸化ペプチド開裂機構の理論的解明

【研究目的】

イオントラップ型質量分析装置を用いた MALDI MS<sup>n</sup> 分析は、複雑な構造を持つ翻訳後修飾の構造解 析に有用であるが、MS<sup>n</sup>分析に用いられる開裂手法である CID には、遊離性の高いリン酸基や糖鎖等の 修飾分子が脱離しやすく結合サイトを高い信頼度で決定できないという欠点を有している。

中心研究者の田中らは、On-Resonance CID法を用いてCID励起強度・周波数の最適化を行うと、遊離 性修飾分子の脱離が抑制され、結合部位を含む構造情報を高精度で得られることを報告した[1]。図1に、 Insulin Receptor リン酸化ペプチドpYYRK(pYはリン酸化チロシンを表わす)の1価陽イオンを従来法 (Off-Resonance CID)とOn-Resonance CID法を用いて分析した結果を示す。図1を見ると、 On-Resonance CIDではリン酸基の脱離が抑制されていることがわかる。

この On-Resonance CID 法による開裂機構を正しく理解することは、高度な翻訳後修飾解析機能を有 する次世代質量分析システムを開発・改良する上で重要である。そこで、ab initio 分子軌道理論によるリ ン酸化ペプチドの開裂シミュレーションを奈良女子大学との共同研究により実施した(島津製作所は測定実 験を担当し、奈良女子大学はシミュレーションを担当した)。

【研究成果】

方法

MMFF94SポテンシャルでConflex 7 Rev. Aプログラムを用いてプリカーサイオンであるリン酸化ペプチ ドイオン(pYYRKプロトン付加分子)の配座探索を行い、妥当と考えられる初期構造の候補を求めた。求め た構造を初期構造の候補として、プリカーサイオンの最適化構造とエネルギーをab initio DFT 法 (B3LYP/6-311G+G(2d,p)//HF/3-21G(d)およびB3LYP/6-311+G(2d,p)// B3LYP/6-31G(d)レベル)を用



図1 Off/On-Resonance CID MS/MSマススペクトル

pYYRK プロトン付加分子の Off-Resonance CID MS/MSマススペクトル(上)と比べ、On-Resonance CID MS/MSマススペクトル(下)では、リン酸基の脱離で生じたフラグメントイオン( [pYYRK+H-HPO<sub>3</sub>]<sup>+</sup> = m/z 629, [b3-HPO3]<sup>+</sup> = m/z 483) のピーク強度が著しく減少した。一方で、b3イオン (m/z 563) のピーク強度はほとんど変わらなかった。

いたエネルギー勾配法により計算した。同様にフラグメント( $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$ 、 $b_1$ 、 $b_2$ および $b_3$ イオン、HPO<sub>3</sub>、 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、CO、pY、pYY、pYYR、K、RK、YRKの中性フラグメント)およびフラグメント生成過程における遷 移状態の最適化構造とエネルギーを計算した。pYYRKプロトン付加分子からの各フラグメンテーション過 程におけるポテンシャルエネルギー超曲面をB3LYP/6-31G(d)//B3LYP/6-31G(d) および B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31G(d) レベルで *ab initio* 法により計算した。

結果

プリカーサイオンのpYYRKプロトン化分子についてB3LYP/6-311+G(2d,p)を用いたab intio密度汎関 数理論による構造最適化計算を行った結果、プロトン親和力の高いArg側鎖がプロトン化された pYYR(H<sup>+</sup>)Kが最安定構造をとることが分かった。

次に、プリカーサイオンからの HPO<sub>3</sub>脱離過程のエネルギープロファイルを求めると、遷移状態は 1 個 で、その障壁エネルギーは 172.8 kJ/mol であった(図2)。この脱離過程では、リン酸の OH から Tyr の O 原子への H の移動が driving force となり HPO<sub>3</sub> が脱離するものと考えられた。



図2 リン酸基(HPO3)脱離過程のエネルギープロファイル

プリカーサイオン(R1)からの HPO<sub>3</sub> 脱離イオン(P1)生成過程について*ab initio* 法により計算したポテン シャルエネルギー曲線で、横軸は反応座標(リン酸の OH と Tyr 側鎖酸素原子との回転角、および、リ ン酸基と Tyr 側鎖酸素原子との距離)。遷移状態 TS1 は1個の虚の振動数 1,506.97*i* cm<sup>-1</sup> を持つ。障 壁エネルギーは 172.8 kJ/mol であった。

 $b_3$  イオンには、5員環を形成するものと、直鎖構造をとるものが予想された。5 員環生成過程では、3 個の遷移状態を持ち、障壁エネルギーは TS2 が最大で 158.7 kJ/mol であった(図3)。

b<sub>3</sub> イオンが直鎖構造を取る場合には遷移状態は 1 個で、その障壁エネルギーは 366.6 kJ/mol であった(図4)。5 員環形成過程と比べると反応に高いエネルギーを必要とするものの反応素過程が単純であるために高エネルギー環境下では高速に反応が進むものと考えられた。 RRKM 理論による反応速度計 算もこの結果を支持するものであった。



図3 b3イオン(5員環構造)の開裂過程のエネルギープロファイル

プリカーサイオン(R1)からのb<sub>3</sub> イオン(5員環構造, P1)生成における各反応素過程について計算した ab initio ポテンシャルエネルギー曲線。TS1は、C末端OH のHがアミド窒素へ移動する遷移状態で、1 つ の虚の振動数 1,027.63*i* cm<sup>-1</sup> を持つ。障壁エネルギーは89.9 kJ/mol であった。TS2 は、Tyr-Arg 間の カルボニル酸素が Arg-Lys 間のカルボニル炭素に求核攻撃をし、5員環構造を生成する遷移状態で 1 つの虚の振動数 155.99*i* cm<sup>-1</sup> を持つ。障壁エネルギーは158.7 kJ/mol であった。TS3はアルギニンの アミドからC末端へのプロトン移動により Lys が脱離する遷移状態で、1つの虚の振動数 696.71*i* cm<sup>-1</sup> を持つ。障壁エネルギーは151.2 kJ/mol であった。

以上の結果から、Off-Resonance CID では低エネルギーで起きるプリカーサイオンからの HPO<sub>3</sub> 脱離 や b<sub>3</sub> イオン(5員環構造)生成が観測され、 On-Resonance CID では、より高いエネルギーを必要とする b<sub>3</sub> (直鎖構造) 生成が観測されると考えられた。

以上の知見は、On-Resonance CID による開裂過程に限るものではなく、反応機構解明の困難であったモバイルプロトンを持たないリン酸化ペプチドのCID開裂機構について正しい理解を与えるものと考えられた。

【結論】

イオントラップ型質量分析装置を用いた新規の開裂手法である On-Resonance 法は、従来のイオント ラップ型質量分析装置の特性である低エネルギー CID による開裂ではなく、より高エネルギーの CID による開裂により翻訳後修飾分子の脱離を抑制していることが、ab initio 分子軌道理論によるリン酸化ペ プチド(pYYRK)の開裂シミュレーションにより明らかになった。今後は、大きなサイズのリン酸化ペプチドの 開裂過程についても、フラグメント分子軌道法を用いて検討するとともに、本知見をシステム開発に活かし、 翻訳後修飾分子の分析手法を発展させる。



図4 b3イオン(直鎖構造)の開裂過程のエネルギープロファイル

プリカーサイオン(R1)からのb<sub>3</sub> イオン(直鎖構造, P1)生成過程について計算した *ab initio* ポテンシャル エネルギー曲線。TS1は、Arg のα炭素の H がアミド窒素へ移動しながら、Lys が脱離する遷移状態 で、1 つの虚の振動数 1,506.97 *i* cm<sup>-1</sup> を持つ。障壁エネルギーは366.6kJ/mol であった。

# 【成果一覧】

### 学会発表

(1) Takae Takeuchi, Ayaka Takahashi, Erika Sugawara, Tomoko Kimura, Yuka Kurosaki, Shigeki Kajihara, Hiroko Morinaga, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka. "Ab initio MO Study on the Fragmentation Mechanisms of Protonated Phosphopeptides in "On-Resonance" and "Off-Resonance" Pulsed Gas Introduction Collision-Induced Dissociations", 29<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference (IMSC), 2012

# 【参考文献】

[1] 田中耕一, 福山裕子, 船越なつ美 "On-Resonance" Pulsed Gas Introduction CIDによる Neutral Lossの低減, 第58回質量分析総合討論会, 2010年.

### 6 マトリックス添加剤によるIR/UV-MALDIの性能向上開発

IR-MALDIは中赤外波長領域の赤外レーザーを用いたMALDI法である。紫外レーザーを用いたMALDI (UV-MALDI)と比較して、イオン化時のフラグメンテーションが少ない(ソフトなイオン化)、多様な化合物を マトリックスとして利用できる(マトリックス選択幅が広い)ことなどが利点として挙げられる。一方、欠点とし ては、感度が低い、1回のレーザー照射当たりの試料の消費量が多く試料の枯渇が早いことなどが挙げら れる。本プロジェクトではIR-MALDIを次世代質量分析装置"DIT-FP機"と組み合わせて性能評価を行うとと もに、試料の枯渇が早い問題点を改善する手法を開発した。

### 1 IR-MALDI基本性能評価

【研究目的】

IR-MALDIは過去に論文が複数報告されているが、UV-MALDIと比較した性能の優位性に一貫性がなく、 分析試料によっては両者で大差がないという報告もある。これは、分析システムの構成や測定条件、試料 の状態などが測定結果に大きく影響を及ぼすことが原因と考えられる。そこで、本IR-MALDIシステムの基 礎的な性能評価として、感度およびソフトイオン化に関しての評価を実施した。

【研究成果】

方法

試料溶液0.5μLをサンプルプレートウェルに滴下後、マトリックス0.5 μLを重層し、室温で溶媒が 乾燥した後、質量分析装置に供した。図1に質量分析装置のレーザーの導光系の模式図を示す。



#### 図1 IRレーザーおよびUVレーザーの導光系

質量分析装置はDIT-FP機を用い、装置イオン源内のサンプルプレート上のマトリックスに入射するIRレーザーおよ びUVレーザーを同一の導光系にするために、UVレーザー用のミラーを取り外すだけでIR-MALDIが行えるようにレ ーザーを配置した。IRレーザーは中赤外波長可変固体レーザー KISS-LASER 5.5-10(川重テクノロジー(株))を 使用した。波長可変領域は5.5µm~10µmで分析には波長5.9µmを使用した。波長可変機構は差周波発生 (Difference Frequency Generation:DFG)を用いて、2種類のレーザー光(ポンプ光:Nd:YAGレーザー(波長 1064nm)、シグナル光:波長可変Cr:forsteriteレーザー(波長1,150~1,350 nm))から波長可変(5.5~10µm)の 中赤外レーザー光を発生させる。導光系はレーザー光の導入をON/OFFするメカニカルシャッター、偏光板によるレ ーザー出力の調整機能、集光レンズの位置調整によるレーザー照射径の調整機能を具備する。UVレーザーには 窒素レーザー(波長337 nm、LTB社)を使用した。マトリックスはurea(2 M; 50% acetonitrile(ACN)に溶解)、 succinic acid(30 mg/mL or 3 mg/mL; 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)に溶解)、2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB)(10 mg/mL;50% ACN/ 0.1% TFAIC溶解)を使用した。 結果

### ① 感度評価

Glufibペプチドを用いたP-LTOFモード(正イオン)による検出限界を表1に示す。ureaとsuccinic acid(3 mg/mL;再結晶化あり)が最も感度が高く、検出限界は5 fmolであった。DIT-FP機のUV-MALDIによる Glufibの検出限界はおよそ50 amolであることから(データ省略)、IR-MALDIの感度はUV-MALDIと比べて 著しく低い。一方、IR-MALDIはUV-MALDIと比べて負イオンモードの感度が高いという報告がある。そこで、 低分子量酸性糖鎖である6'-sialyllactoseを用いた負イオンモードの感度評価を行った(表2)。その結果、 IR-MALDI(ureaマトリックス使用)の検出限界が50 fmolに対し、UV-MALDI(DHBマトリックス使用)の検出限界は500 fmolであり、IR-MALDIの感度が10倍高いことが確認できた。

Matrix	再結晶化	検出限界
Urea	なし	5 fmol
DHB	なし	100 fmol
	あり	10 fmol
	なし	50 fmol
	あり	25 fmol
Sussinia asid(2mg/ml)	なし	50 fmol
	あり	5 fmol

表1	IR-MALDI Glufib検出限界
F	-LTOFモード(正イオン)

(Glufib: Glu-1-Fibrinopeptide B; EGVNDNEEGFFSAR;  $[M+H]^+ = m/z 1,571$ )

DHB, succinic acidについては、サンプルプレートウェル上のサンプル/マトリックス混合結晶にエタノ ールを約1 µL添加し、マトリックス結晶を均一化する"再結晶化法"も評価した(再結晶化法はureaには 効果がない)。

### 表2 6'-sialyllactose検出限界 P-LTOFモード(負イオン)

検出限界		
IR-MALDI	UV-MALDI	
50 fmol	500 fmol	

(6'-sialyllactose: $\alpha$ -NeuNAc(2 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Gal(1 $\rightarrow$ 4)-D-Glc; [M-H]<sup>-</sup> = m/z 632)

### ② ソフトイオン化評価

シアル酸を含有するピリジルアミノ化糖鎖(PA化シアル化糖鎖)およびS-ニトロシル化ペプチドは、 UV-MALDIによる測定中に、それぞれシアル酸、ニトロシル基の脱離が顕著に生じることが知られている。 PA化シアル化糖鎖をI-TOFモード(正イオン)で測定した結果、IR-MALDIではUV-MALDIと比べて post-source decay(PSD)による糖のフラグメンテーションが大幅に抑制された(図2)。次に、S-ニトロシル 化ペプチドをP-LTOFモード(正イオン)で測定した結果、UV-MALDI測定ではin-source decay(ISD)で完 全に脱離するS-ニトロシル基が、IR-MALDIでは脱離が抑制され、ニトロシル基が付加した状態のイオンが 検出された。(図3)。以上の結果から、IR-MALDIはUV-MALDIと比べてソフトなイオン化法であることが示 された。



図2 シアル化PA化糖鎖(PA-023)のマススペクトル ITOFモード(正イオン)/モード2: *m/z* 650-3,800

ピリジルアミノ化糖鎖(PA-023, 10 pmol)をIR-MALDIではureaマトリックスを、UV-MALDIはDHBマトリックスを用い て測定した。UV-MALDIではPSDによってシアル酸の他にも糖の脱離が多数検出された。一方、IR-MALDIではシア ル酸の脱離が僅かに検出された以外に糖の脱離は検出されなかった。

S-ニトロシル化ペプチド: VFDARDC\*RSAQ (\* S-ニトロシル基結合部位)



図3 S-ニトロシル化ペプチドのマススペクトル

P-LTOFモード(正イオン)モード2:m/z650-3,800

Sニトロシル化ペプチド(20 pmol)をIR-MALDIではureaマトリックスを、UV-MALDIではDHBマトリックスを用いて測定した。UV-MALDIではin-source decay(ISD)でSニトロシル基が完全に脱離した。一方、IR-MALDIではニトロシル基の脱離が抑制され、ニトロシル基が付加した状態のイオン([M+NO+H]<sup>+</sup>)が検出された。

【結論】

IR-MALDIは、UV-MALDIと比較して負イオンモードにおける感度が高いことおよびイオン化時のフラグメ ンテーションが少ないソフトなイオン化法であることが確認できた。シアル酸、リン酸基、硫酸基などの負電 荷を有する官能基をもつイオンは、負イオンモードで高感度検出が可能であるが、UV-MALDIでは負電荷 を有する官能基は一般的に脱離が生じやすいという問題がある。そのため、IR-MALDIは負電荷を有する 翻訳後修飾を対象にしたバイオマーカー探索に威力を発揮するものと考えられる。

### 【参考文献】

- Rainer Cramer, Wilhelm J. Richter, Elaine Stimson, Alma L. Burlingame. "Analysis of Phosphoand Glycopolypeptides with Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization", Anal. Chem., 1999, 70, pp4939-4944
- [2] Michiko Tajiri, Yoshinao Wada, "Infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for quantification of glycosaminoglycans and gangliosides", Int. J. Mass Spectrom., 2011, 305, pp164-169
- [3] Michiko Tajiri, Takae Takeuchi, Yoshinao Wada, "Distinct Features of Matrix-Assisted 6µm Infrared Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Biomolecular Analysis", Anal. Chem., 2009, *81*, pp6750-6755

### 2 マトリックス添加剤としてのフラーレン効果

【研究目的】

IR-MALDIの問題点の一つとして、UV-MALDIと比較して分析中のレーザー照射による試料の枯渇(試料が無くなる)が早いことが挙げられる。IRレーザーの波長は長波長のためマトリックスへの浸透性が高く、 IRレーザーがマトリックス結晶の奥深くまで到達する。その結果、激しいアブレーションを引き起こし、試料の消費量が多くなり、試料の枯渇が早くなると考えられている。分析中の試料の枯渇が早いと、レーザー照射回数が増加するMS<sup>n</sup>分析などを円滑に進めることが困難になるという問題が生じる。そこで、IR-MALDIの試料の枯渇の問題を改善することを目的として、IRレーザーの波長を吸収するフラーレンをマトリックスに添加することによって、マトリックス内部に到達するIRレーザーを減衰させ、試料の枯渇の問題を改善する手法を開発した。

### 【研究成果】

方法

試料溶液0.5μLをサンプルプレートウェルに滴下後、マトリックス0.5μL、続いてフラーレン0.5μLを重層し、 室温で乾燥させた後、質量分析装置に供した(図1)。フラーレンを添加した時のサンプルプレート上のurea マトリックスの実体顕微鏡画像を図2に示す。

### 結果

①シグナル持続性の向上

Angiotensin IIペプチドを用いてシグナル持続性(=イオン生成の持続性)を評価した。その結果、フラーレン非添加では約1,400回のレーザー照射で試料が枯渇したのに対し、フラーレンを添加することによって約25,000回のレーザー照射回数までシグナルが持続した(図3)。



図1 試料の調製手順

質量分析装置はDIT-FP機(IR-MALDI測定)および MALDI-TOFMS(UV-MALDI測定;島津製作所)を使用した。DIT-FP機のIRレーザーは中赤外波長可変固体レーザー KISS-LASER 5.5-10(川重テクノロジー)を使用した。波長可変領域は5.5 $\mu$ m ~ 10 $\mu$ m で分析には波長5.9 $\mu$ mを使用した。波長可変機構は差周波発生 (Difference Frequency Generation:DFG)を用いて、2種類のレーザー光(ポンプ光:Nd:YAGレーザー(波長 1,064 nm)、シグナル光:波長可変Cr:forsteriteレーザー(波長1,150~1,350 nm))から波長可変(5.5~10  $\mu$ m)の中赤外レーザー光を発生させる。導光系はレーザー光の導入をON/OFFするメカニカルシャッター、偏光板によるレーザー出力の調整機能、集光レンズの位置調整によるレーザー照射径の調整機能を具備する。マトリックスはurea(2 M; 50% acetonitrile(ACN)に溶解)、 $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)(10 mg/mL;50% ACN/ 0.1% TFAIC溶解)、2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)(10 mg/mL;50% ACN/ 0.1% TFAIC溶解)を使用した。フラーレン(C<sub>60</sub>)はトルエンを用いて飽和溶液を調製し、遠心分離後、上澄み液をフラーレン溶液として使用した。



図2 サンプルプレート上のureaマトリックスの実体顕微鏡画像 フラーレンは褐色の物質として視認でき、今回用いた試料調製手順ではフラーレンはurea結晶の円周部に分布する。



図3 シグナル持続性

#### IR-MALDI/ ureaマトリックス/P-LTOFモード(正イオン)

Angiotensin II (DRVYIHPF; [M+H]\* = m/z 1,047)を用いてureaマトリックスの結晶上のスィートスポットでレーザー 照射を繰り返し、シグナルの持続性を評価した。フラーレンを添加した試料ではフラーレンが分布する領域でスィート スポットを選択した。フラーレン非添加では約1,400回のレーザー照射で試料が枯渇したのに対し、フラーレンを添加 することによって約25,000回のレーザー照射回数までシグナルが持続した。 この結果から、フラーレンを添加することによってシグナルの持続性が向上することが分かった。このシ グナル持続性の向上は、1回のレーザー照射当たりの試料の消費量が減少したためと考えられる。すなわ ち、フラーレンによってマトリックス結晶に到達するIRレーザーが減衰した結果、アブレーションが抑制され、 試料の消費量が減少したと考えられる。また、UV-MALDIでも一部効果が確認でき、DHBマトリックスを用 いた時にシグナル持続性の向上効果が確認できた(図4)。一方、CHCAマトリックスを用いた時にはシグナ ル持続性の向上効果は確認されなかった(データ省略)。マトリックスの性質によりフラーレンの効果が変 化することが示唆され、適切なマトリックスを選択する必要がある。



図4 Angiotensin II(1 pmol)のシグナル持続性のMSイメージ UV-MALDI/ DHBマトリックス/ P-LTOFモード(正イオン) 実体顕微鏡画像内の水色の実線の四角形は実体顕微鏡画像とMSイメージの位置 を比較できるように表示している。

②感度向上効果

フラーレン添加および非添加の感度評価をAngiotensin II の検出限界で評価した(図5)。その結果、フ ラーレンを添加することによって若干の感度向上が見られた。フラーレンを添加剤として用いることによって シグナル持続性が向上していることから(図3)、1回のレーザー照射当たりの試料消費量は減少しており、 感度の低下が予想された。しかしながら、実際には感度は低下せず、逆に感度が向上していることから、フ ラーレンを添加することによって、マトリックスのイオン化効率が向上した可能性が示唆される。フラーレン はUVレーザーやIRレーザーの波長を吸収する性質を持つため、フラーレンが吸収したレーザーエネルギ ーが効率よくマトリックスに伝達された結果、マトリックスのイオン化効率が向上した可能性が考えられる。 以上の結果から、IR-MALDIにおいてフラーレンをマトリックス添加剤として使用することによって、試料の シグナル持続性および感度が向上することが明らかとなった。

### ③MALDI-ISD促進効果(UV-MALDIのみ)

UV-MALDIではIR-MALDIでは確認されなかったフラーレン添加効果が確認された。DHBマトリックスを 用いた糖関連物質(糖鎖、ラベル化糖鎖(ピリジルアミノ化糖鎖)、糖ペプチド)の測定において、フラーレン を添加剤として用いると、これら糖関連物質のin-source decay(ISD)が促進された。糖鎖のISDスペクトル





を図6に示す。糖鎖のMALDI-ISDの効率は低いことが報告されており、今回の評価においてもフラーレン 非添加におけるISDフラグメントの数は少なかった。一方、フラーレンを添加することによってISDが著しく促 進された。ペプチドではISD促進効果は確認されなかったことから(データ省略)、糖を媒体としてフラーレン 自身が吸収したレーザーエネルギーが効率よく糖関連物質に伝達された結果、ISDが促進されたことが示 唆される。



図6 糖鎖(A2-グリカン;1 pmol)のISDマススペクトル UV-MALDI/DHBマトリックス/P-LTOFモード(正イオン) フラーレン非添加では糖鎖のフラグメントは僅かであり、インタクトイオンであるナトリウム付加イオン ([M+Na]<sup>+</sup>)も多く残った。一方、フラーレン添加ではナトリウム付加イオンが完全に開裂し、多数の糖鎖フ ラグメントが生成した。

【結論】

IR-MALDIにおいて、マトリックス添加剤としてのフラーレンは、シグナル持続性や感度を向上させる効果があり、試料の枯渇の問題を改善するのに有用であった。この効果によって、レーザー照射回数が増加す

るMS<sup>n</sup>分析などを円滑に進めることができるようになり、生体試料の分析などにも応用できる。また、 UV-MALDI測定において、フラーレンに糖関連物質のISDを促進する効果があることが明らかとなった。糖 関連物質の質量分析において、ISDと他のフラグメント手法を組み合わせた相補的解析を行うことによって、 より確度の高い構造解析が可能となる。

### 【成果一覧】

学会発表

- Sadanori Sekiya, Kei Kodera, Kaori Kinoshita, Kosuke Hosoi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka. "Novel effect of fullerene as an additive in IR-MALDI MS",61th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013
- (2) 関谷禎規、小寺慶、木下香織、細井孝輔、岩本慎一、田中耕一「IR-MALDIおよびUV-MALDI質量分析における添加剤としてのフラーレンの効果」第61回質量分析総合討論会、2013年

### 特許出願

- (1) 関谷禎規、小寺慶、MALDI質量分析方法、出願番号2013-080956
- (2) 関谷禎規、MALDI質量分析方法、出願番号2013-118806

# 【参考文献】

[1] Hongmei Yang, Yingning Yu, Fengrui Song, Shuying Liu, "Structural Characterization of Neutral Oligosaccharides by Laser-Enhanced In-Source Decay of MALDI-FTICR MS", J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2011, 22, pp845-855