

構造解析のための MALDI-TOFMS

田 中 耕 一⁽¹⁾

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOFMS) for Structure Analysis

by Koichi TANAKA

*Research & Development Department, Analytical Instruments Division,
Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*

(Received January 7, 1997)

Abstract

The recent popularization of the MALDI-TOFMS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) method has brought forth the development of the methods to obtain information on chemical structures, as well as the methods to measure molecular weights with high speed and high sensitivity.

The best way to study chemical structures is to use an MS/MS instrument that also permits mass spectrometry. Low cost MS instruments, however, can be used for this application through the use of some particular methods. Combined use of matrices and/or enzymatic degradation with an MS instrument, for example, is a reliable method for the study of chemical structures.

The advanced computer hardware and software further enhance the reliability and efficiency of the structure study.

Keywords : MALDI, TOFMS, MS/MS, Protein ladder sequencing, Post source decay, Collision induced dissociation, Curved field reflectron

要 旨

近年, MALDI-TOFMS 装置の普及に伴い, その機能を活用した様々な分析手法が開発され, 試料の分子量を迅速・高感度・高精度で測定するのみならず, 構造情報までも入手する方法が数多く考案され, 活用されてきている。

構造情報を最も幅広く入手できる手法は, MS 測定も可能な MS/MS 装置を用いることになるが, 比較的成本の安い MS 測定のための装置でも導入可能な手法も多数存在する。例えば, 試料の分解を促進するマトリックスの採用, 酵素消化等の化学反応との組み合わせがある。また, コンピュータの処理・解析能力を活用した手法も開発されている。

本稿では, これらの手法とその特徴を紹介する。

1. はじめに

近年, MALDI-TOFMS 装置の普及に伴い, その機能を

活用した様々な分析手法が開発されている。また, 試料の分子量を迅速・高感度・高精度で測定するのみならず, 構造情報までも入手する方法が数多く考案され, 活用されてきている。

注⁽¹⁾ 分析機器事業部 技術部

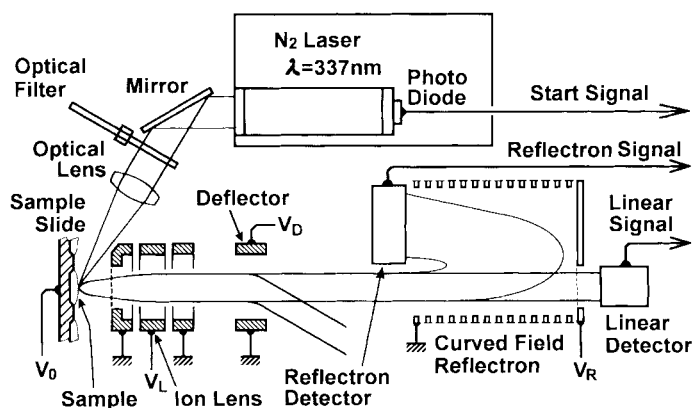


図1 KOMPACT MALDI IV 装置概略図

Block Diagram of KOMPACT MALDI IV MALDI TOFMS/MS

構造情報を最も幅広く入手できる手法は、MS測定も可能なMS/MS装置を用いることになるが、比較的コストの安いMS測定のための装置でも導入可能な手法も多数存在する。

本稿では、これらの手法とその特徴を以下に紹介する。

2. 測定装置

MALDI TOFMS及びMALDI-TOFMS/MS装置として、島津/Kratos KOMPACT MALDI III及びKOMPACT MALDI IVを使用した。図1は、KOMPACT MALDI IVの概略図である。以下に、その動作原理概略を示す。

N_2 Laser光は、Optical Filterによって調光されOptical Lensで集光された後、Sampleに照射される。発生したイオンは、 V_0 の印加電圧によって図1右方向に引き出される。引き出されたイオンは、Ion Lens電圧 V_L を印加することにより、各イオンが平行飛行できるようになる。

ここで、Deflector電圧 $V_D = 0$ かつReflector電圧 $V_R = 0$ の場合、イオンは直線飛行しLinear Detectorに到達する。この方法をLinear型と呼び、特に高感度の測定が期待できる。これに対し、 $V_D = 0$ かつReflector電圧($|V_R| > |V_0|$)を印加した場合、イオンはReflector内で折り返され、Reflector Detectorに到達する。この方法をReflector型と呼び、特に高精度・高分解能の測定が期待できる。

図1の装置でMS/MS測定を行う場合は、通常はDeflectorに電圧を印加($V_D \neq 0$)しておき、図1の下方にイオンを偏向させる。注目しているイオン(プリカーサイオン)が偏向板を通過する一瞬のみ $V_D = 0$ とする。

なお、注目しているイオンは、飛行途中(ドリフト空間)で分解したイオン(プロダクトイオン)も、分解しないイオンと同じ速度で飛行し、同一時刻にDeflectorを通過する。

この操作によって、注目しているイオン及びそれから分解したイオンのみが図1で右方に直線飛行でき、Reflectorに導入できる(これが1段目のMSとなる)。

Reflector電圧 V_R を印加した状態では、上記全てのイオンが折り返すが、分解したイオンは途中で運動エネルギーの一部を失っているため、Reflector内部で先に折り返し、エネルギー(m/z 値)の小さい順に、分解しないイオンよりも早くReflector Detectorに到達できる(これが2段目のMSとなる)。

図1のReflectorの場合、分解したイオン(プロダクトイオン)もエネルギー収束できるため、 V_R 一定のままで全てのイオンを同時に検出できる¹⁾。すなわち、一度のイオン化で、MS/MS全スペクトルが測定できる。

3. MSでも可能な構造解析手法

3.1 Edman方法応用例

B. T. Chaitらが開発し、Protein Ladder Sequencing (PLS)²⁾と名付けているペプチド一次配列解析方法は、Edman方法の応用である。Edman方法とは、Phenylisothiocyanate (PITC)をN末端に100%反応させ、トリフルオロ酢酸(TFA)等にてN末端1残基を取り出し、このHPLC保持時間の差異によって取り出されたアミノ酸をアサインし、これを繰り返してN末端からのシーケンスを行う方法である。

これに対し、図2に示されるPLSは、全てのN末端にPITCを反応させるのではなく、保護基Phenylisocyanate (PIC)を数%加えることによって、一部切れ残るものを残す。この混合物を、最初の反応に戻して同様の反応を行わ

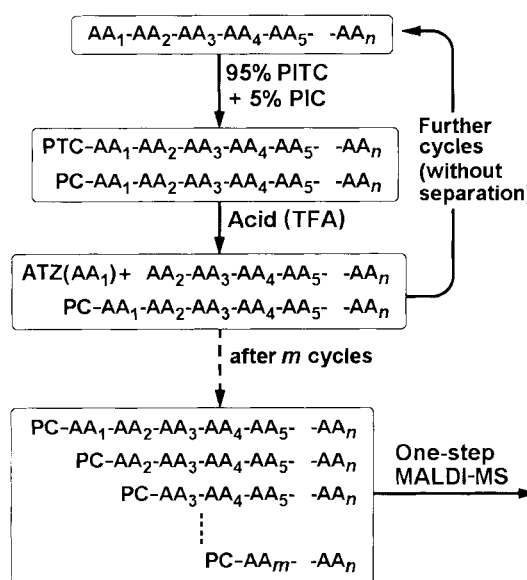


図2 Protein Ladder Sequencing方法
Protein ladder sequencing

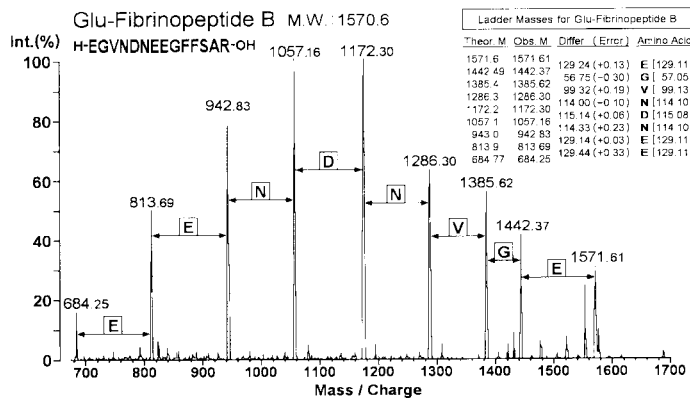


図3 Glu-Fibrinopeptide B Protein Ladder Sequencing 測定例
Protein ladder sequencing of Glu-fibrinopeptide B

せる。これを m 回繰り返せば、まったく切れていない元のペプチドから、N 末端から m 個まで切れたペプチドの混合物ができる。この最終混合物を MALDI-TOFMS で 1 回のみ測定することにより、シーケンスが行える。

図3は、上記方法を用いて Glu-Fibrinopeptide B (M.W.: 1570.6) を測定した一例であり、各ピークの質量数差を見ることによって、容易に N 末端から 8 残基までのシーケンスが行えることが分かる。

この手法の特徴を以下に列記する。

- (1) 高感度 (fmol 程度でも可能)。
- (2) 低ランニングコスト。
- (3) Edman 方法より短時間。
- (4) 数10残基程度のシーケンス可能。
- (5) 通常アミノ酸以外 (e.g. Phosphorylated, Glycosylated) でも測定可能。
- (6) Mass が同一 (e.g. Leu = Ile) の残基は判別不能。

3.2 N 末端, C 末端酵素消化方法³⁾

近年、ペプチドの N 末端または C 末端から順次切断する酵素が注目されている。図4は、Carboxypeptidase P を用いた [Met-OH]-Substance P 測定例である。一番手前のスペクトル (No Digestion) は、酵素消化を行わない場合であり、2 番目以降 (Dgt. #1, 2, 3) は、試料溶液に酵

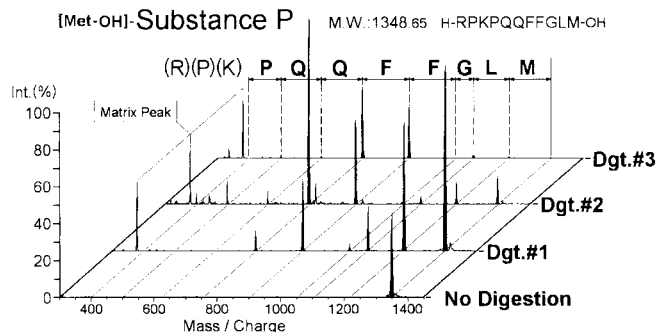


図4 Carboxypeptidase P による酵素消化混合物測定例
Analysis of enzymatic mixture with carboxypeptidase P

素を滴下して数十秒~百数十秒間反応させ、マトリックス溶液を滴下するまでの時間長を変えることによって消化反応進行度の違いを見たものである。反応時間が長いものほど消化が進んでおり、これらのスペクトルを総合することにより、C 末端からのシーケンスが行える。

N 末端からのシーケンスは、例えば Aminopeptidase M を用いることによって可能である。

Protein Ladder Sequencing と異なるのは、通常10残基未満のみに限られることと、反応が短時間・容易に行え、N, C 両末端からのシーケンスが行えることである。

なお、同様の方法を DNA シーケンスにも採用可能である。例えば、3'-Exonuclease Degradation を部分的に行うことにより、Ladder Sequencing スペクトルが得られる⁴⁾。

3.3 マトリックス化学反応活用方法

MALDI におけるマトリックスは、主に試料分子を分解させずに脱離させ、プロトン等のイオンを付加することにより試料分子イオンの発生を促進するために用いるが、使用方法、マトリックスの種類によっては、それ以外の役割をはたす場合がある。

1, 5-Diaminonaphthalene (DAN) ($C_{10}H_{10}N_2$ M.W.: 158.20) は、S-S 結合を分離 (還元反応) させる能力がある。図5上図は、Sinapinic Acid (SA) ($C_{11}H_{12}O_5$ M.W.: 224.21) を用いて負イオン測定モードで Bovine Insulin (M.W.: 5733.5) を測定した一例であり、プロトン脱離分子イオンのみ検出されている。これに対し、図5下図は、DAN を用いた場合であり、Bovine Insulin の A 鎖・B 鎖も検出されている。

3.4 イオン置換方法

MALDI におけるマトリックスは、試料分子関連イオンとしては、プロトン付加/脱離イオン以外のイオン種を発生する場合がある。

図6は、ある製薬関連化合物を測定した一例である。試料分子関連イオンとしては、カチオン付加イオン ($[M+Na]^+$, $[M+K]^+$) 以外に、複素環骨格にある窒素 N に接続した水素 H^+ がカチオンに置換したと考えられるピーク群 ($[M-H+2Na]^+$, $[M-H+Na+K]^+$) も測定されている。試料分子関連イオンのこのようなパターン特徴を解析することにより、(部分的な)分子構造情報を得ることもできる。

プロトンドナー系のマトリックスを用いた場合、このような置換反応が発生しても、プロトンどうしの交換のため、図6のようなピーク群は発生困難である。有機・無機塩を積極的に添加してカチオンの存在量を増加させたり、カチオン付加イオン発生促進用マトリックス (図6では無

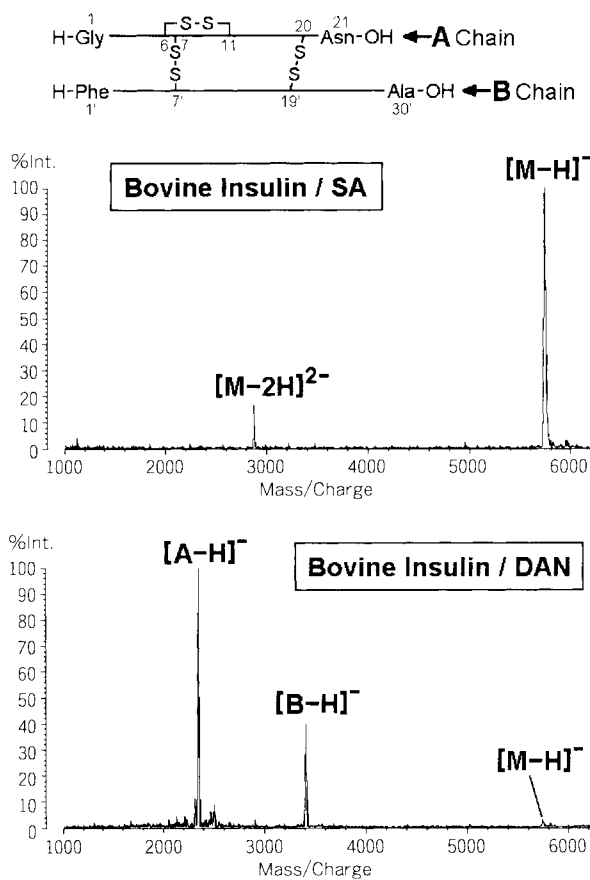


図5 SA及びDANを用いた場合のインスリン測定例比較
Mass spectra of insulin/SA and insulin/DAN

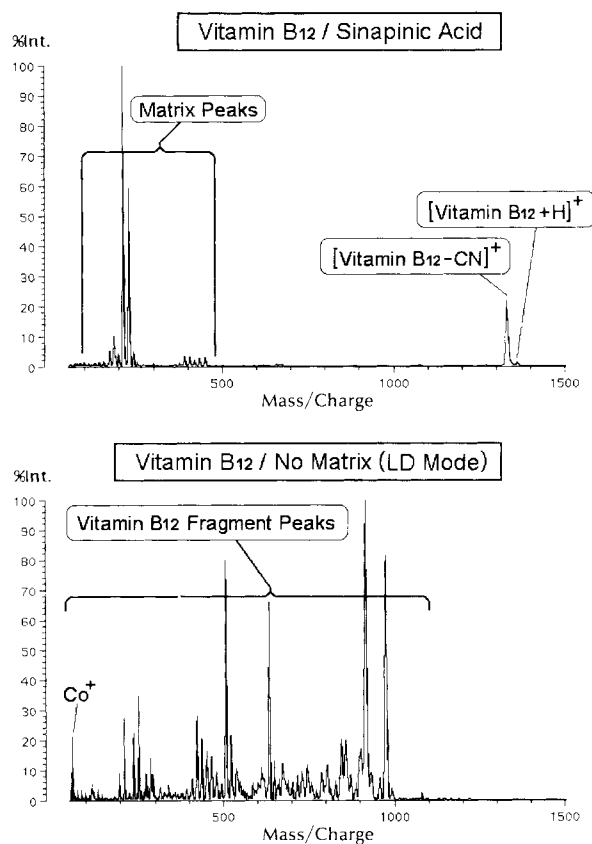


図7 Vitamin B₁₂におけるMALDI/LD比較
MALDI spectrum and LD spectrum of vitamin B₁₂

するレーザー強度を高めたり、さらにマトリックスを用いない(狭義の)レーザー脱離 Laser Desorption (LD) を用いることなどにより、積極的にフラグメントイオン(試料がイオン化時に分解して生成したイオン)の発生を促進させることができる場合が多い。

図7上図は、Vitamin B₁₂をマトリックスを用いたMALDIモードで測定した一例であり、試料分子イオンが強度高く検出されている。

無機・有機化合物の中には、レーザー光波長(使用装置発光波長は337 nm)を多少なりとも吸収できるものが存在する。Vitamin B₁₂は赤褐色をしており、図7下図に示されるように、試料のみにレーザー光を照射したLDモードでも試料関連イオンが測定されている。数多く強度高く測定されている分解イオンが、構造情報となりうる一例である。

なお、図6にもフラグメントイオン(Fragment Peak ①, ②)が測定されている。

4. コンピュータソフトウェア活用方法

4.1 各種パラメータ算出ソフトウェア活用方法

MALDIは、ポリマーに限らず、オリゴマー、添加剤、界面活性剤、色素等を含めた高分子工業関連物質をも幅広く分析できることで近年注目されている。

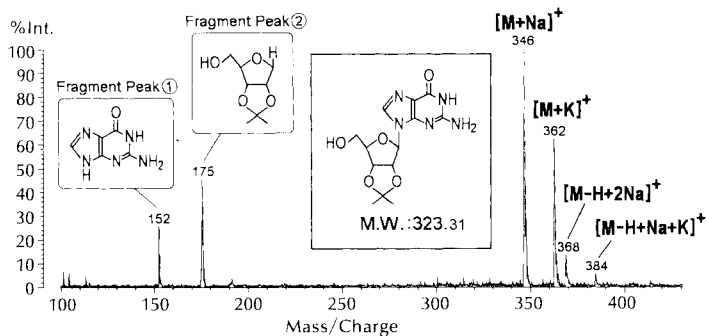


図6 イオン化時における置換反応測定例
An example of substitution reaction in ionization

機化合物マトリックス⁹⁾を採用する等の工夫が必要である。

このような置換反応は、MALDIにおいては例外とはいえない。試料がカルボキシル基(-COOH)やリン酸基(-PO₄H)等のイオン結合性基を持つ場合、頻繁に発生する。

3.5 イオン化状態変更方法

MALDIは、試料分子を分解させずにイオンを発生させる「ソフトなイオン化方法」の代表例であるが、試料分子の内部エネルギーを高めるマトリックスを用いたり、照射

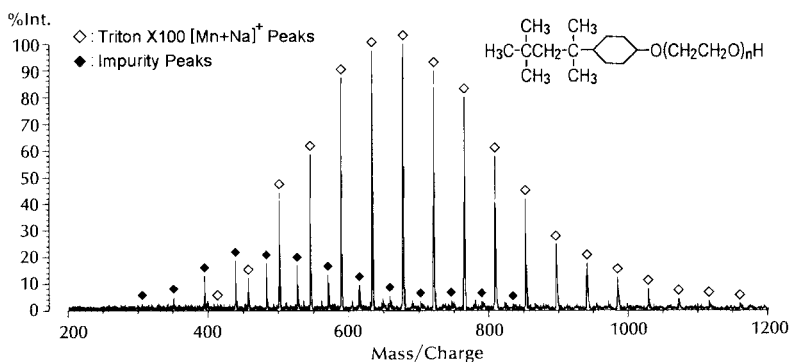


図8 還元型トリトン X-100 測定例
Mass spectrum of Triton X-100 (reduced)

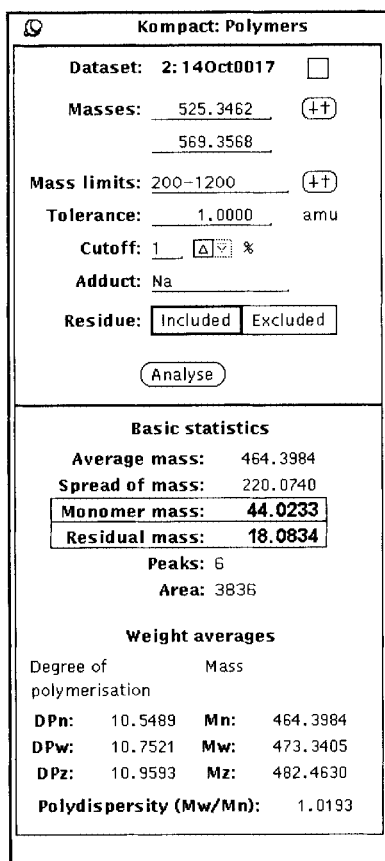


図9 Polymer ウィンドウ表示例
A window for polymer analysis parameters

図8は、ノニオン系界面活性剤の一種である(還元型)トリトン X-100 (図8の◇群)を測定した一例である。スペクトルには、試料以外の不純物ピーク群(オリゴマー)(図8の◆群)が測定されている。

ここで、この不純物のポリマーパラメータを算出するために、装置に付属している“Polymer”ソフトウェアを活用することを試みる。図9が“Polymer”画面表示例である。エントリーすべき項目を上部 Window に入力した結果が、下部 Window に算出結果として表示されている。

自動で算出された各種ポリマーパラメータの中で、

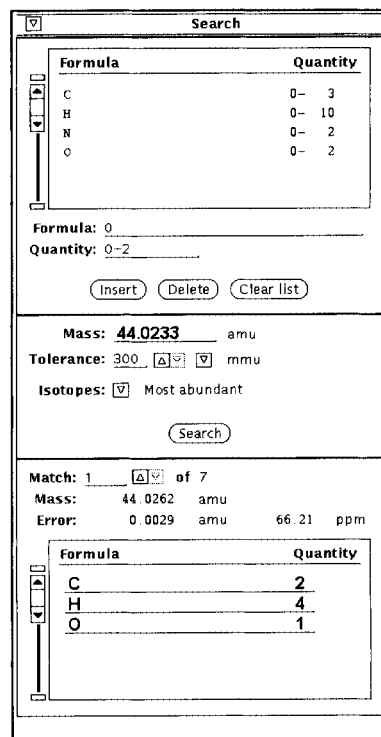


図10 Search ウィンドウ表示例
A window for search

Residual mass が 18.0834 となっており、これが、構造式でモノマー単位以外の左端・右端両方の基を合わせた質量数を表していると考えられる。

4.2 組成等検索ソフトウェア活用方法

さらに、ここで算出されたモノマー単位を構成する組成式を検索するために、装置に付属している“Search”ソフトウェアを活用することを試みる。図10が“Search”画面表示例である。上部 Window は、エントリーすべき項目を入力する。ここでは、モノマー単位~44 Mass を構成する可能性のある元素とその個数(炭素:0~3個、水素:0~10個、窒素:0~2個、酸素:0~2個)を入力し、中部 Window は、検索すべき精密 Mass (44.0233) と範囲 (±300 milli mass unit) を入力し、Search ボタンを押した結果が、下部 Window に検索結果(入力 Mass に近い組み合わせから順にリストアップ)として表示されている。

この結果では、最も近似の組み合わせとして C₂H₄O が上げられており、前述の Residual mass の計算結果と総合して、本不純物ピーク群がトリトン X-100 の原料である Polyethylene glycol (PEG) (HO-[CH₂CH₂O]_n-H) 由来であることを、ほぼ確定することができたといえる。

本例は、モノマー単位という多数ピーク平均値算出結果を採用しており、誤差は通常よりも抑えられている。このことが、TOFMS の精度でも、主に従来からの二重収束型 MS で可能な「ミリマス」に相当するような検索が行えた理由

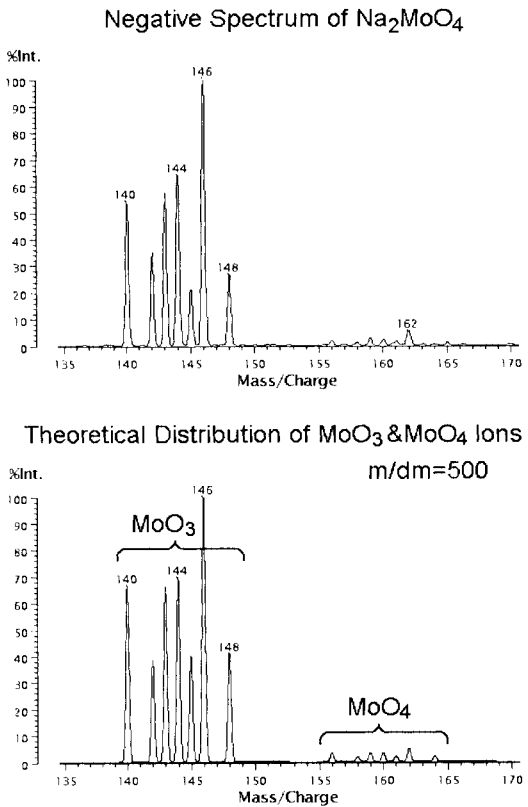


図11 Na₂MoO₄実測例と理論分布比較
Real spectrum and theoretical distribution of Na₂MoO₄

と考えられる。

このような検索は、元素に限る必要はなく、例えば合成ペプチドのアミノ酸組成やオリゴ糖の各単糖組成検索等にも応用できる。

4.3 同位体存在比参照方法

MALDI (LD) は、無機化合物や金属有機化合物の測定も可能である。

図11上図は、Na₂MoO₄を負イオンモードで測定した一例である。図11下図は、装置に付属している理論分布計算ソフトウェアを用いて、MoO₃ (強度：100%)、MoO₄ (強度：5%)、分解能 m/dm=500 の場合の理論分布を表示させたものである。元素の中には、Mo のように特異的な同位体分布を示すものが少なくなく、図11のように理論分布を並列表示させることにより、組成の確認補助を行うことができる。

5. MS/MS で可能な構造解析手法

5.1 プロダクトイオン群アサイン方法

図12上図は、Renin Substrate (M. W.: 1646.95) を MS モードで測定した一例であり、低質量域にマトリックスや不純物由来のピークが多数検出されている。ここで検出されている試料のプロトン付加分子イオン [M+H]⁺ (m/z: 1647.94) をプリカーサイオン (分解を行う前のイオン) と

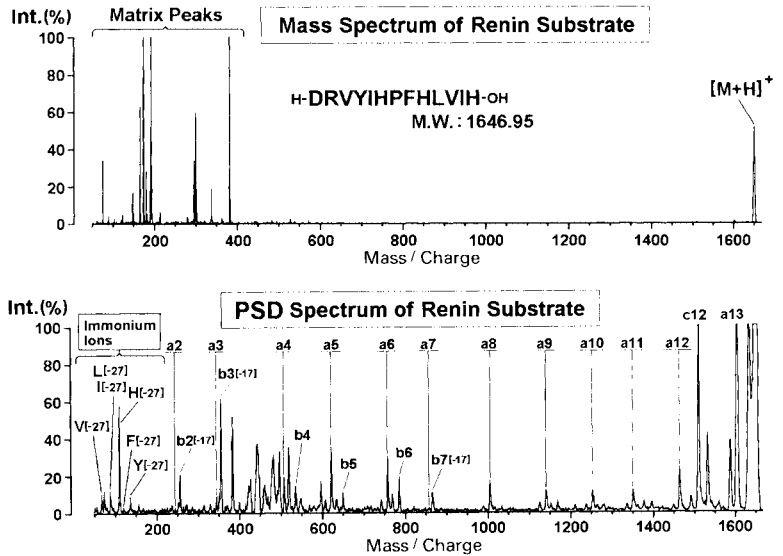


図12 Renin Substrate の MS 及び MS/MS スペクトル
MS and MS/MS spectra of renin substrate

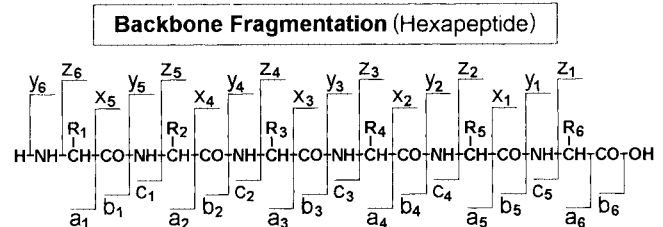


図13 ペプチド主鎖における分解系列説明図
Series of backbone fragmentation of hexapeptide

して MS/MS モードにし、このプロダクトイオン (ここではイオン源以降で自然に分解した Post Source Decay [PSD] Ion) を測定したのが、図12下図である。このペプチドのアミノ酸配列を表す a, b 系列のピーク群と、構成アミノ酸を表す Immonium Ion 群が測定されている。

なお、a, b 系列を含めた記号と数字の意味は、図13の6残基ペプチドの例に示される通りである⁶⁾。

Renin Substrate は、N 末端に電荷 H⁺ の付きやすいアミノ酸 Asp(D)、Arg(R) が存在するため、N 末端が保持され C 末端側が順次切断された a, b, c 系列プロダクトイオンが特異的に強く測定されている。このため、解析が容易である。しかし、一般的には、x, y, z 系列や側鎖の切れた d 系列イオンも混在し、配列によっては配列を示すイオンの一部 (あるいは大部分) が検出されない場合がある。

このような場合にもシーケンスを可能にするため、様々な手法が開発されている。

例えば、イオンが飛行途中に自然に分解することを期待する PSD ではなく、積極的に分解反応を発生させるために、衝突ガスを導入する Collision-Induced Dissociation (CID) がある。図14上図は、Angiotensin II を通常の PSD

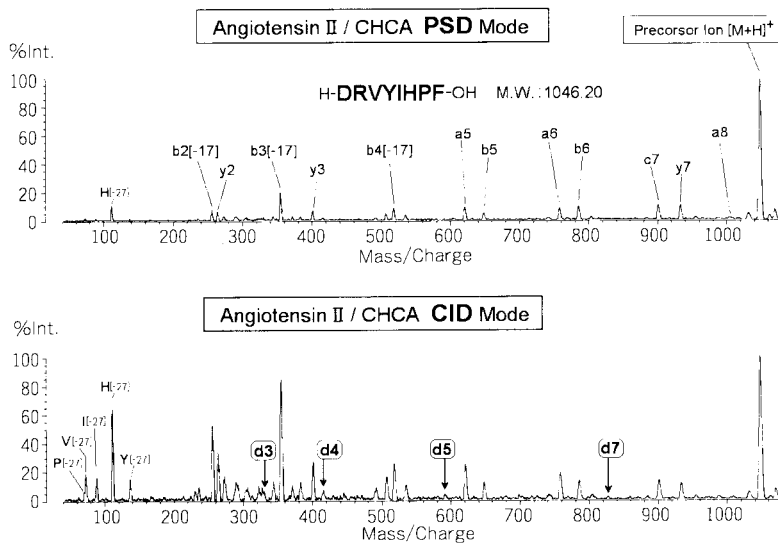


図14 Angiotensin II の PSD 及び CID スペクトル比較
PSD and CID mass spectra of angiotensin II

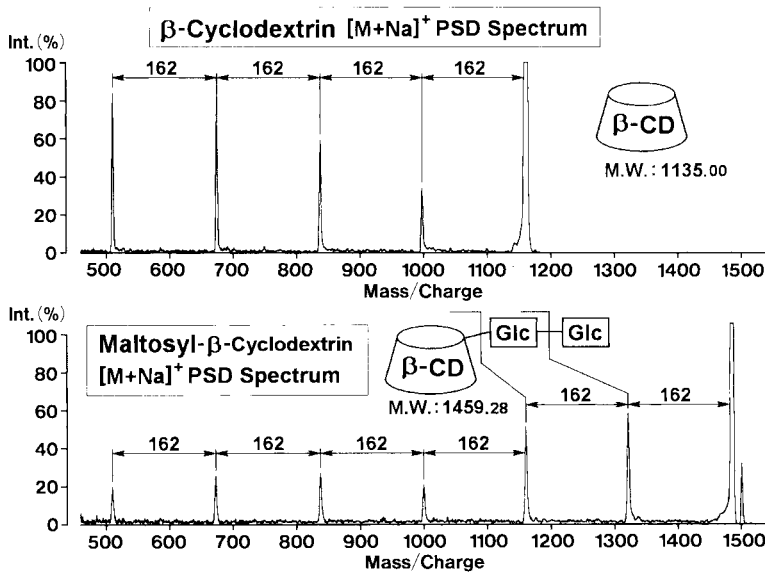


図15 β -Cyclodextrin 及び Maltosyl β -Cyclodextrin の MS/MS
スペクトル比較
MS/MS spectra of β -cyclodextrin and Maltosyl β cyclodextrin

モードで測定した一例である。MALDI は、レーザー強度を強くしたり適切なマトリックスを用いることにより、発生イオンの内部エネルギーを高めることが容易であり、従来の FABMS 等と比べてプロダクトイオンの生成量が比較的多く、この PSD モードでも大部分の構造解析が行える場合があるが、側鎖まで切断できるだけのエネルギー (High Energy Collision) を得ることは困難であり、質量数の等しい残基を判別することは一般には行えない。

これに対し、図14下図は、衝突ガスを導入した場合 (CID モード) であり、側鎖の切れた d 系列イオンまで検出されている。このイオン“d5”の存在により、N 末端から 5 番目のアミノ酸が Leu(L) ではなく Ile(I) であることを確定す

ることができる。

また、a, b, c と x, y, z 系列が混在するスペクトルから各系列を分離判別するために、前述の N, C 末端酵素消化方法を兼用する方法もある。これは、例えば、図4に示されるように Carboxypeptidase P を用いてペプチドを処理した場合、N 末端からの配列が同一のペプチド混合物が生成される。これの各ピークに対し MS/MS 測定を行うと、各々のスペクトルにおける (番号の小さい) a, b, c 系列のプロダクトイオンは同一 Mass になる。すなわち、各 MS/MS スペクトル全てに共通して存在するピークが a, b, c 系列であり、これより N 末端からのシーケンス解析が容易になる。また、MS スペクトルの分子イオン群の質量数差をみることにより C 末端からのシーケンス (数残基) が行えるため、これらの補助情報を総合することにより、解析が容易になる。この方法は、Prof. Cotter らによって “Nested PSD” と呼ばれている。

5.2 プロダクトイオン強度情報活用方法

図15上図は、 β -Cyclodextrin (M. W.: 1135.00) を MS/MS モードで測定した一例である。 β -Cyclodextrin の Na 付加分子イオン (m/z : 1158.00) をプリカーサイオンとしており、グルコース単位 ($C_6H_{12}O_6 - H_2O$) 162 Mass ずつ離れたプロダクトイオン群が測定されている。このような同一化合物単位でできた環状化合物が分解する場合は、分子量が約半分になったものが生成され易い傾向があり、上図もプロダクトイオン強度は、 m/z : 600 を中心としてほぼ正規分布をしている。

これに対し、図15下図の Maltosyl- β -Cyclodextrin (M. W.: 1459.28) を MS/MS モードで測定した一例では、1つ及び2つ糖が切れたピークが強度高く、それ以下の部分が上図と同様の分布をとっている。この試料は、モデル構造図に示される通り、Maltosyl 部位が β -Cyclodextrin から枝のように伸びている。したがって、2糖まで切れて発生するプロダクトイオンは、1か所のみグリコシル結合切断で発生するのに対し、 β -Cyclodextrin 部位は、2か所以上切れる必要があり、それだけ発生が困難、すなわち発生量が少なくなる。

この場合は、プロダクトイオンの強度差も構造情報を表している。用いた測定装置は、発生したプロダクトイオンをスキャンを行わずに全て同時に検出することができる

Curved Field Reflectron¹⁾を採用しているため、このようにプロダクトイオンの定量性が求められるMS/MS分析にも対応できる。

6. む す び

本稿で紹介できたのは、数ある構造解析手法のごく一部でしかない。

従来、化合物の分子量や構造を決定するためには、主にNMR, X線解析, MS, CD, SDS-PAGE, GPC, プロテインシーケンサ等が用いられてきた。

近年、なかでもMSは、MALDIに限らずMSⁿ等の新たな分析手法の開発・普及や測定可能な化合物範囲、装置感度 (fmol~amol), 分解能 (数千~100万), 精度 (~ppm) などの大幅な改善が行われており、得られる分子量情報や構造情報の量・質・信頼性・コスト面・入手の容易さも格段に向上しているといえる。MSが必要とされる分野も、裾野が極めて広がってきている。

特に未知物質の分子量や構造を100%確定するためには、

他の手法を併用しなければならないが、構造解析分野全体においてMS装置が占める役割は、今後ますます増えることは間違いないと言える。

参 考 文 献

- 1) T. J. Cornish and R. J. Cotter: Rapid Commun. Mass Spectrom., 8, 781 (1994)
- 2) B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis and S. B. H. Kent: SCIENCE, 262, 89 (1993)
- 3) A. S. Woods, A. Y. Huang, R. J. Cotter, G. R. Peternack, D. M. Pardoll and E. M. Jaffee: Anal. Chem., 226, 15 (1995)
- 4) E. Nordhoff, M. Karas, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, K. Kristiansen and P. Roepstorff: 42nd ASMS Conf. Mass Spectrom., ThP78 (1994)
- 5) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida: Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 151 (1988)
- 6) R. S. Johnson and K. Biemann: Biomed. Environ. Mass Spectrom., 18, 945 (1989)



たばこ屋こし
(糸野町)