

生体高分子の迅速な質量分析に向けた 中赤外波長可変レーザーによる大気圧レーザーイオン化法の開発

環境・エネルギー工学専攻
量子ビーム応用工学領域（粟津研究室）

平 口 竜 士

1. はじめに

医薬品の5割以上がターゲットにしているとされる膜タンパク質などの生体高分子の網羅的な解析において、質量分析は必須の技術として用いられている。質量分析法は、試料分子を何らかの手法で気相のイオンとして取り出し、電磁気的な手法で質量分離することで質量情報を得る分析手法である。近年の生体分子の質量分析の発展は、タンパク質やペプチドなどの生体高分子を開裂させることなくイオンとして取り出すことが可能なイオン化法（ソフトイオン化法）の開発によるところが大きい。その代表的なものとしてESI (electrospray ionization) 法¹⁾とMALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) 法²⁾が挙げられるが、これらはそれぞれ原理的な問題点を抱えている。ESI法(図1左)では揮発性溶媒に溶かし込んだ試料を大気圧下で噴霧することでイオン化を行うが、膜タンパク質の試料調製上必要になる不揮発性の緩衝剤や強酸、過剰な有機溶媒などによりイオン化が阻害されることが知られている。一方、MALDI法(図1右)は、レーザーをよく吸収する芳香族化合物(マトリックス)と試料の混晶に対して、高真空下でレーザーを照射する。結晶化した不均一な試料に集光したレーザーを照

射することから、再現性や定量性が非常に低いことや、連続的な分析が不可能なことが課題点として挙げられている。

通常、MALDI法において用いられるレーザーは窒素レーザーなどに代表される紫外レーザーである。一方で、中赤外波長域には、一般的な溶媒などに含まれる様々な官能基に特有の吸収帯を持つ。したがって、中赤外波長域の波長可変レーザーを用いることで、溶媒の強いレーザー吸収を引き起こし、溶媒をマトリックスとして活用できる可能性があると言える。

近年、赤外レーザーによるレーザーイオン化質量分析は盛んに検討されており、水をマトリックスとして活用した先行研究も複数報告されている^{3,4)}。しかしながら、先行研究で用いられている赤外レーザーのほとんどは波長3 μm帯に限られている。この波長帯に存在する分子振動モードは主にOHとNHに限られ、マトリックスとして利用可能な溶媒もこれを含む水やアルコールに限定される。

一方で、波長6-7 μm帯にはOH、C=O、CH₃など一般的な有機化合物や溶媒に多く含まれる官能基に由来する振動モードが多数存在する(図2)。つまり、波長6-7 μmの赤外レーザーは、多様な溶媒のレー

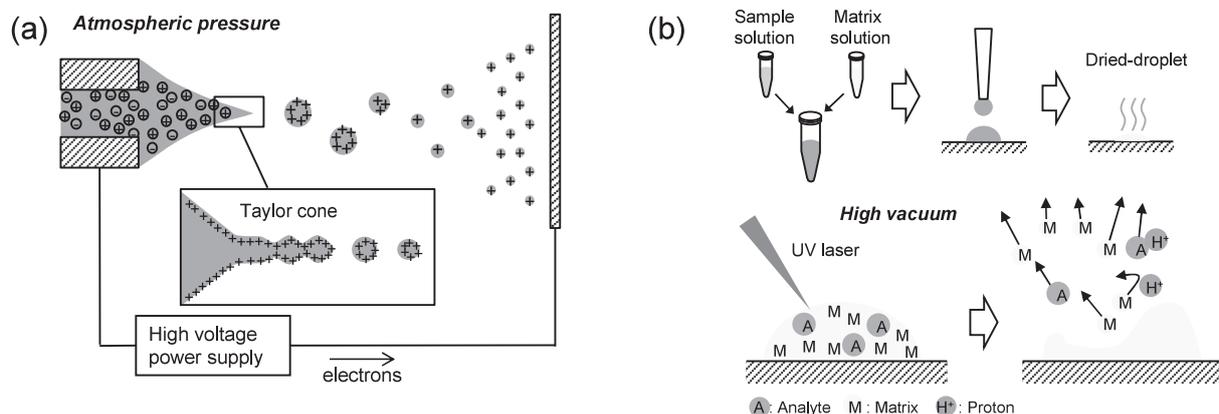


図 1. 従来法である (a) ESI 法と (b) MALDI 法の概略図

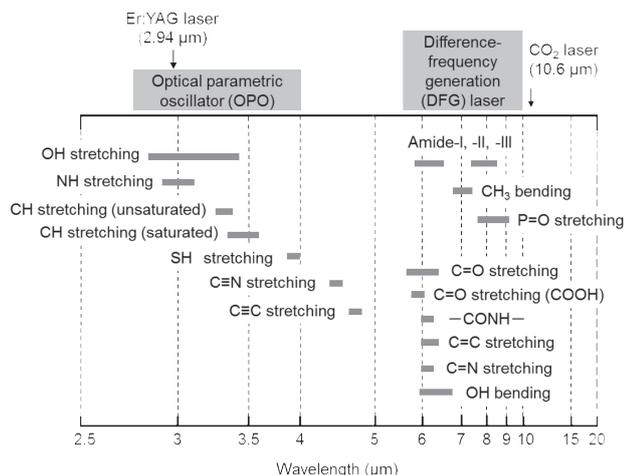


図 2. 中赤外波長域における主な分子振動モード

ザー吸収を積極的に利用したイオン化の可能性を持っているといえる。特に、水やアセトニトリル等の溶媒や緩衝液は液体クロマトグラフで用いられる代表的な移動相でもあるため、マトリックスとして用いることが可能になれば非常に汎用性の高い分析手法となり得る。しかしながら、この波長帯には適切なレーザー光源がほとんど存在せず、レーザーイオン化質量分析への応用も真空下での検討のみである^{5,6)}。

そこで本研究では、水や有機溶媒などが特異的な吸収ピークを持つ波長 6-7 μm 帯の中赤外波長可変レーザーを用いて、大気圧下で溶液中のペプチドを安定にイオン化する手法を開発した。これにより、マトリックスの添加を必要とせず、且つ試料連続流に対して適用可能な MALDI 法の実現を試みた。さらに、より複雑な生体試料への応用に向け、高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatograph; HPLC) と接続した分析法の検討も行った。

2. 実験装置・試料

本研究では、すべての実験において ESI をイオン源に持つイオントラップ型質量分析計 LCQ Classic (Thermo Finnigan, USA) を用いた。本装置は、高真空の質量分析部と大気圧のイオン源を持っており、差動排気を用いて両者間の圧力差を保っている。この ESI のイオン源を改造し、大気圧レーザーイオン源とした。

図 3 に大気圧レーザーイオン源の概略図を示す。レーザーには差周波発生 (difference-frequency generation; DFG) 方式の中赤外波長可変レーザー⁷⁾ (以下 DFG レーザー) を用いた。DFG レーザーは、

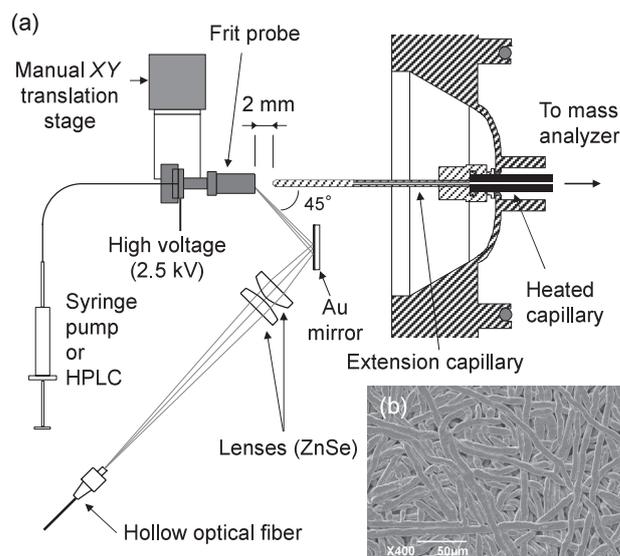


図 3. (a) 設計・製作した大気圧レーザーイオン源と (b) プロープに用いた多孔質ステンレス (フリット) の走査電子顕微鏡像

波長 5.5-10.00 μm で波長可変のナノ秒パルスレーザーである。

イオン源に導光した DFG レーザーを約 0.11 mm² に集光し、フリットと呼ばれる多孔質ステンレス中に拡散した試料溶液に照射した。レーザー波長は 5.7-7.6 μm、パルスエネルギーは 250 μJ とした。大気圧下で生成されたイオンは、高真空の質量分析計内に取り込まれ、質量スペクトルが取得される。

試料として、ペプチドであるアンジオテンシン II を 0.02% のギ酸を添加した 80% アセトニトリル水溶液を溶媒として 10 pmol/μL に調製した。試料溶液は、シリンジポンプを用いて ~5 μL/min でフリットプロープに供給した。HPLC を用いる際の移動相には 0.025% のギ酸を添加した 50% アセトニトリル水溶液を用いた。流速は 200 μL/min とし、スプリッターで ~5 μL/min に絞り込んだ後にイオン源に導入した。

4. 実験結果および考察

図 4 左に 80% アセトニトリルを用いてアンジオテンシン II を 10 pmol/μL に調製した試料を測定した際の質量スペクトルを示す。分子量 1045.5 のアンジオテンシン II のプロトン (H⁺) 付加イオン [M + H]⁺ が観測されていることがわかる。さらに、[M + H]⁺ のイオン信号強度の経時変化 (図 4 右) から、イオン化が継続的に行われていることがわかる。従来の MALDI 法においては、結晶化したマトリックスと試料がレーザー照射によって消費していくため、このような継続的なイオン信号を得ることは困難である。本

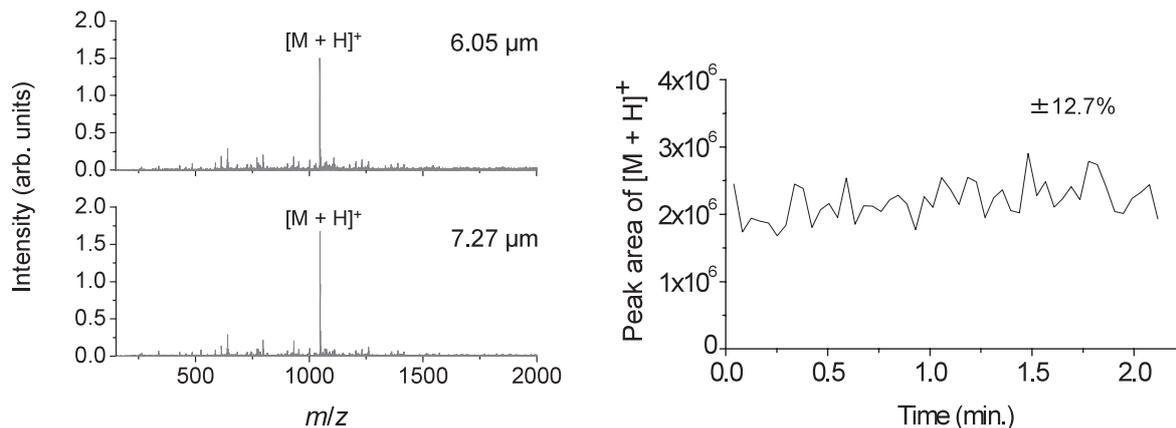


図4. 80% アセトニトリル水溶液をマトリックスに用いた場合のアンジオテンシンⅡの質量スペクトルとアンジオテンシンⅡのイオン信号強度の経時変化

手法は、液体試料から直接的にイオン化することにより、MALDI法の問題点を改善したものと言える。

次に、DFGレーザーの波長と得られた質量スペクトル上の $[M + H]^+$ の信号強度の関係を検討した。水がOH変角振動に由来する吸収ピークを波長6 μm 帯に有することに加えて、アセトニトリルがCH₃変角振動に由来する吸収ピークを7 μm 帯に持つ。レーザー波長以外のすべての条件を統一した上で、イオン信号強度の波長依存性を検討したところ、いずれの吸収ピーク波長においても顕著なイオン化が確認された(図5)。波長3 μm 帯の赤外レーザーを用いた先行研究²⁾では水の吸収のみに依存したイオン化に限られていたが、本手法では6-7 μm 帯波長可変レーザーを用いることで、有機溶媒であるアセトニトリルをイオン化支援剤として利用することに成功したと言える。

ここまでで、水とアセトニトリルのいずれのレーザー吸収もイオン化に寄与し得ることが示された。しかしながら、イオン化のために必要な要件は、レーザーの強い吸収だけではない。MALDIにおいては多くの化合物がプロトン付加イオンとして観測され、結晶中

に残存した水分子が重要であるという報告もある⁸⁾。そこで、水を全く含まない100%アセトニトリルを溶媒としたイオン化が可能であるか検討を行った。図6に、90%アセトニトリルと100%アセトニトリルそれぞれを溶媒として用いた際の質量スペクトルを示す。水を10%含んでいる場合にはアンジオテンシンⅡのプロトン付加イオンが観測されているのに対して、100%アセトニトリルでは観測されていない。この理由として、水がプロトンの溶媒である一方で、アセトニトリルが非プロトン性溶媒であることが挙げられる。溶媒のレーザー吸収はイオン化のための必要条件であるが、水のようなプロトン供給源の存在も必須の条件である可能性が示された。

さらに、水とアセトニトリルの混合比とイオン信号強度の関係を検討した結果を図7に示す。波長7.27 μm と6.05 μm のいずれにおいても、水の混合比が大きくなるにつれてイオン信号強度が低下する傾向が見られた。いずれの波長においても、水の混合割合が大きくなるにしたがって吸光度は大きくなる(すなわちレーザー吸収が強くなる)にもかかわらずイオン化効

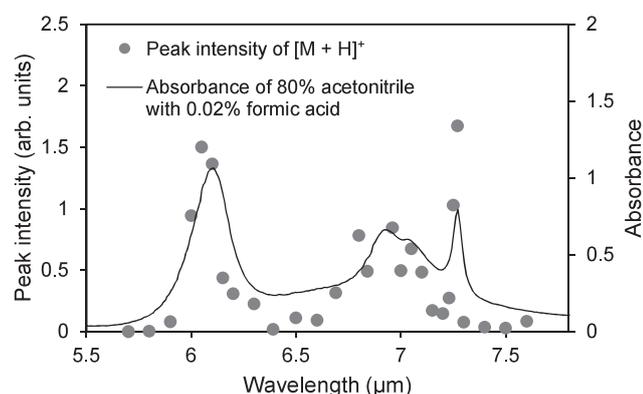


図5. 80% アセトニトリル水溶液をマトリックスに用いた場合のアンジオテンシンⅡのイオン信号強度のレーザー波長依存性

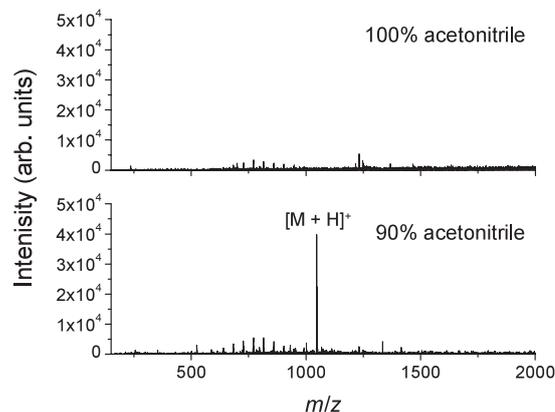


図6. 90%アセトニトリルおよび100%アセトニトリルを用いた際のアンジオテンシンⅡの質量部スペクトル

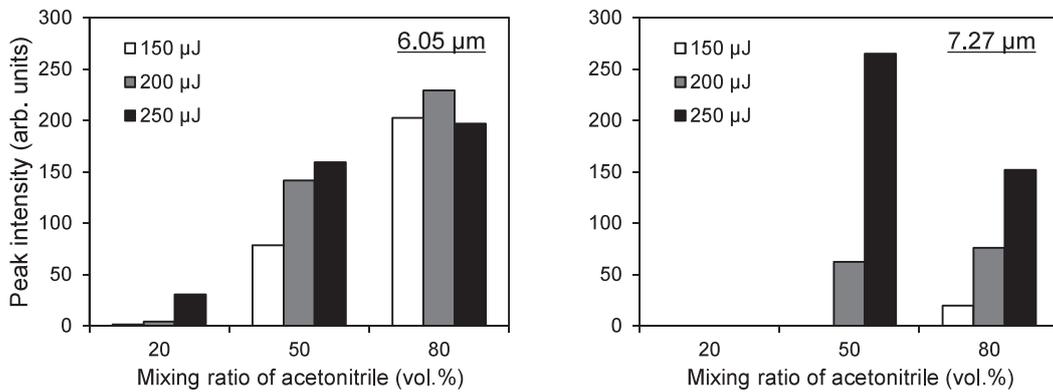


図7. 水とアセトニトリルの混合比を変化させた際のアンジオテンシンⅡのプロトン付加イオンの信号強度の変化

率が低下する要因としては、溶媒の表面張力などの物性の影響が考えられる。具体的なメカニズムについては更なる検討が必要だが、一つの可能性として、アセトニトリルに対して相対的に揮発性の低い水による脱離効率の低減が考えられる。

ここまでで用いた水とアセトニトリルの混合溶媒は、HPLCの移動相として最も一般的なものである。そのため、溶離液を直接イオン源に導入し、LCによる分離と質量分析による分子同定をオンラインで行うLC/MS (liquid chromatography/mass spectrometry) での応用が期待できると考えられる。次に、実際にHPLCと本イオン源を接続し、LC/MSの検討を行った。

まず、基礎的な検討として100 pmol/μLのアンジオテンシンⅡの標準サンプルを2 μLインジェクトし、LC/MSを行った。図8にHPLC内の紫外吸光度検出器によるUVクロマトグラムと質量分析計により取得した[M + H]⁺の信号強度の経時変化を示したイオ

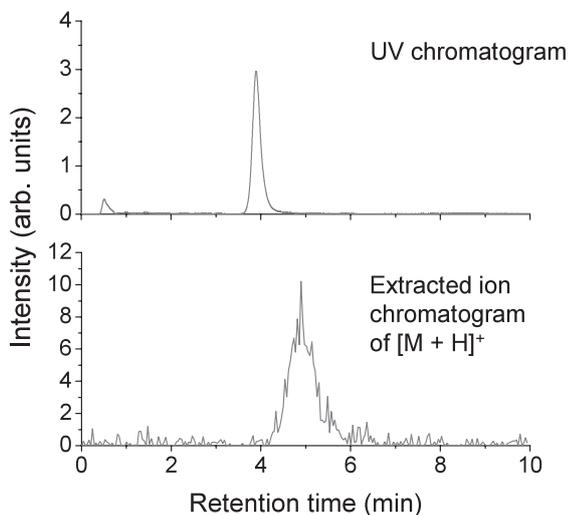


図8. HPLCと質量分析計と接続した際の紫外吸光度検出器によるクロマトグラムと質量分析計によるイオンクロマトグラム

ンクロマトグラムを示す。HPLCによって分離された試料を、イオンクロマトグラム上でも同様にピークとして検出することに成功した。ピーク形状が若干ブロードになっているが、同様の現象はESIを用いた際にも確認されていることから、イオン源の特性に由来するものではないと考えられる。本手法は、LC/MSが可能であることに加えて、レーザーイオン化であるため不揮発性の緩衝剤を使用できる可能性を含んでいる。このことは、試料調製上可溶化剤や緩衝剤が必要な試料のLC/MSの可能性を示唆しており、従来のLC/MSでの分析が難しかった膜タンパク質などの難溶性タンパク質への応用が期待される。

5. 結論

波長6-7 μm帯中赤外波長可変レーザーとフリットを組み合わせることで、水やアセトニトリルといった溶媒のレーザー吸収を利用した大気圧レーザーイオン化を実現した。MALDI法のようにイオン化支援剤の添加を必要とせず、且つ溶液試料を安定にイオン化することが可能であるため、HPLCと質量分析計を接続した分析も可能である。今後、膜タンパク質等のより複雑な生体試料への応用が期待される。

〈参考文献〉

- 1) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **246**, 4926 (1989) 64-71.
- 2) M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons, *Anal. Chem.*, **60**, 20 (1988) 2299-301.
- 3) V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout, M. A. Yakshin, C. R. Prasad, H. S. Lee, V. M. Doroshenko, Desorption/ionization of biomolecules from aqueous solution at

- atmospheric pressure using an infrared laser at 3 μm , *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 4 (2002) 354-61.
- 4) E. Rapp, A. Charvat, A. Beinsen, U. Reichl, A. S. Morgenstern, H. Urlaub, B. Abel, Atmospheric Pressure Free Liquid Infrared MALDI Mass Spectrometry: Toward a combined ESI/MALDI-Liquid Chromatography Interface, *Anal. Chem.*, **81**, 1 (2009) 443-52.
- 5) M. Tajiri, T. Takeuchi, Y. Wada, Distinct features of matrix-assisted 6 μm infrared laser desorption/ionization mass spectrometry in biomolecular analysis, *Anal. Chem.*, **81**, 16 (2009) 6750-5.
- 6) S. Yoshihashi-Suzuki, I. Sato, K. Awazu, Wavelength dependence of matrix-assisted laser desorption and ionization using a tunable mid-infrared laser, *Int. J. Mass Spectrom.*, **270**, 3 (2008) 134-8.
- 7) H. Hazama, Y. Takatani, K. Awazu, Integrated ultraviolet and tunable mid-infrared laser source for analysis of proteins, *Proc. SPIE*, **6455**, (2007) 645507.
- 8) H. Hazama, S. Furukawa, K. Awazu, Effect of solvent on ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides, *Chem. Phys.*, **419** (2013) 196-9.



現在、テルモ株式会社にて、人工心肺装置の開発業務に従事。

(環境・エネルギー 平成 24 年卒 26 年前期)