

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056008

研究課題名（和文） 時間分解分光法を用いた非解離イオン化物質分析機構の研究

研究課題名（英文） Spectroscopic study of non-destructive ionization process for mass spectrometry

研究代表者

藤野 竜也 (Fujino Tatsuya)

首都大学東京理工学研究科・准教授

研究者番号：20360638

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：質量分析法、MALDI法、プロトン移動、時間分解分光

## 1. 研究計画の概要

MALDI法は試料の分子構造を壊さず「一分子一ピーク」といった分子量による質量分析を可能にする手法であり、不安定で変質しやすい代謝物質等の網羅的解析を可能とする。また表面にマトリクス分子を展開させた手法(SALDI法)では、修飾表面上に化学吸着した試料のみをイオン化させる手法であるため、従来困難であった「質量分析による定量」への道を開く方法として期待される。しかしながら分析試料に用いるマトリクス分子の選定は一般に経験則により行われるため、本法の可能性が最大限に活用されているとは言い難く、従って微量かつ貴重な生体試料への応用は困難である場合が多い。本研究では分析対象試料に対し、非解離・高感度・高効率化が可能なマトリクス・修飾(形状・分子)表面を、分子科学的な観点から予想し開発することを目的とする。

## 2. 研究の進捗状況

最初の課題として申請者はマトリクス分子をシクロデキストリンに包接させるという手法をとることにより、イオン化の過程におけるマトリクス分子の解離反応を抑制することに成功した。これにより低分子量領域のMALDI質量分析を可能にし、その応用としてこれまでMALDI測定が困難であった向神経麻薬などの分析を科警研と東大とともにに行った。この手法はマトリクス分子の解離抑制だけでなく、シクロデキストリンを構成するグルコースが効率的にアルカリ金属イオン(Na, K)を取り込むため、アルカリ金属由来のイオンピークを完全に消すことができた。

また、シクロデキストリンの種類と包接されるマトリクス分子の構造を系統的に変化させることにより、包接の割合を変化させた。一般的に用いられるマトリクス分子(THAP：トリヒドロキシアセトフェノン)の水酸基数を変化させた誘導体と $\alpha$ ,  $\beta$ ,

$\gamma$ シクロデキストリンの組み合わせを作り、NMR分光法により包接を評価した。それによると強く包接する組み合わせでは、MALDI測定において完全にマトリクス由来のピークを削減することに成功した。このときの結晶状態を電子顕微鏡で観測したところ、MALDI法では必ず起こる結晶状態の不均一性を削減することに成功した。この研究から、分子包接により内包されるマトリクスの解離反応の抑制に効果があることが理解された。実際の物理化学的側面に関しては、振動エネルギー緩和の観点から背景のメカニズム解明をすすめている。

申請者は次に包接とイオン強度増大の両方を同時に実現できる物質として、アルミと珪素の酸化物であるゼオライトに注目した。ゼオライトはナノサイズの細孔を持ち、分子包接能を持つ分子として知られているだけでなく、アルミと珪素原子の間に存在する水酸基が極めて強いブレンステッド酸性性を有しており、プロトン供与体となりうると予想した。実際、最初の測定例としてモルデナイト型ゼオライト(HM20)に一般に広く用いられる有機マトリクス分子(THAP：トリヒドロキシアセトフェノン)を内包させた場合、マトリクス分子の解離が防止され低分子量領域がクリアに測定できるだけでなく、アルカリ金属イオン付着ピークの完全消去、また通常MALDI法の実に20倍のピーク強度でペプチド分子を検出することに成功している。またこのプロトン付着ピークの強度増大について、励起状態の分子軌道法計算に基づいた解釈を行った(AO1 班橋本健朗氏との共同研究)。これによりゼオライト表面上に吸着した水分子がプロトン供与のための触媒的な役割を果たしていることが理解された。

## 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している：本申請課題の要点は主に二つあり、①マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI法)質量分析法のメカニズムを分

光学的に、特に時間分解分光法を用いて解明すること、②メカニズムの解釈をベースに従来までのMALDI法を凌駕する新規なイオン化法を開発し、代謝産物等の生体関連試料を高感度に観測することである。

課題の性質上、特に①のメカニズム検討には、分光法と質量分析を両立させた本研究専用の質量分析装置の自作が有効であったが、実際配分された予算の関係で装置の作成は断念せざるを得なかった。このため研究室既存の質量分析装置を学生と共同使用しており、これまでは特に②に関する研究に比重を置き遂行してきた。従来のMALDI法でマトリクスとして使用される有機化合物を、包接特性を持つ化合物で保護するという独自の発想により、マトリクス分子の解裂を抑制し、かつアルカリ金属イオン付着ピークの出現によるスペクトルの煩雑化を防ぐことができた。この成果は学術論文(Anal. Sci, 24, 1497~1500 (2008))に報告し、特許申請(特開2009-186298)も行っている。さらに包接特性を持つ化合物に機能性を持つ化合物を選択することで、プロトン付着ピークの強度を従来法の20倍以上まで増加させることが可能となった。これは分子内にナノサイズの細孔を持つゼオライトを利用し、細孔中にマトリクス分子を吸着させ、これを新たにMALDI用のマトリクスとして使用することで分析試料の高感度検出が可能となった。この成果は学術論文として現在投稿中であり査読者から好意的なコメントを頂いているところである。さらにA01公募班米澤氏と東京都科捜研浅野氏とともに、開発したゼオライトマトリクスの生体関連試料への応用の一つとして禁止薬物分析への研究を進めているところである。従って当初研究課題②に関しては順調に研究が進んでおり、このまま遂行していきたいと考えている。2009年6月に国内外の評価委員の方を招いた国際シンポジウムが開催され、研究に関する評価を頂いた。シンポジウムでは特に研究課題②について発表を行ったが、すでにエキサイティングな結果がえられていることを評価すると記された委員のコメントを頂けた。

#### 4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究で明らかとなってきたマトリクス分子の分子内・間振動と質量分析において観測されるイオン強度の相関を調べる研究を進める。照射赤外波長と質量分析装置から観測されるイオン強度の相関をモニターすることによりマトリクス分子のどの振動がプロトン移動反応に大きく寄与しているかを理解することができる。また赤外照射のタイミングを変化させた場合のイオン強度の相関を観測することにより、どの電子状態が主にイオン化に関与するかといった知見を得る。分子の振動スペクトル測定を主に行い、スペクトルの形状やシフト量から系に生じた温度上昇、圧力変化などを理解し、MALDI法のメカニズムの全容解明に努める。

#### 5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計9件)

- ① Y. Komori, H. Shima, \*T. Fujino, J. N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga,

“Pronounced Selectivity in MALDI Mass Spectrometry with 2,4,6-Trihydroxyacetophenone on Zeolite Surface: Intensity Enhancement of Protonated Peptides and Suppression of Matrix-related Ions”, J. Phys. Chem. C 114, 1593~1600 (2010). 有

- ② T. Sakamaki, \*T. Fujino, H. Hosoi, T. Tahara, T. Korenaga, “Picosecond Time-resolved Fluorescence Study of Poly Vinyl Methyl Ether Aqueous Solution”, Chem. Phys. Lett., 468, 171~175 (2009). 有
- ③ \*T. Fujino, K. Hirota, K. Ohta, T. Tahara, “In-cell Viscosity Measurement Using a Fluorescence Up-conversion Microscope”, Chem. Lett., 37, 1240~1241 (2008). 有
- ④ S. Yamaguchi, T. Fujita, \*T. Fujino, T. Korenaga, “MALDI Mass Spectrometry with Cyclodextrin-Supported Matrix”, Anal. Sci, 24, 1497~1500 (2008). 有
- ⑤ D. Nanjo, H. Hosio, \*T. Fujino, T. Tahara, and T. Korenaga, “Femtosecond/picosecond Time-resolved Fluorescence Study of Hydrophilic Polymer Fine Particles”, J. Phys. Chem. B, 111, 2759~2764 (2007). 有

他4件

〔学会発表〕(計3件)

- ① T. Fujino, “Spectroscopic Study of non-destructive ionization process for mass spectrometry”, International Symposium on “Molecular Science for Supra Functional System”, O-okayama, Tokyo, June 4, 2009
- ② T. Fujino, K. Hirota, K. Ohta, T. Tahara, “In-cell Viscosity Measurements by Femtosecond Fluorescence Up-conversion Microscopy”, Focus On Microscopy 2008, Awaji Osaka, Japan, April 15, 2008
- ③ T. Fujino, H. Hosio, D. Nanjo, T. Tahara, and T. Korenaga, “Ultrafast Solvation Dynamics of Hydrophilic Polymer Fine Particles”, XXIII International Conference on Photochemistry, Köln Germany, August 2, 2007

〔図書〕(計1件)

- ① T. Fujino, T. Tahara, Ultrafast Fluorescence Microscope Chapter 3 (pp. 51-70) in “Biochemical applications of nonlinear optical spectroscopy” ed. Vladislav V. Yakovlev, CRC Press (2009).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: 包接マトリクスを用いたMALDI法

発明者: 藤野竜也、山口惣大、伊永隆史

権利者: 公立大学法人首都大学東京

番号: 特願2008-025881

国内外の別: 国内

〔その他〕

特に無し