

令和元年6月20日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08214

研究課題名(和文) MALDI機構解明を指向した多孔性錯体包摂分子のレーザー脱離イオン化質量分析

研究課題名(英文) Laser-desorption ionization mass spectrometry of porous complex inclusion molecules towards elucidation of MALDI mechanism

研究代表者

山口 健太郎 (Kentaro, Yamaguchi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：50159208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では結晶性を有する細孔性錯体である結晶スポンジを用いて、その細孔内へ低分子有機化合物の取り込みを行い、レーザー脱離イオン化を試みた。単結晶X線構造解析の結果から、分析種の立体構造、分析種と骨格との相互作用、そして単結晶内ゲスト量を求めることができた。単一の結晶から単結晶X線構造解析法と質量分析法という二つの分析手法の単なる組み合わせではなく、互いの分析情報から分子構造解析を可能にできる超高感度微量分析手法の創出が達成された。ゲスト包摂結晶の単結晶X線構造解析において disorder 等で解析が困難な場合、質量分析から構造情報を補うことができる。同時に未知化合物の構造解析の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CS-LDI-MS法は単結晶へ単結晶X線構造解析と質量分析という異なる二種類の分析法を同時に適用できることがわかった。これは単結晶X線構造解析のみからは得られない情報であり、未知化合物の解析に役立つ。さらに、フラグメンテーションの分子構造情報は、X線構造解析において分子パーツをモデルとして当てはめることができるものと考えられる。本手法は、このような未知分子の単結晶の構造解析法として、天然抽出物や微量試料の解析へ適用できることが期待される。本研究は分析化学領域における新手法を提供するもで今後広範囲な展開が期待される。さらにイオン化機構解明への道筋を示し、質量分析学への貢献も予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, low-molecular-weight organic compounds were incorporated into the pores of crystalline sponges, which are porous complexes with crystallinity, and laser desorption ionization was attempted. From the results of single crystal X-ray structural analysis, the three-dimensional structure of the analyte, the interaction between the analyte and the framework, and the amount of guest in the single crystal could be determined. It is not just a mere combination of two analysis methods from single crystal, X-ray structure analysis and mass analysis method, but it is shown that it is an ultra-sensitive micro analysis method that enables molecular structure analysis from mutual analysis information. When analysis is difficult due to disorder in single crystal X-ray structural analysis of a guest inclusion crystal, structural information can be supplemented from mass spectrometry. At the same time, the possibility of structural analysis of unknown compounds was shown.

研究分野：構造科学

キーワード：X線解析 質量分析 共結晶 レーザー脱離イオン化 MALDI 分子構造解析 微量分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MALDI(マトリクス支援レーザー脱離イオン化)質量分析(MS)はタンパク質をそのまま壊すことなく検出することができることから、近年のメタボロミクスにおいて特に重要である。MALDIの発見は、1988年に田中耕一らがコバルトとグリセロール混合物をマトリクスとして用いてタンパク質をレーザー脱離イオン化したことにはじまる。また同時期には、有機小分子をマトリクスとして用いるタンパク質のレーザー脱離イオン化が報告されている。現在は、マトリクスに有機小分子を用いる方法が主に用いられている。MALDIは高感度で高質量数を測定できるため、リゾチームやウシ血清アルブミンなどのタンパク質をそのまま検出することができる。しかし、マトリクスの選定や試料と均一に混合しなければならず、高度な塗布技術が必要となり、測定結果が実験者の技術に依存する。このような問題点を解決するためSALDI(表面支援レーザー脱離イオン化)法が登場した。この手法は、ゼオライトの内面や金属のナノパーティクル表面を用いたり、表面の官能基を修飾することにより分析種との相互作用を制御することで効率よくイオン化を達成出来るため、マトリクスとの混合が難しい翻訳後修飾したタンパク質や負イオン検出感度の低い酸化物などが測定できるようになった。しかしながら、分析種とマトリクスとの混合状態の不均一性という問題は依然として解決されておらず、レーザー照射のホットスポットの探索が必須である。そのため、物質比を含めた量論的考察や相互作用の明確な状態は把握できない。

2013年、藤田らは「結晶スポンジ」(CS)を用いることにより単独では結晶化しない試料の立体構造の決定を行う手法を発表した。結晶化の機構は不明な点も多く、全ての純物質が結晶化するとは限らない。溶液中を動き回る分子が弱い分子間相互作用により完全に同方向に配列し、単結晶を形成するには偶然の関与も否定出来ない。「結晶スポンジ法」は、試料分子が並びやすい「箱」(多孔性錯体)を予め用意し、この中へ誘導して規則正しく配向させ、この箱を含めた単結晶によるX線構造解析を行うものである。

2. 研究の目的

マトリクス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)機構の検討を本課題の最終目的とする。本研究は非結晶性分子を含む試料分子(ゲスト)を多孔性錯体結晶である結晶スポンジ(ホスト)に吸収させることにより規則的に配向した単結晶を得、このホスト自身がマトリクスとして機能することにより効率の良いレーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析を可能とするイオン化に関するものである。従来、MALDIは2000倍前後の多量のマトリクスとの固体混合物にレーザーを照射しイオン化しているが、結晶スポンジを用いれば、試料とマトリクスの成分比1:1の単結晶によりイオン化出来る。本研究は、このイオン化を精密に解析することによってMALDIの機構解明を目指す。

3. 研究の方法

これまでに我々は、stilbene誘導体をCS内へ取り込み、そのレーザー脱離イオン化から、CS骨格に由来するイオンだけでなく、分析種の分子イオンを検出できることを発見した。この際に、単結晶X線構造解析により、細孔内におけるCS骨格分子とゲスト(分析種)との相対配置をナノスケールで明らかにし、 π - π 相互作用の存在を確かめた。本手法を結晶スポンジ-レーザー脱離イオン化質量分析法(Crystalline Sponge Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry method, CS-LDI-MS)と呼ぶ。

本研究では、CS-LDI-MS法によって有機分子の微量構造解析を可能とするために、CS内に様々な分析種を系統立てて取り込ませることで、イオン化に必要な条件を分子レベルで確かめ、またCS法に対してレーザー脱離イオン化質量分析法を組み合わせることで分析種の情報がどの程度明らかに出来るか検討した。

以下に示す(1)~(5)の具体的な方法により研究を進めた。

(1) CS内へ取り込まれる分子サイズを調べるために末端に芳香環をもつ直鎖状ene化合物について取り込みを試みた。

(2) CS-LDI-MS法の場合、単結晶X線構造解析と質量分析法においてどちらの検出感度が優れているか調べるために、占有率が低い場合でも構造解析が可能な重原子を持つ化合物の取り込み濃度を変化させ検討を行った。

(3) 1,3-benzodioxole誘導体を取り込み、質量分析法から分子構造に特徴的なイオンが生成する

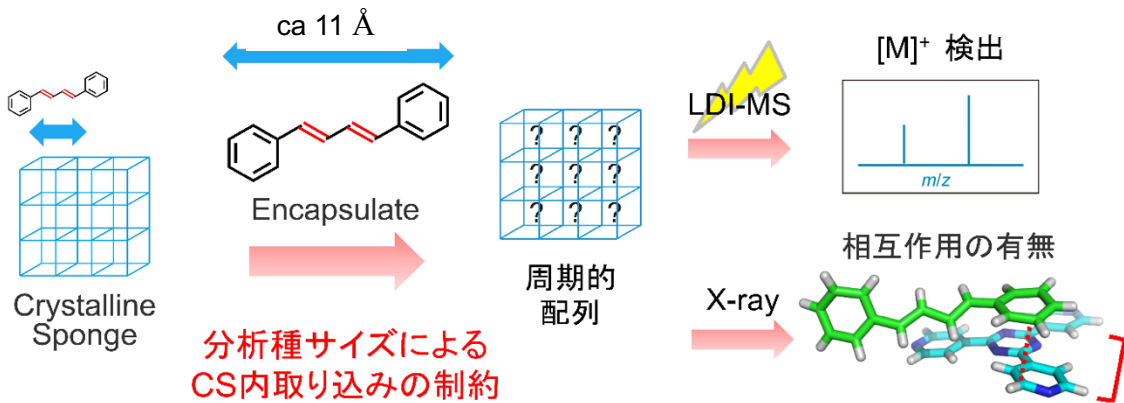
か調べた。

(4) 異なる大きさの単環化合物を取り込み、CS 骨格との相互作用がない状態でのレーザー脱離イオン化挙動を調べる。

(5) CS 骨格を含まない目的分析種のみからの MS 情報を得る方法として、タンデム MS (tandem mass spectrometry, MS/MS) を適用し、質量分析による分子構造解析への可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) CS 法の活用の際し、CS 自体が持つゲストの形やサイズといった取り込みの制約について検討した。また、CS 内へは芳香族化合物が取り込まれやすい傾向にある。そこでゲスト包接に π - π 相互作用が相関すると考え、CS 細孔の周期的長さにおさまり、かつ末端に芳香環を有する直鎖状 ene 化合物の取り込みと単結晶 X 線構造解析および LDI-MS を行った。

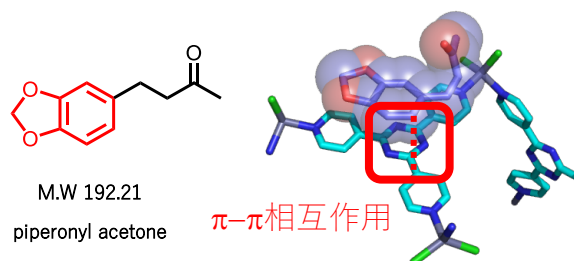


単結晶 X 線構造解析ならびに抽出物の $^1\text{H NMR}$ により、CS 内へ 8~13 Å 程度の長さの直鎖状 ene 化合物が取り込まれることが確かめられた。化合物 (*trans*-Stilbene, 1,4-Diphenyl-1,3-butadiene, 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene) のいずれの場合においても、CS 骨格に含まれる TPT の triazine 骨格と 3.4 Å 以下の距離にあったことから、 π - π 相互作用の関与が示唆された。この単結晶を用いた LDI-MS から分子イオンが得られたこと、また全結晶領域にイオンが観測されたことからホットスポットの探索の必要性がなくなったといえる。さらに、1D MS スペクトルから CS もイオン化していることがわかり、CS がマトリクスとしての機能を有していることがわかった。

(2) CS-LDI-MS 法は、単結晶 X 線構造解析法と質量分析法の二つの分析が単一結晶へ同時に適用できる方法である。特に単一結晶に含まれるゲストの量は数 μg 程度と微量である。そこで、単結晶 X 線構造解析と質量分析それぞれの検出限界を評価することを目的として実験を行った。

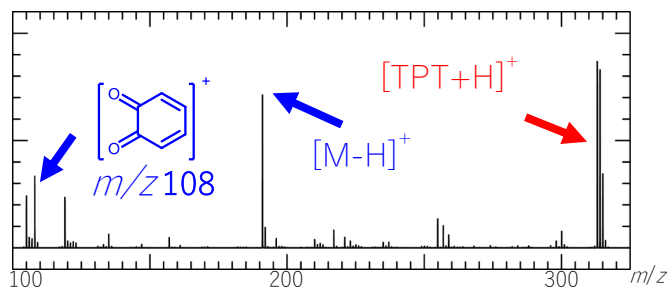
CS 内へ濃度の異なる 9,10-BrAN を取り込ませ、単結晶 X 線構造解析を行った。取り込み量は結晶抽出物の $^1\text{H NMR}$ を用いて TPT 比にて算出すると、濃度 $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ 条件においては 0.8 となった。濃度 $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ および $2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 条件では検出できなかった。高濃度 $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ 条件では、重原子 Br に基づく電子密度が確認され、三分子 anthracene 骨格を含む構造モデルを当てはめたが、disorder により構造精密化はできなかった。濃度 $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ 条件では、わずかに重原子 Br の電子密度が観測されたが、構造モデルを当てはめることはできなかった。濃度 $2.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ 条件では、溶媒のみ観測された。また、IMS (Imaging Mass Spectrometry) による分子イオン検出を試みたところ、 m/z 270 に脱離反応を経た分析種が観測された。同時に、CS 骨格分子 TPT のプロトン付加体のイオンピークも観測された。このイオンピーク強度に対する分析種の相対強度を調べたところ、 $2.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ 以下では、ほとんど観測されなかった。以上から CS 内へ密に包接された場合にのみ、単結晶 X 線構造解析と質量分析の両方で分子情報が得られ、どちらか一方から優先的に分析できるわけではないことが示された。

(3) CS 法を用いて特定の母骨格に着目して包接分子について系統的に調べられた例がないことから、CS 内へ種々の 1,3-benzodioxole 誘導体の取り込みと単結晶 X 線構造解析および LDI-MS を行った。得られた単結晶 X 線構造解析に適する結晶を選び、構造解析を行った後、同一の単結晶の LDI-MS 測定を行った。ここでは、質量分析で検出される分子イオンおよびそのフラグメントイオンから分子構造情報が判別可能か検討した。

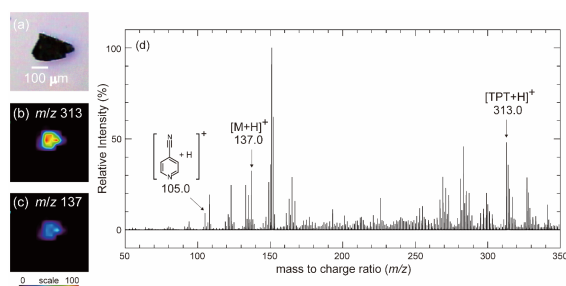


その結果、単結晶 X 線構造解析により、ゲストの位置だけでなく CS 骨格やハロゲンと 1,3-benzodioxole 骨格が π - π 相互作用などの弱い相互作用を多点で生じていることが明らかになった。LDI-MS では、すべての場合でゲスト骨格に特有なイオンの検出に成功した。低質量数領域において、マトリクス機能を持つ CS 骨格の影響を受けず、ゲスト由来のイオンピークを観測できることが明らかになった。

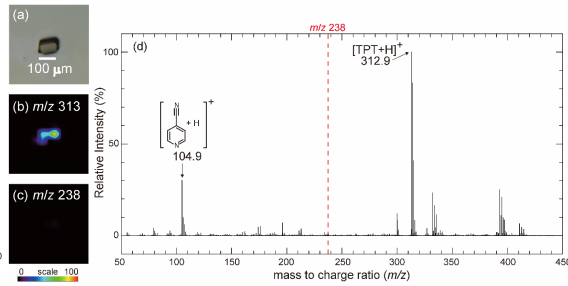
(4) CS 内へは芳香族化合物だけではなく cyclohexane のような環状炭化水素の取り込みも起こりうることから、CS 内へ異なる大きさの単環状化合物の取り込みを行った。ゲストのうち、Cp*H (5 員環) は骨格と π - π 相互作用などの弱い相互作用を多点で生じて



いることがわかった。一方、zerumbone (11 員環) と muscone (15 員環) は細孔内部の狭い空間に環を収縮しておさまっている様子は見られたが、CS 骨格との相互作用はみられなかった。次に LDI-MS によってゲストの分子イオンピーク検出を行ったところ、Cp*H 以外ではゲスト由来イオンピークは観測されなかった。また、すべての場合で CS 骨格およびそのフラグメントイオンが観測された。つまり、マトリクス機能を持つ CS 骨格にてレーザー光吸収が起きており、相互作用のない場合、そのエネルギーはゲストへ伝わらなかった。以上より環状化合物の取り込みは 15 員環程度まで、静電的相互作用がなくても取り込まれることがわかった。これによりイオン検出と相互作用の有無との相関から、エネルギー伝達のために相互作用を有していることが必要であることが分子レベルで明らかになった。これは (2) における単結晶 X 線構造解析と質量分析法において、どちらの検出感度が優れているかを見積もる実験結果とも一致しており、細孔内への相互作用を有した十分な取り込みがイオン化において重要であることが分かった。

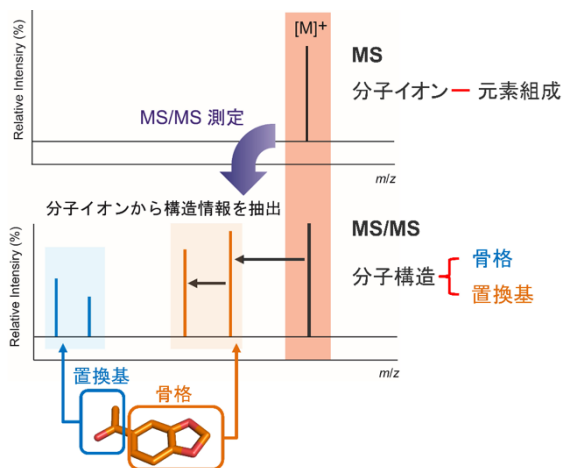


Cp*H 包接 CS の LDI-MS. (a) 光学写真, (b) m/z 313 TPT プロトン付加体イオンピークイメージング, (c) m/z 137 Cp*H プロトン付加体分子イオンピークイメージング, (d) IMS に基づく平均 1D MS スペクトル



Muscone 包接 CS の LDI-MS. (a) 光学写真, (b) m/z 313 TPT プロトン付加体イオンピークイメージング, (c) m/z 238 muscone 分子イオンピークイメージング, (d) IMS に基づく平均 1D MS スペクトル

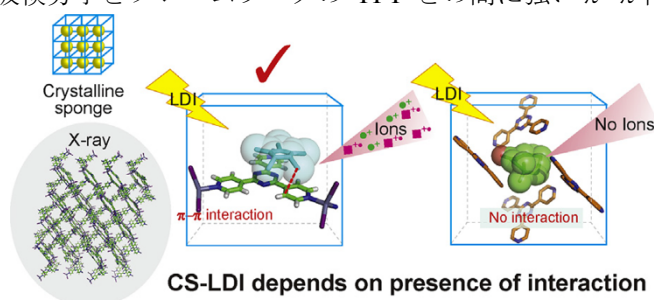
(5) ゲストの分子イオンピークが得られる場合、CID (Collision-induced dissociation)により意図的にフラグメンテーションを起こすことで分子構造情報を得られることから、CS 内へ indole 誘導体を取り込み、単結晶 X 線構造解析、次いでレーザー脱離イオン化質量分析によるタンデム質量分析 (MS/MS)を行った。実際に、X 線構造解析からゲストが CS 内に取り込まれていることを確かめた後、LDI-MS による MS/MS 測定を行ったところ、indole 誘導体について置換基(methyl 基)の脱離が、その数に応じて確認された。また、置換基の導入位置によって開裂するパターンが異なったが、indole 骨格に特徴的なフラグメンテーションが確認された。分子イオンからは分析種の元素組成がわかり、フラグメンテーションからは分子の骨格および側鎖情報が判別できることが示唆された。ところで、単結晶 X 線構造解析では、電子による回折斑点の強度情報をフーリエ変換により初期構造へと変換するために、直接、元素組成の情報は得られない。質量分析で観測される分子イオンから元素組成が得られる。さらに MS/MS は分子の骨格や側鎖



情報が得られる。これらの情報を組み合わせることで、未知分子の構造解析が可能であると考えられる。CS-LDI-MS 法は、 π - π 相互作用を有する包接分子のレーザー脱離イオン化を達成することができた。既存法に比べて、分子の性状によらず、 π - π 相互作用を持つ分子であればイオン化できるが、そのイオン生成物は本手法固有のものである。よって、簡便に構造解析をするためには種々の構造について、分子イオンおよびその MS/MS パターンをデータベース化することが必要であると考えられる。以上より、CS-LDI-MS 法において indole 誘導体の分子イオン検出、続く、MS/MS 測定を行ったところ、分子の骨格構造や側鎖情報が得られることがわかった。これらは未知物質の元素組成を明らかにし、部分構造を明らかにできることから単一結晶の構造解析と組み合わせることで微量の有機分子構造解析が可能であるものとする。

このように、CS-LDI-MS 法は単一結晶へ単結晶 X 線構造解析と質量分析という異なる二種類の分析法を適用できることがわかった。その条件として、細孔内への十分な取り込みが必要であった。また質量分析から得られる分子イオンは、分析種の分子構造情報、すなわち側鎖や骨格構造を与えることがわかった。同時に質量分析は、分子イオンからゲストの元素組成が

明らかとなる。このことは、単結晶 X 線構造解析では得られない情報であり、未知化合物の解析に役立つ。さらに、フラグメンテーションの分子構造情報は、X 線構造解析において分子パーツをモデルとして当てはめることができると考えられる。本手法は、このような未知分子や単一結晶の構造解析法として、天然抽出物や微量試料の解析へ適用できることが期待される。本研究を通して、分子状態とイオン化挙動を関連づけることのできるイオン化機構を議論することがある程度可能となった。特に、被検分子とフレームワークの TPT との間に強い π - π 相互作用を持つときは効率的なイオン化が進行し、フラグメントを伴わない分子イオンのみ高い感度で与える。一方、分散力しか働かない場合はイオン化されない事実が明らかとなったことは、イオン化機構解明に大きく寄与すると考えられる。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) Crystalline sponge-laser desorption ionization (CS-LDI) of unsaturated cyclic organic compounds encapsulated in different electronic environments, Hayashi, Y.; *Ohara, K.; Taki, R.; Saeki, T.; *Yamaguchi, K., *Analytica Chimica Acta*, **2019**, *1064*, 80-86. 査読有り
- 2) Self-Assembly Behavior Shifting to Crystal Formation of Chiral Macrocyclic Tetraamines, *Tominaga, M.; Kawahata, M.; Itoh, T.; *Yamaguchi, K., *Cryst. Growth Des.*, **2019**, *19*, 1118-1124. 査読有り
- 3) Cycloalkanes and cycloalkenes in dispersive force oriented inclusion crystals by a functionalized acyclic host molecule, Hyodo, T.; Kawahata, M.; Hikami, Y.; Komatsu, A.; Tominaga, M.; *Yamaguchi, K., *CrystEngComm*, **2019**, *21*, 1548-1554. 査読有り
- 4) Co-crystal screening of disubstituted adamantane molecules with *N*-heterocyclic moieties for hydrogen-bonded arrays, *Kawahata, M.; Tominaga, M.; Kawanishi, Y.; *Yamaguchi, K., *J. Mol. Struct.*, **2019**, *1177*, 511-518. 査読有り
- 5) Inclusion and selectivity of amides by *p*-terphenyl derivative bearing adamantanecarboxylic acid, *Kawahata, M.; Matsui, K.; Hyodo, T.; Tominaga, M.; *Yamaguchi, K., *Tetrahedron*, **2018**, *74*, 7089-7094. 査読有り
- 6) Separation of *p*-xylene from aromatic compounds through specific inclusion by acyclic host molecule, *Kawahata, M.; Hyodo, T.; Tominaga, M.; *Yamaguchi, K., *CrystEngComm*, **2018**, *20*,

- 5667-5671. 査読有り
- 7) Spherical Aggregates and Crystal Structure of Naphthalenediimide-Based Macrocycle and Complexation with Perylene, *Tominaga, M.; Kawahata, M.; Itoh, T.; *Yamaguchi, K., *Cryst. Growth Des.*, **2018**, *18*, 37-41. 査読有り
 - 8) Combined analysis of 1,3-benzodioxoles by crystalline sponge X-ray crystallography and laser desorption ionization mass spectrometry, Hayashi, Y.; Ohara, K.; Taki, R.; Saeki, T.; *Yamaguchi, K., *Analyst*, **2018**, *143*, 1475-1481. 査読有り
 - 9) Crystal Formation of a Coordination Cage through Spherical Particles Derived from a Tripodal Ligand Containing Adamantane Moiety and Silver(I) Salt, *Tominaga, M.; Ando, H.; Ohara, K.; Itho, T.; *Yamaguchi, K., *Chem. Lett.*, **2018**, *47*, 315-317. 査読有り
 - 10) Preparation and crystal structures of charge-transfer complexes of acyclic host molecules bearing pyrogallol derivatives with paraquat. *Kawahata, M.; Tominaga, M.; Maekawa, Y.; *Yamaguchi, K., *CrystEngComm*, **2017**, *19*, 7229-7235. 査読有り
 - 11) Solvent-Dependent Self-Assembly and Crystal Structures of a Salen-Based Macrocycle, *Tominaga, M.; Takahashi, E.; Ukai, H.; Ohara, K.; Itho, T.; *Yamaguchi, K., *Org. Lett.*, **2017**, *19*(7), 1508-1511. 査読有り

[学会発表] (計9件)

- 1) 伊東和平, 林侑加子, 小原一朗, 山口健太郎 (2019), ハロゲン化インドール類への結晶スポンジレーザー脱離イオン化法の適用, 第67回質量分析総合討論会, 5月15~17日, 茨城.
- 2) 林侑加子, 小原一朗, 山口健太郎 (2019), 結晶スポンジレーザー脱離イオン化質量分析による微量構造解析法の開発, 第67回質量分析総合討論会, 5月15~17日, 茨城.
- 3) 萬藤優騎, 林侑加子, 小原一朗, 山口健太郎, 永浜政博, 田中 好幸 (2019), 結晶スポンジレーザー脱離イオン化質量分析による indole 誘導体の複合解析, 日本薬学会第139年会, 3月20日~23日, 千葉.
- 4) 林侑加子, 萬藤優騎, 平岡佑理, 小原一朗, 山口健太郎 (2019), 結晶スポンジレーザー脱離イオン化タンデム質量分析による複素環式化合物の解析, 日本薬学会第139年会, 3月20日~23日, 千葉.
- 5) 川幡正俊, 兵頭直, 氷上優也, 小松愛, 富永昌英, 山口健太郎 (2019), V型分子を活用した環状脂肪族化合物の包接と結晶構造解析, 日本化学会第99春季年会, 3月16日~19日, 兵庫.
- 6) 林侑加子, 佐伯知美, 瀧莉花, 小原一朗, 山口健太郎 (2018), 結晶スポンジレーザー脱離イオン化質量分析による大環状化合物の複合構造解析, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会, 5月15日~18日, 大阪.
- 7) 小原一朗, 平岡佑理, 林侑加子, 山口健太郎 (2018). 結晶スポンジ包接インドール誘導体のレーザー脱離イオン化, 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会2018年合同大会, 5月15日~18日, 大阪.
- 8) Spherical Aggregation and Crystallization of Naphthalenediimide-Based Macrocycle bearing Adamantane Moieties, Tominaga, M.; Kawahata, M.; Itho, T.; Yamaguchi, K., Asian Crystallization Technology Symposium 2018, (Biopolis, Singapore, 2018) June 20-22.
- 9) High Resolution Single Crystal X-ray Structure Analysis of Oily Medicinal Drugs, Kawahata, M.; Hyodo, T.; Fujita, M.; Yamaguchi, K., 18th Tetrahedron Symposium Asia Edition, (Melbourne, Australia, 2017) July 24-26.

ホームページ <http://kp.bunri-u.ac.jp/course/kaiseiki/>