

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08262

研究課題名(和文) エネルギー分解タンデム質量分析による異性体同定法確立と局所分析への展開

研究課題名(英文) Energy-resolved tandem mass spectrometry for in-situ differentiation and identification of isomers

研究代表者

中村 健道 (Nakamura, Takemichi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別嘱託研究員

研究者番号：10360611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギー分解タンデム質量分析(ER-MS/MS)法により構造異性体の識別・同定が可能であるという方法原理が検証され、ER-MS/MS実験データを効率的に取得する方法論を確立できた。その一方で、実験値からフラグメンテーションのエネルギー要求性を標準化された値に変換するには既存の衝突活性化(CID)モデルでは不十分であることが明らかとなり、ER-MS/MS実験データを計算化学的に求められたエネルギー障壁から説明する試みも部分的にしか成功しなかった。局所分析への応用に向け、CIDおよび計算化学的な反応モデルの精密化と実験データのさらなる蓄積の必要性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学分析法として迅速かつ極めて高感度であるという特性を持つ質量分析は、有機化合物の定性、定量に広く用いられ、近年、医学や薬学等への応用との関連でも注目を集めているメタボローム解析等の新しい応用分野においても必須の分析法となっている。しかし、質量分析のみでは化合物の定性、特に異性体の識別・同定が困難であるという点が現実世界への応用展開を阻害するボトルネックの一つとなっている。本研究により、クロマトグラフィを用いることのできない局所分析等において深刻な異性体識別・同定を実現する新しい方法論の基盤を確立できたので、これを更に発展させることで、応用展開の加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：A proof of principle study of energy-resolved tandem mass spectrometry (ER-MS/MS) for differentiation and identification of isomeric small organic molecules has been carried out. The potential utility of breakdown diagrams for fingerprinting of organic molecules was shown. In the meantime, we've developed a new method for acquiring ER-MS/MS data more efficiently with a Q-TOF instrument to accelerate data accumulation. On the other hand, we had only limited successes in our attempts to establish a method for scaling collision energy axis of breakdown diagrams and to quantitatively model fragmentation pathways and energetics based on computational chemistry. It turned out our current model on CID and fragmentation process is not good enough for quantitative evaluation. We need to refine our models and further accumulation of the experimental data will be required for future, as well.

研究分野：質量分析学

キーワード：Energy-resolved MS/MS Isomer Differentiation Breakdown Diagram CID Computational Chemistry Fragmentation Mechanism Ion Mobility Collision Cross Section

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 有機化合物の定性に質量分析が広く用いられ始めた1960年代以降、70 eV電子イオン化(EI)質量分析(MS)におけるフラグメンテーションは広く研究され、機構の理解も進んできた。並行してEI MSデータは永年にわたって多数集積され、EIマススペクトルライブラリー検索は揮発性低分子有機化合物同定におけるゴールドスタンダード法となり、メタボローム解析等の質量分析の新しい応用分野においても利用されている。一方、EI MSが適用可能な揮発性分子は有機化合物のごく一部にすぎないため、1980年代以降、EI法ではカバーできない有機分子の質量分析を可能とするべく様々なソフトイオン化法が開発された。今日では、エレクトロスプレーイ法(ESI)に代表されるソフトイオン化法が、生命科学等、揮発性に乏しい分子を多く扱う分野において第一選択の手法として利用されている。ESIマススペクトルにはフラグメントイオンがほとんど現れないため、構造情報を得るためには同じく1980年代以降普及発展してきたタンデム質量分析(MS/MS)が用いられる。EI同様にMS/MSスペクトルのライブラリー化による化合物同定の試みがなされてきているが、スペクトルそのものでなく配列情報を検索するペプチド同定などの一部の例外を除き、この試みは成功しているとは言いがたい。例えばLC/MS及びLC/MS/MSを用いたメタボロミクス研究における化合物同定率は高々数パーセントから二、三割とも言われていた(Matsuda, et al., Plant J. 2009; Sreekumar, et al., Nature 2009)。

(2) 我々が質量スペクトル上でフラグメンテーションパターンとして見ているものは、有機分子(イオン)の分解反応生成物を $m/z$ 軸に投影した図である。分解反応過程は本質的に条件依存のだが、EI法の場合、高真空中での70 eV電子イオン化という単純かつ一定の条件下、マイクロ秒オーダーの定まった時間枠内で生成するフラグメントイオンのみを観測するため、質量スペクトルパターンはライブラリー検索に用いられるまで安定したものとなる。一方、衝突活性化分解(CID)を用いたMS/MS測定では、実験系における衝突エネルギー(CE)のみならず、衝突ガスの種類、圧力、さらにはマイクロ秒からミリ秒オーダーに及ぶ幅広いフラグメンテーション観測の時間枠といったイオンの分解に影響を与える様々な変数が存在する。そのため、単純にCEを一定にしても、異なる装置、異なる実験室で測定においては他の変数がしばしば異なるためスペクトルパターンは再現しない。近年の装置技術の発展により質量分解能と質量測定精度が向上し、分子量数百以下の低分子有機化合物について精密質量測定結果に基づく分子式決定が完全にルーチン化した結果、化合物同定は異性体の識別・同定の問題へと集約しつつある。異性体の識別同定には厳密に測定条件を同じにしてのスペクトルパターン比較やクロマトグラフィーの保持時間比較が必要なため、多大な労力が必要なインハウスデータベース構築がしばしば行われる。

### 2. 研究の目的

(1) われわれは、従来は主としてイオン化学の基礎研究に用いられてきたエネルギー分解タンデム質量分析(ER-MS/MS)法を、異性体の識別同定に応用できないか検討してきた。ER-MS/MS法で取得されるデータセットは、分解反応全体の投影図であるMS/MSスペクトルと同時に、個々の分解経路のエネルギー依存性に関する情報を含む。横軸にCE、縦軸に各分解経路に対応するプロダクトイオン相対強度をプロットしたブレークダウン図から、フラグメンテーションパターンや移動度単独からは明瞭でない場合が多い異性体間の差を可視化できる。これをさらに発展させ、フラグメンテーションがエネルギー依存的であるという本質を積極的に利用した異性体の識別・同定法の原理と方法論を確立する。

(2) 生命科学などの分野で近年急速に発展、普及しつつある一細胞質量分析や質量イメージング等、局所・リアルタイムの分析においては、メタボローム解析等で主流となっているクロマトグラフィー保持時間と分子質量情報に依存した異性体識別同定法を用いることができない。目的化合物の単離も不可能である状況で、ER-MS/MSデータ以外に異性体識別・同定に利用しうると考えられるのは、イオン移動度分析(IMS)データの利用である。両者の利点と限界を明らかにし、クロマトグラフィーを併用できない局所質量分析における低分子有機化合物の識別・同定法としての有用性を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) Q-TOF型装置に代表される近年のタンデム質量分析装置にER-MS/MS法を適用することで、従来法のLC/MS/MS実験に余り遜色ない水準の感度とデータ取得速度を保ちつつ情報量を飛躍的に増やせる。ER-MS/MS測定は、原理的には簡単であるが、情報量が増大するのでこれを効率的に処理、可視化する方策が必要となる。広範な化合物に対しER-MS/MS法を適用してデータ集積を行っていくことを視野に、ER-MS/MSデータ取得ならびにデータ処理の効率化、高スループット化のための実際的方法論を確立、基礎的な検討にも応用していく。

(2) 一般に、フラグメンテーションパターンは測定条件に依存して大きく変動するが、これはス

ペクトルパターンが様々な競争的な分解反応経路を経た生成物（フラグメントイオン）の量比を反映したものであることに起因する。個々の分解反応は化合物（イオン）の化学構造によって規定されるので、反応のエネルギー依存性は立体化学を含む異性体間の構造差を反映すると予想される。ER-MS/MS 法に基づく異性体識別・同定方法論の原理と有用性について、代謝物異性体を含むモデル系を用いて検証する。

(3) ER-MS/MS データから得られるブレイクダウン図の横軸を、絶対的なエネルギー軸に関連付ける方法を開発する。生データの横軸は、個々の装置の CE 設定値であるが、実際の分解反応は前述のとおり CE 値だけでなくガス圧等、他の様々な条件にも依存するため、異なる装置や他の研究室で得られたデータを直接比較することはできない。そこで、様々な条件でイオンが実際に受ける活性化の度合いを温度計分子や計算化学的に得られる活性化エネルギー値を用いて標準化、ブレイクダウン図のエネルギー軸を較正する方法を見出す。

(4) 簡単なモデル化合物の反応経路について計算化学データと ER-MS/MS 実験データの比較解析を行い、フラグメンテーションデータがエネルギー依存的な分解反応の投影であるという背景原理を定量的に描出、クロマトグラフィー保持時間情報の得られない局所質量分析のような状況において標品との比較なしに ER-MS/MS データのみによって異性体識別・同定が可能であるかを検証する。並行して、異性体イオン構造と衝突断面積に依存する IMS データに戻り異性体識別の有用性評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 従来法の ER-MS/MS 実験においては CE の設定を段階的に変化させた条件で個別のスペクトルデータを多数取得し、それらから必要なピーク情報を抽出、統合、再構成することによってブレイクダウン図を得る。MS/MS スペクトルの測定サイクルが比較的早い Q-TOF 型市販装置で 1 秒間に取得可能なスペクトル数は 10 程度なので、仮に CE (実験室系) を 5 eV から 40 eV まで 1 eV 刻みに 40 段階ステップするには 4 秒必要となり、試料導入系に高速分離 LC を用いた場合ピーク溶出の時間スケールに追従できなくなる。この問題を解決するため、市販の Q-TOF 型装置 (Waters Synapt G2) に組み込まれている IMS-MS/MS 測定用データ取り込み機構を転用し、迅速に ER-MS/MS データセットを取得する方法を開発した。IMS データ測定時には 10 ミリ秒オーダーのイオン移動度時間軸を 200 ステップに分割して信号を記録するが、1 ステップは直交加速型飛行時間分析計における 1 プッシュに相当する。緩衝ガスを取り除き移動度分離が起こらない状態とした上で各ステップに対して CE を任意のスロープで割り当てることにより、IMS データに替えて ER-MS/MS データを取得する方法を編み出した。これにより、クロマトグラフィー時間スケールよりも早いサイクルで効率的にデータを取得することが可能となった。また、本法で得られるデータは、既存の IMS データセットと同じ構造を有しており、 $m/z$ 、強度、移動度の 3 軸の代わりに  $m/z$ 、強度、CE の 3 軸を持つデータとして、既存の IMS データ処理ソフトウェアを部分的に流用、効率的なデータ処理を行うことが可能になった。分子量 500 以下の低分子薬物をモデルとし、本法で Q-TOF 型装置を用いて得られたブレイクダウン図と、従来法で三連四重極型装置を用いて得られたブレイクダウン図の比較した結果、ブレイクダウン図そのものを集積、ライブラリー化することで、異なるプラットフォームで得られたデータを化合物同定に利用できる可能性が示された。

(2) 種々の異性体を含む低分子代謝物の一つのモデルとなる C4 アミノ酸について、構造異性体の関係にある 6 種の化合物、2-aminobutyric acid (2-ABA) , 3-aminobutyric acid (3-ABA) , 4-aminobutyric acid (GABA) , 2-aminoisobutyric acid (2-AIBA) , 3-aminoisobutyric acid (3-AIBA) , *N,N*-dimethylglycine (DMG) の識別について検討した。これらのうち、3-ABA, GABA, 3-AIBA の 3 化合物は MS/MS スペクトルパターンの違いに基づく識別が可能であったのに対し、 $\alpha$ -アミノ酸である 2-ABA, 2-AIBA, DMG の 3 化合物は同じ組成のフラグメントイオン、 $m/z$  58 のみを与え、スペクトルパターンに基づく識別は全く不可能であった。一方、ER-MS/MS 法により取得した 2-ABA, 2-AIBA, DMG のブレイクダウン図では  $m/z$  58 生成の CE 要求性に明確な差が認められ、測定条件を種々変化させても、常に開裂が容易である方から 2-ABA < 2-AIBA << DMG の順であった。この差は各異性体の構造の違いそのものに起因するものであり、スペクトルパターンが同一であっても ER-MS/MS により構造異性体の識別・同定が可能であるという方法原理が検証された。

(3) 開裂に至る CE 要求性の違い (2-ABA < 2-AIBA << DMG) は測定条件を変化させてもブレイクダウン図上に明確に表れる。一方、CE 軸上の曲線の位置は、測定条件に依存して変動する。イオンの衝突活性化に直接的に関与するのは実験室系 CE ではなく重心系衝突エネルギー (E<sub>com</sub>) であることが知られている。そこで、同じ CE に対して異なる E<sub>com</sub> を与える質量の異なる衝突ガス (Ar, Ne, He, N<sub>2</sub>) を用い、同時に衝突ガス圧を変化させながら様々な条件で各異性体の ER-MS/MS データを収集した。同様に、解離の閾値エネルギーが自明であるとされているベンジルピリジニウム温度計イオンを用いてデータを収集し、ブレイクダウン図の条件依存性とエネルギー軸の標準化について検討した。その結果、個々の化合物群 (アミノ酸異性体、

温度計イオン) について, CE, 衝突ガス圧, 衝突ガス種を変化させるとブレイクダウン図は反応のエネルギー要求性に応じてシフトし, 何らかの方法でエネルギー軸のスケールが可能であることが示唆された. 一方, CE から Ecom への単純な変換ではエネルギー軸の標準化には不十分であることが判明した. これは, 現状の CID のモデルは現実の実験系における現象を十分に記述できていないことを示唆している. 今後, CID のエネルギー要求性の定量的記述のため, 剛体球モデルでは記述できない個々の衝突ガスの特性や衝突活性化と衝突冷却双方向のエネルギー移動過程を考慮したより精密なモデルを構築していく必要がある.

(4) フラグメンテーション反応過程のエネルギー的側面を理論サイドから裏付けるため, C4  $\alpha$ -アミノ酸異性体である 2-ABA, 2-AIBA, DMG それぞれのプロトン付加分子 ( $m/z$  104) から  $m/z$  58 のプロダクトイオン ( $C_3H_8N^+$  異性体イオン) が生成する過程について, 量子化学計算を用いて解析を行った. 即ち, 最も単純な  $\alpha$ -アミノ酸である Gly のプロトン付加分子から 46 Da の中性種が脱離する過程は  $H_2O$  と  $CO$  分子の連続的脱離によって説明できると報告されており, このモデルに基づき, 各アミノ酸異性体のプロトン付加分子から遷移状態を経て  $m/z$  58 の各異性体イオンを生成する過程をモデル化, 各反応経路のエネルギー障壁を見積もった. DFT 計算に基づいて得られた DMG について得られた反応障壁は Gly のそれに比較して約 10 kcal/mol 高く, ER-MS/MS において DMG が高いエネルギー要求性を示すこととよく符号した. 一方, 計算化学的に見積もられた 2-ABA と 2-AIBA のフラグメンテーションエネルギー障壁には有意な差は認められず, エネルギー要求性の明確な差が認められた ER-MS/MS 実験の結果を再現できなかった. この比較的単純なフラグメンテーション過程に対しても計算化学モデルの妥当性を再検討する必要がある, 標品がなく実験データの得られない系におけるフラグメンテーション過程の定量的に予測のすることの難しさが明らかとなった. 並行してイオン移動度による異性体識別の可能性を評価するため,  $C_3H_8N^+$  各異性体イオンの構造モデルに対し, トラジェクトリー法による衝突断面積見積を行った. 異性体イオン間で 2% 前後の衝突断面積の違いがあることが予想され, IMS により実験的識別可能であることが示唆される一方で, 予想される衝突断面積の差は計算自体の不確かさ (3% 前後) の範囲内にあるため, 計算のみに依存して異性体の同定と帰属を行うことは難しいことがわかった.

以上, 本研究の結果, ER-MS/MS 法により構造異性体の識別・同定が可能であるという方法原理が検証され, ER-MS/MS 実験データを効率的に取得する方法論を確立できた. その一方で, 実験値からフラグメンテーションのエネルギー要求性を標準化された値に変換するには既存の CID モデルでは不十分であることが明らかとなり, ER-MS/MS 実験データを計算化学的に求められたエネルギー障壁から説明する試みも部分的にしか成功しなかった. 局所分析への応用に向け, CID および計算化学的な反応モデルの精密化と実験データのさらなる蓄積の必要性が明らかとなった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kano Naoki, Kawamata-Asano Ayano, Suzuki Kana, Takahashi Yusuke, Miyazawa Takeshi, Nakamura Takemichi, Moriya Takashi, Hirano Hiroyuki, Osada Hiroyuki, Iwabuchi Yoshiharu, Takahashi Shunji	4. 巻 9
2. 論文標題 An integrated screening system for the selection of exemplary substrates for natural and engineered cytochrome P450s	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54473-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maeda K., Izawa M., Nakajima Y., Jin Q., Hirose T., Nakamura T., Koshino H., Kanamaru K., Ohsato S., Kamakura T., Kobayashi T., Yoshida M., Kimura M.	4. 巻 65
2. 論文標題 Increased metabolite production by deletion of an HDA1-type histone deacetylase in the phytopathogenic fungi, <i>Magnaporthe oryzae</i> ( <i>Pyricularia oryzae</i> ) and <i>Fusarium asiaticum</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Letters in Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 446 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/lam.12797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takemichi Nakamura
2. 発表標題 Do we have chemistry? MS/MS in anticipation or in reality
3. 学会等名 22nd International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takemichi Nakamura
2. 発表標題 Do We Have Chemistry? Deciphering MS/MS Data of Small Molecules to Recognize the Chemistry Behind
3. 学会等名 4th International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村健道
2. 発表標題 An Efficient Way to Capture Energy-Resolved Tandem Mass Spectrometry Data for Fingerprinting Small Molecules
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村健道
2. 発表標題 エネルギー分解MS/MSを用いた小分子異性体識別同定に向けたアプローチ
3. 学会等名 第66回質量分析総合討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村健道
2. 発表標題 MS/MS 測定とスペクトル解析の基礎の基礎
3. 学会等名 第45回BMSコンファレンス(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takemichi Nakamura
2. 発表標題 An energy-resolved tandem mass spectrometry approach towards identification of small isomeric metabolites
3. 学会等名 22nd International Mass Spectrometry Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村健道, 須田康明, 佐藤太
2. 発表標題 エネルギー分解タンデム質量分析法の小分子異性体識別同定への利用: C4アミノ酸
3. 学会等名 第65回質量分析総合討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村健道
2. 発表標題 フラグメンテーションの基礎と MS/MS
3. 学会等名 日本質量分析学会材料分析部会第1回研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関