

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18550085

研究課題名（和文） 閾値エネルギー解離質量分析法の開発と生体分子解析への応用

研究課題名（英文） Development of threshold-energy dissociation mass spectrometry for characterization of biomolecules

研究代表者

中村 健道 (NAKAMURA TAKEMICHI)

独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チーム・前任研究員

研究者番号：10360611

研究成果の概要：低分子有機化合物の定性および定量分析法として質量分析法は最も高感度かつ特異性の高い方法の一つであるが、生体分子の多くに対しては電子イオン化法を適用できず、化合物の同定は非常に困難な作業となる。閾値エネルギー解離法に関する本研究の結果、汎用性が高く小型化可能なイオントラップ質量分析計を用いて、本法を生体分子を含む広範な低分子有機化合物の定性・同定法へと展開していくための基盤を構築できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	800,000	0	800,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	450,000	2,750,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：質量分析法，閾値エネルギー解離，生体分子，イオントラップ，解離反応経路，選択的断片化，衝突冷却，有機化合物定性

1. 研究開始当初の背景

(1) 質量分析法は有機化合物の定性分析法として最も高感度かつ汎用性の高い方法であり、化学のみならず、医学、生物学、薬学、環境科学等の多くの分野で用いられている。長年にわたって蓄積されてきた質量スペクトルライブラリーの検索により、微量物質を瞬時に同定することも可能である。しかし、この方法は、電子イオン化の適用が可能なごく一部の有機化合物化合物にしか適用できない。

(2) 多数の異性体の中から該当物質を識別する際には、分子質量の測定に加えてフラグメンテーション情報を用いることが必須である。70eV の衝撃電子を用いた電子イオン化質量スペクトルにおいては、プラットフォームに依存しない高いフラグメンテーションパターン再現性が得られるので、スペクトルライブラリー検索による化合物同定が可能である。一方、電子イオン化の適用が不可能な多くの生体分子のフラグメンテーション情報を得る際には ESI や MALDI 等のソフトイオン化法に MS/MS 法を組み合わせるが、得ら

れるフラグメンテーションパターンは装置ならびに測定条件に大きく依存する。このため、スペクトルライブラリー検索による化合物同定は上手く機能せず、メタボローム解析などの分野で大きな障害となっていた。

(3) 電子イオン化によるフラグメンテーションについては 50 年以上に及ぶ有機質量分析の歴史の中で基礎研究、理解が進められてきた。一方、ソフトイオン化と MS/MS 法の組み合わせによるスペクトル測定が一般化したのは 1980 年代後半以降であり、過去 20 年間程の間に種々測定法と装置が提案、開発され、並立した状態で存在している。統一的な理解が進まず、それらの間でのフラグメンテーションパターンの比較は行えなかった。

2. 研究の目的

(1) 今後、ますます重要性が高まることが予想されるメタボロミクス分野等への展開を目指し、気相イオンの解離（断片化）法に関する新しい方法論である閾値エネルギー解離質量分析法を確立する。

(2) MS/MS 法における各種解離法の統一的な理解を基盤に、閾値エネルギー解離法の有用性を検証、微量生体分子解析への応用展開を図る。第一段階である閾値エネルギー解離質量分析法の確立においては、エレクトロスプレー法により生成した基底状態近傍の解析対象イオンをイオントラップ中で緩和な振動励起状態に導いた後に一定時間保つことにより、閾値エネルギーが最小の反応経路の生成物へ選択的かつ高収率に導く測定法を開発する。モデル低分子有機化合物の断片化実験により、閾値エネルギー選択性と測定精度を評価、種々の構造を反映する最小閾値解離反応を明らかにし、生体分子解析の基盤を構築する。

3. 研究の方法

フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析装置（イオン源部六重極イオンリザーバーと、ICR セルの双方をイオントラップとして使用）と四重極イオントラップ質量分析計を用いて、以下の各項に挙げるような内容について検討した。

(1) 基本的実験条件の確立

FT-ICR 型質量分析装置のイオンの六重極イオンリザーバー（リニアイオントラップ）を用いた解離実験条件の確立

FT-ICR 型質量分析装置を用いての、低エネルギーCID法（SORI）と IRMPD 法を ECD 法に組み合わせて用いる解離実験条件の確立

四重極イオントラップ型質量分析装置を用いての、低エネルギーCID と長時間イオン蓄積を併用した解離実験条件の確立

(2) ベンジルピリジニウム誘導体温度計分子を用いた閾値エネルギー選択性の検討

六重極イオンリザーバーを用いた実験：活性化条件（イオントラップ中の蓄積時間）に依存した解離反応生成物の FT-ICR MS による観測

四重極イオントラップ質量分析装置を用いた実験：トラップ温度と蓄積時間の制御による閾値選択的反応の観測と選択性の評価・検討

(3) 従来法を用いた比較対照実験解離実験

FT-ICR 質量分析装置を用いた ECD, SORI CID 及び IRMPD 法を併用した解離実験

四重極型質量分析装置を用いた低エネルギーCID法による解離実験

磁場型質量質量分析計を用いた高エネルギー及び低エネルギーCID法による解離実験

(4) 四重極イオントラップ型温度制御反応装置を用いた閾値エネルギー選択解離実験

トラップ温度制御装置を用いての測定条件検討と最適化

トラップ温度と蓄積時間の制御による閾値選択的反応の観測と選択性の評価

従来法と閾値エネルギー選択法によるデータの比較検討

4. 研究成果

気相イオン解離に関する新しい方法論である閾値エネルギー解離質量分析法の原理を確立し、構造解析への有用性の検証と微量生体分子解析への応用展開を図るため、反応効率と閾値エネルギー選択性を評価した。

(1) 閾値エネルギー解離質量分析法は、エレクトロスプレー法等により生成した基底状態近傍の解析対象イオンを緩和な振動励起状態に導き、イオントラップ中に一定時間保つことで閾値エネルギーが最小の反応経路生成物へと選択的かつ高収率に導くことを基本原理とする（図1）。この原理は、種々装置への実装可能と考えられる。

FT-ICR 質量分析装置の六重極イオンリザーバーをイオントラップとして用いた実装（図2）においては、イオン蓄積時間に依存して観測される MSAD を用いて最小閾値反応の観測が可能であることを示した。

図1 閾値エネルギー解離質量分析法の原理．上段：通常の質量分析法による解離（閾値エネルギー E_0 の低い反応経路と高い経路の双方が観測される） 下段：閾値エネルギー解離質量分析法（ E_0 が最小の経路の生成イオンのみを高収率 = 高感度で観測）

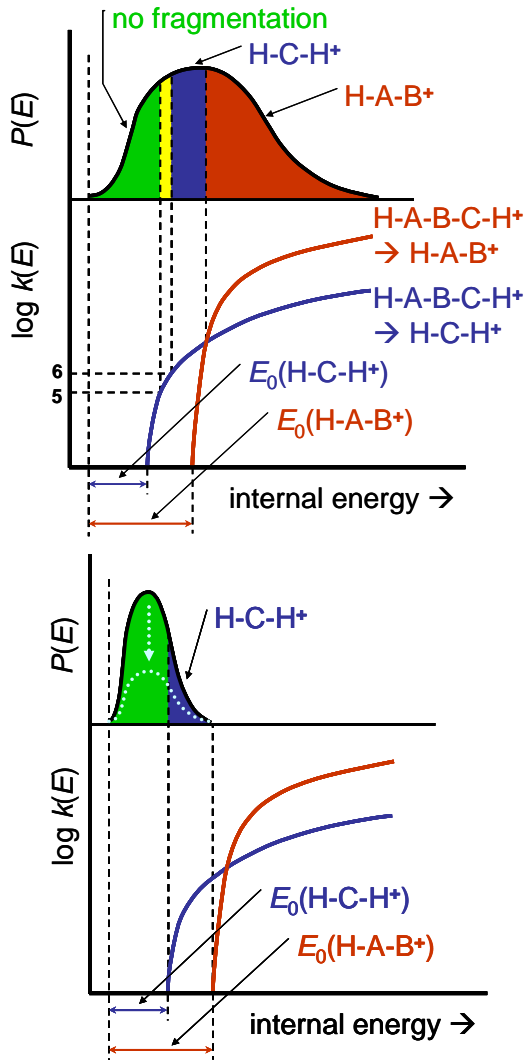
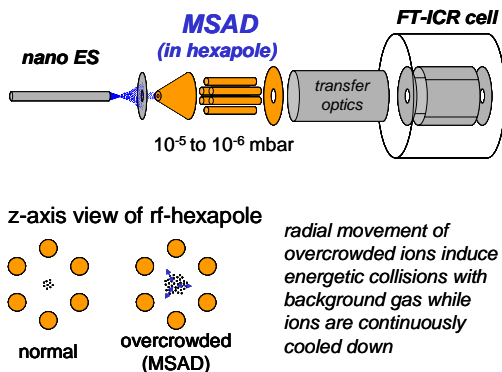
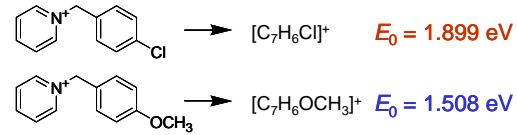


図2 FT-ICR 質量分析装置の六重極イオンリザーバーを用いた実装 (MSAD) の模式図



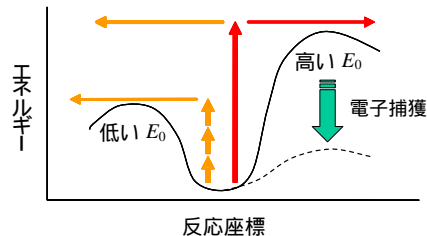
ベンジルピリジニウム誘導体温度計分子を用いて最小閾値解離反応の選択性について検討した結果、閾値エネルギー(E_0)が1.9 eVである p -クロロ体を全く解離させることなく、 E_0 が1.5 eVの p -メキシ体を完全に解離させられることが分かった(図3)。

図3 ベンジルピリジニウム温度計分子の閾値エネルギー



(2) 従来、FT-ICR質量分析計を用いたECD法による解離では、電子捕獲に引き続いた非エルゴード的直接解離により E_0 の高低とは無関係にペプチド鎖のN-C結合開裂等が進行する、との考え方があった。しかし、本研究において複合型糖ペプチド等をモデルとしてECD法とCID法、IRMPD法を組み合わせた解離反応に関する詳細な検討を行った結果、ECD法による解離の選択性は非エルゴード的直接分解によるものではなく、電子捕獲により特定部位解離反応の E_0 が低下するためと考えられた(図4)。すなわち、閾値エネルギー解離質量分析法のコンセプトを奇数電子系を含む反応にも普遍的に適用できることが示された。

図4 電子捕獲に伴う最小閾値エネルギー経路の変化



(3) FT-ICR 質量分析装置を用いた閾値エネルギー解離質量分析法の実装においては、トラップ内蓄積時間やIRMPD照射時間等をそれぞれ変化させることにより反応の制御が可能だが、装置の普及度が低いため、将来のメタボロミクス分野等への応用展開を考える際には問題があった。一方、四重極イオントラップ質量分析装置は小型かつ、比較的安価な装置の実現可能性が高いため、汎用装置への展開が比較的容易と考えられる。四重極イオントラップ中で高周波により励起されたイオンは高確率でトラップ内のバッファガスと衝突し、ほぼ100%の反応効率を得られる。しかし、閾値エネルギーでの反応を観測する際には、高周波励起後の衝突で一旦内部エネルギーを獲得したイオンが thermal

なガスとの衝突で再冷却されることが問題となる。すなわち、選択性を上げるためには過剰エネルギーをなるべく小さく保ったまま解離させる必要があるが、反応待ち時間中に衝突冷却により内部エネルギーが閾値以下に低下する。この問題を解決するため、エンドキャップ電極を加熱し間接的にバッファガスの温度を上げて衝突冷却の効果を薄める方法を試みた。モデル化合物を用いた検討の結果、トラップを 500K 程度まで加熱しつつ 10 秒程度までの反応待ち時間をとった場合、従来法に比較して有意に低い励起状態での解離が可能であることが分かった。

(4) 本研究の結果、実装の比較的容易な四重極イオントラップを用いて閾値エネルギー解離法を広範な低分子有機化合物の定性法へと応用展開していくための基盤を構築できた。閾値エネルギー解離質量分析法によって高感度での観測が可能となる最小閾値反応経路は、基本的には実験条件と無関係に化合物の構造のみに依存する。MS および MS/MS 実験条件に依存しない点が MS/MS スペクトルパターンそのものとは大きな相違点であり、一種の物性値として扱うことが可能である。今後、広範な有機化合物への適用と、最小閾値反応に関するパラメーター（最小閾値エネルギーと生成イオンの m/z ）測定ならびにデータベース化、既存化合物データベースとの関連づけを通して、メタボロミクス分野における化合物同定手法に組み入れていくといった展開が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

中村健道, マススペクトルの解析と有機化合物の定性 質量分析実務者のための基礎講座. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 57, 印刷中, 2009, 査読有
Hongo Y., Sato A., Nakamura T. Factors governing peptide backbone cleavages in electron capture dissociation of triantennary complex-type N-glycosylated peptide. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 55, 279-285, 2007, 査読有
Hongo Y., Nakamura T., Sato A. Electron capture dissociation of triantennary complex-type N-glycosylated peptides: a case of suppressed peptide backbone cleavage. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, 55,

77-82, 2007, 査読有

Nagatsuka Y., Horibata Y., Yamazaki Y., Kinoshita M., Shinoda Y., Hashikawa T., Koshino H., Nakamura T., Hirabayashi Y. Phosphatidylglucoside exists as a single molecular species with saturated fatty acyl chains in developing astroglial membranes. *Biochemistry* 45, 8742-8750, 2006, 査読有

[学会発表](計4件)

中村健道, スペクトル解析と定性 - MS と MS/MS を有機化学的視点から考える. 第 35 回 BMS コンファレンス (BMS2008), 2008 年 7 月 8 日, 裏磐梯ロイヤルホテル Takemichi Nakamura, Inconvenient Reality: Is the "Hydrogen-shift" in Electron Capture Dissociation of Peptide Backbone Predictable? 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2007 年 6 月 4 日, Indiana Convention Center in Indianapolis

中村健道, ECD スペクトルの解釈について 有機マススペクトロメトリーの視点から考える. 第 55 回質量分析総合討論会, 2007 年 5 月 16 日, 広島国際会議場

Takemichi Nakamura, A proposal for extension of Biemann's nomenclature: peptide backbone fragmentation with odd electron species, 22nd Asilomar Conference on Mass Spectrometry: Fundamentals of Gas Phase Ion Chemistry, 2006 年 10 月 21 日, Asilomar Conference Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 健道 (NAKAMURA TAKEMICHI)
独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チーム・前任研究員
研究者番号: 10360611