

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06521

研究課題名（和文）レーザー電場および高電圧パルスの波形デザインに基づくMALDIイオン生成量の増大

研究課題名（英文）Enhancement of MALDI ion production based on designing waveform of laser electric field and high voltage pulses

研究代表者

星名 賢之助（Hoshina, Kennosuke）

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60292827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：MALDI法におけるイオン信号強度について、引き出し電場の影響を調べた。引き出し電場の遅延時間に対しては、正イオン、負イオンともに、時間に対して一次反応的に減少することが分かった。これは、レーザー照射によりMALDI結晶中に正負イオンがペアとして近接して生成し、そのペアが再結合により中性化したためと考えられる。次に、引き出し電場の大きさを変化させると、電場の大きさの増加に伴い、信号強度も増加した。その関係は、両対数プロットにおいて線形となった。この電場とイオン信号の関係を、モデルを構築することにより再現することに成功した。また、生成したイオンペアの距離の分布に関する情報を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MALDI法は、熱分解しやすい生体分子などを非破壊的に気化し、高感度かつ簡便に質量分析できる方法である。定性分析としてはすぐれている一方、定量性についての評価は容易ではない。それは、MALDIにおけるイオン信号の生成過程が定量的に記述できないからである。本研究では、その中の1つの因子である、生成した正イオンと負イオンの再結合による失活に着目した。MALDIでは、レーザー照射時に生成したイオンの少ない量が、この再結合により観測される前に消滅していると考えられる。本研究で、再結合がパルス電場の印加デザインを工夫することにより抑制できることが、定量的に示された。今後の高感度化に役立つ知見である。

研究成果の概要（英文）：The effect of the extraction field on the ion signal intensity in the MALDI method was investigated. It was found that both positive and negative ions decreased with time in a first-order response to the delay time of the extraction electric field. This is considered to be due to the formation of pairs of positive and negative ions in close proximity in the MALDI crystal by laser irradiation, and their neutralization by recombination. Next, when the magnitude of the extraction electric field was varied, the signal intensity increased with the increase in the magnitude of the electric field. The relationship was linear in both log-log plots. This relationship between the electric field and the ion signal was successfully reproduced by constructing a model. Information on the distribution of the distance between the ion pairs generated was also obtained.

研究分野：物理化学

キーワード：MALDI 質量分析 イオン再結合 パルス引き出し 数値シミュレーション DHB CHCA アスパラギン酸

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MALDI - MS 法は、エレクトロスプレー (ESI) 法と並び、高質量有機分子の非破壊的気化・イオン化法である。質量分析法と組み合わせた MALDI - MS 法は、現在では生命科学研究におけるたんぱく質・核酸に代表される生体分子種、あるいは信号伝達物質や薬物などの生体内制御分子の主たる検出法の 1 つである。特に、試料の検出までが迅速で簡便、かつ高感度であることが、MALDI 法の特長である。一方で、分析法としての MALDI 法は、定量性に課題がある。それは、MALDI 過程が固相から気相への相転移を含むため容易に記述できない過程であること、そして、数 100 ナノ秒程度の時間スケールで高速に進行する過程であることが要因である。それでも、レーザー照射直後に生成する高密度プラズマ中で、マトリックス分子と試料分子の間でプロトン交換反応が起こり、それが、熱平衡状態にあると近似することで、アミノ酸やペプチドにおいて、「相対的なイオン生成量」に関する定性的な解釈は可能となっている。しかしながら、分析法としての感度を決定する生成されるイオンの絶対量に関してはこれまで調べられていない。高感度といえども、イオン信号の定量的理解と、さらなる MALDI 法の感度向上には、その知見が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では生成される絶対イオン強度を決定する要因について着目した。MALDI 法は、レーザー照射後に、MALDI 結晶内に、正イオンと負イオンの両方が生成する。具体的には、マトリックス分子 M について、プロトン化正イオン (MH^+)、脱プロトン化負イオン ($[M-H]^-$) のペアである。これらから 2 次イオン化過程を通じて、試料イオンが生成する。しかし、この正負イオンペアは、生成直後より再結合により失活していくと考えられている。したがって、電場で引き出して質量分析装置で検出することは、正負イオンの再結合を抑制して分離することに対応する。このことから、申請者は、引き出し電場のデザインが、再結合せずに検出される MALDI イオン信号量を決める重要な要素であると考えた。電場と検出イオン量の関係性を調べ、それをモデル化して解釈することにより、MALDI イオン生成の絶対量に関する知見が得らることを目的とした。

3. 研究の方法

引き出し電場のタイミングと電場の大きさを制御した測定は、Bruker Daltonics Autoflex III を用いた。マトリックス剤として、CHCA、DHB を選び、試料としてアスパラギン酸 (Asp) を選択した。Asp は、気相酸性度が比較的小さく、負イオンモードでも十分な信号強度が得られる。

(1) 試料作製: マトリックス剤は、CHCA/ACN(30%)+H₂O、DHB/H₂O 共に、50 mM で調整した。また、Asp/H₂O は、10 mM とした。マトリックス剤、試料を 1 μ L ずつステンレスターゲット基盤に滴下し、自然乾燥により混合結晶を作成した。

(2) MALDI 測定条件: 作成した混合結晶に対して、レーザー強度を調整しながら、まず MALDI スペクトル上に MH^+ (M = マトリックス剤) 信号が観測される閾値を確認した。閾値から 1.2 ~ 2 倍程度のレーザー強度に設定し、MALDI スペクトルを 500 ショット積算した。信号強度は、ピーク面積を読み取った値とした。

(3) 引き出し電場の遅延時間の影響: パルスレーザー照射のタイミングを 0 とし、引き出し電場を印加する遅延時間を 0 ns ~ 400 ns に変化させ、スペクトルを測定した。マトリックス関連信号、および、 $AspH^+$ (正イオンモード)、 $(Asp-H)^-$ (負イオンモード) の信号強度の遅延時間依存

性を解析した。

(4) 引き出し電場の大きさの影響：電極に印加する電圧を 17 - 60 kV/m の間で変化させながら、スペクトルを測定した。同様に、信号強度の電場依存性を解析した。

(5) 解析モデル構築：イオンペアの分離率(1 - 再結合率)と電場の大きさの関係をトラジェクトリー計算により調べた。イオンペアの距離が一定であれば、電場に対してステップ関数に近い変化をすることが分かった。最終的に、検出されるイオン量は、

$$N = N_0 S(E) e^{-kt}$$

で表され、再結合抑制率 $S(E)$ を、

$$S(E) = 1 - e^{-\alpha E^n}$$

と定義した。ここで、 E は電場の大きさ、 α 、 n はパラメータである。

4. 研究成果

(1) 引き出し電場の遅延時間依存性：

試料を Asp, マトリクス剤を DHB としたときの、遅延時間を変えた時の MALDI スペクトルを図 1 に示す。遅延時間の増加とともに、信号強度が減少がみられた。これは、電場で引き出すまでは、正負イオンの再結合が進行し、イオンが中性化して減少していることを示している。図 2 は、これらのスペクトルの信号強度の対数を、遅延時間に対してプロットしたものである。正イオン、負イオンともに、ほぼ同じ負の傾きの直線でよくフィッティング出来ることが分かった。すなわち、近接したイオンペアとして、一次反応的に再結合により減少していることが分かった。その時定数は、 $(=1/k)=150$ ns 程度であった。一方、マトリクス剤に CHCA を用いた時は、DHB よりも長い 170 ns 程度の時定数となったが、イオン種によって大きくばらつきがみられた。これは、レーザー強度が強いために、正負イオンのアンバランスが生じていると考えられる。

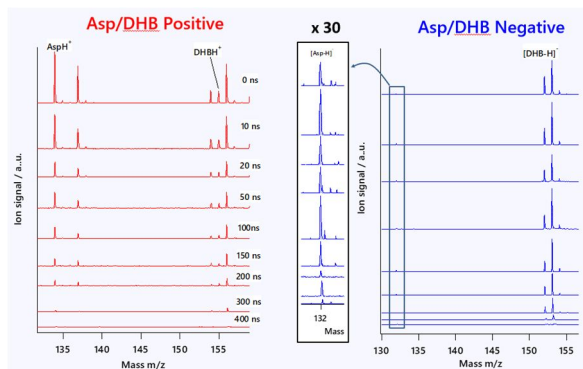


図 1：遅延時間を変化させた Asp/DHB 系の正イオンモード (左)、負イオンモード (右) の MALDI スペクトル。

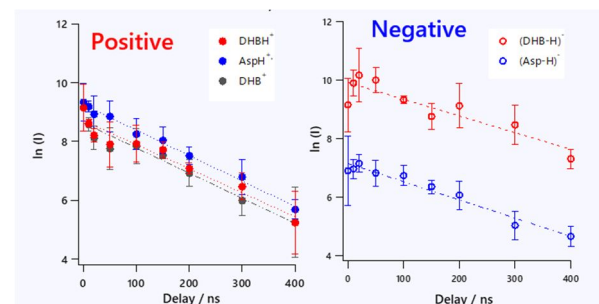


図 2：Asp/DHB 系の正イオンモード(左)、負イオンモード(右)の遅延時間に対する信号強度の対数プロット。

(2) 引き出し電場の電場依存性：

イオン引き出し部は、3枚の電極からなり、標準設定においては、サンプルを載せたプレートが 20.00 kV、2枚目の引き出し電極が 18.85 kV、3枚目の加速プレートが 0 kV となっている。2枚目の電極に印加させる電圧を 18.20 ~ 19.60 kV まで変化させることにより、MALDI 過程が起こる環境における電場の大きさを変化させた。図 3 に示すように、信号強度と電場強度は、両対数プロットにおいて線形の関係が見出された。前述のモデル式を用いてフィッティングすると、パラメータ n が 1 ~ 1.1 程度で良く再現された。

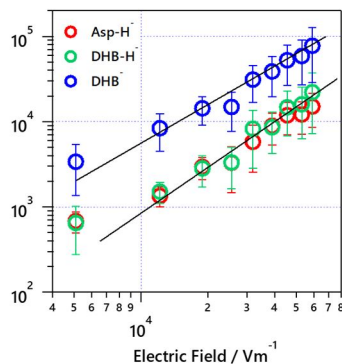
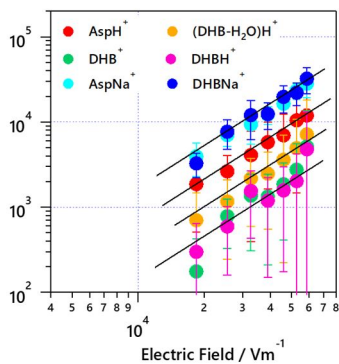


図3 : Asp/DHB 系の正イオンモード(左),負イオンモード(右)の電場に対する信号強度の両対数プロット。

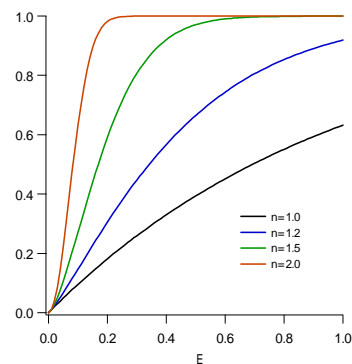


図4 : 再結合抑制率 $S(E)$ 関数グラフ

プロットにおいて線形の関係が見出された。前述のモデル式 $S(E) = \frac{1}{1 + nE}$ を用いてフィッティングすると、パラメータ n が 1 ~ 1.2 程度で良く再現された。

図4に、式(1)の再結合抑制率 $S(E)$ を示す。パラメータ n が 1 ~ 1.2 ということは、電場の増加とともに、急激に分離率が増加することを示している。

申請者は、ある距離のイオンペアをランダム方向に発生させて分離率をトラジェクト計算を行った。その結果、分離率は、ほぼステップ関数を示すことが分かった。このことを考慮すると、図4のパラメータ $n = 1 \sim 1.2$ の $S(E)$ は、ステップ関数が、イオンペアの距離分布関数によりコンボリューションされたものと考えることができる。そこで、図4の $S(E)$ のデコンボリューションにより距離分布関数を求めると、図5

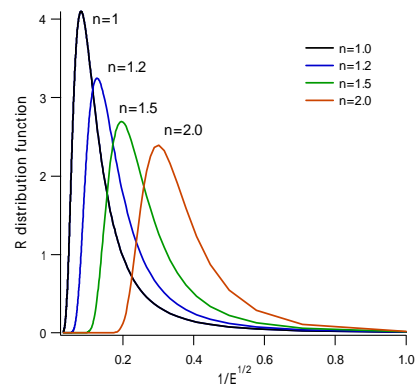


図5 : 距離分布関数

のようになった。現段階では、横軸が $1/\text{電場の平方根}$ (これは、イオンペアの距離に比例する) で描いている。この分布関数は、MALDI マトリックス結晶の中で、イオン化が起こり、残された正イオンと、電子が移動した先で生成する負イオンの距離を表している。この結果から、今後データを増やし、絶対値として、イオンペアの距離分布、そのマトリックス依存性を明らかにする道筋を得ることが可能となった。

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 0件）

1. 著者名 Hoshina Kennosuke, Shirota Tatsuro, Tsuge Masashi	4. 巻 125
2. 論文標題 Two-Body Metastable Dissociation of n -Pentane and n -Hexane Triplet Dications in Intense Femtosecond-Laser Fields	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 9508 ~ 9517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpca.1c06567	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 -

1. 著者名 Shirota Tatsuro, Hoshina Kennosuke	4. 巻 490
2. 論文標題 Ionization detection of neutral 2,5-dihydroxy benzoic acid molecules in the matrix-assisted laser desorption/ionization plume by ultraviolet laser post-ionization: Correlation between internal energy distribution and thermal decomposition rate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 117086 ~ 117086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijms.2023.117086	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城田起郎、星名賢之助
2. 発表標題 紫外レーザーポストイオン化法を用いたMALDI法における相爆発過程の検証
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城田起郎、星名賢之助
2. 発表標題 MALDI結晶のレーザー過加熱と相爆発の検証：レーザーポストイオン化によるアプローチ
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城田起郎、小林 将文、星名賢之助、山内 薫
2. 発表標題 フェムト秒レーザー照射によるステンレス表面からの水素分子イオン生成
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 将文、城田 起郎、柘植 雅士、星名 賢之助
2. 発表標題 MALDI法における定量性に関する研究： アミノ酸を用いた新たな熱平衡モデルの提案
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 城田起郎、小林 将文、星名賢之助、山内 薫
2. 発表標題 フェムト秒レーザーによる金属アブレーションに伴う水素分子イオンの生成
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 城田起郎、星名賢之助
2. 発表標題 MALDI機構における相爆発過程の検証：紫外レーザーポストイオン化によるアプローチ
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 将文、城田 起郎、柘植 雅士、星名 賢之助
2. 発表標題 MALDI法における凝縮相中プロトン移動反応モデルの検討
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
4. 発表年 2023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