

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550026

研究課題名(和文)フェムト秒強レーザー場による非破壊的イオン化を利用したMALDI plumeの活性化

研究課題名(英文)Activation of MALDI plume based on non-dissociative ionization by femtosecond laser fields

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) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：不揮発性分子の高感度分析法であるMALDI法について、試料イオンの生成機構の解明に基づく高感度化を目指して研究を行った。そのために、フェムト秒レーザーを導入できるような独自のMALDI装置を製作した。試験的にPhe/DHB系のMALDI plumeにフェムト秒レーザーを照射することにより、脱離された中性分子種が、断片化を最小限に抑えてイオン化できることが分かった。この結果は、これまでMALDI過程の未知パラメータであった中性分子種量の見積もりが可能となったことを示しており、MALDI過程の定量的解釈が格段に進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop an effective method which improves MALDI-MS sensitivity based on elementary reactions involved in ion formation mechanism. We constructed a unique MALDI-TOF-MS system to which we can introduce femtosecond(fs) laser pulses to induce desorption of MALDI targets or to ionize species in MALDI plume generated by a conventional nanosecond(ns) UV laser desorption. When neutral species in the MALDI plume of phenylalanine in DHB matrix were ionized by focused fs laser pulses, molecular ions or identifiable large fragment ions (Phe⁺, [Phe-COOH]⁺, DHB⁺, etc.) were detected in the TOF mass spectra. This means that the method using ns-laser desorption followed by fs-laser ionization enables us to estimate amount of neutral species, which has been unknown parameters in the ion formation model in MALDI plume, and will definitely improve the quantitative analysis of MALDI process.

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：MALDI フェムト秒レーザー プロトン化 イオン化 フラグメンテーション TOF質量分析 アミノ酸マトリックス剤

1. 研究開始当初の背景

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) 法は、タンパク質に代表される大質量数の不揮発性分子を非破壊的に気化・イオン化し、その質量を特定する高感度分析手法である。とくに、生体分子を取り扱う医療科学、生命科学の進歩への貢献は極めて大きい。MALDI-MS 法は、ターゲットなる分子 (A) をマトリックス剤 (M) と混合結晶化させ、そこに紫外レーザーを照射するだけで比較的容易にイオン信号が得られる。そして、多くの場合、ターゲット分子はプロトン化イオン (AH^+) として観測され、分子量を迅速かつ容易に決定できる。このような利便性により分析手法として広く用いられている一方で、MALDI 過程における定量性、すなわち、MALDI 信号と試料濃度の関連付けは確立されていない。

その要因の一つは、プロトン化イオンの生成過程の反応モデルにおいて、中性分子種の量が未知パラメータとなることであった。対象試料の信号である AH^+ は、マトリックス剤とのプロトン移動反応 ($MH^+ + A \rightleftharpoons M + AH^+$) の熱平衡により生成量が決まると考えられている。したがって、質量スペクトルには検出されない中性種 A や M の量が、定量的な議論には不可欠である。そして、その量はイオン種の 1 万倍とも言われており、生成量における影響は大きい。

2. 研究の目的

本研究では、この中性化学種に着目して、MALDI 法にフェムト秒 (fs) レーザーイオン化法を組み合わせた研究計画として、以下の 2 つを研究の柱とした。いずれも、fs レーザーのもつ非破壊的光イオン化という特色を利用したものである。

(1) 高感度化を目標とした研究として、レーザー脱離により湧き上がる MALDI 蒸発注 (ブルーム) 中において、中性種を fs レーザーイオン化する。それにより、プロトン化移動反応に関わる分子の割合を増加させる。通常 YAG レーザーによりマトリックス剤をレーザー脱離すると、イオン種よりも 3 ケタ程度多い中性の M や n 量体 M_n が気化されると考えられている。これらを、フェムト秒レーザーによりイオン化し、 M^+ や MH^+ 濃度を一桁以上増加できれば、実質的にプロトン化される A の割

合が増加できる。あるいは、 $M^+ + A \rightarrow M + A^+$ の電荷移動反応によるイオン化が期待される。

(2) fs レーザーにより脱離された中性種をイオン化し、質量スペクトルで検出する。断片化がない、あるいは、断片化を最小限に抑制できれば、試料 A の同定が可能である。このスキームにより、脱離された中性種の高感度検出の可能性、および、中性種量の見積りの可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) 装置の立ち上げ: MALDI-TOF-MS システムを設計・製作した (図 1)。主真空槽には入射ポートが 2 組あり、1 つはレーザー脱離イオン化光、もう一つは脱離された化学種へのレーザー照射用である。質量分析部はリフレクトロン型を購入し主真空槽と接続している。

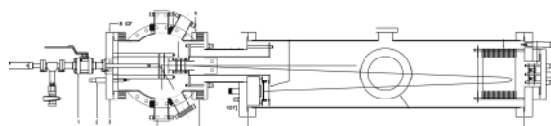


図 1 : MALDI-TOF-MS システム

(2) MALDI-TOF-MS システムによるスペクトル測定: レーザー脱離にはナノ秒 YAG レーザー (第 3 高調波 355 nm) を用い、試料 (アミノ酸) とマトリックス剤 (CHCA, DHB) の混合結晶を対象に動作確認をした。

(3) 脱離化学種への fs レーザー照射: YAG レーザーにより脱離した化学種に対し、MALDI プレートからの距離、fs レーザーの遅延時間などをパラメータにしてスペクトル測定を行う。YAG レーザーのみの MALDI スペクトルに重なるように、fs レーザーによるイオンおよびフラグメントイオンの質量スペクトルが観測される。スペクトルの帰属、解析により、MALDI 過程により脱離された中性種の種類と量に関して考察をする。

(4) 遅延引き出しによるスペクトル測定: MALDI 過程により脱離された MALDI プルームは分子密度が高いため、レーザーイオン化後の 2 次過程の影響を除くために、パルス遅延引き出しを行った。そのために、高電圧パルススイッチを製作した。

(5) 市販の MALDI-MS システムによる測定: 前項目と平行し、基礎データ収集として、市

販の高性能 MALDI 分析装置(新潟薬科大設置)を用いて、試料濃度を変えた測定、および正負両イオンの測定を行った。

4. 研究成果

(1) ナノ秒紫外レーザーを脱離光源に用い、一般的なマトリックス剤 (M=CHCA, DHB), 試料としてはアミノ酸 (Phe, Gly, Ala) を用いて MALDI スペクトル測定を行った。いずれの組み合わせにおいても、市販の MALDI システムと同様に、質量スペクトルには AH^+ , MH^+ が観測され、製作した MALDI システムが動作していることが確認された。

本装置では、任意のレーザーを脱離用に導入できるので、試験的に近赤外 fs レーザーを脱離光とした測定を行った。その結果、ナノ秒レーザーと同様のスペクトルが見られたが、スペクトルは完全に一致しているわけではない。これは、今後のフェムト秒レーザー MALDI 法として追求すべきテーマであり、本研究期間とは別に遂行していく予定である。

(2) ナノ秒 YAG レーザー脱離により生成した MALDI プルームにフェムト秒レーザーを集光する実験では、中性分子種のイオン化に由来するイオン信号が TOF スペクトルに現れた (図 2)。

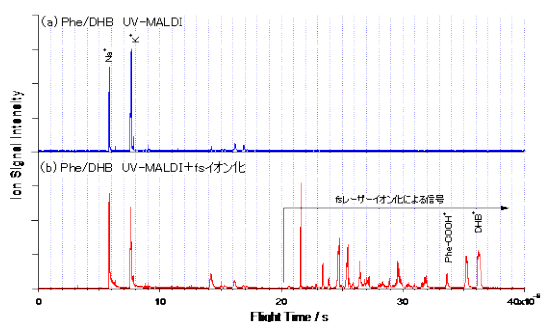


図 2: フェニルアラニン(Phe)とマトリックス剤(DHB)を試料とした通常の MALDI-TOF スペクトル(a)と、それに加えて MALDI プルームへフェムト秒レーザー照射したときの MALDI-TOF スペクトル(b)。

図 2(a)の通常のナノ秒 UV レーザーによる MALDI スペクトルは、MALDI 信号($PheH^+$, $DHBH^+$)が見え始める程度にレーザー強度を抑えている。不純物に由来する強いアルカリ金属イオン Na^+ , K^+ 信号を除けば、MALDI 過程のみで生成されたイオン種の量は非常に少ないことが分かる。ここに、ナノ秒脱離レーザーからの遅延時間数 10μ 秒、ターゲットからの距離

数 mm の位置に fs レーザーを集光すると、ちょうど MALDI プルーム中に集光することになる。その結果、図 2 (b)のように新たなイオン化信号が観測される。これは、MALDI 過程によって脱離された中性種のイオン化に由来する信号である。fs レーザー強度を上げれば、より多くのイオンが観測されることから、MALDI プルーム中の中性種の量は、3 ケタ程度イオン種よりも多いと予想される。これは、過去の研究による推定と一致する結果である。

観測されたイオン信号の中には、 DHB^+ , $DHB-H_2O^+$, $Phe-COOH^+$ など、中性分子種が特定できる比較的質量数大きい信号が含まれていることが分かった。この観測結果には 2 つ重要な意義がある。

① MALDI 過程のみでは、図 2(a)のように、Phe 由来の信号は非常に微弱である。すなわち、イオン化(プロトン化)されずにいた多量の Phe が存在しているわけであるが、それらが fs レーザーを導入することにより強いイオン信号として観測されたことになる。したがって、高感度検出への一つの端緒となる結果である。

② この測定により Phe と DHB の相対的な存在量が直接観測により見積もれるようになったといえる。イオン生成メカニズムにおける未知パラメータである中性分子種の比(図 2 の場合は Phe/DHB 比)が、試料の濃度比を変化させた測定により決定できる。

(3) 図 2 の fs レーザーイオン化による信号の低質量領域 (TOF の小さい領域) に着目すると、顕著に断片化されたイオン種の信号群が見られる。これらの信号群は、fs レーザー強度を下げても観測されることから、レーザーイオン化に伴う解離ではなく、高密度 MALDI プルーム中の 2 次過程、すなわち、引き出し電場により加速された光電子による衝突イオン化に由来するものと考えられる。

(4) 前項目の結果を受けて、イオン引き出しを定常電場ではなく、パルス引き出し電場により行った。fs レーザーによる光電子が拡散した後に高電圧パルス (3 kV, <10 ns) を印加することにより二次的な電子イオン化の効果を除いた。その結果、図 2 (b)の低質量のピーク群の強度が減少し、DHB, Phe に由来するイオン信号強度が増加する結果となった。このことは、中性分子種の電子衝突による断

片化が定常電場の時には起きており、それがパルス引き出しにより抑えられたことを示している。本手法に基づいた中性分子種の量の見積り精度が格段に向上できることを意味する。

(5)前項(1)-(4)に加えて、市販のMALDIシステムによるデータ収集を行い、イオン生成機構の定式化の拡張を目指した。2種類のアプローチ、① アミノ酸のLi⁺付加イオンの測定、② 正イオン-負イオン相関の測定である。これまでの正イオンMALDIでは、信号強度を定量的に評価するための実測値が、AH⁺とMH⁺のみである。それに対して、①ではALi⁺、MLi⁺、②ではA-H、M-Hという、それぞれ2つの実測値がモデルに加わる。その結果、実測できないA/M比をモデルから消去することができる。これに基づき、測定結果を解析すると、モデルに合致する濃度領域と逸脱する領域があることが分かった。すなわち、A/M比がMALDI プルーム中で一様ではないこと、あるいは、熱平衡状態に達していないことを示唆しており、結果(3)(4)による中性種の直接観測の必要性が明確となった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① M. Nakajima, H. Toyoshima, S. Sato, K. Tanaka, K. Hoshina, H. Kohguchi, Y. Ohshima, Y. Endo, "Electronic Spectroscopy of the HCCN radical", J. Chem. Phys. (査読有) 138, 164309 (2013) (10 pages).
DOI:10.1063/1.4802003
 - ② R. Kanya, T. Kudou, N. Schirmel, S. Miura, K. M. Weizel, K. Hoshina, K. Yamanouchi, "Hydrogen scrambling in ethane induced by intense laser fields: Statistical analysis of coincidence events", J. Chem. Phys. (査読有) 136, 204309-1-9 (2012).
DOI: 10.1063/1.4720503
 - ③ K. Hoshina, H. Hagihara, M. Tsuge, "Double ionization and Coulomb explosion of formic acid dimer induced by intense femtosecond laser pulses", J. Phys. Chem. A (査読有) 116, 862-831 (2012).
DOI: 10.1021/jp2111154
- [学会発表] (計8件)
- ① 城田起郎, 増子亮平, 岡田健, 小池友, 彦坂泰正, 星名賢之助, アミノ酸MALDI信号の正イオン・負イオンによる評価, 日本薬学会 第134年会, 2014.3.27-30 熊本大学
 - ② Tatsuro Shirota, Koichii Soejima, Yasumasa Hikosaka, Kennosuke Hoshina, Development of matrix-assisted laser desorption /ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS) with near-infrared femtosecond laser pulses, The 3rd International Congress on Nature Sciences, 2013.10.12-14 新潟大学
 - ③ 宮武智哉, 小林将文, 城田起郎, 柘植雅士, 星名賢之助, 放電ジェット中生成分子種のフェムト秒レーザーイオン化質量スペクトル, 第7回分子科学討論会 2013.9.24-27, 京都テルサ
 - ④ 宮武智哉, 小林将文, 城田起郎, 柘植雅士, 星名賢之助, 放電分子線中に生成する炭素鎖分子種のフェムト秒レーザーイオン化質量分析, 第61回質量分析総合討論会 2013.9.10-12, つくば国際会議場 エポカルつくば
 - ⑤ 天田まい, 佐藤恵葉, 柘植雅士, 星名賢之助, カルボン酸二量体のフェムト秒レーザー多重イオン化, 第6回分子科学討論会, 2012.9.18-21, 東京大学
 - ⑥ 星名賢之助, 萩原博, 柘植雅士, 水素結合体のフェムト秒レーザー多重イオン化, 日本化学会第92春季年会, 2012.3.25-28, 慶応大学
 - ⑦ 柘植雅士, 八子雄太, 綿貫那美, 星名賢之助, MALDI法におけるアミノ酸レーザー脱離および衝突プロトン化機構の解明, 原子衝突研究会第36回年会 2011.8.17-19 新潟大学
 - ⑧ K. Hoshina, H. Hagihara, M. Tsuge, "Double ionization and Coulomb explosion of formic acid dimer induced by femtosecond laser pulses", 第27回化学反応討論会 2011.6.8-10 東京工業大学

[その他]

ホームページ

<http://www.nupals.ac.jp/labo/ph/bukka/>

6. 研究組織

(1) 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