

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 4月13日現在

機関番号：22604

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056008

研究課題名（和文） 時間分解分光法を用いた非解離イオン化質量分析機構の研究

研究課題名（英文） Spectroscopic study of non-destructive ionization process for mass spectrometry

研究代表者

藤野 竜也 (Fujino Tatsuya)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：20360638

研究成果の概要（和文）：マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）質量分析法は分子量による質量分析を可能にする手法である。試料調整や測定が他のソフトイオン化の手法に比べて簡単である一方、そのイオン化のメカニズムが不明であること、また低分子量試料の分析には適さないなどの問題点も存在する。本研究では分光法を基本に MALDI 法のメカニズム解明を行い、数々の MALDI 法の弱点を克服する新しいイオン化の手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry allows us to know molecular weight of compounds. Although sample preparation and operation of instruments are quite easy compared with other soft ionization methods, there are several drawbacks at the same time. In the study, we investigated desorption and ionization mechanisms by spectroscopic methods, and we developed useful techniques to overcome such drawbacks in MALDI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,400,000	0	13,400,000
2008年度	10,000,000	0	10,000,000
2009年度	3,300,000	0	3,300,000
2010年度	5,800,000	0	5,800,000
2011年度	3,300,000	0	3,300,000
総計	35,800,000	0	35,800,000

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：質量分析法、MALDI法、プロトン移動、時間分解分光

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報が実行された代謝産物を、より高次のプロテオームやトランスクリプトームとともに統合的に解析することにより疾病の原因となるゲノム情報を理解できるのではないかという期待が持たれている。このようなポストゲノム科学においては定性性と分解能において一定の性能を備えている質量分析法が広く用いられており、特にガスや液体クロマト法と電子衝撃イオン化法を組み合わせ

た分離解析法が主流となっている。しかしながら生体機能発現の本来の意味を理解するためにはゲノムの特定だけでは不十分であり、マクロな現象を個々の分子素過程の連環と捉え直す分子科学的翻訳、つまり「高次系分子科学」が本質的課題として残る。申請者はこの課題を解決するための手法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI法）に注目した。MALDI法は試料の分子構造を壊さず「一分子一ピーク」といった分子量

による質量分析を可能にする手法であり、不安定で変質しやすい代謝物質等の網羅的解析を可能とする。また表面にマトリクス分子を展開させた手法 (SALDI法) では、修飾表面上に化学吸着した試料のみをイオン化させる手法であるため、従来困難であった「質量分析による定量」への道を開く方法として期待される。しかしながら分析試料に用いるマトリクス分子の選定は一般に経験則により行われるため、本法の可能性が最大限に活用されているとは言い難く、従って微量かつ貴重な生体試料への応用は困難である場合が多い。

2. 研究の目的

本研究では、これまで不明であった MALDI 法のイオン化・脱離のメカニズムを各種時間分光法及び光励起後の試料の時間変化をマススペクトル上に観測できる時間分解型の質量分析装置を開発することにより明らかにする。また分析対象試料に対し、非解離・高感度・高効率化が可能なマトリクス・修飾 (形状・分子) 表面を、分子科学的な観点から予想し開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イオン化の過程におけるマトリクス分子の解離反応を抑制することを目指し、マトリクス分子をシクロデキストリンに包接させたシクロデキストリン包接マトリクスを作成した。

(2) 酸化物表面からの効率的なプロトン供与を期待し、ゼオライト細孔内に有機マトリクスを吸着させたゼオライトマトリクスを作成した。

(3) ゼオライト表面上のブレンステッド酸性水酸基をアルカリ金属に置換したゼオライトを合成し、その表面上に有機マトリクスを吸着させることにより、プロトン付加を好まない様々な分子への応用を期待し、アルカリ金属置換ゼオライトマトリクスを作成した。

(4) 有機マトリクスの持つ水酸基の位置を変化させることにより、どのような構造を持つ水酸基の位置がマトリクスのイオン化に重要であるかを確かめた。また重水を用いることで吸着水の役割を確かめた。

(5) 時間分解型の質量分析装置を新たに開発し、MALDI 法における脱離過程だけを抽出し観測した。

(6) ゼオライト表面とマトリクス分子の吸着は一義的に決まるため、時間分解分光法により反応ダイナミクスを観測する上で都合がよい。ゼオライトマトリクスを用いて、マトリクス分子の開裂を電子緩和の観点から議論した。

(7) 鎖長の違う芳香族炭化水素 (PAH) 間の励起エネルギー移動を用い、PAH の高効率検出を行った。

(8) イオン化したマトリクスから試料へのプロトン供与過程のダイナミクスを調べるために、試料として指示薬を用い、時間分解過渡吸収により観測した。

(9) (4) の延長として、時間分解型の二次元 IR

-UV-MALDI 測定を行っている。

(10) (5) で得られた知見をもとに、脱離に係る振動モードを励起しながら脱離を観測する測定を行っている。

4. 研究成果

(1) 従来の MALDI 法では低分子量試料の測定が困難であるが、シクロデキストリン包接マトリクスはマトリクス分子の開裂を防ぎ、かつプロトン付加体以外のピークを生じさせないという優れた効果があることが分かった。特に包接度の高い組み合わせでは、マトリクス分子由来のピークをほぼ完全に消すことができることが分かった。また、従来 MALDI 法に特有の、試料-マトリクス複合体の空間不均一性を解消する効果があることが分かった。

(報文 2 報、準備中 1 報)

(2) トリヒドロキシアセトフェノンとモルデナイト型ゼオライトを用い、ゼオライトマトリクスの作成を行った。シクロデキストリンの際の効能に加え、ゼオライト表面からの効率的なプロトン供与が起き、試料ピークが従来法の約 20 倍に増加した。吸着水がプロトン源とする "solvent-assisted-mechanism" を、量子化学計算をもとに提案した。(報文 1 報)

(3) ゼオライトを弱酸の塩とともに反応させることにより、表面を各種のアルカリ金属イオンに置換したゼオライトマトリクスを作成した。これによりアセチルサリチル酸やバルビタールなど、プロトン付加をこのまず、従来 MALDI 法では測定が不可能であった多くの分子の測定に成功した。(準備中 3 報)

(4) ヒドロキシアセトフェノンをもとに、分子内水素結合を形成する水酸基の存在が、マトリクスのイオン化に不可欠であると結論した。既報の文献を参照に、マトリクスの電子励起状態における分子内プロトン移動が契機となり、溶媒からのプロトン引き抜きが起き、プロトン付加体マトリクスの電子基底状態が生成するというメカニズムが示唆された。またナノ秒のポンププローブ法を用いた質量分析を行い、考えたメカニズムが妥当であるという結論を得た。(準備中 1 報)

(5) 脱離過程だけを純粹に抽出する目的で、テトラセン混合アントラセン結晶を試料-マトリクスの複合体と考え、テトラセンイオンの脱離ダイナミクスを、フェムト秒時間分解型質量分析装置を新たに開発し、観測した。テトラセンイオンの脱離時間はドープ量によって変化し、励起後約 100ps 程度の時間の後、脱離が行われることが分かった。脱離は励起されたマトリクスから放出される振動エネルギー冷却が結晶中で起こること、振動エネルギーの伝搬に由来するという結論を得た。(報文 1 報)

(6) シリカ・アルミナ比の異なるゼオライトを用いたゼオライトマトリクスを作成し、マトリクスの電子寿命と質量スペクトル上の

フラグメントとの相関を議論した。シリカ・アルミナ比の小さいゼオライトでは、脱アルミが行われるため、マトリクスの無輻射緩和に用いられるゼオライトのフォノン密度が低下するため、マトリクスの電子緩和寿命が増加し、かつマスペクトル上にフラグメントの増加が観測されることが分かった。(準備中1報)

(7)アントラセンをドナー分子として、ペリレン及びベンゾ a ピレンをアクセプター分子として混合結晶を作成し、アクセプター分子の微量分析を行った。ペリレン及びベンゾ a ピレンの単体をレーザーイオン化で観測した場合には、数十ピコモル以下の物質質量では観測ができなかったのに対し、アントラセン分子からのエネルギー供与を用いた場合には、数フェムトモルの物質質量までレーザーイオン化で観測できることが分かった。従ってレーザー脱離イオン化に比べ、1000 倍程度の高感度分析が可能となった。(準備中1報)

(8)過渡吸収分光法を用いることにより、溶液中では数ピコ秒の時定数にてマトリクスから試料へのプロトン供与が起きていることが分かった。現在、従来 MALDI 法で用いられる固体におけるプロトン移動反応のダイナミクスを研究中である。

(9) (4) で得られた結論を実証するための実験を継続中である。

(10) (5) で得られた結論を実証するための実験を継続中である。

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 10 件)

- ① Y. Minegishi, D. Morimoto, J. Matsumoto, H. Shiromaru, K. Hashimoto, *T. Fujino, “Desorption Dynamics of Tetracene-Doped Anthracene Crystals Studied by Femtosecond Time-Resolved Mass Spectrometry”, J. Phys. Chem. C 116, 3059~3064 (2012). 有
- ② T. Fujita, *T. Fujino, K. Hirabayashi, T. Korenaga, “Mass spectrometry of low-molecular-weight compounds with 2,4,6-trihydroxyacetophenone and 2,4-dihydroxyacetophenone in β -cyclodextrin”, Anal. Sci. 26, 743~748 (2010). 有
- ③ Y. Komori, H. Shima, *T. Fujino, J. N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga, “Pronounced Selectivity in MALDI Mass Spectrometry with 2,4,6-Trihydroxyacetophenone on Zeolite Surface: Intensity Enhancement of Protonated Peptides and

Suppression of Matrix-related Ions”, J. Phys. Chem. C 114, 1593~1600 (2010). 有

- ④ Y. Sato, T. Kodama, H. Shiromaru, J. H. Sanderson, T. Fujino, Y. Wada, T. Wakabayashi, Y. Achiba, “Synthesis of polyyne molecules from Hexane irradiation by intense femtosecond laser pulses”, Carbon 48, 1673~1676 (2010). 有
- ⑤ T. Sakamaki, *T. Fujino, H. Hosoi, T. Tahara, T. Korenaga, “Picosecond Time-resolved Fluorescence Study of Poly Vinyl Methyl Ether Aqueous Solution”, Chem. Phys. Lett., 468, 171~175 (2009). 有
- ⑥ *T. Fujino, K. Hirota, K. Ohta, T. Tahara, “In-cell Viscosity Measurement Using a Fluorescence Up-conversion Microscope”, Chem. Lett., 37, 1240~1241 (2008). 有
- ⑦ Y. Takabayashi, T. Fujino, T. Korenaga, “Characterization of Diffusion and Mixing Process in Microchannels”, Anal. Sci. 24, 1481~1485 (2008). 有
- ⑧ S. Yamaguchi, T. Fujita, *T. Fujino, T. Korenaga, “MALDI Mass Spectrometry with Cyclodextrin-Supported Matrix”, Anal. Sci., 24, 1497~1500 (2008). 有
- ⑨ T. Sakamaki, *T. Fujino, H. Hosoi, T. Tahara, T. Korenaga, “Solvation Structure of Polyacrylamide Fine Particle Surfaces Studied by Picosecond Time-resolved Fluorescence Spectroscopy”, Chem. Lett., 37, 980~981 (2008). 有
- ⑩ D. Nanjo, H. Hosio, *T. Fujino, T. Tahara, and T. Korenaga, “Femtosecond/picosecond Time-resolved Fluorescence Study of Hydrophilic Polymer Fine Particles”, J. Phys. Chem. B, 111, 2759~2764 (2007). 有

[学会発表] (計 8 件)

- ① J. Suzuki, Y. Komori, T. Fujino, H. Shima, J.N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga, “Development of Zeolite Matrix for Soft Ionization”, IUPAC International Congress on Analytical Science 2011 (Kyoto, Japan, May22-26, 2011)
- ② T. Fujino, “Spectroscopic Characterization of Hydrophilic Fine Particles”, BIT’ s 8th Annual

- Congress of International Drug Discovery Science and Technology, Beijing, China, October 24, 2010
- ③ T. Fujino, Y. Komori, H. Shima, J. N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga, “Pronounced Selectivity in MALDI Mass Spectrometry with 2,4,6-trihydroxyacetophenone on zeolite surface”, The 13th Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress, Taipei, Taiwan, October 5-8, 2010
- ④ T. Fujino, Y. Komori, H. Shima, J. N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga, “MALDI mass spectrometry using 2,4,6-trihydroxyacetophenone on zeolite surface enhancement of protonated species of matrix and analyte molecules”, Molecular and Ionic Clusters Conference in 2010, Tokamachi, Niigata, September 5-10, 2010
- ⑤ T. Fujino, Y. Komori, H. Shima, J. N. Kondo, K. Hashimoto, T. Korenaga, “Pronounced Selectivity in MALDI Mass Spectrometry using 2,4,6-trihydroxy acetophenone on zeolite surface”, XIII IUPAC Symposium on Photochemistry, Ferrara, Italy, July 11-16, 2010
- ⑥ T. Fujino, “Spectroscopic Study of non-destructive ionization process for mass spectrometry”, International Symposium on “Molecular Science for Supra Functional System”, Okayama, Tokyo, June 4, 2009
- ⑦ T. Fujino, K. Hirota, K. Ohta, T. Tahara, “In-cell Viscosity Measurements by Femtosecond Fluorescence Up-conversion Microscopy”, Focus On Microscopy 2008, Awaji Osaka, Japan, April 15, 2008
- ⑧ T. Fujino, H. Hosoi, D. Nanjo, T. Tahara, and T. Korenaga, “Ultrafast Solvation Dynamics of Hydrophilic Polymer Fine Particles”, XXIII International Conference on Photochemistry, Köln Germany, August 2, 2007

[図書] (計 2 件)

- ① 伊永隆史、藤野竜也、他 6 名
“生命科学のための分析化学”
化学同人(2011)

- ② T. Fujino, T. Tahara, Ultrafast Fluorescence Microscope Chapter 3 (pp. 51-70) in “*Biochemical applications of nonlinear optical spectroscopy*” ed. Vladislav V. Yakovlev, CRC Press (2009).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：包接マトリックスを用いたMALDI法
発明者：藤野竜也、山口惣大、伊永隆史
権利者：公立大学法人首都大学東京
番号：特開 2009-186298
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤野 竜也 (FUJINO TATSUYA)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：20360638