

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19350045
 研究課題名（和文） ナノ粒子の2次元規則配列表面を利用した新規なレーザー脱離ソフトイオン化法の開発
 研究課題名（英文） Development of Laser desorption/ionization mass spectrometry using 2D ordered nanoparticles on substrates
 研究代表者
 荒川 隆一（ARAKAWA RYUICHI）
 関西大学・化学生命工学部・教授
 研究者番号：00127177

研究成果の概要（和文）：本研究は、近年、ライフサイエンス分野・環境分野において低分子物質分析の重要な地位を築きつつある有機マトリックスを用いない表面支援レーザー脱離イオン化質量分析(SALDI-MS)のための新規な SALDI プレートの開発を目的としている。本研究では、SALDI-MSのためのナノ粒子の2次元規則配列表面をもつLDIプレート（ナノ粒子を含む）として、計4つの新規なプレートを開発した。（1）白金ナノフラワー、（2）ロッド状酸化亜鉛ナノ粒子、（3）尿素表面修飾酸化チタニア粒子、及び（4）スルホン基修飾 FePtCu 磁性ナノ粒子が有効であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using organic matrices is a soft ionization technique that causes very less fragmentation of the analytes. However, matrix ion interface and detector saturation are inevitable in the MALDI-MS analysis of low-mass molecules (<m/z 500), and this makes the characterization of small molecules difficult despite the significance of such characterization. As an approach involving the use of organic-matrix-free LDI-MS for analyzing small molecules in a MALDI instrument, we have investigated a new and facile method for synthesizing two-dimensional (2D) nanoparticles on substrates for the applications of surface-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (SALDI-MS). New types of nanostructured substrates for organic-matrix-free LDI-MS have been found: (1) Platinum nanoflowers, (2) rod-like zinc oxide nanoparticles,, (3) urea-modified titania nanoparticles, and (4) FePtCu magnetic nanoparticles. The feasibility of using these nanomaterials for SALDI-MS has been demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	11,700,000	3,510,000	15,210,000

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：レーザー脱離イオン化質量分析法、ナノ粒子、SALDI-MS、環境分析、バイオ分析

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法(MALDI-MS)は、たんぱく質や合成高分子などの高分子量化合物を測定するための基盤技術として広く利用されている。しかし、MALDI 法では、試料に加えるマトリックスの種類や混合比などの最適な条件を測定ごとに試行錯誤しなければならない。加えて、過剰に加えられた有機マトリックス分子に由来するクラスターイオンが低分子量域に強く観測されるために、分子量が 1000 以下のペプチドや添加剤などの分析が困難となる。

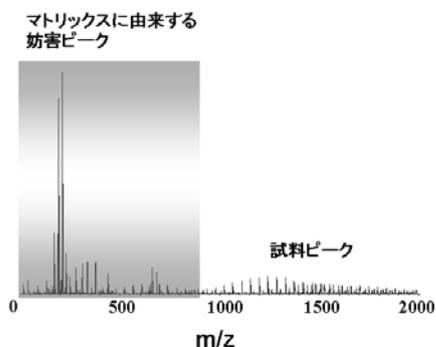


図 MALDI マススペクトルの例

Siuzdak らは、電解エッジングにより作製された数百ナノメートルの細孔構造を持つ多孔質シリコン基板を利用して、マトリックスなしでイオン化をできることを報告した。彼らはこの方法 DIOS(desorption/ionization on silicon)と名づけた。このようなマトリックスを用いない表面支援レーザー脱離イオン化(SALDI)は、低分子量域の妨害イオンが観測されず、MALDI に比べて定量性に優れている。さらに、重要なことはマトリックスを用いないことで、ハイスループット分析が実現できることである。今後、医療・環境分野においてスクリーニング分析の需要が拡大することは目に見えており、それに対応できる唯一の技術として発展することが期待される。

DIOS 法は、いろいろ報告されている SALDI 法の中で最も優れたイオン化法で、分子量 3000 以下の有機化合物が感度よく測定できる。しかし、DIOS 基板の製造コストが高く、保存性が良くない欠点を持つ。Russell らは 5 nm サイズの金ナノ粒子をマトリックス代わりに用いてペプチドのサブスタンス P(MW 1348)のイオン化を報告した(JACS,2005)。しかし、試料調製法、低分子量域の詳細なスペクトル及び MALDI スペクトル

の標準品であるアンジオテンシンのスペクトルが記述されていないのでその評価は限定的であった。また、国内ではイオンビームによるシリコン基盤上に数十から数百ナノメートル間隔でゲルマニウムドットを成長させた表面ナノ構造を利用して、マトリックスなしでイオン化できることが学会発表された。このようにして、研究開始当初、国内外で DIOS を凌ぐ新しい表面構造体や無機ナノ粒子を利用したレーザー脱離イオン化法の開発競争が始まったところであった。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子が 2 次元(2D)配列した凸構造を持つ固体表面上で起こる新規なレーザー脱離ソフトイオン化(2D ナノ粒子イオン化)法を開発し、この 2 次元ナノ粒子イオン化法のバイオ・環境関連分野でのスクリーニング分析への応用することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 自己組織化・自己集積を利用した固体表面 2 次元ナノ粒子の構造制御、(2) 2 次元ナノ粒子構造を利用したソフトイオン化(2D ナノ粒子イオン化法)とそのイオン化過程の解明、及び(3) 2 次元ナノ粒子イオン化法のバイオ・環境関連分野でのスクリーニング分析への応用を計画した。

4. 研究成果

本研究では、SALDI-MS のためのナノ粒子の 2 次元規則配列表面をもつ LDI プレート (ナノ粒子を含む) として、計 4 つの新規なプレートを開発した。(1) 白金ナノフラワー、(2) ロッド状酸化亜鉛ナノ粒子、(3) 尿素表面修飾酸化チタニア粒子、及び (4) スルホン基修飾 FePtCu 磁性ナノ粒子が有効であることを見出した。以下に本研究で開発された主な LDI プレートの特徴を示す。

(1) 白金ナノフラワー

貴金属 Pt、Au、Cu、Ag のナノ粒子よるペプチド angiotensin I の SALDI イオン化を比較したところ、イオン化効率と質量分解能は $Ag < Cu < Au < Pt$ の順に増大した。Pt 金属のバルク融点が 2045 K と最も大きくかつ熱伝導度が最も小さいので、レーザー照射によって極小的に温度が最も高くなる。そのために試料の脱離イオン化が促進されると推定した。そこで、白金の特徴を生かした上に、さらに粒子表面に花びら状の突起をもった白金ナノ粒子(ナノフラワー)を新規に創製し、白金ナノフラワーの SALDI-MS への可能性を検討し

た。その結果、これまで金属ナノ粒子の SALDI-MS において、分子量 10,000 を越える分子のイオン化は困難とされていたにもかかわらず、白金ナノフラワーを利用して分子量 10,000 以上の cytochrome C のソフトイオン化に成功した。さらに angiotensin I, insulin, cytochrome c に対して、それぞれ 0.7, 5, 20 fmol の高感度なイオン化が達成された。

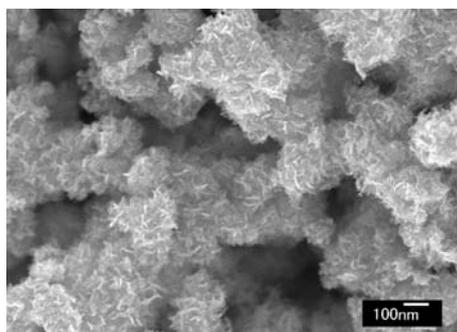


図 白金ナノフラワーの SEM 像

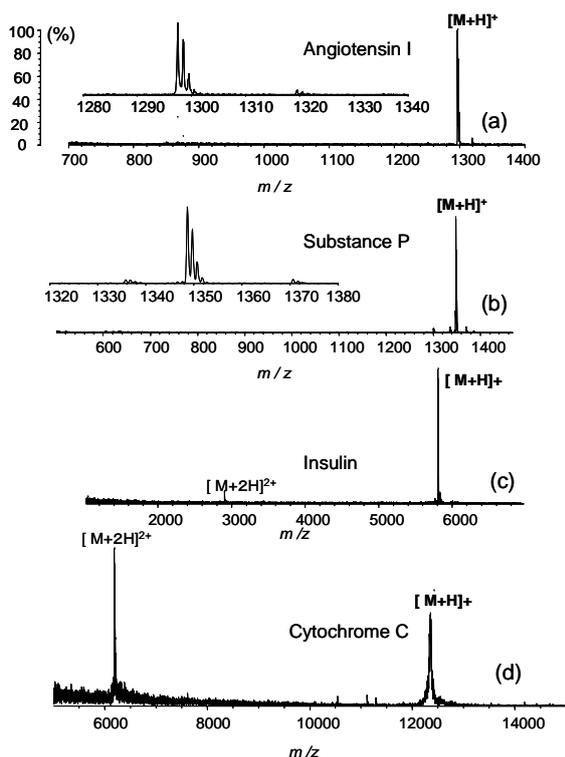


図 白金ナノフラワーを用いたペプチド、及びタンパク質のマススペクトル

(2) ロッド状酸化亜鉛ナノ粒子

貴金属である Pt, Au のナノ粒子を用いた合

成高分子の SALDI-MS では分解イオンが多く検出され、測定が困難であった。これに対し、金属酸化物半導体である ZnO のナノ粒子を利用した SALDI では PMMA, PPG, PEG, PS などの合成高分子に対して分解イオンのないソフトなイオン化法であることを見出した。

(3) 尿素表面修飾酸化チタニア粒子

チタニア粒子を尿素で表面修飾した尿素表面修飾チタニア粒子を SALDI のための LDI プレートに担持することにより、サブフェムトモルオーダーのペプチドの高感度検出、分子量 3 万程度の蛋白質の検出できた。合成高分子、生体高分子、薬物、及び環境有害物質など多くの試料の検出が可能であることを見出した。これにより、従来の SALDI に比べて、多くの試料が測定できるようになり、かつ感度と検出限界分子量ともに著しく向上できた。

(4) スルホン基修飾 FePtCu 磁性ナノ粒子を用いたアフェイ SALDI-MS

生体分子混合溶液の中から特定の試料を分離・抽出・除去する目的で、磁性粒子 (Magnetic Beads) による磁気分離が利用されている。本研究では、標的分子の捕捉・分離とイオン化支援作用を併せ持つ LDI-MS のための新規な磁性無機マトリックスとして鉄・白金・銅からなる複合ナノ粒子 (FePtCu ナノ粒子) を合成した。ここでは、FePtCu ナノ粒子をチオールスルホン酸で表面修飾した FePtCu-SO₃⁻ ナノ粒子を用いて、正電荷を持つオリゴペプチドを静電的に捕捉し、それらを SALDI-MS で直接検出することを試みた。pH 2.5 では、DDDD, GGGG, および GGYR のオリゴペプチドの全てが検出されたが、pH10 では全く検出されなかった。一方、pH 8 では GGYR のみ検出された。これは、DDDD (pI=3.2)、GGGG (pI=6.1)、GGYR (pI=9.4) の等電点 (pI) の違いにより説明される。つまり、pI 以下の pH 2.5 では全てのオリゴペプチドが正電荷を持つことから、負帯電ナノ粒子に捕捉され、SALDI-MS で全て検出される。pI 以上の pH 10 では全てのペプチドが負電荷を持つため、負帯電ナノ粒子に捕捉されず、SALDI-MS では検出できない。一方 pH 8 では、正電荷を持つ GGYR のみが負帯電ナノ粒子に捕捉・抽出され、混合物中から GGYR のみが検出できたものと考えられる。このように、FePtCu ナノ粒子を用いた SALDI では、通常の溶媒抽出などの煩雑な分離操作を行うことなく、粒子表面に吸着した物質を直接、検出できる利点を持つ。

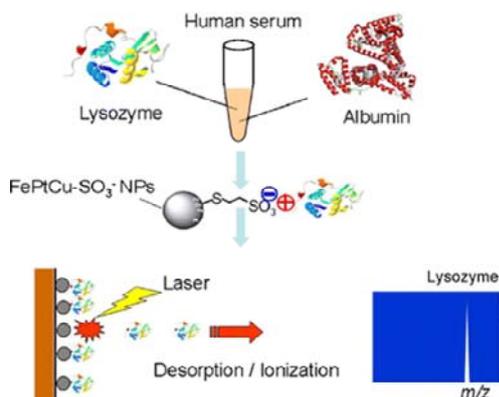


図 スルホン基修飾 FePtCu 磁性ナノ粒子を用いたアフニティ SALDI-MS の概念図

(5) 白金ナノ粒子担持シリコン基板

白金ナノ粒子担持シリコン基板では、レーザー照射によって生じる電子とホールの電荷分離が、SALDI-MSにおけるペプチドのプロトン付加分子の生成を促進するという新規なイオン化メカニズムを提案でき、SALDI-MSでは検出が困難であったプロトン付加分子の生成を促進する方法を見出した。

<研究成果のまとめ>

本研究で開発されたナノ粒子やナノ構造を利用した SALDI 法は、MALDI 法に比べてマトリックス由来のノイズのない良好なスペクトルが得られる特徴をもっている。そして、他のイオン化法に比べ、低分子量化合物を高感度に検出・同定するのに有効である。そのために、医薬、農薬、環境汚染物質などの低分子試料の高感度・微量分析に有効であり、これら有機低分子のスクリーニング分析への応用が期待される。ナノ粒子・ナノ構造表面を利用したレーザー脱離イオン化(SALDI)では、(1) レーザーパルスの照射後に細孔表面に試料が効果的に補給されること(多孔質構造が有効)、(2) "preformed"イオンとその対イオンを分離するためのレーザー場を提供する環境であること(突起形状と表面導電性)、そして(3) レーザー吸収と同様にレーザー放射による効果的な試料の昇華(局所加熱)がおこるためには、熱容量、熱伝導性が小さいことが必要であると思われる。しかし、その SALDI のイオン化機構の解明には至らなかった。SALDI-MS は、マトリックスを用いないという利点以外に、ナノ粒子やナノ構造表面を修飾することによって機能化を図ることが可能であり、試料のイオン化の選択性を向上させるなどの MALDI 法にはない特徴がある。こうした SALDI のためのナノ粒子やナノ構造表面設計では、ナノ粒子・表面のサイズ・形態・配列制御、保護剤の選択、分散制御など多くの事柄が重要であり、今後は、こ

れらを考慮した SALDI のための材料開発が必要である。

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 34 件)

① T. Yao, H. Kawasaki, T. Watanabe, and R. Arakawa, Effectiveness of Platinum Particle Deposition on Silicon Surfaces for Surface Assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Peptides, *Int.J. Mass Spectrom.*, 291,145-151(2010). 査読有り

② H. Kawasaki, T. Akira, T. Watanabe, K. Nozaki, T. Yonezawa, and R. Arakawa, Sulfonate group-modified FePtCu nanoparticles as a selective probe for LDI-MS analysis of oligopeptides from a peptide mixture and human serum proteins, *Anal Bioanal Chem*, 395, 1423-1431(2009). 査読有り

③ H. Kawasaki, N. Takahashi, H. Fujimori, K. Okumura, T. Watanabe, C. Matsumura, S. Takemine, Takeshi Nakano, R. Arakawa, "Functionalized Pyrolytic Highly Oriented Graphite Polymer Film for Surface Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Environmental Analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 23, 3323-3332(2009). 査読有り

④ H. Kawasaki, Y. Shimomae, T. Watanabe, and R. Arakawa, Desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry (DIOS-MS) of perfluorooctane sulfonate (PFOS), *Colloids and Surfaces A*, 347, 220-224(2009). 査読有り

⑤ Y. Niidome, Y. Nakamura, K. Honda, Y. Akiyama, K. Nishioka, H. Kawasaki, N. Nakashima, Characterization of Silver Ion Complexes adsorbed on Gold Nanorods: Surface Analysis by Using Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectroscopy (SALDI-MS), *Chem. Comm.* 1754-1796(2009). 査読有り

⑥ T. Yonezawa, H. Kawasaki, A. Tarui, T. Watanabe, R. Arakawa, T. Shimada, F. Mafune, Detailed Investigation on Possibility of Nanoparticles of Various Metal Elements for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Sci.*, 3, 339- 346(2009). 査読有り

⑦ A. Tarui, H. Kawasaki, T. Taiko, T. Watanabe, T. Yonezawa, and R. Arakawa, Gold-nanoparticle-supported silicon plate with polymer micelles for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides, *J. Nanosci. Nanotech.*, 9, 159-164(2009). 査読有り

⑧ H. Kawasaki, T. Sugitani, T. Watanabe, T.

Yonezawa, H. Moriwaki, R. Arakawa, Layer-by-Layer Self-Assembled Multilayer Films of Gold Nanoparticles for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 80,7524-7533(2008). 査読有り

⑨T. Watanabe, H. Kawasaki, T. Yonezawa and R. Arakawa, Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles, *J. Mass Spectrom.*, 43,1063-1071(2008). 査読有り

⑩H. Kawasaki, T. Yonezawa, T. Watanabe and R. Arakawa, Platinum Nanoflowers for Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biomolecules, *J. Phys. Chem C*, 111, 16278 – 16283(2007). 査読有り

〔学会発表〕(計 62 件)

①川崎英也、高橋尚幸、渡辺健宏、竹峰秀祐、中野武、荒川 隆一、酸化グラファイトシートを利用した表面支援レーザー脱離イオン化質量分析法による有機フッ素化合物の検出、第 70 回分析化学討論会 2009 年 5 月 16 日、和歌山大学。

②奥村晃司、渡辺健宏、川崎英也、荒川隆一、合成高分子分析における酸化物微粒子を用いたSALDI特性、第 13 回高分子分析討論会、2008 年 11 月 26 日、名古屋国際会議場

③川崎英也、樽井章、太鼓卓久真、荒川隆一、交互吸着自己組織化基板を利用したマトリックスフリーレーザー脱離イオン化法の開発、第 55 回質量分析総合討論会、2007 年 5 月 15 日、広島国際会議場。

〔図書〕(計 1 件)

荒川隆一、「金属ナノ・マイクロ粒子の形状・構造制御技術」、シーエムシー出版, p249-262, 2009 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

①名称：MALDI 質量分析測定のためのナノ粒子担持イオン化基板の製造方法とその用途

発明者：米澤 徹, 川崎 英也, 渡辺 健宏, 荒川 隆一

権利者：東京大学、関西大学

種類：特願

番号：2007- 36658

出願年月日：2007 年 2 月 16 日

国内外の別：国内

②名称：質量分析用基板及びその製造方法並びに質量分析法

発明者：川崎 英也, 渡辺 健宏, 荒川 隆一, 溝口 大剛, 室内 聖人, 田村 祐介

権利者：関西大学、(株)大日本塗料

種類：特願

番号：2008-332164

出願年月日：2008 年 12 月 26 日

国内外の別：国内

③名称：試料捕捉合金、質量分析装置、質量分析方法、試料捕捉方法、試料捕捉合金、試料捕捉合金製造方法

発明者：川崎 英也、樽井 彰、渡辺 健宏、荒川 隆一

権利者：関西大学

種類：特願

番号：2009-171507

出願年月日：2009 年 7 月 22 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒川 隆一 (ARAKAWA RYUICHI)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00127177

(2)研究分担者

川崎 英也 (KAWASAKI HIDEYA)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：50322285