

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14889

研究課題名（和文）真空紫外レーザー1光子ソフトイオン化によるMALDI検出感度向上に関する研究

研究課題名（英文）Improvement of detection sensitivity of MALDI by one-photon soft ionization using vacuum-ultraviolet laser light

研究代表者

城田 起郎（SHIROTA, Tatsuro）

新潟薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：20714900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：真空紫外(VUV)光の1光子イオン化特性を利用し、生体由来試料等の質量分析手法として汎用されているMALDI法において生成するプラーム中の大部分を占める中性分子種をソフトイオン化する手法を用いて検出感度の向上を目指した。その結果、Pheの混合比が高く十分な強度のMALDI信号が得られないPhe/DHB混合結晶では、プラーム中の中性分子種由来のMALDI-VUV信号がMALDI信号と比較して高い強度で得られることがわかった。さらに、本手法を用いたプラーム中の中性DHBの内部エネルギー分布測定により、プラーム前方は熱的に非平衡状態であり高い内部エネルギーをもったDHBが多いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いたMALDI-VUV法によりMALDIプラーム中の中性分子種を真空紫外光の1光子イオン化により検出することで、MALDI法では検出できない条件の試料等を検出できる可能性が見出された。また、MALDI法では観測できないプラーム中の中性分子種の伝搬を実時間追跡できることが明らかとなった為、今後、本手法を用いて、MALDIイオン生成メカニズムに関する新たな知見が得られることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The MALDI-MS method is widely used as a mass-spectrometry technique for biological samples. However, most molecules in the MALDI plume remain neutral and undetectable. The purpose of this study is to improve the detection sensitivity using vacuum-ultraviolet (VUV) laser light to produce one-photon ionization of neutral molecular species that occupy most of the plume. Accordingly, it was found that the MALDI-VUV ion signal intensities derived from neutral molecular species in the plume were higher than the MALDI ion signal intensities in phenylalanine/2, 5-dihydroxybenzoic acid (Phe/DHB) mixed crystal that cannot be used to observe MALDI ion signals with sufficient intensity owing to a high Phe mixing ratio. In addition, the internal energy distribution of neutral DHB molecules in the plume was measured using sheet-like VUV laser light, and the tip of the plume was found to contain DHB molecules with high internal energy in non-thermal equilibrium.

研究分野：物理化学

キーワード：MALDI 真空紫外光 ソフトイオン化 飛行時間型質量分析法 質量分析

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 (MALDI-MS) 法は、マトリックス剤と混合結晶化した大質量数の不揮発性分子をソフトイオン化し検出できる質量分析手法であり、これまで生体由来試料などの質量分析手法として、特に生命科学分野に大きく貢献してきた。MALDI 過程は、MALDI 結晶中のマトリックス剤がレーザー照射によって光子を吸収し加熱され、マトリックス分子 (M) とともに試料分子 (A) が脱離・気化され、MALDI プルームと呼ばれる高密度な分子集団を形成し、形成されたプルームの脱離・拡散過程でプロトン化マトリックスから試料へのプロトン移動反応 $[M+H]^+ + A \rightleftharpoons M + [A+H]^+$ が進行し、試料イオン $[A+H]^+$ が生成するという機構が支持されている。一方、この過程において、結晶から脱離したプルーム中の中性分子種 A, M に対する、イオン化された分子種 $[A+H]^+$, $[M+H]^+$ 等の割合は、 $10^{-8} \sim 10^{-3}$ と見積もられており、プルーム中の大部分が中性のまま検出されていないことが報告されている。すなわち、通常の MALDI 法では、高密度な MALDI プルーム内で起きる現象のごく一部を観測しているに過ぎない。仮に、高密度なプルーム内に大量に存在する中性分子種のうち 1 % でも中性分子種がイオン化検出できれば、試料の検出感度は格段に向上する可能性がある。また、プルーム中の中性分子種は通常の MALDI 法では検出できない為、これらをイオン化検出することにより、MALDI イオン生成機構に対する理解が進むことが期待できる。

2. 研究の目的

気相分子の断片化を抑えたイオン化手法としては、真空紫外(VUV)光による 1 光子イオン化が挙げられる。VUV 光の 1 光子あたりのエネルギーは、多くの分子のイオン化ポテンシャル近傍のエネルギーに対応しているため、分子の断片化を抑えた効率の良いイオン化が可能である。この VUV 光による 1 光子ソフトイオン化特性を用いれば、MALDI プルーム中の中性分子種の断片化を抑えたイオン化を実現できる可能性がある。

そこで、本研究では、VUV 光の 1 光子ソフトイオン化特性に着目し、MALDI プルームに VUV 光を照射する手法(MALDI-VUV-MS 法)を確立することで、通常の MALDI 法では検出できないプルーム中の大部分を占める中性分子種をイオン化検出し検出感度を向上させること、また、MALDI イオン生成機構に対する理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) VUV 光発生用チェンバーの製作および MALDI-VUV-MS 装置の製作：

VUV 光発生用チェンバーを製作し、これを既設 MALDI-MS 装置に組み込み、MALDI-VUV-MS 装置を製作した。また、既設の MALDI-MS 装置の試料プレート部は固定式であった為、MALDI 結晶全体をある程度均一に脱離させるため、試料プレートを回転できるように改良した。MALDI イオン化光源には、集光した Nd:YAG レーザー光の第 3 次高調波(355nm)を用い、ポストイオン化光源には、Nd:YAG レーザー光の第 9 次高調波(118nm)を用いた。この VUV レーザー光は、Nd:YAG レーザー光の第 3 次高調波(355nm)の出力を (Xe : Ar = 1 : 9) ガスが充填された VUV 光発生用チェンバー内に集光し非線形光学現象による第 3 次高調波発生を利用して第 9 次高調波である 118nm(10.5eV)の VUV レーザー光を発生させた後、VUV 光発生用チェンバー内に設置した MgF₂ レンズにより、VUV レーザー光と 355nm のレーザー光を分離し用いた。TOF 部は、リニア型、リフレクトロン型の両者で使用できるように設計されているが、本研究では、感度の高い測定を目指すため、リニア型で実験を行った。

(2) シート状ナノ秒レーザー光を用いた MALDI イオンパケットの伝搬追跡：

前項により、MALDI-VUV-MS 装置を製作している間、MALDI 法の検出感度を向上させることを目指す上で、MALDI イオンの時空間分布を把握する必要があるとの判断から、シート状ナノ秒レーザー光を用いて、汎用されているマトリックス剤 CHCA 由来の MALDI イオン (CHCA)H⁺, (CHCA)₂H⁺ の生成・伝搬を追跡した。これらの MALDI イオンは、CHCA 結晶へ入射角 30° で Nd:YAG レーザー光の第 3 次高調波(355nm)(LASER-1)を照射することで生成させた。また、t 秒後に LASER-1 と同期した Nd:YAG レーザー光の第 3 次高調波(355nm)(LASER-2)を幅 1mm のスリットによりシート状(1mm × 7mm)にし、これらの MALDI イオンパケットへ照射した。生成したイオン種は、加速電場により加速され、リニア型 TOF-MS のマイクロチャンネルプレートにより検出された。シート状レーザーの照射位置と試料プレート間の距離 z は、スリット位置を移動させることで、z=0.6-4.6 mm の範囲で条件設定し実験を行った。

(3) VUV 光発生条件の最適化：

MALDI-VUV-TOF 装置のメインチェンバー部に一時的にパルスノズルを設置し、TOF 内に導入したベンゼンの分子線へ VUV 光発生用チェンバーから発生した VUV レーザー光を照射したところ、ベンゼンの断片化を抑えてベンゼンの分子イオン信号を確認することができた。この信号を用いて、VUV 光発生用チェンバー内の (Xe : Ar = 1 : 9) ガスの圧力を調整することで、VUV 光発生条件を最適化した。

(4) VUV レーザー光を用いた MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化検出：

MALDI 結晶への Nd:YAG レーザー照射により結晶から脱離・拡散する MALDI プルーム中の

中性分子種へ VUV レーザー光を照射し中性分子種のイオン化検出を試み、検出感度の向上を目指した。MALDI プルーム中の中性分子種由来のイオン収量を増加させ検出感度を高める為に、VUV レーザー光をコリメートすることで VUV レーザーの照射領域を広くし、かつ、MALDI 混合結晶近傍を VUV レーザー光が通過するよう条件設定した。測定対象には、マトリックス剤 CHCA の他、DHB、SA のみの結晶と、アミノ酸 Phe と DHB の混合比 $[Phe]_0/[DHB]_0$ が 1, 0.1 の混合結晶を用いた。

(5) シート状 VUV レーザー光を用いた MALDI プルーム中の中性 DHB の伝搬追跡と内部エネルギー分布測定：

VUV 光発生用チェンバーから発生した 118nm の VUV レーザー光をコリメートし、TOF 内に設置した幅 1 mm のスリットを通過させることで、シート形状の VUV レーザー光を MALDI プルーム中に照射した。シート状 VUV レーザー光の中央部と MALDI 結晶間の距離 z は、3mm に設定し、MALDI レーザー(355nm)とシート状 VUV レーザー光の遅延時間 t は、0~25 μ s に設定した。測定対象には、DHB 結晶を用い、 t の変化に伴う MALDI プルーム中の中性 DHB 由来の MALDI-VUV イオン信号である DHB^+ と $(DHB-H_2O)^+$ の信号強度比の変化から、MALDI プルーム中の中性 DHB の内部エネルギー分布を測定した。

4. 研究成果

(1) シート状ナノ秒紫外レーザー光を用いた MALDI イオンパケットの伝搬追跡：

MALDI 過程によりマトリックス剤 CHCA 結晶から生成した MALDI イオン、 $(CHCA)H^+$ 、 $(CHCA)_2H^+$ に、ポストレーザーとしてシート状の UV レーザー (355nm) を照射したところ、これらのイオンがフラグメンテーションを引き起こし、観測された TOF 上のスペクトル形状が一部欠損する現象が確認された。このスペクトル形状が一部欠損するという現象は、LASER-1 照射から t 秒後に、試料プレートからの距離 z の位置にこれらの MALDI イオンが存在していることを示している。すなわち、この現象を用いれば、MALDI イオン $(CHCA)H^+$ 、 $(CHCA)_2H^+$ の伝搬を実時間追跡できることがわかる。図 1, 2 は、 z を 0.6-1.6, 1.6-2.6, 2.6-3.6, 3.6-4.6 mm に固定し、各 z に対して t を 0~500 ns の範囲に設定し、TOF-MS の加速電場を +4.5kV に印加し測定した $(CHCA)H^+$ 、 $(CHCA)_2H^+$ の MALDI-TOF スペクトルである。図中の青色の矢印は、スペクトル形状が欠損した中央の位置を示している。 $(CHCA)H^+$ スペクトルは、 $z=0.6-1.6$ mm において、 $t=100-200$ ns の際に欠損が生じた。これは、 $(CHCA)H^+$ のイオンパケットが、 $z=0.6-1.6$ mm の領域を $t=100-200$ ns の間に通過したことを示している。また、 $t=200-300$ ns の間に $(CHCA)H^+$ のイオンパケットが $z=3.6-4.6$ mm の領域を通過していたことから、 $(CHCA)H^+$ のイオンパケットが、 $z=0.6-4.6$ mm の領域を LASER-1 照射後、約 200ns ほどで通過していることがわかった。一方、 $(CHCA)_2H^+$ スペクトルは、 $z=0.6-1.6$ mm において、 $t=100-300$ ns の際に欠損が生じており、 $(CHCA)_2H^+$ のイオンパケットがこの領域を通過するのに要する時間が、 $(CHCA)H^+$ のイオンパケットと比較して約 100ns ほど多かった。これにより、 $(CHCA)_2H^+$ は、 $(CHCA)H^+$ と比較して質量数が大きい為、イオンパケットの伝搬速度が遅くなっている様子が、本手法を用いることで観測できていることがわかる。

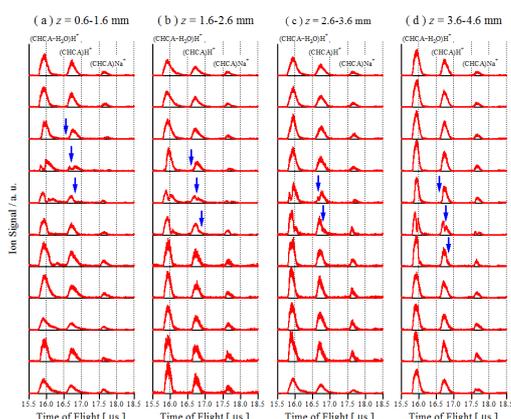


図 1：各 z における t の変化に伴う $(CHCA)H^+$ の MALDI-TOF スペクトル形状

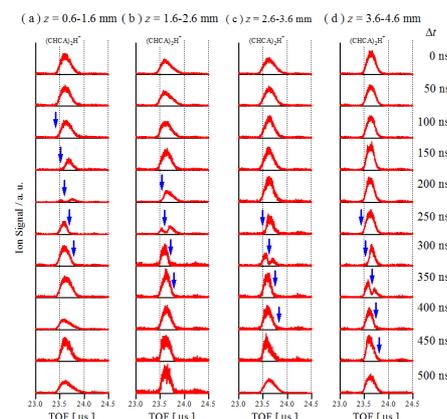


図 2：各 z における t の変化に伴う $(CHCA)_2H^+$ の MALDI-TOF スペクトル形状

図 3(a), (b) は、加速電場を +3.5, +4.5, +5.5 kV に印加した場合において、 $(CHCA)H^+$ および $(CHCA)_2H^+$ イオンパケットの中央部の欠損が観測される (t , z) をプロットしたものである。また、 t における z は、以下の式で表される。

$$z = v_0(\Delta t - t_E) + \frac{eE}{2m}(\Delta t - t_E)^2 \dots$$

ここで、 t_E は LASER-1 を照射してから MALDI イオンパケットの中央部が脱離する時間、 v_0 はイオンの初速度、 m は質量、 E は加速電場である。

式に基づくシミュレーションにより実験結果を再現すると、(CHCA)H⁺は、 $v_0 = 500$ m/s、 $t_E = 45$ ns とした場合に、(CHCA)₂H⁺は、 $v_0 = 500$ m/s、 $t_E = 65$ ns とした場合に、図 3(a), (b) の実線で示すように、3 パターンの加速電場の観測結果をおおよそ再現することができた。これにより、MALDI イオンパケットの中央部が生成し気相に放出される時間 t_E は、加速電場の影響をほとんど受けないことが明らかとなった。この結果は、MALDI イオンの生成と気相への放出過程は、熱的な過程が支配的であることを示している。

(2) VUV レーザー光を用いた MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化検出：

項目(1)により製作した MALDI-VUV-MS 装置を用いて、汎用されている3つのマトリックス剤 (CHCA, DHB, SA) への紫外レーザー照射により生成した MALDI プルームへ VUV 光を照射したところ、全てのマトリックス剤において、中性分子種が断片化せずにイオン化された信号 (CHCA⁺, DHB⁺, SA⁺) が観測された。これらのマトリックス剤のうち、DHB のみが親イオン DHB⁺ 信号に加え、このイオンの脱水反応により生成したフラグメントイオン (DHB-H₂O)⁺ 信号が検出された。また、図 4(a) に示すように、通常の MALDI 法では Phe の混合比が高く MALDI イオン信号が十分に観測できない条件である混合比 [Phe]₀/[DHB]₀ = 1 の Phe/DHB 混合結晶から生成したプルームへ VUV レーザー光を照射したところ、プルーム中の中性 DHB 由来信号である DHB⁺, (DHB-H₂O)⁺ 信号に加え、中性 Phe 由来の親イオン信号である Phe⁺ とそのフラグメントイオン (Phe-COOH)⁺, Phe の側鎖 R⁺, (Phe-R)⁺ などの信号が MALDI 信号よりも高い強度で観測できた。一方、図 4(b) に示すように、これよりも Phe の混合比率を少なくし作製した [Phe]₀/[DHB]₀ = 0.1 の Phe/DHB 混合結晶では、[Phe]₀/[DHB]₀ = 1 の Phe/DHB 混合結晶と同様にプルーム中の中性 DHB 由来信号である DHB⁺, (DHB-H₂O)⁺ 信号は、MALDI 信号より高い強度で観測できたが、中性 Phe 由来信号である Phe⁺ 信号強度は、[Phe]₀/[DHB]₀ = 1 の Phe/DHB 混合結晶の場合と比較すると著しく低下し、MALDI 信号より高い信号強度が得られなかった。この原因としては、[Phe]₀/[DHB]₀ = 0.1 の混合結晶は、[Phe]₀/[DHB]₀ = 1 の混合結晶と比較して、VUV レーザー光の照射領域に存在する中性 DHB の割合が多い為、中性 DHB が VUV 光を吸収する確率が高くなり、相対的に中性 Phe に VUV 光が照射されにくいこと等が挙げられるが、これについては、今後引き続き調査する予定である。

(3) シート状 VUV レーザー光を用いた MALDI プルーム中の中性 DHB の伝搬追跡と内部エネルギー分布測定：

MALDI-VUV 法は、MALDI プルーム中の中性分子種をイオン化検出する手法としてのみならず、VUV レーザー光をシート形状にすることで、MALDI プルーム中のマトリックス剤や試料の中性分子種の伝搬を実時間追跡する手法として用いることができる上、特に、マトリックス剤 DHB については、プルーム中の中性 DHB の内部エネルギー分布測定手法としても用いる

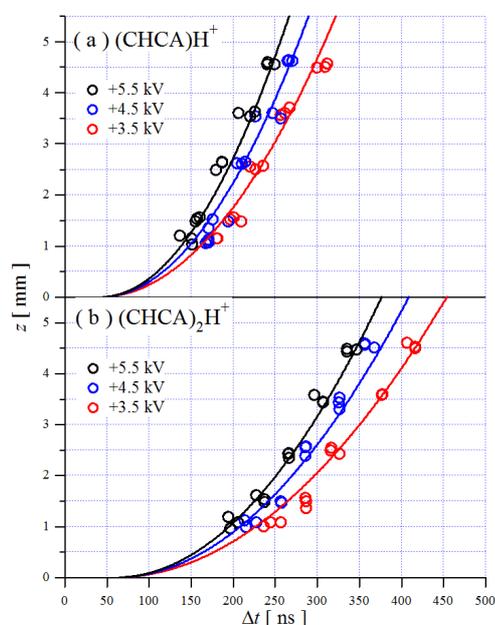


図 3：加速電圧+3.5, +4.5, +5.5kV における MALDI イオンパケットの中心で欠落信号が観測された (Δt , z) のプロット (a) (CHCA)H⁺, (b) (CHCA)₂H⁺

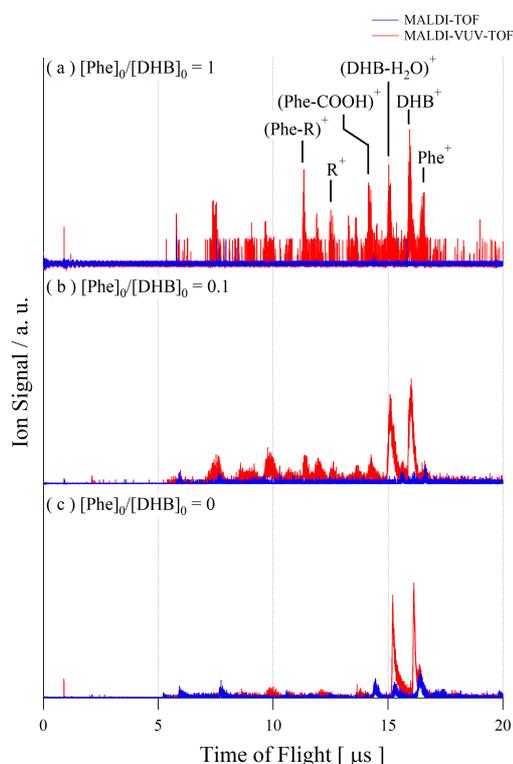


図 4：Phe/DHB 混合結晶における MALDI-TOF スペクトルと MALDI-VUV-TOF スペクトルの比較

ことができる。

図 5(a) に、MALDI レーザーと VUV レーザー間の遅延時間 t の変化に伴うシート状 VUV レーザー光の照射により観測された MALDI プルーム中の中性 DHB 由来の MALDI-VUV 信号である DHB^+ と $(\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+$ の信号強度比を示す。これらの信号強度比 $(\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+/\text{DHB}^+$ は、 t が短くなるにしたがい増加傾向を示し、 t が長くなるにしたがって一定値に収束するよう減少している。この信号強度比の変化は、MALDI プルーム中の中性 DHB における内部エネルギーの違いを反映しており、内部エネルギーが高いほど、解離性イオン化（脱水反応）が進行し $(\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+$ の収率が増加していると考えられる。したがって、プルーム先端に近いほどプルーム後方と比較して高い内部エネルギーをもった中性 DHB が多く存在することがわかった。これは、MALDI プルーム先端の分子は、後方の分子からの衝突により内部エネルギーを与えられるが、周囲の分子との衝突頻度が少ないまま孤立状態となる一方で、後方の分子は、周囲の分子と衝突しながら、内部エネルギーが周囲の分子と共有され低下し、結果として、プルーム先端の平均的な内部エネルギーが後方よりも相対的に高くなったものと解釈できる。すなわち、プルーム後方は前方と比較し周囲の分子との衝突頻度が高い為、ほぼ熱平衡状態に到達している領域である一方で、プルーム前方は、周囲の分子との衝突頻度が後方と比較し少ない為、熱的には非平衡状態であり高い内部エネルギーをもった中性 DHB を含む領域であることが明らかとなった。さらに、図 5(b)より、プルーム中の中性 DHB の量が最も多いのは、 $t=4.5 \mu\text{s}$ 付近に $z=3\text{mm}$ (MALDI 結晶から TOF 軸方向に 2.5-3.5 mm) の空間に存在するものであったが、この時点では、既に中性 DHB の内部エネルギーは収束値に近い値まで減少していること、そして、高い内部エネルギーをもったプルーム先端の中性 DHB の量は比較的少ないことが明らかとなった。

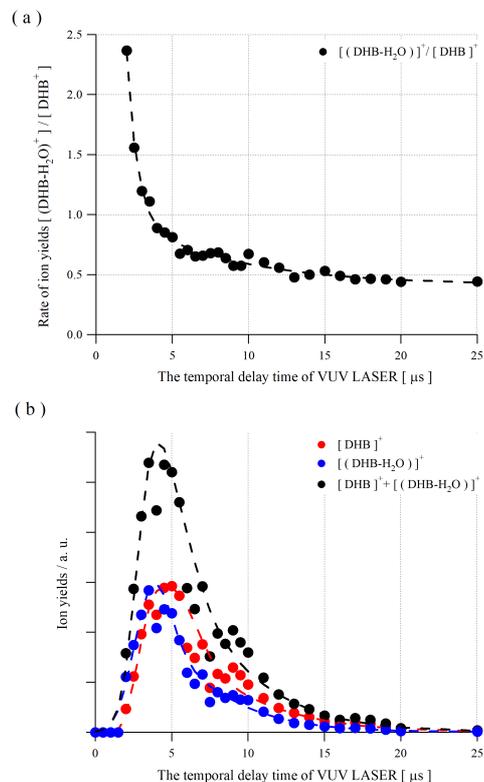


図 5 レーザー間の遅延時間 t 変化に伴う各 MALDI-VUV イオン信号強度及び強度比変化 (a) $(\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+/\text{DHB}^+$ (b) DHB^+ (赤)、 $(\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+$ (青)、 $\text{DHB}^+ + (\text{DHB}-\text{H}_2\text{O})^+$ (黒)

以上、研究成果 (1) ~ (3) に記述したように、本研究では、真空紫外光の 1 光子イオン化特性を利用した MALDI-VUV-MS 法により、汎用されているマトリックス剤 (CHCA, DHB, SA) や Phe の混合比が高い Phe/DHB 混合結晶から生成した MALDI プルーム中の中性分子種をソフトイオン化することで、MALDI 法を超える検出感度で、これらの MALDI-VUV 信号を観測することができた。また、本研究では、シート状紫外レーザー光を用いて MALDI プルーム中のイオンの伝搬を、MALDI-VUV-MS 法を用いて通常の MALDI 法では観測できないプルームの大部分を占める中性分子種の伝搬を、実時間追跡できることが明らかとなった為、今後、これらの手法を用いることで、MALDI イオン生成メカニズムに関して新たな知見が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shirota Tatsuro, Hoshina Kennosuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Generation and Propagation of MALDI Ion Packets Probed by Sheet-Like Nanosecond UV Laser Light	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 A0071 ~ A0071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspectrometry.A0071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1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 UVポストレーザー光解離によるMALDIイオン信号変化に基づくイオンパケットの生成・伝搬追跡
3. 学会等名 第66回質量分析総合討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城田起郎, 横沢沙紀, 川島千花, 森山高宏, 星名賢之助
2. 発表標題 シート状ナノ秒紫外レーザー光によるMALDIイオンパケットの生成・伝搬追跡
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城田起郎, 星名賢之助
2. 発表標題 真空紫外レーザーポストイオン化を用いたMALDIブルーム中の中性分子種の伝搬追跡
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五十嵐崇, 高橋亜衣, 田邊恵里香, 庭山寛子, 森田紘平, 城田起郎, 星名賢之助
2. 発表標題 MALDI初期過程におけるイオンペア生成と消滅: 遅延引き出しによるスペクトル変化からの考察
3. 学会等名 第44回原子衝突学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城田起郎, 森山高宏, 星名賢之助
2. 発表標題 MALDI過程により脱離・拡散される中性分子種の検出: VUVレーザーイオン化による時空間分布の可視化
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城田起郎, 森山高宏, 星名賢之助
2. 発表標題 MALDI法により脱離・拡散する中性分子種の真空紫外レーザーイオン化検出
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟薬科大学 薬学部 薬品物理化学研究室ホームページ
<https://bukkabu.com/bukka/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----