

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05138

研究課題名(和文) タンデム質量分析における異性化フラグメンテーション経路の検証

研究課題名(英文) Collision-induced isomerization in tandem mass spectrometry

研究代表者

中村 健道 (Nakamura, Takemichi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別嘱託研究員

研究者番号：10360611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：衝突誘起解離(CID)タンデム質量分析(MS/MS)は、ソフトイオン化された有機分子の構造解析や異性体識別に汎用される。しかし、スペクトルから得られる構造情報は、断片化に先立つ異性化によって劣化する恐れがある。CIDに競合する異性化プロセスである衝突誘起異性化(CII)を、エネルギー分解タンデム質量分析(ER-MS/MS)、イオン移動度分析タンデム質量分析(IMS/MS/MS)、および計算化学の手法を用い探求した。ER-IMS/MS/MS実験により、異性化イオン存在比が衝突励起の度合いに依存して変化することが観測され、衝突エネルギー依存的CII過程の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた知見である、微量有機分子のタンデム質量分析において汎用されるCIDの条件下で前駆イオンの骨格転位を伴う異性化が起こりうる、という事実は、マススペクトルデータを用いて構造解析を試みようとする有機化学者にとって「不都合な真実」である。しかし、衝突エネルギー依存的な骨格転位の頻度や前駆イオン構造要素との関係性が解明されていくことにより既存手法の限界が明確化する同時に、構造解析や異性体識別の可否などを適切に評価することが可能となり、分析の信頼性向上と新たな解析法開発の指針へと繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Fragmentation in collision-induced dissociation (CID) tandem mass spectrometry is widely used for structural characterization beyond the molecular formula assignment of soft-ionized analytes including isomeric small molecules. However, it turned out the spectral information may be degraded due to isomerization prior to the fragmentation. Collision-induced isomerization (CII), the isomerization process associated with CID was studied by using energy-resolved tandem mass spectrometry (ER-MS/MS), ion mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (IMS/MS/MS), and computational chemistry. CII does occur in an energy dependent manner as ER-IMS/MS/MS experiments showed that relative abundance of the isomeric ion structures depends on the degree of collisional excitation prior to the mobility separation.

研究分野：mass spectrometry

キーワード：tandem mass spectrometry fragmentation pathway isomerization ion structure ion mobility collisional excitation energetics

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。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 質量分析は様々な応用分野で有機化合物の分析に用いられており、高分解能装置の発展により分子式の帰属まではルーチン化され自動化も進んでいる。その一方で、プロテオミクスやリポミクス等の特定分野を除くと、分子式決定後のさらなる定性、すなわち異性体の識別や同定、未知物質の構造解析等においては、期待されるほどの有用性を必ずしも発揮できていない。例えば、メタボロミクスの分野では、検出されるが同定できない "dark matter" (da Silva, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 112, 12549 (2015)) と呼ばれる多数のピークの存在が問題となっている。

(2) エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 等ソフトイオン化を用いた質量分析で有機分子の構造情報を取得する際は、意図的にイオンの解離を誘起したタンデム質量分析 (MS/MS) によりフラグメントイオンを観測する。その際最も広く用いられる手法は衝突活性化解離 (CID) である。CID はほとんどの装置に実装可能であり多くの有機化合物に対し適用されているが、得られるスペクトルの解釈は必ずしも容易ではない。その背景に、低分子有機化合物のタンデム質量分析において解釈困難なフラグメントイオンがしばしば観測される、という問題がある。

(3) 構造式に対応する「計算スペクトル」データベースを構築し解析に利用する試みは、フラグメンテーション経路が詳細に調べられているペプチドや一連の同族体からなる複合脂質等を除くと成功しているとは言い難い。背後には、計算スペクトル構築の前提となっている既存のフラグメンテーション規則研究において看過されてきた問題が潜んでいる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、「なぜ CID スペクトルには化合物の構造から解釈が困難なフラグメントイオンがしばしば出現するのか？」という点にある。測定原理に基づく考察から、有機イオンの衝突活性化に際し、CID によるフラグメントイオン生成に先行して転位反応による異性体イオンの生成が広く起こりうる、という仮説を立て、検証を試みる。

(2) 研究の目的は、MS/MS データに基づく有機化合物同定と構造解析の信頼性を適切に評価し、様々な応用分野で確信を持って解析結果を利用できるようにするための学問的基盤を構築することにある。CID に付随して様々な転位反応による異性化が起こりうるという仮説を CID の実験条件を踏まえながら検証、事例に基づき異性化の前提となる構造要素の関係等を調べていく。

## 3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS 等で現在最も一般的に用いられている低エネルギー CID の実験条件における異性化について検討する必要がある。低エネルギー CID の条件では多重衝突の過程でプロトン付加分子などの前駆イオンはマイクロ秒以上の時間をかけ徐々に内部エネルギーを獲得、振動励起状態を経て結合開裂、解離に至る。その過程に並行して生じうる異性体イオンは転位反応の生成物である。転位反応では結合開裂に要するエネルギーの一部が結合生成によって相殺されるためエネルギー障壁は比較的小さい。このことを踏まえ、エネルギー分解タンデム質量分析 (ER-MS/MS) 法を用い、CID によるフラグメントイオン生成閾値の前後の事象を検討する。

(2) 異性体イオンは、最終的な解離、即ちフラグメントイオン生成に至る反応チャンネルのエネルギー障壁より低いエネルギー障壁を経由して起こりうる転位反応を経て生成する (Fig. 1)。前駆体の衝突活性化により進行しうる反応のエネルギー障壁を計算化学により評価し、解離チャンネルより低い活性化エネルギーで生成しうる中間体をモデリングすることにより、衝突誘起異性化 (CII) の生成物の候補構造を見出す。

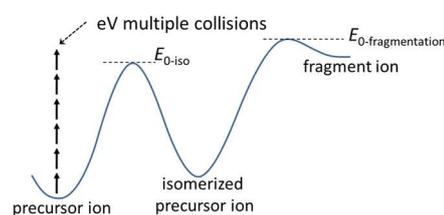


Fig. 1

(3) 異性体の関係にある有機イオンはイオン移動度分析 (IMS) によって互いに分離可能な場合がある。衝突活性化後のイオンを IMS にかけることで CII 生成物を検出可能な場合がある。より具体的には、低エネルギー CID のための衝突セルの後段にイオン移動度分析部を装備したタンデム質量分析計である Synapt G2 及び Cyclic IMS を用いて、ER-IMS/MS/MS 分析を行う。ER-IMS/MS/MS 実験においては、四重極分析部で質量分離された前駆イオンに対し衝突エネルギーを段階的に上げながら衝突活性化を行い、最終的な CID 生成物が生じる前、もしくは生じる前後の衝突エネルギーにおける前駆イオンの移動度スペクトルの変化を調べることで CII 生成物を検出する。

## 4. 研究成果

(1) 低エネルギーCID条件下で進行可能な断片化反応経路がごく限られているような小さな分子ではMS/MSによるフラグメンテーションパターンもごく単純なものとなり、結果としてMS/MSスペクトルのみからは異性体の識別は不可能である。例えば、クマル酸のオルト異性体とパラ異性体の  $[M-H]^-$  イオンは低エネルギーCIDスペクトルにおいて共通の  $[M-H-CO_2]^-$  のみを与え、スペクトルパターンに基づく両者の識別は不可能である (Fig. 2a)。しかし、異性体の関係にある両者の  $[M-H]^-$  イオンは異なる反応経路を経て  $CO_2$  を脱離するので、ER-MS/MS実験により断片化のエネルギー要求性を調べることで識別可能である (Fig. 2b)。

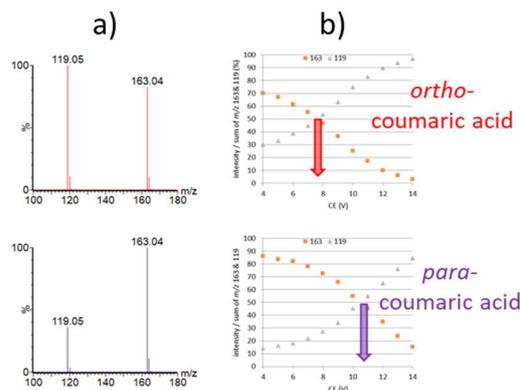


Fig. 2

計算化学を用いてモデリングしたところ、パラ異性体の断片化においてはフェノレート陰イオンから  $CO_2$  脱離に至る過程で  $[M-H]^-$  が異性化した中間体を経由していることが示唆された (Fig. 3)。異性化プロセスを含む断片化メカニズムはER-MS/MS実験によって示されたオルト体とパラ体のエネルギー要求性の違いを説明可能であった。すなわち、一見単純に見える中性種脱離の過程においても、隠れた異性化反応が介在している可能性に留意する必要がある。

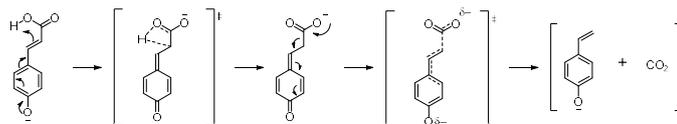


Fig. 3

(2) シアノバクテリアが産生する環状ペプチドであるアナバエノペプチン類においてCIIの観測に成功した。大環状構造からのフラグメントイオン生成には、必然的に環状構造内の2つの位置での結合切断が必要となる。このため、大環状化合物のCIDの過程では、前駆イオンの異性化体として1箇所切断され2番目の位置は切断されずに残っている開環体イオンが中間体として生成する (Fig. 4)。アナバエノペプチンA (AP-A) と B (AP-B) は5つのアミノ酸残基からなる大環状構造を共有するが、ウレイド結合を介して環外位置に結合したアミノ酸残基が異なる。AP-Aは環外アミノ酸残基としてTyrを、AP-BはArgを持つ。また、AP-Bは、Arg残基のグアニジノ基を加水分解することによりCit-AP-Bに変換できる。それぞれのプロトン化分子  $[M+H]^+$  を前駆イオンとしたCIDスペクトルを比較すると、AP-Bでは他と大きく異なり、大環状構造部分の開裂が認められず環外部分の開裂のみが観測された (Fig. 5)。また、AP-BのCIDには、他の類縁体に比べて有意に大きなエネルギーを要した (Fig. 6)。これらの違いは、モバイルプロトンの有無により説明できる。即ち、AP-Bでは前駆イオンの電荷がプロトン化したグアニジノ基に固定されるのに対し、AP-A, Cit-AP-Bでは衝突活性化によりプロトンが大環状構造内のペプチド結合周辺に移動することで環部分での開裂を誘起、開環構造を有する中間体を経て2段階目の開裂により大環状構造部分に起因するフラグメントイオンを与えたものと理解できる (Fig. 7)。この中間体は衝突活性化の過程で異性化した前駆イオンであり、イオン移動度分析により分離観測が可能であった。即ち、AP-B及びCit-AP-Bの衝突活性化後の  $[M+H]^+$  に対する移動度スペクトルには、衝突エネルギーに依存して複数のピークが出現した。一方、環状部分の開裂を示さないAP-Bの移動度スペクトルには衝突エネルギーに関わらず単一ピークしか観測されず、前駆イオンの異性化は認められなかった。以上より、アナバエノペプチン類において、モバイルプロトンが関与したCIIが起こりうることを示された。

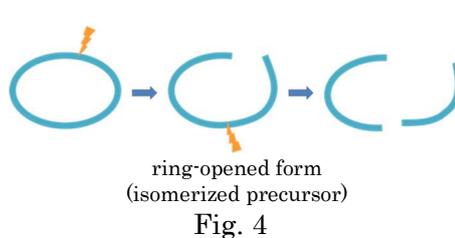


Fig. 4

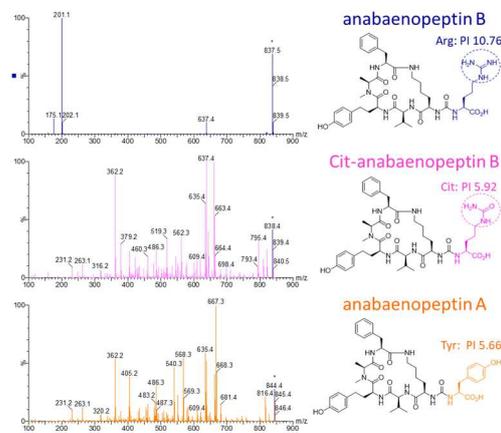


Fig. 5

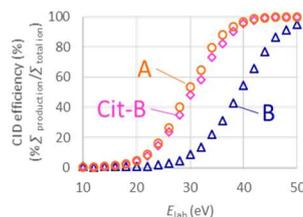


Fig. 6

Fig. 7: Energy diagrams illustrating the fragmentation pathways for Cit-B and A. The left diagram shows the direct channel for Cit-B and A, where the proton is mobile and migration leads to an isomerized  $[M+H]^+$  ion. The right diagram shows the direct channel for B, where the proton is not mobile and fragmentation occurs directly.

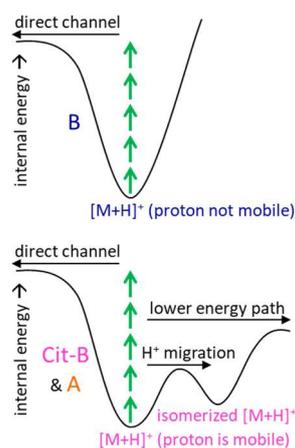


Fig. 7

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 1件）

1. 著者名 Oikawa Hideaki, Mizunoue Yusuke, Nakamura Takemichi, Fukushi Eri, Yulu Jiang, Ozaki Taro, Minami Atsushi	4. 巻 86
2. 論文標題 Structure and biosynthesis of the ribosomal lipopeptide antibiotic albopeptins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 717 ~ 723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac039	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 Nakamura Takemichi, Hongo Yayoi, Harada Ken-ichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Mobilize a Proton to Transform the Collision-Induced Dissociation Spectral Pattern of a Cyclic Peptide	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 A0144 ~ A0144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5702/massspectrometry.A0144	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takemichi Nakamura, Toshihiko Nogawa
2. 発表標題 Why do we fail structural analysis of organic compounds based on spectral appearance? Reflections on a few natural products' cases
3. 学会等名 71st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (国際学会)
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
---------	---------