

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15242

研究課題名(和文)マトリックスクラスターの脱溶媒和促進によるMALDI検出感度向上に関する研究

研究課題名(英文)Improvement of MALDI detection sensitivity by promoting desolvation of matrix clusters

研究代表者

城田 起郎 (SHIROTA, Tatsuro)

新潟薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20714900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

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)法は生体分子等のソフトイオン化手法として汎用されているが、結晶からレーザー脱離したブルーム内の分子種のうち99%以上が中性のまま検出されていない。この原因の一つに、ブルーム内のマトリックスクラスター(Mn)内部に存在するイオンが脱溶媒和前に近傍の対イオンと再結合し中性化すること等が挙げられている。本研究では、ポストレーザーイオン化によりブルーム中のMnの寄与の調査を行ったほか、レーザー照射により相爆発したDHB結晶から脱離・拡散するブルーム中の中性DHB分子の内部エネルギーや分子種の分布には空間的な偏りがあること等が実験的に明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MALDI法は、生体分子等のソフトイオン化手法として広く用いられているが、MALDIイオン生成機構については全てが解明されているわけではない。本研究で得られた知見は、MALDIイオン生成機構の特に初期過程の解明に寄与するものであるが、仮に今後MALDIイオン生成機構の全貌について解明できれば、MALDI法におけるイオン生成効率を向上させることができる可能性があり、試料検出感度の向上に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) is used as a soft ionization method such as for biomolecules, however, more than 99% of the molecular species in the laser desorbed plume from the crystal remain neutral and undetected. One reason for this is that the ions in the matrix cluster (Mn) in the plume recombine with nearby counterions to form neutral molecules before desolvation. In this study, the contribution of Mn in the plume was investigated by post-laser ionization. It was also experimentally clarified that there are spatial biases in the internal energy and molecular species distribution of neutral DHB molecules in the plume, which desorb and diffuse from the DHB crystal due to laser-induced phase explosion.

研究分野：物理化学

キーワード：MALDI 脱溶媒和 マトリックスクラスター 質量分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 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、試料(A)をエネルギー緩衝材であるマトリックス剤(M)と混合結晶化させ、紫外レーザーを照射することにより、試料(A)をプロトン化試料  $[A+H]^+$  として非破壊的に気化・イオン化できる手法であり、生体由来試料の高感度な質量同定手法として広く用いられている。一方で、MALDI法は、開発されてから現在に至るまでイオン生成機構が完全に解明されないまま、新しいマトリックス剤の開発や試料調製方法の工夫により経験的に適用範囲を拡大してきた経緯があり、現在用いられている手法では、MALDI法の潜在能力のごく一部しか引き出せていない可能性がある。それでも、先行研究により、MALDI法で検出される  $[A+H]^+$  は、レーザー照射により生成したプロトン化マトリックス剤  $[M+H]^+$  から中性試料へのプロトン移動反応  $[M+H]^+ + A \rightleftharpoons M + [A+H]^+$  により生成される過程が主過程であることが広く支持されている。しかしながら、この過程は、紫外レーザー照射により、結晶状態から気相への急激な相転移などの光物理過程を伴い進行する為複雑であり、MALDIイオン生成メカニズムの全貌が完全に解明されていない1つの原因となっている。また、先行研究により、MALDI結晶からレーザー脱離したブルーム内分子種のうち99%以上が中性のまま検出されていないことが分かっているが、この原因の一つとして、ブルーム内のマトリックスクラスター(Mn)内部に存在するイオンが脱溶媒和する前に近傍の対イオンと再結合し中性化することなどが挙げられている。すなわち、Mnの脱溶媒和を効率よく促進させることができれば、孤立分子の  $[A+H]^+$  を多く検出できる可能性があるほか、真空紫外 (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為、このVUV光を用いれば、近傍の対イオンにより中性化した試料や、イオン化されずそのまま脱溶媒和した試料を壊さずにイオン化することができ、試料の検出感度をより向上させることができる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、Mn内部に存在するイオンの脱溶媒和に最適な波長のレーザー光をMnへ照射し脱溶媒和を促進させ、さらにMn内部で中性化した試料等を真空紫外 (VUV) 光照射でソフトイオン化することで、従来のMALDI法を超える試料検出感度の向上を目指すと共に、MALDIイオン生成機構におけるMnの寄与等について検証することを目的とする。また、MALDIイオン生成機構を理解した上でMALDI検出感度の向上に取り組むには、MALDIブルーム中に含まれるあらゆる情報を引き出す必要がある為、主にポストレーザーイオン化手法によりMALDIブルーム内の分子種を調査することで、未だ全貌が完全に解明されていないMALDIイオン生成機構に関する情報を見出すことも目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) MALDI-IR-MS法、MALDI-IR-VUV-MS法による実験スキームの構築

MALDI法におけるMnの脱溶媒和の促進によるプロトン化試料イオン信号の増強を目指すと同時に、MALDIイオン生成におけるMnの寄与を調査する為、MALDI-IR-MS法、及び、MALDI-IR-VUV-MS法による実験スキームの構築を行った。

まず、MALDI-IR-MS法による実験スキームは、既設の独自製作のリフレクトロン型MALDI-TOF-MS装置を活かして構築した。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) の出力を用い、試料に対して30°の角度でTOF内のMALDI結晶にレーザー照射した。また、ポストイオン化光源として用いる赤外(IR)レーザー光には、Nd:YAGレーザーの基本光 (1064nm)、又は、OPOレーザーを用いた。OPOレーザーは、MALDIイオン化光源とは別のNd:YAGレーザーの第3次高調波 (355nm) の出力を用いてOPOレーザーの出力を行った。また、IRレーザー光は、集光し、又は、集光せずにMALDI結晶をのせた試料プレートに対して水平に照射し、表面近傍を通過するよう調整した。実験は、MALDIイオン化光源として用いるNd:YAGレーザーとポストイオン化光源として用いるIRレーザーを同期し、レーザー間の遅延時間を0~1µsの範囲に設定し測定を行った。また、OPOレーザーの波長は、800~2500nmの範囲に設定し用いた。なお、TOF内に設置したMALDI結晶をのせた試料プレートは、MALDI結晶全体をある程度均一に脱離させる為、試料プレートを回転させながらMALDIイオン化レーザーを照射し測定を行った。また、MALDI結晶は、マトリックス剤として-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid (CHCA)を用いて、超純水:アセトニトリル=1:1の溶液で溶解し濃度50µmol/mlに調製し、試料としてはアンジオテンシンIIを用いて、超純水で濃度5µmol/mlに調製し、これらの溶液をdried-droplet法により試料プレート上に滴下し結晶化させたものを用いた。

次に、MALDI-IR-VUV-MS法による実験スキームは、MALDI-IR-MS法の実験スキームに独自製作したVUVレーザー光発生用チェンバーをMALDI-TOF-MS装置に設置し構築した。この

VUV レーザーには、MALDI イオン化光源と OPO レーザーの出力用に用いたものとは別の Nd:YAG レーザーの第 3 次高調波 (355nm) の出力を Xe と Ar が 1 : 9 で充填された VUV レーザー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) のレーザー光を発生させ用いた。(1) と同様に、この実験スキームに利用した 3 つの Nd:YAG レーザーは同期させ、MALDI イオン化レーザーと IR レーザー間の遅延時間を 0~1 $\mu$ s の範囲に、IR レーザーと VUV レーザー間の遅延時間を 0~1 $\mu$ s の範囲に設定し測定を行った。

#### (2) 近赤外フェムト秒レーザーを用いた MALDI 測定

(1) の実験では、ポストイオン化レーザーとして IR レーザーを使用した。この実験では、(1) の実験の補足として、MALDI イオン化レーザーとして近赤外フェムト秒レーザー(800nm) を使用し得られたスペクトルと、通常ナノ秒レーザーを使用する MALDI 法で得られるスペクトルとの比較検討を行った。

#### (3) 紫外レーザーポストイオン化法による MALDI プルーム中の中性分子種のイオン化検出

MALDI 結晶へのレーザー照射により生成する MALDI プルーム中の分子には、特に相爆発に関するあらゆる情報が含まれていると推測される。本研究の目標の一つである MALDI 法を用いた試料検出感度の向上を達成する上で、これらの情報、特にマトリックス剤に関する様々なパラメーターを把握することは極めて重要である。このような観点から、既設の MALDI-TOF-MS 装置を用いて、MALDI 法で汎用されているマトリックス剤 2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHB) 結晶へ集光した Nd:YAG レーザー光の第 3 次高調波 (355nm) を照射し生成したプラームに、試料から 6mm 離れた位置にポストレーザーイオン化 (PI) 光源として、シート状の Nd:YAG レーザー光の第 4 次高調波 (266nm) を TOF 軸方向のみ集光することで、MALDI プルーム内の中性 DHB 分子について調査した。なお、これらの 2 つのレーザーは同期し、遅延時間を 0~25 $\mu$ s の範囲に設定し測定を行った。なお、試料として用いた DHB は、DHB を超純水で溶解し、濃度 50 $\mu$ mol/ml に調製し、dried-droplet 法により試料プレート上に滴下し結晶化させたものを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 赤外レーザー光による Mn 内部の試料イオンの脱溶媒和促進と VUV 光 1 光子イオンによる Mn 内部の中性試料のイオン化検出の検証

まず、MALDI-IR-MS 法で使用する IR レーザーとして Nd:YAG レーザーの基本光 (1064nm) を用いて、試料表面に対して集光せずに水平に照射することで、IR レーザーが試料表面近傍を通過するよう設定し、同期した MALDI イオン化レーザーと IR レーザーの遅延時間を 0~1 $\mu$ s の範囲に設定し測定を行ったが、設定遅延時間内では、Mn の脱溶媒和が促進すると信号が増強すると予想されたプロトン化試料イオン信号が増強する遅延時間が見つからなかった。また、IR レーザーを集光して用いても同様の結果であった。次に、Mn の脱溶媒和により最適な波長を設定し照射する為、Nd:YAG レーザーを OPO レーザーに代え、OPO レーザーの波長を 800~2500 nm の範囲に設定し、かつ、レーザー間の遅延時間を 0~1 $\mu$ s の範囲に設定し様々な組み合わせで実験を行ったが、現時点では、プロトン化試料イオン信号が増強する実験条件が確認できていない。これについては、通常の MALDI 法では Mn 内部に含まれ検出できない試料イオンの量が少ないが、Mn 内部に含まれる中性試料の脱溶媒和は促進している可能性があった為、Mn から脱溶媒和した中性試料を VUV レーザー光(118nm)によりイオン化検出する手法 MALDI-IR-VUV-MS 法を用いて、この可能性についても検証した。仮に VUV レーザー光で Mn から脱溶媒和した中性試料をイオン化できた場合、試料イオンが検出されることが予想されるが、同期した MALDI レーザー、IR レーザー、VUV レーザー間の遅延時間をそれぞれ 0~1 $\mu$ s の範囲に設定し、本手法でも様々な組み合わせで実験を行ったが、やはり、現時点では、IR レーザー照射によるプロトン化試料イオン信号や VUV レーザー照射による試料イオン信号が増強される実験条件が確認できていない。これは、調査した各レーザー照射タイミングが最適な条件ではない可能性も残されているが、その他の可能性として、MALDI レーザー照射後に発生する Mn 内に含まれる試料イオン量が極めて少ない可能性や、Mn の存在領域が試料表面から極めて近傍の領域に限られており Mn の多くに IR レーザーが照射できていないことなどが示唆された。これらについては、今後も継続して調査する予定である。

### (2) 近赤外フェムト秒レーザーを用いた MALDI 法と通常の MALDI 法により得られたスペクトルの比較検討

アンジオテンシン II/CHCA 混合結晶にナノ秒レーザーである Nd:YAG レーザーを照射すると、プロトン化 CHCA イオン信号や、プロトン化アンジオテンシン II イオン信号などの MALDI 信号が観測された。一方で、同じ条件で作製したアンジオテンシン II/CHCA 混合結晶にフェムト秒レーザーを照射すると、低質量側に極めて多くのフラグメントが観測された。また、試料プレートの材質由来のイオン信号も観測されており、フェムト秒レーザーで MALDI 法を行う場合には、これについての対策も検討しなければならないことが分かった。よって、試料のソフトイオン化手法として MALDI 法を用いる場合は、やはりナノ秒レーザーを用いることが適切であると

考えられた。一方で、このフェムト秒レーザーをMALDIイオン化レーザーとして用いた実験で、試料プレートの材質であるステンレス由来のものと思われる信号が観測されていたことから、このステンレス由来の信号を確認する為、試料プレートにMALDI結晶をのせずに、試料プレート表面にフェムト秒レーザーを照射し確認したところ、 $H^+$ 、 $H_2^+$ 、 $H_3^+$ などのイオン信号が観測された。特に $H_3^+$ のイオン信号は、ナノ秒レーザーでは極めて強い強度で照射しても観測されなかった為、フェムト秒レーザー特有の現象であることが分かった。また、この観測された水素の由来については、ステンレス表面に吸着している水素又はステンレス内部に溶存している水素であることが考えられた。一方、これまで、 $H_3^+$ の生成過程には、水素プラズマ中での生成過程や有機分子へのフェムト秒レーザー照射による生成過程が知られていたが、ステンレス表面に吸着している水素やステンレス内部に溶存している水素にフェムト秒レーザーを照射することにより $H_3^+$ が生成する過程はこれまで知られておらず、今回の実験で明らかとなったステンレス表面にフェムト秒レーザーを照射すると $H_3^+$ が生成される過程は、 $H_3^+$ の新たな生成過程であることが分かった。この研究成果については、今後論文を投稿する予定である。

### (3) 紫外レーザーポストイオン化法によるMALDI法における相爆発過程の検証

マトリックス剤DHB結晶へ集光したNd:YAGレーザー光の第3次高調波(355nm)を照射し生成したMALDIブルームに、MALDIイオン化レーザーと同期したシート状のNd:YAGレーザー光の第4次高調波(266nm)をTOF軸方向のみ集光し測定したところ、MALDI-PI-TOFスペクトル上には、主に、 $DHB^+$ 、 $[DHB-H_2O]^+$ 、 $[DHB-CO_2]^+$ などのイオン信号が検出された(図1)。

この $[DHB-H_2O]^+$ はDHBの解離性イオン化により生成するイオンであり、 $R_1 = [DHB-H_2O]^+ / DHB^+$ 比は、MALDIブルーム中の中性DHB分子の内部エネルギーに指標となる。一方、 $[DHB-CO_2]^+$ はDHBの熱分解により生成するイオンであり、 $R_2 = [DHB-CO_2]^+ / DHB^+$ 比は、MALDIブルーム中の中性DHB分子の熱分解の指標となる。次に、同期した各レーザー間の遅延時間を0~25 $\mu s$ の範囲で変化をさせ得られたMALDI-PI-TOFスペクトルの $DHB^+$ 、 $[DHB-H_2O]^+$ 、 $[DHB-CO_2]^+$ イオン信号強度から、 $R_1$ 比と $R_2$ 比を求め、遅延時間から求めた速度をプロットしたものが図2である。図2の速度が速い領域はMALDIブルームの前方、速度の遅い領域はMALDIブルームの後方に位置すると解することが出来る。これにより、ブルーム前方では、 $R_1$ 比が高くなる一方で $R_2$ 比は低くなる傾向があり、ブルーム後方では、 $R_1$ 比は低くなる一方で $R_2$ 比が高くなる傾向があり、ブルームの前方と後方で、 $R_1$ 比と $R_2$ 比は逆の相関を示すことが分かった。すなわち、これは、ブルーム前方の中性DHBには、内部エネルギーの高いDHBが多く含まれている一方で、ブルーム後方では、中性DHBの熱分解の割合が高くなることを示している。したがって、これらの結果から、ブルームの前方では、DHB結晶がレーザー照射により相爆発し生成したブルームの脱離・拡散過程で分子間の衝突によるエネルギー緩和が十分に進行しないまま気相に放出された高励起状態の中性DHB分子の割合が多いこと、ブルーム後方では、高励起状態の中性DHB分子の衝突緩和が進み、熱的平衡状態になるべく昇温し、DHB分子の熱分解が進行した、ということが分かった。以上により、本実験から、レーザー照射により相爆発したDHB結晶から脱離・拡散するブルーム中の中性DHBの内部エネルギーや分子種の分布には空間的な偏りがあることが明らかとなり、MALDIイオン生成の初期過程を解釈する上で新たな知見を得ることができた。なお、これらの研究成果については、International Journal of Mass Spectrometry誌に論文が掲載された。[T.Shirota, K.Hoshina, *Int. J. Mass spectrom.*, **490** (2023) 117086]

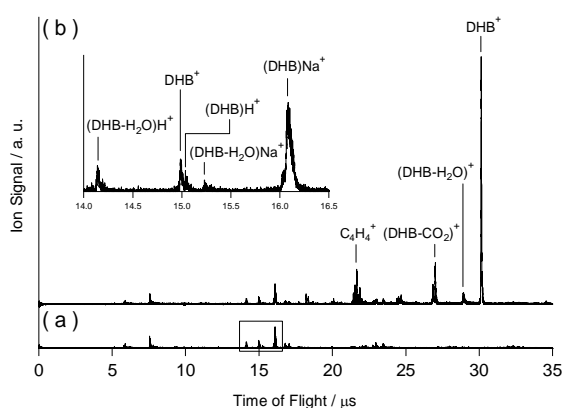


図1 : (a) DHBのMALDI-TOFスペクトル  
(b) DHBのMALDI-PI-TOFスペクトル

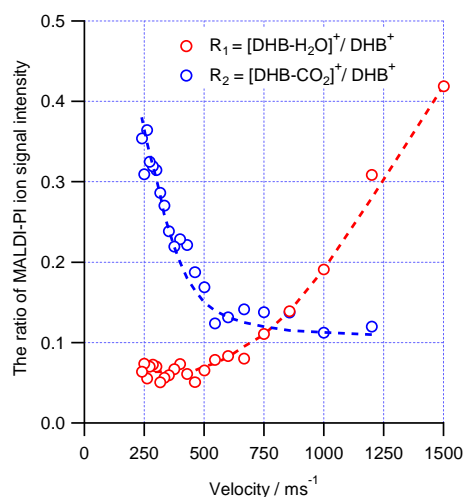


図2 :  $R_1$ 比、 $R_2$ 比と速度分布の関係

以上の研究成果により、本研究では、主にポストレーザーイオン化手法により MALDI プルーム中のマトリックスクラスターや中性分子の内部エネルギー、熱分解に関する知見を得ることができた。今回得られた知見は、MALDI イオン生成機構の全貌を解明する上で重要な知見であり、今後 MALDI 法における試料検出感度の向上に取り組む上で貢献する可能性がある。

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 0件）

1. 著者名 Shirota Tatsuro, Hoshina Kennosuke	4. 巻 490
2. 論文標題 Ionization detection of neutral 2,5-dihydroxy benzoic acid molecules in the matrix-assisted laser desorption/ionization plume by ultraviolet laser post-ionization: Correlation between internal energy distribution and thermal decomposition rate	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 117086 ~ 117086
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijms.2023.117086	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0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 MALDI機構における相爆発過程の検証：紫外レーザーポストイオン化によるアプローチ
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城田起郎、星名賢之助
2. 発表標題 紫外レーザーポストイオン化法を用いたMALDI法における相爆発過程の検証
3. 学会等名 第70回質量分析総合討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城田起郎、小林 将文、星名賢之助、山内 薫
2. 発表標題 フェムト秒レーザー照射によるステンレス表面からの水素分子イオン生成
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 城田起郎、星名賢之助
2. 発表標題 MALDI結晶のレーザー過加熱と相爆発の検証：レーザーポストイオン化によるアプローチ
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 将文、城田 起郎、柘植 雅士、星名 賢之助
2. 発表標題 MALDI法における定量性に関する研究：アミノ酸を用いた新たな熱平衡モデルの提案
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 城田 起郎、小林 将文、星名 賢之助、山内 薫
2. 発表標題 フェムト秒レーザーによる金属アブレーションに伴う水素分子イオンの生成
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林将文、城田起郎、柘植雅士、星名賢之助
2. 発表標題 MALDI法における凝縮相中プロトン移動反応モデルの検討
3. 学会等名 第71回質量分析総合討論会
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
---------	---------