

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22550090
 研究課題名（和文） 閾値エネルギー解離質量分析法を用いた低分子有機化合物同定法の開発
 研究課題名（英文） Characterization of small organic molecules with threshold-energy dissociation mass spectrometry
 研究代表者
 中村 健道（NAKAMURA TAKEMICHI）
 独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チーム・専任研究員
 研究者番号：10360611

研究成果の概要（和文）：

閾値エネルギー解離質量分析法の測定原理を四重極型を含む各種タンデム質量分析計に応用、種々化合物のフラグメンテーション挙動と閾値エネルギー測定法を検証し、異性体を含む低分子有機化合物の同定法として幅広く展開していくための基盤を構築した。活性化に伴うイオンの異性化と異性体イオンの生成に着目、本法にイオン移動度分析を融合させ、フラグメンテーションネットワーク解析を含む解析法へ発展させる端緒を掴んだ。

研究成果の概要（英文）：

The basic concept and framework of threshold-energy dissociation mass spectrometry have been applied to various tandem mass spectrometers including quadrupole-type instruments. Analysis of fragmentation behavior of some organic molecules and threshold-energies allowed us to establish the basis for the exploitation of the method for identification of small molecules including isomers. An integrated analytical strategy including threshold dissociation and ion mobility tandem mass spectrometry was shown to be promising for characterization of isomeric ions and fragmentation networks.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 0 | 0 | 0 |
| 2009年度 | 0 | 0 | 0 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計 | 2,800,000 | 840,000 | 3,640,000 |

研究分野：化学・オミクス計測科学・質量分析学化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：閾値エネルギー解離、タンデム質量分析法、環状ペプチド化合物、構造解析、モバイルプロトン、イオン移動度分析、エネルギー分解質量分析、異性体識別

1. 研究開始当初の背景

質量分析法の応用分野は生命科学の様々

な領域へと大きく広がり続けている。プロテオミクス分野においては、タンパク質を消化ペプチドレベルで分析、アミノ酸配列データ

ベースとの比較によりタンパク質を同定する一方で同位体標識化合物を用いて定量する手法が確立し、目覚ましい成果があがっている。その一方で、メタボローム解析等、非プロテオミクス分野においては、対象となる「低分子有機化合物の同定」に一般法がないという極めて基本的な問題において暗礁に乗り上げているのが現状である。この問題の解決に向け、閾値エネルギー解離質量分析法の利用を提案してきており、これまでに、イオントラップ質量分析計内でのゆっくりとしたイオン活性化用いた閾値エネルギー解離質量分析法の基本原理を確立してきた。

2. 研究の目的

閾値エネルギー解離質量分析法を改良・発展させることで、種々異性体を含む低分子有機化合物、生体分子の微量、迅速同定に資する解析法とデータベース構築への展開を図る。閾値エネルギー解離質量分析法により、化合物固有の物性値としてとらえうる

i) 最小閾値エネルギー解離反応の生成物の質量（組成）

ii) 最小閾値エネルギー解離反応の閾値エネルギー値

を測定するための方法論を確立、物性値として化合物同定に用いるべく測定精度を高めていく。i), ii) と分子質量（組成）を含む低分子有機化合物同定のためのデータベースを構築しそれを用いた低分子有機化合物同定を可能としていくため、普遍性の高いデータの取得および取り扱い方法の確立が必要である。その前提として、閾値エネルギー解離質量分析法に用いる各種質量分析装置での低分子有機化合物の閾値エネルギー解離反応の特性についても明らかにしていく。

3. 研究の方法

閾値エネルギー解離質量分析法を用いた低分子有機化合物の定性法を一般化していくため、イオントラップ方式の質量分析計のみならず、最も広く普及・汎用されている四重極型分析部を含む透過型タンデム質量分析装置を用いた際のフラグメンテーション挙動、特性を把握し、最小閾値反応を検出するための普遍性の高いデータ取得、ならびに取り扱い方法を確立する必要がある。そのため、イオントラップ型装置に加え、エレクトロスプレイイオン源を装着した透過型タンデム質量分析装置を用い、モデルとなる種々低分子有機化合物のフラグメンテーション挙動を調べるのと同時に、最小閾値エネルギー解離反応の検出・解析法を改良していく。さらに、分子モデリングとイオン移動度分析を用いたイオン構造推定を行い、個々の最小閾値エネルギー解離反応の機構についても

検証を試みる。

4. 研究成果

(1) 閾値エネルギー解離質量分析法による低分子有機化合物のフラグメンテーション挙動

質量分析法による解析や同定対象となりうる幅広い低分子有機化合物の中でも最も重要なグループの一つとして、天然有機化合物、代謝物等の生体関連物質が挙げられる。そこで、同じく生体関連物質ではあるが、既に方法論が確立している直鎖ペプチド配列解析の場合と比較しつつ、検討を進めた。図1に、通常直鎖ペプチドのエレクトロスプレイ法によるイオン化と、閾値エネルギー解離質量分析法によるフラグメンテーションを模式的に示した。

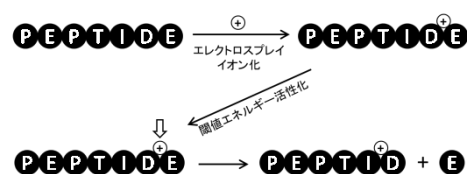
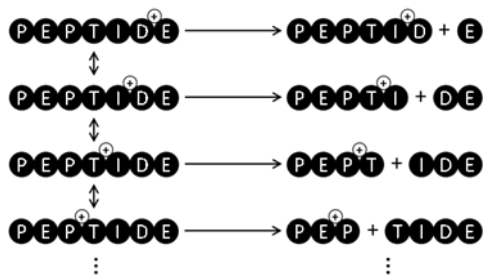


図1 直鎖ペプチドのイオン化とフラグメンテーション

エレクトロスプレイ法により、まず電荷キャリア（例えばプロトン）が付加することによって直鎖ペプチド分子“PEPTIDE”がイオン化する。生成したイオンを閾値エネルギー法で活性化することにより、最小閾値反応経路を経た開裂生成物を優先的に観測することができる。一般に、イオン化（例えばプロトン付加）によって電荷位置近傍の結合が弱められるので、最小閾値反応として、電荷位置近傍における開裂がしばしば観測される。通常、プロトン付加はエネルギー的に最も有利な位置に起こると考えられるが、直鎖ペプチドは側鎖のみが異なるα-アミノ酸がペプチド結合で規則的につながった比較的「均質」な分子構造（有機化合物全般との比較において）を有するため、分子中の複数個所が（プロトン付加に関して）ほぼ同等の性質を示すことも珍しくない。このため、エレクトロスプレイ法によって生成したプロトン付加分子は、比較的低い活性化状態（最小閾値反応による開裂に必要なとされるエネルギーより低い活性化状態）を経て、相互に構造変換しうる（モバイルプロトンモデル）。相互変換するプロトン付加分子それぞれから、ほとんど同一の閾値エネルギーのフラグメンテーション経路を経てプロダクトイオンが生成するため、閾値エネルギー解離法を用いたタンデム質量分析においても直鎖ペプチド配列解析が可能である（図2）。

図2 モバイルプロトン機構による



プロトン付加分子の相互変換とペプチド配列イオンの生成

一方、一般の低分子有機化合物は直鎖ペプチドのような「単純かつ均質」な構造的な特徴を持たないので、閾値エネルギー解離質量分析法における挙動については、異なった視点からの検討が必要となる。一例として、微生物代謝産物等の中にしばしば見出される環状構造ペプチド化合物について考察する。環状ペプチド化合物は様々な生理活性物質を有するものが数多く見出されており、直鎖ペプチドとは異なり酵素消化を受けにくい安定な構造を有することも多いため、医薬等の資源としての期待も大きい。その一方で、大環状構造に加え、しばしば異常アミノ酸を含む、といった構造的特徴は、酵素消化抵抗性や生理活性とも密接な関係を持つ一方で、その構造解析や同定を困難なものとしている。環状ペプチドの同定においては、ルーチン化されている直鎖ペプチドの同定とは全く異なった取り扱いが必要になり、その構造解析は質量分析法にとって古くて新しい問題である。図3に、環状ペプチド“CYCLEA”のエレクトロスプレイイオン化とフラグメンテーション挙動を、模式的に示す。

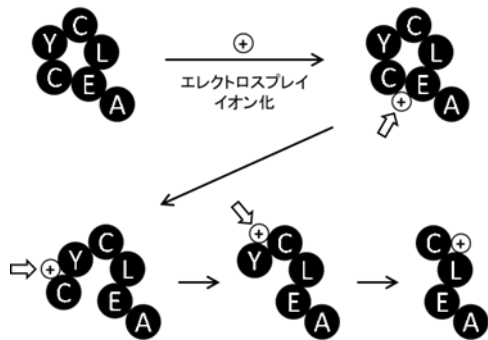
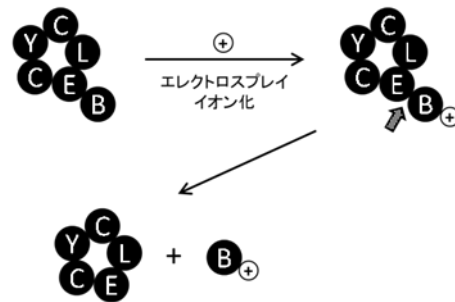


図3 環状ペプチド化合物のイオン化とフラグメンテーション

環状ペプチド化合物は、鎖状ペプチド同様、プロトン付加分子としてイオン化される。分子内にプロトンを持固に保持する官能基がない場合、プロトン付加によって弱められたペプチド結合まわりでの開裂がおり、配列情報を与えるフラグメントイオンが生成する。一方、ペプチド結合に比較してプロトン親和力の非常に大きな部分構造（例えば塩基

性の強いグアニジル基）を持つ場合、プロトンはその位置に固定され、配列情報を与えるフラグメントイオンは生成しない（図4）。

図4 環状ペプチド（塩基性残基Bを含む）



のイオン化とフラグメンテーション

環状ペプチド化合物において強い塩基性を持つ残基の有無でフラグメンテーション挙動に大きな差が生じることは、一般の鎖状ペプチドで知られていた Arg 残基の有無やイオンの価数によりフラグメンテーション挙動が大きく変化する現象と対比可能であり、モバイルプロトンモデルによって説明できることがわかった。また、環外側鎖に強い塩基性を持つ残基を含むような化合物（“CYCLEB”）の構造解析に際しては、2価プロトン化分子を前駆イオンとすることによって2個目のプロトンがモバイルプロトンとなって環状構造部分の開裂を促進するため、後述のごとく低エネルギー条件においても効率よく断片化できることを見出した。

(2) 透過型タンデム質量分析計を用いた閾値エネルギー反応の検出・測定

モバイルプロトンが関与する系ではフラグメンテーションの閾値エネルギーが低くなることは一般の直鎖ペプチドの場合によく知られていたが、より広範な低分子有機化合物に関してもモバイルプロトンの考え方が拡張可能なことを見出した。環状ペプチド“CYCLEA”と“CYCLEB”の1価及び2価プロトン付加分子の解離反応のエネルギープロファイルを、透過型アナライザーを用いたエネルギー分解タンデム質量分析によって調べた例を、図5に模式的に示した。

前述のごとく、モバイルプロトンがともに存在する2価イオンについては、CYCLEA, CYCLEB いずれの場合においても最小閾値エネルギーは10 eV未満（実験室系衝突エネルギー）の小さな値となり、ブレークダウンカーブは塩基性残基の有無に関わらずほぼ重なった。このことは、ペプチドの配列解析という側面にのみ注目した場合、環状ペプチド化合物の場合においても、直鎖ペプチドと同様に多価イオンのMS/MS解析が有用なことを示している。一方、多くの低分子有機化合物

においては唯一の観測対象となる1価イオンについて見てみると、2価イオンの場合と対照的に、塩基性残基の有無によりブレイクダウンカーブは明確に分離する。即ち、塩基性残基を含まない CYCLEA の1価イオン（モバイルプロトン有し）ではブレイクダウンカーブが 8 eV 前後から立ち上がるのに対し、側鎖に強塩基残基を持つ CYCLEB の1価イオン（モバイルプロトン無し）では 15 eV 前後からとなる。この分離により、CYCLEA と“CYCLEB”の構造的特徴（性質の違い）を明確に示される。

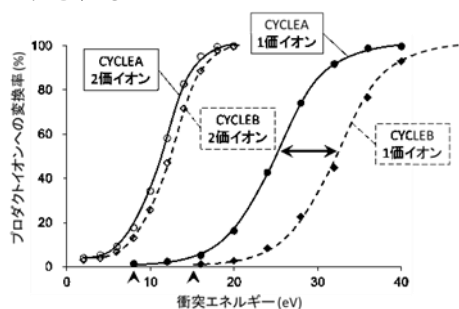


図5 環状ペプチド“CYCLEA”, “CYCLEB”の閾値解離反応エネルギープロファイル

さらに、図5から、閾値エネルギーの測定法に際してブレイクダウンカーブが利用できることがわかる。すなわち、最小閾値エネルギーの測定はブレイクダウンカーブの立ち上がり点を求めることに相当するが、透過型のタンデム質量分析装置を用いた測定では、立ち上がり部分の微小なプロダクトイオンシグナル（図5の横軸直下の2箇所の矢尻の位置に相当）を求めることはしばしば困難を伴う。そのような場合においても、ブレイクダウンカーブの中間点での分離（図中に左右を向いた両矢印で示した）を利用すれば、閾値エネルギーを相対値として感度よく求められることがわかった。

(3) イオン源における反応と異性化の検出

閾値エネルギー解離法においては、低分子有機化合物のイオン化に際して基底状態近傍のイオンを生成するため、最も緩和なイオン化法の一つであるエレクトロスプレイ法を用いる。しかし、エレクトロスプレイ法は緩和ではあるが、電極における酸化還元反応を伴う場合がある。本研究の過程においても、芳香環に共役したケイ素リン二重結合を有する化合物のイオン化時に微量ヨウ化物イオンが関与する酸化反応によってヨウ素付加体が生成する等の反応を見出した。反応体の構造変化は化合物の同定を難しくするが、一般に、酸化・還元反応によって構造変化が起きた場合、生成物は反応体とは異なる質量となるので、その検出は比較的容易である。

一方、イオン化に付随して、あるいはその後の活性化において起こりうる構造変化の一つとして、異性化を考える必要がある。閾値エネルギー解離法は低エネルギー衝突活性化を用いるので、一般論として転位反応に有利な条件となる。転位反応を伴うフラグメンテーションは構造特異的であり、化合物同定に有用な場合も多い。一方、質量変化を伴わない転位反応、即ち、フラグメンテーションを伴わないイオンの異性化も、閾値エネルギー解離の競争的なプロセスとして広く存在すると考えられる。図6に、異性化の一例である環状化合物の開環反応を模式的に示す。

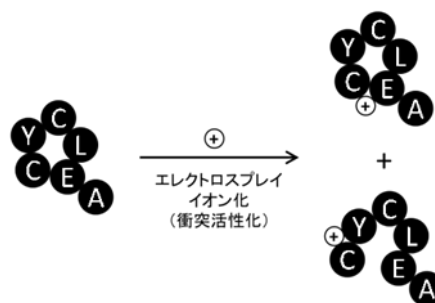


図6 開環反応による環状化合物の異性化

イオンの異性化は質量の変化を伴わないので、従来あまり注目されてこなかったが、閾値エネルギー解離法、特に、頻度因子の小さな転位反応が相対的に有利となるイオントラップ方式の質量分析装置を用いた解析において深刻な問題となりうる。本研究では、この問題の解決策をとして、イオン移動度分析の利用について検討した。その結果、図7に示すごとく、閾値解離法にイオン移動度分析を組み合わせることで異性化したイオンを分離・検出できることがわかった。

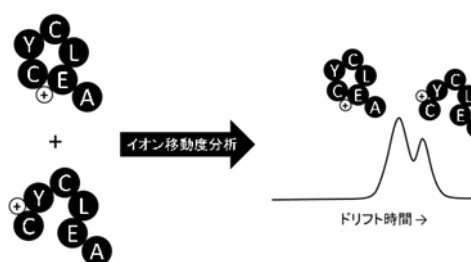


図7 閾値エネルギー解離法で生成した異性体イオンのイオン移動度に基づく分離

(4) 反応経路解析と中性種脱離を伴う反応

環状有機化合物ではフラグメントイオンの生成過程に開環による異性化が含まれるため反応経路解析が困難である。この問題の解決策としてイオン移動度分析が有効であるかを検討、閾値解離タンデム質量分析法と

イオン移動度分析を組合せたアプローチを用いることで反応経路の解析が可能であることを見出した。すなわち、前述のごとくイオン移動度分析により異性体イオンをあらかじめ分離した後、再度衝突活性化を行って閾値エネルギー反応を観測することで、反応経路の解析の手がかりが得られる。

閾値エネルギー解離反応を用いた化合物同定において考えなければならないもう一つの問題として、互いに異性体の関係にある前駆イオンが、ありふれた中性種を脱離することで全く同じ質量のプロダクトイオンを与えるケースが挙げられる。この問題の解決策を見出すため、脱水・脱アンモニア等の中性種脱離を示すモデル系について検討した結果、互いに異性体の関係にある前駆イオンが同じく異性体の関係にあるプロダクトイオンを与えるために前駆イオンおよびプロダクトイオンいずれの精密質量からも識別が不可能な場合でも、脱離反応の閾値エネルギーに有意な差が認められる場合は、それを手がかりに異性体の弁別が可能であることがわかった。異性体の関係にあるプロダクトイオンが生じた場合もそれらはイオン移動度に基づき分離可能なので、中性種脱離やイオン異性化が支配的な系における化合物同定に際して、エネルギー分解タンデム質量分析法とイオン移動度分析の組み合わせが有効な解決策となる可能性が示された。

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3件)

- ① Sato, Y., Toyoda, T., Shimizu-Ibuka, A., Tamura, T., Kobayashi-Hattori, K., Nakamura, T., Arai, S., Mura, K. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides found in a thermolysin-treated elastin with antihypertensive activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76, 1329-1333, 2012, 査読有
- ② Hongo, Y., Li, B., Suzuki, K., Nakamura, T. An unexpected $[M+I]^+$ ion formation in phosphasilene compounds detection by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 956-959, 2011, 査読有
- ③ Hirose, Y., Watanabe, K., Minami, A., Nakamura, T., Oguri, H., Oikawa, H. Involvement of common intermediate 3-hydroxy-L-kynurenine in chromophore biosynthesis of

quinomycin family antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 64, 117-122, 2011, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Nakamura, T., et al. Energy-resolved ion mobility tandem mass spectrometry - a new way for characterizing isomeric ions formed in fragmentation processes. 24th Australian and New Zealand Society for Mass Spectrometry Conference (招待講演), 2013年2月6日, Trinity College, University of Melbourne, Melbourne, Australia
- ② Nakamura, T., et al. Energy-resolved ion-mobility tandem mass spectrometry: a new tool for probing gas-phase isomerization and fragmentation of small molecules. 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012年9月20日, Kyoto International Conference Center, Kyoto
- ③ Nakamura, T., et al. Probing fragmentation characteristics of cyclic peptides with integrated tandem mass spectrometry approaches. 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012年5月23日, Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada
- ④ 中村健道, フラグメンテーションの基礎とCID, ECD/ETD, 第38回BMSコンファレンス(BMS2011)(招待講演), 2011年7月11日, 箱根高原ホテル, 箱根町
- ⑤ Nakamura, T., et al. Tandem mass spectrometric structural characterization of cyclic peptides: Revisited. 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011年6月9日, Colorado Convention Center, Denver, USA

[図書] (計1件)

- ① 中村健道, フラグメンテーション, 現代質量分析学, 化学同人, pp.119-146, 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 健道 (NAKAMURA TAKEMICHI)

独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チーム・専任研究員

研究者番号: 10360611