

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25513004

研究課題名(和文) 膜タンパク質の迅速な質量分析に向けた赤外線レーザーによる大気圧イオン化技術の開発

研究課題名(英文) Development of infrared laser atmospheric pressure ionization techniques for high throughput mass spectrometry of membrane proteins

研究代表者

間 久直 (HAZAMA, Hisanao)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70437375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：赤外線レーザーと、フリットとよばれる多孔質の金属薄板を用いて液体クロマトグラフィー(liquid chromatography; LC)と質量分析(mass spectrometry; MS)とをオンラインで接続可能な大気圧イオン源を開発した。レーザーの波長を溶媒の吸収ピークに合わせることで、水や水とアセトニトリルの混合溶液中のペプチドをイオン化させ、MSを行うことができた。さらに、ペプチド混合物のオンラインLC/MSを行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Atmospheric pressure ion source for online coupling of liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS) was developed using an infrared laser and a porous metal thin disk called frit. Peptides dissolved in water or mixture of water and acetonitrile were successfully ionized and analyzed with MS by tuning the laser wavelength to the absorption peak of the solvent. Moreover, online LC/MS of a mixture of peptides was succeeded.

研究分野：レーザー医工学、レーザーイオン化質量分析

キーワード：レーザーイオン化質量分析 赤外線レーザー 大気圧イオン化 液体クロマトグラフィー 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞膜上には様々な膜タンパク質が発現しており、これら膜タンパク質が細胞内外の分子輸送やシグナル伝達などの重要な機能を担っている。このため、膜タンパク質はプロテオミクスや新規医薬品開発における重要なターゲットになっている。プロテオーム解析では液体クロマトグラフィー (liquid chromatography; LC) と質量分析 (mass spectrometry; MS) を組み合わせた LC/MS が広く用いられており、LC からの溶出液のイオン化には主にエレクトロスプレーイオン化 (electrospray ionization; ESI) が用いられている。しかし、膜タンパク質は難溶性であるため、可溶化剤として用いられる界面活性剤が ESI によるイオン化を妨害するという問題があり、現状の LC/MS では難溶性である膜タンパク質の解析が極めて困難である。また、LC で最適な分離を得るためには pH 調整を必要とする場合が多く、リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウムなど無機塩の緩衝液が使用されているが、これらは低揮発性の溶媒であり、ESI におけるイオン化効率の低下につながる。更には、流路系の目詰まりや塩の析出による汚染で感度低下を起こすことにもなる。

一方、LC/MS におけるイオン化法としてマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix-assisted laser desorption/ionization; MALDI) も用いられている。しかし、MALDI では試料溶液を結晶性化合物 (マトリックス) と混合し、乾燥させ、共結晶化させてから紫外線レーザーを照射して試料をイオン化させるため、LC と MS とをオンラインで接続することができない。このため、LC からの溶出液をロボットで順次プレート上の別の点にスポットし、乾燥させてから MS を行う必要がある。LC からの溶出液を ESI で連続的にイオン化させながら順次質量スペクトルを測定するオンライン LC/MS に対して、スポットングを行った後で別途 MS を行う手法はオフライン LC/MS と呼ばれており、オンライン LC/MS と比べて分析のスループットやコストの面で不利があると言える。

以上のように、膜タンパク質のプロテオーム解析では未だに十分な解析手法が確立されておらず、これがプロテオミクスや新規医薬品開発における重要な課題となっている。この課題を解決するために申請者は赤外線レーザーを用いた MALDI に関する研究を進めてきた。通常 MALDI では紫外線レーザーを使用しており、溶液状態の試料からのイオン化が困難であるため、上述のようにオフラインで LC/MS を行う必要がある。これに対して、赤外線領域は分子内の分子振動と共鳴して特定の波長の光が強く吸収される領域であり、化学結合の種類によって吸収が強くなる波長が異なるため、分子の指紋領域とも呼ばれる。水は広い波長範囲に渡る赤外線を強く吸収し、中でも波長 3 μm 帯、および 6

μm 帯では紫外線領域と比べて吸収の強さが 10^6 倍にもなる。このため、赤外線レーザーを用いると、大気中で溶液状態の試料からのイオン化が可能であり、波長 3 μm のレーザーを用いて大気中で水溶液中のペプチドをイオン化させ質量スペクトルを測定した結果が報告されている (V. V. Laiko *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13**, 354-361, 2002)。しかし、波長 3 μm 帯で利用できる分子振動は O-H 伸縮振動や N-H 伸縮振動に限られている。これに対して、波長 6~7 μm 帯では 3 μm 帯よりも多様な分子振動を利用することができるため、より汎用性の高いイオン化が期待できる。ところが、この波長 6~7 μm 帯ではイオン化に使用できるような強度のレーザー光源を得ることが困難であった。そこで、研究代表者は世界でも稀な波長 5~10 μm の小型・高出力波長可変レーザー装置の開発を行い、この赤外線レーザーを用いた生体分子のイオン化法の研究を進めてきた。その成果の一つとして、波長 6~7 μm の赤外線レーザーを用いた場合も大気中で水溶液中のペプチドをイオン化させ、MS が可能であることを示した。ここで重要なのは、通常 MALDI で用いられる芳香族有機化合物などのマトリックスを添加することなく、水溶液から直接のイオン化を実現していることである。波長 6~7 μm 帯では水以外にも様々な物質の吸収をイオン化に利用するため、レーザーが波長可変である特徴を活かして様々な溶媒に対して使用でき、プロテオーム解析に適したイオン化を実現できると考えられる。

上述のとおり、膜タンパク質の分析には高濃度の可溶化剤が用いられるが、ESI の場合と同じく、紫外線レーザーを用いた通常 MALDI でも可溶化剤がイオン化を妨害するという問題がある。この問題に対して毛旧代表者は赤外線レーザーを用いた MALDI (真空中) を用いた膜タンパク質のイオン化を試み、高濃度の可溶化剤 (n-ドデシル- β -D-マルチド 0.05% と尿素 2 M) を含んだ試料から膜タンパク質 (イカのロドプシン) のイオンを検出することに成功した。また、赤外線レーザーと併せて紫外線レーザーを同時に照射することでイオン信号強度をさらに高められることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、高分子量タンパク質の分析に適した MALDI を用いて LC と MS をオンラインで接続することで、従来の LC/MS では分析が困難であった膜タンパク質の分析を高スループットで行う手法を確立し、プロテオミクスや新規医薬品開発におけるブレークスルーの実現を目標とした。このために、波長 6~7 μm 帯の赤外線レーザーを利用し、LC からの溶出液を大気中で直接イオン化させて MS を行うオンライン LC/MS を実現するための基礎検討、および LC と MS のインターフェイスの開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 赤外線レーザーイオン源の開発

LC からの溶出液を連続的にイオン化させるために必要となる、LC とレーザーイオン化部とのインターフェイスを開発した。LC からの溶出液に赤外線レーザーを照射してイオン化を行うことになるが、キャピラリーは内径が数 100 μm 以下で非常に細いため、単純にキャピラリーの先端にレーザーを照射するのみではレーザー照射位置の変動などによってイオン化の安定性やイオン化効率が不十分となる可能性がある。このため、キャピラリー先端部にフリットと呼ばれる多孔質の金属製薄板を設置し、フリットを通して溶出させることとした。フリットによって溶出液の断面積が拡大されると共に液面が安定し、イオン化の安定性を高めることができると考えられる。

(2) 質量分析装置へのイオン導入部の開発

赤外線レーザーの照射によって生成したイオンを質量分析装置内の高真空へ導入する部分の形状や温度、フリットとイオン導入部との位置関係などについて検討を行い、イオン導入部の設計・製作を行った。大気中でイオン化を行い、差動排気によって質量分析装置内の高真空へイオンを導入する構造となっているが、大気中には大量の中性粒子が存在しているため、生成したイオンの大部分が中性粒子との衝突などによって失われてしまう可能性がある。このため、フリット、およびイオン導入部の周辺を減圧して低真空にすることも検討した。中性粒子の減少によってイオンの損失を大幅に減らせることに加え、LC からの溶出液の気化が促進されることによるイオン化効率の向上も期待できる。イオン化に ESI を用いた場合との比較を通じて赤外線レーザーを用いたオンライン LC/MS の有用性を評価した。

(3) 試料のイオン化条件の検討

試料としてペプチドを用い、イオン化に対するレーザー波長、レーザー強度、試料溶媒や可溶化剤の影響など様々な項目の検討を行った。特に、他の研究で既に用いられている波長 3 μm 帯と、3 μm 帯よりも多様な分子振動を利用できる波長 6~7 μm 帯とでイオン化の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 赤外線レーザーイオン源の開発

質量分析計にはイオントラップ型質量分析計 (LCQ Classic, Thermo Finnigan, USA) または四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-ToF Ultima API, Micromass, UK) を用いた。これらの質量分析計に装備されている ESI イオン源を取り外し、図 1 のようにイオンを真空中へ吸引する開口の近傍へ設置したフリットに赤外線レーザーを照射するための光学

系を取り付けた。イオンを真空中へ吸引する開口とフリットを密接させることが困難であったため、延長キャピラリーを取り付け、フリット表面で発生したイオンを真空中へ吸引できる構造にした。

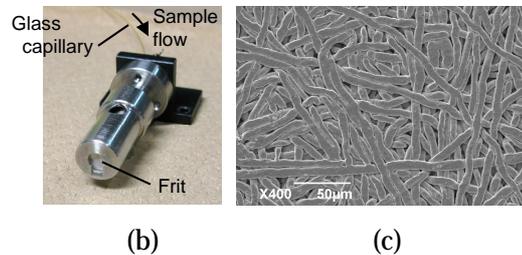
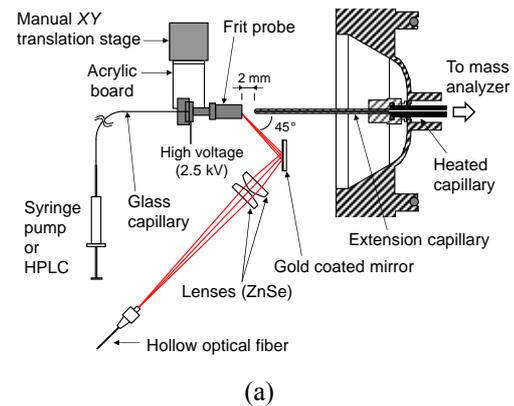


図 1. (a) 本研究で開発した赤外線レーザーイオン源の概略図、(b) 同イオン源で使用したフリットを内蔵したプローブの外観、および (c) フリット表面を走査型電子顕微鏡で観察した画像。

(2) 波長 3 μm 帯および 6 μm 帯レーザーによるイオン化の比較

赤外線レーザーとして、波長 3 μm 帯では光パラメトリック発振方式の波長可変レーザー (IR Opolette model 2731, Oportek, USA)、波長 6 μm 帯では差周波発生方式の波長可変レーザー (川崎重工業株式会社と理化学研究所の共同開発) を用いた。測定試料にはペプチド (angiotensin II) を用い、0.1%トリフルオロ酢酸水溶液を溶媒として濃度 10 pmol/ μL の溶液を作製した。同溶液に赤外線レーザーを照射して質量スペクトルを測定した。本測定ではイオントラップ型質量分析計 (LCQ Classic, Thermo Finnigan, USA) を使用した。レーザーの波長を 2.70~3.10 μm 、および 5.80~6.38 μm で変化させ、各波長で測定した質量スペクトルを比較した結果、波長 3 μm 帯、および 6 μm 帯において、それぞれ、波長 2.88 μm 、および 6.00 μm で最もペプチドのイオン信号強度が高くなった。図 2 に、波長 2.88 μm 、および 6.00 μm の赤外線レーザーを照射して得られた質量スペクトルを示す。ペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ が m/z 1046 に強く検出されており、通常の MALDI のようにマトリック

スに由来する低質量域のピークが検出されていないことがわかる。試料に由来するイオンのみが検出されることで質量スペクトルの解析を簡略化することができる。また、波長 3、および 6 μm 帯いずれの波長においても同程度のイオン信号強度が得られた。波長 3 μm 帯における水の吸収係数は、波長 6 μm 帯におけるそれよりも約 5 倍大きいにもかかわらず、イオン信号強度が両波長域でのレーザーではほぼ同程度であったことから、波長 6 μm 帯の方がイオン化効率が高い可能性があり、イオン化効率は溶媒の吸収係数以外の要因にも依存することが明らかとなった。

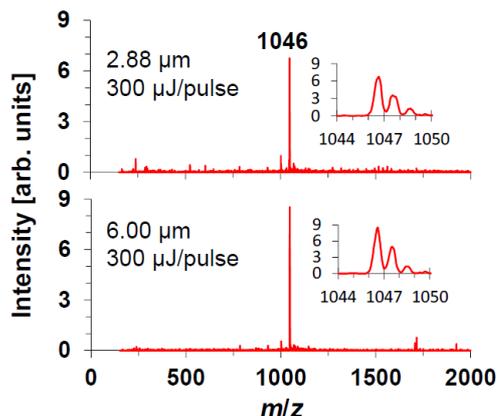


図 2. 波長 2.88 μm 、および 6.00 μm のレーザー照射によって得られたペプチド (angiotensin II) の質量スペクトル。

(3) 有機溶媒を用いたイオン化

図 2 は水を溶媒とした場合の測定結果であるが、実際の LC/MS では有機溶媒と水の混合溶液を溶媒として用いることが多い。そこで、有機溶媒であるアセトニトリルを 80%、水を 20%、ギ酸を 0.02% 含んだ混合溶液を溶媒として用い、ペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ の信号強度のレーザー波長依存性をアセトニトリルと水が

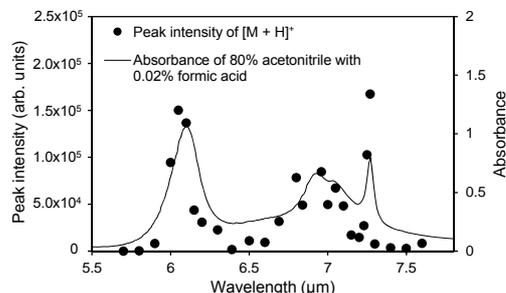


図 3. アセトニトリルと水の混合溶媒を用いた場合のペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ の信号強度のレーザー波長依存性。実線は溶媒の吸収スペクトルを、点は各波長におけるイオン信号強度を示す。

吸収ピークを持つ波長 6~7 μm 帯で測定した結果を図 3 に示す。本測定ではイオントラップ型質量分析計 (LCQ Classic、Thermo Finnigan、USA) を使用した。波長 6.05 μm 付近の吸収ピークは水に、7.27 μm 付近の吸収ピークはアセトニトリルに由来しており、それぞれの吸収ピークとレーザー波長が近づくともイオン信号強度も高くなることがわかる。さらに、水だけではなく、有機溶媒の吸収もイオン化に利用できることが確認されたため、赤外線レーザーを用いたイオン化がこの波長域に吸収を持つ様々な溶媒に利用できることが期待できる。

(4) 赤外線レーザーイオン化による LC/MS

本研究で開発した赤外線レーザー大気圧イオン化を用いてペプチド混合物の LC/MS を試みた。本測定では四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-ToF Ultima API、Micromass、UK) を使用した。図 4 に、波長 2.94 μm の赤外線レーザーとフリットを用いた大気圧イオン化によって 2 種のペプチド (angiotensin II (10 pmol/ μL) および $[\text{Glu}^1]$ -fibrinopeptide B (GFP) (8 pmol/ μL)) のオンライン LC/MS を行った際のイオンクロマトグラムを示す。LC によって分離された 2 種のペプチドをフリットを介したイオン化法でも分離でき、LC/MS を行っていることがわかる。

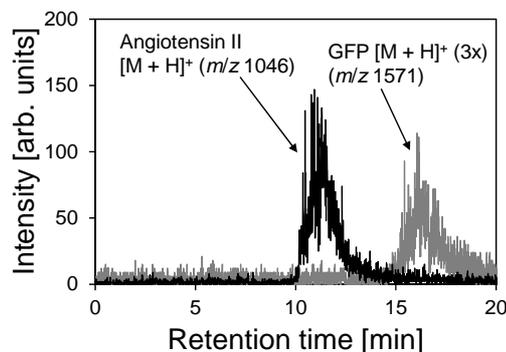


図 4. 波長 2.94 μm の赤外線レーザーとフリットを用いた大気圧イオン化によって 2 種のペプチド (angiotensin II (10 pmol/ μL) および $[\text{Glu}^1]$ -fibrinopeptide B (GFP) (8 pmol/ μL)) のオンライン LC/MS を行った際のイオンクロマトグラム。

(5) 減圧イオン源の開発

大気圧での赤外線レーザーイオン化は容易に利用できる反面、現時点では検出感度が ESI と比べて低いことがわかった。そこで、フリット周囲を小型の真空容器で覆い、イオンを質量分析装置内の真空へ吸引する開口とフリットとの間の圧力を減圧できるイオン源の開発を行った。本測定では四重極-飛行時間型質量分析計 (Q-ToF Ultima API、Micromass、UK) を使用した。図 5 に、イオン源の圧力とペプチド (angiotensin II) の

ロトン付加イオン $[M+H]^+$ のイオン信号強度との関係を示す。イオン源の圧力を大気圧 (101 kPa) から 81 kPa に低下させることでイオン信号強度が高くなっていることがわかる。これは、大気中の中性粒子とイオンとの衝突によるイオンの損失が減少したためと考えられる。しかし、圧力を 81 kPa よりも低くすると、再びイオン信号強度が低下することがわかった。これは、イオン源と質量分析計内の真空との圧力差が少なることで、イオンを真空中へ吸引する力が低下したためと推測される。イオン源と質量分析計内の真空との圧力差が無くても電場を加えることなどでイオンを質量分析計内へ導入できれば、さらにイオン信号強度を高められる可能性がある。

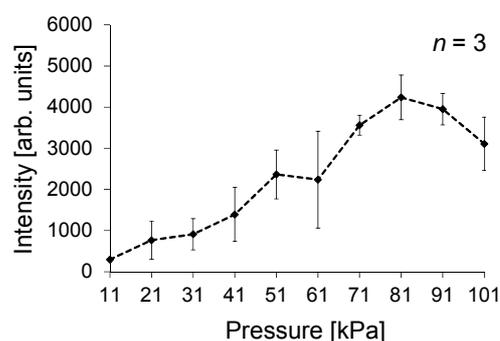


図 5. イオン源の圧力とペプチド (angiotensin II) のプロトン付加イオン $[M+H]^+$ のイオン信号強度との関係。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

井口泰成, 閻久直, 粟津邦男: “生体分子の質量分析に向けた赤外レーザーイオン化法の開発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会資料 **OQD-16**, 21–26 (2016) 査読無。

岩出彩花, 閻久直, 粟津邦男: “大気圧レーザーイオン化質量分析におけるイオン化効率の波長 3 および 6 μm 帯での比較,” 電気学会 光・量子デバイス研究会 **OQD-14**, 23–28 (2014) 査読無。

Ryuji Hiraguchi, Hisanao Hazama, Katsuyoshi Masuda, Kunio Awazu: “Atmospheric pressure laser desorption/ionization using a 6–7 μm -band mid-infrared tunable laser and liquid water matrix,” *Journal of Mass Spectrometry* **50**, 65–70 (2014) 査読有。

DOI: 10.1002/jms.3473

Ryuji Hiraguchi, Hisanao Hazama, Kenichirou Senoo, Yukinori Yahata, Katsuyoshi Masuda, Kunio Awazu: “Continuous flow atmospheric pressure laser desorption/ionization using a 6–7- μm -band mid-infrared tunable laser for biomolecular mass spectrometry,” *International Journal of*

Molecular Sciences **15**, 10821–10834 (2014) 査読有。

DOI: 10.3390/ijms150610821

Ryuji Hiraguchi, Hisanao Hazama, Kunio Awazu: “Development of an atmospheric pressure ionization method using a mid-infrared tunable laser for high-throughput mass spectrometry of biomolecules,” 電気学会 光・量子デバイス研究会 **OQD-14**, 5–10 (2014) 査読無。

〔学会発表〕(計 12 件)

井口泰成, 閻久直, 粟津邦男: “生体分子の迅速な質量分析に向けた赤外レーザーイオン化法の開発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会(バイオメディカルフォトニクス応用), 東北大学東京分室, 東京都千代田区 (2016 年 3 月 7 日)。

Ayaka Iwade, Hisanao Hazama, Kunio Awazu: “Comparison of atmospheric pressure laser ionization at the wavelength ranges of 3 and 6 μm for continuous flow ionization of peptide solution,” 36th British Society for Mass Spectrometry Annual Meeting, University of Birmingham, Birmingham, UK (15–17 Sep. 2015)。

岩出彩花, 閻久直, 粟津邦男: “波長 3 および 6 μm 帯における大気圧中赤外レーザー脱離イオン化の波長特性評価,” 第 63 回質量分析総合討論会, つくば国際会議場エポカルつくば, 茨城県つくば市 (2015 年 6 月 17–19 日)。

井口泰成, 閻久直, 妹尾健一郎, 八幡行記, 粟津邦男: “LC/MS への応用に向けた大気圧赤外レーザー脱離イオン化法の開発,” 第 63 回質量分析総合討論会, つくば国際会議場エポカルつくば, 茨城県つくば市 (2015 年 6 月 17–19 日)。

岩出彩花, 閻久直, 粟津邦男: “大気圧レーザーイオン化質量分析におけるイオン化効率の波長 3 および 6 μm 帯での比較,” 第 2 回レーザーイオン化研究会, 首都大学東京, 東京都八王子市 (2014 年 11 月 29 日)。

井口泰成, 閻久直, 妹尾健一郎, 八幡行記, 粟津邦男: “液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) に向けた波長 6 μm 帯中赤外レーザーによる生体分子イオン化法の検討,” 第 2 回レーザーイオン化研究会, 首都大学東京, 東京都八王子市 (2014 年 11 月 29 日)。

岩出彩花, 閻久直, 粟津邦男: “大気圧レーザーイオン化質量分析におけるイオン化効率の波長 3 および 6 μm 帯での比較,” 電気学会 光・量子デバイス研究会(バイオメディカルフォトニクス応用), 東北大学東京分室, 東京都千代田区 (2014 年 9 月 26 日)。

岩出彩花, 閻久直, 粟津邦男: “波長 3 および 6 μm 帯レーザーでの大気圧赤外レーザー脱離イオン化の比較,” 第 62 回質量分析

総合討論会, ホテル阪急エキスポパーク,
大阪府吹田市 (2014年5月15日).

平口竜士, 間久直, 粟津邦男: “生体高分子
の迅速な質量分析に向けた中赤外波長可
変レーザーによる大気圧イオン化法の開
発,” 電気学会 光・量子デバイス研究会
(バイオメディカルフォトンクス応用),
東北大学東京分室, 東京都千代田区
(2014年3月3日).

平口竜士, 間久直, 粟津邦男: “中赤外 6-7
 μm 帯波長可変レーザーによる大気圧イ
オン化生体分子質量分析法の開発,” レー
ザー学会学術講演会第 34 回年次大会, 北九
州国際会議場, 福岡県北九州市 (2014年1
月20日).

平口竜士, 間久直, 粟津邦男: “中赤外 6-7
 μm 帯波長可変レーザーを用いた溶液試料
の大気圧連続イオン化法の開発,” 第 61 回
質量分析総合討論会, つくば国際会議場
エポカルつくば, 茨城県つくば市 (2013
年9月12日).

Ryuji Hiraguchi, Hisanao Hazama, Kunio
Awazu: Development of atmospheric pressure
laser ionization method using a novel 6
 μm -band mid-infrared tunable laser and
solvent as matrix, 61st ASMS Conference on
Mass Spectrometry and Allied Topics,
Minneapolis Convention Center, Minneapolis,
MN, USA (13 Jun. 2013).

〔その他〕

大阪大学大学院工学研究科粟津研究室

ホームページ

<http://www.see.eng.osaka-u.ac.jp/seemb/seemb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間 久直 (HAZAMA, Hisanao)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 70437375