

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25513011

研究課題名(和文)化合物同定及び異性体識別に資する閾値エネルギー分解IMS/MS/MS法の開発

研究課題名(英文) Energy-resolved tandem mass spectrometry and ion mobility spectrometry for identification and isomer differentiation

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・専任研究員

研究者番号：10360611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エネルギー分解タンデム質量分析法(ER-MS/MS)によって得られるブレイクダウン図が、有機小分子の同定や、スレオニン、アロスレオニンといったジアステレオマーを含む異性体の識別に有用であることを示した。本研究で確立したER-MS/MS方法論はフラグメンテーションのエネルギー依存性を積極的に観測することを原理とし、オミクス科学における分子同定に適用可能な感度と迅速性を有する。我々のアプローチは、質量イメージング、一細胞分析、アンビエントその場分析等、クロマトグラフィーを適用できず異性体識別がさらに困難になる将来のオミクス科学における化合物同定に革新をもたらしているものである。

研究成果の概要(英文)：We have shown that breakdown diagrams obtained by energy-resolved tandem mass spectrometry (ER-MS/MS) experiments are useful for identification of small organic molecules and differentiation of isomers including diastereomers, such as Thr and allo-Thr, as well. The established ER-MS/MS method is based on intentional observation of energy dependence in fragmentation chemistries and fast and sensitive enough to be used in the context of omics molecular identification. Our strategy would leads to an innovation in molecular identification in future omics sciences where isomer differentiation will become an even bigger challenge under mass imaging, single cell analysis, and/or ambient in situ ionization setups where no chromatography is available.

研究分野：質量分析学

キーワード：異性体識別 フラグメンテーション 衝突活性化 エネルギー分解法 タンデム質量分析法 オミクス計測科学 ジアステレオマー

### 1. 研究開始当初の背景

(1) オミクス計測学が目指すところは、生命現象に関与し、あるいは自然環境に存在する多種多様な有機化合物を網羅的に定性・定量するための方法論を開発・提供することにより、化学、生物学、医学、薬学、農学、環境科学等、様々な分野におけるオミクス科学アプローチとその実社会への応用を加速することである。1990年代後半からのプロテオミクスの目覚ましい成功に触発され、メタボロミクス、グライコミクス、リポドミクス等々、様々なオミクス科学が提唱されている。

(2) オミクス科学には大きな期待が寄せられてきているが、プロテオミクスを例外としてその進展は必ずしも順調ではない。オミクス計測の中核をなすのは、多種多様な化合物に適用可能であり、高感度かつ迅速な手法である質量分析法である。1990年代以降のLC/MS/MS法が目覚ましい発展により、分子量測定は精密質量レベルで高感度かつ容易に行えるようになってきている。プロテオミクス(ペプチドレベル)では、得られた分子量情報とゲノム情報から得られる配列情報を相互参照することで対象分子(ペプチド及びタンパク質)の同定がルーチン化されている。一方、他のオミクス分野においては対象分子(代謝物、糖、脂質等)に対して直接比較参照しうる配列情報等がないのみならず、同一分子量、同一組成の様々な異性体が存在するため、分子の同定がボトルネックとなる。

(3) 古典的方法、即ちGC/MSを用いたメタボロミクスにおいてはEIマススペクトルライブラリーを用いた化合物同定が一定の成功を収めてきた。これに対しLC/MS/MSを用いた分析では、公共スペクトルライブラリーを用いた同定は上手く機能しないため、多くの研究室でスペクトルおよび保持時間を集積した化合物同定用インハウスデータベースが構築されているが、今後、アンビエントイオン化を用いたその場リアルタイム分析、質量イメージングや一細胞分析等、クロマト保持時間を利用できない状況にどのように対応していくかが、極めて大きな課題である。

### 2. 研究の目的

(1) さらなる深刻化が予想される化合物同定に関する問題の本質を解明し、次代のオミクス計測法構築への基盤を確立する。MS/MSを含む質量スペクトル中のフラグメンテーションパターンは測定条件に依存して大きく変動することは古くから知られている。条件を完全に一致させるためメタボロミクス分野ではインハウスデータベースが構築されるが非効率なうえデータ共有も困難である。ラボ間、プラットフォーム間のデータ比較を可能にするための方法原理を確立する。

(2) スペクトルパターンの比較による化合

物同定は、ジステレオマー等、構造が互いに類似した異性体同士や小分子において特に困難である。これは、異性体同士でフラグメントイオンが同じ $m/z$ に出現し、その生成量比のみが異なる場合が多いためであるが、立体化学の差異に起因するイオン移動度の違いと、分解反応の閾値の違いの双方を用いて異性体を識別する方法原理を確立する。

(3) 確立したプラットフォームに依存しない化合物同定や異性体識別が可能な方法原理に基づき、市販の装置を用いて実施可能な測定法を構築、いくつかのモデルケースに対して適用しデータ処理を含む実際のワークフローとその適用限界を検証する。

### 3. 研究の方法

(1) 実験的な方法と計算化学的な方法との双方向からアプローチした。実験的アプローチにおいては、四重極飛行時間ハイブリッド型や三連四重極型のMS/MS装置を用いて閾値エネルギー分解法の実験を行った。広く一般に利用可能な測定法を構築するため、衝突ガス導入系に若干の改変を加えた以外、市販装置に改造等を施すことなく使用した。閾値エネルギー分解法の実験では、衝突エネルギーに加え、衝突ガス種、ガス圧を変数として種々条件にて測定を行った。イオン移動度の測定においては、ハイブリッド型MS/MS装置に組み込まれたTWIMS方式のデバイスを用い、窒素ガスに対する移動度を計測した。

(2) 方法原理確立ならびに測定法検証のためのモデル化合物として、将来の応用において対象となりうるような化合物を種々選択して用いた。モデル化合物は、市販の低分子薬物や、内因性の低分子代謝物(アミノ酸等)を含む。また、エネルギー軸の較正と標準化のため、種々のパラ置換ベンジルピリジニウム塩を調製して用いた。イオン移動度測定の際の較正用化合物としては、衝突断面積が報告されている一連の低分子薬物様化合物を使用した。

(3) TM法による衝突断面積計算はCampzanoらにより窒素ガス用に改変されたMobcalプログラムを用い、ワークステーション環境にて行った。衝突断面積計算の対象となるイオン構造は、各々の化合物について想定されるイオンについてSpartanソフトウエアによって生成した初期構造(コンフォーマー)のうち主要なものに対しDFT計算を行い最適化したものを用いた。電荷の分布はGaussianソフトウエアを用いて計算した。実験データと計算によって得られた衝突断面積、実験的に衝突断面積が図られている化合物(上記)の移動度をそれぞれ比較し、実験ならびに計算による衝突断面積の一致度に基づき推定したイオン構造の妥当性評価を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究開始以前の時点においては、イオン移動度・衝突断面積を用いるアプローチは、イオン構造と直接関連付けられる物理量と計算化学的に得られる理論値の比較が可能であることより、化合物同定や異性体識別に資するところ大であることが期待されていた。しかし、実際にモデル系を用いて測定、データ処理、計算化学を含む一連のワークフローを検証してみた結果、現時点では低分子同定のための汎用的な方法への組み込みは困難であることが判明した。その理由は、窒素に対する低分子有機イオンの移動度がガスの分極、電荷の局在に大きな影響を受けることに帰せられる。すなわち、タンパク質等の巨大分子におけるイオン移動度測定の場合と異なり、移動度の精度良い予測には電荷の局在を含むイオン構造の厳密なモデリングが必要であることが分かった。これは、汎用分析法として組み入れるには現時点では許容し難い計算コストを意味する。特に、コンフォーメーションに自由度のある低分子有機イオンにおいては精度よい移動度予測のためには膨大な量の計算が必要であるため、ワークステーションレベルの計算を用いた現実的ワークフローは成立し難い。

これまで我々は、イオン構造が衝突活性化によってしばしば変化することを示してきた。イオン構造の変化は化合物の構造に密接な関係があることより、個別の詳細な構造解析には大変有用である。一方、オミクス計測のワークフローに衝突断面積を組み込もうとする場合には過度の複雑性が生じることからむしろ障害になる。オミクス計測のための方法論としては、イオン移動度を用いない、従来型のエネルギー分解 MS/MS 法がむしろ適していることが明らかとなった。

(2) イオントラップを用いた低エネルギー MS/MS 法から得られる最小閾値エネルギーに関する情報は化合物ごとに固有の値であり、識別情報として利用可能であることを以前見出している。一方、オミクス計測の中で用いる汎用的な方法としては、より迅速で再現性の高い測定が可能なビーム方式の MS/MS 装置、特に飛行時間型装置を用いた測定法が有利である可能性が考えられた。三連四重極型装置で用いられてきた従来型のエネルギー分解 MS/MS 実験に類似した測定を飛行時間ハイブリッド型装置を用いて 0.1 秒間隔で衝突エネルギーステップしながら実施することにより、クロマトタイムスケール（ピーク半値幅 2 秒）でエネルギー分解 MS/MS データセットを取得できることが分かった。測定後のオフラインデータ処理により、従来法の試料をインフュージョンしながら衝突エネルギーを順にステップさせて測定することによって得られるのと同様のブレイクダウン図が得られる。一例として低分子薬物である

ベラパミルについてクロマト時間スケールで飛行時間ハイブリッド装置を用いて取得したエネルギー分解 MS/MS データ(a)と、三連四重極型装置を用いて取得した従来型のインフュージョン測定によるデータ(b)を示す。それぞれの装置での MS/MS スペクトルパターンは条件依存的に大きく異なるのに対し、ブレイクダウン図は定性的にはほぼ一致した。飛行時間ハイブリッド装置を用いると、高速だけでなく、感度も通常の MS/MS 測定に近い状態で測定できることがわかった。このことより、オミクス計測における化合物同定に、ブレイクダウン図そのものをデータベース化して利用可能であることが示唆された。

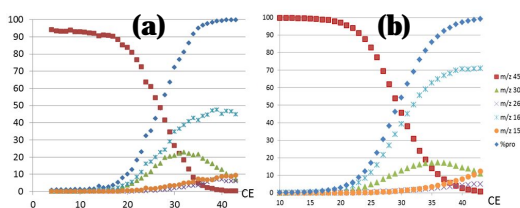


図1 ベラパミルのエネルギー分解 MS/MS データ (ブレイクダウン図)

(3) 異性体の識別はメタボロミクスにおいて極めて重要な問題である。特に、立体異性体において MS/MS スペクトルはしばしば似通ったパターンとなり識別困難である。一方、立体化学の差異はしばしば反応の遷移状態の安定性に大きな影響を与えるため、反応経路毎のエネルギーを反映したブレイクダウン図を用いるとしばしば容易に識別可能となることが分かった。図2は一例で、スレオニンとそのジアステレオマーであるアロスレオニンのブレイクダウン図 (プロトン化分子と脱水イオンのみを抜粋) である。両者の MS/MS スペクトルは似通っているのに対し、脱水イオンのブレイクダウン図には明確なエネルギー依存性の差が認められる。脱水イオン生成は水酸基へのプロトン移動を経由した分子内 S<sub>N</sub>2 型反応によると考えられており、データは、より立体障害の少ない遷移状態を経由するアロスレオニンにおいて脱水が起きやすいという機構とよく一致する。

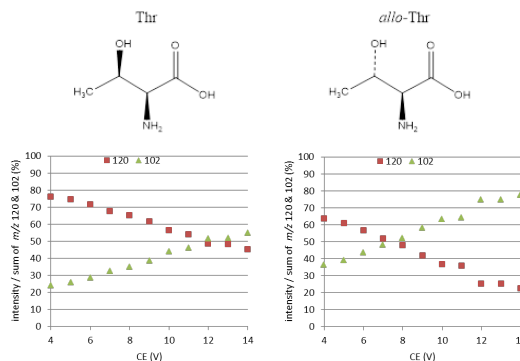


図2 スレオニンとアロスレオニンのブレイクダウン図

以上のごとく、ブレイクダウン図を用いてフラグメンテーションパターンや移動度では識別できない異性体間の差を可視化できることが示され、エネルギー分解法に基づく化合物同定法の原理を確立できた。

#### 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)

Amagai, K.; Ikeda, H.; Hashimoto, J.; Kozono, I.; Izumikawa, M.; Kudo, F.; Eguchi, T.; Nakamura, T., et al., Identification of a gene cluster for telomestatin biosynthesis and heterologous expression using a specific promoter in a clean host. *Sci Rep* 2017, in press, 査読有

Furuhashi, T.; Ishii, K.; Tanaka, K.; Weckwerth, W.; Nakamura, T., Fragmentation patterns of methyloxime-trimethylsilyl derivatives of constitutive mono- and disaccharide isomers analyzed by gas chromatography/field ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2015, **29**, 238-246. 査読有, DOI: 10.1002/rcm.7105

Nishioka, T.; Kasama, T.; Kinumi, T.; Makabe, H.; Matsuda, F.; Miura, D.; Miyashita, M.; Nakamura, T., et al, Winners of CASMI2013: Automated Tools and Challenge Data., *Mass Spectrom (Tokyo)* 2014, **3**, S0039, 査読有, DOI: 10.5702/massspectrometry.S0039

##### [学会発表](計9件)

中村健道, 有機分子の同定: MS の新しい課題, 蛋白研セミナー・大阪大学「知の共創プログラム」産学連携セミナー『質量分析の最新動向と未来』(招待講演), 2016年12月3日, 大阪大学(大阪府吹田市)

Takemichi Nakamura, Utility of Energy-Resolved Tandem Mass Spectrometry in Identification of Isomeric Small Organic Molecules Including Diastereomers, 21st International Mass Spectrometry Conference, August 22, 2016, Toronto (Canada)

中村健道, 有機イオンの化学とフラグメンテーションのあれこれ, 第66回イオン反応研究会&第144回関東談話会講演会(招待講演), 2016年4月23日, 東京大学(東京都文京区)

中村健道, エネルギー分解 LC/MS/MS 法の要め 有機化合物定性・構造解析と

MS/MS データの解釈のために, 第15回日本質量分析学会北海道談話会・研究会(招待講演), 2015年10月19日, 北海道大学(北海道札幌市)

中村健道, GC/MS の基礎とフィールドイオン化法 (FI) の応用, 理研シンポジウム分子構造解析 2015:MS と NMR の基礎と実践(招待講演), 2015年6月30日, 理化学研究所(埼玉県和光市)

Takemichi Nakamura, Formation of isomeric ions in collision-induced dissociation process probed by energy-resolved ion mobility tandem mass spectrometry (ER-IMS/MS<sup>2</sup>), 20th International Mass Spectrometry Conference, August 28, 2014, Geneva (Switzerland)

Takemichi Nakamura, Utility of Energy-Resolved Tandem Mass Spectrometry in Structural Characterization of Small Organic Molecules, 5th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference (Invited), July 18, 2014, Beijing (China)

中村健道, 質量分析による有機分子構造解析とイオン移動度分析, 第3回イオン移動度研究会(招待講演), 2014年4月19日, 東邦大学(千葉県船橋市)

中村健道, タンデム質量分析法による構造解析: 種々の解離法と測定法を用いたデータをどのように捉え解釈していくか?, 第61回質量分析総合討論会(招待講演), 2013年9月10日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

##### [図書](計1件)

中村健道, 第3章 マススペクトルの解釈 3.2 フラグメンテーション, 質量分析学 基礎編, 日本質量分析学会, pp.48-67, 2016

#### 6. 研究組織

##### (1) 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・専任研究員  
研究者番号: 10360611

##### (2) 連携研究者

高橋 俊哉 (TAKAHASHI, Shunya)  
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・専任研究員  
研究者番号: 00202151