らせん状のイオン軌道を利用した
タンデム飛行時間型質量分析計"MALDI Spiral TOF/TOF"の
性能評価およびリン脂質の構造解析手法の確立

大阪大学大学院理学研究科物理学専攻
博士課程前期２年
質量分析グループ
久保　歩

1章 はじめに 1

2章 測定原理 3
2.1 マトリックス支援レーザーイオン化 (MALDI) 3
2.2 飛行時間型質量分析計 4
2.2.1 原理 4
2.2.2 分解能の定義 5
2.2.3 遅延引き出しおよび二段階加速 6
2.3 タンデム質量分析法 (MS/MS) 11
2.4 衝突誘起解離 13
2.4.1 低エネルギーCID 14
2.4.2 高エネルギーCID 15
2.4.3 チャージリモートフラグメンテーション 17
2.5 タンデム飛行時間型質量分析計のMS-Ⅱに求められる性能 18
2.6 リフレクトロン 20

3章 装置説明 22
3.1 マルチターンタンデム飛行時間型質量分析計 “MULTUM” 22
3.2 PSD成分の排除 23
3.3 追い抜き問題 24
3.4 らせん状のイオン軌道を持つタンデム飛行時間型質量分析計
“MALDI Spiral TOF/TOF” 26

4章 実験1 「MALDI Spiral TOF/TOF”の性能評価」 29
4.1 飛行時間型質量分析計として評価 31
4.1.1 分解能の評価 31
4.1.2 質量決定精度の評価 39
4.1.3 感度 (検出限界) の評価 46
4.1.4 プリカーサーイオン選択能の評価 49
4.2 タンデム質量分析計としての評価 51
4.2.1 分解能の評価 54
4.2.2 質量決定精度の評価 56
4.2.3 感度 (検出限界) の評価 60

5章 実験2 「リン酸化ペプチドの修飾部位の同定」 63

6章 実験3 「リン脂質の構造解析」 71
6.1 Lyso-PCの構造解析 72
6.2 PC (標準試料) の構造解析 77
6.3 PC (未知試料) の構造解析 83

7章 まとめ 102

謝辞 103

参考文献 104

1章.はじめに

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (matrix-assited laser desoption/ionization,MALDI)[1,2] やエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI)[3] の開発により生命科学の分野でも質量分析計がよく用いられるようになっている. 中でも, 2台の質量分析計を組み合わせて行うタンデム質量分析法では対象試料の質量だけでなく, その構造までも解析が可能となった[4]. この方法は, 1台目の質量分析計 (MS-1) で, ある特定のm/zを持つイオンをプリカーサーイオンとして選択し, 不活性ガスなどと衝突させることで解離させる. そして, 2台目の質量分析計 (MS-2) で, 解離した結果生成されるフラグメントイオンのm/zを測定し, 測定対象の構造を解析する方法である. 当研究室でも, マルチターン飛行時間型質量分析計 “MULTUM”[5] に衝突室および ”quadratic-field ion mirror”[6]を組み合わせたマルチターンタンデム飛行時間型質量分析計 “MULTUM-TOF/TOF” を開発し[7], これまでにペプチドなどの生体分子の構造解析を行ってきた[8,9].

そして本研究に用いた日本電子株式会社で開発中の “MALDI Spiral TOF/TOF” は, “MUL-TUM”の追い抜き問題を, らせん軌道を採用する事で克服した “MALDI Spiral TOF”[10] をMS-1として採用したタンデム飛行時間型質量分析計である. 本装置は,一般的な装置のMS-1が直線のイオン軌道で飛行距離が数十cmであるのに対して, らせん軌道を採用する事で飛行距離が17 mとなっている. 本装置の大きな特徴として, 以下の2つをあげることができる.

1つ目の特徴として, 高いプリカーサーイオン選択能がある. MS- I の飛行距離が長いために, イオン間同士の距離が十分に離れ, 一般的な装置では同位体や近い質量のイオンも含めてしか選択できないような場合でも, 1 u刻みでピークの選択ができる. したがって, 測定対象の試料の同位体ピーク1つのみをプリカーサーイオンとして選択可能となっている. 通常は, 分子を構成する各元素全てが最小質量の同位体となっているモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択する. (Cならば, 全てが^{12}Cとなる.)

2つ目の特徴として, ポストソース分解 (post source decay, PSD) 由来イオンの排除がある. 試料は, イオン化の際に過剰にエネルギーを与えられ飛行中自発的に解離することがあり, これをPSDという. PSD由来イオンは, 元のイオンとほぼ同じ速度を持つために, 通常の直線型の飛行時間型質量分析計では分離できない. しかし, “MALDI Spiral TOF” では, イオンをらせん軌道で飛行させるために扇形電場を用いている. 扇形電場は特定の運動エネルギーを持ったイオンのみが通過でき, エネルギーアナライザーの役割を果たす. PSD由来イオンは解離前のイオンよりもエネルギーが低くなってしまうために扇形電場を通過できず排除される.

この２つの特徴により, “MALDI Spiral TOF” を通過し選択されたプリカーサーイオンは特定のm/zのみを持つことになる. このようなプリカーサーイオンを, 次に不活性ガスを充填した衝突室に導入する. イオンはガスと衝突する事で内部エネルギーが蓄積され, ある一定のエネルギーを超えると解離する (collision induced dissociation, CID)[11]. “MALDI Spiral TOF/TOF”ではイオンを20 kVで加速しているために, 1 度の衝突でイオンに十分な内部エネルギーが蓄積され, 解離が起こることになる. このように衝突室に導

入される際のイオンの運動エネルギーが大きい場合 (keV以上の場合) を, 特に高エネルギーCIDという. 逆に, 1 衝突あたりのエネルギーが小さく複数回イオンとガスを衝突させてイオンの解離を引き起こす方法を, 低エネルギーCIDという. 低エネルギーCIDでは開裂しやすい結合が選択的に開裂するのに対して, 高エネルギーCIDではイオンに蓄積される内部エネルギーが大きいために低エネルギーCIDでは開裂しないような結合も開裂しうる. そのため, 様々な位置で開裂したフラグメントイオンが検出され, 低エネルギーCIDよりもペプチド等の構造解析において有用であるとされている[12]. しかし, その結果生成されるフラグメントイオンは, 質量に応じた0 - 20 keVもの幅広いエネルギーを持つため, 線形場を有する通常のリフレクトロン型飛行時間型質量分析計では高分解能で測定される範囲が限定され, 複数回条件を変えて測定する必要がある. そこで, “MALDI Spiral TOF/TOF”では, MS-II として “Offset Parabolic Ion Mirror”[13]を採用し, 再加速領域と線形部分および放物線部分を組み合わせることで, 全質量範囲を高感度で一度に十分な分解能で測定可能となっている. こうして得られたマススペクトル (プロダクトイオンスペクトル) には, PSD由来のイオンはほとんど検出されず高エネルギーCID由来のイオンのみが観測されることになる. さらに, プリカーサーイオンとしてモノアイソトピック質量の同位体ピークのみを選択しているため, プロダクトイオンスペクトル上で観測されるピークは, 全てモノアイソトピック質量のイオンのピークということになる. これにより, 解釈を容易に行うことが可能となる. 以上の特徴から, 既存の装置では困難であったり, 細部の構造まで同定できない試料の構造解析を行えるのではないかと期待される.

本研究では, “MALDI Spiral TOF/TOF” を用いて, アプリケーション領域拡大を目指し, 生体分子の構造解析を行った. 特に, 細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質の構造解析においては, グリセリン骨格に脂肪酸が 1 つ結合しているものについては脂肪酸の不飽和結合の位置の同定は報告されている[9]. しかし, 生体内に多く含まれる脂肪酸が 2 つのPCについては, 四重極質量分析計 (QMS) やイオントラップ型質量分析計でそれぞれの脂肪酸の炭素鎖の数や不飽和結合の数は同定されているが, 不飽和結合の位置等の詳細な構造の解析は行われていなかった. 今回 “MALDI Spiral TOF/TOF” を用いることで, 脂肪酸が 2 つ結合したリン脂質についても不飽和結合の位置等の詳細な構造情報を得ることができ, 解析手法を確立するまでに至った. また高エネルギーCIDによるリン酸化ペプチドの修飾部位の同定についても, 既に報告のあるトレオニン以外にもセリン, チロシンのリン酸化を測定し, 部位が同定できることを確認した. 2 章では, MALDIや飛行時間型質量分析計, CIDの原理を説明する. 3 章では, 測定に用いた “MALDI Spiral TOF/TOF” の装置構成, 特徴について説明する. 4 章では, 今回行った“MALDI Spiral TOF/TOF” の分解能, 精度, 感度の評価について報告する. 5 章では, 高エネルギーCIDによるリン酸化ペプチドの修飾部位の特定について報告する. 6 章では, リン脂質の構造解析について報告する.

２章. 測定原理

この章では, MALDI, 飛行時間型質量分析計およびタンデム質量分析法の原理を説明し, 今回測定に用いた“MULTUM-TOF/TOF”および“MADLI Spiral TOF/TOF”の装置構成について説明する.

2.1 マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)

今回用いた装置は, イオン源としてMALDIイオン源を採用しているためここではその原理について説明する.

MALDIが開発されるまでは, 試料にパルスレーザー光を直接照射してイオン化するレーザー脱離イオン化 (laser desorption/ionization, LDI) がペプチド等の生体分子の測定に用いられてきた. この方法では試料が直接レーザー光を吸収しイオン化するため, そのイオン化効率は試料の持つ吸収波長により大きく異なる. 吸収波長とレーザー光の波長が異なる場合は, ほとんどレーザー光を吸収せずイオン化しない. また同じ場合は, 効率よく吸収しイオン化するが, 過剰に与えられたエネルギーによりその後解離等を引き起こしてしまうこともある.

このLDIの問題点を改善するために窒素レーザーの波長 (337 nm) に吸収を持つ物質 (マトリックス) と試料を混合し, 試料を解離分解させることなく (ソフトに) イオン化させる手法 (MALDI) が考えられた. 図 1 のようにパルスレーザー光をマトリックスと混合した試料に照射する. ペプチド等の試料は210 nmや280 nm付近に吸収を持つため, レーザー光を吸収しない. マトリックスのみがレーザー光を吸収し, マトリックスが気化する. その際に試料も気相状態になり, マトリックスとの間でプロトンの授受が起こり, イオン化するとされている[14]. レーザー光のエネルギーをマトリックスが吸収するために試料自身はエネルギーを吸収せず, 解離分解は起こりにくく, LDIと比べるとソフトにイオン化できる. 適切なマトリックスを選択することで, これまで解離させずにイオン化することが困難であったタンパク質・ペプチドなどもイオン化できるようになり, 質量分析計が生命科学の分野で幅広く用いられるようになった.

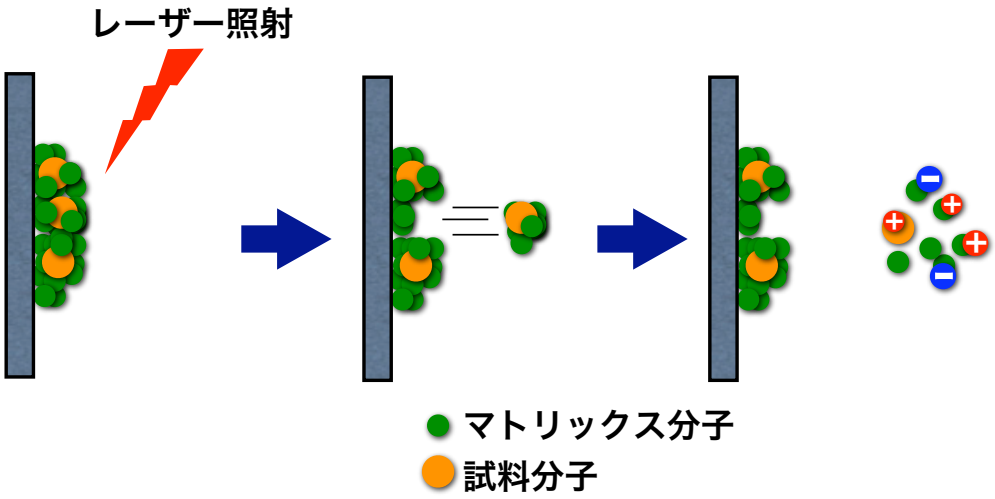


図1. MALDIのイメージ図

2.2 飛行時間型質量分析計の原理

最初に最も一般的な直線型のイオン軌道を持つ飛行時間型質量分析計の測定原理を説明する. 概略図を図２に示す.

電荷を持ち気相状態にあるイオンを加速する. イオンの電荷が正であれば, 通常はイオンが出射する側の電極をアースに繋ぎ, もう1枚の電極に$+V$の電圧を印加する. するとイオンは自由空間に速度vを持って飛び出すとする. イオンの質量をm, 価数をz, 電気素量をeとするとエネルギー保存則から次の式が成り立つ.

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV \qquad \text{式(1)}$$

式(1)から速度vを求めると次のようになる.

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \qquad \text{式(2)}$$

速度vを持ったイオンは, 電場等の影響がない自由空間を飛行する. その距離をLとすると, 飛行時間tは次のように表される.

$$t = \frac{L}{v} \qquad \text{式(3)}$$

式(2), (3)からm/zは次のように表される.

$$\frac{m}{z} = \frac{2eV}{L^2}\,t^2 \qquad \text{式(4)}$$

LおよびVを一定にして飛行時間tを測定すると, m/zを求める事ができる.

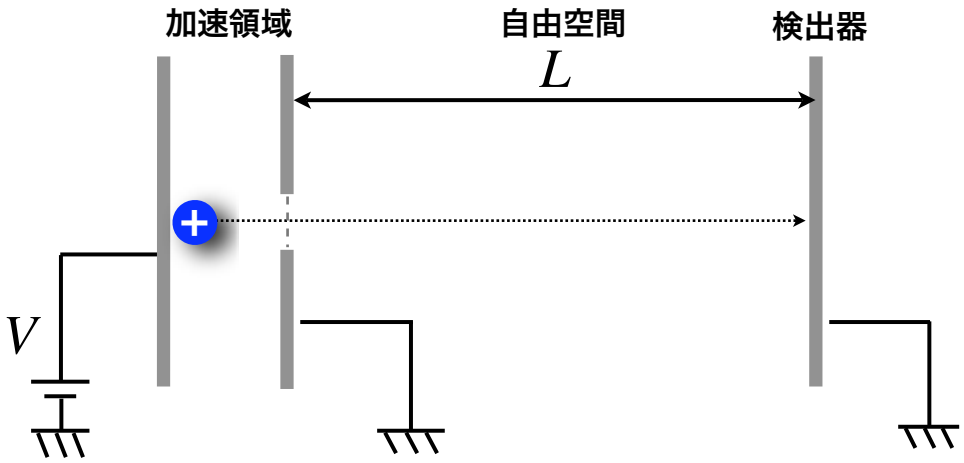


図2. 直線形の飛行時間型質量分析計の概略図

2.2.2 飛行時間型質量分析計の分解能の定義

次に飛行時間型質量分析計の分解能の定義を説明する.

図3aのような横軸がm/z, 縦軸がイオン強度のスペクトル (マススペクトル) が測定されたとする. 分解能はピークの位置をmとし, その半値幅をΔmとすると次のように表される.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad \text{式(5)}$$

この分解能をピークの半値幅で定義するために特にR_{FWHM} (full width at half maximum) という. 例えば, $R_{FWHM} = 1000$の時, m/z 1000, 1001のピークが観測されていると図3bのように観測されることになる (赤の点線が本来の m/z 1000のピーク, 青の点線が本来の m/z 1001のピーク, 塗りつぶしが実際観測されるピーク). このようにm/z 1000と1001を僅かでも分離できていれば, 分解能は1000ということになる.

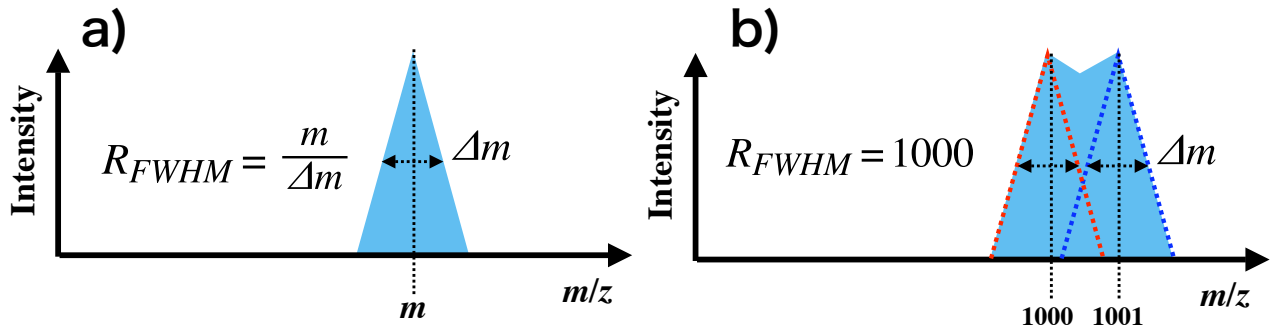


図3. a). 分解能の定義, b). R_{FWHM}=1000でのピークの様子

実際に観測されるのは, 横軸が飛行時間のスペクトル (TOFスペクトル) である. その場合の分解能R_{FWHM}は式(4)から, ピークの位置をtとして, 半値幅をΔtとすると次の式で表される. 式(6)

$$R_{FWHM} = \frac{t}{2\Delta t}$$

この式で表されているように, tのみを大きくできれば分解能は大きくなるが, 同時にΔtが大きくなってしまうと分解能は向上しない. そのために高分解能を実現するためには飛行時間を大きくしつつ, Δtを小さくする (イオンを収束させる) 必要がある.

2.2.3 遅延引き出し(delayed extraction, DE)および二段階加速 (two-stage acceleration)

MALDIでは, イオンはパルス的に生成されるために, イオンをパルス的に加速する必要がある飛行時間型質量分析計と相性が良い. そのために多くの飛行時間型質量分析計のイオン化法としてMALDIが採用されている. しかし, 単にイオンを加速すると分解能は低くなってしまう. これは, MALDIにより生成されるイオンは, 初期速度・初期位置・初期時刻の３つの分布が, 高分解能を実現する上で無視できないほど大きいためであり, 本節で述べるような遅延引き出し法が開発された. MALDIで生成されるイオンの初期速度の大きさは, 750 m/s程度であり±100 m/s程度の分布を持つとされている[15]. 例えばm/z 1000で初期速度が650 m/sと850 m/sの２つのイオンを同時に20 kVの電圧で加速すると, そこから1 mの地点での２つの飛行時間の差は, 粗く見積もって40 ns程度となる. 全飛行時間が, 20 μs程度であるため, これを無視する事はできない.

また初期位置の分布は, 結晶の厚みにより生じると考えられる. 初期位置が異なると飛行距離が変わるだけでなく, 加速される距離も異なるために加速領域を出た後の速度も変わってしまう. 結果として, 飛行時間にばらつきが生じることになる. 調整法や試料, マトリックスの種類によって結晶の大きさは変わるために正確に見積もることはできないが, 結晶の厚みが数 μmのオーダーであることを考えると, 初期位置の分布は10 μm程度だと考えられる. 加速する領域の間隔を20 mmとし, そこにかかる電圧を20 kVとし, 先ほどの条件と同じように, 1 mの地点での10 μmの初期位置の違いによる飛行時間の差は, 5 ns程度となる. これは初期速度の影響と比べると十分に小さいといえる.

初期時刻の分布は, レーザーがパルス的に照射されるといってもその照射時間には数 ns程度の幅があり, さらに分子が脱離しイオン化する時間にもばらつきがあるために生じると考えられる. 実際にはレーザーの照射後すぐにイオンが生成される訳ではなく, 10 ns程度の脱離時間が必要となるためである. この初期時刻の分布は, 直接飛行時間の分布となるために数 ns程度の分布があると思われる. これについても初期速度の影響と比べると十分に小さいといえる.

高分解能を実現するためには, この３つの初期条件, 特に初期速度の分布を持ったイオンを検出器に到達する時間の分布を数 nsのオーダーに抑える必要がある. そこで, MALDIをイオン源とする飛行時間型質量分析計では, イオン源での加速時に遅延引き出し[16]および二段階加速[17]が採用されている. 以下の説明では, MALDIでは初期速度のばらつきの影響がもっとも大きいため, 初期速度のみ分布を持っていると考える.

遅延引き出しとは, レーザー照射後すぐに加速電極に電圧を印加するのではなく, そのタイミングを数100 ns程度 (遅延時間) 遅らせる. 遅延時間後には, イオンは初期速度に応じた位置に存在する事になる(図4). 例えば, 初期速度の大きいイオンは表面から離れた位置に存在し, 小さいイオンは表面近くに位置することになる. レーザーが照射され, t=0にイオンがx=0の位置に生成され, 初期速度v_0を持っているとすると, 遅延引き出し開始時の$t=t_d$での位置$x(t_d)$は次の式で表される.

$$x(t_d) = t_d \,.v_o \qquad \text{式(7)}$$

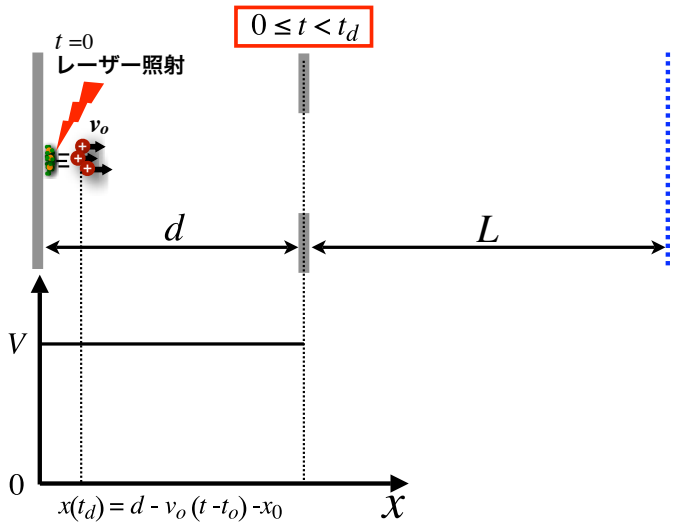


図4. イオン引き出しまでの加速領域でのイオンの運動の様子

そして，間隔dの加速電極に電圧Vを印加すると，速度の大きいイオンは加速される距離が短くなるために運動エネルギーは小さくなり，速度の小さいイオンは大きくなる(図5)．質量mで 1 価のイオンが加速領域を出るまでの時間t_1およびその際の速度v_1は次の式で表される．

$$t_1 = \frac{-v_o + \sqrt{v_o^2 + 2a(d - x(t_d))}}{a} \qquad \text{式(8)}$$

$$v_1 = \sqrt{v_o^2 + 2a(d - x(t_d))} \qquad \text{式(9)}$$

ただし，aは次の式で表される．

$$a = \frac{eV}{dm} \qquad \text{式(10)}$$

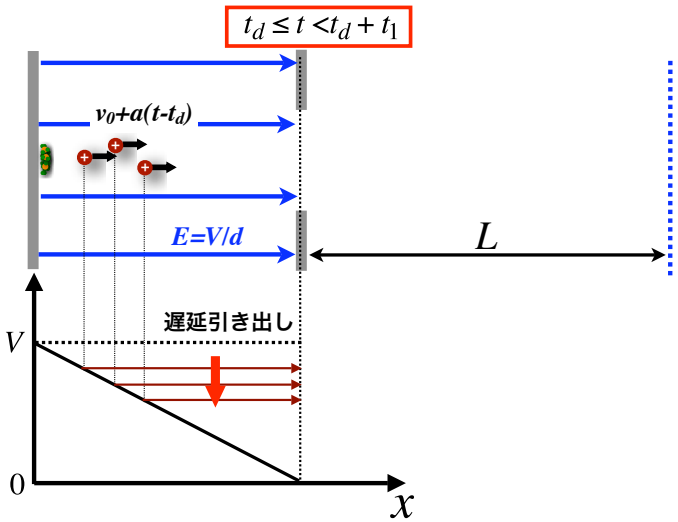


図5. イオン引き出し後の加速領域でのイオンの運動の様子

このイオンが距離Lを飛行する時間は次の式で表される.

$$t_2=\frac{L}{v_1} \qquad \text{式(11)}$$

結局イオンが到達する時刻$t=T$は, 次のようになる.

$$T=t_d+t_1+t_2=t_d+\frac{-v_o+v_1}{a}+\frac{L}{v_1} \qquad \text{式(12)}$$

様々な初期速度を持ったイオンが距離Lの位置に同時に到達する (収束する) ためには以下の条件を満たす必要がある. (図6)

$$\frac{dT}{dv_o}=-\frac{1}{a}+\frac{v_o-at_d}{av_1}-L\frac{v_o-at_d}{v_1^3}=0 \qquad \text{式(13)}$$

式からLを求めると次のように表される.

$$L=\frac{v_1^2}{a}-\frac{v_1^3}{a(v_o-a\,t_d)} \qquad \text{式(14)}$$

すなわち, 式(14)で表される距離Lの位置でイオンは, 収束することになる.

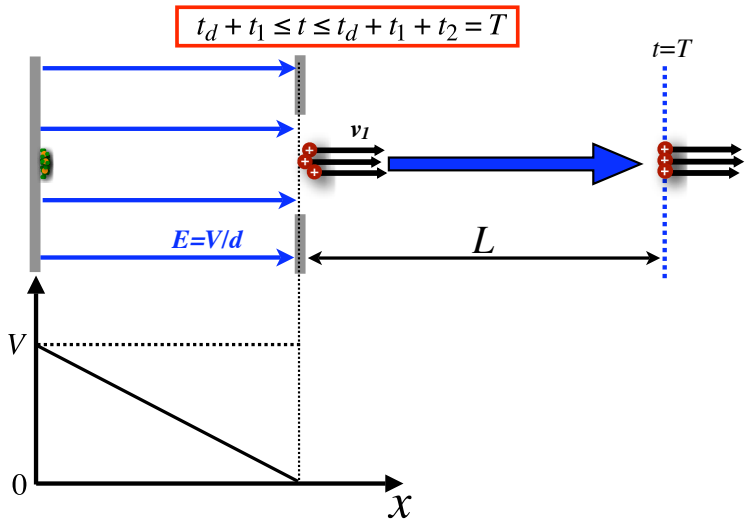


図6. 加速領域を出た後のイオンの運動の様子

aは式(10)で表されているようにイオンの質量や加速電極の間隔, 電圧に依存する. イオンの質量は対象とする試料に依存し, 加速電極の間隔は技術的問題から通常固定して行う. 加速電圧についても変更すると異なる質量間で較正を行うことが困難になるため, 固定する. そのため, 遅延時間であるt_dを変えて, イオンを収束させることになる. t_dを変えると, イオンが実際加速される電圧は変わるが, その影響は加速電圧を変更するよりも遥かに小さい.

式(14)から横軸t_d, 縦軸Lとして, グラフを書くと図7のようになる. t_dおよびL以外については, 次の値で計算を行った (但し, t_0およびx_0は, それぞれt_dおよびdと比べると十分に小さいと考え無視した).

m= 1000 [u], v_0=1000 [m/s], d = 35 [mm], e=1.60×10^{-19} [C], V = 20000 [V]

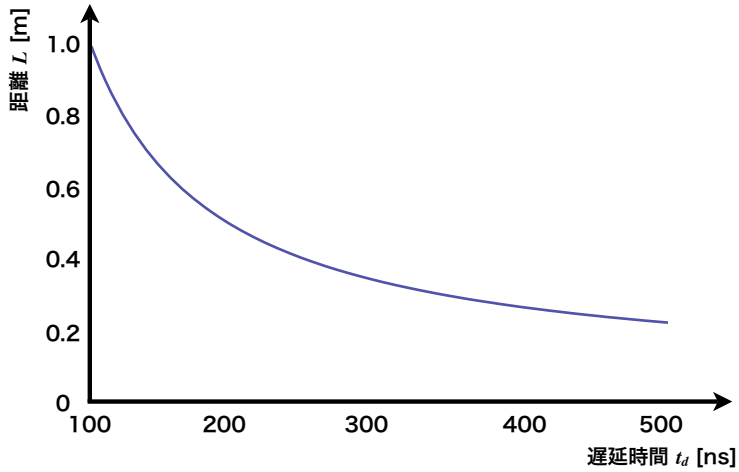


図7. 距離Lと遅延時間t_dの関係

図7のグラフを見ると，遅延引き出しのタイミングを変えることで距離Lを変えられることがわかる．質量が異なるイオンを同時に収束させることはできないが，遅延引き出しの値を調節することで収束させることが可能となる．図8にm= 500, 1000, 2000 [u]のグラフを示す．それぞれ質量以外の条件は同じである．

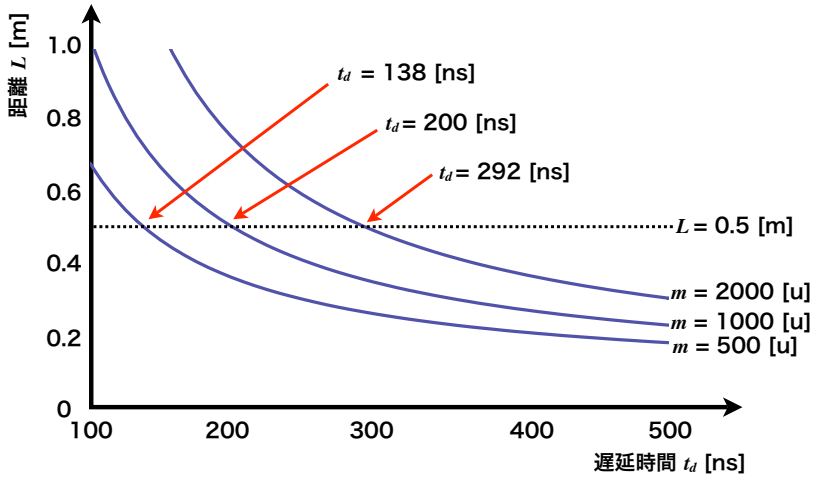


図8. 距離Lと遅延時間t_dの関係 (上から, m=2000, 1000, 500 [u])

質量が異なるために式(14)のv_1やaが変わるために同じ曲線にはなっていないが，遅延時間t_dを変えることで同一の距離Lに収束させることが可能となる．例えば，加速領域から50 cmの位置に検出器がある場合を考える．m= 500 [u]のときは，t_d=138 [ns]，m= 1000 [u]のときは，t_d=200 [ns]，m= 2000 [u]のときは，t_d=292 [ns]にすることで，それぞれイオンを収束させ，高分解能で測定することが可能となる．

また，遅延引き出しと併せて２段階加速も行っている．これは，低質量のイオンの場合，遠くの位置に収束させるt_dは存在するが，100 ns以下の小さい値になってしまう場合がある．この場合，式(7)で表される$x(t_d)$に対する，初期位置および初期時刻の分布の影響が相対的に大きくなり，初期速度の分布の影響を押さえることはできても，分解能が悪くなってしまう．そのため，加速電圧を変化させることになる．例えば，m= 200 [u] のイオンを

t_d=200 [ns]で，L= 0.5 [m]の位置に収束させる条件を考える．図8aのように電極２枚を用いて加速する場合は，１枚目の電極の電位Vを20000 [V]から 4000 [V]まで下げることで，収束させることが可能となる．しかし，この方法では異なる質量のイオンを高分解能で測定するためには，加速電圧を変化させる必要があり，較正を行うことが困難となる．そこで通常はイオンを２段階で加速し，異なる質量のイオン間の運動エネルギー差を大きくすることなく，高分解能で測定できるようにしている．図8bのように２段階加速を行うことで，V_1=20000 [V]にしたまま，V_2の電圧を変えることで距離Lを変化することが可能となり，イオンを収束させることが可能となる．ただし，１段目の電極の間隔を3 mm，２段目の電極の間隔を20 mmとして計算を行った．

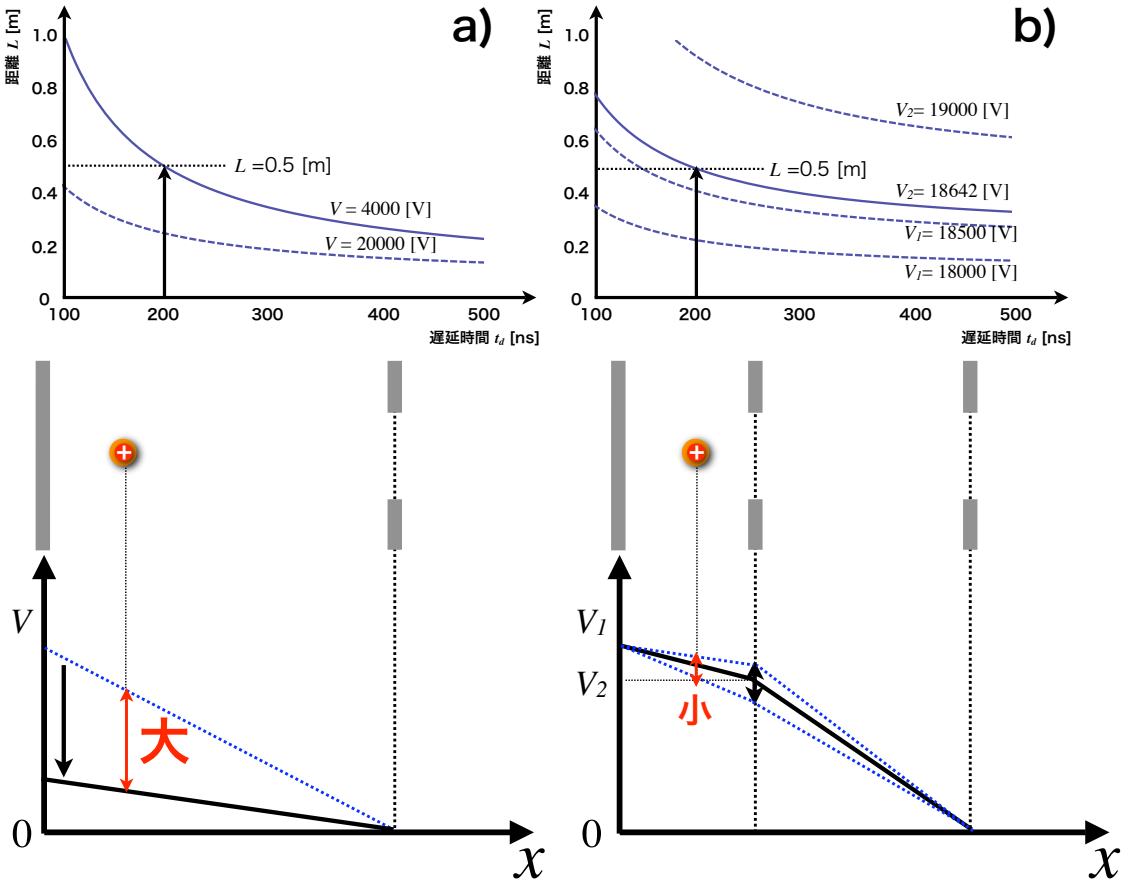


図8. １段階加速と２段階加速の比較 (上: 距離Lと遅延時間t_dの関係. 下: 模式図)

2.3 タンデム質量分析法 (MS/MS)

タンデム質量分析法とは，２台の質量分析計で行う質量分析法を意味し，MS/MSと表される．今回，測定に用いたのは，タンデム飛行時間型質量分析計である．この装置は実際に２つの装置を直接空間的に連結させて行うtandem in spaceと呼ばれるタンデム質量分析法になるので，これにしたがって説明する．(もう一方をtandem in timeと呼び，イオントラップやフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計等で，イオンを空間中に閉じ込めて連続的な時間経過で行われる．こちらは１台の装置で行われる．)

イオン源でMALDIやESI等の方法で，試料に電荷を与え気相中に取り出す (図10①)．その際に目的の試料以外のものも同時にイオン化するため，1台目の質量分析計(MS-Ⅰ)である特定のm/zを持つイオンのみを選択する (図10②)．そして，選択したイオン(プリカーサーイオン)を不活性ガスや電子と衝突させたり，光を照射することで励起させて，イオン内の結合の開裂を引き起こし断片化させる．例えば，１価の電荷を持ったプリカーサーイオンが２つに解離すると，通常電荷を持ったイオン (フラグメントイオン) と電荷を持たないフラグメントが生成される (図10③)．フラグメントイオンを2台目の質量分析計(MS-Ⅱ)で質量分析する．この方法で得られたスペクトルをプロダクトイオンスペクトルと呼ぶ(図10④)．フラグメントイオンの質量およびプリカーサーイオンの質量から試料の構造を解析する．例えば，ペプチドやタンパク質は表1に示される20種類のアミノ酸が多数繋がった物であり，マススペクトルを測定して質量からそのアミノ酸の組み合わせの候補を挙げることは可能であるが，その順番 (配列) までは同定することができない．しかし，図10④のように右から１つずつ取れたようなフラグメントイオンが観測されれば，それぞれの質量差から順番を同定することが可能である．実際のスペクトルは様々なパターンのフラグメントイオンが検出されるために図の④のようなスペクトルが検出される事は稀だが，“MASCOT”[18]等のデータベース検索を用いて配列の同定を行っている．

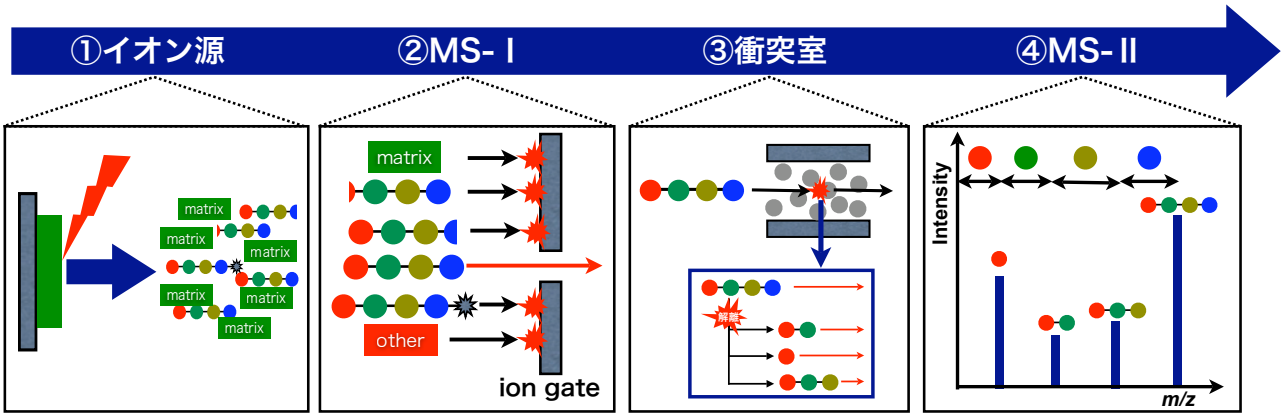


図10. タンデム質量分析法の流れ

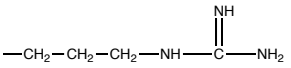
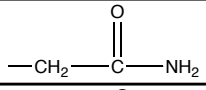
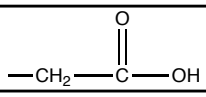
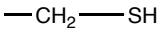
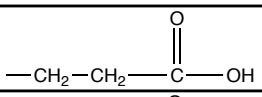
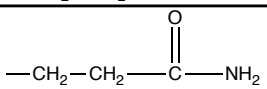
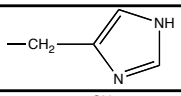
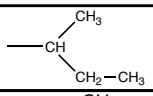
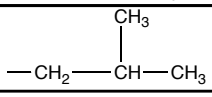
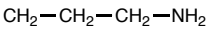
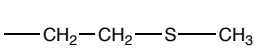
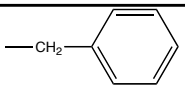
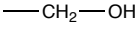
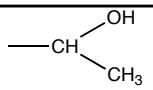
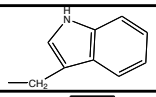
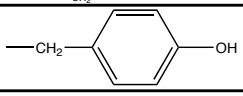
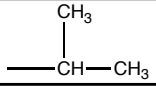
アミノ酸	略号	側鎖の構造	側鎖の質量
アラニン	Ala / A		15
アルギニン	Arg / R		100
アスパラギン	Asn / N		58
アスパラギン酸	Asp / D		59
システイン	Cys / C		47
グルタミン酸	Glu / E		73
グルタミン	Gln / Q		72
グリシン	Gly / G		1
ヒスチジン	His / H		81
イソロイシン	Ile / I		57
ロイシン	Leu / L		57
リシン	Lys / K		72
メチオニン	Met / M		75
フェニルアラニン	Phe / F		91
プロリン	Pro / P		41
セリン	Ser / S		31
トレオニン	Thr / T		45
トリプトファン	Trp / W		130
チロシン	Tyr / Y		107
バリン	Val / V		43

表１．２０種類のアミノ酸一覧

2.4 衝突誘起解離 (collision induced dissociation)

今回用いた装置では，プリカーサーイオンの解離方法としてCID [11]を採用しているため，この項ではCIDについて説明する．CIDの模式図を図11に示す．

MS- I で選択したプリカーサーイオンを不活性ガス (今回はHeを用いた) を充填した衝突室に導入すると，イオンとガスが衝突 (相互作用) する．衝突によりイオンは内部エネルギーを蓄積し，エネルギー準位が高い励起状態のイオンになり，解離が起こる．これをCID (衝突誘起解離) という．

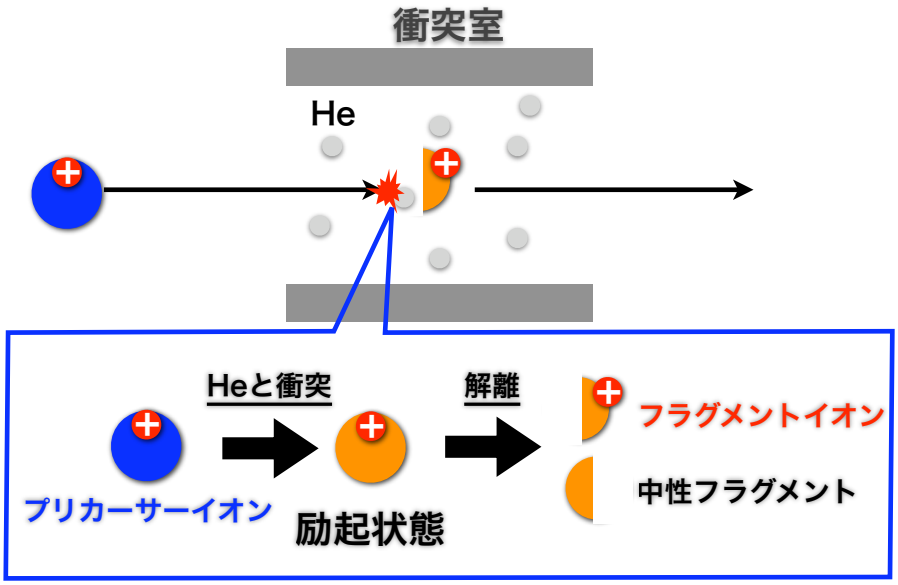


図11. CIDの模式図

さらに衝突室に導入する際の実験室系から見たイオンの運動エネルギーで解離機構が異なることから，高エネルギーCIDと低エネルギーCIDの２つに分類される．次頁以降説明する．(今回は，イオン化法として用いたMALDIでは，大半が1価の正イオンとしてイオン化されるため，これに則して説明する)

2.4.1 低エネルギーCID

低エネルギーCIDとは，ガスと衝突する際のイオンの運動エネルギーが，実験室系で200 eV以下の条件で行われるCIDを意味する．低エネルギーCIDは，イオントラップやフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計，三連四重極質量分析計等の装置で行われ，ガスを充填した中にイオンを導入し，ガスと衝突させる．一度の衝突でイオンに蓄積する内部エネルギーでは結合の開裂を引き起こすことはできず，イオンとガスを多数回衝突させてはじめてイオン内の結合を開裂することが可能となる．

ペプチドの低エネルギーCIDでは，結合の開裂にモバイルプロトンが必要とされている[19]．このモバイルプロトンはイオン化した際は，エネルギー的に最も低い位置に存在しているが，ガスとの衝突によりイオンに内部エネルギーが蓄積され，他の位置に移動することが可能となる．塩基性アミノ酸が配列内に存在しない場合は，モバイルプロトンはN末端に位置しており，それがペプチド結合に移ることで結合の開裂が引き起こされる(図12)．そして開裂した後に，電荷が付加されやすい側に移り，フラグメントイオンが生成される．低エネルギーCIDでは，主にBiemann標記 (図13) [20]で表されるb, yイオンが生成される．配列内に塩基性アミノ酸が存在しない場合は，比較的配列全体の構造を反映したフラグメントイオンが得られ，配列を同定することが可能となる．しかし，塩基性アミノ酸 (特にアルギニン) が存在する場合は，イオン化の際にプロトンが塩基性アミノ酸に束縛される．そのため，プロトンは移動することができず，近傍で開裂したフラグメントイオンが主に検出される事になり，配列を同定することが困難となる．

また，ポストソース分解 (PSD) により生成されるフラグメントイオンは，低エネルギーCIDで生成されるフラグメントイオンと同じような傾向があるとされている．これは，イオン化後，イオンがマトリックス等と衝突することによりイオンにエネルギーが蓄積され起こるというモデルが考えられている[21]．

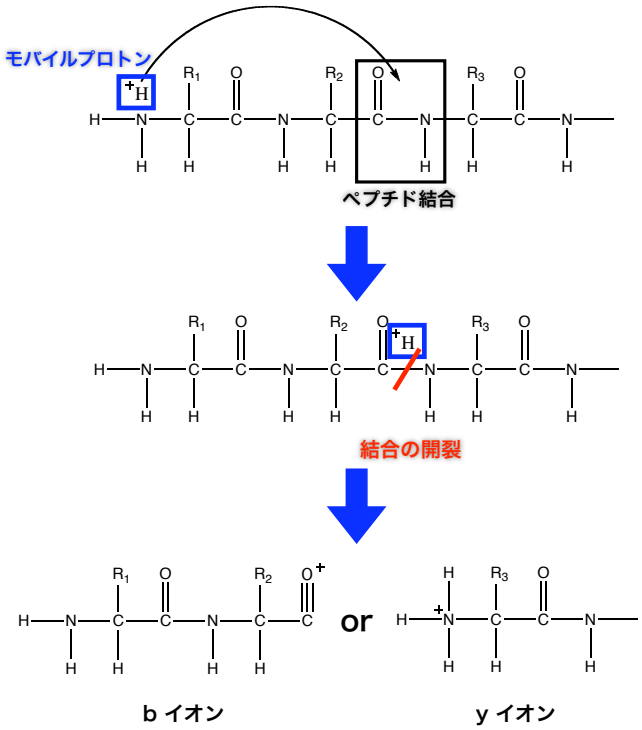


図12. 低エネルギーCIDでのペプチド結合の開裂の様子

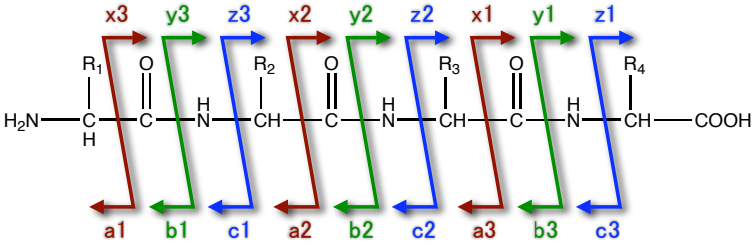


図13. Biemann標記

2.4.2 高エネルギーCID

高エネルギーCIDとは, ガスと衝突する際のイオンの運動エネルギーが, 実験室系で1 keV以上の条件で行われるCIDを意味する. 高エネルギーCIDは, タンデム飛行時間型質量分析計や磁場型質量分析計等のように, イオンを1 kV以上の電圧で加速する装置で行われる. 一度の衝突でイオンに十分な内部エネルギーを蓄積することができ, 結合の開裂を誘起できる. そのため, ペプチドの高エネルギーCIDでは低エネルギーCIDと異なり, プロトンはイオン内部にアルギニン等のプロトンを局在化させる構造があっても動くことが可能となる. 結果として, 低エネルギーCIDよりも比較的アミノ酸配列に依存しない構造を反映したフラグメントイオンが得られる.

また, ペプチド結合で開裂した後も十分なエネルギーがイオンに残っているため, そこからさらに結合の開裂が起こる. 低エネルギーCIDでは, イオンの内部エネルギーが徐々に蓄積されるために, ペプチド結合の開裂が起こっても, bやyイオンで止まってしまう. しかし, 高エネルギーCIDではイオンに一度に結合エネルギーを大きく上回る内部エネルギーが蓄積されるために, ペプチド結合が開裂て生成されたb, yイオンは, さらに解離することもある[22]. 図14aのように, bイオンからはaイオンが生成され, 末端のアミノ酸残基にβ炭素が存在する場合は, 側鎖 (R_2') が取れたイオンが生成される. yイオンからは図14bのように, 末端のアミノ酸残基にβ炭素が存在する場合は, wイオンが生成される. このd, wイオンによりロイシン・イソロイシンやリシン・グルタミンの判別が可能となる. ロイシン・イソロイシンは異性体で側鎖の質量は同じであるが, 側鎖の構造は異なる. ロイシンの場合は1種類のdイオンが生成される (図15a) のに対して, イソロイシンでは2種類のdイオンが生成されることになる (図15b). すなわち, dイオンとaイオンの質量差を見ることで, ロイシン・イソロイシンの判別が可能となる. またリシン・グルタミンについては, 組成式は異なるが, 質量差が0.036 uと非常に近いために, 通常の測定ではどちらか判別できない. しかし, 構造の違いからaイオンとdイオンの強度比が異なるために, 強度比から判別することができる. aイオンからdイオンを生成する際に側鎖の構造をラジカルとして放出する必要があるが, リシンではこのラジカルが不安定であるためにdイオンへの解離は起こりにくくaイオンが相対的に強く検出される. 一方, グルタミンではこのラジカルが安定であるために放出が起こりやすくdイオンが相対的に強く検出されることになる. ロイシン・イソロイシンやリシン・グルタミンの判別は低エネルギーCIDでは困難とされており, ペプチドの構造解析を行う上で, 高エネルギーCIDは低エネルギーCIDよりも有用であるとされている[12]. ただし, 高エネルギーCIDでは, 多数回衝突が起こるとイオンの散乱やフラグメントイオンのさらなる解離が起こってしまう. 結果としてピーク強度が弱くな

り，検出されるピークも低質量のものが大半になる．通常は全質量範囲のフラグメントイオンをみるために，イオンとガスを 1 回衝突させる条件で測定を行う．

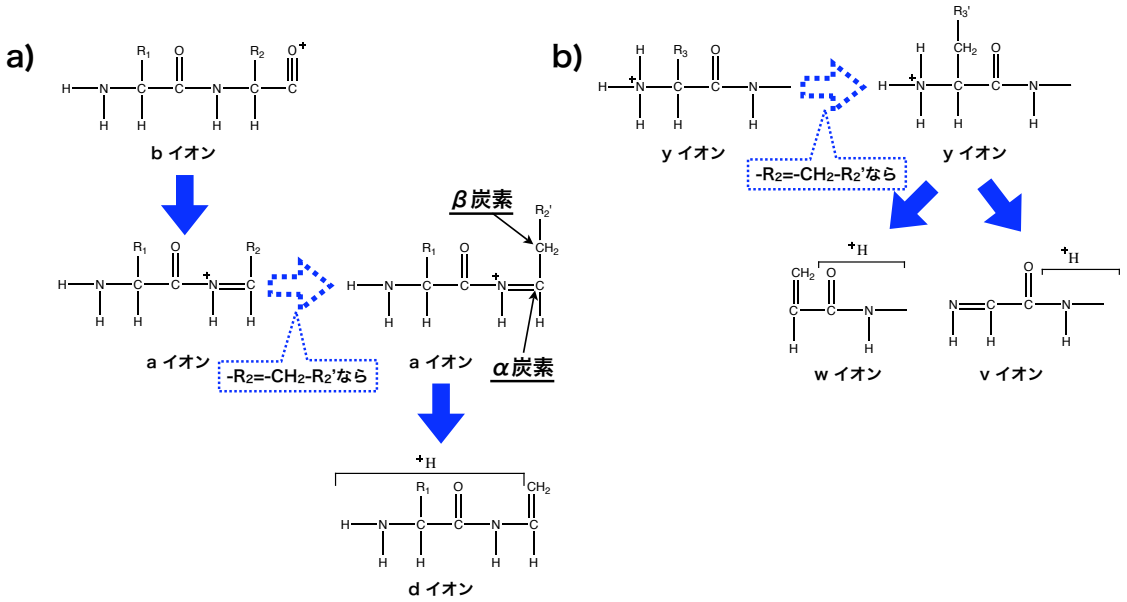


図14. 高エネルギーCIDでのペプチド主鎖の開裂
(a. a, d イオン生成, b. y, w, v イオン生成)

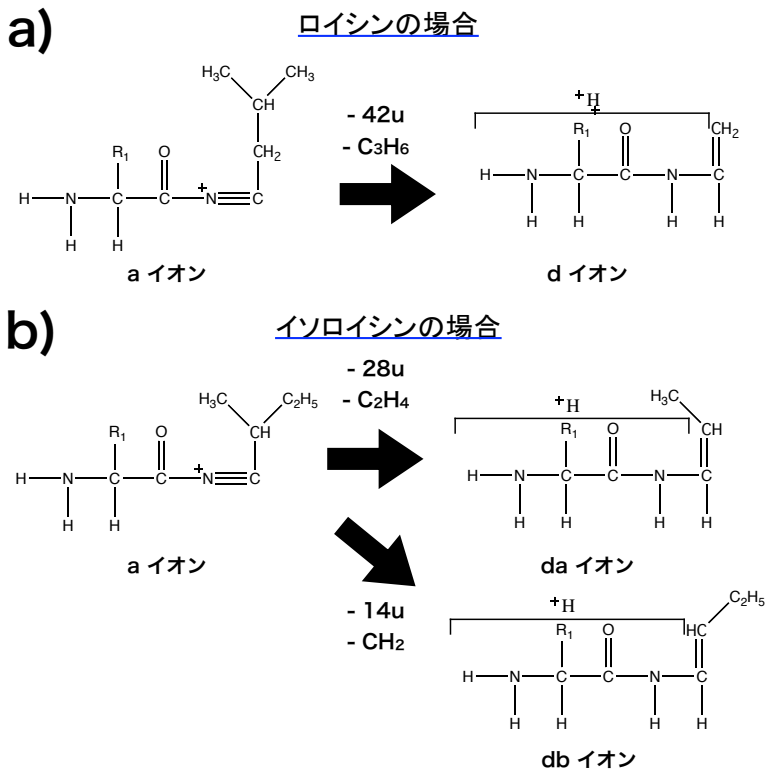


図15. d イオンによるロイシン・イソロイシンの判別(a. ロイシン, b. イソロイシン)

2.4.3 チャージリモートフラグメンテーション(CRF)

ペプチド以外の脂肪酸や脂質等の構造解析においても，高エネルギーCID特有のチャージリモートフラグメンテーション (CRF) を用いた構造解析が報告されている[9,24]. $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ のようなイオンで，内部に電荷を局在化させるような構造があるものをCIDで測定すると，電荷の位置から遠く離れた結合が電荷が直接関与せずに開裂する．これをチャージリモートフラグメンテーション(CRF) といい，高エネルギーCIDで主に観測される．CRFによるフラグメントイオンはしばしば規則的に起こるとされ，構造解析において有用であるとされている[23-25]. 例えば，脂肪酸のCRFではカルボキシル基にアルカリ金属を付加し，電荷を局在化させることで行われる．この場合，アルキル鎖の末端からアルカンに相当する質量が脱離したフラグメントイオンが連続的に検出される．結合の開裂に電荷が直接関与しないために電荷からの距離にあまり影響を受けず開裂が起こる．C-C結合が繰り返されるため，プロダクトイオンスペクトルで観測されるピークの間隔は，14 u刻みになり，ピーク強度も同程度のものになる．アルキル鎖中の炭素の 1 つに側鎖構造がある場合や不飽和結合が存在する場合は，14 u間隔のピーク中に変化が現れるため，位置を特定することが可能となる (図16a) .また，不飽和結合がある場合は，単結合と比較すると結合エネルギーが，1.7 倍程度大きいために結合の開裂が起こりにくく，不飽和結合に相当するピークの強度は弱く検出される．また，不飽和結合の前後の結合で開裂したピークの強度も比較的弱く検出されるため，スペクトル中に54 uの間隔が見られる [24] ことになり，その位置を同定することが可能となる (図16b).

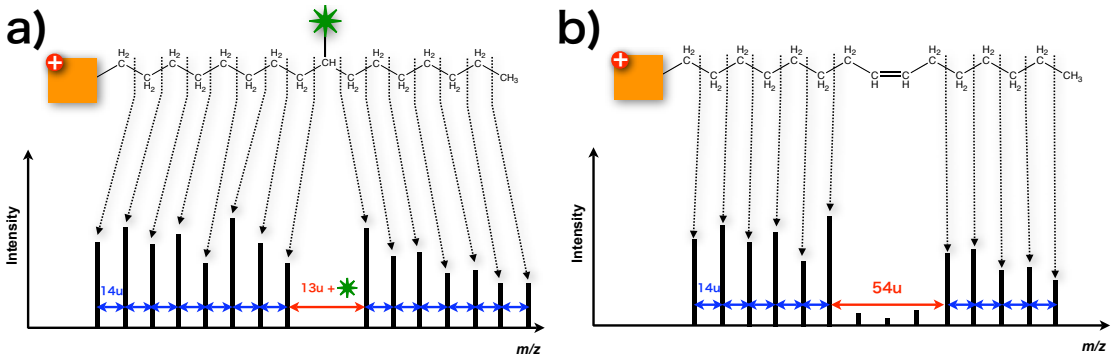


図16. CRFによる構造解析の様子 (a: 付加部位の同定, b: 不飽和結合位置の同定)

このようにCRFは分子の構造解析において非常に有用であると言える．ペプチドでもアミノ酸が繰り返して並んでおり，アルギニンなどがあるとそこに電荷が固定されるため，CRFが同じように起こっていると考えることもできる．

2.5 タンデム飛行時間型質量分析計のMS-IIに求められる性能

タンデム飛行時間型質量分析計のMS-IIとして求めれる性能ついて説明する． 一般的なタンデム飛行時間型質量分析計では，イオンをCIDなどで解離させ，その結果生成されるフラグメントイオンをMS-IIで質量分析することになる．プリカーサーイオンはガスと衝突することで，その運動エネルギー (K_p) の一部がイオンの内部エネルギー (U) やガスの運動エネルギー (K_g) に変換され，解離しフラグメントイオンおよび中性のフラグメントとなる．本来ならUやK_gが存在しているために，K_pとフラグメントイオンおよび中性のフラグメントの運動エネルギー (K_f, K_n)との間には保存則が成り立たないが，K_pからみるとUや K_gは数十 eVと十分小さいため，式(15)が成り立つと考えることができる．

$$K_p = K_f + K_n \qquad \text{式(15)}$$

質量m_pのプリカーサーイオンが，質量m_fのフラグメントイオンと質量 (m_p-m_f)の中性フグラメントに解離したならば，フラグメントイオンの運動エネルギーK_fは，プリカーサーイオンの速度v_pを用いて，次の式で表される．

$$K_f = \frac{m_f}{m_p} K_p = \frac{1}{2} m_f v_p^2 \qquad \text{式(16)}$$

すなわち，フラグメントイオンは速度v_pで運動することになる．しかし，実際は図17のように解離した後，分離するための運動エネルギーΔKが必要となる．

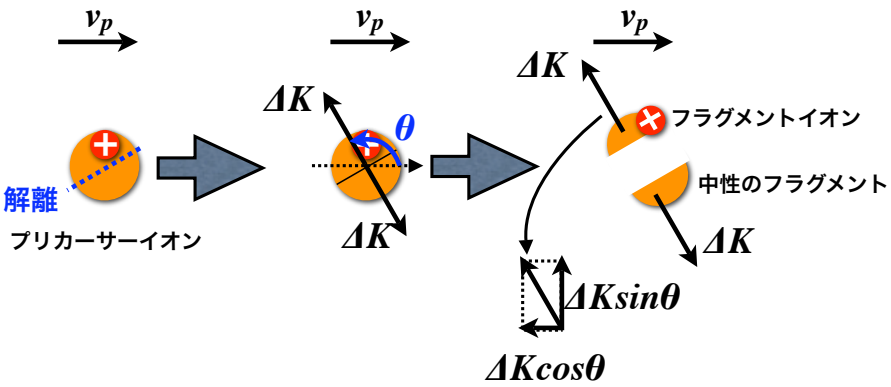


図17. 解離後のイオンの分離の様子

フラグメントイオンは，速度v_pで動く系からみて，x軸方向から角度θの方向に分離したとすると，フラグメントイオンの実験室系での運動エネルギーのx軸方向成分K_{fx}およびy軸方向成分K_{fy}は次の式で表される (プリカーサーイオンの進行方向をx軸方向，それに垂直な方向をy軸方向とする)．

$$K_{fx} = \frac{1}{2} m_f v_p^2 + \Delta K \cdot \cos\theta = \frac{m_f}{m_p} K_p + \Delta K \cdot \cos\theta \qquad \text{式(17)}$$

$$K_{fy} = \Delta K \cdot \sin\theta \qquad \text{式(18)}$$

ΔKは，運動エネルギー放出 (kinetic energy release; KER) と呼ばれるエネルギーであり，その大きさは数 - 数十 eV程度である[26]．そのためにy軸方向の運動エネルギーはx軸方向のそれよりも十分に小さく無視することができ，フラグメントイオンはプリカーサー

イオンと同じx軸方向に飛行していると考えられる. 実際にフラグメントイオンの速度のx方向成分をv_{fx}およびy方向成分v_{fy}とするとそれぞれ次の式で表される.

$$v_{fx} = v_p + \sqrt{\frac{2\Delta K \cdot \cos\theta}{m_f}} \qquad \text{式(19)}$$

$$v_{fy} = \sqrt{\frac{2\Delta K \cdot \sin\theta}{m_f}} \qquad \text{式(20)}$$

実際, K_p=20000 eV, m_p=1000, m_f=500, θ=45°, ΔK=10 eVとすると, x軸方向に1 m飛行する間にy軸方向には0.3 mmしか飛行せず, x軸方向に比べると遥かに小さい. 結果としてフラグメントイオンは式(19)に表される速さで, x方向に飛行していると考えられる. しかし, θは一定値ではなく, 360°全ての値を取りうるためにフラグメントイオンは, 以下の速度の幅を持っていると考えられる.

$$v_p - \sqrt{\frac{2\Delta K}{m_f}} \leq v_f \leq v_p + \sqrt{\frac{2\Delta K}{m_f}} \qquad \text{式(21)}$$

すなわち, MS-IIには, プリカーサーイオンと同程度の速度を持ち, 同じ質量でも速度に分布を持つフラグメントイオンを分離する能力が求められる.

2.6 リフレクトロン

タンデム飛行時間型質量分析計のMS-Ⅱとして用いられるのが, リフレクトロン[27,28]とよばれる飛行時間型質量分析計である. 概略図を図18に示す.

フラグメントイオンの進行方向に対して垂直な方向から図のように角度ϕをつけて２枚の電極を配置する. P1の電極の電位を0, P2の電極の電位をV_rとすると, 電極の間隔であるd_oの間は一様な強さの電場が発生する. フラグメントイオンは, ポテンシャル場に入るまで距離L_1の第一自由空間を飛行する. そしてポテンシャル場に入るとフラグメントイオンは均一の電場Eから力を受ける. そして次の式で表される到達深度dで折り返す.

$$d = \frac{K_f}{eV_r} d_o \qquad \text{式(22)}$$

但し, ϕは, ３°程度であるために式は以下の近似を行った.

$$\cos\phi \sim 1 \qquad \text{式(23)}$$

角度ϕをつけているためにフラグメントイオンは同じ場所には戻らず, 図18のような軌道を描き, 距離L_2の第二自由空間を飛行し, 検出器に到達することになる. 検出器に到達するまでのフラグメントイオンの飛行時間は次の式で表される. 但し, 式(23)の近似を用いている. (MALDIでは, 1価のイオンが主に生成されるために価数は1価とする.)

$$t = (L_1+L_2)\sqrt{\frac{2K_f}{m_f}} + 2\frac{d_o}{eV_r}\sqrt{2K_f m_f} \qquad \text{式(24)}$$

この式をフラグメントイオンの速度v_fを用いて書くと次のようになる.

$$t = \frac{L_1+L_2}{v_f} + 2\frac{d_o}{eV_r} m_f v_f \qquad \text{式(25)}$$

第１項は自由空間での飛行時間にあたるために質量が異なっても速度が同じなら飛行時間は同じになるが, 線形ポテンシャル場での飛行時間は, 質量にも依存するためにリフレクトロン型飛行時間型質量分析計ではフラグメントイオンを分離することが可能となる.

しかし, 式(21)で示したようにv_fには分布が存在する. そのためリフレクトロンでは, 同じ質量のイオンが検出器に同時に到達するように飛行時間を速度で微分した値が0となる条件で測定を行う. 飛行時間を速度で微分すると以下の式が得られる.

$$\left.\frac{dt}{dv_f}\right|_{v_f=v_p} = -(L_1+L_2)\, v_p^{-2} + 2\frac{d_o m_f}{eVr} = 0 \qquad \text{式(26)}$$

この式を式(22)のdを用いて変形すると次の式が得られる.

$$L_1+L_2 = 4d \qquad \text{式(27)}$$

dは, 式(22)で表されるようにフラグメントイオンの運動エネルギーに依存するためにその質量により変わる. そのため, 各dに対して, (L_1+L_2) を変える必要があるが, 電極を動かすのは手間がかかり, 困難であるためにV_rの値を変えてdの値を式(27)を満たすようにした上で測定を行う. 実際は, 式の条件から多少ずれても十分な分解能で測定できるために, 7, 8回程度Vrの値を変えて測定を行い, １つのプロダクトイオンスペクトルを得る.

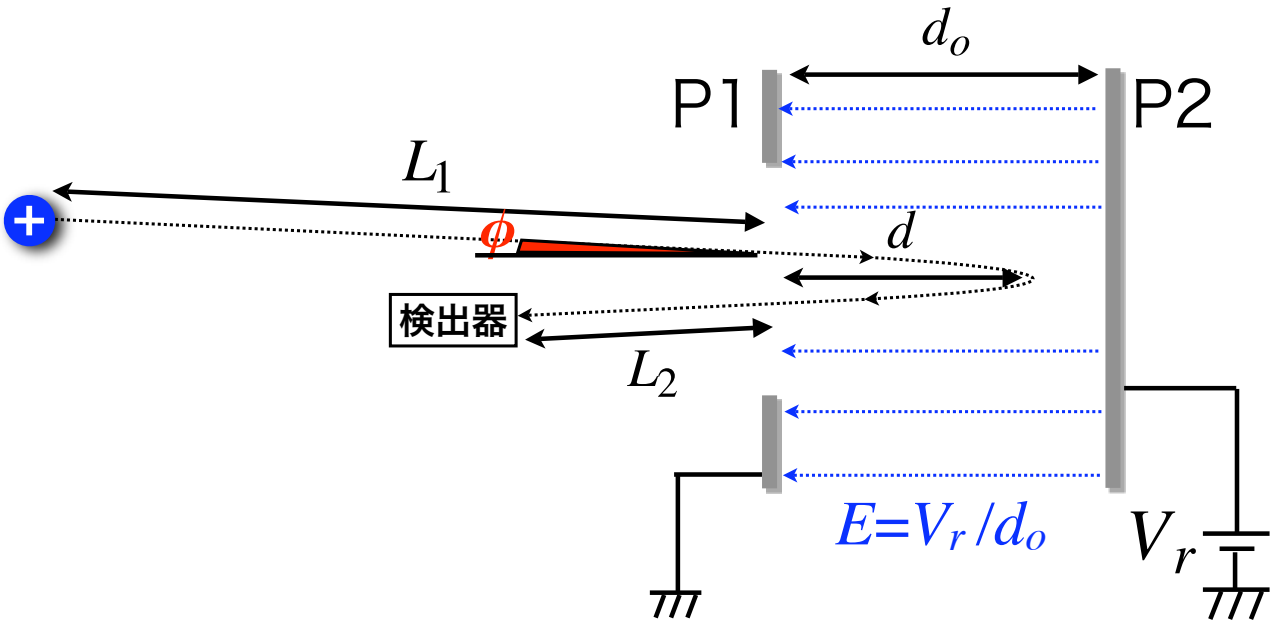


図18. リフレクトロン型飛行時間型質量分析計の概略図

3章. 装置説明

この章では，最初に当研究室で開発されたマルチターン飛行時間型質量分析計“MULTUM”について説明し，今回測定に用いたタンデム飛行時間型質量分析計“MALDI Spiral TOF/TOF”について説明する．

3.1 マルチターン飛行時間型質量分析計 “MULTUM”

2.2で示したように，飛行時間型質量分析計の分解能は，飛行時間tを大きくすればするほど向上する．しかし，飛行時間を稼ぐために単純に飛行距離を伸ばすのではピーク幅Δtも大きくなり，分解能の向上はあまり得られず，同時に透過率の低下も招いてしまう．それだけでなく，装置の大型化も必要となり設置場所は限定されてしまう．

そこで開発されたのが，“MULTUM Linear plus”である[29]．“MULTUM Linear plus”では，4個の円筒電極と28個のQレンズを組み合わせてイオンを８の字型の軌道で飛行させている．イオンは同一軌道を周回し，装置を大型化させることなく飛行距離を稼ぐことが可能となる．さらにこのイオン軌道は，周回前と後でイオンの運動エネルギー，位置，角度が変わらず，また飛行時間が質量にのみ依存する完全収束条件を満たしているために，周回数を増やして飛行距離を稼いでもピーク幅は大きくならず，透過率の減少も残留ガスとの衝突による散乱のみとなる．現在では，“MULTUM Linear plus”と同じ完全収束条件を満たしつつ，Qレンズを排除し４個のトロイダル電場のみで構成される“MULTUMⅡ”が開発されている[5,30]．図19に“MULTUMⅡ”の写真を示す．

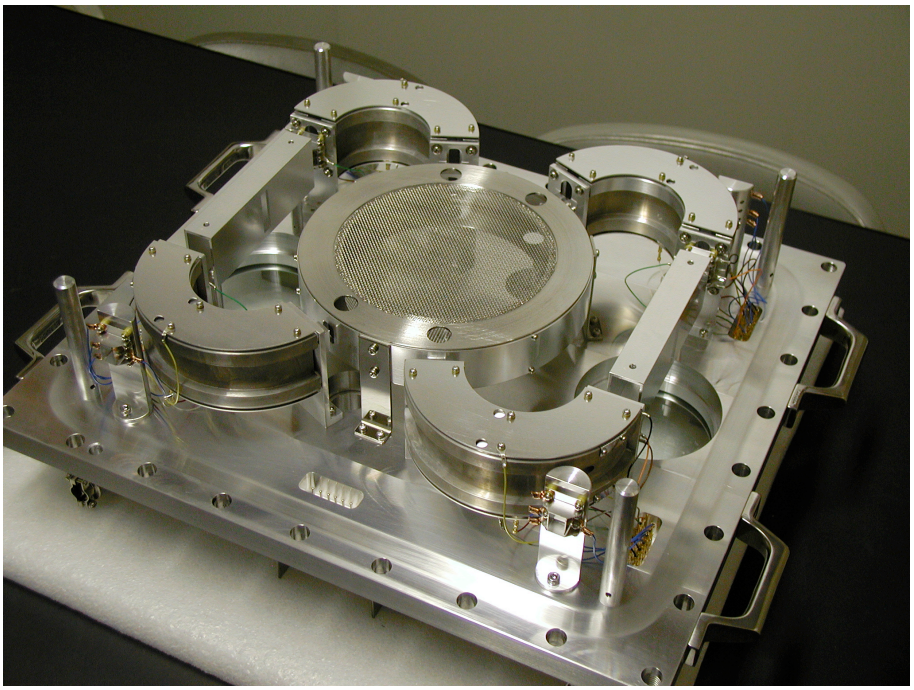


図19. “MULTUMⅡ”装置写真

3.2 PSD由来イオンの排除

ここでは，“MULTUM II” 等の扇形電場を用いてイオン軌道を曲げる飛行時間型質量分析計で可能な，PSD由来イオンの排除について説明する．

“MULTUM II”では，イオンを図20のように扇形電極を用いて軌道を曲げている．イオンの価数を 1 価，質量をm，運動エネルギーをKとし，2 枚の電極の間隔をd_sとし，外側の電極の電位を$+V_s$，外側の電極の電位を$-V_s$とする．2 枚の電極間に生じる電場Eの大きさは次の式で表される．

$$E = \frac{2V_s}{d_s} \qquad \text{式(28)}$$

イオンの軌道半径をrとすると，力のつりあいから次の式が成り立つ．

$$\frac{2U}{r} = eE \qquad \text{式(29)}$$

通常は，イオン源で加速電圧V_aで加速されたイオンが周回するように設定するために次の条件が成り立つ．

$$\frac{V_a}{V_s} = \frac{r}{d} \qquad \text{式(30)}$$

PSDにより生成されたフラグメントイオンの運動エネルギーは，CIDのときと同様に式(16)で表されるため，PSD由来イオンは扇形電極で過度に軌道を曲げられることになる．その結果，これらのイオンは電極にぶつかったり周回軌道から外れたりするため，排除され検出器まで到達できない．

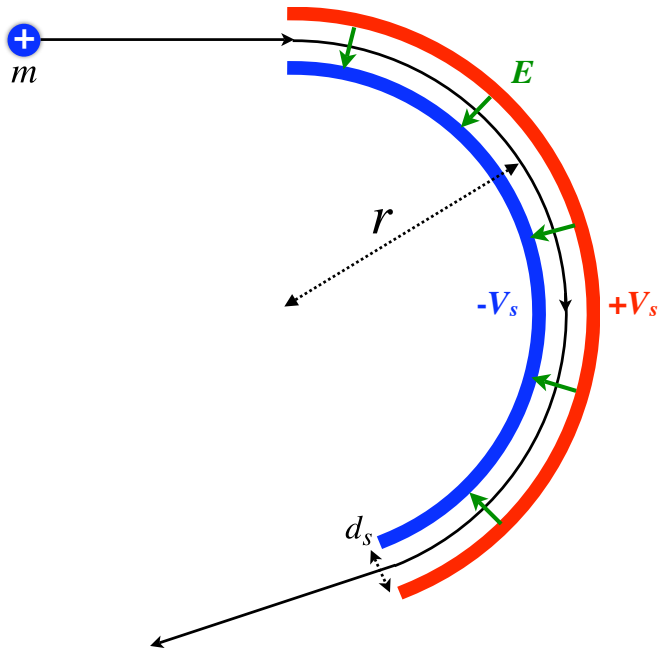


図20. “MULTUM II”の１つの電極での周回の様子

3.3 追い抜き問題

ここでは, “MULTUM II” 等の多重周回飛行時間型特有の問題であるイオンの追い抜きについて説明する. “MULTUM II”を例に挙げて説明する. “MULTUM II”では, 以下の手順で測定を行っている.

イオンを加速し, イオン源側の電極 (セクターIV) を通過するまでは, セクターIVの電場をoffにし, イオンを周回軌道に導入する. セクターIV 以外の 3 つの電極については電場をonにしておく. 周回軌道にイオンを導入した後. セクターIVの電場をonにし, イオンを周回させる. そして, 十分な飛行時間になったら検出器側の電極 (セクター I) の電場をoffにし, イオンを周回軌道から出射し検出する.

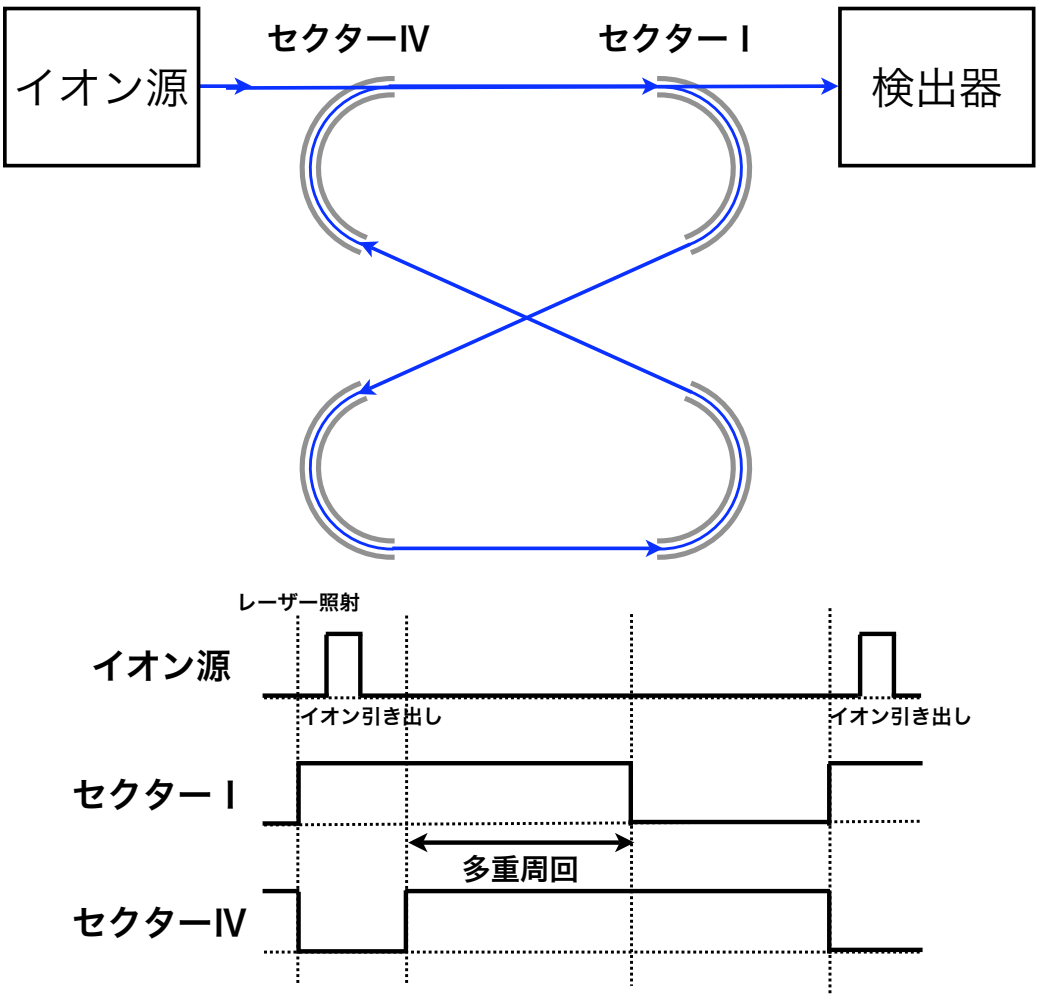


図21. “MULTUM II”の模式図およびタイミングチャート

イオンを同一軌道で周回させ, 任意のタイミングでセクター I の電場をoffにしているために, 質量が異なるイオンを同時に測定するとイオン間に追い抜きが起こり, 本来なら先に到達するはずの質量の小さいイオンが遅れて検出器に到達し, 遅れて到達するはずの質量の大きいイオンが先に到達してしまう場合がある. また, 質量の小さいものから順に検出器に到達した場合でも, イオン間の周回数に差が生じ, 飛行時間から質量に式(4)のように一意的に求めることができず, 複雑なスペクトルが検出されることになる.

イオン間の追い抜きが起こっているスペクトル (横軸が飛行時間であるためにTOFスペクトルと表記する) の例を図21に示す. このスペクトルは, “MULTUM II”と同じ光学系を

採用しているマルチターンタンデム飛行時間型質量分析計“MULTUM-TOF/TOF”で測定を行った. bradykinin fragment 1-7 ($[M+H]^+$=757), angiotensin II ($[M+H]^+$=1047), angiotensin I ($[M+H]^+$=1297), P14R ($[M+H]^+$=1534), ACTH fragment 18-39 ($[M+H]^+$=1534) の試料を混合して同時に測定し, 周回軌道に 5 種類のイオンを導入後, 200 μs後に検出器側の電極をoffにし得られたスペクトルになる. 本来なら最も早く検出器に到達するはずの質量が最も小さい bradykinin fragment 1-7 が, 最も遅れて検出器に到達してしまっている. それ以外のイオンについては, 質量の小さいものから順番に検出器に到達しているが, 周回数は異なっている. それぞれのイオンの周回数を計算すると質量の小さいものから順番に9, 8, 8, 6, 11周となっておりイオン間の追い抜きが起こってしまっている. 通常は, 追い抜きを避けるためにセクターⅠおよびⅣのタイミングを制御して, 追い抜きが起きない質量範囲のイオンを周回軌道に導入して, 測定を行っている.

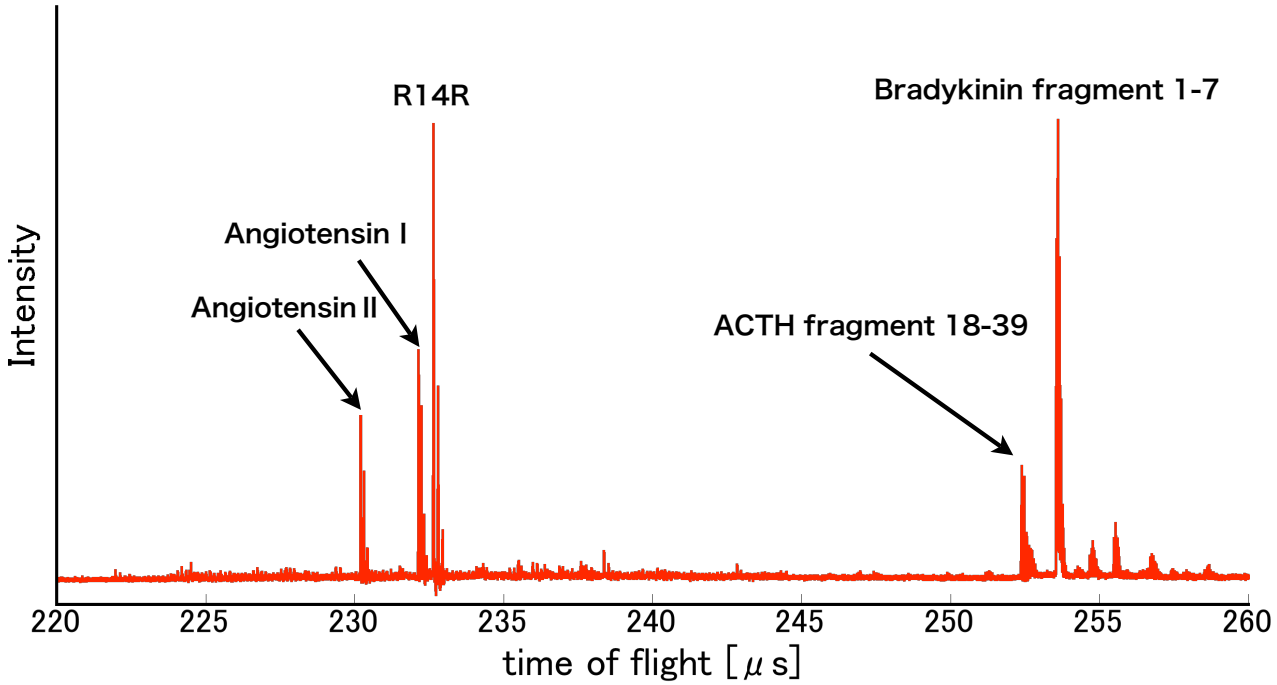


図22. 追い抜きが起こっているTOFスペクトル

3.4 らせん状のイオン軌道を持つタンデム飛行時間型質量分析計 “MALDI Spiral TOF/TOF”

この項では，“MALDI Spiral TOF”[10] に衝突室および“Offset Parabolic Ion Mirror”[13] (以後, イオンミラーと表記する)を組み合わせたタンデム飛行時間型質量分析計 “MALDI Spiral TOF/TOF” について説明する. 装置図を図23に示す.

最初にMS-Ⅰである “Spiral TOF”について説明する. 前項で, 多重周回飛行時間型質量分析計では追い抜き問題を克服するために質量範囲を制限して測定を行うと説明したが, 幅広い質量範囲を測定するためには複数回測定する必要がある. 質量範囲を制限することなく追い抜き問題を克服するために “MULTUMⅡ”のイオン光学系にらせん軌道の要素を加えた光学系を採用した飛行時間型質量分析計が開発された[31]. この装置の光学系は,*x-y*平面では,“MULTUMⅡ”の光学系を採用し, *z*軸方向には “MULTUMⅡ”とは異なり速度を持たせて同一軌道をイオンが飛行することを回避し, イオンの追い抜きが起きないようになっている. EIイオン源を採用して幅広い質量範囲で高分解能を達成している[31]. 光学系はほぼ同じでMALDIイオン源を採用した “MALDI Spiral TOF” [10]においても, ペプチドを測定し, 分解能 70000を達成している[10].

今回測定に用いた“MALDI Spiral TOF”の各電極構造について説明する. 図23のように４つのトロイダル電場 (TES 1, TES 2, TES 3, TES 4) からなり, 各電場は*z*軸を軸として同心円上に配置された２枚の扇形電極に９個のマツダプレート[32]が*x-y*平面から*z*軸方向に1.6°傾けた状態で等間隔で取り付けられ生成されている. このようにすることで, “MULTUMⅡ”の扇形電極が*x-y*平面から*z*軸方向に1.6°傾けた状態で*z*軸方向に8個並んだ状態と同じになっており, *x-y*平面からみると合計8周分８の字軌道を描くことになる. ただし, 電極の大きさおよび間隔は, “MULTUMⅡ”の1.60 倍となっているために，1 周の飛行距離も2.093 mとなっており, 合計の飛行距離は17 mとなっている. MALDIにより生成されたイオンは，*y* 軸方向から1.6° *z* 軸方向に傾いた状態で20 kVの電圧で加速され, “MULTUMⅡ”と同じ８の字型の軌道を*x-y*平面では描きつつ, *z*軸方向には速度を持った状態で飛行し, らせん状の軌道を通過することになる.

らせん軌道の7周回後の位置に, イオンゲートが設置されており, on/offのタイミングを切り替えることで, プリカーサーイオンの選択を行う. イオン源で加速されてからの飛行距離が, 15 m程度と非常に長いので, 質量2500 u程度までのイオンを1 uの範囲で選択することが可能である[13]. これにより, モノアイソトピック質量の同位体ピークのみを選び, MS/MSを行うことが可能となる. また, “MALDI Spiral TOF”でも扇形電場を用いているためにPSD由来イオンの排除が行われており, 選択されたイオンにはPSD由来イオンは, ほとんど含まれていない. 但し, “MALDI Spiral TOF”以降でPSDにより生成したイオンについては, プリカーサーイオンと同じように検出される.

選択されたイオンは衝突室で, ガスと衝突しする. イオンは20 keVの運動エネルギーを持っているために高エネルギーCIDが行われていることになる.

生成されたフラグメントイオンは, MS-Ⅱであるイオンミラーで質量分析されることになる. イオンミラーのポテンシャルは, 図24のように再加速領域および線形と放物線を組み

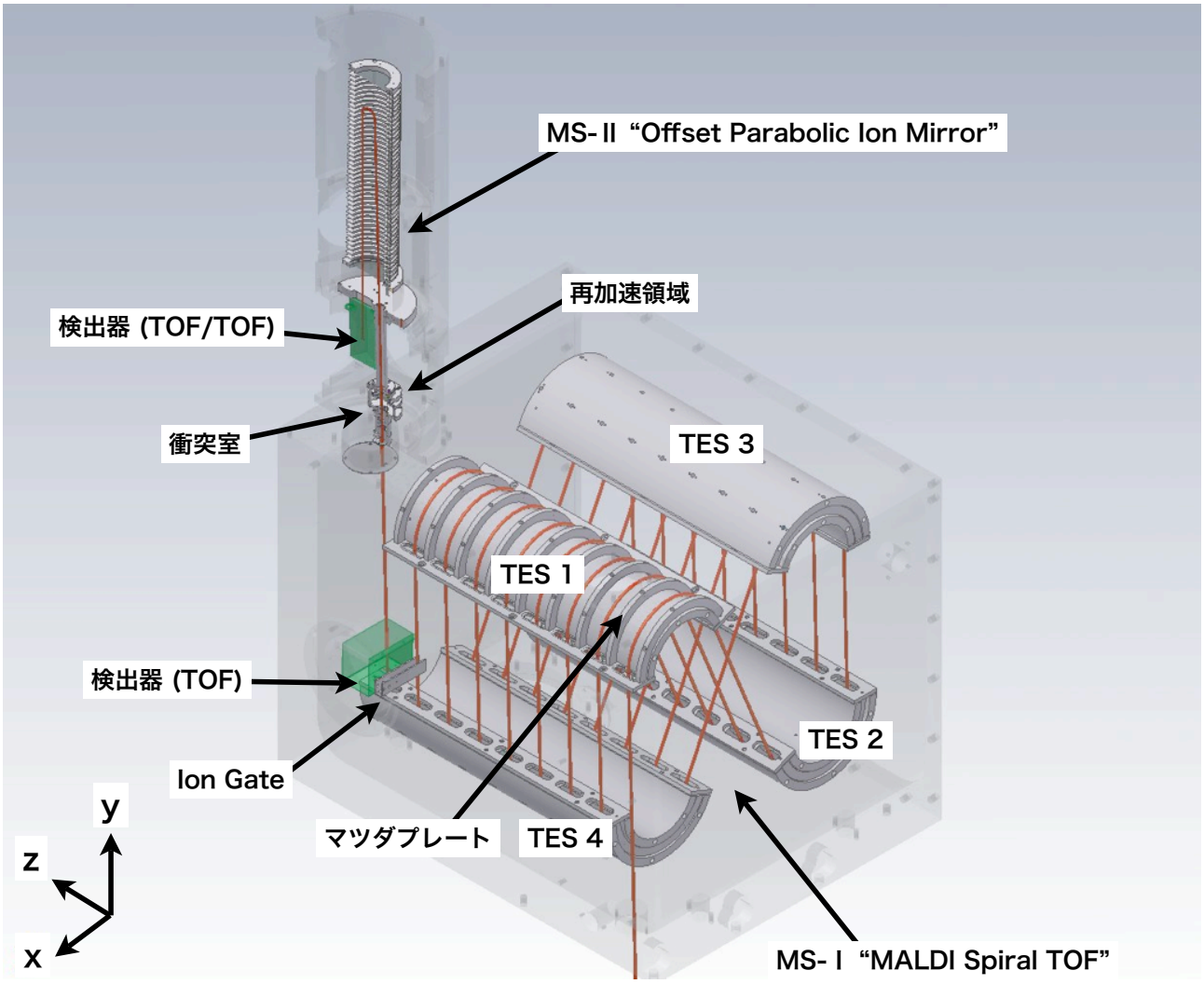


図23. “MALDI Spiral TOF/TOF”の装置図

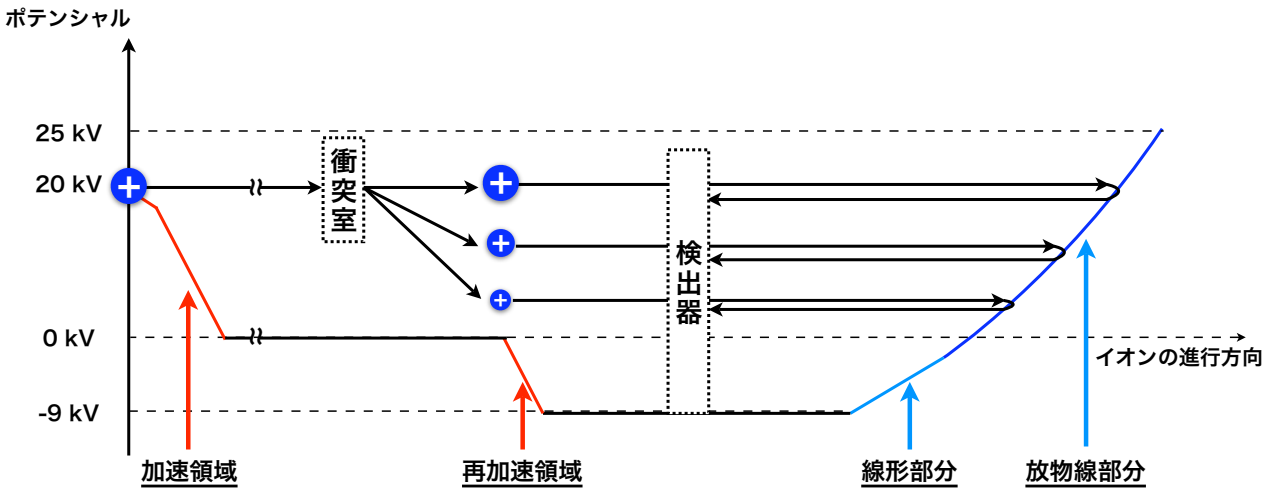


図24. “MALDI Spiral TOF/TOF”のポテンシャル図

合わせたものとなっている.

式(31)で表される放物線のポテンシャルでは, イオンは単振動を行う (イオンの進行方向をz軸方向とする).

$$U = \frac{1}{2}kz^2 \qquad \text{式(31)}$$

ポテンシャルでの飛行時間τは, 単振動の半周期に当たり, イオンの質量をmとすると, 次の式で表される.

$$\tau = \pi\sqrt{\frac{m}{k}} \qquad \text{式(32)}$$

速度に依存せず質量にのみ依存するため, イオンミラーのポテンシャル場に放物線のポテンシャル場を採用することで, 式(21)で表される速度の幅を持つフラグメントイオンを収束させて質量分析できる. また, リフレクトロンと異なり, 飛行時間にイオンの速度が依存していないために, 全質量範囲のフラグメントイオンをスキャンすることなく, 収束させて測定することが可能となる. しかし, 衝突室直後から放物線のポテンシャル場を発生させることは, 機械設計上困難であり, MS-Ⅱには自由空間が存在することになる. 自由空間での飛行時間は, 速度に依存するため, その分イオンは空間的に広がり, ピーク幅は広がってしまう. そこで, “MALDI Spiral TOF/TOF”では, 放物線場に直線場を組み合わせている. 直線場を採用することで, リフレクトロンの場合と同様に自由空間でのイオンの広がりを収束させることが可能となっている. 放物線場だけでないために, 飛行時間が速度に依存し, 一度に全質量範囲を収束させることはできないが, リフレクトロンよりも広い範囲を十分収束させつつ, 多少の自由空間をとることが可能となっている. 機械設計上, 十分な自由空間をとるために, さらに再加速領域を組み合わせ, フラグメントイオンの運動エネルギーの広がりを相対的に圧縮し, 十分な自由空間をとることが可能となっている [13].

4章. 実験１ 「“MALDI Spiral TOF/TOF” の性能評価」

最初に測定条件について説明する. イオン源の模式図を図25に示す.

イオン源としてMALDIイオン源を採用している. N_2レーザー (Laserterchnik Berlin GmbH, MNL-100) からのレーザー光をマトリックスと混合した試料に照射してイオン化させている. レーザーは, 30 Hzの周波数で照射し, その強度は, NDフィルター (シグマ光機, VND-50U) を用いて調整を行っている. 生成されたイオンは, グリッド電極を用いて加速される. サンプルプレートから3 mmの位置にグリッド電極G1, 20 mmの位置にグリッド電極G2があり, この３つの電極を用いて２段階に加速を行っている. G2は, 常にアースに接続されている. サンプルプレートおよびG1を20 kVの電位にフロートされている. レーザー照射後, 任意の遅延時間t_d‘の後, G2の電位を-V_G下げることによりイオンの引き出しを行う. 但し, 回路の応答などにより遅延時間の実効値t_dは, t_d‘の値に200 ns程度を加えた値となる. イオンはサンプルプレートとG1の間およびG1とG2の間で２段階に加速されることになる. ３つの電極は全て, x-z平面からz軸からy軸方向に1.6°傾けられた平面に設置されている (x,y,z軸の方向は, 図18と同じである). そのため, 加速されるイオンもy軸方向からz軸方向に1.6°傾いた状態 (図25左) となっている. V_Gの値は, 後述する検出器(TOF) (ETP, 14880 Option1)で測定を行う場合は, 3000 V, 検出器 (TOF/TOF) (ETP, 14882 Option1) で測定を行う場合は. 2000 Vとした.

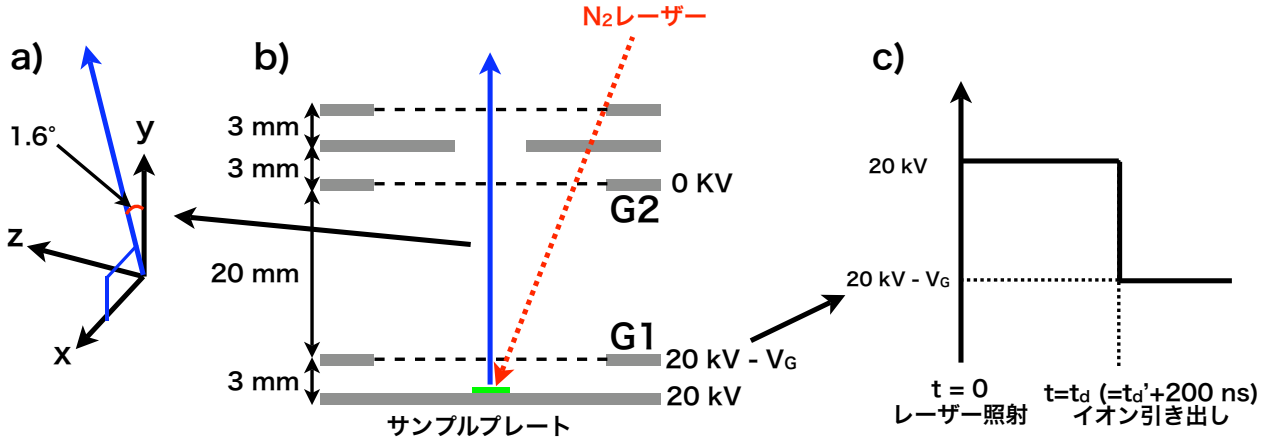


図25. イオン源の様子

(a. イオンの進行方向, b. 模式図, c. 引き出し電極G1のタイミング)

図23の “Spiral TOF”の各扇形電極に印加する電圧は, 全ての実験を通して内側-4.0 kV, 外側+4.0 kVとした. またマツダプレートについても, +0.73 kVで固定した. マススペクトルを測定する場合は, 図23で検出器(TOF)と書かれている二次電子増倍管を用いる. この検出器は, 計測ソフトウェア上のモードを“TOF”に切り替えるとイオン軌道上に移動し, イオンを検出できるようになる. この検出器の電圧を2600~2800 Vの間で調節することで, ゲインを変えることができる. モードを“TOF/TOF”にすると検出器(TOF)は, 軌道から外れ, イオンは検出器(TOF/TOF)まで到達できるようになる. 検出器(TOF/TOF)の電圧は, 3000-3200 Vの間で調節することができる. イオンゲートのon/offのタイミングは, delay generatorで制御されており, delayとwidthを操作することでイオンの選択を行えるよう

になる (レーザー照射後, delayの設定値の時間が経ってからwidthの設定値の間だけ, イオンはイオンゲートを通過することができる). 衝突室の不活性ガスとしてヘリウムガスを用い, その量はニードルバルブを用いて導入した. 導入量は, 衝突室の真空ゲージの値を見て調節した. ガスを充填していない時の真空度は, 8×10^{-6} Pa程度であり, そこからの変化としてガスの量を衝突室の真空度で表す. イオンミラーの各部の電圧は, 再加速電圧は9 kV, ミラーの再奥部の電位は25 kVで固定して行った. 計測される飛行時間は, 遅延引き出しのタイミングをトリガーとして, イオンが検出されるまでの時間となっている.

以後の実験の測定条件では, 実験毎に調節した値である測定モードおよびレーザー強度 [%], 2段階加速の一段目の電圧に相当するV_G [V], 遅延時間 t_d‘ [ns], 検出器電圧 [V], 積算回数 [shot]を示す. MS/MSの場合は, イオンゲートのwidth [ns], 衝突室の真空度 [Pa]について示す.

4.1 飛行時間型質量分析計としての評価

タンデム質量分析計としての評価を行う前にMS-Ⅰである“MALDI Spiral TOF”の飛行時間型質量分析計としての評価を行った.

4.1.1 分解能の評価

最初にらせん状のイオン軌道により期待される高分解能の評価として以下の実験を行った.

実験1: Angiotensin Ⅰ ($[M+H]^+$=1297) (ペプチド研究所より購入) を単体で測定し, 分解能を求めた.

実験2: Angiotensin Ⅰ とinsulin ($[M+H]^+$=5730) (Sigma-Aldrichより購入) を混合し, 質量が離れたものでも同時に高　分解能で測定可能か実証した.

実験3: 標準的なペプチドであるsubstance P ($[M+H]^+$=1348) (ペプチド研究所より購入) の配列 (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Pfe-Pfe-Leu-Met-NH_2) の3番目のLys (146.069 u) をGln (146.105) に置換したペプチド (以後, 3-Glnと表記する.) を林化成にて合成し, substance Pと混合して測定し2つを分離できるか試みた. これらの質量差は. 単一のアミノ酸の質量差としては最小の0.036 Uである. これを分離するのに必要な分解能 (R_{FWHM}) は, 37000となる.

実験4: タンパク質であるubiquitin ($[M+H]^+$=8564) (Sigma-Aldrichより購入) とcytochrome c ($[M+H]^+$=12362) (Sigma-Aldrichより購入) を測定し, 同位体を分離できるか試みた.

i)**測定手順**

マトリックスとして

α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (α-CHCA) (Sigma-Aldrichより購入), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) (Bruker Daltonicsより購入), sinapic acid (Flukaより購入)の固体マトリックス(以後, α-CHCA(solid), DHB (solid), sinapic acid (solid) と表記する) およびα-CHCAの液体マトリックス (以後, α-CHCA (liquid) と表記する) を用いた. 固体マトリックスは, 試薬をアセトニトリル (Sigma-Aldrichより購入) と水, trifluoroacetic acid (TFA) (Sigma-Aldrichより購入) を体積比で 1：1：0.0005 で混合したものを溶媒として10mg / mLの濃度で調整し作成した. 液体マトリックスは, α-CHCAの100 %メタノール (和光純薬工業より購入) 飽和溶液150 μLに対し3-amino quinoline (Sigma-Aldrichより購入) を35 mg溶解させ, 作成した.

実験1では, 水に体積比で0.1 %TFAを加えた溶液 (以後, 0.1%TFAと表記する) を溶媒としてangiotensin Ⅰを1 pmol/μLで調整し. α-CHCA (solid) と1:1で混合し, 0.5 μLをサンプルプレートに滴下し測定した.

実験2では, 0.1%TFAを溶媒として, 2つの試料を様々な濃度比で混合し, 強度が同程度になる濃度を調べた. その結果, angiotensin Ⅰが50 fmol/μL, insulinが

5 pmol/μLのとき，同程度の強度になったので，この濃度の溶液にα-CHCA (solid) を1：1で混合し，サンプルプレートに0.5 μLを滴下し，測定を行った．

実験3では，0.1％TFAを溶媒として，合わせた濃度が1 pmol/μLになるようにsubstance Pおよび3-Glnをともに500 fmol/μLの濃度で混合した．２つの試料は，配列がほとんど同じであるために同程度の強度で検出されることが期待される．その溶液をα-CHCAと1：1で混合し，0.5 μLを滴下し，測定を行った．

実験4では，0.1％TFAを溶媒として，ubiquitin, cytochrome cを10 pmol/μLで調整した．ubiquitinについては，α-CHCA (solid)，α-CHCA (liquid) それぞれと1：1で混合し，0.5 μLをサンプルプレートに滴下し測定を行った．cytochrome cは，α-CHCA (solid)，α-CHCA (liquid), sinapic acid (solid), DHB (solid) それぞれと1：1で混合し，0.5 μLをサンプルプレートに滴下し測定を行った．

ii)**測定結果および考察**

実験1 測定結果

他の条件は固定して，レーザー強度を35 %から１ %刻みで上げていったところ，41 %でイオンが検出され，43 %からは安定してイオンが検出された．そこからは，イオン強度は増えるが，ピーク幅が太くなって行ったためにレーザー強度は，43 %とした．そして，t_d‘の値を0 nsから10 ns刻みで大きくしていったところ，40 nsまでは，ピーク幅は細くなり，それ以降はピーク幅は太くなったため，この値で測定を行った．積算回数は，後述する実験2と比較するために1000 shotとした．測定結果を図26に示す．ピークの半値幅は3.9 nsとなり，angiotensin I のモノアイソトピック質量の同位体ピークのR_{FWHM}は40300となった.測定条件は次のようになる．

測定モード：TOF, レーザー強度：43 %, V_G：3000 V, t_d‘：40 ns

検出器電圧：2600 V, 積算回数：1000 shot

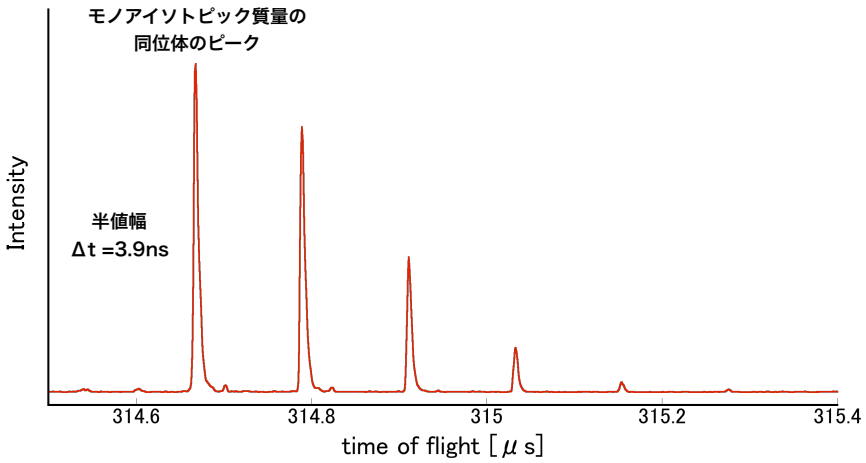


図26. Angiotensin I ([M+H]⁺=1297)のTOFスペクトル

実験1 考察

レーザー強度を大きくするとピーク幅が太くなったのは, 結晶中のマトリックスに過剰なエネルギーが与えられ, 爆発的に広がり, その際に試料も一緒に広がる. 結果として初期位置の分布が大きくなったためだと思われる. ピークの半値幅が, 3.9 nsとなったが, これはイオンが実際に飛行時間として3.9 ns程度の広りを持っているとも考えられるが, 測定に用いた検出器の応答が3 ns程度であるため, これが主な原因であると思われる.

実験2 測定結果

実験 1 と同じように最初にレーザー強度を設定した. レーザー強度が, 45 %のときイオン強度は弱かったが, 安定して検出され, これ以上のレーザー強度ではピークが太くなり, insulinの強度がangiotensin I の強度に対して, 相対的に弱くなっていたため, このレーザー強度で測定を行った. 強度が弱かったため検出器電圧を最大の2800 Vとした. t_d‘については, angiotensin I は, 実験1と同じように40 nsで, ピーク幅は最も細くなったが, Insulinのピーク幅が太くR_{FWHM}は20000前後であった. そのため, t_d‘の値を大きくしたところ80 nsで, insulinのピークが最も細くなり, angiotensin I のピーク幅も40 nsのときと比較すると多少太くなったが, 分解能は30000以上であったためにこの条件で測定を行った. 積算回数は, insulinの各同位体ピークが十分なS/N比となった, 1000 shotとした. 測定結果を図27に示す. angiotensin I のモノアイソトピック質量の同位体のピークのR_{FWHM}は31000, insulinについてはR_{FWHM}は28000となった. 測定結果を図27に示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF, レーザー強度 : 45 %, V_G : 3000 V, t_d‘ : 80 ns

検出器電圧 : 2800 V, 積算回数 : 1000 shot

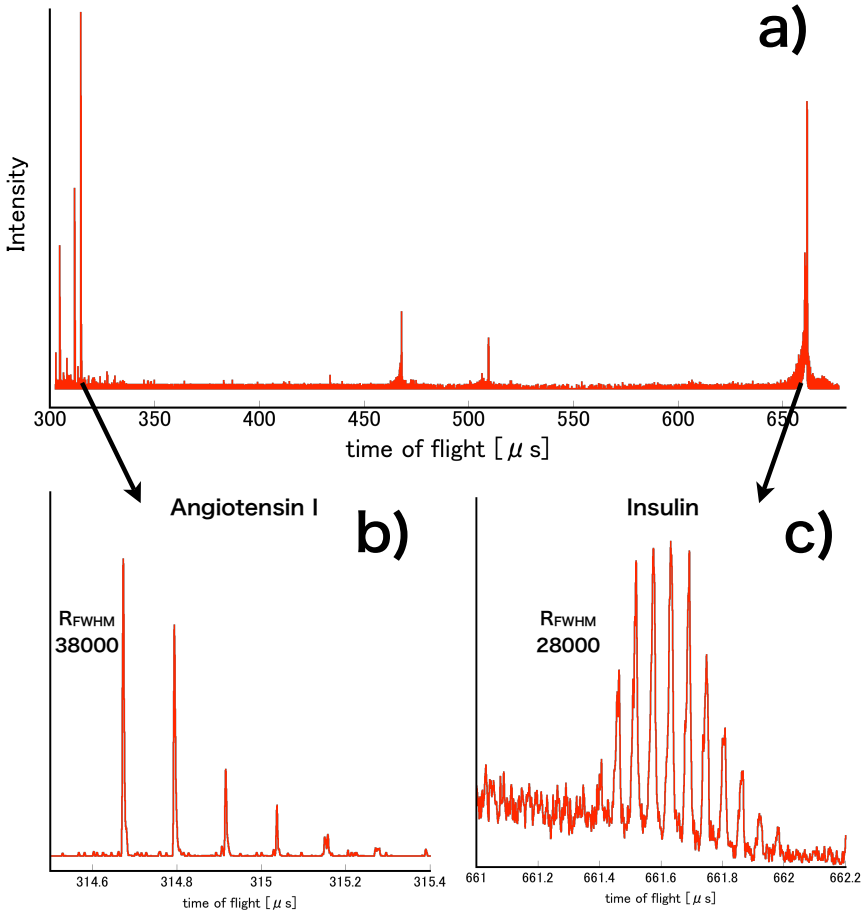


図27. Angiotensin I とInsulin([M+H]⁺=5730)の混合物のTOFスペクトル
(a. スペクトル全体, b.c. Angiotensin I およびInsulinが観測される範囲を拡大)

実験2 考察

図27aで, angiotensin I , insulin以外にもピークが観測されているが, これはinsulinがイオン化の際に過剰にエネルギーが与えられ, イオン源で加速される前に解離したイオンだと思われる. 図27bのangiotensin I のピークの分解能は, Insulinのピーク幅が最も細くなる条件に合わせたため, 実験1と比べて悪くなっている. このことは, 2.2.3の図8で示したように異なる質量のイオンでは, イオンが収束するDEのタイミングが異なる点と一致する. しかし, それでも分解能は30000以上を維持している. これは, “Spiral TOF”の光学系は完全収束条件を満たしているためだと考えられる. すなわち, らせん状のイオン軌道に導入されるときに持っている運動エネルギーや角度, 位置は保存され, その間の飛行時間は質量にのみ依存する. イオンの飛行時間の収束を考えたとき, らせん軌道は無視して考えることができ, 結果としてイオンをらせん軌道を除いた残りの部分である数10 cm先に収束させれば良いことになる. そのため, DEのタイミングは質量に依存しにくく, 2.2.2の式(6)で分母に当たるピーク幅Δtはあまり太くならない. さらに, 分子に当たる飛行時間tには, らせん軌道部分の飛行時間も加わるために分解能は高くなる. 図27cをみると, こちらも分解能 28000で測定されており,

angiotensin I とinsulinという質量が大きくはなれた試料を同時に分解能 28000 以上で測定することが可能となっている. また, angiotensin I の同位体ピーク以外にも強度の弱いピークがいくつか検出されているが, これはノイズではなく angiotensin I やinsulinがイオン源で加速されている間に解離などを起こした結果, 生成されたイオンが検出されていると思われる.

実験3 測定結果

レーザー強度を徐々に上げていったところ, 実験2と同じ45 %のときイオンが安定して検出された. レーザー強度をこれ以上大きくしても, 実験1および2からピーク幅が大きくなることが確認できたため, このレーザー強度で測定を行った. t_d‘を40 nsにしたところ, モノアイソトピック質量のピークの頭が, 同程度の強度で辛うじて割れた状態で検出された. t_d‘をこれ以上大きくしてもピークの頭は割れなかった. 積算回数は, 各同位体ピークが分離されていることを確認できるまで積算したところ, 3000 shotとなった. 測定結果を図28に示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF, レーザー強度 : 45 %, V_G : 3000 V, t_d‘ : 40 ns

検出器電圧 : 2800 V, 積算回数 : 3000 shot

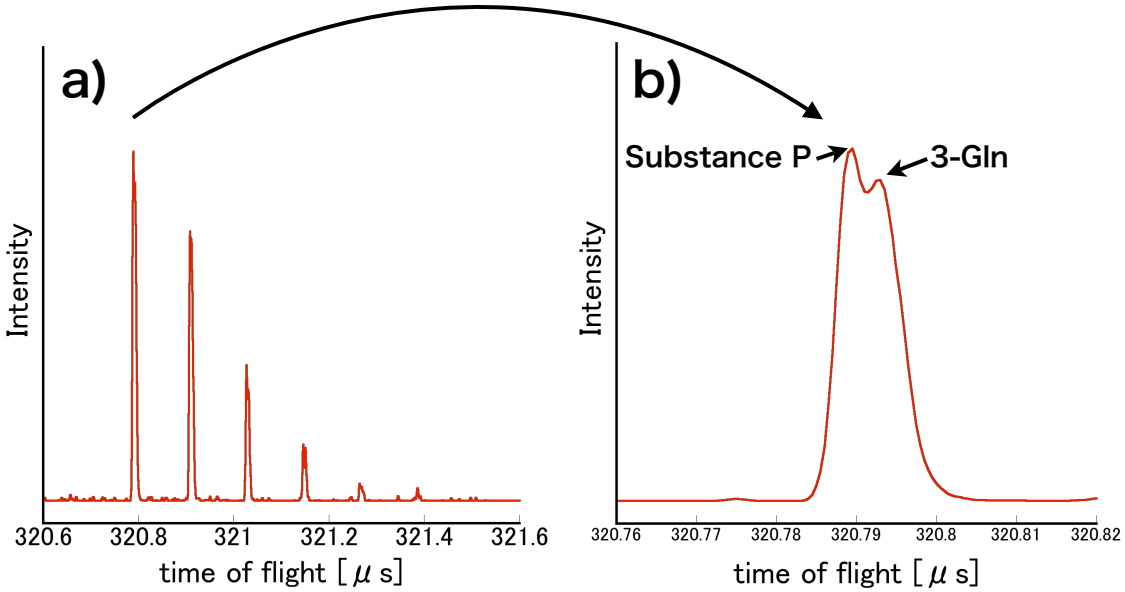


図28. Subsntance Pと3-Glnの混合物のTOFスペクトル
(a. 同位体ピーク全体, b. モノアイソトピック質量のピークを拡大)

実験3 考察

積算が少ないと 1 つのピークでも分離したように観測される恐れがあるが, 積算を3000 shotと多くしても, ピークトップは割れた状態で検出された (図28b) . 分かれたピークの頭の間隔を見ると, 3.4 nsとなっている. m/z 1347.734のイオンが, 320 μs飛行すると考えると, m/z 1347.699のイオンとの飛行時間の差は,

4.1 ns程度となる. 理論値に近い間隔となっており, 確かにSubstance Pと3-Glnは分離できていると思われる.

また, ２つのピークは同程度の強度で検出され, LysとGlnの違いが及ぼすイオン化効率への影響は小さいと考えられる.

今回の測定では, ピークトップが辛うじて分離されているだけである. 多数のピークが検出されるタンパク質の消化物などでは, substance Pと3-GlnのようにLysとGlnのみが異なる２つのペプチドを単一のペプチドと認識する恐れがある. しかし, 今回用いた検出器とは異なる応答が速い検出器を用いた測定では70000程度の分解能が得られることが報告されており[10], その検出器を用いることで２つのペプチドをより明確に分離でき, 認識できると思われる.

実験4 測定結果

ubiquitin, cytochrome cともにα-CHCA (solid)では, どのレーザー強度でもイオンは, ほとんど検出されなかった. 次にα-CHCA (liquid) を試したところ, レーザー強度を55 %程度にすると共に安定してイオンは検出され, t_d‘の調節を行った. ubiquitinでは, t_d‘を120 nsにすると同位体が完全に分離された状態で検出された. cytochrome cでは, t_d‘を500 nsまで変えたが, 同位体を分離するまでには至らなかった. そのため, cytochrome cについては, タンパク質の測定によく用いられるsinapic acid (solid) [33]を用いて測定を試みた. イオンは, 安定して検出されたが, レーザー強度やt_d‘を調節してもピーク幅はほとんど変わらず, α-CHCA (liquid) の場合よりもピーク幅 は細くならなかった. さらに, cytochrome cについては, DHB (solid)についても試した. 条件を変えて測定を行ったところ, レーザー強度63 %, t_d‘ 240 nsで同位体を分離することに成功した. 測定結果を図29, 30に示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード：TOF, レーザー強度：45 %, V_G：3000 V, t_d‘：40 ns

検出器電圧：2800 V, 積算回数：3000 shot

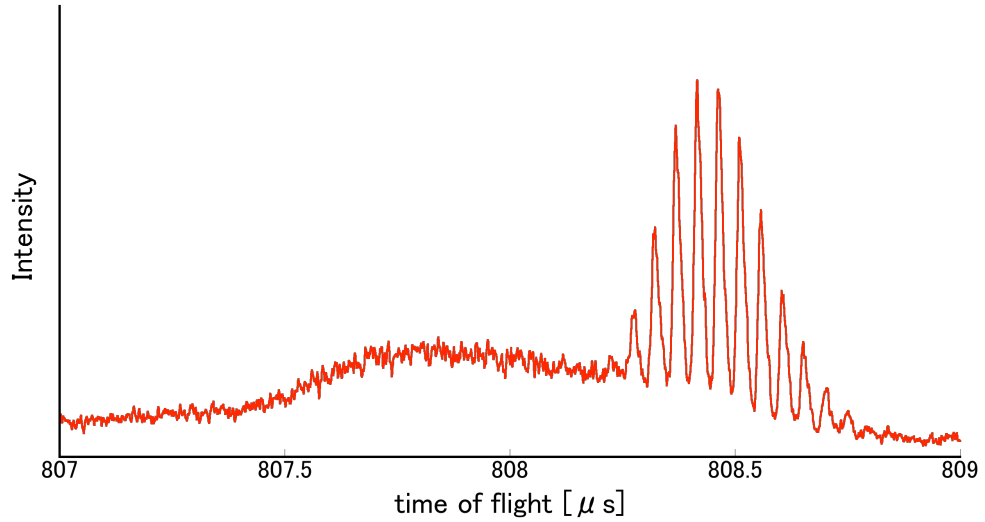


図29. ubiquitin([M+H]⁺=8564)のTOFスペクトル

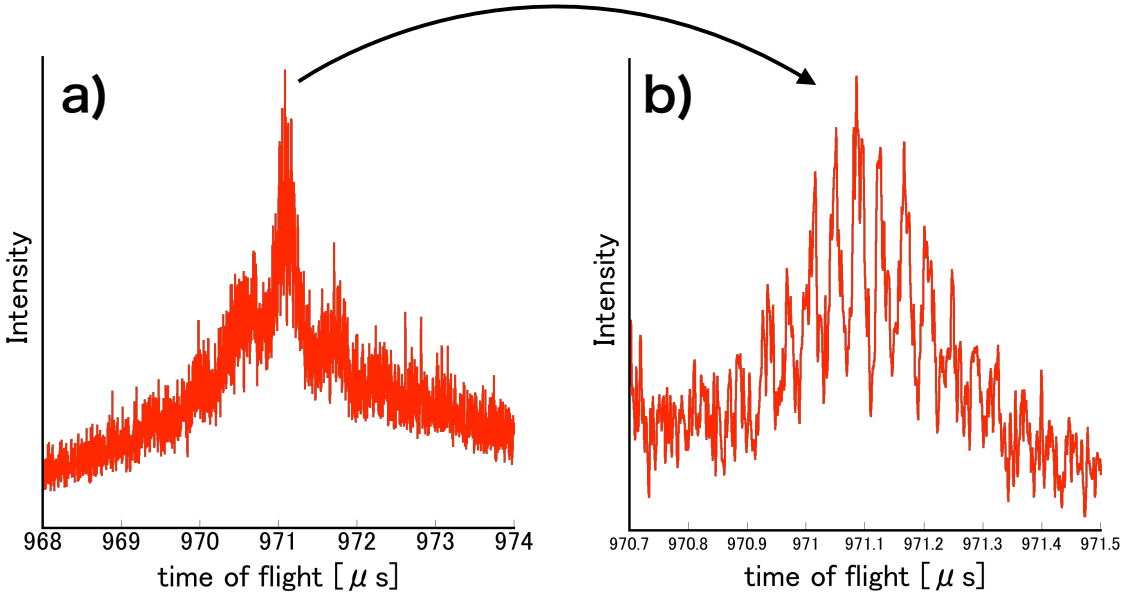


図30. cytochrome c([M+H]⁺=12362)のTOFスペクトル
(a. ピーク全体, b. 拡大)

実験4 考察

図30bをみると，ubiquitinの同位体ピークの前に幅広いピークが検出されている．これは，ubiquitinのピークと比べると，明らかにピーク幅が大きく，収束していない．もし，この質量のイオンがイオン源で生成され，加速されているなら，その位置からubiquitinと質量の近いイオンであると推測される．質量の近いイオンでは，収束するt_d'の値も近いものとなると考えられ実験結果と一致しない．また，実験2で示したように質量が大きく離れたイオンでも分解能は多少は悪くなるが，図29ほど悪くなることはないと予想される．そのため，この幅広いピークは，イオン源で加速後，らせん軌道途中に水脱離などのPSDにより生成されたイオンが検出された結果だと思われる．通常のペプチドでもこのようなPSDは，起こっている

と考えられるが, 質量が大きくなるほどPSDは起こりやすいとされており[34], ほとんど観測されていないと思われる. 3.2でPSD由来イオンは排除されると説明したが, 脱離した質量が全体の質量からみた場合1 %に満たないため, イオンの運動エネルギーもほとんど変わらず, イオン軌道から外れることなく検出器に到達すると思われる.

また, α-CHCAではubiquittin, cytochrome cともにほとんど検出されなかったが, これはα-CHCAは“hot matrix”とよばれ, α-CHCAをマトリックスとして用いるとPSDが起こりやすいとされており[35, 36], 水が脱離する場合よりもイオン全体から見て大きい割合で脱離が起こり, 軌道から外れ検出されていないと思われる. cytochrome cでは, タンパク質の測定に幅広く用いられているsinapic acid (solid) を試したが, 条件を変えても分解能は全く良くならなかった. 遅延引き出しのタイミングを変えてもピーク形状がほとんど変化せず, DHB (solid) やα-CHCA (liquid)で検出された位置よりも低質量側に広がったピークが観測されたため, シナピン酸の場合, PSDがα-CHCA (solid) ほどではないがDHBやα-CHCA (liquid) よりも頻繁に起こっており, それにより同位体ピークが見えなくなっているのはないかと思われる. MALDIでは, 同じ試料濃度, マトリックスでも, プレート上で作成された結晶状態に, 生成されるイオン量やPSDの起こりやすさが大きく左右される[37]ために, sinapic acidを用いたためにこのようになったのか, 結晶状態に問題があったためかは今後検討する必要がある. 図30aの同位体ピークの後ろに観測されているピークは, イオン化の際にNa等が付加されてイオン化したものだと思われる.

4.1.2 質量決定精度の評価

前項で, 高分解能を達成していることは示したが, いくら質量の近い試料を分離できても質量決定精度が伴わなければその能力は半減してしまう. そこで質量決定精度の評価として以下の実験を行った.

Bradykinin fragment 1-7 ([M+H]$^+$=757.4) (Sigma-Aldrichより購入), Angiotensin II ([M+H]$^+$=1046.6) (Sigma-Aldrichより購入), Angiotensin I ([M+H]$^+$ =1296.7), P14R ([M+H]$^+$=1533.9) (Sigma-Aldrichより購入), ACTH fragment 18-39 ([M+H]$^+$=2465.2) (Sigma-Aldrichより購入) の混合物 (peptide-mix) を外部標準として較正を行い, polyethylene glycol 1500 (PEG) (和光純薬工業より購入) を測定し,peptide-mixとPEGのプレート上での距離および異なる遅延時間質量決定精度の評価を行った. プレート上でのサンプル位置を変えることで, プレートが傾いていなければ, 誤差は距離に依存しないものと期待される. 質量が異なる試料では, 最適な遅延時間は異なるため, その遅延時間の違いがどの程度影響するかについても調べる必要がある.

i)**測定手順**

図31にサンプルプレートの模式図を示す. x,z軸はそれぞれ図23と共通である. bradykinin fragment 1-7, angiotensin II, angiotensin I, P14R, ACTH fragment 18-39の強度が同程度になる, モル濃度比で2:1:2:1:4で混合した. それを濃度1 pmol/μlとしてCHCA (solid) と1：1で混合し, 図31のB, C, D, E, Fの位置に0.5 μLを滴下した. 次にPEGを水とアセトンを体積比で3：7で混合し, それを溶媒として10 pmol/μLの濃度に調整した. PEGはプロトン付加では正イオンとしてほとんど検出されないため, その溶液にNaCl (松永化学工業より購入) を1 nmol/μLの濃度で加えた. α-CHCA (solid) と1：1で混合し, 図31のAの位置に0.5 μLを滴下した.

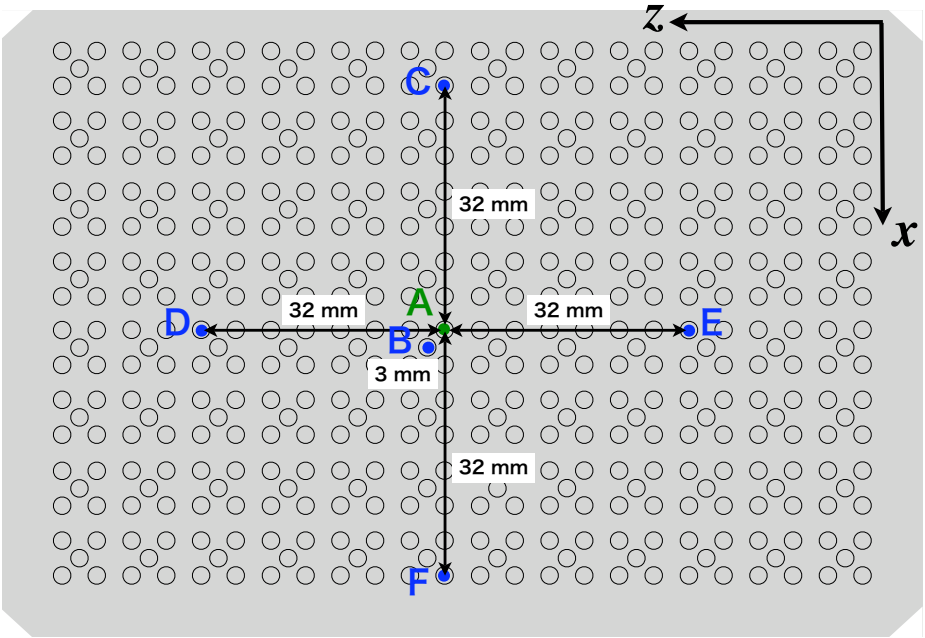


図31. サンプルプレートの模式図

最初に再現性を見るために，Aの近くに位置するBのpeptide-mixを測定し，式(30)で最少２乗法を用いてフィッティングを行い，a, b, cを求めた (*t*: 飛行時間, *m*:質量とする).

$$m = (at^2+bt+c)^2 \qquad \text{式(33)}$$

そして，PEGを測定し，式(33)を用いて質量に変換し，通常のタンパク質消化物で主にピークが検出される範囲である*m/z* 700-2000までの29個のピークを用いて，測定値と計算から求める質量の誤差を求めた．これを３回行った．

次にサンプル位置の誤差への影響を見るために，Bだけなく Aから32 mmの距離にあるC, D, E, Fに滴下したpeptide-mixをそれぞれ測定し，その都度，AのPEGを測定した．peptide-mixの測定結果を用いて，a, b, cを求め，PEGの計算値からの誤差を求めた．

次に遅延時間の影響を見るために，Bのpeptide-mixを t_d‘を80 nsで測定し，AのPEGを t_d‘の値を0, 40, 80, 120, 160 nsと変化させて測定を行い，計算値からの誤差を求めた．

ii)**測定結果および考察**

較正に用いたpeptide-mixの測定結果を図32に示す．測定条件は次のようになる．

測定モード：TOF, レーザー強度：45 %, V_G：3000 V, t_d‘：80 ns

検出器電圧：2600 V, 積算回数：2000 shot

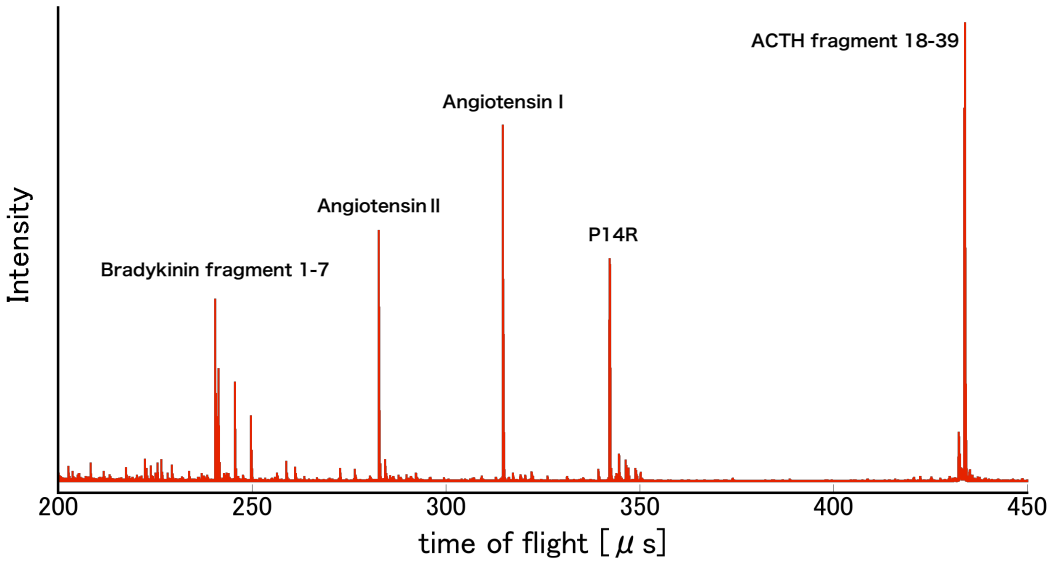


図32.較正に用いたペプチドの混合物のTOFスペクトル

PEFの測定結果を図33に示す．測定条件は次のようになる．

測定モード：TOF, レーザー強度：50 %, V_G：3000 V, t_d‘：80 ns

検出器電圧：2600 V, 積算回数：3000 shot

m/z 1400-1600を拡大すると (図33b) , 繰り返し構造 [-CH_2OCH_2-] の質量に相当する44 u間隔のピークが検出されており，これを誤差の測定に用いた．

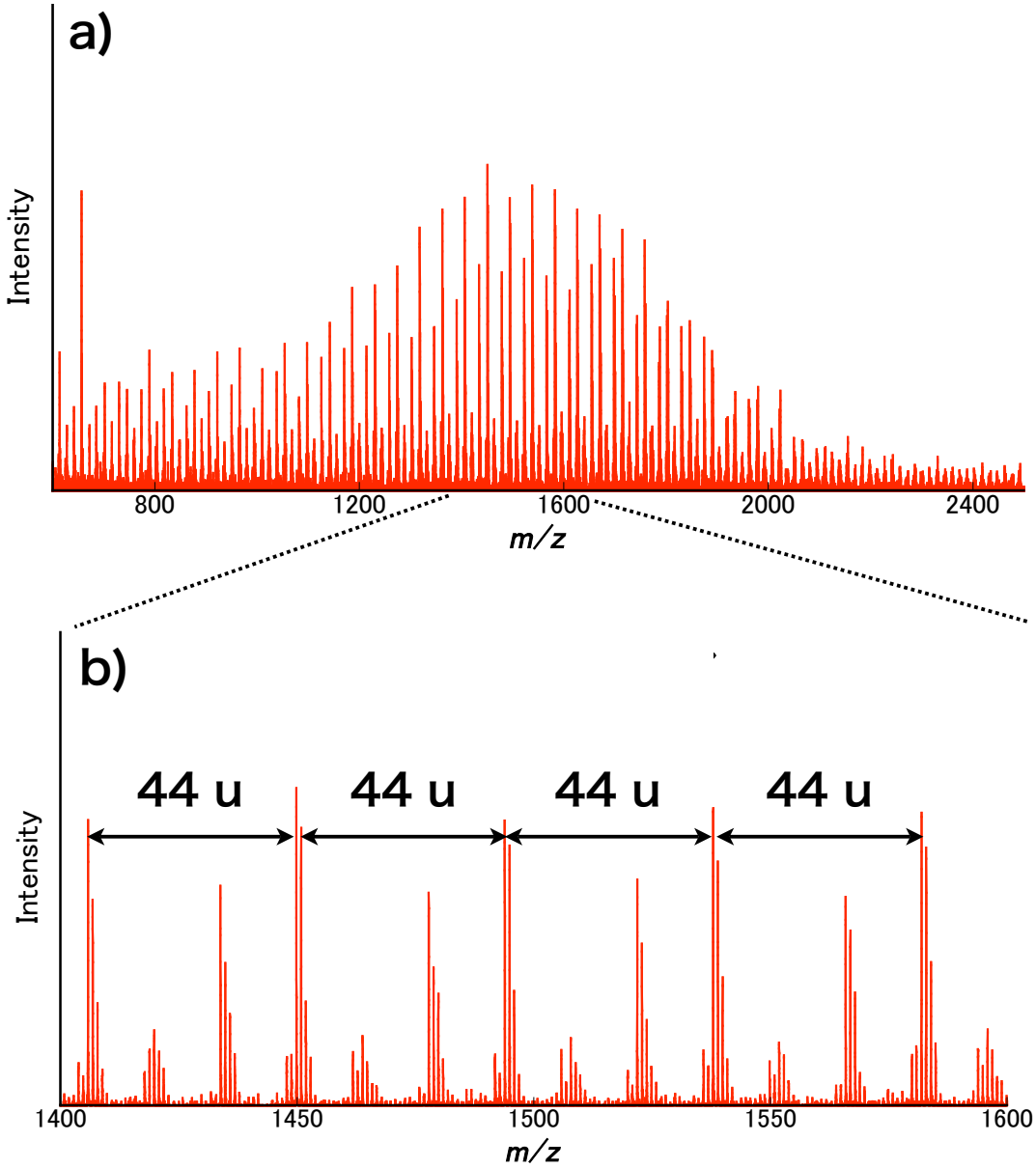


図33.PEGのマススペクトル(a. 全体, b. 拡大)

最初に同条件で３回測定した結果を図34に示す. 横軸は*m/z*, 縦軸は誤差(error)であり, ３回とも全範囲で誤差 ±10 ppm以内に収まっている. ペプチドの質量から構成しているアミノ酸を同定するために必要な質量決定精度は, 0.5 - 5 ppmとされており[38], 今回の測定では達成することはできなかった. しかし, タンパク質をトリプシンなどの消化酵素などで断片化し, 消化物であるペプチドの質量の組み合わせから同定するpeptide mass fingerprint (PMF) においては, 広い質量範囲を30 ppm以上の精度で同定することができれば, 高精度でタンパク質を同定できるとされており[39], 十分であるといえる.

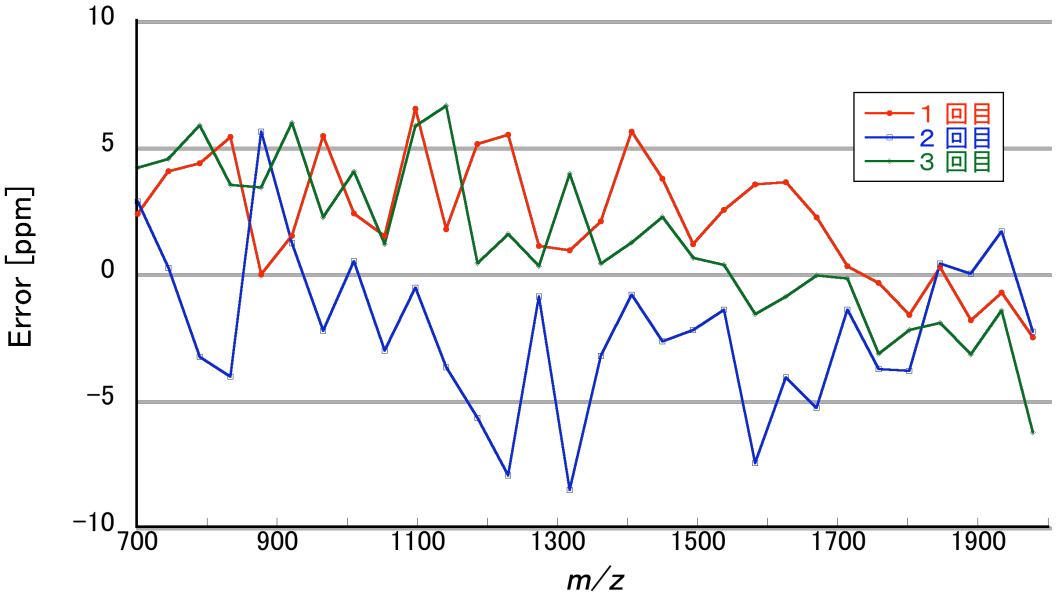


図34. 再現性の確認

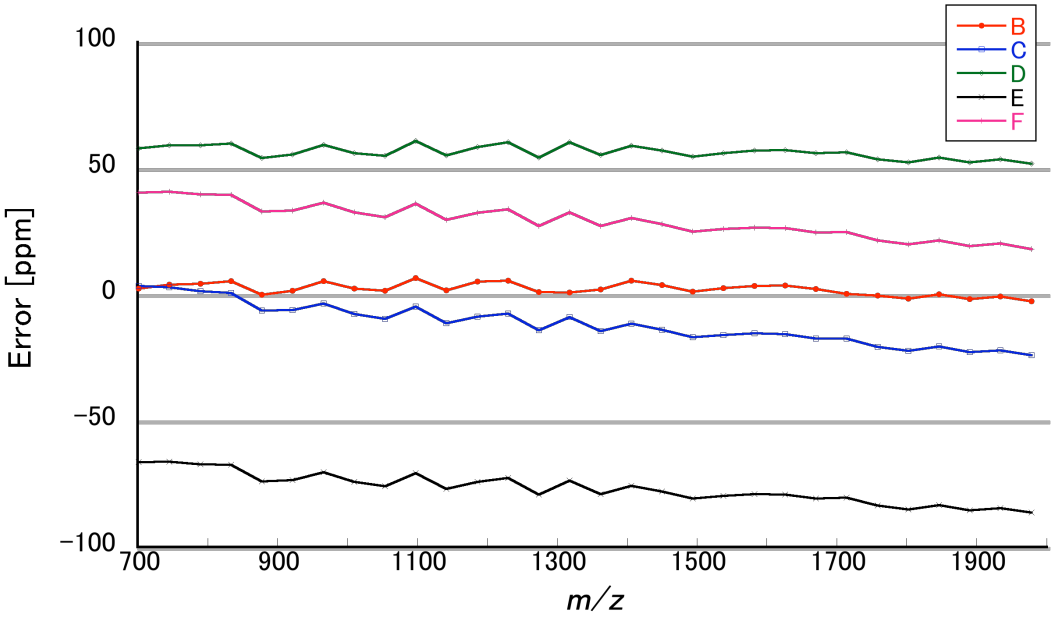


図35. 位置が誤差に及ぼす影響

次にB-Fのpeptid-mixを測定し，CのPEGを測定した．測定条件はターゲットの位置以外は上述の測定と同じであるため，省略する．また測定されたスペクトルについても，図32，33とほぼ同一のものとなったため省略する．B-Fのpeptide-mixをそれぞれ測定し較正を行い，AのPEGを測定し計算値からの誤差を求めた．結果を図35に示す．C-Fは，Aから全てプレート上で距離32 mmの位置であるが，全く異なる傾向を示した．Aからz軸方向に+32 mmの位置であるDでは，全範囲で誤差は,+50 ppm程度になっている．これは，peptide-mixの飛行時間がプレート中央で測定されるときよりも小さくなっていることが原因であると考えられる．逆にAからz軸方向に-32 mmの位置であるEでは，全範囲で誤差は-60 ppm以

下になっており, Eの位置ではプレート中央で測定されるときよりも飛行時間は大きくなっていると考えられる. レーザーの照射位置は固定されたままサンプルプレートが動き, 指定された位置にレーザーが照射されるようになっているのだが, Aの位置を基準にした場合Dでは, 試料がグリッド電極に近づいているためにAの場合よりもイオンが加速される距離が短くなり, 飛行時間が小さくなっていると考えられる. Eでは, グリッド電極から遠ざかっているために加速される距離が長くなり, 結果的に飛行時間が大きくなっていると考えられる. 以上のことからプレートが, z軸方向からy軸方向に傾いていると思われる. B, D, Eで測定されたマススペクトルでの, Angiotensin I ($[M+H]^+$ =1296.7)の飛行時間を比べると, 確かにDではBより3 ns程度大きく, EではBより3 ns程度小さくなっていた. 飛行時間差が, プレートの傾きによるものと考え, 見積もったところ, 0.2°程度となった. 図36のようにサンプルプレートは傾いていると思われる. CとFについては, CではDと同様の傾向が見られるが, Eについてはあまり誤差は変わらなかった. そのため, x軸方向については単純にプレートが傾いているのではなく, プレート表面が水平から曲がった状態にあることが予想される.

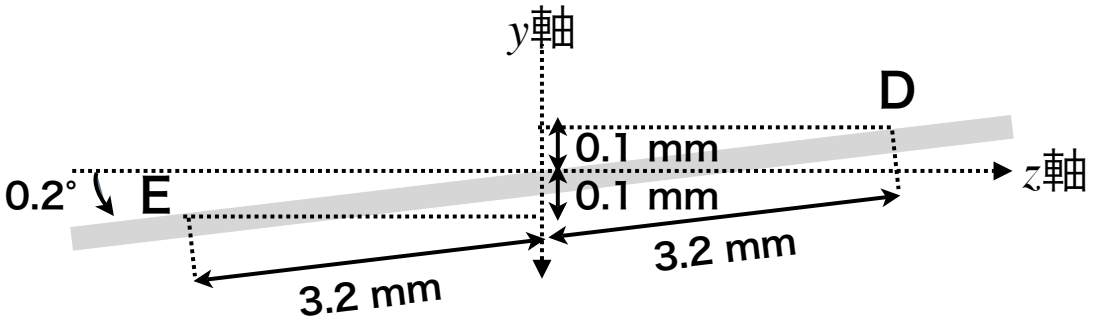


図36. 予想されるサンプルプレートの傾き

最後にpeptide-mixとPEGのプレート上の距離は近づけた状態で, peptide-mixの t_d'は80 nsで一定とし, PEGの測定の際のt_d'を0, 40, 80, 120, 160 nsと変えて, 計算値からの誤差を求めた. 図37のグラフを見ると, PEGのt_d'が80 nsより早い0, 40 nsでは, 各ピークの飛行時間がt_d'=80 [ns]のときより小さくなっており, 誤差はマイナスとなっている. 引き出しのタイミングが早いために, イオンはt_d'=80 [ns]のときと比べると引き出しの際にあまり進んでおらず, 加速領域の距離は長くなるため加速領域での飛行時間は相対的に大きくなるが, 加速領域を出た際の速度は大きくなり, 自由空間での飛行時間は相対的に小さくなる. 加速領域での飛行時間の差よりも, 自由空間での飛行時間の差の方が大きいために, 飛行時間は小さくなったと思われる. t_d'=120, 160 [ns]のときは, 逆に飛行時間は大きくなっている. このことを確認するためにDEのタイミングと飛行時間との関係を計算した. 電圧, 電極の間隔などの条件は, 実際の装置の条件に合わせ, イオンの質

量と初期速度は，それぞれ1296.7 uおよび1000 m/sとした．そして，自由空間の距離Lおよびt_d‘以外は固定で，t_d‘を変え，飛行時間への影響を計算した．Lについては，らせん軌道を考慮に入れていない場合 (L=0.5 [m])，入れた場合 (L=17 [m]) の両方 を計算した．結果を図38に示す.横軸

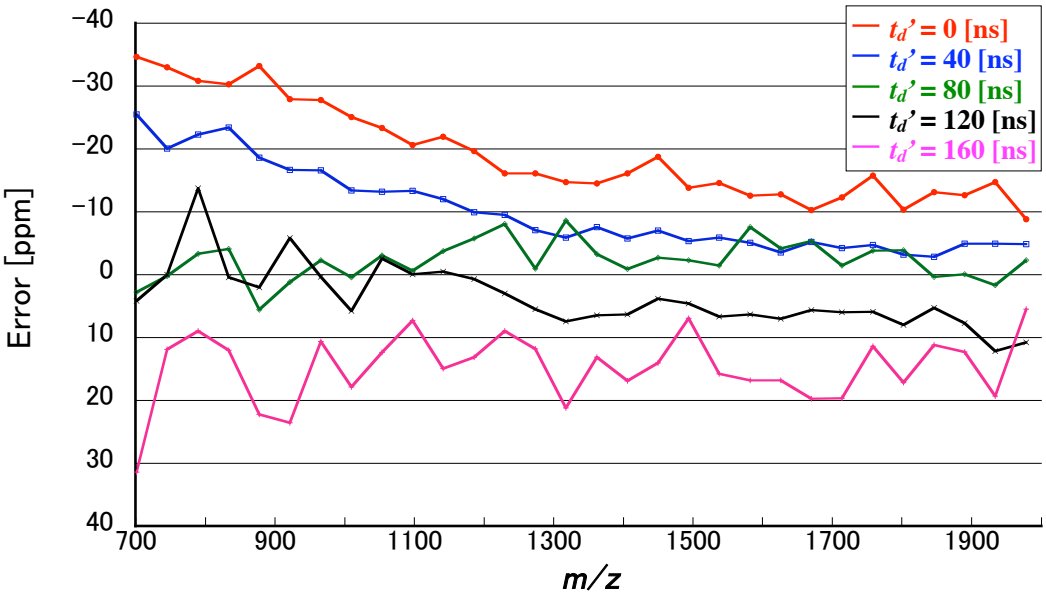


図37. 遅延引き出しのタイミングが誤差に及ぼす影響

はt_d‘で表し，縦軸はt_d‘=80 nsのときの飛行時間を基準として，そこからのズレΔtで表している．ただし，飛行時間は実際の測定と比較するために，引き出しのタイミングをトリガーとして計算している．

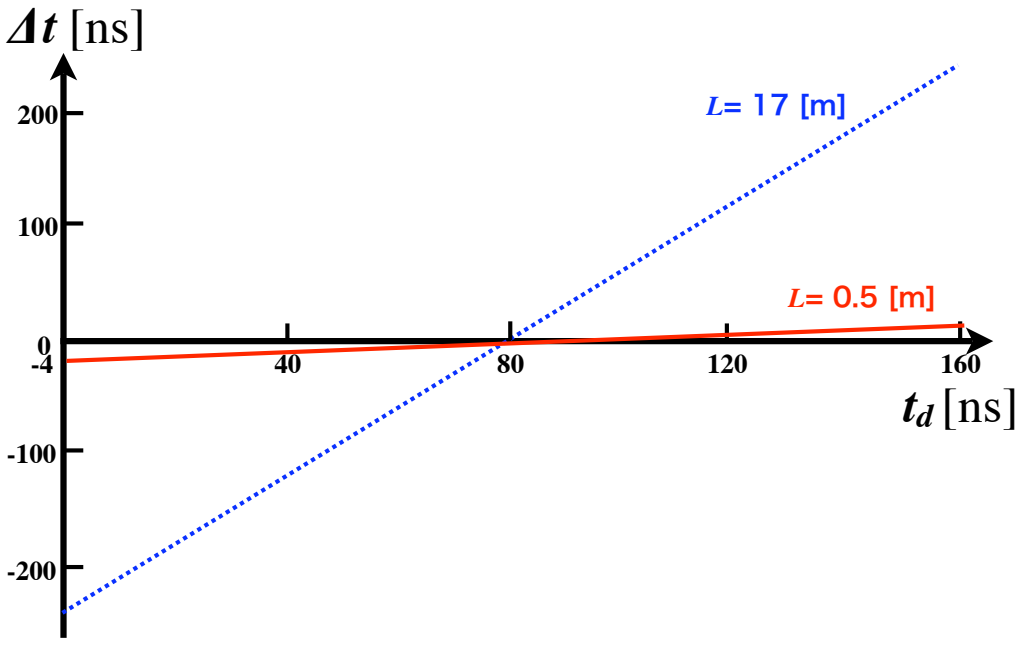


図38. 遅延引き出しのタイミングが飛行時間に及ぼす影響 (計算)

図38をみると，L=0.5, 1.7 [m]のときで，ともにt_d‘が80 nsより小さいところではΔtはマイナスを示し，80 nsより大きいところではプラスとなっている．これは，測定結果と一致している．また，測定結果でのAngiotensin I のズレΔtは，それぞれ5.4 ns (t_d‘=0 [ns]), 3.1 ns (t_d‘=40 [ns]), 0.1 ns (t_d‘=120 [ns]), -2.6 ns (t_d‘=160 [ns])となっており，L=0.5 [m]のときの計算結果とおおよそ一致している．また，図37をみると，t_d‘の誤差への影響は，±30 ppm程度に収まっており，80 ns程度ならt_d‘を変えて測定を行っても，質量決定精度はプレートの位置の違いほど影響は受けないと思われる．

4.1.3 感度 (検出限界) の評価

飛行距離が長いために透過率が低下する恐れがあるが, 完全収束を満たしているならば, 初期条件の分布によるイオンの空間的な広がりは生じず, 透過率の減少は残留ガスとの衝突による影響だけとなる. そこで感度 (検出限界) の評価を行った. 以下の実験を行った.

標準的なペプチドであるangiotensin IIおよびACTH fragment 18-39の濃度を変えて, どの濃度までモノアイソトピック質量のピークがS/N比10以上で検出できるか調べた.

i)**測定手順**

Angiotensin IIおよびACTH fragment 18-39の濃度を1 pmol/μLから1 amol/μLまで１０倍刻みで, 0.1%TFAを溶媒として濃度を薄くし, 試料を用意した. そして, それぞれをα-CHCA (solid) と1：1で混合しサンプルプレートに0.5 μLを滴下し, 測定を行った.

ii)**測定結果および考察**

Angiotensin IIは, 濃度の濃い試料から順に測定を行った. 最初レーザー強度は, 43%にして測定したが, 10 fmol/μLではイオンがほとんど検出されなかったために, 強度を46 %まで上げて測定を行った. 100 amol/μLでは, さらに50%まで上げた. 積算回数は, これ以上積算を重ねても変化がスペクトルに見られなかったので, 1000 shotとした. 図39に各濃度でのマススペクトルを示す. それぞれの測定条件は次のようになる.

測定モード：TOF, レーザー強度：43 %(1 pmol, 100 fmol/μL), 46 %(10 fmol, 1 fmol/μL), 50% (100 amol, 10 amol, 1 amol/μL), V_G：3000 V, t_d‘：40 ns
検出器電圧：2600 V (1 pmol, 100 fmol/μL), 2800V (10 fmol, 1 fmol. 100 amol, 10 amol, 1 amol/μL) , 積算回数：1000 shot

図39a-gのスペクトル全てで, モノアイソトピック質量のピークはS/N比10以上で検出されており, 1 amol/μLでもイオンは検出できることがわかった. しかし, 1 fmol/μL以降については結晶中の大半の部分で, レーザーを照射してもイオンが生成されず, 結晶中でイオンが生成される位置をいかに探せるのかが問題になり, イオンが検出される位置を探せたとしても, 同じ位置からイオンを安定して生成させることは困難であった. 図39d-gでは, angiotensin IIの同位体ピーク以外にもピークが検出されているが, これはangiotensin IIのイオンがイオン源で加速されている間や, らせん軌道の途中で解離して生成されたイオンが検出されていると思われる. 図39aなどの場合と異なり, ピークのように見えているのは, 濃度を薄くすると生成されるイオン量が減るために, 本来なら様々な位置で検出されベースラインとなるイオンが, 数が少ないためピークのように検出されていると思われる.

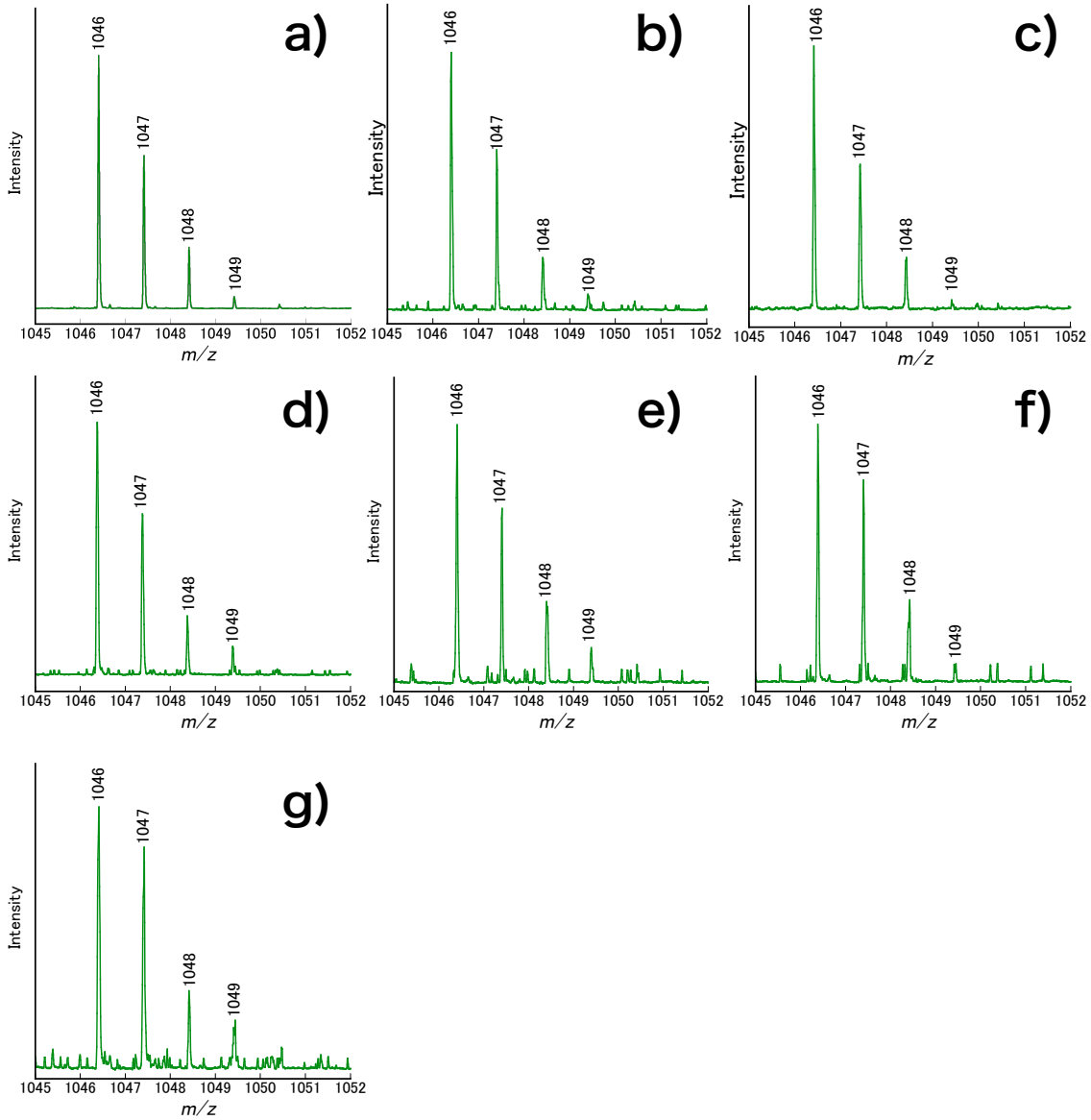


図39. Angiotensin II のマススペクトル
(a. 1 pmol/μL, b. 100 fmol/μL, c. 10 fmol/μL, d. 1 fmol/μL , e. 100 amol/μL, f. 10 amol/μL, g. 1 amol/μL)

ACTH fragment 18-39についても同様に, 濃度の濃い試料から順に測定を行った. 最初レーザー強度は, 45%にして測定したが, 1 fmol/μLではイオンがほとんど検出されなかったために, 強度を50 %まで上げて測定を行った. 10 amol/μLおよび1 amol/μLでは, さらに強度を60%まで上げたが, イオンはほとんど検出されなかった. 積算回数は, 1000 shotとした. 図41に各濃度でのマススペクトルを示す. それぞれの測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF, レーザー強度 : 45 %(1 pmol, 100 fmol, 10 fmol/μL), 50 % (1 fmol, 100 amol/μL), 60% (10 amol, 1 amol/μL), V_G : 3000 V, t_d' : 80 ns
検出器電圧 : 2800V, 積算回数 : 1000 shot

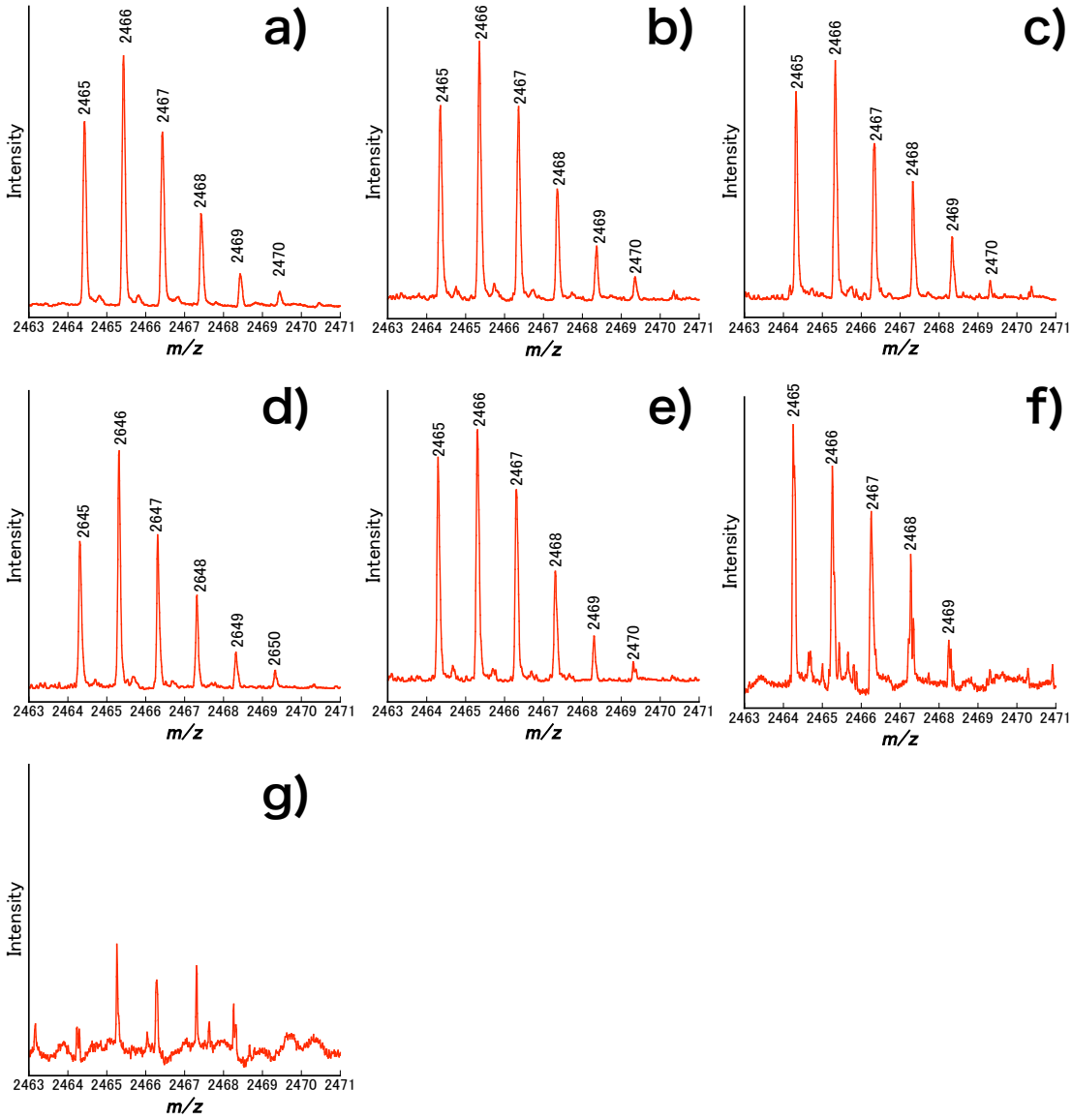


図40. ACTH fragment 18-39のマススペクトル (a. 1 pmol/μL, b. 100 fmol/μL, c. 10 fmol/μL, d. 1 fmol/μL, e. 100 amol/μL, f. 10 amol/μL, g. 1 amol/μL)

図40a-eをみると，100 amol/μLまでは，S/N比10以上で検出することができた．angiotensin IIと異なり，10 amol/μL (図40f) では，イオンは検出されたがS/N比は低く，1 amol/μL (図40g) では，ほとんどイオンが検出されなかった．angiotensin IIの質量の倍近くあるACTH fragment 18-39は，angiotensin IIよりもPSDが比較的起こりやすい [34]と思われる．しかし，MALDIではサンプルの結晶状態などでも生成されるイオン量は大きく異なる [37] ため，その影響も考えられる．しかし，100 amol/μLまではモノアイソトピック質量の同位体ピークが検出されており，質量 2500 u程度のペプチドまでは，100 amol/μLの濃度があれば検出し，質量を求めることは可能であると思われる．

4.1.4 プリカーサーイオン選択能の評価

次に単体の飛行時間型質量分析計としではなく，タンデム質量分析計のMS- I としての性能であるプリカーサーイオン選択能を調べた．“MADLI Spiral TOF/TOF”では，MS- I の飛行距離が長いため，衝突室に到達した時点で，試料の各同位体ピークが十分離れている．そのため，イオンゲートにてそれぞれを選択できることが期待されるため，その評価を行った．

i)**測定手順**

Angiotensin I などの様々な質量のペプチドを測定したところ，質量5730 uであるinsulinでは，同位体ピーク 1 つを選択することはできなかったが，質量2844 uであるmelittin (Sigma-Aldrichより購入) までは，同位体ピーク 1 つをイオンゲートを用いて選択することができた．濃度10 pmol/ μL (溶媒: 0.1 %TFA)で，α-CHCA (solid) と1：1で混合し，0.5 μLを滴下し測定を行った．イオンゲートの選択は，同位体ピーク全体を拡大し，最初にモノアイソトピック質量の同位体ピークがかろうじて通るイオンゲートのdelayのタイミングを探し，そこからwidthを調節してモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択した．

ii)**測定結果および考察**

イオンゲートで選択する前と後のスペクトルを図41に示す．完全に他の同位体ピークは検出されておらず，1 つの同位体ピークのみを選択することが可能となった．測定条件は次のようになる．

測定モード：TOF, レーザー強度：50 %, V_G：3000 V, t_d‘：90 ns

検出器電圧：2800 V, 積算回数：2000 shot,

イオンゲート delay: 409.13 μs, width: 300 ns

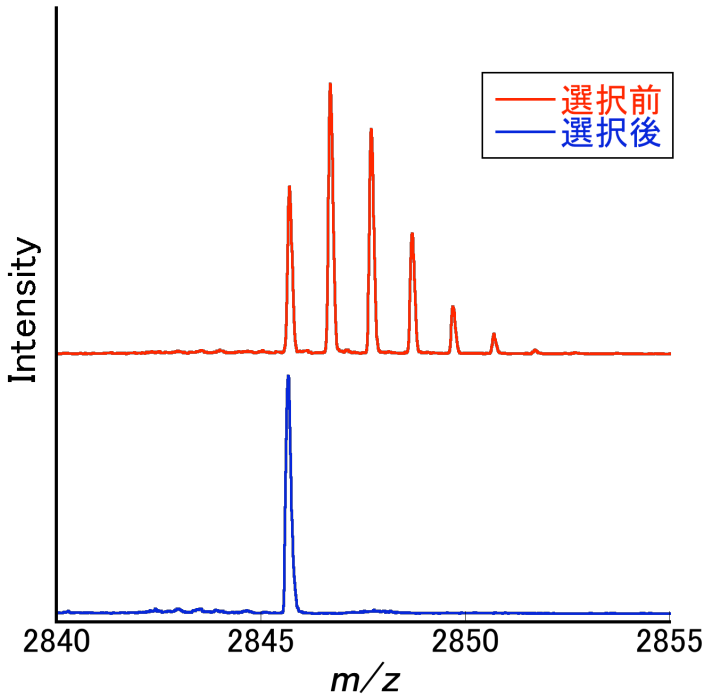


図41.melittin ([M+H]⁺=2845) のピーク選択の様子
(上: 選択前, 下: 選択後)

通常の飛行時間型質量分析計ではMS-Ⅰの飛行距離が, 数十 cm程度であるため, 選択されるプリカーサーイオン選択の質量範囲が広く, 同位体ピーク全体しか選択することしかできないが, 本装置では, MS-Ⅰの飛行距離が17 mと長いために図41のようにイオンを構成する各元素全てが最小質量の同位体となっているモノアイソトピック質量のピークをプリカーサーイオンとして選択することが可能となる. モノアイソトピック質量の同位体ピークを選択することで, 生成されるフラグメントイオンを構成する元素全ても最小質量の同位体のみとなり, 解析を容易に行うことが可能となる. 例えば, ペプチドのMS/MS測定では, 1 u離れたフラグメントイオンが生成される場合が少なくなく, 同位体ピーク全体をプリカーサーイオンとして選択すると, フラグメントイオンも同位体ピークを持ち, 判別することが困難とになる. 一方, モノアイソトピック質量の同位体ピークを選択することができれば, 1 u離れたイオンも間違うことなく判別することが可能となる.

4.2 タンデム質量分析計としての評価

最初にタンデム質量分析法によるペプチドの構造解析についてangiotensin I を例にとり, 説明する. 得られたangiotensin I のプロダクトイオンスペクトルを図42に示す.

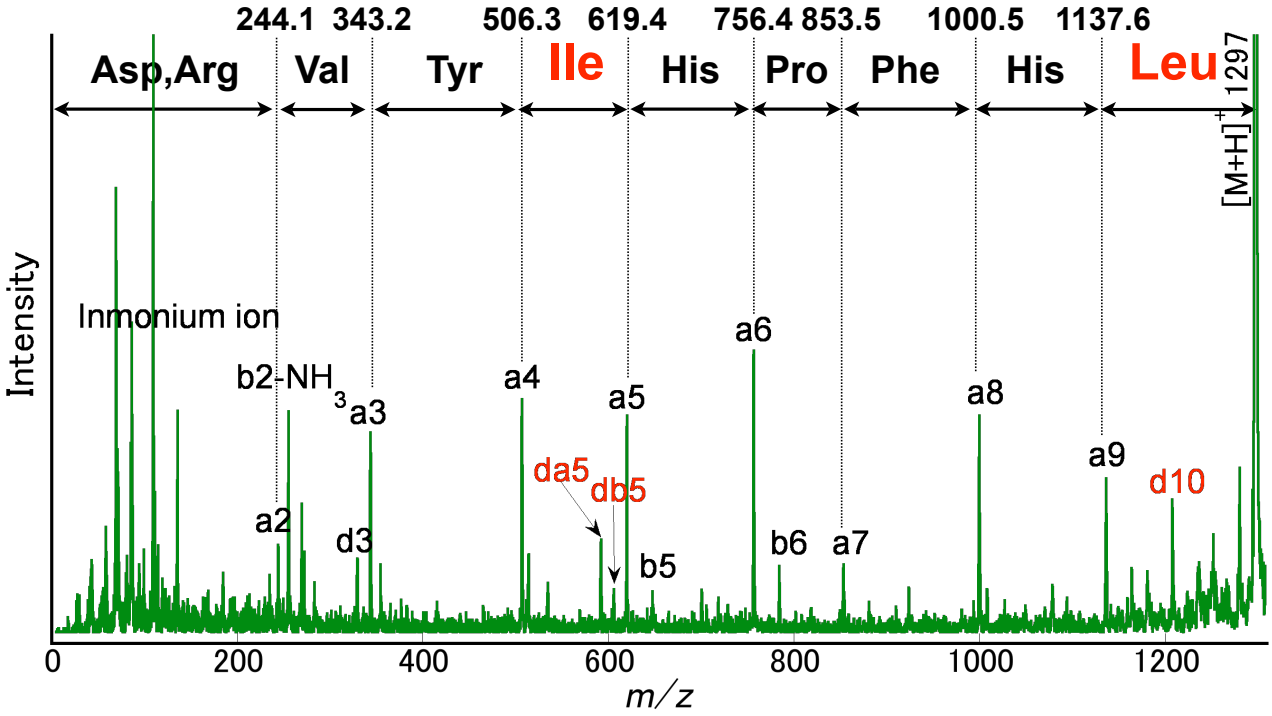
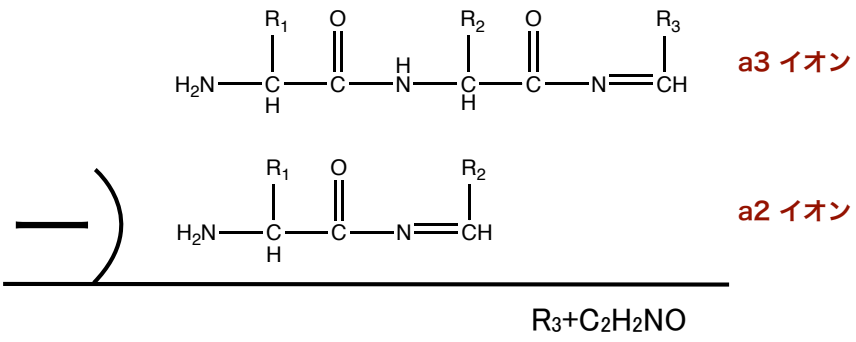


図42. Angiotensin I のプロダクトイオンスペクトル
(モノアイソトピック質量の同位体ピークをプリカーサーイオンとして選択)

右端にある$[M+H]^+$ 1297とラベルを振ってあるピークがプリカーサーイオンであり, その左に検出されているピークがフラグメントイオンとなる. 各ピークに振ってあるラベルは, Biemann標記 (図13) [20] による. Protein prospector [40] を用いて配列 (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-His-Leu) から想定される質量を導出し, 各ピークを同定 (アサイン) した. N末端側に電荷を固定しやすい塩基性アミノ酸であるアルギニンが存在しているためにBiemann標記でN末端側のフラグメントイオンに相当するa, b, d-seriesのイオンのみが検出されている. 高エネルギーCID特有のa-seriesのイオンが2-9まで検出されており, このa イオンの質量差がそれぞれのアミノ酸の側鎖の質量に対応する値となっている. 例えば, a3イオンとa2イオンの質量差は図43の様に 3 番目のアミノ酸の側鎖の質量にC_2H_2NOに相当する質量56 uを加えた値となっている. 10番目のアミノ酸については, a10イオンも検出されているためにa10イオンとa9イオンとの質量鎖から同定することも可能であるが, プリカーサーイオンとa9イオンとの質量差からも側鎖の質量は同定できるために, 通常は後者を用いる. 図42の場合なら, a2, a3イオンの質量が, 244.1および343.1であるために, 3 番目のアミノ酸の側鎖の質量は, 43 uとなり表1を確認するとバリンとなる. 他のアミノ酸についてもaイオンを用いて同定すると, 1, 2, 5, 10番目のアミノ酸以外は同定することが可能となる. 1, 2番目については, a2イオンが存在しているために 2 つのアミノ酸の側鎖の質量の合計を求め, 組み合わせを同定することは可能である. しかし, a1イオンが, 高エ



(a3 イオンの質量) - (a2 イオンの質量) = (3番目のアミノ酸の側鎖の質量) +56 u

図43. a イオンによる配列の同定

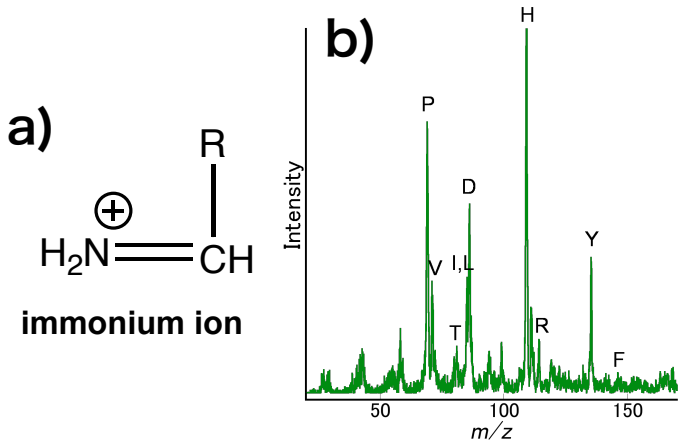


図44 a. immonium ionの構造,
b. Angiotensin I のプロダクトイオンスペクトルで検出されたimmonium ion

ネルギーCID特有のimmonium ion (図44a) とよばれるイオンと同じ構造を持ち, immonium ionは配列の全てのアミノ酸からも生 成されるために, a1イオンを特定することができず, 順番を同定することはできない. 実際に,図42のスペクトルの低質量域をみると図44bのように配列内の各アミノ酸に相当するimmonium ionが検出されている.各ピークのラベルは, 対応するアミノ酸を表す. a1イオンに相当するDも検出されているが, それ以外のイオンも検出されており, 配列が未知の場合は特定できない. PMFで質量決定精度が足りず, 質量からペプチドを構成しているアミノ酸を同定できない場合でも, 組み合わせて行うことでペプチドを同定でき, タンパク質を精度良く同定することが可能となる [38].

また, 5, 10番目については, aイオンの質量差から側鎖の質量は57 uとなり, 質量が同じで構造が異なるイソロイシン・ロイシンの2つが考えられる. ペプチド主鎖が開裂したaイオンでは, 同定することはできないが, 2.4.2でも説明したいように, 高エネルギーCID特有の側鎖が開裂したdイオンを見ることで同定することが可能となる[22]. 図42のスペクトルをみると, 5番目のアミノ酸は, a5 イオンから-28 u (da5イオン) および-15 u (db5イオン) の位置にピークが検出されており, イソロイシンであることがわかる. また, 10番目のアミノ酸は, プリカーサーイオンから, a10イオンとプリカーサーイオンの質量差に相当

する46 u (CH_4O_2) を加えた, -88 uの位置にピークが検出されており, ロイシンであることがわかる.

配列未知のアミノ酸の解析を行う場合は, protein prospectorを用いて予めaやbイオン等の質量を求めることはできない. そのため, 検出された各ピークをaやbやcイオン等と仮定してピークの間隔を読みアミノ酸を同定していくことになる. 実際今回測定したAngiotensin I のようにピーク数が少なければ人の手で行うことも可能だが, 多数のピークが検出される事も少なくないために人の手で行うことは難しく, “MASCOT” [18] 等のデータベース検索等を用いて同定することになる.

4.2.1 分解能の評価

ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを測定すると多くのフラグメントイオンが検出され, 中には質量の近いフラグメントイオンも存在し, 分解能が足りなければ, 1 つのフラグメントイオンと判断され, 配列を同定する精度の低下を招く. そこで, 以下の実験を行い, 分解能を評価した.

Substance Pのモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択するのではなく, モノアイソトピック質量から+1 uの同位体ピークを選択した. 結果として, プリカーサーイオンには, 例えば炭素なら^{13}Cを 1 つ含むことになり, フラグメントイオンにも質量に応じた割合で^{13}Cが含まれることになる. ^{13}Cが構造内に局在していなければ, 比率は次の式で表される.

$$1\text{-}\frac{m_f}{m_p} : \frac{m_f}{m_p} \qquad \text{式(34)}$$

フラグメントイオンの質量が大きいほど, +1 uのピークの強度が相対的に強くなる. 今回の測定では, 式(34)の比率で生成される1 u離れた同位体ピークが分離できるか試みた.

i)**測定手順**

Substance Pの濃度を1 pmol/μLとして, CHCA (solid) を1：1で混合し, サンプルプレートに0.5 μL滴下し, 測定を行った. モードをTOF/TOFにし, ピークを拡大した状態で, ion gateを用いて 2 本目の同位体ピークをプリカーサーイオンとして選択し, プロダクトイオンスペクトルを測定した.

ii)**測定結果および考察**

フラグメントイオンが, はっきり分離されていることを確認されるまで積算を重ねた結果, 積算回数は10000 shotとなった. Heの量は, プリカーサーイオンの強度が, Heを導入する前の強度の60%程度となるように調節を行った. 測定結果を図45に示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード：TOF/TOF, レーザー強度：50 %, V_G：2000 V, t_d‘：40 ns

検出器電圧：3200 V, 積算回数：10000 shot,

イオンゲート delay: 281.59 μs , width: 300ns

衝突室真空度: 3.3×10^{-4} Pa 測定モード：TOF/TOF

図45のb-eをみると, ピークトップが分離されていることを確認できた. ピークが完全に分離できていないために比較はできないが, おおよそ式(34)で表される比で検出されており, ^{13}Cは構造内に局在していないと思われる. 各質量でピークが半値幅の定義で分離できているので, フラグメントイオンに対する分解能R_{FWHM}は, 少なくとも1000以上はあると思われる. この数字は, トリプシン消化により生成される多くのペプチドの質量は1000-1500程度となるため, それらを測定する上で, フラグメントイオン全体を1 u違いのイオンを分離することは可能である. しかし, ピークトップが辛うじて分離される程度であるために強度比が大きく異なるピークでは見逃す可能性があり, 十分であるとはいえない. そのため, MS/MS測定を高分解能で測定するためには, 試料の濃度を薄くするやレーザー強

度を押さえるなどのプリカーサーイオンのピーク幅を細くする工夫が必要であると思われる.

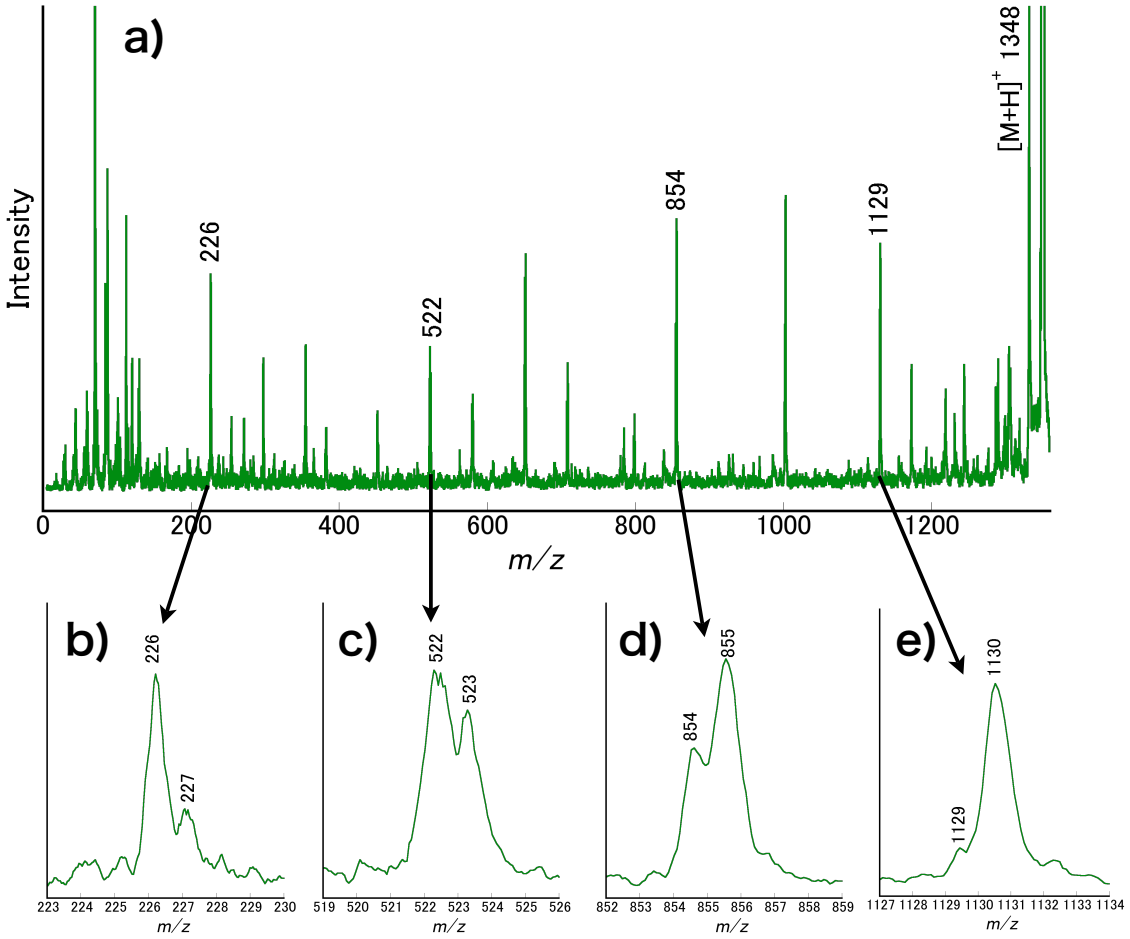


図45. Substance Pのプロダクトイオンスペクトル
(a. 全体, b-e. それぞれ*m/z* 226, 522, 854, 1129近傍を拡大)

4.2.2 質量精度の評価

前項で, MS-Ⅱに1000以上の分解能があることがわかった. しかし, 1 u離れたフラグメントイオンを分離できても質量精度が悪ければ, 同定する事はできない. そこで, 質量精度の評価を行い, 分解能に見合った値であるか確かめた.

外部標準試料として, angiotensin Ⅰのプロダクトイオンスペクトルを用いて較正を行い, bradykinin ($[M+H]^+$ =1060.6) (Sigma-Aldrichより購入), substance P, ACTH fragment 18-39の測定を行った. 最初にMASCOTのMS/MSサーチにかけ, 配列通りにヒットされていることを確認した上で, MASCOTの結果で配列の同定に用いられたフラグメントイオンの測定値とprotein prospectorで求めた計算値を比較し, 誤差を求めた.

i)**測定手順**

最初に較正法について説明する. angiotensin Ⅰを測定したプロダクトイオンスペクトルからa イオン等をアサインしてプリカーサーイオンを含めて合計11組の飛行時間tとそれに対応するフラグメントイオンの質量m_fの組み合わせを得た. それを横軸をm_fのルート, 縦軸をtとしてプロットし, 式(35)のα, βの値を求めた. この際に最小２乗法でフィッティングするのではなく, 近接する２点を直線結び, 各点間毎にαおよびβを求めた.

$$t = \alpha\sqrt{m_f} + \beta \qquad \text{式(35)}$$

各質量 m_fおよび飛行時間 t に対するα, βのテーブルを得たことになる. この結果を異なる質量のイオンのプロダクトイオンスペクトルに適用する場合は, 適用したイオンの質量をM, 飛行時間をTとして, angiotensin Ⅰのプリカーサーイオンの場合のα, βをそれぞれα_p, β_pとして, 次の式を用いて新たにβ_pを求める (これをβ_p'とする).

$$\beta_p' = T - \alpha_p\sqrt{M} \qquad \text{式(36)}$$

このβ_p'を用いてangiotensin Ⅰで作成したテーブルの範囲を異なる質量のイオンに合わせて補正を行う. angiotensin Ⅰの各範囲の始点の飛行時間をt_i(i= 1.2.3....10) とし, プリカーサーイオンの飛行時間t_pとすると, 新たに作成するテーブルの始点の飛行時間をT_iは次の式で求められる.

$$T_i = \frac{T-\beta_p'}{t_p-B_p}\, t_i \qquad \text{式(37)}$$

αについては, angiotensin Ⅰから導出された値を用いるが, βについては以下の式で求められるβ'を用いる.

$$\beta' = \beta_p' + \beta - \beta_p \qquad \text{式(38)}$$

そして, 各区間毎のα, β'を用いて式で, 飛行時間から質量への変換を行う.

$$m_f = \left(\frac{t-\beta'}{\alpha}\right)^2 \qquad \text{式(39)}$$

Angiotensin I , bradykinin, substance P, ACTH fragment 18-39を濃度1 pmol/μLで調整し，α-CHCA (solid) と混合し測定を行い，前述の較正法で較正を行い，それぞれのプロダクトイオンスペクトルの横軸を飛行時間から質量へと変換した．そして，横軸が質量になったプロダクトイオンスペクトルから一定の強度以上のピークの重心値を求め，ピークリストを作成した．作成したリストをMASCOTのMS/MSサーチにかけたところ，bradykinin, substance P, ACTH fragment 18-39それぞれ配列通りに同定できた．そして，MASCOTで配列の同定に用いられたフラグメントイオンの測定値の計算値からの誤差を，3回測定を行い求めた．

ii)**測定結果および考察**

Bradykinin, substance P, ACTH fragment 18-39それぞれの最初に測定したプロダクトイオンスペクトルを図46-48aに示す．2回目以降は，ほぼ同じスペクトルとなったため，省略する．スペクトルは，イオンゲートを用いてモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択し測定を行った．測定条件は次のようになる．

測定モード：TOF/TOF, レーザー強度：50 %,

V_G：2000 V, t_d‘：40 ns. 80 ns(ACTHのみ)検出器電圧：3200 V

積算回数：10000 shot, イオンゲート delay: 249.69 (bradykinin), 281.48 (substance P), 380.69 (ACTH fragment 18-39) μs, width: 300ns

衝突室真空度: 3.3×10^{-4} Pa

各スペクトルでラベルが振ってあるピークは，MASCOTのサーチ結果で配列の同定に用いられたフラグメントイオンで，図46-48bに3回分の測定結果から求めた誤差を示す．MASCOTの条件は，検索範囲を一切制限せず，これまでの測定結果からプリカーサイオンの質量決定精度は10 ppmとした．また，フラグメントイオンの質量決定精度は，デフォルトの0.6 uとした．()内は，各条件のMASCOT MS/MSサーチの表示を表す．

データベースの種類 (Database)：MSDB

検索範囲 (Taconomy)：All entries

消化酵素 (Enzyme)：None

消化不備の数 (missed cleavages)：0

確実な修飾 (Fixed modifications)：None

可能性のある修飾 (Variable modifications)：Amidated (C-term)

プリカーサーイオンの質量決定精度 (Peptide tol.)：±10 ppm

フラグメントイオンの質量決定精度 (MS/MS tol.)：±0.6 u

プリカーサーイオンの価数 (Peptide charge)：1+

プリカーサーイオンの質量 (Precursor m/z)：プロトン付加の質量 (計算値) Monoisotopic

測定に用いた装置 (Instrument)：MALDI TOF/TOF

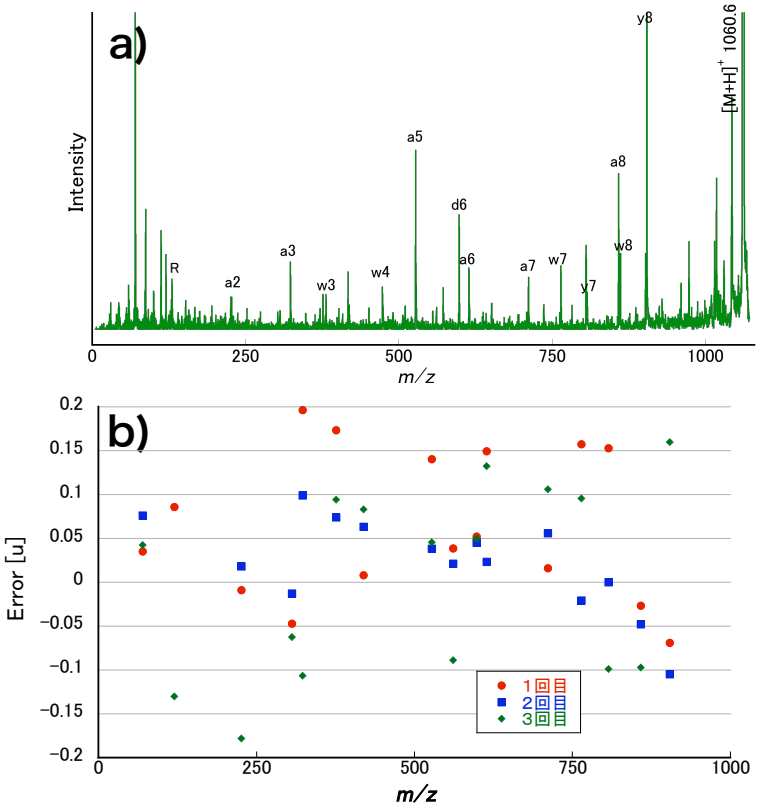


図46. Bradykininの結果

(a. プロダクトイオンスペクトル, b. フラグメントイオンの誤差)

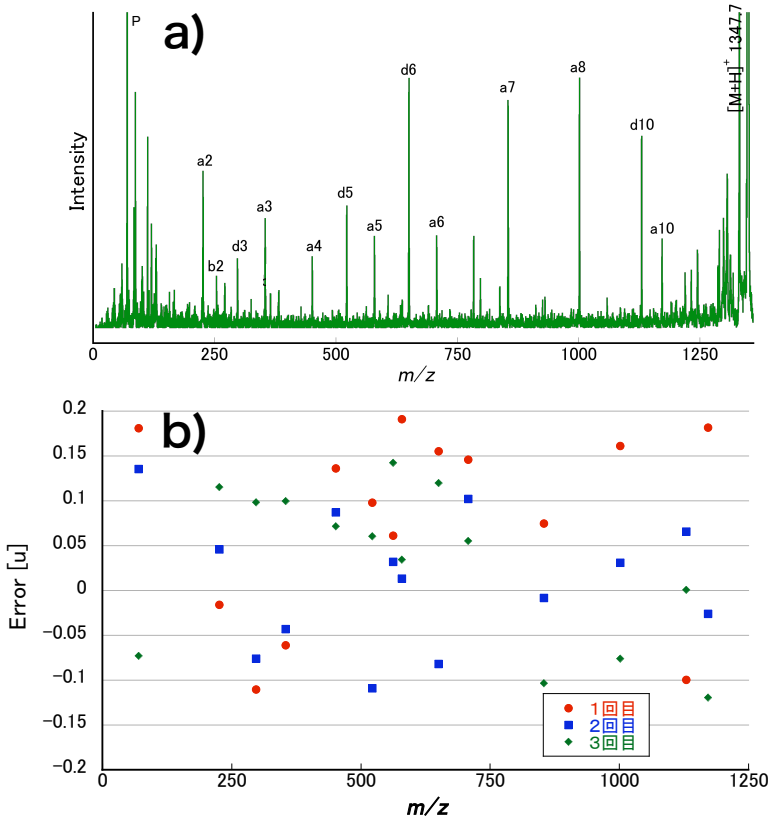


図47. Substance Pの結果

(a. プロダクトイオンスペクトル, b. フラグメントイオンの誤差)

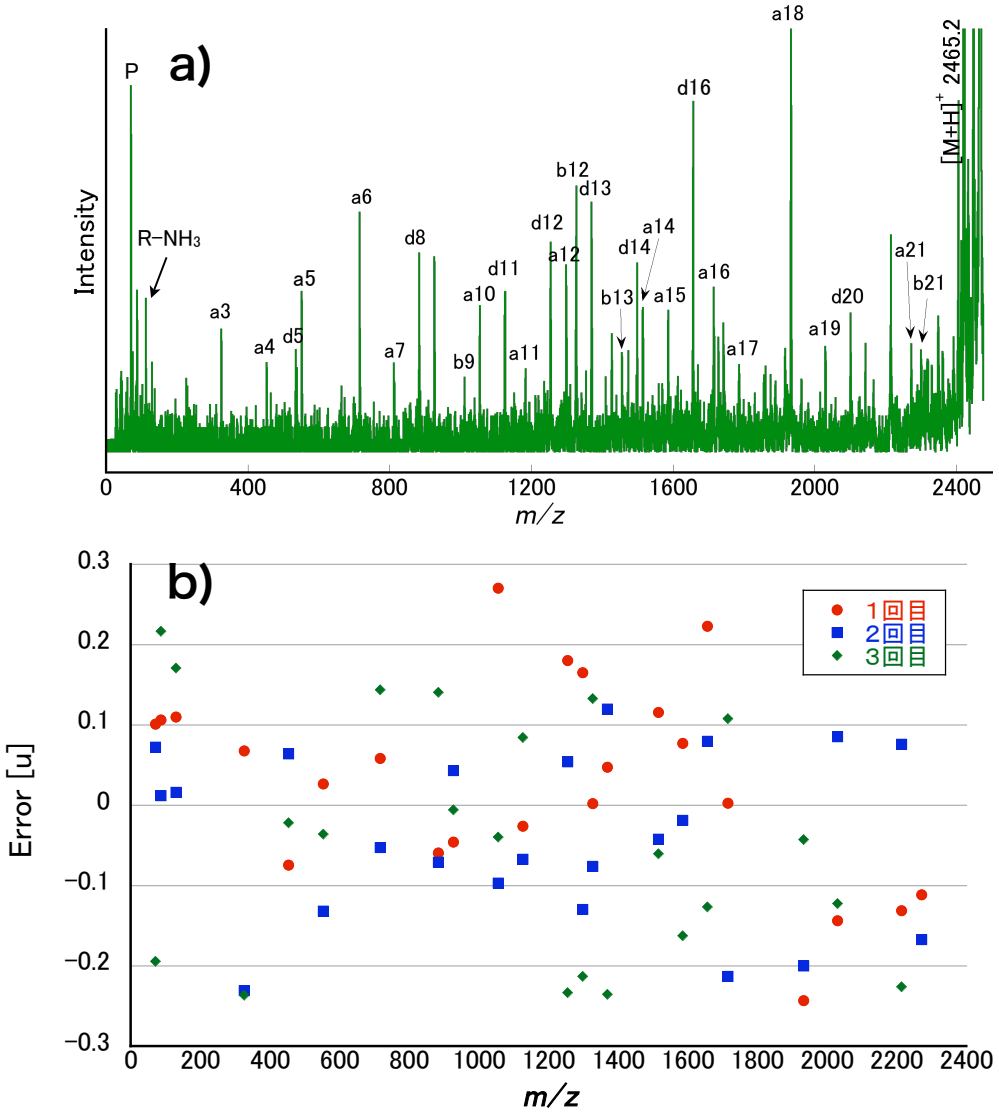


図48. ACTH fragment 18-39の結果
(a. プロダクトイオンスペクトル, b. フラグメントイオンの誤差)

各試料で, 同条件で３回測定を行い, 誤差を求めたが, 図46-48bの全範囲で±0.3 u以内に収まったている. このことから, 外部標準としてangiotensin I を用いれば, タンパク質をトリプシンで消化することによって生成されるペプチドを±0.3 uの質量決定精度で, MS/MS測定可能であることがわかった. MASCOTのMS/MSサーチの条件でフラグメントイオンの精度を0.6 uから0.3 uに変えて再度検索を行ったところ, 0.6 uのときよりも３つのペプチドにおいて同定の正確性を表すスコアの向上が得られた. また, *m/z*に対する誤差のパターンに同じような傾向が見られないため, angiotensin I で較正に用いた11 個のピークで十分であり, より多くのフラグメントイオンのパターンが観測される合成高分子などの試料を外部標準として用いても, 精度はあまり変わらないことが予想される.

4.2.3 感度 (検出限界) の評価

MS/MSの感度についてもangiotensin IIを用いて行った.

Angiotensin IIの濃度を変えて, どの程度の濃度まで主要なピークが, S/N比３以上で測定でき, さらにMASCOTのMS/MSサーチで配列通りに同定可能か試みた.

i)**測定手順**

Angiotensin IIの濃度を0.1％TFAを用いて, 1 pmol/μLから10倍刻みで薄め, 各濃度でモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択し. プロダクトイオンスペクトルを測定した.

ii)**測定結果および考察**

測定結果を図49に示す. 図49a-bでは, 各a イオンがS/N比３以上で検出できている. 図49cでは他のスペクトルでも強い強度で検出されている, a3-6イオンについては, S/N比３以上で検出されているが. a2やa4イオンと言った他のイオンが検出されていなかった. 1 pmol, 100 fmol/μLについては, 4.2.2と同条件でMASCOTのMS/MSサーチにかけたところ, 1 pmol/μLでは配列通りにヒットしたが, 100 fmol/μLではヒットした配列の候補の中に同じ配列はあったが, 同定することはできなかった.

測定モード：TOF/TOF, レーザー強度：53 %,

V_G：2000 V, t_d‘：40 ns. 80 ns(ACTHのみ)検出器電圧：3200 V

積算回数：10000 shot,

イオンゲート delay: 248.05 μs, width: 280ns, 衝突室真空度: 3.2×10^{-4} Pa

MS/MSの場合も4.1.3と同様に, 濃度を薄くするとイオンが検出される場所が限定されてしまい, 安定して出る場所も非常に限られてしまう. しかも, 4.1.3と比べると感度はかなり悪くなっている. これはマススペクトルを測定する場合は, プリカーサーイオンを測定するために多少イオン量が少なくとも積算を重ねればS/N比が３以上で測定できるが, MS/MSの場合はプリカーサーイオンが解離して生成されるフラグメントイオンを測定し, その解離パターンもいくつかあり, さらに解離するイオン自体もプリカーサーイオン全体の半分にも満たないためにマススペクトルを測定する以上に強度およびスペクトルの積算が必要となる. 100 fmol/μLでは, 確かにa系列のイオンが検出されているが, MASCOTでは配列通りにヒットしなかった. 図49b,cで検出されているノイズのようなピークは, 4.1.3と異なりイオンゲートで特定の質量のイオンを選択していることから, イオンが衝突室後, MS-IIの再加速部やイオンミラーの部分で解離して生成されたイオンであると思われる.

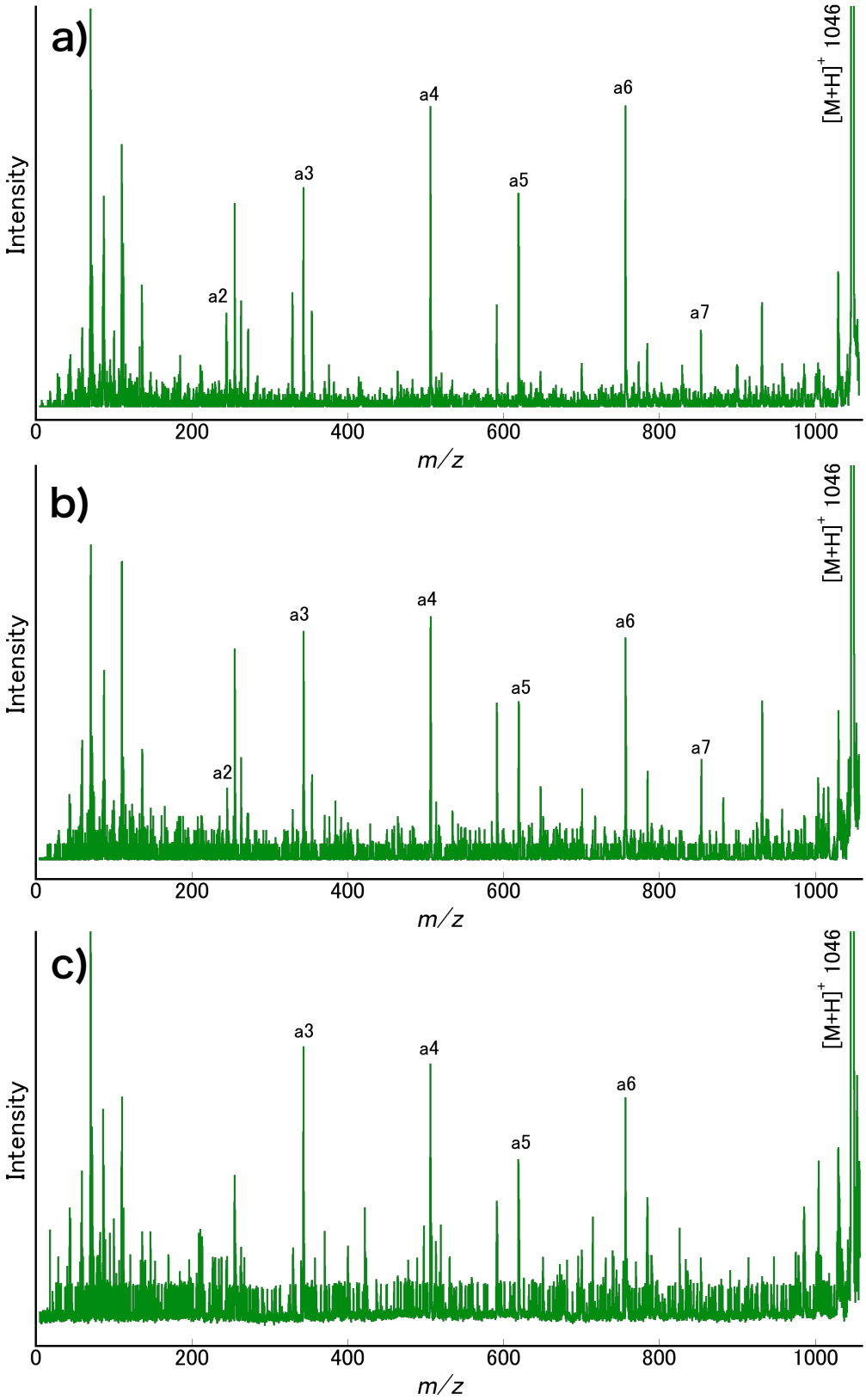


図49. Angiotensin II のプロダクトイオンスペクトル
(a. 1 pmol/μl, b. 100 fmol/μl, c. 10 fmol/μl)

実験 1 まとめ

“MALDI Spiral TOF”単体として, angiotensin Ⅱ とinsulinを同時に分解能30000程度で測定でき, 幅広い質量範囲を高分解能で測定できることがわかった. また, 遅延時間を調節することで, 分解能 40000程度までは向上することを確認した. 質量l決定精度は, 試料の近傍にpeptide-mixを外部標準として用いることで, *m/z* 700-2000の範囲は, 10 ppmの精度で測定できることがわかった. 感度は, angiotensin Ⅱ では10 fmol/μLまでS/N比が 3 以上で検出され, 10 fmol/μLより薄くても1 amol/μLまでは存在比の大きい同位体ピークに関しても検出可能であることがわかった. ACTH fragment 18-39では, 100 amol/μLまでは検出可能であることがわかった. 通常の飛行時間型質量分析計では同位体ピークを分離することが難しいタンパク質においても質量13000程度までは, 分離可能であることがわかった. タンデム質量分析計のMS- Ⅰ としても, 質量2800程度までであればモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択できることがわかった.

“MADLI Spiral TOF/TOF”として, angiotensin Ⅱ を用いて100 fmol/μLまでは, a イオンのピークをS/N比が 3 以上で検出できることがわかった. substance Pの２番目の存在比の同位体ピークを選択することで意図的に1 u違いのフラグメントイオンを生成し, 全質量範囲で分離できていることを確認した. また, angiotensin Ⅰ を用いて較正することで, angiotensin Ⅱ, substan-ce P , ACTH fragment 18-39に関しては, MASCOTのMS/MSサーチで配列通りにヒットすることを確認し, フラグメントイオンの質量決定精度も±0.3 u程度であることを確認した.

5章. 実験２ 「リン酸化ペプチドの修飾部位の同定」

タンパク質のリン酸化は, 植物に限らず細菌からヒトに至るほとんど全ての生物種において細胞内シグナル伝達系, 細胞の癌化学など様々な生物化学的過程において幅広く使用されている. そのためにタンパク質のどの部位がリン酸化しているかはシグナル伝達経路を理解する上で非常に重要であるといえる. 蛍光染色法やウェスタンプロット法では, タンパク質全体を見るため, リン酸化の存在は確認することができるが, その位置までは特定できない. そこで, 分子を解離させ, そのフラグメントイオンを検出するタンデム質量分析法が用いられることになる. タンパク質をそのままイオン化し, タンデム質量分析法で分析することは困難であるため, 通常は消化酵素で消化し, 網羅的に解析していくことになる. リン酸基はセリン・トレオニン・チロシンに付加されうるが, 中でもセリンおよびトレオニンのリン酸基は熱力学的に不安定で, 容易にリン酸基がH_3PO_4の形で脱離する. したがって, CIDではペプチド主鎖の開裂よりもこの脱離が優先的に起き, 修飾位置の同定は困難であるとされてきた [41]. しかし, トレオニンのリン酸化については, 我々の研究室で開発されたマルチターンタンデム飛行時間型質量分析“MULTUM-TOF/TOF”を用いて, 高エネルギーCIDではリン酸基が付加されたままのフラグメントイオンが検出され, 修飾部位を同定可能だと報告された[8]. そこで, 今回トレオニンだけでなく, セリン, チロシンのリン酸化についても測定を試み, 高エネルギーCIDではリン酸が付加したままのフラグメントイオンが検出されるか調べた.

リン酸化の翻訳後修飾を受けることで知られるカルモジュリンの281番目から289番目のアミノ酸配列に相当する Met-His-Arg-Gln-Glu-Thr-Val-Asp-Cys のトレオニンがリン酸化されているリン酸化ペプチド (以後, 6-pTと表記する.) を用意し, さらにトレオニンの部分をセリン・チロシンに置換し, それぞれがリン酸化されたリン酸化ペプチド (以後, 6-pSおよび6-pYと表記する) も用意した (東レリサーチセンターにて合成). また, 比較のためにそれぞれについてリン酸化されていないペプチドも用意した (それぞれ, 6-T, 6-S, 6-Y と表記する). リン酸化の有無による質量差は, 80 u (-HPO_3) となる.

i) **測定手順**

6-T ($[M+H]^+$=1118), 6-pT ($[M+H]^+$=1198), 6-S ($[M+H]^+$=1104), 6-pS ($[M+H]^+$=1184), 6-Y ($[M+H]^+$=1180), 6-pY ($[M+H]^+$=1260)それぞれを10 pmol/μLで調整し, CHCA (solid) と1:1で混合し, 0.5μLをサンプルプレートに滴下した. 測定を行ったところ, 6-pTおよび6-pSについては, ピークは検出されたが, その強度は弱く, プロダクトイオンスペクトルを測定するのには不十分であった. そこで, 一般的なペプチドでPSDが起こりにくいとされている [36], CHCA (liquid) を試した. 1 : 1で混合し, 測定を行ったところ, 全ての試料でプロダクトイオンスペクトルを測定することができた. また, 衝突室にHeを充填していない状態のプロダクトイオンスペクトルについても測定を行った. このときのスペクトルに検出されるピークは, 真空度が8×10^{-6} Paと高いためCIDによるフラグメントイオンではなく, 主にPSDによるフラグメントイオンが検出される. そのため, PSDスペクトルと表記する.

ii)**測定結果および考察**

6-T, 6-pT, 6-S, 6-pS, 6-Y, 6-pYのプロダクトイオンスペクトルおよびプロダクトイオンスペクトル (PSD) を図50-55に示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF/TOF, レーザー強度 : 54 %

V_G : 2000 V, t_d' : 80 ns, 検出器電圧 : 3200 V

積算回数 : 10000 shot,イオンゲート delay: 256.45 (6-T), 265.46 (6-pT), 254.84 (6-S), 263.91 (6-pS), 263.46 (6-Y), 272.24 (6-pY) μs, width: 300ns

衝突室真空度: 3.7×10^{-4} Pa

各スペクトルのピークのアサインは, protein prospectorを用いてフラグメントイオンの質量を計算し行った.

最初に6-Tおよび6-pTについて考える. 図50のPSDスペクトルをみると, トレオニンがリン酸化されていない6-Tでは, b8イオンが検出されているが, それ以外のイオンはほとんど検出されていない. これは, MS- I である“Spiral TOF”では3.2で説明したようにPSD由来イオンは排除されるためだと思われる. リン酸化されている6-pTでは, 6-Tと同じようにb7やb8イオンが検出されてはいるが, それ以上の強度でリン酸基が, H_3PO_4の形で脱離したイオン ($[M+H]^+$-H_3PO_4) が検出されている. これは, 既に報告されている [41, 42] ように, PSDではトレオニンのリン酸基は脱離しやすいことと一致する.

図51のプロダクトイオンスペクトルをみると, 6-Tでは, N末端に塩基性アミノ酸であるヒスチジンやアルギニンが存在しているためにaやdイオンが主に検出されている. aイオンについては, 配列を反映した2-8までの全てのフラグメントイオンが観測されている. 6-pTのプロダクトイオンスペクトルをみると, 6-Tと同じようにaやdイオンが主に検出されている. aイオンについては, 2-5までは6-Tのそれと同じ質量で検出されており, 6以降は+80 uの位置に検出されている. m/z 835については, ピークを拡大したところ, 図51のように２つに分かれており, m/z 835のa6 イオンとm/z 836のa7-H_3PO_4が共に検出されている. すなわち, リン酸基が付加したままのa イオンが, 2-8まで検出されているので, これをみることで, スペクトルから直接６番目のアミノ酸であるトレオニンがリン酸化されていると同定することが可能となる.

リン酸基が脱離してペプチド主鎖が開裂したイオンについては, b6-H_3PO_4および a7-H_3PO_4のみ確認できた. どちらも図52のPSDスペクトルでは, 検出されていないことから, 高エネルギーCIDの結果生成されたイオンだと考えられる. 高エネルギーCIDでは, 一度にイオンに十分な内部エネルギーを与えるために, イオンは幅広い内部エネルギーを持つことになる. よって, リン酸脱離が起こらずに結合エネルギーの大きいペプチド主鎖の開裂も起こるが, エネルギー準位の低いリン酸脱離も当然起こるため, b6-H_3PO_4およびa7-H_3PO_4が観測されたと考えられる.

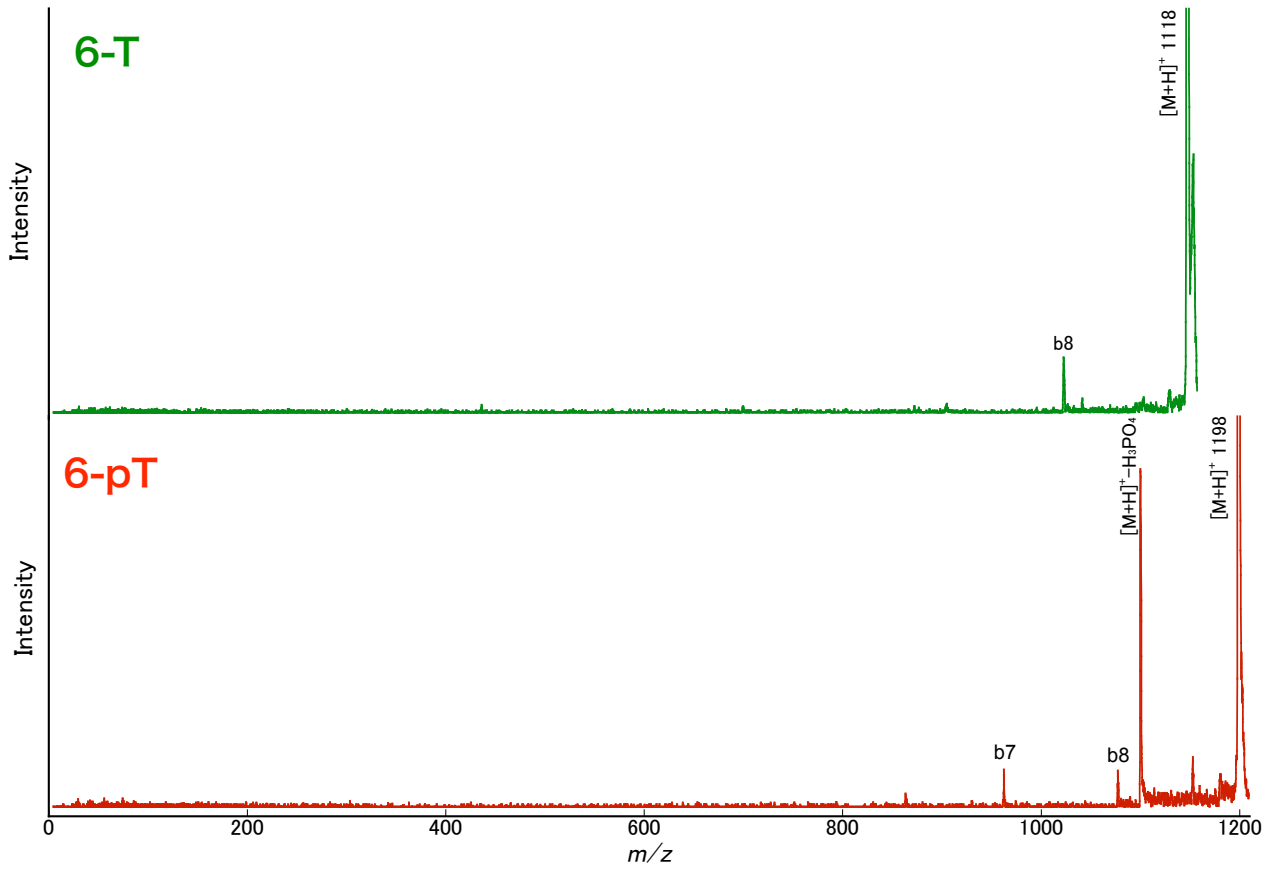


図50. 6-TおよびPSDスペクトル

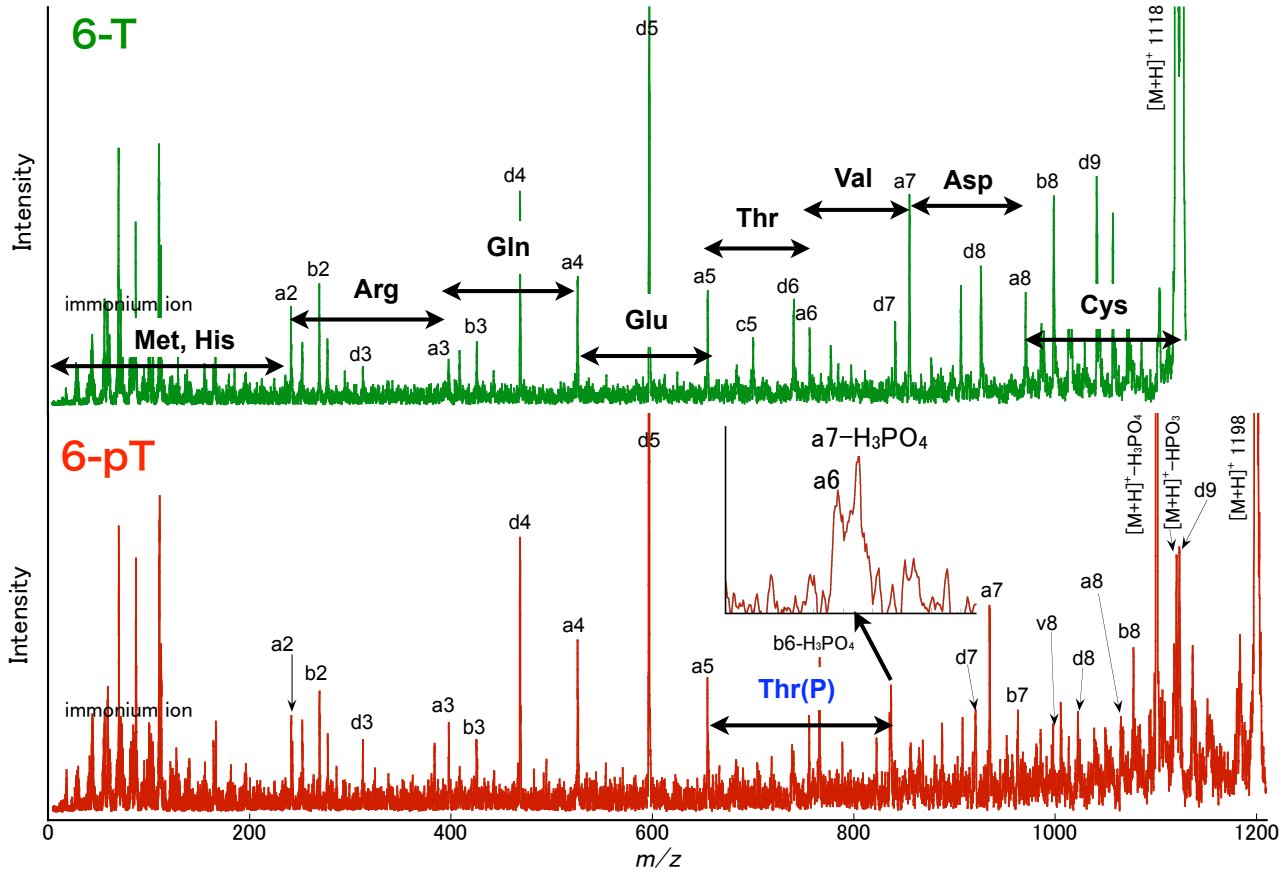


図51. 6-TおよびPSDスペクトル

ただ, b6- H_3PO_4とa7-H_3PO_4のみ観測され, なぜそれ以外の位置で開裂したイオンが観測されないかについては, トレオニンのリン酸化の特有なのか他の部分の配列によるものか, 今後検討する必要がある. また, 同じくPSDスペクトルではほとんど観測されなかったプリカーサーイオンからリン酸基が HPO_3 の形で脱離したイオンも, 図51では検出された. $[M+H]^+$-HPO_3のピークが, $[M+H]^+$ -H_3PO_4と比べ相対的に強く検出されたことから, リン酸脱離において, HPO_3の形での脱離より, H_3PO_4の脱離の方が, 安定であることが予想される.

以上のことから, 既に報告されているように, トレオニンのリン酸化では, 高エネルギーCIDを行った場合, リン酸基が付加したままペプチド鎖が開裂したイオンが観測され, その修飾部位の同定は可能となる.

次に6-Sおよび6-pSについて考える. 図52のPSDスペクトルをみると, トレオニンの場合と同じような傾向を示している. リン酸化されていない6-Sでは, b8イオンが検出され, 他のイオンについてはほとんど検出されていない. セリンがリン酸化されている6-pSでは, $[M+H]^+$-H_3PO_4が強く検出されている. これについても既に報告されている [41, 42] ようにセリンのリン酸基は脱離しやすいことと一致する.

図53のプロダクトイオンスペクトルについても, トレオニンの場合と同じ傾向を示している. 6-Sでは, aやdイオンが主に検出されており, aイオンは配列を反映した2-8の全てのフラグメントイオンが観測されている. 6-pSでは, リン酸基が付加したままのa イオンが検出されており, セリンのリン酸化についても修飾部位の同定は可能である. また, リン酸基が脱離したイオンについても, トレオニンと同じb6-H_3PO_4やa7-H_3PO_4, $[M+H]^+$-HPO_3 が検出されており, 高エネルギーCIDでは, リン酸基が付加したイオン, 脱離したイオンの両方が生成されると思われる. トレオニンと同じ, リン酸基が脱離した状態でペプチド主鎖が開裂したイオンは, b6-H_3PO_4とa7-H_3PO_4のみ観測されているが, これについても今後他の試料を測定するなどして, 検討する必要があると思われる.

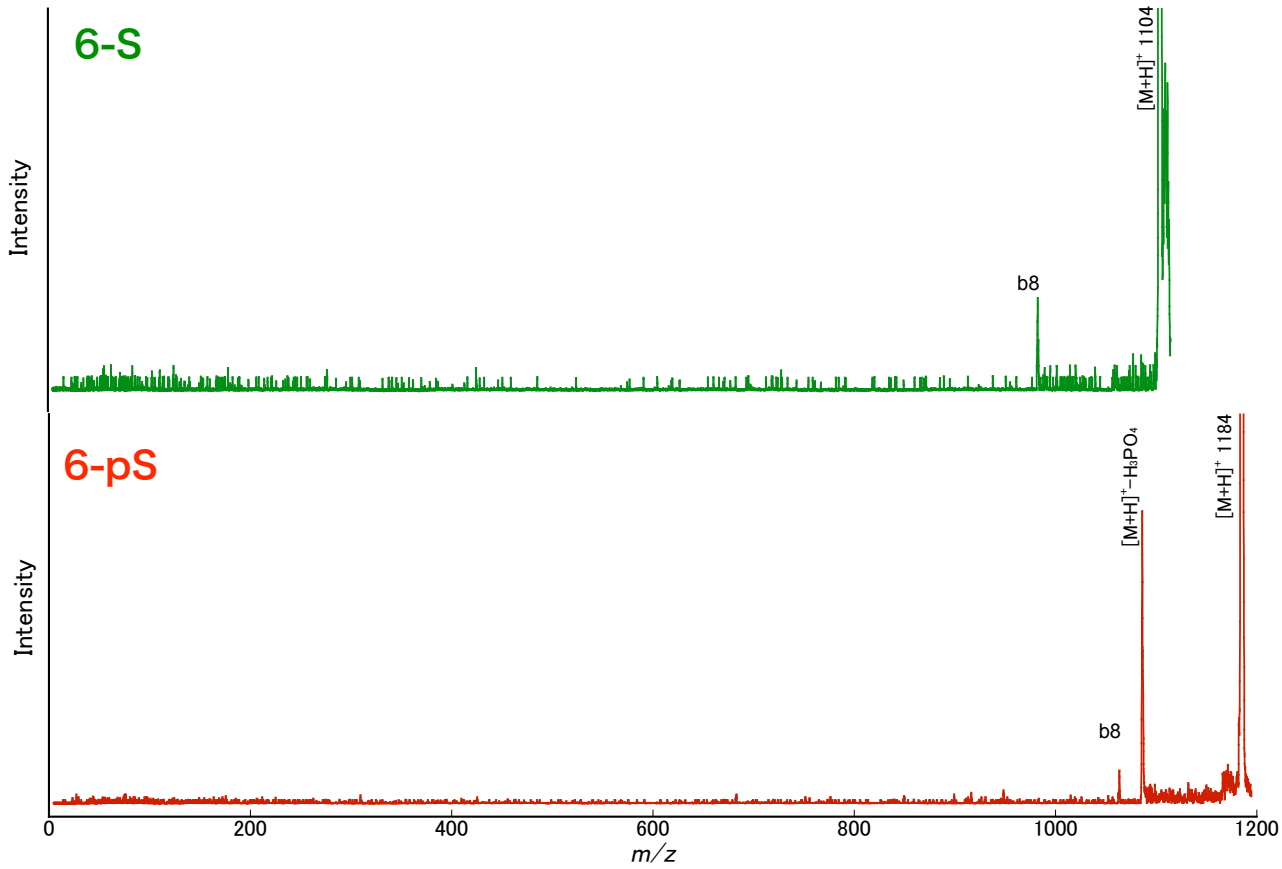


図52. 6-Sおよび6-pSのPSDスペクトル

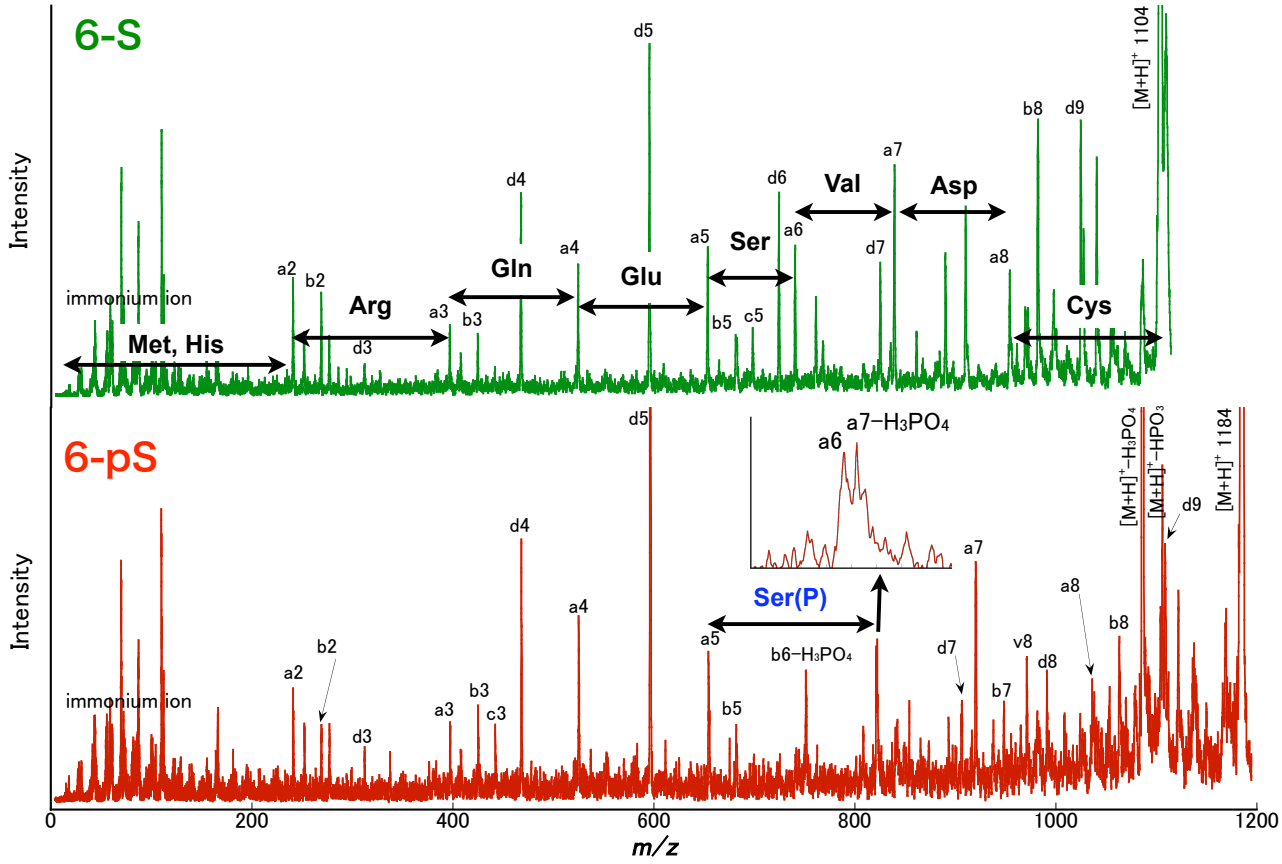


図53. 6-Sおよび6-pSのプロダクトイオンスペクトル

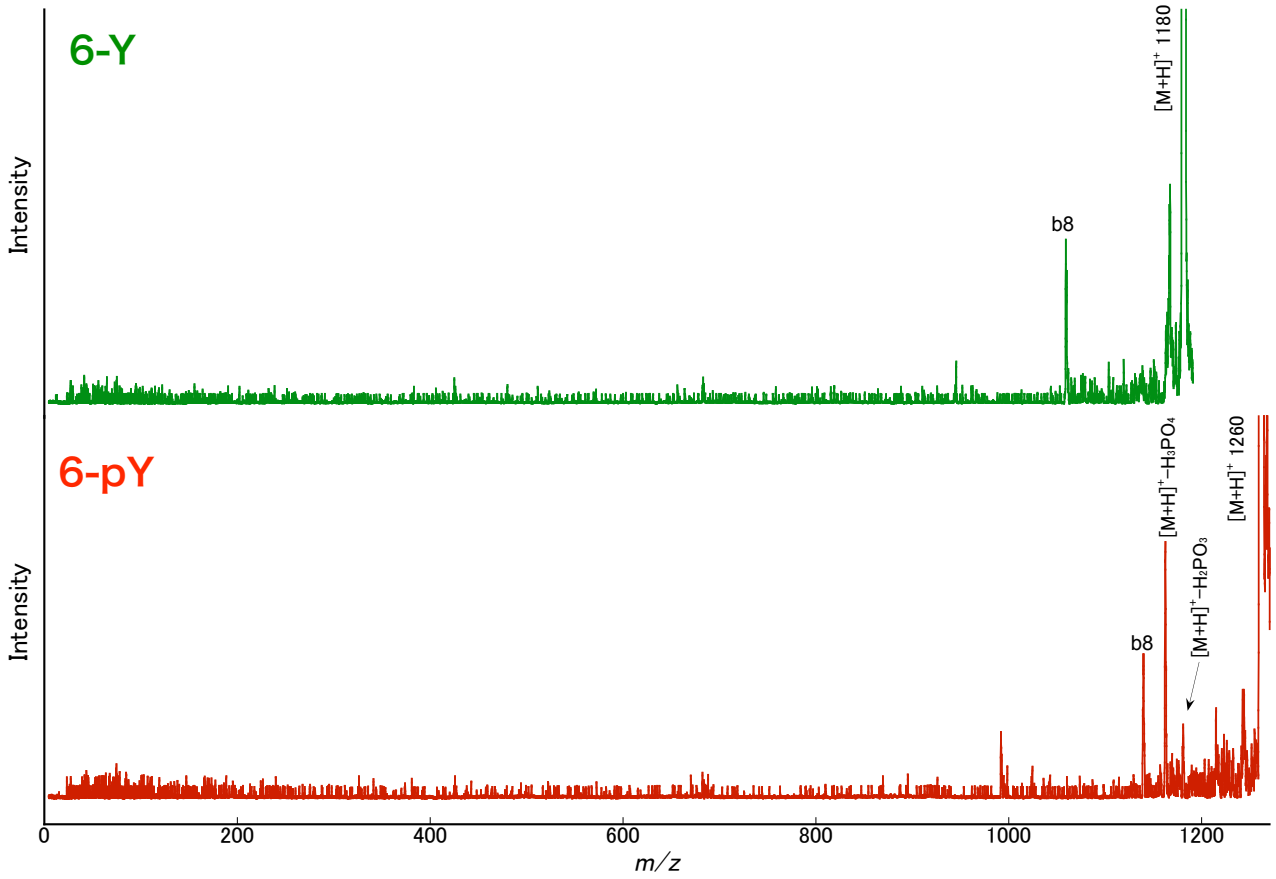


図54. 6-Yおよび6-pYのPSDスペクトル

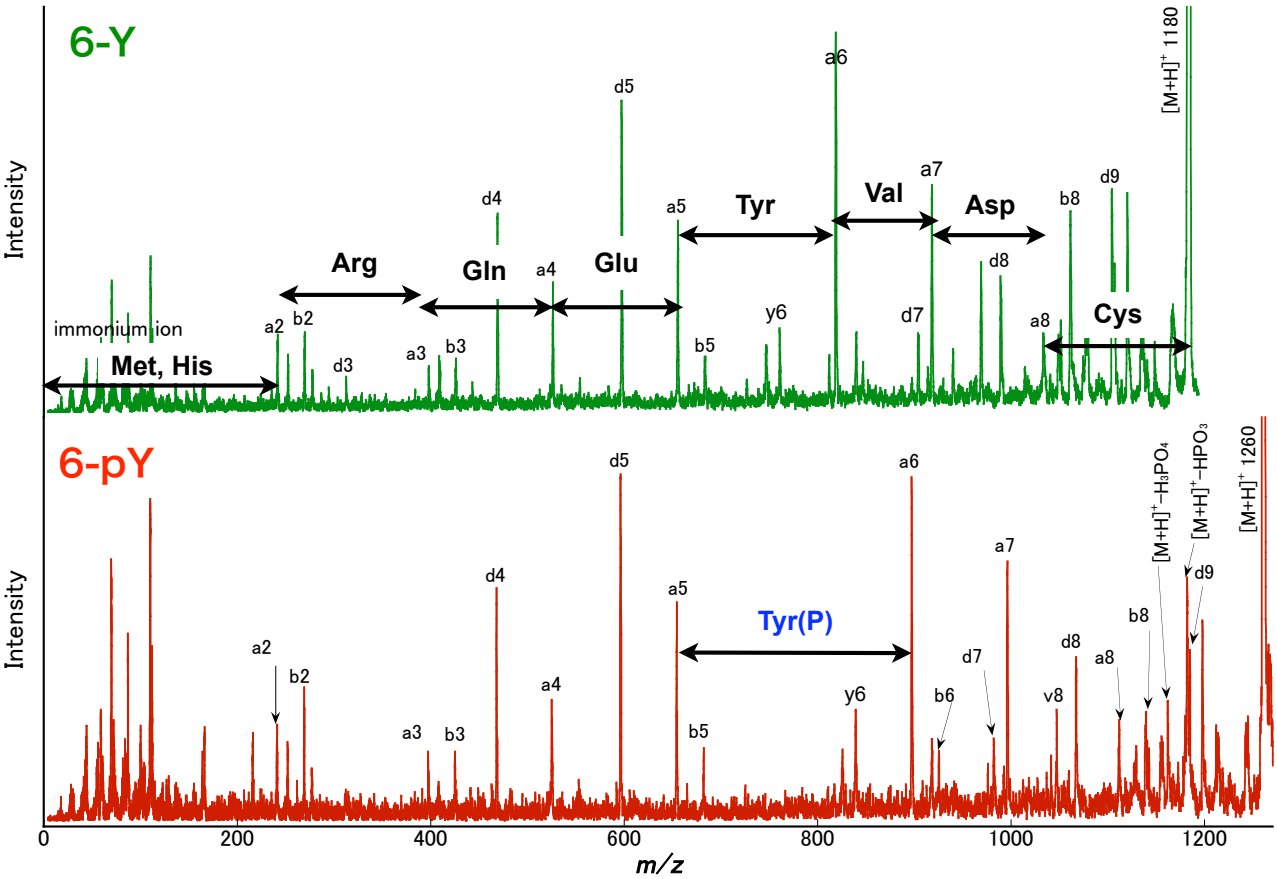


図55, 6-Yおよび6-pYのプロダクトイオンスペクトル

最後に6-Yおよび6-pYについて考える. 図55のPSDスペクトルをみると, これまでの結果と異なり, 6-Yではb8イオンが検出されているが, 6-pYでは, $[M+H]^+$-H_3PO_4だけでなく, $[M+H]^+$-HPO_3も検出されている. これは, チロシンのリン酸化は, セリン, トレオニンのリン酸化と異なり熱力学的に不安定でないため, PSDではH_3PO_4としての脱離はほとんど起こらないとされており[43], H_3PO_4の形での脱離とHPO_3の形での脱離の安定性の差がセリン, トレオニンのリン酸化ほど大きくないためだと考えられる.

図55のプロダクトイオンスペクトルをみると, 6-Yではこれまでと同じようにaやdイオンが検出され, 配列を反映したものとなっている. 6-pYについても, リン酸基が付加したままのaイオンが-8まで検出されているため, 修飾部位は特定することが可能となる. これら以外のピークをみると, $[M+H]^+$-H_3PO_4や$[M+H]^+$-HPO_3のイオンが検出されているが, その強度はこれまでの結果とことなり, 他のイオンの強度と同程度になっている. 6-pT, 6-pSで見られたb6-H_3PO_4やa7-H_3PO_4のイオンは検出されていない. これは, リン酸の結合エネルギーは, ペプチド主鎖の結合エネルギーと同程度あるいはそれ以上となっており, リン酸脱離がトレオニンやセリンほど起こりにくいためだと考えられる.

さらに, immonium ion (図56) をみると, トレオニンやセリンではリン酸化の有無による違いは見られなかった. しかし, チロシンでは, リン酸化されていない6-Yだと*m/z* 136にチロシンのimmonium ionが検出されているが, 6-pYではその位置にimmonium ionが検出されておらず, そこから+80 uの位置 (*m/z* 216) にリン酸基が付加したままのチロシンのimmnonium ionだと思われるピークが検出されている. 以上のことからも, チロシンのリン酸化での, リン酸の結合エネルギーは, ペプチド主鎖の結合エネルギーと同程度だと思われる.

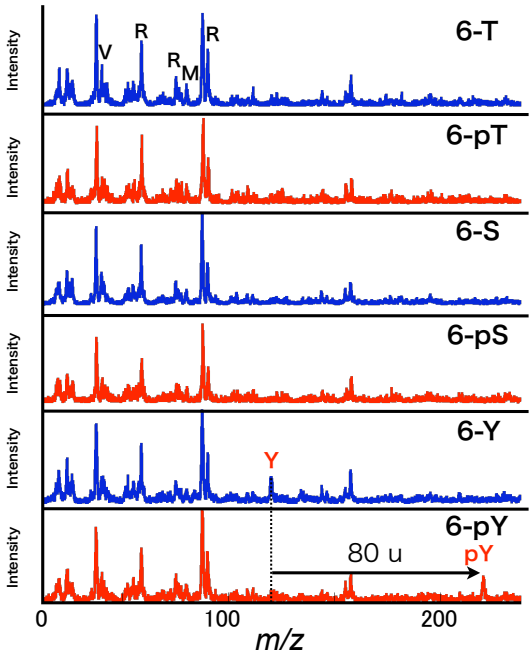


図56. プロダクトイオンスペクトルの*m/z* 0-250を拡大

実験2まとめ

トレオニンだけでなく, セリンおよびチロシンでも高エネルギーCIDにおいてリン酸が付加したままの状態でペプチド主鎖が開裂したフラグメントイオンが確認できた. そのため, 高エネルギーCIDを測定することで修飾部位の同定は可能であると思われる. また, トレオニンおよびセリンのリン酸化では, リン酸の結合エネルギーは, ペプチド主鎖の結合エネルギーよりも小さく, 同じリン酸脱離でもHPO_3の形での脱離より, H_3PO_4の脱離の方が安定だと思われる. チロシンのリン酸化では, プリカーサーイオンからリン酸脱離したイオンの強度は, 他のイオンの強度と同程度であり, リン酸が付加したままのimmonium ionが検出されたことから, リン酸とペプチド主鎖の結合エネルギーは同程度であると思われる.

6章. 実験3 「リン脂質の構造解析」

この章ではリン脂質の構造解析について説明する. リン脂質は細胞を覆う生体膜である細胞膜の主要な成分である. 細胞膜はただ単に細胞の内外を隔てるのではなく, 細胞の情報伝達に関わる部分であり, 細胞にとって重要な役割を果たしている. リン脂質は, 図45のようにグリセリン骨格の 1 位と 2 位の位置に疎水性の脂肪酸が結合し 3 位の位置に親水性のリン酸-Xが結合した構造を持つ. この両極性により生体で単独の分子としては存在せず, 疎水基同士・親水基同士が結合し脂質脂質 2 分子膜を形成し細胞膜を形成している. また脂肪酸は長い炭素鎖を持ったカルボン酸であり, 炭素鎖の数およびそこに含まれる不飽和結合の数•位置により融点が異なる (脂肪酸は, (18:1)のように標記し18は炭素鎖の数であり 1 は不飽和結合の数を表す). この融点の違いによりリン脂質の働きが異なるためにそれを特定することは重要であると言える.

今回取り扱うのは, リン脂質の中でも特に量の多いXがコリン (リン酸と結合しているので合わせて特にフォスフォコリンという) となっているフォスファチジルコリン (phosphat-idylcholine, PC) (図57a)である. 図57bにPCの標準試料であるPC(16:0, 18:1)の構造を示す. これはグリセリン骨格の 1 位の位置に(16:0)の脂肪酸, 2 位の位置に(18:1)を有している. また脂肪酸が 2 位の位置には結合しておらず 1 位の位置にのみ結合しているPCを特にlyso-PCと呼ぶ.

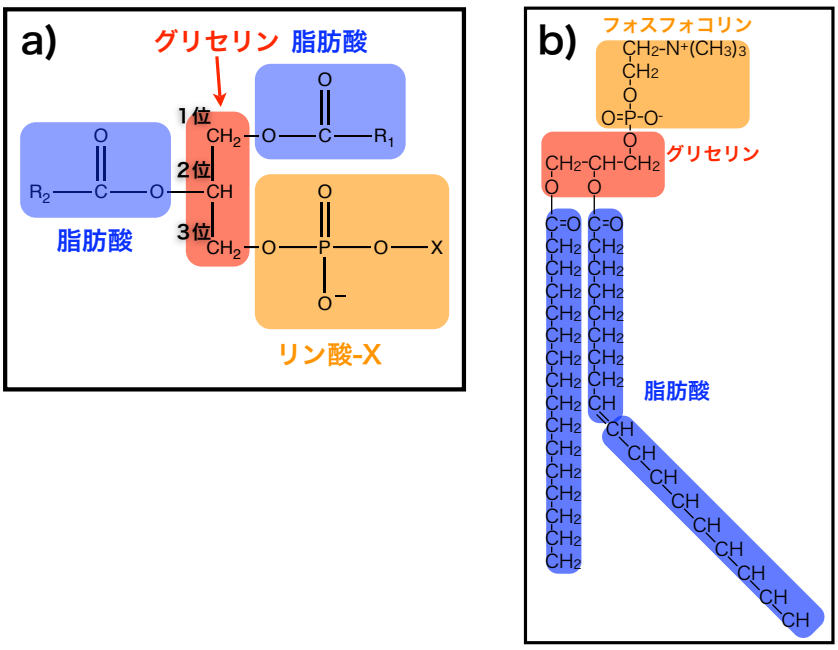


図57. a. リン脂質の構造, b. PC(16:0, 18:1)の構造

6.1. Lyso-PCの構造解析

最初に, 既にチャージリモートフラグメンテーション (CRF) による詳細な構造解析が報告されているlyso-PC[9]について測定を行い, 脂肪酸部分の構造を反映したCRFの解離パターンの確認を試みた. lyso-PCの構造解析においては, Na・K付加よりプロトン付加での測定がCRFの解析を容易に行えるとされているため[9], 全てプロトン付加の試料 ($[M+H]^+$) で行った.

i)**測定手順**

脂肪酸部分の炭素鎖の数は同じ18で, 不飽和結合があるlyso-PC (18:1) と不飽和結合がないlyso-PC (18:0) を用意した. lyso-PC (18:1) は, Sigma-Aldrichより精製品を購入し, lyso-PC (18:0) については, 同じくSigma-Aldrichより購入した卵黄由来のlyso-PC (P3556) に含まれていたため, それを用いた. メタノールを溶媒として用い, lyso-PC (18:1) については濃度10 pmol/μL, lyso-PC (18:0) については混合品であるために濃度を20 pmol/μLとした. 最初, α-CHCA (solid) を測定に用いたが, 原因はわからないが結晶状態にならず, そこにレーザーを照射してもイオンがほとんど検出されなかった. そこで, 同じ位置をレーザーで照射し続けてもイオンが安定して生成するとされている [36] α-CHCA (liquid) を試した.これにより, 安定してイオンが検出されたためにプロダクトイオンスペクトルの測定にはα-CHCA (liquid) を用いた. lyso-PC (18:0), lyso-PC (18:1) ともに試料とマトリックス, 水を1：1：0.5の体積比で混合し, サンプルプレートに0.5 μLを滴下し測定を行った. 水を加えたのは, 試料およびマトリックスは溶媒としてメタノールを用いており, ２つを混合してそのまま滴下すると溶液がプレートのウェルの範囲を超えて広がってしまうためである.

ii)**測定結果および考察**

Lyso-PC (18:0) およびlyso-PC (18:1) のプロダクトイオンスペクトルを図58に示す. どちらもモノアイソトピック質量の同位体ピークをプリカーサーイオンとして選択している. 測定条件は次のようになる.

測定モード：TOF/TOF, レーザー強度：58 %,

V_G：2000 V, t_d‘：60 ns, 検出器電圧：3200 V, 積算回数：10000 shot,

イオンゲート delay: 175.55 (lyso-PC (18:0)), 175.21 (lyso-PC (18:1)) μs, width: 300ns , 衝突室真空度: 2.7×10^{-4} Pa

低質量域のフラグメントイオンを比較するとlyso-PC(18:0)とlyso-PC(18:1)で, ほぼ同じパターンを示し, その質量も一致している. このことから, 低質量域のフラグメントイオンが脂肪酸部分由来のものでなく, フォスファチジルコリン由来のフラグメントイオンだと思われる[44]. 実際にいくつかのピークについて図59のようにアサインする事ができた. 中でもm/z 258のピークは, 脂肪酸がケトンの形で解離したフラグメントイオンとなっている. 以上のことから低質量域のピー

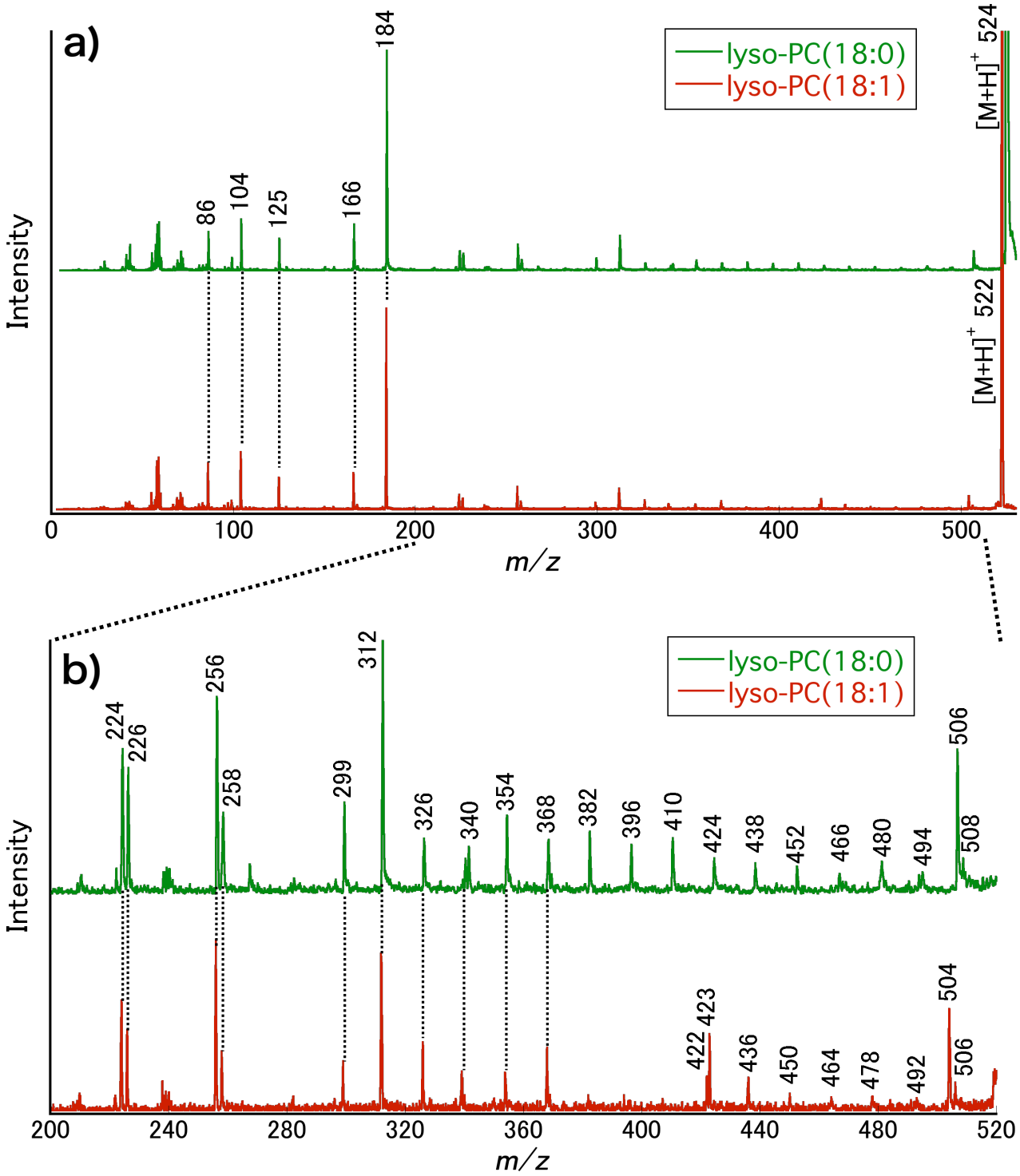


図58. lyso-PCのプロダクトイオンスペクトル (a. 全体, b. m/z 200-520を拡大)

緑線: lyso-PC(18:0), 赤線: lyso-PC(18:1)

クを見ることで, ヘッドグループがフォスファチジルコリンであることを確認できる.

高質量域を見ると, Lyso-PC (18:0), Lyso-PC (18:1) 共通でプリカーサーイオンから18 u脱離した*m/z*　506,504のイオンが検出されている. これは水が脱離したフラグメントイオンだと思われる. さらにプリカーサーイオンから16 u脱離し

た m/z 508, 506のピークも検出されている. これは図61上のように開裂していると考えられる[45]. そこから14 u刻みのピークが検出されていることから, 炭素鎖が開裂したものが系統的に観測されており, それぞれ開裂時に末端の結合が不飽和結合を形成しているためと考えられる. lysp-PC(18:0)については, C17からC3まで14 u刻みでピークが観測されており, そこから13 u離れた位置にC2で開裂したと思われるピークが検出されている (図60の位置で開裂したフラグメントイオンをC1, C2, C3, ・・・と定義した). 13 uとなっている原因として, 14 u刻みで観測されている位置での開裂では, 関係する炭素は全て単結合で結合しているが, C2の場合は, 2つ離れた位置にある炭素がカルボニル基の炭素であるために酸素と不飽和結合をしており, これによりイオンとしてではなくラジカルイオンとして検出されているものと考えられる. またC3の強度が他と比べると明らかに強く検出されている. これについては, 脂肪酸のカルボキシル基にアルカリ金属を付加したイオンのスペクトルでもC3に相当するイオンが強く検出されている. しかし, スペクトル中ではC3以外にもC1, C2に相当するイオンも強く検出されており, これらのイオンはCRF由来ではなく, 電荷が関与した解離により生成されたイオンだとされている [46, 47]. Lyso-PCの場合は, 電荷はコリンのトリメチルアミンの窒素に局在化していると考えられる. そのためC3は, 電荷が関与した解離由来とは考えにくく, CRF由来のイオンだと思われるが, 今後解離機構などを検討する必要がある.

次にlyso-PC(18:1)について考える. m/z 506からm/z 422までは14 u刻みで観測されており, そこから54 uの間はピークはほとんど検出されておらず, m/z 368からまた14 u刻みでピークが検出されている. この54 uの間隔がちょうど不飽和結合およびその前後の結合に相当し, これまでに報告されているように不飽和結合位置を反映した解離パターンになっている [9]. さらにC11のイオンは, m/z 422だけでなく, そこから1大きいm/z 423であるラジカルイオンのピークも観測されている. これについても不飽和結合特有のフラグメントイオンだとされている[24]. またlyso-PC (18:1) についてもC2とC3の間隔が13 uとなっており, C3の強度が他と比べると明らかに強く検出されている.

以上のことから, 既に報告されている [9]ように, lyso-PCの脂肪酸に不飽和結合が存在する場合は, その位置を反映したCRF由来のピークパターンが観測されることを確認した (図62). また, 今回新たにC3のイオンは強く検出され, 他が14 uであるのに対して, C2とC3の間隔は13 uとなることもわかった.

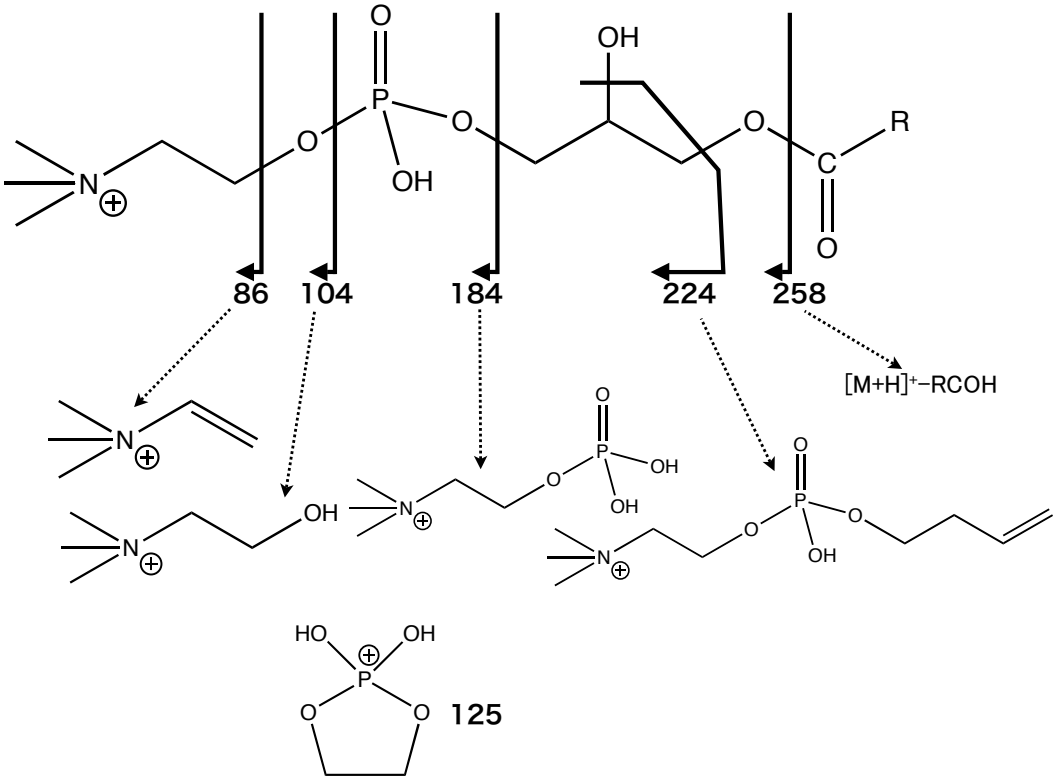


図59. lyso-PCの低質量フラグメントイオンのアサイン

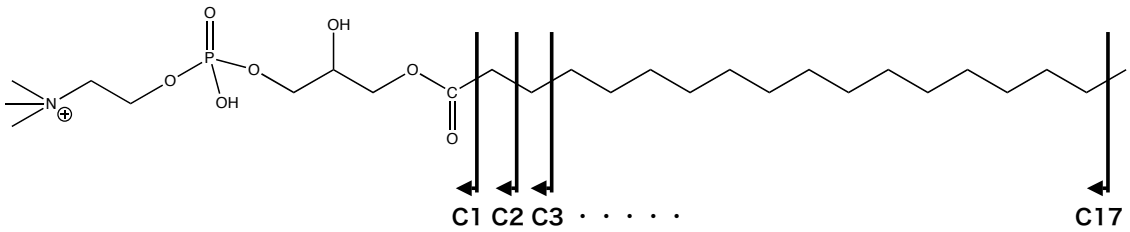


図60. フラグメントイオンの定義

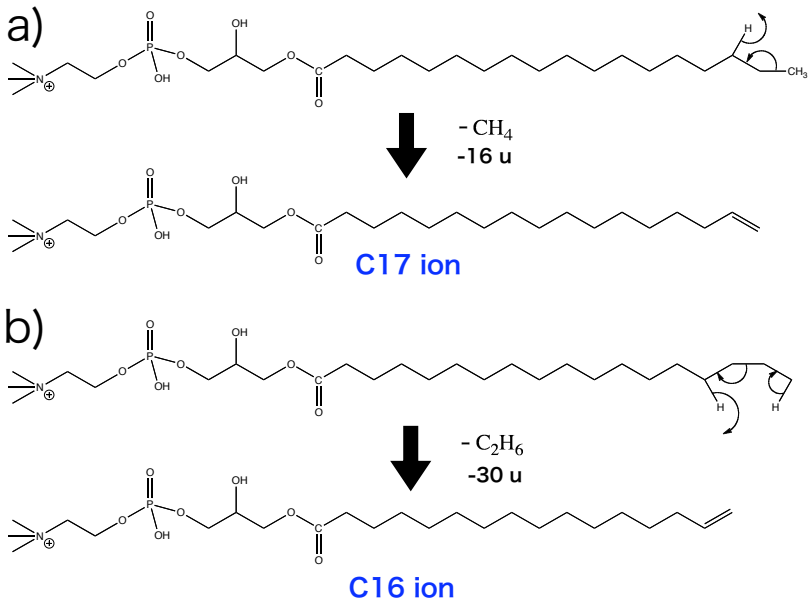


図61. lyso-PCの脂肪酸部分のCRFによる結合開裂の様子
(a : C17イオン, b : C16イオン生成の様子)

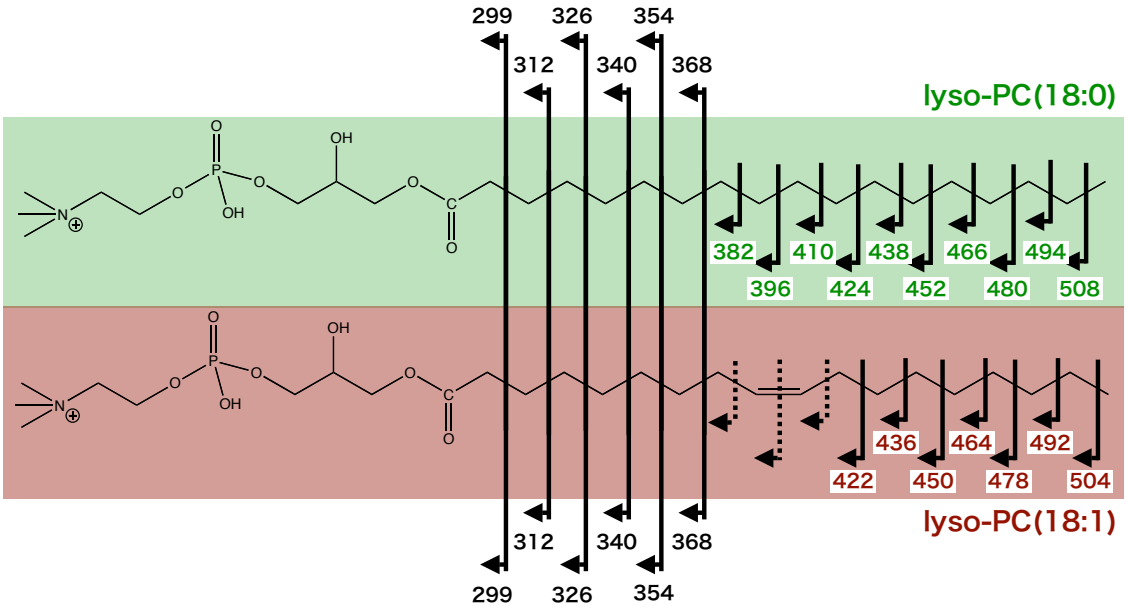


図62. lyso-PCの高質量フラグメントイオンのアサイン

6.2. PC(標準試料)の構造解析

前項では, lyso-PCの構造解析について説明した. しかし, 生体内ではlyso-PCとしての形ではほとんど存在せず, グリセリン骨格の 1 位, 2 位共に脂肪酸が結合したPCの形として存在している. そこでこの項では, PCの標準試料であるPC (16:0, 18:1)を測定し, lyso-PCと同様にCRF由来のフラグメントイオンを観測することで, 脂肪酸部分の構造を反映したピークパターンが得られるか確認した. 付加イオンについては, lyso-PCと同様にアルカリ金属付加よりプロトン付加での測定に優位性があると期待されるが, 生体内ではNaやKが豊富に存在するため, そのままイオン化するとNa, K付加のイオンがプロトン付加と同等あるいはそれ以上の割合で検出されることが予想される. そのため, 通常の解析ではイオン強度を確保するために, NaやK等を予め過剰に加えておき, 特定の付加イオンのみが生成される条件にした上で, 測定を行う[44, 46]. そこで本実験では, プロトン付加だけでなくNa, K付加についても測定を行い, 脂肪酸の構造を反映したフラグメントイオンが観測されるか確認を行った.

i)測定手順

PC(16:0, 18:1)の精製品 (Avanti Polar Lipidsより購入) を用意し, メタノールを用いて10 pmol/μLの濃度に調整した. lyso-PCでの結果から, マトリックスとしてCHCA(liquid)を用い, 同様の体積比で水を加えた. サンプルプレートに0.5 μLを滴下し, 測定を行ったところ, プロトン付加だけでなくNa付加やK付加のイオンが検出された. Na付加イオンについては, プロダクトイオンスペクトルを測定する上で十分な強度があったが, さらにNaを加えることで, Na付加イオンが顕著に検出されることを期待し, CH_3COONa (和光純薬工業より購入) を様々な濃度でマトリックスに加え, 測定を行った. $NaHCO_3$の濃度を1 pmol/μLから濃くしていったところ, 1 nmol/μLでで Na付加がプロトン付加よりも強く検出されはしたが, CH_3COONaを加えていないときと比較すると強度の絶対量が減少した. そのため, Na付加イオンについてもマトリックスにCH_3COONaを加えずに測定を行った. K付加についても同様である.

ii)測定結果および考察

PC(16:0, 18:1)のプロトン付加およびNa, K付加のプロダクトイオンスペクトルを図63, 65, 67に示す. プロトン付加に比べるとNa, K付加のS/Nが悪いがこれは元々の親イオンの強度が異なるためである. 測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF/TOF, レーザー強度 : 60 %,

V_G : 2000 V, t_d‘ : 100 ns, 検出器電圧 : 3200 V, 積算回数 : 15000 shot,

イオンゲート delay: 211.46(プロトン付加), 214.49 (Na付加), 216.68 (K付加) μs, width: 300ns , 衝突室真空度: 3.6×10^{-4} Pa

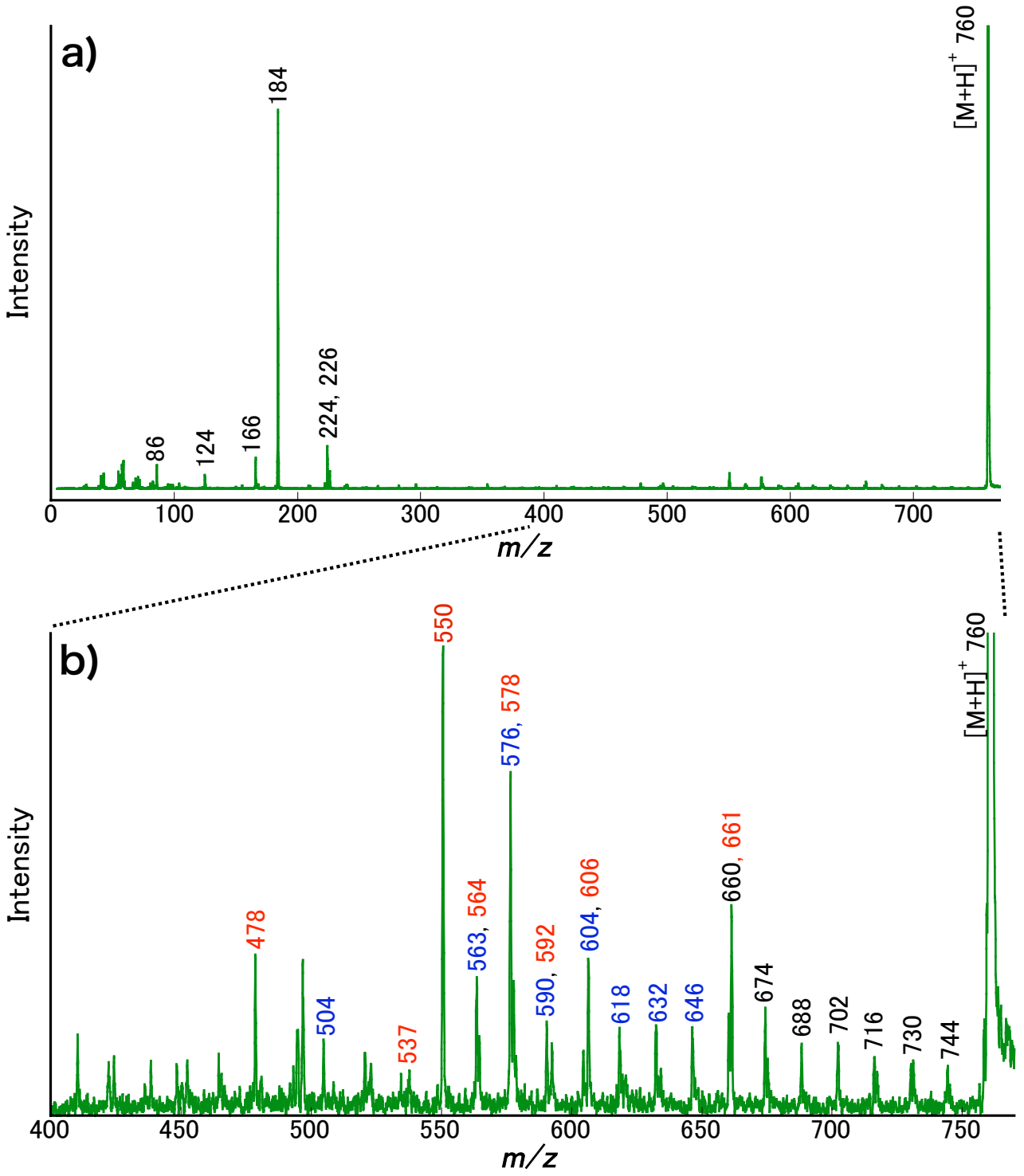


図63. PC(16:0, 18:1) プロトン付加のプロダクトイオンスペクトル (a. 全体, b. 拡大)

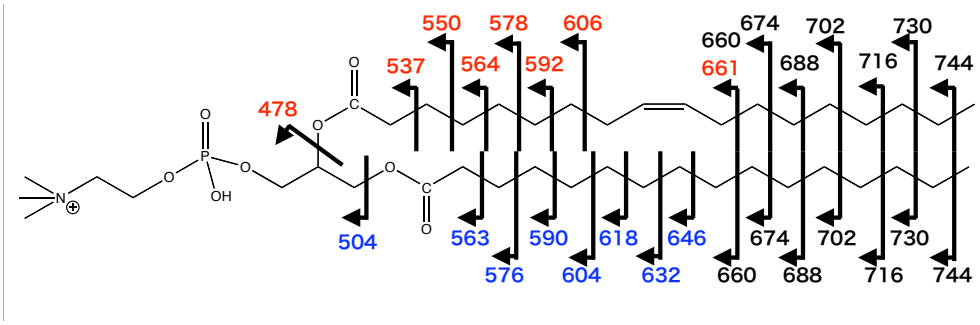


図64. PC(16:0, 18:1) プロトン付加のアサイン

最初にプロトン付加 ($[M+H]^+ = 760$) の場合について考える. 図63aの低質量域をみると， lyso-PCの場合とほぼ同じ位置にピークが観測されており, フォスファチジルコリン由来であると思われる.

次に脂肪酸の構造を反映したCRF由来のフグラメントイオンが検出されることが期待されるm/z 400以上の領域 (図63b) をみると, m/z 550および576に他と比べ強いピークが検出されている. これは, lyso-PCの結果からC3のイオンであると予想される. プリカーサーイオンとの質量差を求めるとそれぞれ210および184となり,(18:1)および(16:0)の場合のC3とプリカーサーイオンの差に相当する$C_{15}H_{30}$, $C_{13}H_{28}$となっている. C3を基準として, 他のピークについてみると, m/z 550および576ともに-13 uの位置 (m/z 537および563) にピークが検出されており, C2だと考えられる. またm/z 576からm/z 744までは14 u間隔でピークが検出されており, lyso-PC (18:0) と同じように (16:0) の構造を反映したCRFの解離パターンが観測されている (図63bおよび64において青字で表記されている. m/z 660 - 744については, 後述する (18:1) 由来のフラグメントイオンが重複していると考えられるために黒字で示してある). このパターン以外にも, m/z 550についても606までは14 u間隔でピークが検出されている. また, m/z 606からは14 u間隔でピークが検出されておらず, +54 u離れた位置 (m/z 660) にピークが検出されている. 再びm/z 660からm/z 744までは14 u間隔でピークが検出されている. m/z 660からm/z 744のピークについては(18:1)ではなく(16:0)由来のフラグメントイオンが検出されているとも考えられるが, m/z 661にlyso-PC (18:1) で見られたラジカルイオンが検出されており (18:1) 由来のCRFの解離パターンも (16:0) と同様に観測されていると考えられる (図63bおよび64において赤字で表記されている. m/z 660 - 744以降については(16:0)由来のフラグメントイオンが重複していると考えられるために黒字で示してある).

また通常の低エネルギーCIDの測定で主に検出されるプリカーサーイオンから, 1つの脂肪酸がそのまま脂肪酸の形で脱離したフラグメントイオン ($[M+H]^+$-RCOOH) が, m/z 478および504に検出されている (このフラグメントイオンをNLと定義する). このNLは, 低エネルギーCIDでは2位に結合した脂肪酸が脱離したものの方が強度が強いことが知られている[34]. 図63bをみると, 2位の脂肪酸 (18:1) が脱離したm/z 478の方が1位の脂肪酸 (16:0) が脱離したm/z 504よりもピーク強度は強くなっており, 高エネルギーCIDでも同様の傾向を示していると思われる.

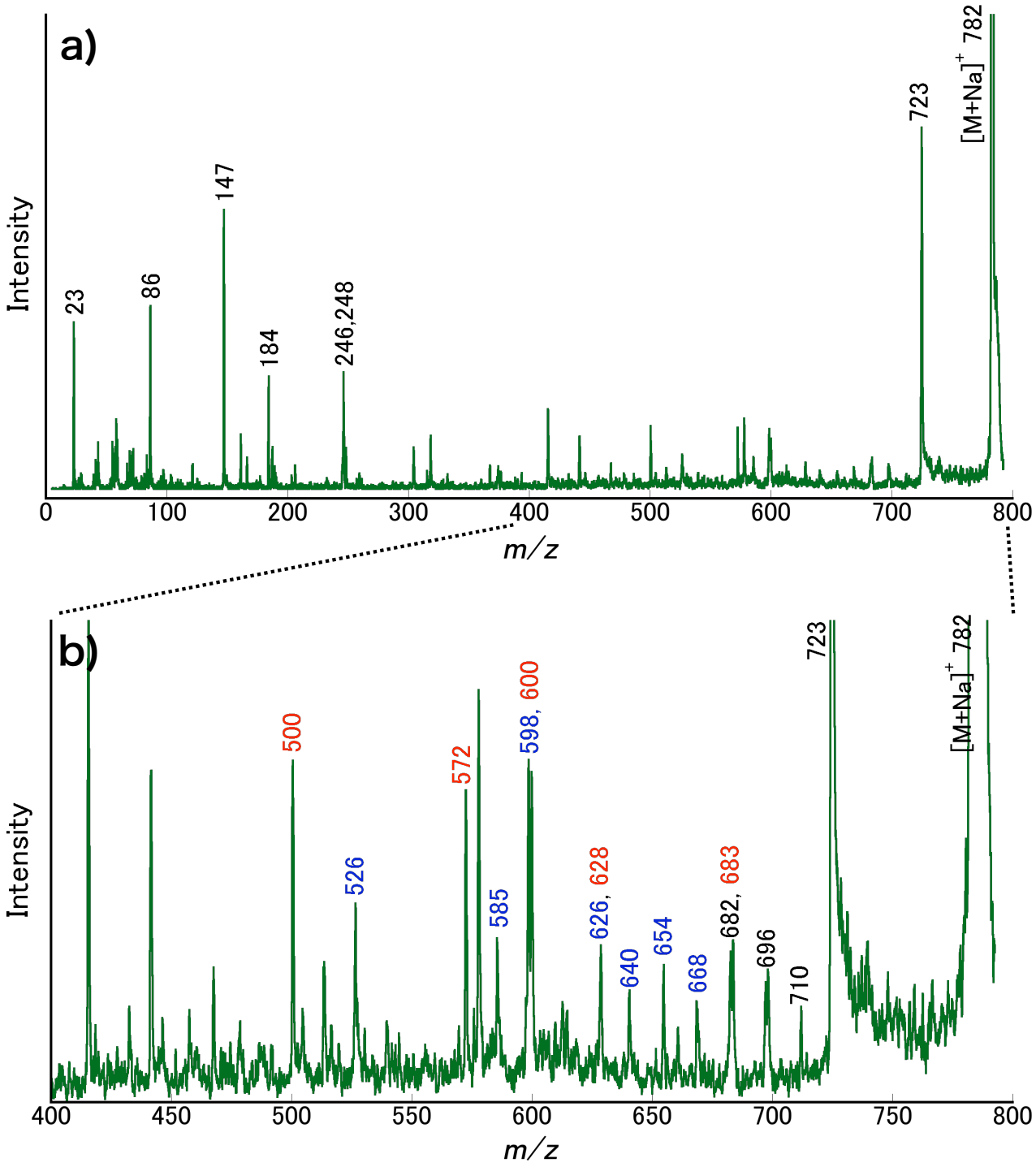


図65. PC(16:0, 18:1) Na付加のプロダクトイオンスペクトル (a. 全体, b. 拡大)

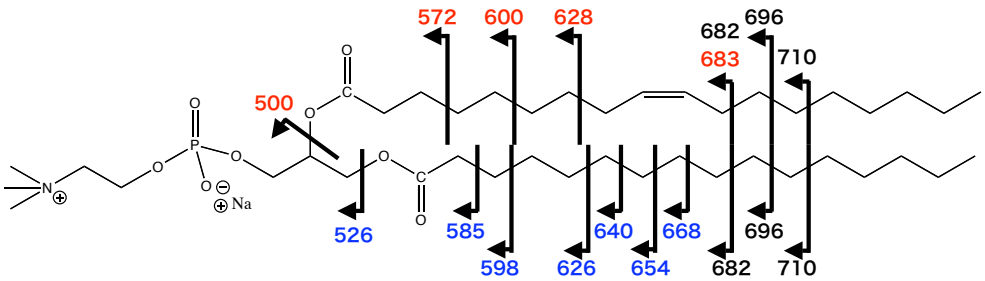


図66. PC(16:0, 18:1) Na付加のアサイン

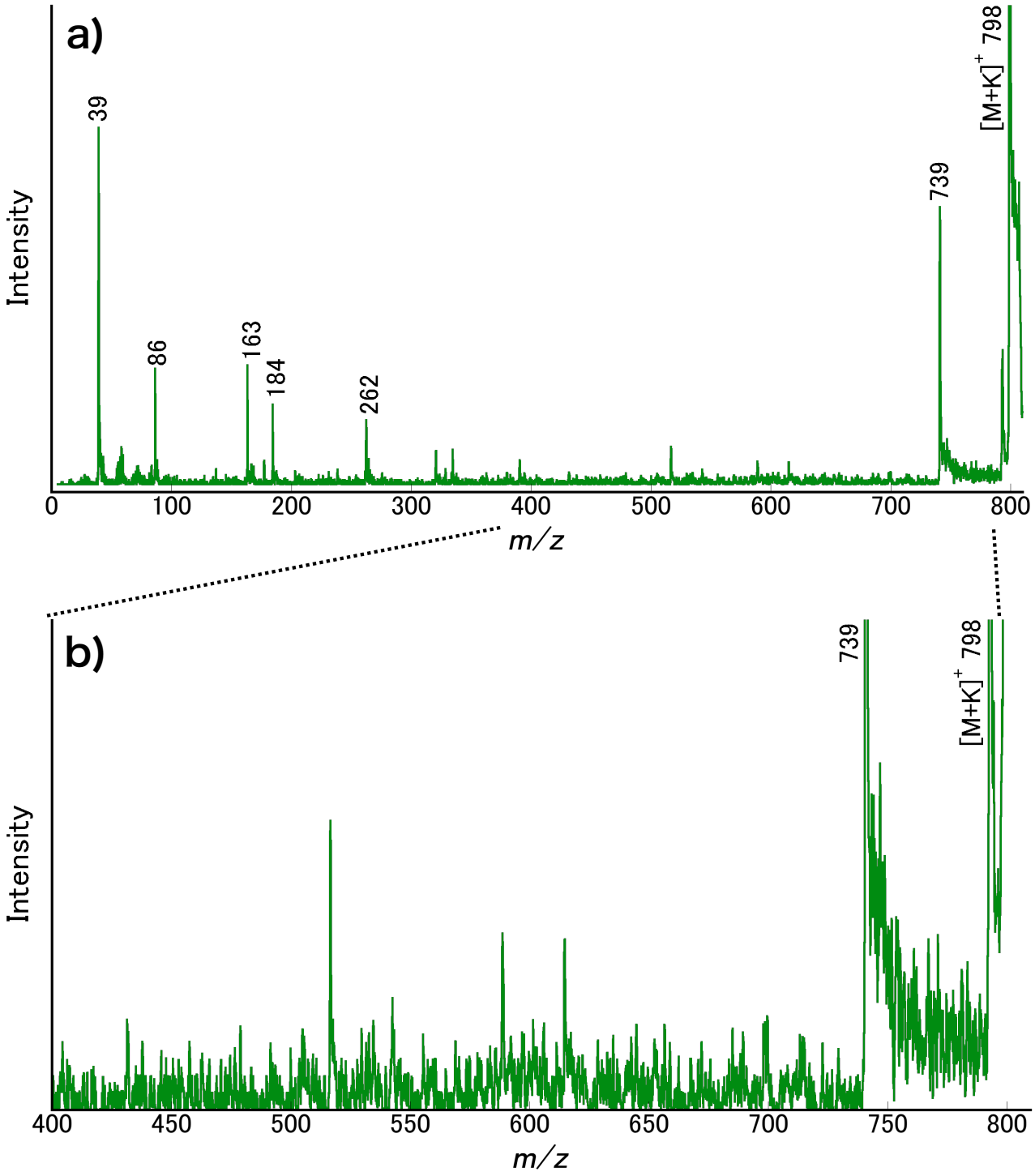


図67. PC(16:0, 18:1) K付加のプロダクトイオンスペクトル (a. 全体, b. 拡大)

次にNa付加 ($[M+Na]^+ = 782$) について考える. Naはリン酸基近傍に付加しているとされる[9]. 図65aの低質量域をみると, プロトン付加でも観測されたm/z 86, 104の位置にピークが検出された. プロトン付加で観測されたm/z 125, 224は, リン酸基を含むためHとNaの質量差に相当する+22 uの位置 (m/z 147, 246) にピークが検出されている. また, これら以外にもm/z 23にNaがイオンとして検

出されている. m/z 184にプロトン付加と同じようにピークが検出されているが, このイオンはプロトン付加では図59で示したようにリン酸基を含んでいると考えられる. そのため, 本来ならNa付加では, m/z 206に検出されるはずであるが, 観測されておらず, Naを脱離してプロトンが置換される解離機構により生成されたと思われる.

次にm/z 400以上 (図65b) を見ると, プロトン付加の場合と同様に脂肪酸の構造を反映したフラグメントイオンが検出されており, それぞれのピークを解析すると, 図66のようになる. m/z 723に強いピークが検出されているが, これはトリメチルアミンが脱離したイオンであり, 金属付加の場合強く検出されるとされている[9] . このピーク強度が非常に強いために, 周りのCRF由来のピークが埋もれてしまう形となり, その部分に相当する脂肪酸由来のピークが見えなくなってしまっている. そのため, プロトン付加と比較すると完全に脂肪酸の構造を反映した解離パターンは観測されていない (図66).

次にK付加 ($[M+K]^+ = 798$) の場合について考える. KもNaと同様にリン酸基の近傍に付加していると考えられる. 図67aの低質量域をみると, Na付加と同様のパターンを示している. プロトン付加と同じ質量でm/z 86, 104が検出されており, プロトン付加から+38 uの位置にm/z 163, 262が検出されている. また, m/z 39にKがイオンとして検出されており, m/z 184のフラグメントイオンも検出されている.

m/z 400以上 (図67b) については他の２つと比べるとプリカーサーイオンの強度が弱かったためにあまりピークは観測されていないが, Na付加と同様に強度の強いm/z 739のピークのため, その周辺で検出されるはずの脂肪酸由来のピークが埋もれてしまい, 完全に脂肪酸の構造を反映した解離パターンを観測するのは, 困難であると思われる.

以上のことから, 脂肪酸が２つ結合したPCにおいても, それぞれの脂肪酸の構造を反映した解離パターンが観測される事がわかった. また, lyso-PCと同様に, Na・K付加でも脂肪酸の構造を反映したCRFの解離パターンを観測することは可能であるが, プロトン付加で測定を行った方が容易に解析を行えることがわかった. そのため, 実試料のPCを詳細な構造解析を行う場合は, 試料をそのまま測定するのではなく脱塩処理などを行い, 金属イオンを可能な限り溶液中から取り除いた環境で測定を行う必要があると思われる.

6.3 PC (未知試料) の構造解析

前項で脂肪酸が２つ結合したPCにおいても, 脂肪酸の詳細の構造まで解析できることがわかったので, 大阪大学生命機能研究科 河村研究室より鯉の桿体細胞の提供を受け, その抽出物を測定することで未知リン脂質の解析を試みた. あわせて, リン脂質の抽出したものを脱塩処理を行い, プロトン付加が顕著に検出されるか試みた.

i)測定手順

提供を受けた細胞から次の３つの方法で, リン脂質の抽出を行った.

イ) 200 uLのクロロホルム/メタノール混合液(2:1)に細胞を20 uL添加し, ボルテックスミキサーで撹拌遠心の後, 上清を回収した.

ロ) 200 uLの100%メタノールに細胞を20 uL添加し, ボルテックスミキサーで撹拌遠心の後, 上清を20 uL回収した.

ハ) ロで残った上清150 uLをスピンカラム (Thermo, 89870) を用いて脱塩処理した.

イは通常のリン脂質の抽出方法である. ロは溶媒をメタノールのみとし, より簡便な抽出方法を試みた. イ, ロでは, 脱塩処理を行っていないので, プロトン, Na, Kの３種類が付加されたイオンが混在することが推測される. イについては, クロロホルムのカラムへの影響が心配されたために, 今回の測定では脱塩処理を行わなかった. ハの試料では脱塩処理を行っているので主にプロトン付加のイオンが検出されることが期待される.

イ, ロ, ハの試料それぞれをCHCA(liquid)と水で体積比1：1：0.5で混合し, 0.5 μLをサンプルプレートに滴下した. 最初にイ, ロ, ハのマススペクトルを測定した. そして, イのマススペクトル中でPCが検出される範囲m/z 700-1100で, 一定以上の強度があるピークに関しては, それぞれモノアイソトピック質量の同位体ピークを選択し, プロダクトイオンスペクトルを測定し, 同定を試みた.

ii)測定結果および考察

試料イ, ロ, ハのマススペクトルを図68に示す. t_d‘ の値は, m/z 1000前後のピークが最も細くなる条件で測定を行った.

測定条件は次のようになる.

測定モード：TOF, レーザー強度：60 %, V_G：3000 V, t_d‘：100 ns

検出器電圧：2800 V, 積算回数：3000 shot

試料イでは, 脱塩処理を行っていないため, 様々な付加イオンのPCが検出されていると予想される. 付加イオンが不明であるため, イオンの質量から対応する試分子のの質量を求めることができないが, いくつかのピーク間でHとNaの質量差に相当する22 u, HとKの質量差に相当する38 uの間隔が図68でみられた. 例えば, m/z 834とm/z 856の差は22 uであり, m/z 834とm/z 872の差は38 uとなっている. そのため, これからだけでは, m/z 834, 856, 872はそれぞれ同じPCのプロトン, Na, K付加だと予想される. そこから, PCの脂肪酸部分の炭素鎖および不飽

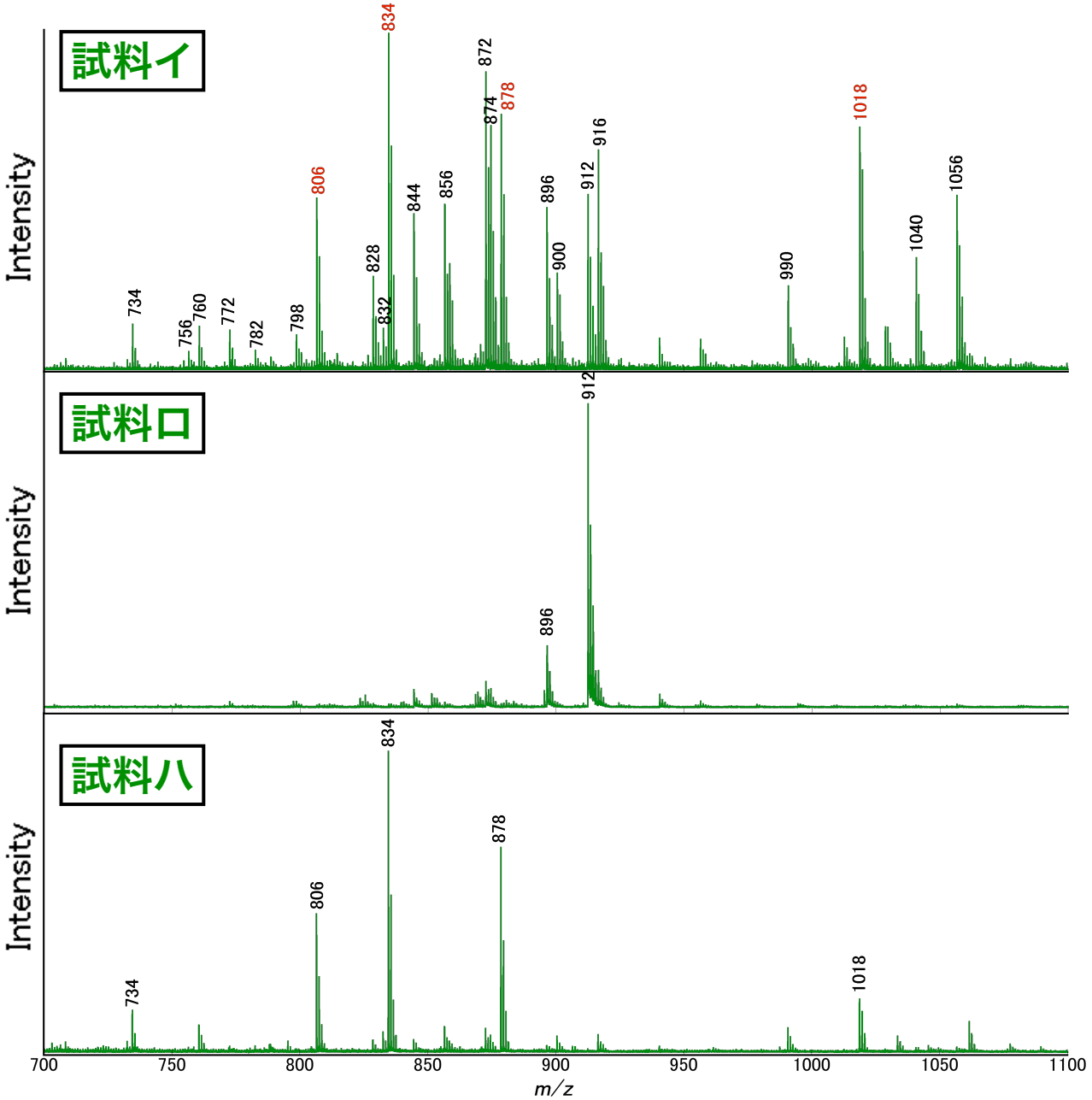


図68. 鯉の桿体細胞の抽出物のマススペクトル

和結合の総数として考えられる組み合わせを計算すると, (40:6) となる. ただし, これまでに報告されている不飽和脂肪酸で炭素鎖の総数に対する不飽和結合の総数の比が最も大きいものが, ドコサヘキサエン酸 (22:6) であるため, この時の比を上限として計算を行った. 他のピークについても, (*m/z*　734, 756, 772), (*m/z* 760, 782, 798), (*m/z*　806, 828, 844), (*m/z*　878, 900, 916), (*m/z*　1018, 1040, 1056)は, それぞれ同じPCのプロトン, Na, K付加だと予想される. これをまとめたものが, 表2になる. 試料ロは, 試料イと同等のマススペクトルとなることが予想されたが, 試料イでも検出されている*m/z*　896および912が他のピークよりも明らかに強く検出されている. 他のピークも強度は相対的に弱くなっているが, 検出されている. 試料ロを脱塩処理した試料ハでは, 試料イでも検出されている一部のピーク (*m/z* 806, 834, 878, 1018) が強く検出されている. このピークは, 表2

m/z	付加イオン	脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の総数	*m/z*	付加イオン	脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の総数
734	H^+	(32:0)	872	K^+	(40:6)
756	Na^+	(32:0)	874	?	?
760	H^+	(34:1)	878	H^+	(43:5) or (44:12)
772	K^+	(32:0)	896	?	?
782	Na^+	(34:1)	900	Na^+	(43:5) or (44:12)
798	K^+	(34:1)	912	?	?
806	H^+	(38:6)	916	K^+	(43:5) or (44:12)
828	Na^+	(38:6)	990	?	?
832	?	?	1018	H^+	(53:5) or (54:12)
834	H^+	(40:6)	1040	Na^+	(53:5) or (54:12)
844	K^+	(38:6)	1056	K^+	(53:5) or (54:12)
856	Na^+	(40:6)			

表2. 試料イに含まれていると予想されるPC

でプロトン付加とされており, 脱塩処理が機能していると予想される. 試料ロで強く検出されたピーク (*m/z*　896, 912) は, 検出されてはいるが, その強度は相対的にかなり減少している. 脱塩処理が機能していると考えると, 処理を行う前の試料であるロにはNaやKが溶液中に多く存在していると予想され, *m/z*　896, 912はPCではなく, マトリックスなどがNaやKと結合した結果生成されたイオンと予想される.

マススペクトルのみでは, 予想はできるが同定することはできないために, 試料イで検出されているピーク (図68で黒字のラベルが振ってあるピーク) について, それぞれモノアイソトピック質量のイオンを選択し, プロダクトイオンスペクトルを測定した. プロダクトイオンスペクトルを図69-74に示す. 前述したように付加イオンが同定できていないためにプリカーサーイオンを$[M+X]^+$として示す. 測定条件は次のようになる.

測定モード : TOF/TOF, レーザー強度 : 62 %,

V_G : 2000 V, t_d' : 100 ns, 検出器電圧 : 3200 V, 積算回数 : 15000 shot,

イオンゲート delay: 207.81 (*m/z* 734), 210.89 (*m/z* 756), 211.45 (*m/z* 760), 213.12 (*m/z* 772), 214.51 (*m/z* 782), 216.69 (*m/z* 798), 217.77 (*m/z* 806), 220.73 (*m/z* 828), 221.26 (*m/z* 832), 221.53 (*m/z* 834), 222.85 (*m/z* 844), 224.42 (*m/z* 856), 226.51 (*m/z* 872), 226.78 (*m/z* 874), 227.29 (*m/z* 878), 229.62 (*m/z* 896), 230.13 (*m/z* 900), 231.64 (*m/z* 912), 232.15 (*m/z* 916), 241.34 (*m/z* 990), 244.47 (*m/z* 1016), 247.34 (*m/z* 1040), 249.24 (*m/z* 1056) μs width: 300 ns , 衝突室真空度: 4.1×10^{-4} Pa

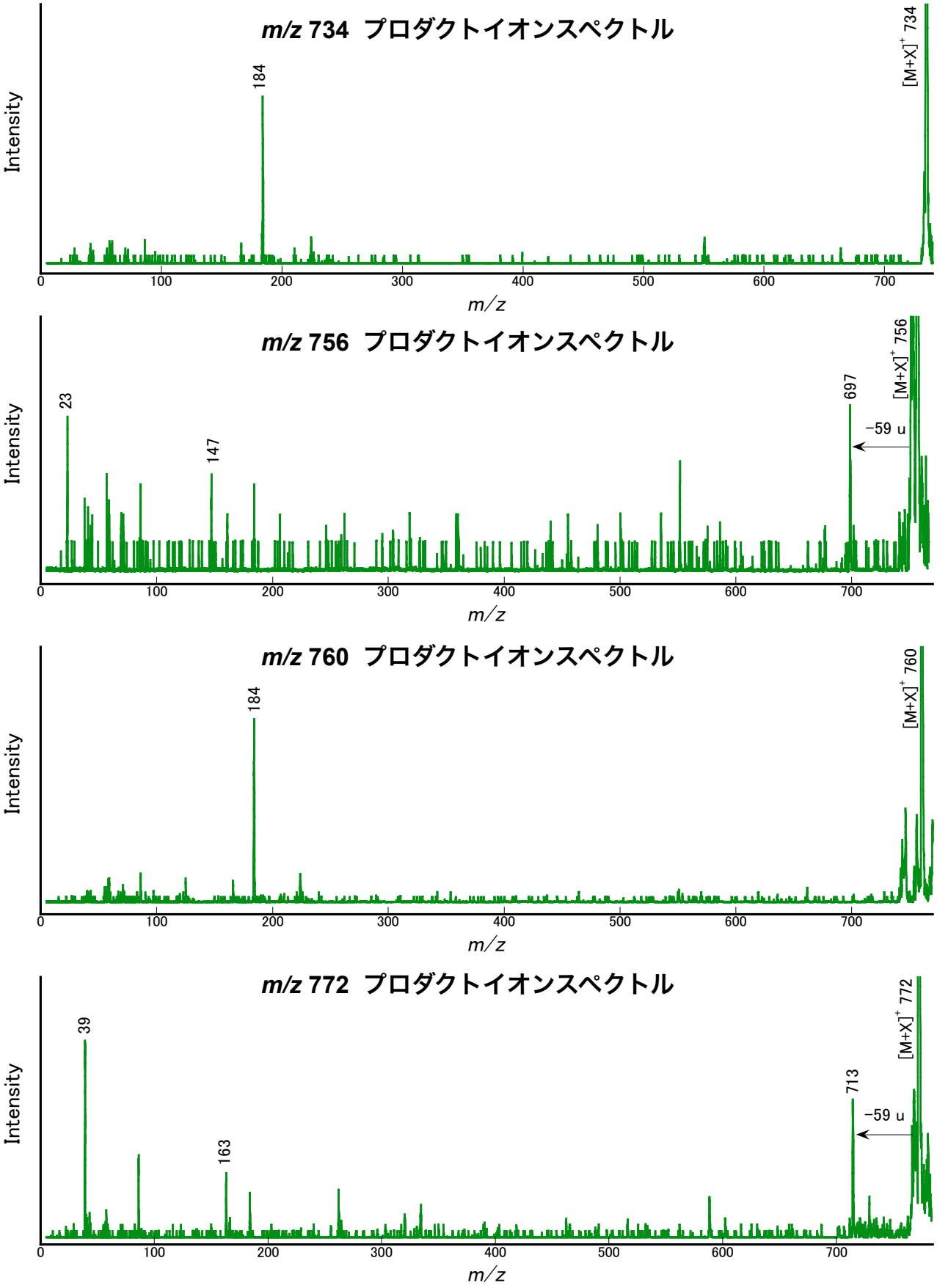


図69. 上からm/z 734, 756, 760, 772のピークを選択して得られたプロダクトイオンスペクトル

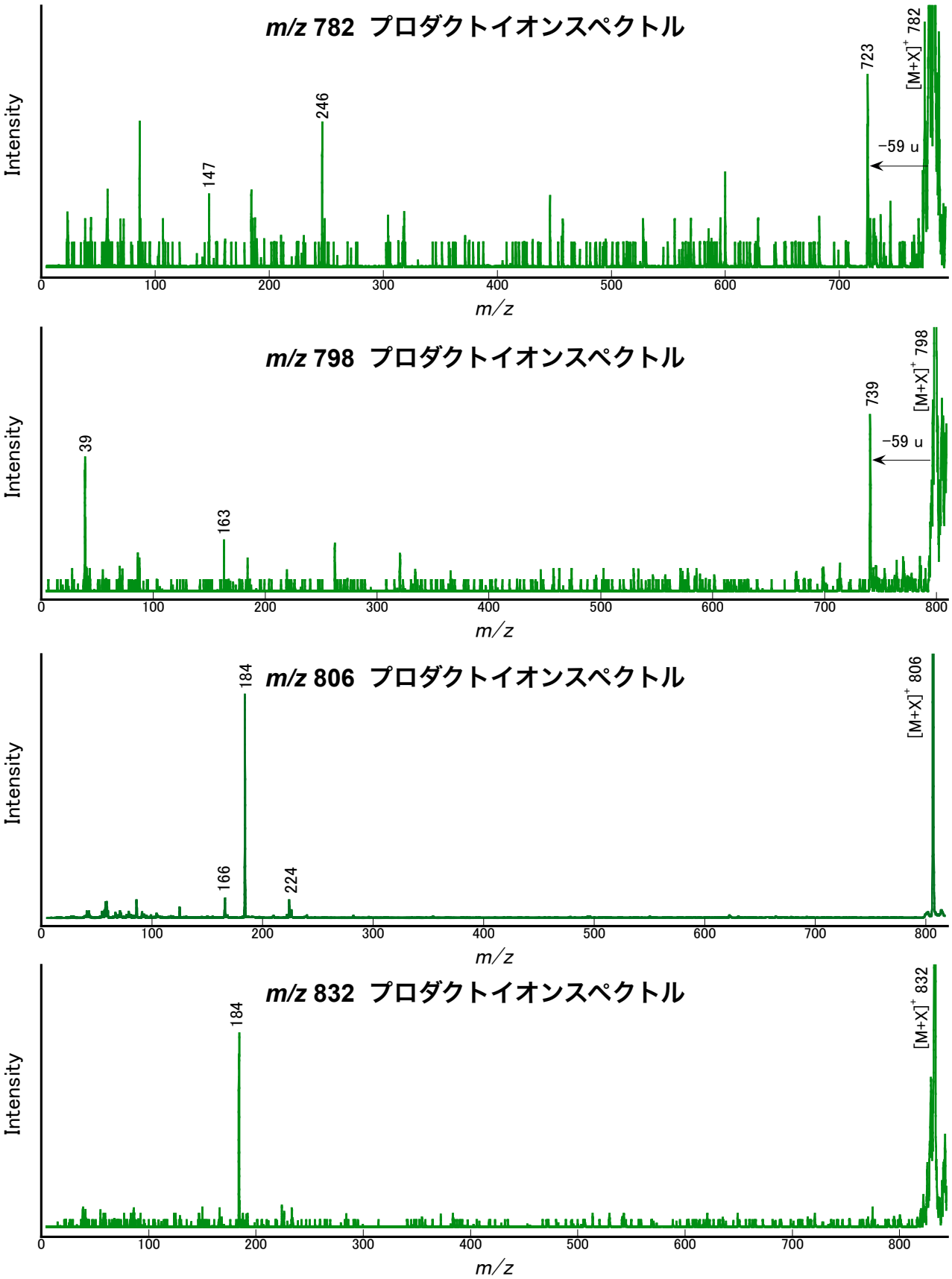


図70. 上からm/z 782, 798, 806, 832のピークを選択して得られたプロダクトイオンスペクトル

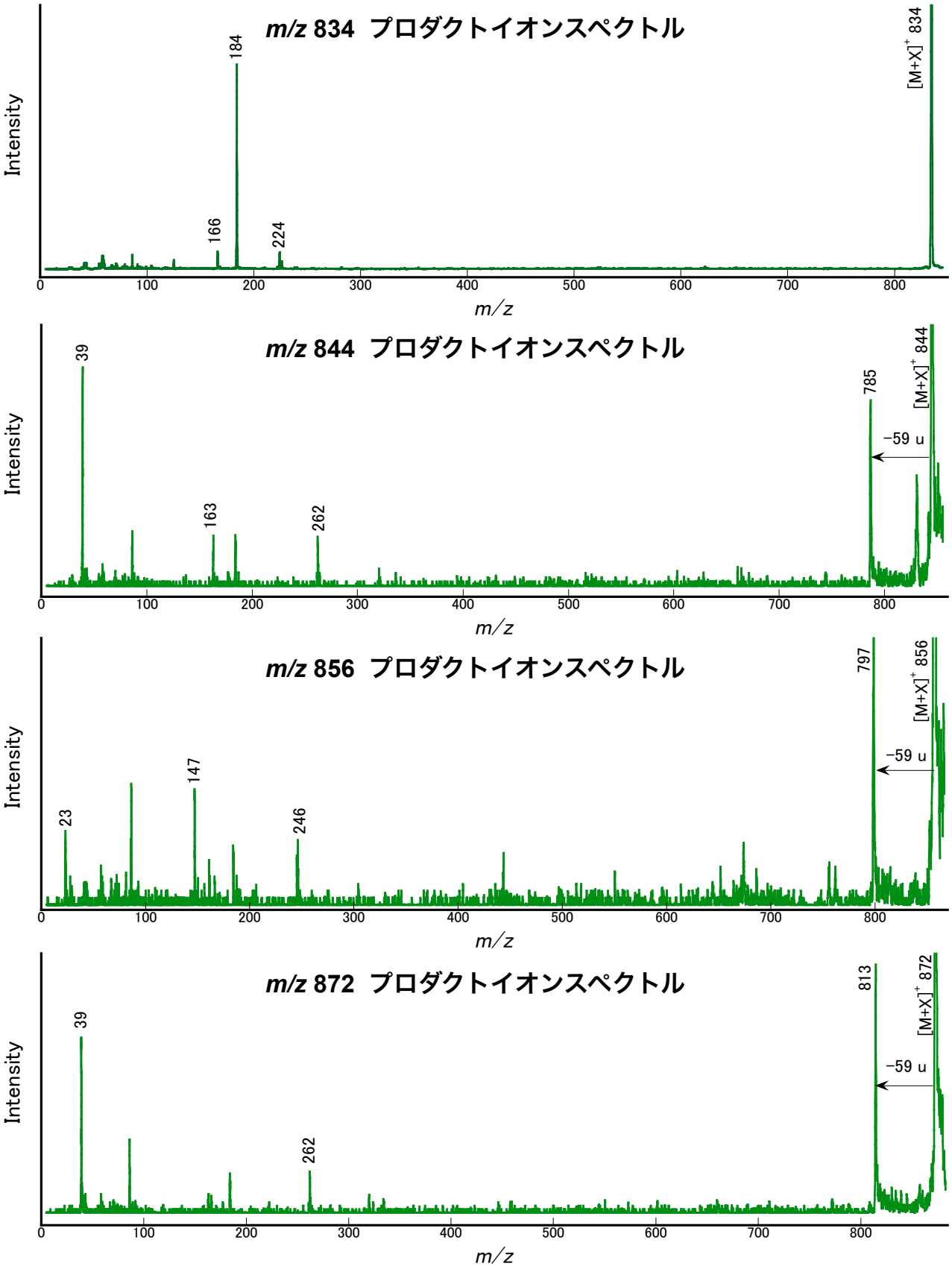


図71. 上からm/z 834, 844, 856, 872のピークを選択して得られたプロダクトイオンスペクトル

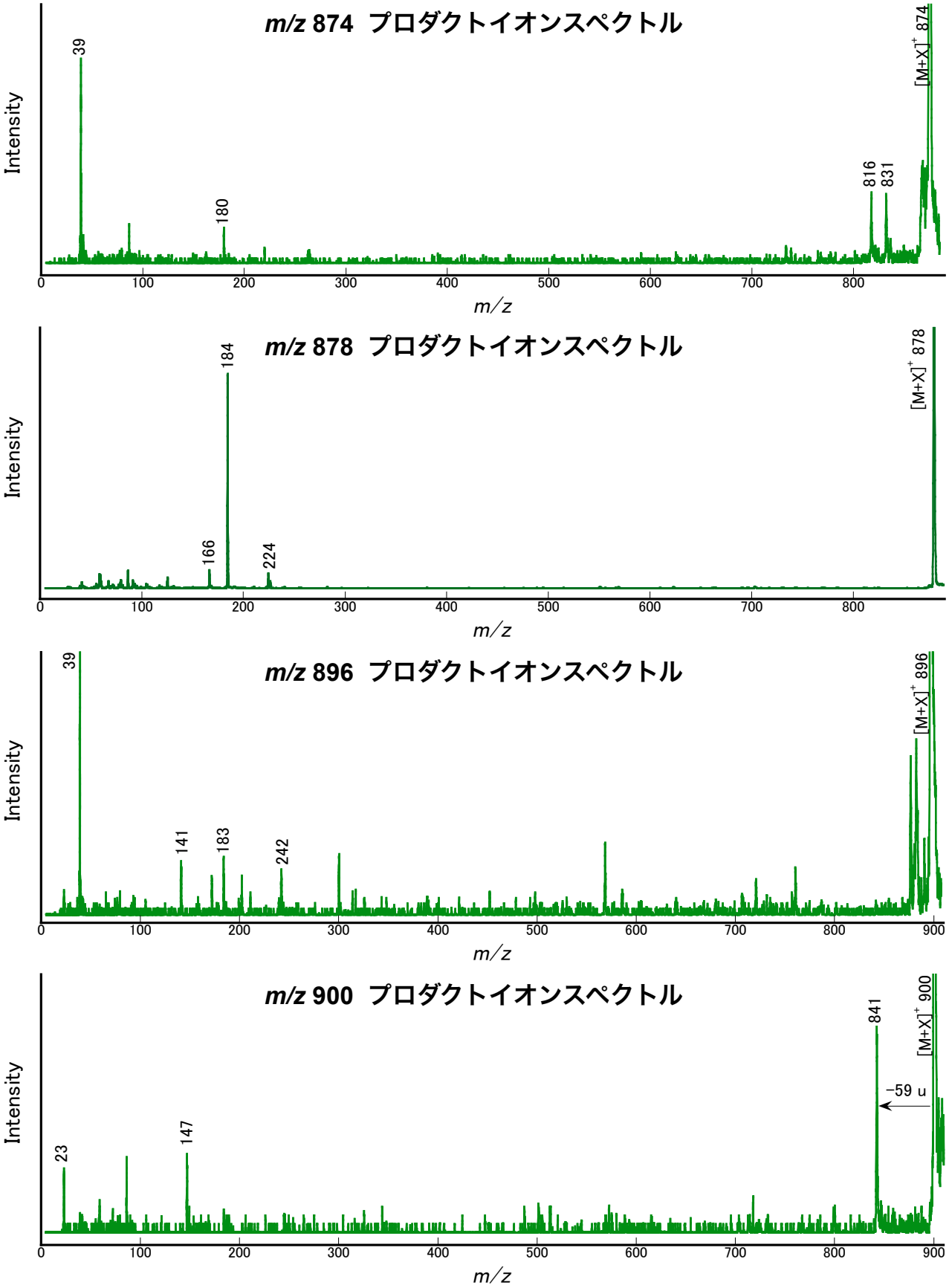


図72. 上からm/z 874, 878, 896, 900のピークを選択して得られた
プロダクトイオンスペクトル

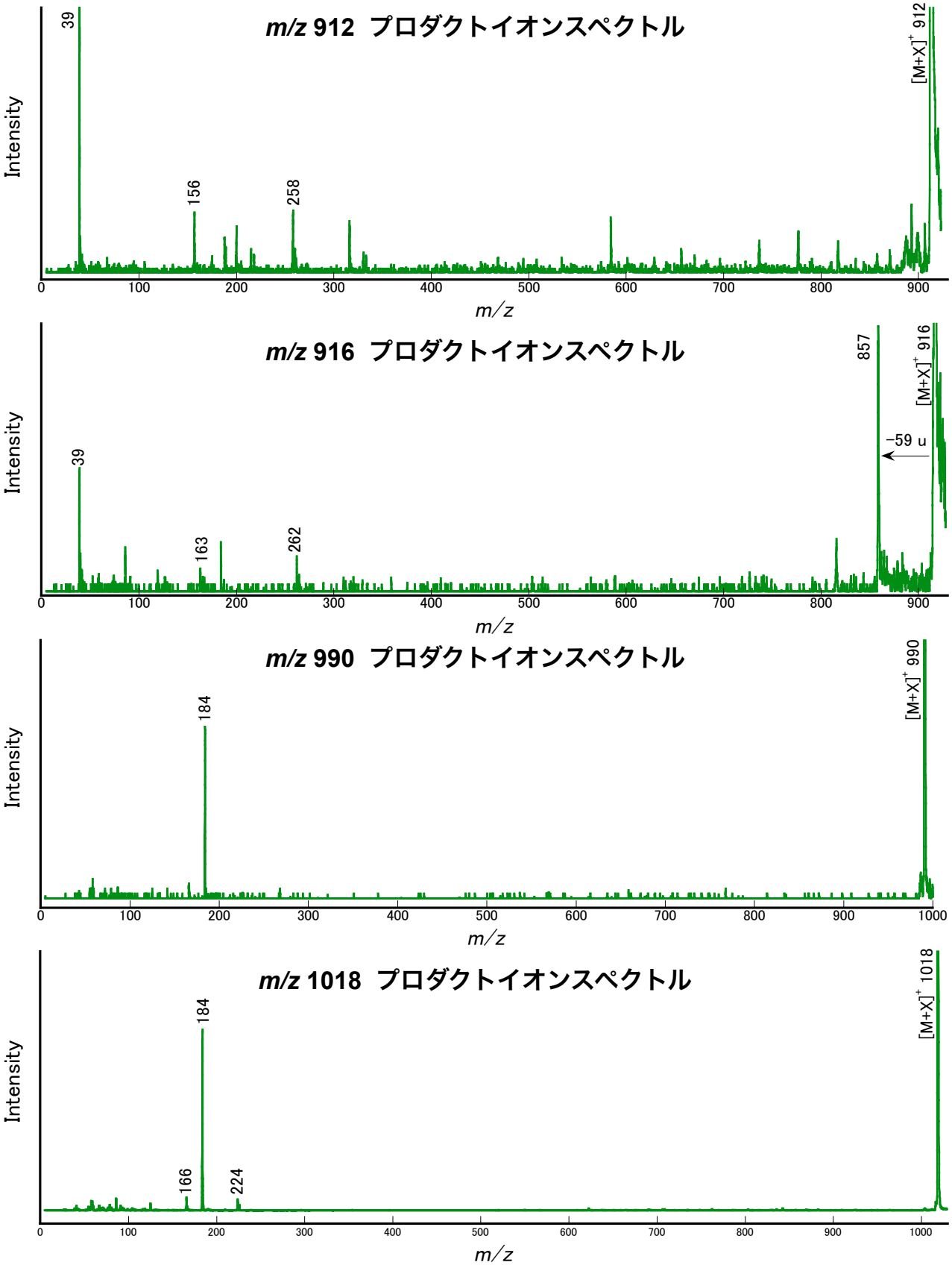


図73. 上からm/z 912, 916, 990, 1018のピークを選択して得られたプロダクトイオンスペクトル

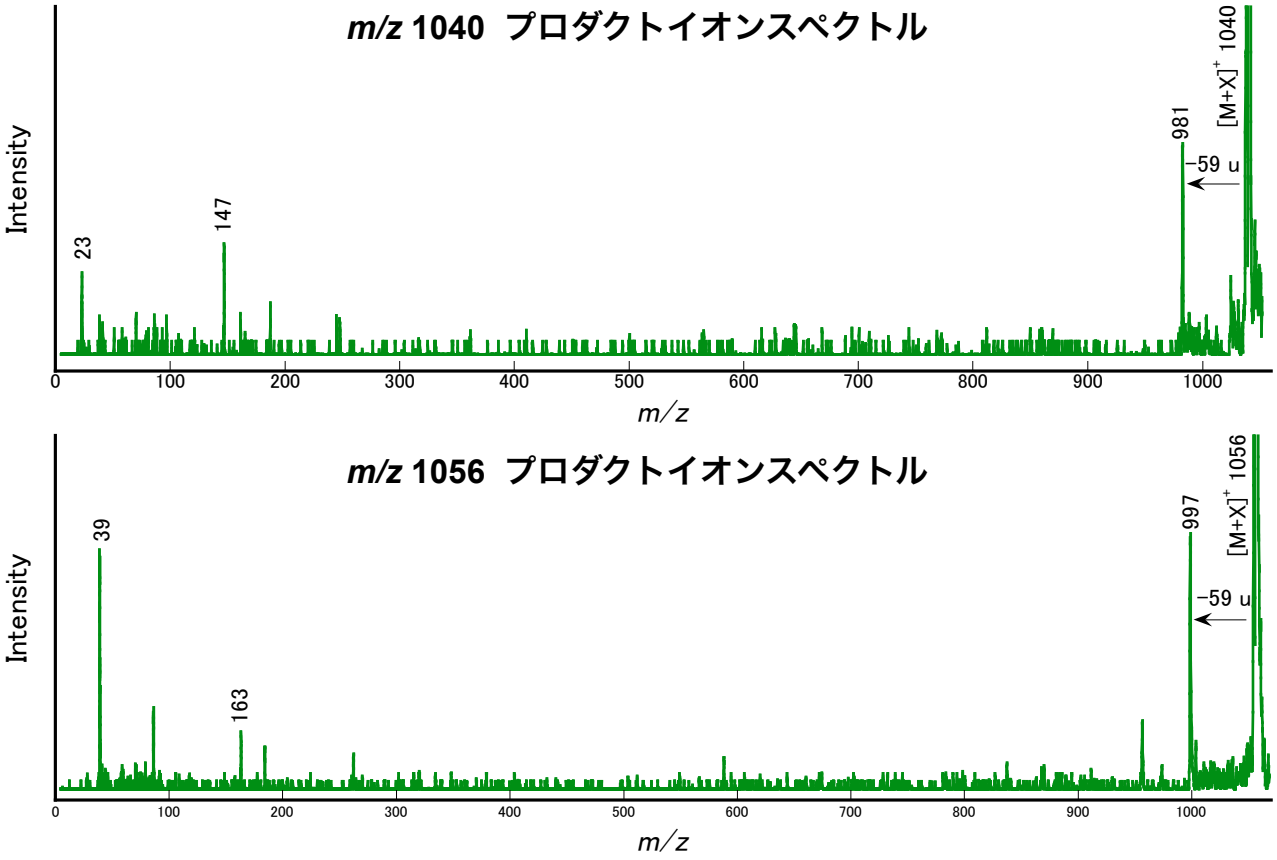


図74. 上からm/z 1046, 1056のピークを選択して得られたプロダクトイオンスペクトル

6.2 の測定結果からPCの付加イオンの違いにより，プロダクトイオンスペクトルに次の特徴が表れることがわかっている(図75).

- プロトン付加では，*m/z* 184のピークが顕著に検出され，それ以外にも*m/z* 166, 224のピークが検出される.
- Na付加では，*m/z* 23, 147のピークや，プリカーサーイオンから-59 uの位置にピークが強く検出される.
- K付加では，*m/z* 39, 163のピークや，プリカーサーイオンから-59 uの位置にピークが強く検出される.

今回測定した，図69-74の各プロダクトイオンスペクトルを図75と比較すると*m/z* 734, 760, 806, 832, 834, 878, 990, 1018に関しては*m/z* 184のピークが他のピークよりも明らかに強く検出されておりPCのプロトン付加だと判断した. *m/z* 756, 782, 828, 856, 900, 1040についてはプリカーサーイオンの強度が弱くS/Nがかなり悪いが，Na付加の特徴的なピークである*m/z* 23, 147, 246やプリカーサーイオンから59 u脱離したピークが検出されており，PCのNa付加だと判断した. *m/z* 772, 844, 872, 916, 1056についてもK付加の特徴的なピークである*m/z* 39, 163, 262やプリカーサーイオンから59 u脱離したピークが

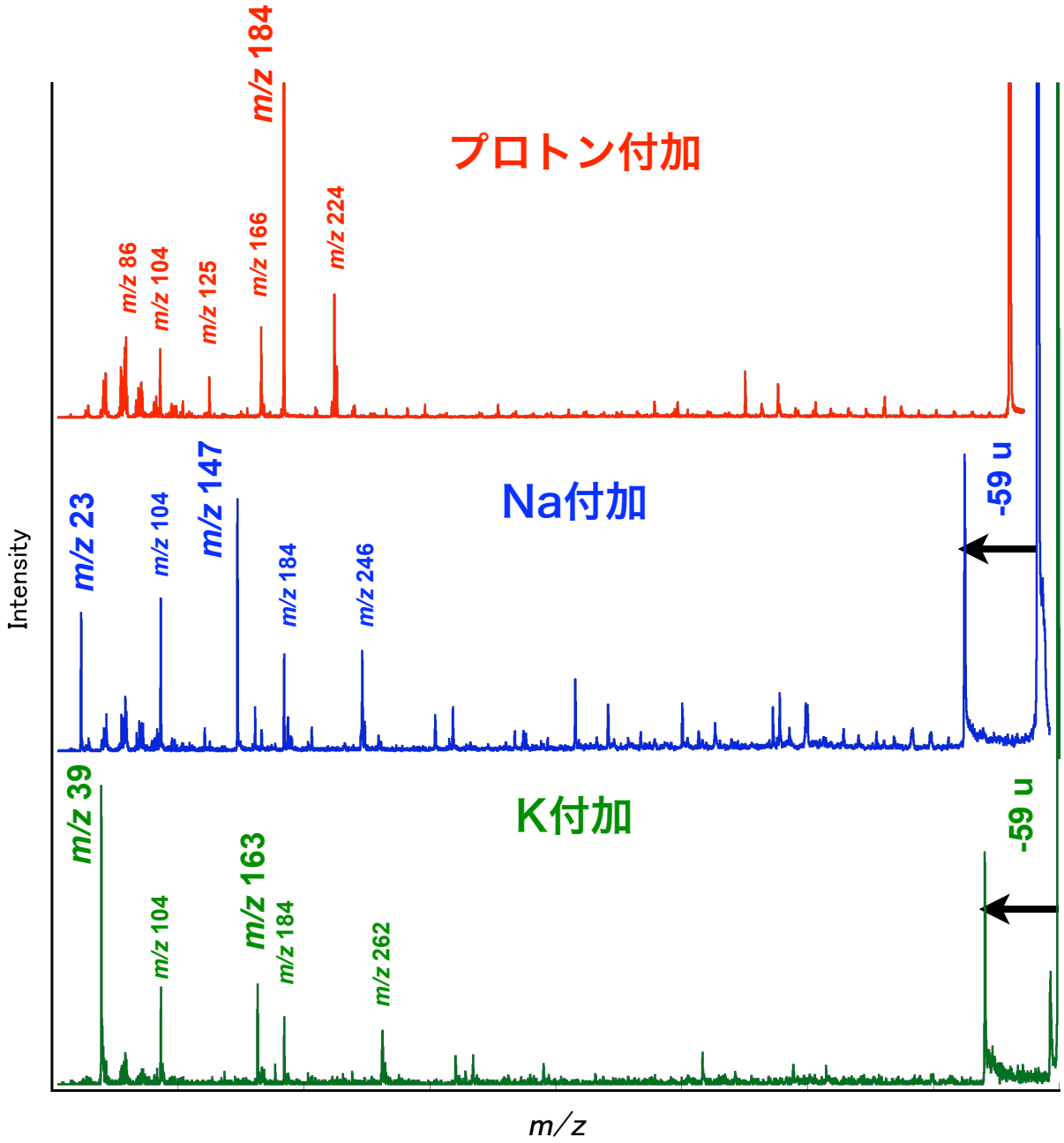


図75. PC(16:0, 18:1)プロダクトイオンスペクトルパターン

検出されており, PCのK付加だと判断した. 残る*m/z* 874, 896, 912に関しては*m/z* 39のピークが検出されているためにPCのK付加が疑われるが, それと同等程度で検出されるはずのプリカーサーイオンから59 u脱離したピークが全く検出されておらず, PCではないと思われる. 以上の結果から付加イオンを同定し, 脂肪酸部分の炭素鎖および不飽和結合の総数の候補を挙げたものが表3になる. 表２で予想されたPCと完全に一致しており, 試料ハにおける脱塩処理は有効に機能していると思われる. 図68の試料イのマススペクトルで強く検出された*m/z* 806, 834, 878, 1018については, CRF由来のピークも確認できたために, そのパターンから,脂肪酸の詳細な構造解析まで行った.

m/z	付加イオン	脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の総数	*m/z*	付加イオン	脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の総数
734	H^+	(32:0)	844	K^+	(38:6)
756	Na^+	(32:0)	856	Na^+	(40:6)
760	H^+	(34:1)	872	K^+	(40:6)
772	K^+	(32:0)	878	H^+	(43:5) or (44:12)
782	Na^+	(34:1)	900	Na^+	(43:5) or (44:12)
798	K^+	(34:1)	916	K^+	(43:5) or (44:12)
806	H^+	(38:6)	990	H^+	(51:5) or (52:12)
828	Na^+	(38:6)	1018	H^+	(53:5) or (54:12)
832	H^+	(40:7)	1040	Na^+	(53:5) or (54:12)
834	H^+	(40:6)	1056	K^+	(53:5) or (54:12)

表3. 鯉の桿体細胞の抽出物から確認する事ができたPC

***m/z* 806について**

図76に*m/z* 806のプロダクトイオンスペクトルの*m/z* 400以上を拡大したものを示す. *m/z* 834はプリカーサーイオンの質量からPC (40:6) だと推定される. 二つの脂肪酸の組み合わせはいくつか考えられるが, *m/z* 622に強度の強いピークが検出されており, これを一方の脂肪酸のC3だと仮定する. すると２つの脂肪酸は, (16:0) および (22:6) となる. (22:6) のC3の*m/z*が550となり, ピークは検出されているが, これは (16:0) のC3 (*m/z* 622) から-72 uの位置に当たるため, (16:0) のNLだとも考えられる. しかし, *m/z* 550から-72 uの位置である*m/z* 478に (22:6) のNLと考えられるピークが検出されているため, ２つの脂肪酸は (16:0)と (22:6) と判断した. (16:0) のNLと (22:6) のC3が重なってしまっているために２つのNLの強度を比べることはできないが, ２位の位置に不飽和脂肪酸が結合しやすいという生化学的事実から, PC (16:0, 22:6)と判断した. (22:6)は, DHAと予想され, その不飽和結合位置は図77のようになっていると考えられる. そこで, それを確認するために, C3, NL以外のピークについても同定を行った. (16:0)のC3にあたる*m/z* 622から-13 uの位置である*m/z* 609にC2だと思われるピークが検出されている. また*m/z* 622-790までは一部13や15になっているが , 14 u間隔でピークが検出されており, (16:0) の構造を反映した解離パターンが観測されているといえる (図76および77の青字のラベルが振ってあるピークにあたる. 776および790は, 後述する (22:6) からのフラグメントイオンも同じ質量に検出されると予想されるために黒字として表している). 14 u間隔のパターンからズレている*m/z* 735および749については, ピーク強度不足ではっきり確認できないが, 2 u離れた位置に検出されるはずの(22:6) からのフラグメントイオンと分離されず重なってしまっているためだと思われる. また, (22:6)についてもこれまで測定したlyso-PC, PC(16:0, 18:1) と比べると不飽和結合が多く, その解離パターンはわからない部分が多いが, 不飽和結合は結合エネルギーが高いために開裂せず, 単結合のみが開裂するとして (22:6) からのフラグメントイオンを考えると, 図77の

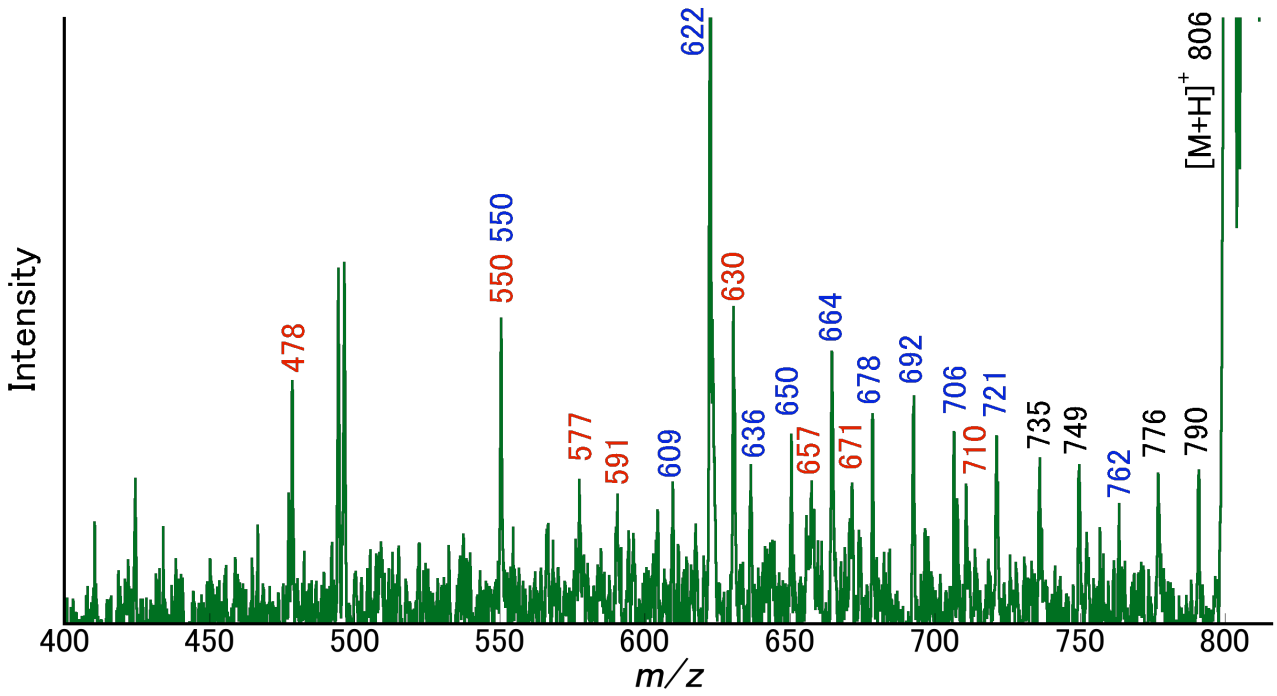


図76. m/z 806のプロダクトイオンスペクトル m/z 400-810を拡大

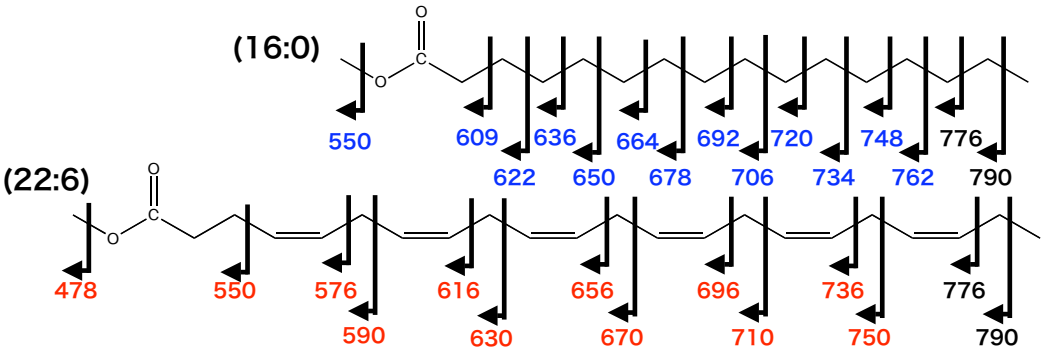


図77. m/z 806のプロダクトイオンスペクトルのアサイン

ようになる. 但し, これについては解離後のフラグメントイオンが三重結合や不飽和結合が並ぶことになるため, (22:6) を持つPCの生成品を測定して考察する必要がある. (16:0) からのフラグメントイオンでは説明できないピークである*m/z* 577, 591, 630, 657, 671, 710は, 若干のズレがあるが, 図の値と近いために, (22:6)からのフラグメントイオンであるといえる. このズレがピーク強度不足によるズレか, 解離機構が異なるためなのか, 今回の測定では判断できなかった. (16:0) からのフラグメントイオンと重なってしまったりして, はっきり見えていないが (22:6) の解離パターンも検出されていると思われる.

m/z 834について

図78に*m/z* 834のプロダクトイオンスペクトルの*m/z* 450以上を拡大したものを示す. 既に示した*m/z* 806のプロダクトイオンスペクトルよりも, プリカーサイオンの強度が強いためスペクトルのS/N比は比較的良くなっている. *m/z* 834はプリカーサーイオンの質量から PC(40:6) だと推定される. これについても*m/z* 806と同様に解析すると, *m/z* 578および622が２つの脂肪酸のC3であり, *m/z* 506および550がそれぞれのNLだと考えられる. ここから２つの脂肪酸は (18:0) および (22:6) となる. またNLの強度が (18:0) よりも (22:6) の方が強いためにPC(18:0, 22:6)だと判断した. C3, NL以外についても, *m/z* 806と同じように (18:0) のフラグメントイオンは系統的に検出されており, それ以外のピークに付いても (22:6) からのフラグメントイオンとして図79のようにアサインできるためにPC (18:0, 22:6) で間違いないと思われる.

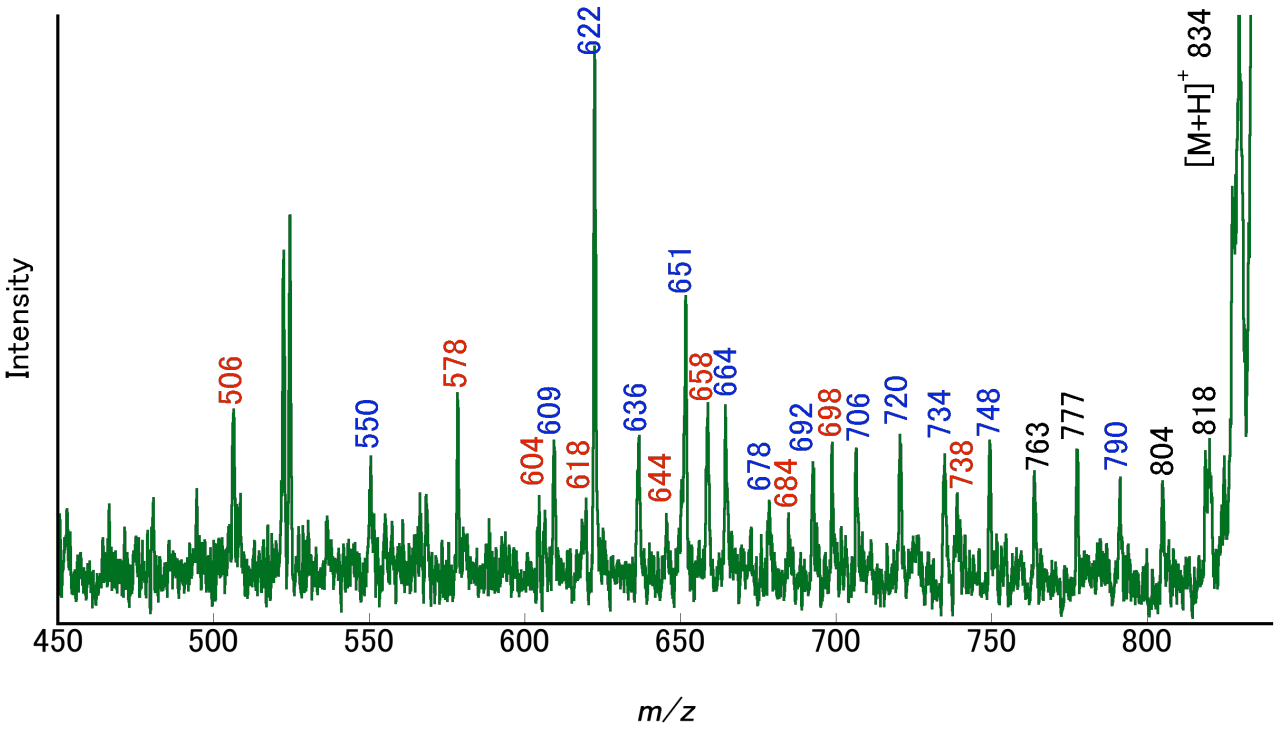


図78. m/z 834のプロダクトイオンスペクトル m/z 450-850を拡大

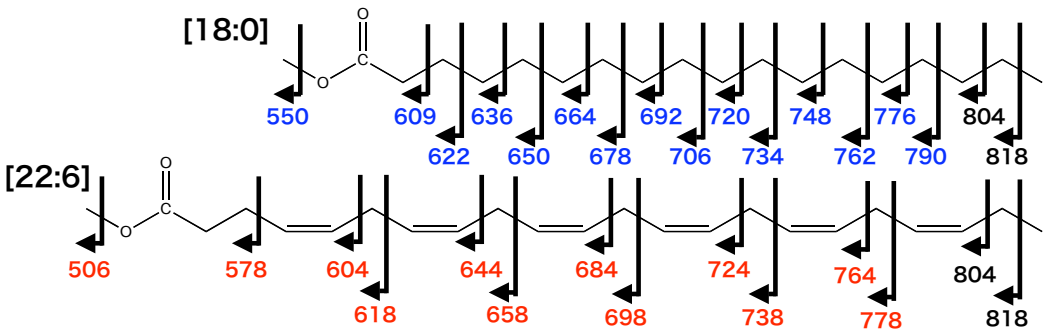


図79. m/z 834のプロダクトイオンスペクトル m/z 450-850

m/z 878について

図80に*m/z* 878のプロダクトイオンスペクトルの*m/z* 450以上を拡大したものを示す. *m/z* 878はプリカーサーイオンの質量からPC(43:5), (44:12)の２つの候補が考えられる. *m/z* 622を一方の脂肪酸のC3であると仮定するとこの脂肪酸は(22:6)となり, もう一方の脂肪酸についても(22:6)となる. NLだと思われる *m/z* 550のピークも観測されているために, PC(22:6, 22:6)だと判断した. C3, NL以外に付いても, これまでと同じように考えて, 一部特定できないピーク (*m/z* 695) があるものの, それ以外は (22:6) からのフラグメントイオンで説明できる (図81) . そのため, PC (22:6, 22:6) で間違いないと思われる. またC3が他のピークよりも強く検出されず, C9が最も強く検出されており, これはDHA特有のパターンだと思われる.

m/z 695については, プリカーサーイオンから -183 uであるためにヘッドグループであるフォスファチジルコリンが脱離したフラグメントイオンであると考えられる. 改めて他のPCのプロダクトイオンスペクトルを見ると, 同じフラグメントイオンが検出されている. (図71) lyso-PC(18:0)では*m/z* 341, lyso-PC(18:1)では*m/z* 339, PC(16:0, 18:1)では*m/z* 577の位置にピークがはっきり検出されており, 脂肪酸の一部が脱離したものではなくフォスファチジルコリンが脱離したものだと予想される. この脱離は, アルカリ金属付加のイオン低エネルギーCIDで報告されている[35].

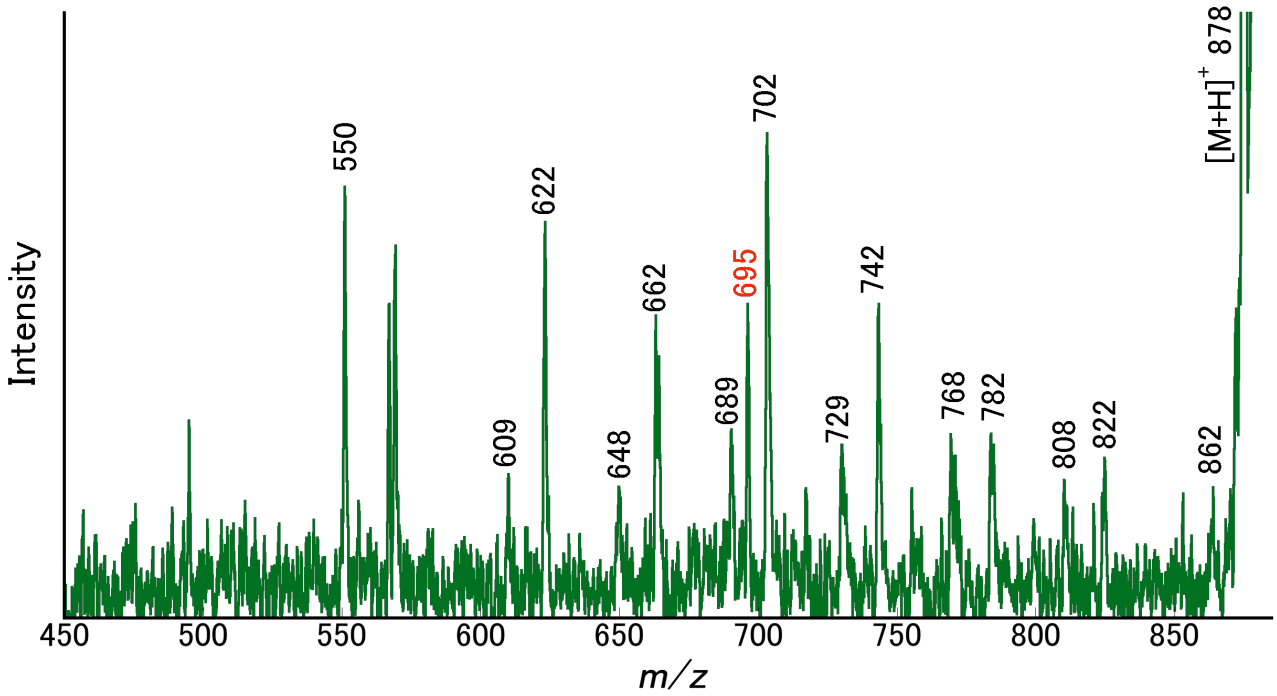


図80. m/z 878のプロダクトイオンスペクトル m/z 450-890を拡大

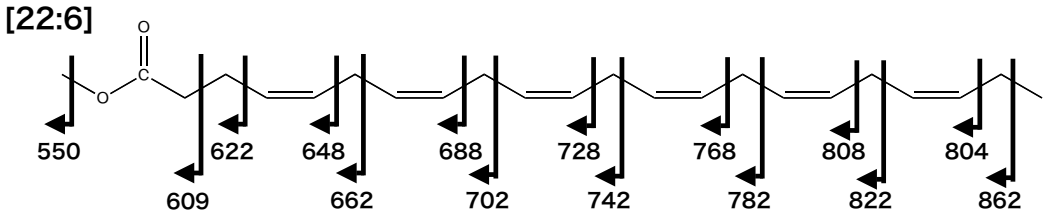


図81. m/z 878のプロダクトイオンスペクトのアサイン

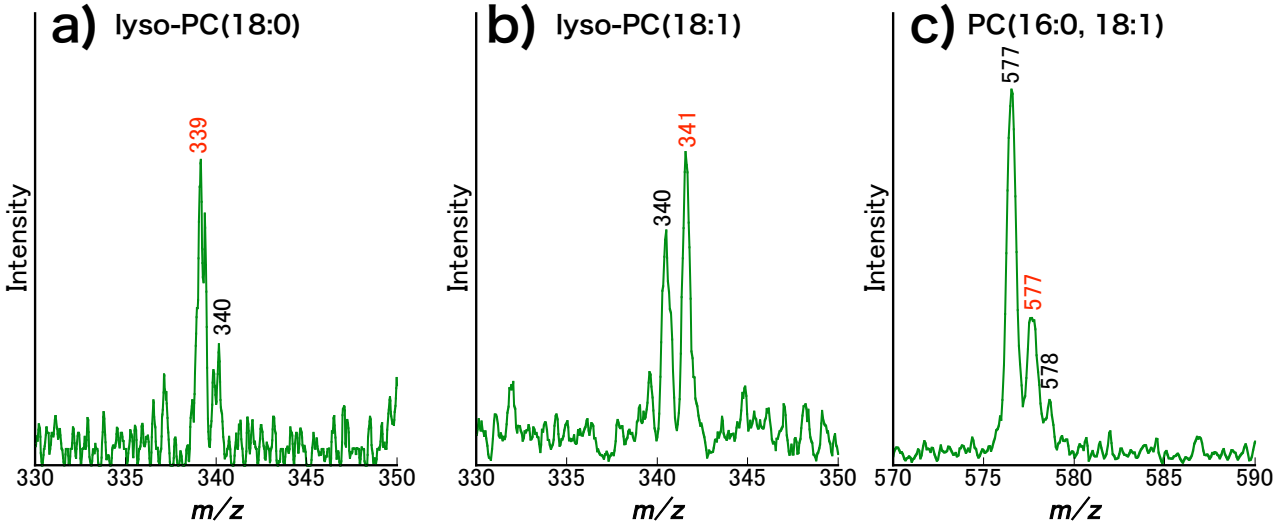


図82. lyso-PC, PCのプロダクトイオンスペクトルのプリカーサーイオンから-183の位置を拡大した. (a. lyso-PC (18:0), b. lyso-PC (18:1), c. PC(16:0, 18:1))

m/z 1018について

図83に*m/z* 1018のプロダクトイオンスペクトルの*m/z* 500以上を拡大したものを示す. *m/z* 1018はプリカーサーイオンの質量からPC(53:5), (54:12)の２つの候補が考えらる. 強度の強い*m/z* 622を一方の脂肪酸のC3だと仮定するとこの脂肪酸は，(32:6) となり，もう一方の脂肪酸は (22:6) となる．(22:6) のC3に当たる*m/z* 762の位置にピークが検出されている. しかし, NLに当たる*m/z* 622および762から-72 uの位置にピークはほとんど検出されていない. NLがないために他の組み合わせを考えたが, *m/z* 762-1010の範囲を見ると*m/z* 835のピーク以外は，PC (22:6, 22:6) と同じパターンが観測されている. そのため，この部分に相当する脂肪酸の構造は(22:6)と同じ構造になっていると考えられる. このことから，2つの脂肪酸は, (32:6) および (22:6) で, (32:6) の構造は, 図84のようになっていると判断した. *m/z* 622-762の領域を見ると，14 u刻みのピークが検出されている(図83および84で, 赤字が振ってあるもの). この事実からも (32:6) は図84のような位置に不飽和結合を持っていると思われる.

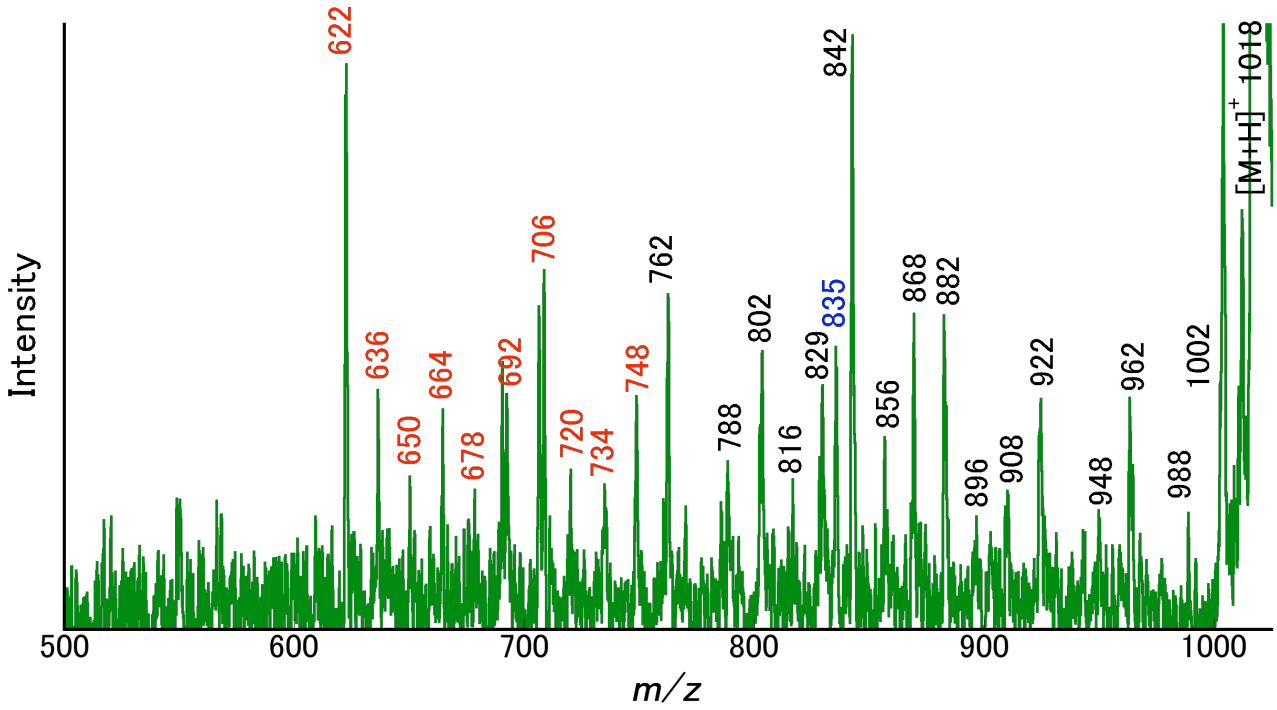


図83. m/z 1018のプロダクトイオンスペクトル m/z 500-1030を拡大

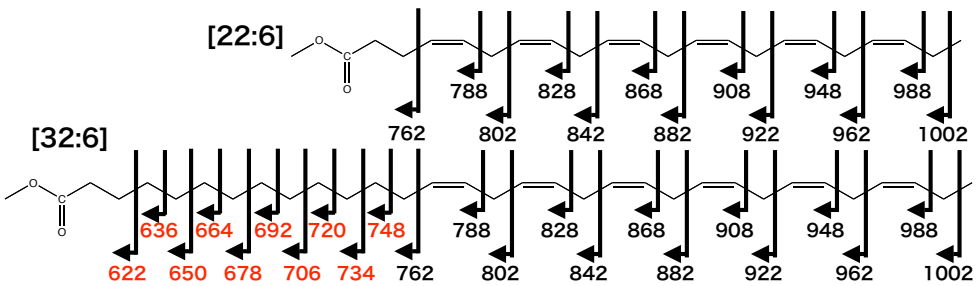


図84. m/z 878のプロダクトイオンスペクトルのアサイン

今回, 提供を受けた鯉の桿体細胞からMS/MS により同定する事ができたPCは表4のようになる.

m/z ([M+H]$^+$)	脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の総数	各脂肪酸部分の炭素鎖及び不飽和結合の数
734	(32:0)	
760	(34:1)	
806	(38:6)	(16:0), (22:6)
832	(40:7)	
834	(40:6)	(18:0), (22:6)
878	(44:12)	(22,6), (22:6)
990	(52:12)	
1018	(54:12)	(22,6), (32:6)

表4. 鯉の桿体細胞の抽出物から同定できたPC

m/z 806, 834, 878, 1018については, プロダクトイオンスペクトルから各脂肪酸の炭素鎖および不飽和結合の数を同定することができた. *m/z* 806, 834, 878については, その数から脂肪酸内の不飽和結合位置は既知であったが, 構造を反映したCRF由来のピークパターンが観測されていることを確認した. *m/z* 1018については, (32:6) という超長鎖の脂肪酸が含まれており, 不飽和結合位置が不明であったために, CRF由来のピークパターンからその不飽和結合位置を推定し, 同定することができた. また, 脱塩処理を行うことで, プロトン付加が優先的に検出されていることを確認した. 今回の結果からPCの解析手順を次頁のように定めた.

PCの解析手順

一. マススペクトルを測定し, 質量を測定する. この際, 試料は脱塩処理を行っていることが望ましい.

二. PCの質量として考えられるm/z 700〜1100の範囲のイオンをプリカーサーイオンとしてMS/MSを測定し, そのプロダクトイオンスペクトルのパターンを確認し, PCのプロトン, Na, K付加のいずれかのパターンに一致するか確認する (図75) .

三. 付加イオンの同定ができたものについては, 質量から脂肪酸部分の炭素鎖の総数 (N_C) および二重結合の総数 (N_d) を計算する. M, N_C , N_dの間には以下の式が成り立つ.

$$M=285+14\cdot N_C - 2\cdot N_d$$

(但し, これまでに発見されている不飽和脂肪酸でN_d/N_Cが最も大きいものは, (22:6)であるためにN_dとN_Cの間には以下の条件が成り立つ.)

$$\frac{N_d}{N_C} \leq \frac{3}{11}$$

四. プリカーサーイオンの強度が十分なものについては, *m/z* 400以上の範囲を拡大し, 強く検出されているピークを選択し, それを 1 つの脂肪酸のC3であると仮定する(このピークの*m/z*を*X*と定義する.).このように仮定するともう 1 つの脂肪酸のC3の*m/z*が(プリカーサーイオンの*m/z*を*M*とすると) *M*+366-*X*となるのでその位置にピークが存在するか確認する. 存在すれば, それぞれから-72 uの位置にNLのピークが存在するか確認する. 存在すれば最初の仮定が正しいことになり, 2 つの脂肪酸それぞれの炭素鎖および不飽和結合の数を同定できる. 最後に 2 つのNLの強度を比較し, 2 つの脂肪酸のどちらが 1 位でどちらが 2 位の位置に結合しているかを同定する.

五. Eの結果を元にC3, NL以外のピークを同定する. lyso-PCおよびPC (16:0, 18:1) の結果から, 単結合が連続する場合は, 14 u間隔でピークが検出され, 不飽和結合が存在する場合は, 54 uの間隔が見られる. 例外としてC2とC3の間隔は, 13 uとなる.

実験３まとめ

これまでに報告のあったlyso-PCについて, 脂肪酸部分の構造を反映したCRFによる解離パターンを確認し, 不飽和結合の位置を同定できることを確認した.

lyso-PCより複雑な構造を持つ脂肪酸が２つ付いたPC (16:0, 18:1)においても両方の脂肪酸の構造を反映した解離パターンが検出されていることを確認した. また, lyso-PCと同様にアルカリ金属付加よりもプロトン付加の方がパターンを観測する上で適していることを確認した. さらに付加イオンの種類による特徴的なフラグメントイオンを確認した. PCの混合物を測定し, MS/MSを行うことで, 付加イオンの同定ができ, 脂肪酸部分の炭素鎖および不飽和結合の総数を同定できることを確認した. 強度が一定以上の場合は, CRF由来の解離パターンから脂肪酸の構造を同定することが可能となった. 中でも (32:6) という超長鎖の脂肪酸の存在を確認し, 不飽和結合の位置が不明であったために, 解離パターンから推測し, 同定することができた. また, 脱塩処理を行うことで, 優先的にプロトン付加が測定されるようになることを確認した.

7章. まとめ

本研究で, “MALDI Spiral TOF/TOF”は, 飛行時間型質量分析計として30000程度の高分解能で幅広い質量範囲を測定可能であることを確認した.質量決定精度については, 外部標準を用いて10 ppmの誤差に収まることを確認し, sngiotensinⅡ, ACTH fragment 18-39でatmol/μのオーダーでも十分なS/Nでマススペクトルを測定できることを確認した. さらに, タンデム飛行時間型質量分析計として質量が1300 u程度までのプリカーサーイオンが解離して生成されたフラグメントイオンは, unit mass resolutionで測定できることを確認した. 標準的なペプチドを測定し, “MASCOT”のMS/MSサーチで, 配列通り同定できることを確認し, 質量決定精度は0.3 uであることを確認した. 感度については, angiotensinⅡで100 fmol/μLでa イオン全てがS/N比3以上で測定可能であることを確認した.

次にアプリケーションとしてリン酸化ペプチドを測定し, トレオニン以外のセリン•チロシンのリン酸化についても, 高エネルギーCIDでリン酸が付加したままペプチド主鎖が開裂することを確認し, 修飾部位の同定が可能であることを確認した. またチロシンのリン酸化については, 他の２つよりもリン酸が脱離しにくく, immonium ionについてもリン酸が付加したまま検出されることを確認した. リン脂質の測定において, 脂肪酸が１つのlyso-PCだけでなく脂肪酸が２つ結合したPCにおいても２つの脂肪酸の構造情報が得られることを確認した. この結果を用いて, PCの実試料 (細胞からの抽出物) においても脂肪酸の構造まで同定できることを確認した.

本研究で標準的なペプチドを測定し, 性能評価を行った. 高分解能および高い質量決定精度, 高感度を確認したため, 今後は実試料であるタンパク質のトリプシン消化物などの実試料の測定を行っていく予定である. また, リン酸化ペプチドについてもトレオニン, セリン, チロシン全ての場合で, 修飾部位の同定が可能であることを確認できたために, 実試料の測定を行っていく. リン脂質については, 装置がまだ負イオンの測定を行えなかったため, MALDIでそのまま正イオン化しやすく, 量が多いPCを対象としたが, 負イオンが測定できるようになれば, PC以外のリン脂質であるPhosphatidyl Ethanoamine (PE)やPhospatidyl Inositol (PI) も同様に解析できると思われる. また, PCの構造解析において脂肪酸がDHB等の不飽和結合が多い場合のCRFによる解離機構等不明な部分が多く, 精製品を重水素ラベル等をして測定して検討していく必要がある. リン脂質以外についても, 高いプリカーサーイオン選択能および高エネルギーCID, PSD成分の排除により, CRF由来ピークを明確に確認し, 複雑な構造を持つ合成高分子や糖鎖などの試料の構造解析においても有用であると期待される.

謝辞

本研究をすすめるにあたってご協力いただいた皆様に心よりお礼を申し上げます. 豊田岐聡先生には, この研究に携わる機会を与えていただき, また質量分析の基本的な知識をはじめとする研究全般に対する多くのご指導を頂きました. 石原盛男先生には, 実験結果の考察にあたって貴重なご意見を頂きました. 研究員の新間秀一さんには, 実験をすすめるにあたって, 試料調整法や実験結果の解析方法に関して多くのご指導を頂きました. 研究員の青木順さんには, 物理に関する知識や数値計算に関して多くのご指導を頂きました. 工学研究科の長尾博文さんには, 研究生活について多くのご助言を頂きました. 院生の加納英朗君には, 実験を行うにあたり, ご助力を頂きました. 質量分析グループのスタッフ, 学生の皆様には, 研究活動全般において様々な面からご指導を頂きました.

日本電子株式会社のMSグループの皆様には, 実験装置を使う機会を与えて頂き, 研究について多くのご協力を頂きました. 深く感謝致します.

生命機能研究科 橘木修志先生には, 貴重な試料を提供して頂きました. 深く感謝致します.

参考文献

[1] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2** (1988) 151.

[2] M. Karas, F. Hillenkamp, *Analytical Chemistry* **60** (1988) 2299.

[3] M. Yamashita, J.B. Fenn, *Journal of Physical Chemistry* **88** (1984) 4451.

[4] F.W. McLafferty, *Science* **214** (1981) 280.

[5] M. Toyoda, D. Okumura, M. Ishihara, I. Katakuse, *Journal of Mass Spectrometry* **38** (2003) 1125.

[6] A.W. Colburn, A.E. Giannakopulos, P.J. Derrick, M. von Raumer, *European Journal of Mass Spectrometry* **6** (2000) 523.

[7] M. Toyoda, A.E. Giannakopulos, A.W. Colburn, P.J. Derrick, *Review of scientific instruments* **78** (2007) 074101.

[8] S. Shimma, H. Nagao, A.E. Giannakopulos, S. Hayakawa, K. Awazu, M. Toyoda, *Journal of Mass Spectrometry* **43** (2008) 535.

[9] S. Shimma, H. Nagao, M. Toyoda, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **55** (2007) 343.

[10] T. Satoh, T. Sato, J. Tamura, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **18** (2007) 1318.

[11] F.W. McLafferty, R. Kornfeld, W.F. Haddon, R. Levsen, I. Sakai, P.F. Bente III, S.-. Tsai, H.D.R. Schuddemage, *Journal of the American Chemical Society* **95** (1973) 3886.

[12] M.F. Bean, S.A. Carr, G.C. Thorne, M.H. Reilly, S.J. Gaskell, *Analytical Chemistry* **63** (1991) 1473.

[13] 佐藤 貴弥, 佐藤 崇文, 田村 淳, 第55回質量分析総合討論会 2P-08-A08.

[14] M. Glückmann, A. Pfenninger, R. Krüger, M. Thierolf, M. Karasa, V. Horneffer, F. Hillenkamp, K. Strupat, *International Journal of Mass Spectrometry* **210-211** (2001) 121.

[15] R.C. Beavis, B.T. Chait, *Chemical Physics Letters* **181** (1991) 479.

[16] M.L. Vestal, P. Juhasz, S.A. Martin, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **9** (1995) 1044.

[17] W.C. Wiley, I.H. McLaren, *Review of Scientific Instruments* **26** (1955) 1150.

[18] http://www.matrixscience.com/

[19] V.H. Wysocki, G. Tsaprailis, L.L. Smith, L.A. Breci, *Journal of Mass Spectrometry* **35** (2000) 1399.

[20] K. Biemann, *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **16** (1988) 99.

[21] I. Fournier, A. Marie, D. Lesage, G. Bolbach, F. Fournier, J.C. Tabet, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **16** (2002) 696.

[22] R.S. Johnson, S.A. Martin, K. Biemann, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **86** (1988) 137.

[23] J. Adams, *Mass spectrometry reviews* **9** (1990) 141.

[24] N. Akimoto, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **46** (1998) 228.

[25] M.L. Gross, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **118-119** (1992) 137.

[26] J. Laskin, C. Lifshitz, *Journal of Mass Spectrometry* **36** (2001) 459.

[27] B.A. Mamyrin, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **131** (1994/2/24) 1.

[28] T.J. Cornish, R.J. Cotter, *ACS Symposium Series* **549** (1994) 95.

[29] M. Toyoda, D. Okumura, S.-. Yamaguchi, M. Ishihara, I. Katakuse, T. Matsuo, *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan* **48** (2000) 312.

[30] M. Ishihara, M. Toyoda, I. Katakuse, *Advances in mass spectrometry* **15TH** (2001) 435.

[31] T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, Y. Kammei, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **16** (2005) 1969.

[32] H. Matsuda, Y. Fujita, *International Journal or Mass Spectrometry and Ion Physics* **16** (1975) 395.

[33] R.C. Beavis, B.T. Chait, H.M. Fales, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **3** (1989) 432.

[34] A. V. Loboda, S. Ackloo, I. V. Chernushevich, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17** (2003)2508

[35] E. Stimson, O. Truong, W. J. Richter, M. D. Waterfield, A. L. Burlingame, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **169/170** (1997) 137.

[36] H. Hazama, H. Nagao, R. Suzuki, M. Toyoda, K. Masuda, Y. Naito, K. Awazu, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22** (2008) 1461.

[37] S.L. Cohen, B.T. Chait, *Analytical Chemistry* **68** (1996) 31.

[38] K.R. Clauser, P. Baker, A.L. Burlingame, *Analytical Chemistry* **71** (1999) 2871.

[39] O.N. Jensen, A. Podtelejnikov, M. Mann, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10** (1996) 1371.

[40] http://prospector.ucsf.edu/

[41] A. Stensballe, O.N. Jensen, J.V. Olsen, K.F. Haselmann, R.A. Zubarev, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **14** (2000) 1793.

[42] R.S. Annan, S.A. Carr, *Analytical Chemistry* **68** (1996) 3413.

[43] 秋山翹一, 島田信子, 木村成道, 戸田年総, 生物物理化学 **49** (2005) 73.

[44] F.u. Hsu, J. Turk, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14** (2003) 352.

[45] N.J. Jensen, K.B. Tomer, M.L. Gross, *Journal of the American Chemical Society* **107** (1985) 1863.

[46] X. Han, R.W. Gross, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **6** (1995) 1202.

[47] V.H. Wysocki, M.M. Ross, *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **104** (1991) 179