

超高性能質量分析計による最新アプリケーション

菰澤 崇

ブルカー・ダルトニクス株式会社

はじめに

物質の重さ（質量）を計測する装置である質量分析計は、長い歴史の中でさまざまなバリエーションに分化し、発展してきた。分析者は、対象物質の形態、性質および必要とする情報に合わせて質量分析計を選択し、測定を行っている。現在ではその学術的な位置づけよりも、分析者の一つのツールとしての役割が重要視されるようになってきている。したがって分析計にとっても、「いかに簡便かつ短時間で有用な情報を得るか」が課題である。各質量分析メーカーは、このニーズに答えるべく、装置開発に凌ぎを削っている。つまり、“簡便で速く”という課題をクリアすることが、装置開発陣営には非常に厚く高い壁なのである。この壁を乗り越えようと、年々進化している質量分析計は、いつの間にか非常に高性能な分析装置として生まれ変わりつつある。ルーチン測定のみならず、質量分析計のポテンシャルを全て引き出した最先端技術を駆使して解析を行う場面も、次第に多くなってきている。しかし、現状では多くの研究者にそれが周知されていないことも事実である。

超高性能化された質量分析計のポテンシャルおよび最先端アプリケーションに関して、最も汎用性の高いMALDI-TOF-MSを中心に、他の装置も交えながら紹介する。

質量分析計

質量分析計は、サンプル導入部、イオン源、分析計、検出器およびコンピュータで構成されている（図1）。その中で、イオン源および分析計部のバリエーションは多い。

主なイオン源は、図2に示したようにMALDI、ESI、EI、FABなどで、試料の物性によって選択する。中でもMALDIおよびESIは、近年のアプリ

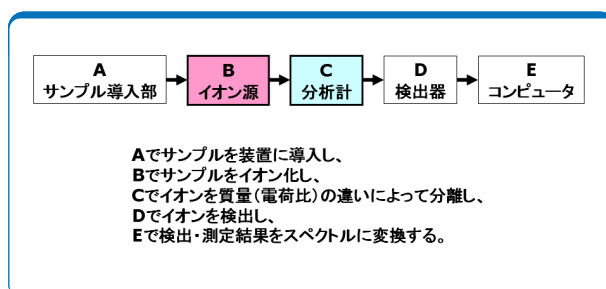


図1. 質量分析計の構成

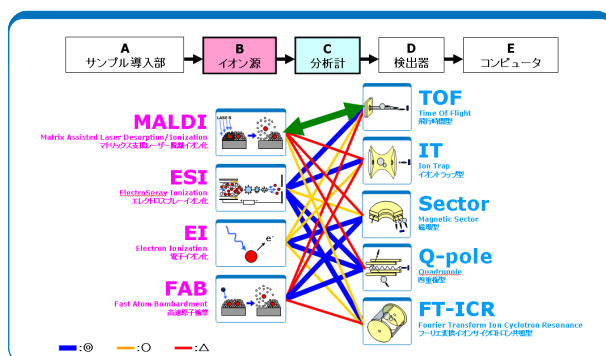


図2. イオン源と分析計の組み合わせ

ケーションに数多く使用されている。特殊なイオン源としては、錯体、クラスタ等の熱に不安定な試料を、ごく低温に冷やしながらいオン化する、クライオスプレイイオン化等が開発されている。

分析計には、飛行時間型（TOF）、イオントラップ型（IT）、磁場型（Sector）、四重極型（Q-pole）およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型（FT-ICR）があり、取得する情報の種類に合わせて選択する。イオン源と分析計の組み合わせによって、さまざまなアプリケーションに対応することができるが、中でもMALDIとTOFを組み合わせたMALDI-TOF-MSは、応用できる試料の種類が多く簡便で、プロテオーム解析など、幅広く使用されるようになってきた。

イオン源、分析計の概略および最新の質量分析

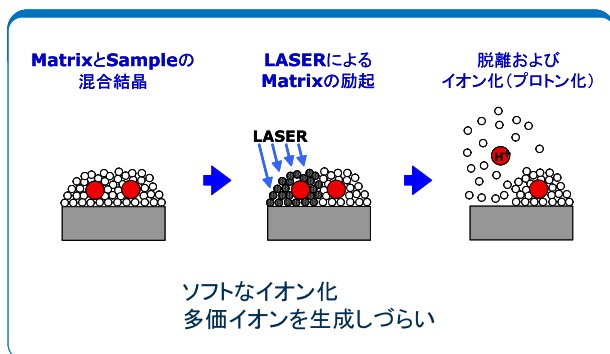


図3. MALDIの基本原理

計の高性能化に関して、順に紹介して行く。

イオン源 (MALDI)

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionizationの略語) は、2002年のノーベル化学賞を受賞した、タンパク質等、生体高分子解析に必須なイオン化方法である。その原理に関する全容は、未だ完全には解明されていないが、さまざまな試料に対して非常に適合性の高いイオン化源である。図3のように、試料とマトリックスを混合した溶液を試料台に滴下し、乾燥させて結晶化した後に、レーザーによってイオン化する。このイオン化法は、おもにマトリックス由来のH⁺（プロトン）が試料に付加した擬分子イオンを生成するため、非常にソフトなイオン化であり、また多価イオンを生成しにくいので解釈の容易なスペクトルが得られると言われている。さらに、難溶解性の試料でも、固相のままマトリックスと混合することによってイオン化させることができる。ゆえに汎用性が高い画期的なイオン化法と言える。

表1に、おもに使用されているマトリックスを示す。表からもわかるように、タンパク質、合成高分子など、目的の試料に応じて、マトリックスの種類を選択して使用することによって、分析が簡便になる。マトリックスに関しては、現在も多くの研究がなされており、日々進化している。MALDIの苦手とする低分子量物質の測定に関しては、マトリックスピークの混在を避ける方法として、マトリックスを使わずにイオン化を行う、NALDI (Nanostructure Assisted Laser Desorption Ionization) が開発されている。これは金属クラスターのナノ構造を利用したイオン化方法であり、測定対象物質のみをイオン化するものである。今まで、マトリックス由来のピークによ

表1. おもなマトリックスリスト

マトリックス	分子量	使用濃度(例)	適合対象
α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)	189.2	飽和	ペプチド
sinapinic acid (SA)	224.2	飽和	タンパク質
2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB)	154.1	10mg/ml	タンパク質、糖質、糖ペプチド、PEG等合成高分子
trans-3-indoleacrylic acid (IAA)	187.2	10mg/ml	脂質、PMMA等合成高分子
5-chlorosalicylic acid (5CSA)	172.6	10mg/ml	脂質、油脂等
picolinic acid (PA)	123.1	10mg/ml	核酸
anthranilic acid (ANA)	137.1	10mg/ml	核酸
nicotinic acid(NA)	123.1	10mg/ml	核酸
3-hydroxypicolinic acid (3HPA)	139.1	10mg/ml	核酸(<10000Da)
2,4,6-trihydroxyacetophenone (2,4,6-THAP)	186.1	10mg/ml	核酸(>10000Da)
3-aminoquinoline	144.2	10mg/ml	塩基性サンプル
9-nitroanthracene (9NA)	223.2	10mg/ml	合成高分子、芳香族等
2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)	242.2	10mg/ml	ナイロン等合成高分子
dithranol	226.2	20mg/ml	ポリスチレン等合成高分子
Lithium trifluoromethanesulfonate			(カチオン添加用)
Silver trifluoroacetate			(カチオン添加用)

り阻害されていた領域の測定には、特に威力を発揮する新しいイオン化方法である。

MALDIは、レーザーによるイオン化法であるため、イオン化源のレーザーも進化している。従来、窒素レーザーが一般的に使用されていたが、現在では繰り返し周波数が高く、寿命が長いYAGレーザーを基本とする高性能レーザー(smartbeam-II™ : 1kHz)が使用されている。窒素レーザーの特徴である、ビーム内の強度プロファイルの分散を応用し、YAGレーザーの持つガウシアンタイプのビームプロファイルを機械的に分散させることによって、試料の消費を抑え、クオリティの高いスペクトルを取得することが可能となった。

分析計 (TOF-MS)

飛行時間型質量分析計TOF-MS (Time-of-Flight Mass Spectrometry)は、質量分析計の中でも特に簡単な原理で動作している。図4のようにパルスレーザーによりイオン化された物質は、一定の電場によりエネルギーを受け、飛行を始める。ドリフト領域では、質量の小さいものはスピードが速く、大きいものはスピードが遅いことから、検出器への到達時間に差が生じる。その時間差を精密に計測し、それを質量に変換すると、質量ス

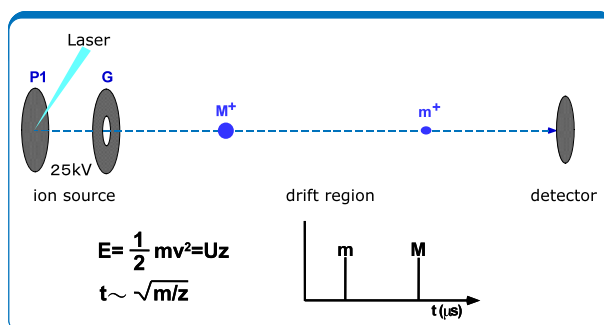


図4. TOF-MSの基本原理

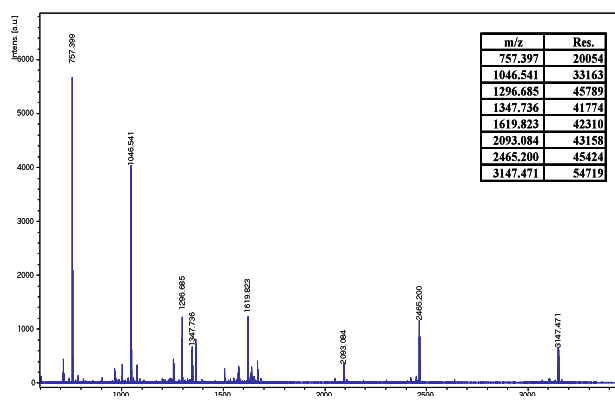


図5. 高分解能質量スペクトル

ペクトルが得られる。また、反射電場（リフレク）を置くと、さらなる時間分布の収束を行うことができ、高分解能測定が可能となる。現在では、より高分解能測定を行う加速電圧装置を装備することで、40000（FWHM）を超える分解能が得られている(図5)。

我々は、PAN（パノラマフォーカシング）、超高速検出器（FlashDetector）および4GHzのデジタルを採用し、各時定数の影響を考慮して電気系を再設計することにより、広い質量範囲での高分解能化を実現している。

最新のTOF-MSでは、TOFを直列に配置したタンデム型を採用することによって、MS/MS測定を容易かつ高速化した、TOF/TOF-MS(LIFT)も開発されている。基本的な原理は、次のように説明される。まず1段目のTOFで加速されたイオンは、イオン化時に受けた過剰エネルギーによりメタステーブル崩壊（PSD）を起こして解離する。生成したプロダクトイオンは、プリカーサーイオンと同じスピードで飛行し続ける。イオンセレクト（タイムドイオンセレクト）によって選別された、イオンの集団は2段目のTOFに導かれ、過剰なエネルギーで再加速される。再加速されたイオンの集団は、ドリフト領域およびリフレクタで質量分離され、その結果、MS/MSスペクトルが得られるのである（図6）。

以上のように高性能化した装置は、試料の処理速度が速いことから、多数の試料を短時間に測定できることになるが、その際、高感度測定を維持するためにイオン源のメンテナンスも重要となる。その対策として、イオン化レーザの他に赤外レーザを搭載させた。赤外レーザはイオン源を自己クリーニングする機構を有している。

これらの最新の技術を搭載したMALDI-TOF/TOF-MSによって、多岐にわたるアプリケーションへの対応が可能になった。現在、我々が展開し

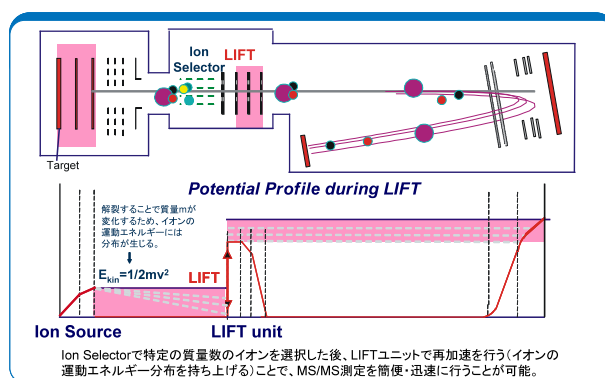


図6. TOF/TOFの基本原理

ている応用例について後述する。

最新アプリケーション

汎用性の高いMALDI-TOF/TOF-MSの超高性能化の実現により、今までは不可能だった新しい測定手法が次々と開発されている。さらに、TOF-MSのみならず、他の質量分析計と組み合わせることによって、包括的な解析も可能となった。

プロテオーム解析では、ゲルベースに加え、LCベースでのアプリケーションが行われ、より含有量の低いタンパク質の網羅的な同定および、同位体ラベル、ラベルフリーによる比較定量が実現できる。また、異なる方式の質量分析計で取得した結果を一括管理・解析を行うソフトウェアも充実している。酵素処理を行うボトムアッププロテオミクスから、現在では酵素処理を行わずにインタクトプロテインからダイレクトに配列情報を得るトップダウンプロテオミクスまでが容易に実施できるようになった。さらに、生体組織切片を直接分析し、分子量およびその位置情報を得ることによるバイオマーカー探索や、薬剤を投与した組織を使用し、その動態を観測するイメージング質量分析(IMS)も容易になった。さらなる応用として、TLCを直接分析するTLC-MALDI、TLC-IMSという測定方法や、得られるプロファイルスペクトルのパターンから、微生物の同定を行うアプリケーションまで、まだまだ多くの測定・解析手法が開発されている。以下に、最新アプリケーションの一部を紹介する。

1. MALDI-TDS (Top-Down Sequencing)

従来、酵素処理によるボトムアップで行われていたプロテオーム解析では、網羅的なタンパク質の同定は可能であるが、マーカー探索に不可欠な分子量の情報が失われてしまう側面があった。しか

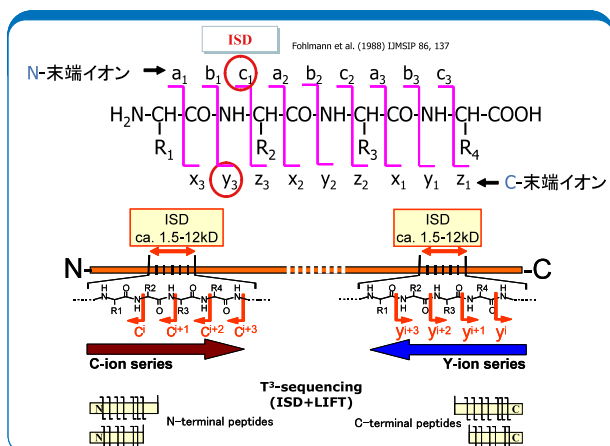
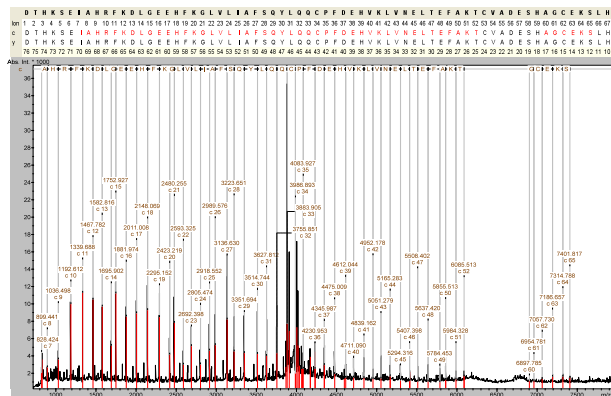


図7. MALDI-TDSの基本原理

し、トップダウン解析では、あらかじめ分子量で振り分けたタンパク質の配列情報をダイレクトに得られるので、マーカー探索等においてその威力が発揮される。さらに、リコンビナントタンパク質に関しては、その末端情報が簡単に得られるので、エドマンシーケンサに代わる解析として、抗体医薬分野への有用性も期待される。

MALDI-TDSの基本原理を図7に示す。イオンソース内で過剰なレーザーエネルギーによって気化した分子は、衝突等の作用により、インソースフラグメンテーション(ISD)を起こす。ここで生成されるフラグメントイオンは、N端側の情報を持つCタイプおよび、C端側の情報を持つYタイプである。図7のように、生成したISDフラグメントイオンピークの質量差を求めることによって、タンパク質の末端配列情報を得ることができる。ISD解析のみではマトリックス等の影響によりm/z: 1000以下の情報を得ることができず、最末端の配列情報を得ることが難しい。しかし、ISDで生成されたフラグメントイオンの一つを選択して、MS/MS測定することにより、最末端までの配列情報を得ることができる。我々は、これをT3シーケンシングと呼んでいる。図8にウシ血清アルブミン(BSA)のreISD (reflector mode ISD) スペクトルを示す。Cタイプイオンが明瞭に検出され、N端から65番目のアミノ酸まで配列情報が得られている。このように、インタクトタンパク質の末端からの配列情報を簡便に得る手法として、TDSが有効活用されている。また、インタクトタンパク質の内部配列情報をダイレクトに取得したい場合は、UHR-TOF(Ultra High Resolution TOF)を用いた、ETD(Electron Transfer Dissociation)-MS/MSの測定により、80kDaを超えるようなインタクトタンパク質の内部配列情報が容易に得られる。いずれも



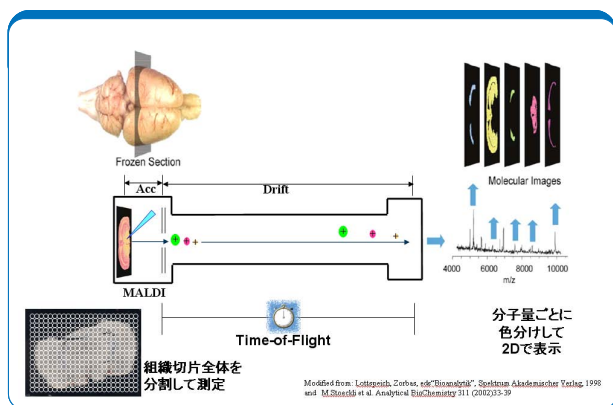


図 9. イメージング質量分析の概略図

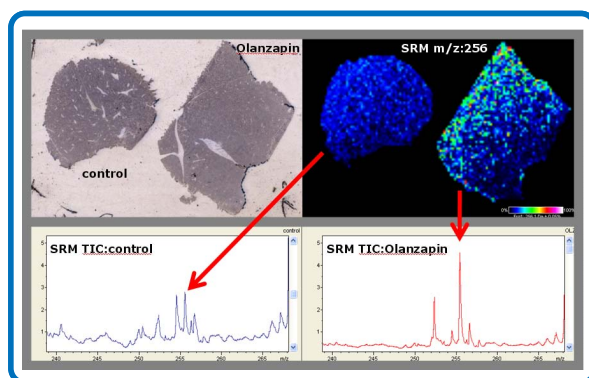


図 12. マウス肝臓の SRM-IMS
(Olanzapine 10mg/kg i.p.)

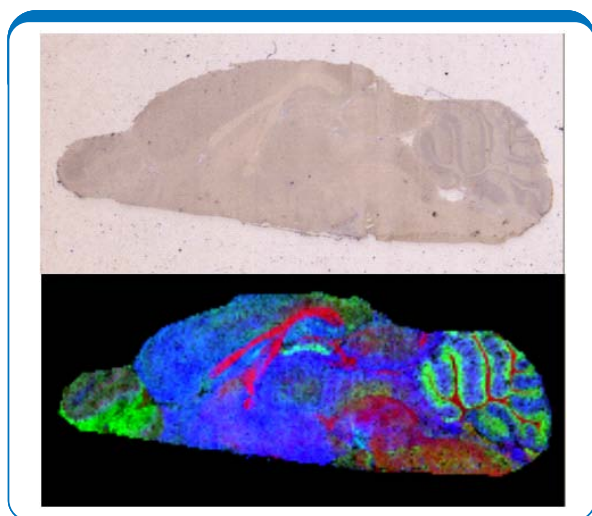


図 10. マウス脳サジタル切片 脂質のイメージング

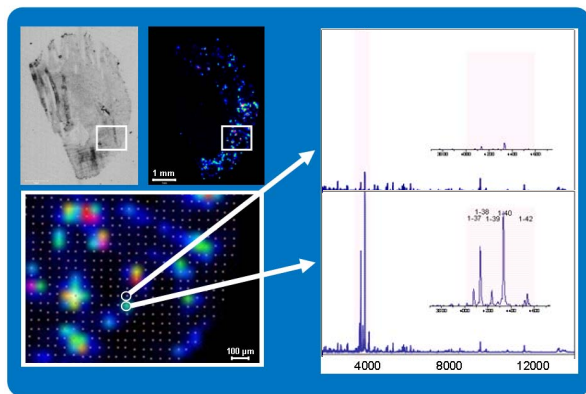


図 11. アルツハイマモデルマウス脳のイメージング

質量スペクトルにおいて特定の分子量をフィルタとし色分けすることによって、可視化を行う。図 10 にマウス脳サジタル切片のイメージングを示す。脂質をターゲットとした測定で、空間分解能は $20\mu\text{m}$ である。形態学的に特徴的な脂質の分布が明瞭に確認できる。また、イメージのコントラストは、ある程度の量的分布を反映しているものである。図 11 には、アルツハイマモデルマウスのイメージングを示す。この測定では、タンパク質、ペプチドをターゲットとしており、 β アミロイド

の分布が $50\mu\text{m}$ の空間分解能で良好に得られている。また、もともと質量分析であるため、 β アミロイドのアミノ酸鎖長の違いに関するデータも得られ、これについても非常に詳細な議論ができる。また、薬物動態等、低分子を捕捉する目的のイメージングには、MS/MSを使用した SRM-IMS (selected reaction monitoring) が用いられる。これは、構造を反映した特徴的なフラグメントピークをモニタしてイメージングされる。MS によるイメージングとは異なり、ターゲット分子のみをモニタする非常に選択性の高いイメージング法である。その中でも、PSD を利用した FAST-SRM は、MALDI-TOF-MS の特性を生かした測定法の一つである。捕捉するフラグメントイオンを選択し、その質量領域のイオンが反射できるだけのリフレクタ電圧を設定してイメージングを行う。検出器に到達するイオン群が制限されることから、高感度な測定が可能となる。図 12 に Olanzapine 10mg/kg を腹腔内投与したマウス肝臓の SRM イメージングを示す。コントロールに比べて、明らかに投与後の切片に薬剤の分布が確認できる。MS のイメージングでは、バックグラウンドの影響が大きいいため、検出が難しい濃度でも、SRM では確実にモニタリングすることができる。さらに、FT-ICR-MS を用いたイメージングでは、より高感度で高精度な検出が可能である。代謝経路がわかっていない薬物に関しても、イメージング測定の結果から網羅的な組成解析および同定を行いながら、代謝物を取りこぼすことなく検出することができる。

このように、イメージング質量分析は、臨床、製薬等の分野に魅力的な情報を提供することができる、最新のツールとなりうる。

3. TLC-MALDI & TLC-IMS

質量分析、特に MALDI-TOF MS は脂質、糖脂質、およびリン脂質 (PL) の分析に非常に有用な分

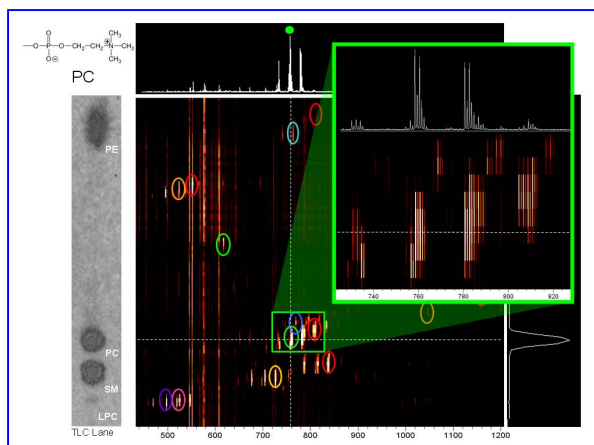


図 13. 脂質混合物の TLC-MALDI

析方法である。多くのPLがMALDI-TOF MSで検出できるが、いくつかの脂質類、特にホスファチジルコリン(PC)などの4級アミンをもつものは、他の脂質以上に高感度で検出される。そのため、細胞からの組織抽出物等の複雑な混合物中で、これら4級アミンは低濃度のPLのイオン化を抑制し、その検出感度を低下させてしまう。したがって、複雑な混合物系では、それらPL類を分離する必要がある。現在、脂質類の分析法として、薄層クロマトグラフィー (TLC) による分離法が確立されており、さらにTLCプレートはMALDIのサンプルターゲットと容易に組み合わせることができるという利点がある。我々は、市販のTLCプレートを保持する専用のサンプルターゲットアダプタを用い、TLCの直接分析を可能にした。TLCの展開方向に直線的に測定を行うTLC-MALDIおよびTLCプレート全体のイメージング測定を行うTLC-IMSを提案している。図13は、TLC-MALDIによる脂質混合物の測定結果である。横軸にm/z、縦軸に展開方向のポジションをプロットした擬似ゲル表示をさせることにより、オーバーラップしているピークに関しても詳細に解析を行うことができる。一方、TLC-IMSでは、図14に示すように、蛍光や染色による検出法と同様の表示方法ながらも、各脂質を色分け表示することにより、高感度で高分解能な可視化を実現している。さらに、MS/MS測定およびFT-ICRによる超高分解能測定による組成解析を組み合わせることによって、各脂質類の同定も容易になる。

4. 微生物同定 (MALDI BioTyper)

微生物の同定には、生化学的手法や形態学的手法が用いられているが、煩雑な作業であり高い専門的技能を必要とする。また、16S rRNAを指標とする手法は高い識別能力があるが、一度に多検体を解析することが難しく、使用する試薬等の

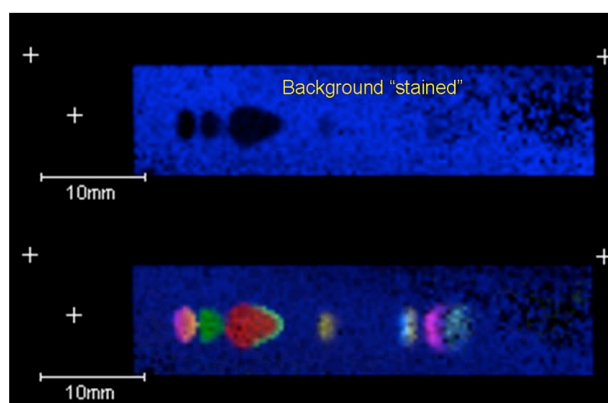


図 14. 脂質混合物の TLC-IMS

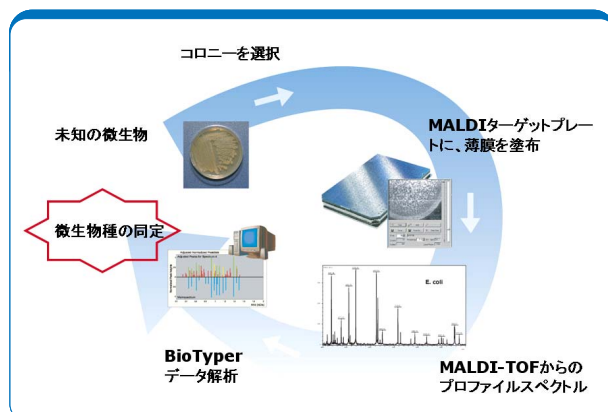


図 15. 微生物同定のワークフロー

コスト面にも課題がある。質量分析計による微生物の同定は、試料の調製が容易で、測定の操作も簡便であり、一菌種の同定がおよそ10分で完了する。使用する試薬のコストが安価であるという利点もある。この同定は、微生物のリボゾームプロテイン由来のスペクトルパターンのマッチングによって行われる。現在では、約4000種の微生物のライブラリが存在する。図15にMALDI BioTyperのワークフローを示す。培養した微生物のコロニーを選択し、少量を採取して、MALDIサンプルターゲットに薄膜上に塗布し、マトリックスを添加、結晶化した後にプロファイルスペクトルを取得する。スペクトルをソフトウェアでライブラリサーチすることによって微生物の同定を行うという、非常に簡便な方法である。低コストで多検体を迅速に同定できることから、現在では臨床、食品分野への応用が期待されている。

以上のように、一つの質量分析計を多岐にわたって応用していくことが可能であり、また異なるタイプの装置を組み合わせることによって、さらにアプリケーション対応の広がりが増してゆく。本講演では、超高性能質量分析を用いた最新アプリケーションに関して、実例を交えながら紹介する予定である。