

# イオンモビリティ分離機能を搭載したQ-ToF-MSの原理と応用例

佐藤 太 (日本ウォーターズ)

## 1、はじめに

Ion Mobility Spectrometry (IMS)は、1950年代に開発された移動度によりイオンを分離する技術であり、爆発物の検出などに広く用いられている。一方、質量分析(MS)は、 $m/z$ によりイオンを分離する技術であり、近年の検出感度や質量分解能の飛躍的な向上に伴い、益々その応用範囲が広がり、多くの分野で活用されている。これらの異なる分離技術を組み合わせたIMS-MSは、質量分析計だけでは不可能な $m/z$ が同一の妨害成分の分離や、イオンの立体構造解析を可能とし、より特異的で詳細な情報を科学者にもたらすことができる。

弊社では2006年に市販の装置として初めて、IMS-MSの機能をもつSYNAPT® HDMSの販売を開始した。さらに、2009年には、IMSとTOF-MSの分解能をどちらも大幅に向上させたSYNAPT G2 HDMSを発表している。今回はIMS-MSの基本となるIMSの原理について解説し、さらにIMS-MS応用例について紹介する。

## 2、IMSの基礎

IMSは、比較的高圧(大気圧から数mbar)のガスセル内を、電場によりイオンが移動する際に、イオンと中性ガス分子が衝突することにより決定される移動度に応じて分離を行う技術である。移動度の分離方法によって大きく2つのタイプに分類できる。

Drift-time Ion Mobility Spectrometry (DTIMS)は、イオンの進行方向に静電場が印加されたドリフトチューブ内にパルス状にイオンを導入し、それぞれイオンが移動に要する時間(ドリフトタイム)を測定する方式である(図1)。このタイプの装置は、イオンの立体構造の解析に広く用いられており、ドリフトタイム( $t_D$ )とイオンの衝突断面積( $\Omega$ )は図2に示した式の関係にある。この式の左項

の測定対象イオン質量( $m_i$ )と $t_D$ 以外は、ドリフトチューブの設定に依存しており、同一のシステムの場合は定数と見なすことができる。つまり、 $t_D$ を測定することにより直接、 $\Omega$ を算出することが可能となる。

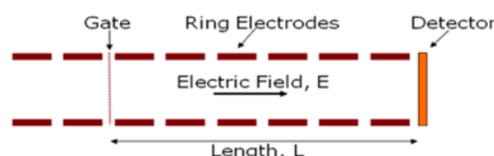


図1 DTIMSの模式図

$$\Omega = \frac{(18\pi)^2}{16} \frac{ze}{(k_b T)^2} \left[ \frac{1}{m_i} + \frac{1}{m_N} \right]^2 \frac{760}{P} \frac{T}{273.2} \frac{1}{N} \frac{t_D E}{L}$$

$\Omega$ : average ion-neutral collisional cross section  
 $e$ : charge of a single proton  
 $z$ : number of charge  
 $N$ : the number of density of the drift gas at standard conditions (1 atm, 273.15 K)  
 $k_b$ : Boltzmann's constant  
 $m_i$ : analyte ion mass  
 $m_N$ : buffer gas of molecular mass  
 $L$ : the length of the drift tube (cm)  
 $E$ : the drift voltage  
 $T$ : the temperature of drift gas (in kelvin)  
 $P$ : the pressure in the drift region (in Torr)  
 $t_D$ : measured drift time

図2 ドリフトタイムと衝突断面積の関係式 (Smith, et al, 2009)

DTIMSでは分解能を上げるために、ドリフトチューブの長さが2m以上になる場合もあり、装置は大型になる傾向がある。また、移動度の測定中はイオンを導入できないため、検出効率は高くない。

Differential-Mobility Spectrometry (DMS)は、静電場が印加された並行するプレートの間を、中性ガスとともにイオンが電場に対して垂直方向に移動する際に、特定の移動度を持つイオンのみが、静電

場内を通過できることを利用して、イオンを選択する方法である。このタイプの装置は、基本的に移動度に応じたイオンのフィルターとして用いられ、DTIMSのように立体構造につながる衝突断面積の測定はできない。しかしながら、イオンの移動度が衝突断面積に直接関連がないことから、イオンの質量に依存性が低い分離が可能のため、特定のイオンを選択する能力は高い。

### 3、SYNAPT G2のIMS

弊社のSYNAPTで採用されているIMSは、DTIMSの1種であるが、弊社独自のイオン輸送技術であるTraveling-Wave (T-Wave) を用いることにより、DTIMSの大きさや検出効率の問題を解消しており、Traveling-Wave Ion Mobility Spectrometry (TWIMS)という新しい方式として分類される。

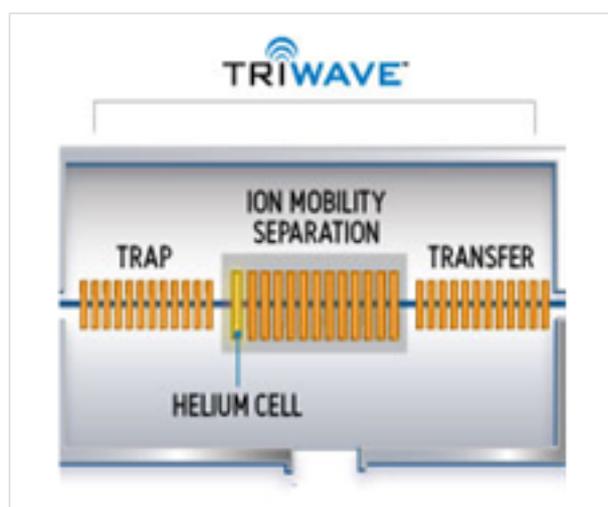


図3 TWIMSの模式図

T-Waveは、連続したリング状の電極で構成され、イオンをリング中央に収束させるRF電圧とイオンを前後に移動させるDC電圧が印加されている。T-Wave内のイオンはDC電圧によりポケット状に保持され、電圧の移動に伴って、トラップまたは掃引される。TWIMSは3つのT-Wave(Triwave®)から成り、1段目のT-Waveでイオンを保持し、2段目でIMSによる分離を行い、3段目でイオンをTOFに輸送する。ミリ秒単位で行われるIMS分離の間は、1段目のT-Waveでイオンをトラップすることにより、連続的にTriwaveに導入されるイオンを100%検出でき、測定効率を飛躍的に高めることが可能となった。T-Waveでは、印加するDCパルスの強さと

速度を調節することにより、効率的なIMS分離を行うことができる。図4に、配列が逆転している5残基のペプチドを測定して得られたドリフトグラム(ドリフトタイム/強度のプロット)を示したが、これは2mのコンベンショナルなDTIMSと同等並びに、第1世代のSYNAPTの4倍の分離能である。また、図4の横軸はIMSセルのドリフトタイムであり、これはDTIMSと同様に衝突断面積と関連がある。衝突断面積が既知のイオンを用いて校正曲線を作成することにより、TWIMSでも衝突断面積の測定を行うことができる。

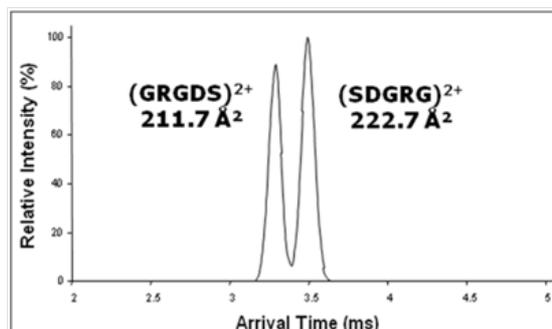


図4 SYNAPT G2のIMSによるペプチドの分離

また、Triwaveでは、IMSセルの前後のT-WaveでCIDによるフラグメンテーションを行うことができる。これとTriwaveの前にある四重極MSによるイオンの選択、及び、後に続く分解能4万のTOFによる精密質量測定とを組み合わせることにより、様々な形式の構造解析が可能となる。次にこうしたIMS-MSの機能を生かした応用例について、イオンの分離及び衝突断面積の測定に分けて紹介する。

### 4、イオンの分離

#### 4-1、HDMS<sup>E</sup>

複雑なタンパク質の混合物が試料となるプロテオームのショットガン解析においては、ペプチドを如何に分離し、フラグメントイオンの情報を正確に得るかということが重要であるが、数万以上のペプチドのピークをLCですべて分離することは難しい。ショットガン測定で一般的な測定法であるData Depended/Directed Analysis (DDA)では、イオンの同位体パターンが価数の情報を得るために必要となるので、3Da程度の幅で、MS/MSを記録することが多い。このため、実際の試料ではかなりの数のフラグメントイオンスペクトル中に、複数のプリカー

サイオン由来のイオンが混在している可能性がある。大腸菌のライセイトで検出された3万以上のプレカーサイオンのうちm/zが561-564の範囲に入るイオンを、その溶出時間ごとに30秒単位でまとめたヒストグラムを示した。(図5)

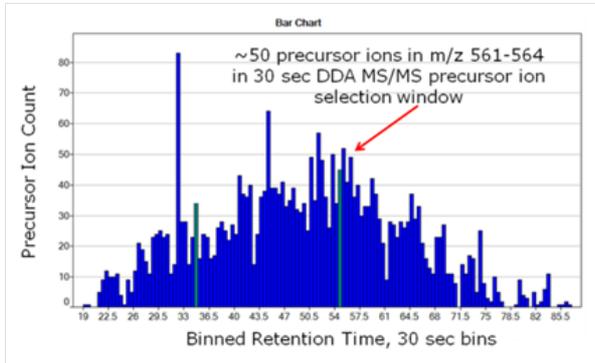


図5 m/z 561-564の範囲に入るプレカーサイオンの溶出時間に対する分布

最もピーク密度が高い時間では50以上の質量が近似したイオンが溶出しており、このような複雑な試料の測定においては、MS/MSだけで特定のイオンに由来するフラグメント情報を得ることは難しい。

弊社では、DDAによるフラグメント情報の網羅性と特異性の限界を克服すると同時に、ラベルフリー定量に活用できる正確なペプチドのピーク面積の測定を可能にするLC/MS<sup>E</sup>法をプロテオーム解析に推奨している。LC/MS<sup>E</sup>法では、四重極でイオンを選択しない代わりに、ペプチドとフラグメントイオンの保持時間を正確に測定し、それを用いてフラグメ

ントイオンのスペクトルを構築する。これにより、ピークの半値幅の1/10以上保持時間が異なるイオンを識別し、特異的なフラグメントの帰属が可能となる。さらに、SYNAPT G2によって向上したIMS分離を活用したHDMS<sup>E</sup>法は、ここにイオンのドリフトタイムによる情報を加えることによって、さらに帰属の特異性を高めることができる。図6に保持時間のみで帰属した場合(a)とドリフトタイムも含めて帰属した場合(b)の再構成されたフラグメントイオンのスペクトルを示した。

ドリフトタイムを帰属の判断に加えることにより、フラグメントイオンの数を254から35まで絞り込むことができた。プレカーサイオンとフラグメントイオンをどちらも精密質量で測定し、さらに保持時間及びドリフトタイムが一致するペプチドとフラグメントイオンをデータから選択することにより、特に共溶出する強度の高いイオンの影響を受ける可能性がある低濃度のペプチドのデータベース検索における特異性が高まり、その結果、同定数と信頼性の両方を向上させることが可能になる。

#### 4-2、MALDIイメージング

質量分析計を用いた組織切片の分子イメージングは、薬物動態研究、メタボローム及びプロテオーム研究において、対象分子の局在化を網羅的に測定できる手法として、近年注目されている新しいアプリケーションである。しかしながら、生体試料中には様々な種類の分子が混在しており、ここでもその複雑さが測定における大きな障害となる。

IMS-MSにより測定されたデータは、従来のm/zに加えて、個々のイオンのドリフトタイムの情報を持っている。得られたデータをm/zとドリフトタイムにより2次元に展開すると、性質の類似するイオンは、一続きのライン(トレンドライン)を形成する

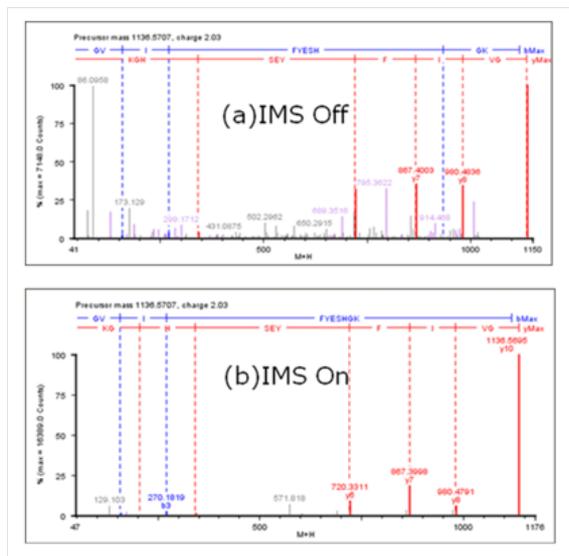
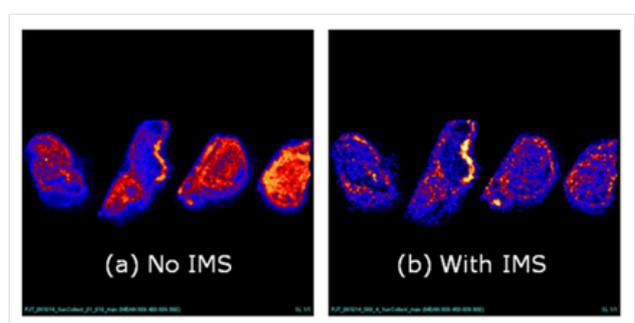


図6 IMSを用いたフラグメントイオンの帰属



ことが知られている(McLean, et al, 2007)。図7に  
図7 マウスの前立腺におけるVinblastineのイオン像

抗がん剤ビンブラスチンのマウス前立腺におけるイオン像を示した。

IMSによる分離を行わない場合(a)は、組織全体に分布している像が得られたが、特定のドリフトタイムのイオンを抽出することにより、周辺部に分布していることが明らかになった。

#### 4-3、位置異性体の分離と構造解析

天然化合物の構造解析において、精密質量測定による組成式の推定は、非常に有効な方法であるが、位置の違いによる複数の異性体が考えられる場合に、その構造まで特定することは困難である。SYNAPT G2のTriwaveは、IMS分離後に、Transfer T-Waveでフラグメンテーションを行うことができる。ここで生じたフラグメントイオンはプレカーサーイオンと同一のドリフトタイムを持つために、別々にフラグメントイオンスペクトルを抽出することができる。これにより位置異性体の分離とフラグメントイオンによる構造解析を効率的に行うことができる(図8)。

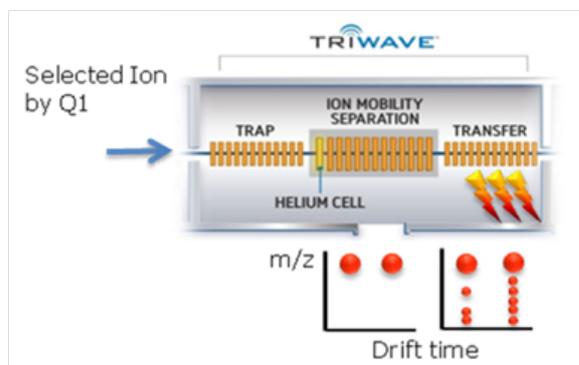


図8 IMS分離とTransfer T-Wave CID

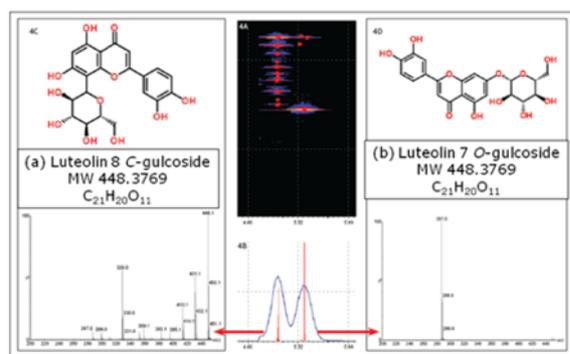


図9 ルテオリン配糖体の位置異性体のIMS分離及びCIDによる構造解析

図9にルテオリンの配糖体の位置異性体を測定した例を示した。ドリフトグラムとそれぞれのフラグメントパターンから、前のピークの配糖体がより小さな衝突断面積を持ち、さらにフラグメンテーションが起きやすいということを読みとることができる。

#### 5、イオンの衝突断面積の測定

化合物の立体構造を解析する方法としては、X線結晶構造解析とNMRが最も一般的な方法であり、正確な原子位置座標を得ることができる。それに対してIMSによって得られる衝突断面積は、間接的な情報であり、PDB形式等の原子座標からのシミュレーション計算により得られる予測値との比較により、初めて構造情報としての意味を持つ。しかしながら、従来の手法よりも低濃度で測定ができ、分子量による制約も少なく、さらには非共有結合による複合体を測定できるなど、多くの利点も存在する。こうした利点に加えて、質量測定と同時に構造情報を得られるという簡便性がIMS-MSによる衝突断面積測定の特徴である。ここでは、低分子とタンパク質複合体の測定例を紹介する。

##### 5-1、抗がん剤の構造解析

ターフェニル骨格を持つ有機ルテニウム錯体の抗がん剤としての活性は構造異性体により異なる(図10) (Williams, et al, 2009)。この3種類の異性体をSYNAPT G2で測定し、衝突断面積を実測した。同時に、最安定構造と衝突断面積のシミュレーション計算を行い実測値との比較を行った(表1、図11)。

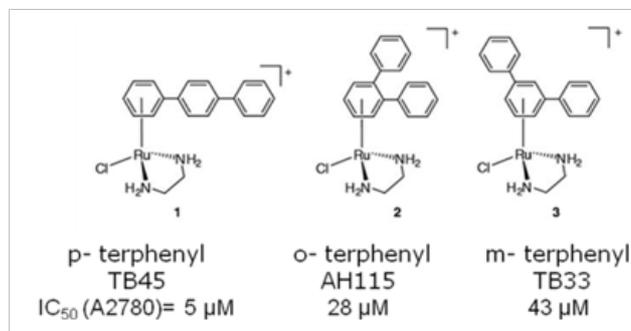


図10 有機ルテニウム錯体の異性体構造式と抗がん活性

衝突断面積の計算は複数の方法で行ったが、いずれの値も実測値の傾向とよく一致していた。また、この傾向は抗がん活性の違いともよく一致していた。さらに、この測定では、HClが脱離したイオンの衝突断面積も実測しており、このイオン種では、o-とm-について若干の分離の向上がみられ、これも計算値はよく一致していた。HClが脱離した錯体は、構造が不安定であり、結晶を得ることが難しいが、このような分子種でも衝突断面積測定により構造情報が得られた。

合体のNMRにより得られた溶液中の立体構造を示した。この原子座標からMOBCAL (Mesleh, et al, 1996) により衝突断面積を計算し、SYNAPTにより測定された実測値と比較した(表2)。

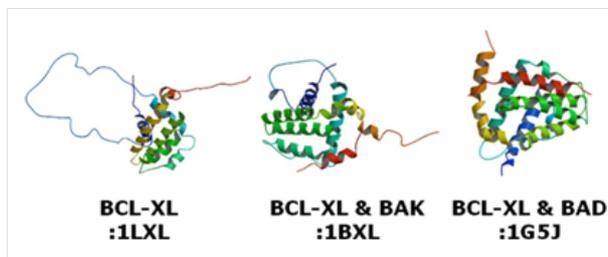


図12 BCL-XL及び基質との複合体の立体構造

Complex	[M] <sup>+</sup> calculated CCS (Å <sup>2</sup> )			
	T-Wave (± 0.5%)	MOBCAL Projection Approx.	MOBCAL Trajectory Method	MOBCAL Exact Hard Sphere
1	120.6	121.5	121.3 (±7.3%)	130.0
2	113.0	112.2	112.9 (±3.5%)	121.8
3	113.6	116.1	117.2 (±4.7%)	125.1
Following loss of HCl [M - HCl] <sup>+</sup>				
1	115.3	119.3	118.1 (±8.2%)	126.7
2	106.6	109.3	108.2 (±3.6%)	117.7
3	110.0	114.3	114.9 (±4.7%)	122.4

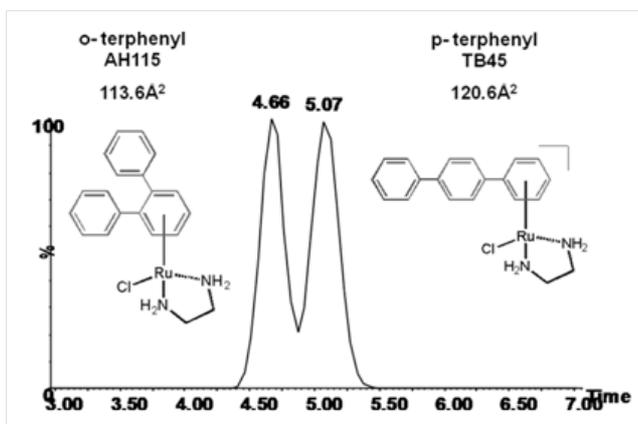


表1 有機ルテニウム錯体の衝突断面積の実測値と計算値

(J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20, 1119–1122)

図11 p-及びo-terphenylのドリフトグラム

## 5-2、タンパク質複合体

技術の進展に伴い、従来結晶化が困難であったようなタンパク質複合体についても、X線結晶構造解析が可能になりつつある。一方で、質量分析計は、タンパク質複合体の正確な質量測定に、幅広く用いられており、結晶化が最も難しい巨大な複合体でも測定が可能である。IMS-MSは、そうした質量分析計の適用範囲の広さを生かし、質量と構造情報を同時に、得ることができる利点がある。

図12に、BCLタンパク質及び2種類の基質との複

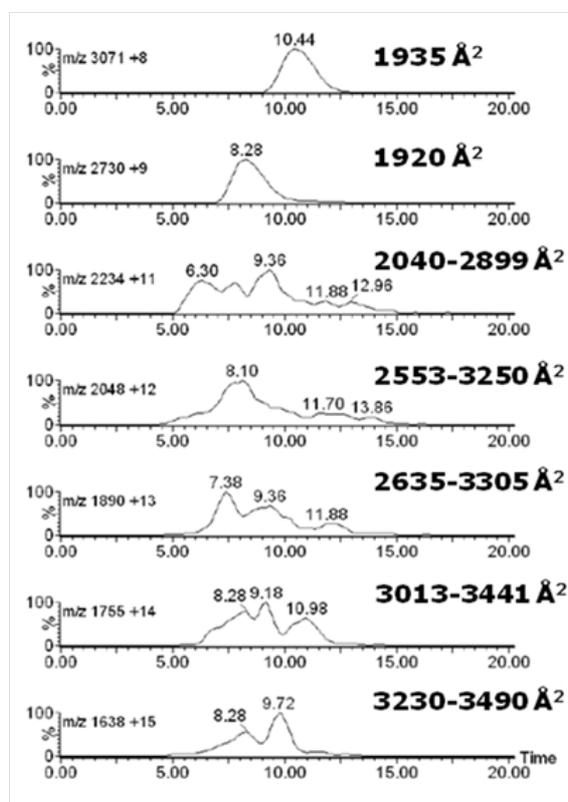


図13 BCL-XLの各価数イオンにおけるドリフトグラムと衝突断面積の実測値

Protein	T-Wave CCS (Å <sup>2</sup> )	PA(Å <sup>2</sup> )	EHSS(Å <sup>2</sup> )
BCL-XL	1995 +/- 22	2549	3180
BCL-XL & BAK	2166 +/- 14	1897	2422
BCL-XL & BAD	2134 +/- 24	1811	2327

表2 BCL-XL及び基質との複合体の衝突断面積の実測値及び計算値

図13にBCL-XLの各価数イオンにおけるドリフトグラムと衝突断面積の実測値を示した。11-15価では、ドリフトグラム上に複数のピークが観測され、複数のコンフォーマーが存在することが示唆された。それに対して8-9価では、単一のピークが観測されており、その衝突断面積はこの2つの価数イオンでよく一致していた。また、複合体のドリフトグラムでは、価数の多いイオンにおける複数のコンフォーマーは観測されなかった。これらの結果から、気相中のBCL-XLは、構造を形成していない状態とフォールディングした状態が混在しており、複合体を形成することによって、フォールディングが安定化していることが示唆された。これは、BCL-XLの溶液中のNMRで複数のコンフォーマーが分離されずに測定されているという結果とも一致していた。また、複合体の衝突断面積を、フォールディングしていると考えられるBCL-XLの8-9価の値と比較すると8%高い値が得られており、これは基質との結合によって、衝突断面積が増加したことを反映している(表2)。

## 6、まとめ

IMS-MSは、イオンの移動度と $m/z$ という種類の異なる特性に応じて、分離を行う技術であり、質量分

析計単独では得られない、精細な分離が可能となる。SYNAPT G2 HDMSは、四重極MSと高分解能TOF-MSの間に高効率のIMSを搭載することにより、原理の異なるイオンの選択と分離を柔軟に組み合わせた測定法を提供できる。さらにTWIMSは、コンベンショナルなDTIMSと同様に衝突断面積を測定できるため、イオンの構造解析に有用な新たな情報を、質量情報と同時に得ることが可能である。このような利点は、生体試料など複雑な混合物中の対象化合物の特異的な検出や、位置異性体の分離、及び低分子から高分子までの幅広い化合物の立体構造解析に大きく寄与すると考えられる。

## 参考文献

- Smith DP, Knapman TW, Campuzano I, Malham RW, Berryman JT, Radford SE, Ashcroft AE., *Eur J Mass Spectrom.* 2009, **15**(2), 113-30.
- McLean JA, Ridenour WB, Caprioli RM., *J Mass Spectrom.*, 2007, **42**(8), 1099-105.
- Williams JP, Bugarcic T, Habtemariam A, Giles K, Campuzano I, Rodger PM, Sadler PJ., *J Am Soc Mass Spectrom* 2009, **20**, 1119-1122
- Mesleh, M. F., Hunter, J. M., Shvartsburg, A. A., Schatz, G. C., Jarrold, M. F., *J. Phys. Chem.* 1996, **100**, 16082-16086.