

MALDI-TOF-TOF タンデム質量分析計

JMS-S3000 SpiralTOF™による

高エネルギー衝突誘起解離(HE-CID)

プロダクトイオンスペクトルの観測

田村 淳（日本電子・MS事業ユニット）

1. はじめに

イオン源としてマトリックス支援レーザー脱離イオン源 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization = MALDIイオン源) を用い、2台の飛行時間型質量分析計 (Time-of-Flight Mass Spectrometer = TOFMS)を直列に接続してタンデム質量分析計 (Tandem Mass Spectrometer = Tandem MS)とした、いわゆるMALDI-TOF-TOFは、二重収束質量分析計 (Double-Focusing Mass Spectrometer = Double-Focusing MS)を2台直列に接続した4-sector tandem MSと並んで、高エネルギー衝突誘起解離 (High-Energy Collision Induced Dissociation = HE-CID)によるプロダクトイオンスペクトルが観測可能な数少ないタンデム質量分析計の一つである。現在市販されているMALDI-TOF-TOFは、例えばある種のペプチドの分析においては、4-sector tandem MSと比べて数百分の一以下の試料量で部分シーケンス情報を得ることを可能にしたが、一方で、HE-CIDを用いなければ構造解析が困難な天然有機化合物などの分析において4-sector tandem MSに匹敵する情報量を得ることは困難であった。これは、現在市販されているMALDI-TOF-TOFの第1MSが、飛行距離1 m未満のリニアTOFMSであることに依ると考えられる。すなわち、

1. 第1MSのプリカーサーイオン選択性が低く、 monoisotopicイオンのみを選択することができないため、得られるプロダクトイオンスペクトルは同位体ピークを含む複雑なものとなる。
2. 第1MS内の飛行時間が短いため、イオン源で生成された準安定(metastable)イオンの相当部

分が第1MSを通過し、その後、単分子分解する。このため、プロダクトイオンスペクトルは、HE-CID由来のプロダクトイオンに加え、準安定イオン分解 (metastable ion decay) に由来する、転位反応を伴ったプロダクトイオンを含む複雑なものとなる。

我々は以前から、独自のらせん軌道型イオン光学系を用いたTOFMS^{1,2,3}の研究開発を進めてきた。この程、第1MSとして飛行距離約17 mのらせん軌道型イオン光学系を採用したMALDI-TOF-TOF、JMS-S3000 SpiralTOF™を開発した。我々はこの装置を用いて天然有機化合物、脂質、ペプチドなどのプロダクトイオンスペクトルを測定し、4-sector tandem MSと事実上同一(virtually identical)と言って良いプロダクトイオンスペクトルが得られることを確認した。

本講演では、まずこの新しいMALDI-TOF-TOFタンデム質量分析計の概要と基本性能を説明し、その後に、この装置で得られたプロダクトイオンスペクトルの特徴について、4-sector tandem MSから得られたものと比較して論じる。

2. JMS-S3000 SpiralTOF™

MALDI-TOF-TOFタンデム質量分析計の概要

2.1. らせん軌道型イオン光学系の設計

TOFMSの質量分解能は、同一の m/z 値をもつイオン群 (イオンパケット) の検出面での飛行時間分布 ΔT (すなわち検出面での飛行方向のイオンパケットの空間的な広がり)、およびその飛行時間分布の

重心値Tを用いて $T/2\Delta T$ で表現することができる。TOFMSは1964年に発明されて以来⁴、Tを大きくすること、 ΔT を小さくすることにより質量分解能の向上が図られてきた。1955年にはイオン源での初期条件の分布を飛行軸方向に収束させる加速方法が開発され、 ΔT を小さくすることが可能となり質量分解能が向上した⁵。また1970年初頭には、その加速方法による収束位置を始点とし、イオンミラー⁶や扇形電場⁷で構成されるイオン光学系を後段に配する方法が発明された。これにより ΔT を増加させることなく、飛行距離すなわち飛行時間Tを増加させることができが可能となり、質量分解能が向上した。現在の市販装置のほとんどはイオンミラーを利用しておる、その飛行距離は1~3 mである（リフレクtron型イオン光学系）。さらなる質量分解能の向上のために、同一軌道を複数回飛行するマルチリフレクティング型（多重反射型）^{8, 9}やマルチターン型（多重周回型）^{10, 11}のイオン光学系も提案され、製作評価されている。マルチリフレクティング型やマルチターン型のイオン光学系は、コンパクトな空間内に理論上無限大の飛行距離を実現できる点で優れている。その反面、同一軌道を複数回飛行させるため、速度の大きいイオン（ m/z 値の小さいイオン）が、速度の小さいイオン（ m/z 値の大きいイオン）を追い越すので、質量範囲が限定されてしまう問題点がある。

我々は、独自にらせん軌道を利用したイオン光学系（らせん軌道型イオン光学系）の開発を行った。このイオン光学系は、マルチリフレクティング型やマルチターン型イオン光学系の「追い越し」の問題を解決でき、かつ現在主流のリフレクtron型イオン光学系に比べて高質量分解能、高質量精度を実現することができる。らせん軌道型イオン光学系を開発するに当たっては、マルチターン型イオン光学系の技術を応用した。特に、大阪大学で発明された“Perfect Focusing”と“マルチターン”¹²の組み合わせは、TOFMSとして世界最高質量分解能を実現しており、らせん軌道イオン光学系への展開には最適と考えた。マルチターン型イオン光学系を、らせん軌道状に展開するためには、イオン軌道を周回軌道面と垂直方向に移動させていく必要がある。我々は、これを実現するために周回軌道面に対して、イオンを数度傾けて入射させる方法をとった。この方法の最大の利点は、各階層にイオン軌道を移動させるための構造物が不要なことである。その反面、斜め入射によるマルチターン型イオン光学系からのず

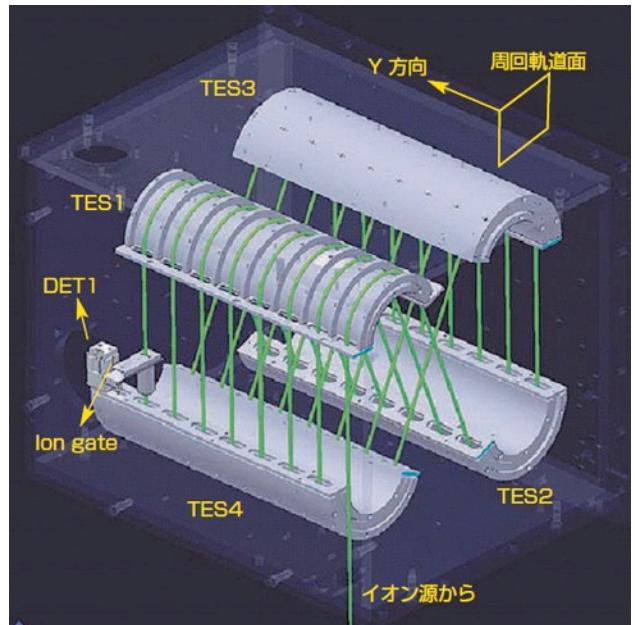


Fig. 1 らせん軌道型イオン光学系

れによる質量分解能の悪化も懸念されるが、進入角度を数度と浅く保つことでその影響を小さくすることができると予想された。

実際には、円筒電場と2枚のマツダプレートを組み合わせたトロイダル電場4つで構成されたMULTUM IIの構造を基本として、らせん軌道型イオン光学系を設計した。イオン光学系の概略図をFig. 1に示す。らせん軌道への展開は、円筒電場中に（周回数+1）枚のマツダプレートを組み込み、トロイダル電場を階層状にした構造物（階層状トロイダル電場: Toroidal Electric Sector = TES）を利用することで実現した。各TESは、内側電極と外側電極の間隔 L_x に、等しい空間 L_y を設けて並べられた（周回数+1）枚のマツダプレートで構成されている。TES1~4への印加電圧は、内側電極電圧、外側電極電圧、マツダプレート電圧の3種類であり、それぞれTES1~4の全てのマツダプレート、TES1~4の各内側電極および各外側電極に供給されている。

4つのTESを周回軌道面からみればMULTUM IIと同じになるように配置した。Y方向は周回軌道面に對して垂直方向な方向、すなわち1周回ごとにイオン軌道が移動していく方向であり、後述のMALDI-TOF-TOFの開発では水平方向に設定した。Fig. 1のTES1は外側電極を外した状態を示しており、マツダプレートが等間隔に並んでいる様子がわかる。イオンは L_x と L_y とで形成される空間の中心を飛行する。同階層のTES1~4を順次通過し、TES4通過

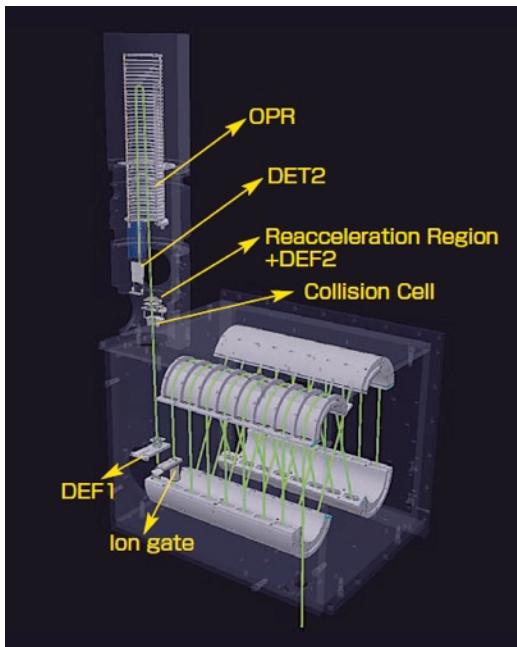


Fig. 2 らせん軌道型イオン光学系を利用したMALDI-TOF-TOF

後、TES1の次階層へ入射する。それを周回数分繰り返すことで、らせん状のイオン軌道を描き検出器(DET1)に到達する(Fig. 1中、緑線がイオン軌道)。マツダプレートの厚さをLm、周回軌道長をLcとすると、同一階層トロイダル電場の階層間の中心軌道距離(すなわち1周回ごとにY方向にずれる距離)は、Ly + Lmであり、階層状トロイダル電場への入射角 θ は、1周回の軌道長Lcを用いて、

$$\tan \theta = (Ly + Lm) / Lc \dots \dots (1)$$

とあらわすことができる。以上のように、イオン光学系は同一の4つのTES1~4で構成することにより、複雑なイオン軌道を、シンプルな構造物で実現している。

2.2.らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF-TOFの製作

我々は、第1TOFMSにらせん軌道型イオン光学系と第2TOFMSにリフレクトロン型イオン光学系を直列に配置し、MALDIイオン源と接続したMALDI-TOF-TOFを開発した。以下では、第1TOFMSでのマススペクトル測定をスパイラルモード、第2TOFMSでのプロダクトイオンスペクトル測定をTOF-TOFモードと呼ぶ。

装置の概略図をFig. 2に示す(ただしイオン源と第1TOFMS用検出器DET1は省略されている)。らせん軌道は、1周回2.093mの8周回に設定した。同

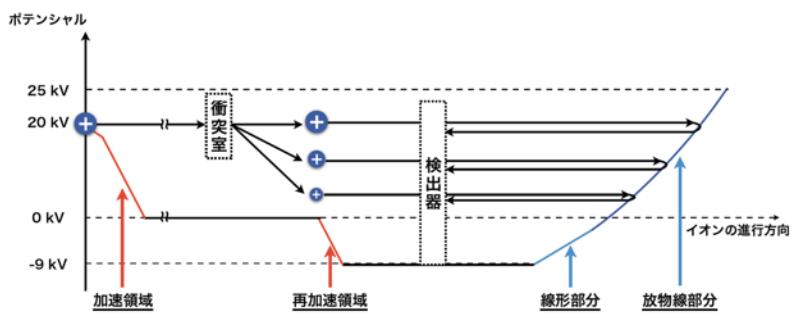


Fig. 3 OPRと再加速機構を組み合わせた第2TOFMSの電位配置

一TESの隣り合う階層の中心軌道間の距離は、58mmであるので、式(1)からTESへの入射角度は1.6度となる。Y方向は水平方向に設定しており、イオン源からの引き出し方向を水平より1.6度傾けることで入射角度を実現している。

スパイラルモードでは、イオンはらせん軌道を描き、スパイラルモード用検出器(Fig. 2に記載はないが、Fig. 1のDET1と同じ位置にある)で検出される。7周回目にはイオンゲートが配置され、データ取得範囲外のマトリックスに由来する高強度のイオンを排除することができる。

TOF-TOFモードでは、このイオンゲートによる選択幅を小さくし、プリカーサーイオンのモノアイソトピックイオンを選択する。また、コリジョンセルへプリカーサーイオンが導入されるように、スパイラルモード用検出器を機械的に軌道外に外すことができる。コリジョンセルに入射したイオンは、およそ20 keVの運動エネルギーでコリジョンセル中の希ガスと衝突、解離し、フラグメントイオンを生成する。プリカーサーイオンおよびフラグメントイオンは、オフセットパラボリックリフレクトロン(OPR)¹³と再加速機構を組み合わせたリフレクトロン型イオン光学系にて質量分離される。OPRは、直線電場と放物線電場をつなげたリフレクトロンであり、 m/z 値の小さなフラグメントイオンからプリカーサーイオンまでを同時に質量分離可能である。また、イオンの透過率を向上させるため、コリジョンセル前後に配置した2つのデフレクタDEF1とDEF2によりイオン軌道の微調整が可能である。Fig. 3に第2TOFMSの電位配置を示す。

2.3.らせん軌道イオン光学系を利用したMALDI-TOF-TOFの基本性能

Fig. 4にスパイラルモードで測定した6種類の標準

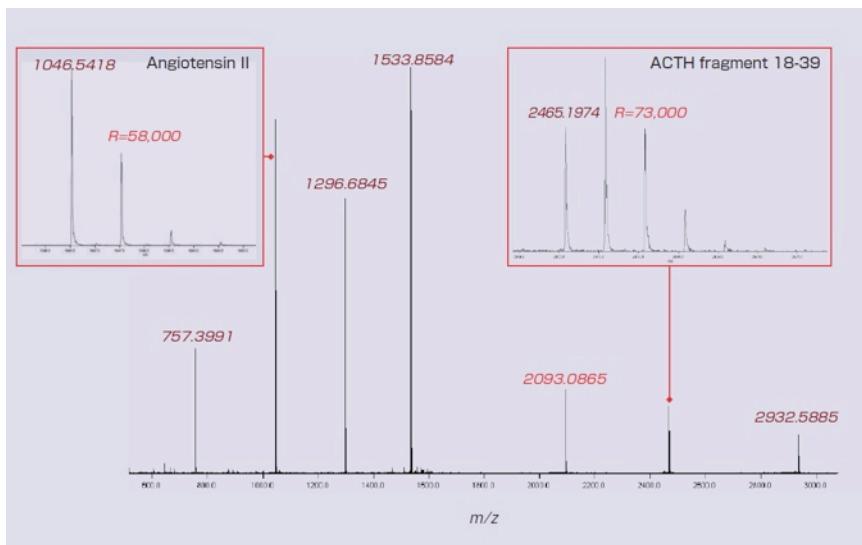


Fig. 4 標準ペプチド混合物のマススペクトル

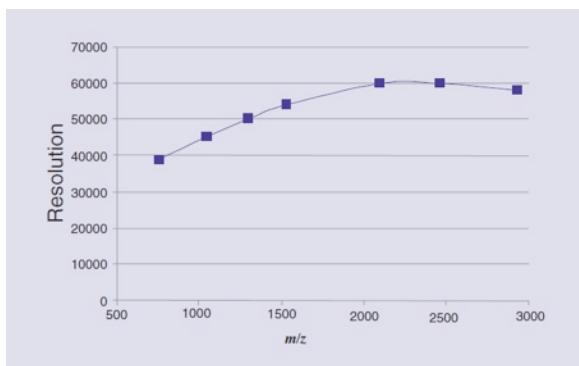


Fig. 5 m/z 値と質量分解能の相関

ペプチド混合物（分子量が小さいほうから Bradykinin fragment 1-7、Angiotensin II、Angiotensin I、P14R、ACTH fragment 1-17、ACTH fragment 18-39）のマススペクトルを示す。AngiotensinIIおよびACTH fragment 1-17については、拡大図も示した。それぞれの質量分解能は、58,000 (FWHM) と 73,000 (FWHM) である。また、ACTH fragment 1-17以外の5つのペプチドで内部キャリブレーションを行った場合の、ACTH fragment 1-17の質量誤差は0.16 ppmである。以上から、らせん軌道型イオン光学系の飛行距離17mは、従来のリフレクタロン型イオン光学系のそれよりも5倍以上長く、質量分解能・質量精度を向上させることができることが分かった。

Fig. 5には、ACTH fragment 1-17で質量分解能を調整した場合の、 m/z 値と質量分解能の関係を示した。Fig. 5から幅広い m/z 領域で同時に高質量分解能を達成できることがわかる。これは高質量分解能が局所的にしか達成できなかつた従来のリフレクタロン型イオン光学系を利用したMALDI-TOFMS

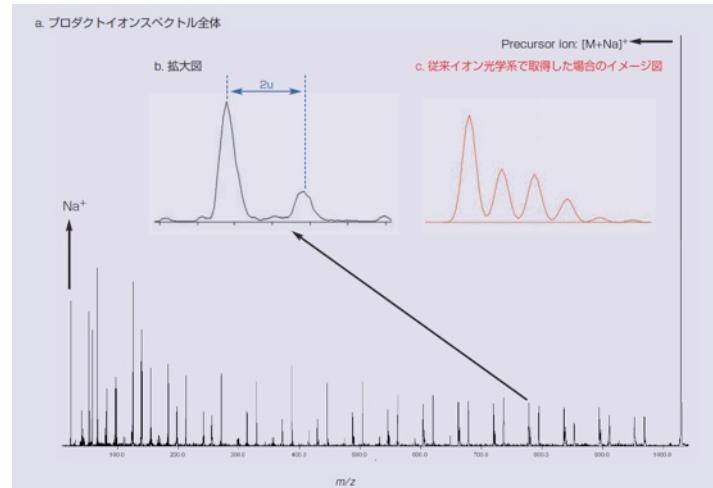


Fig. 6 Poly(oxypropylene)のプロダクトイオンスペクトル

の課題を解決するものである。

Fig. 6aにTOF-TOFモードで測定したpoly(oxypropylene)のプロダクトイオンスペクトルの全体図を示す。選択したプリカーサーイオンは、 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ シリーズ中の m/z 1027のモノアイソトピックイオンである。Fig. 6aからプロダクトイオンとしてのナトリウムイオンからプリカーサーイオンイオンまで、多くの開裂情報が得られていることが分かる。さらに m/z 780付近を拡大したFig. 6bを示す。本装置では、プリカーサーイオンのモノアイソトピックイオンを選択が可能なため、プロダクトイオンも同位体ピークを含まない形で観測できる。つまり、Fig. 6bの2本のピークは異なる開裂経路を示したものであり、 $2u$ 異なる開裂経路も明確に分離することができる。Fig. 6cに、従来TOF-TOFで測定した場合に、観測されるFig. 6bの m/z 領域のイメージ図

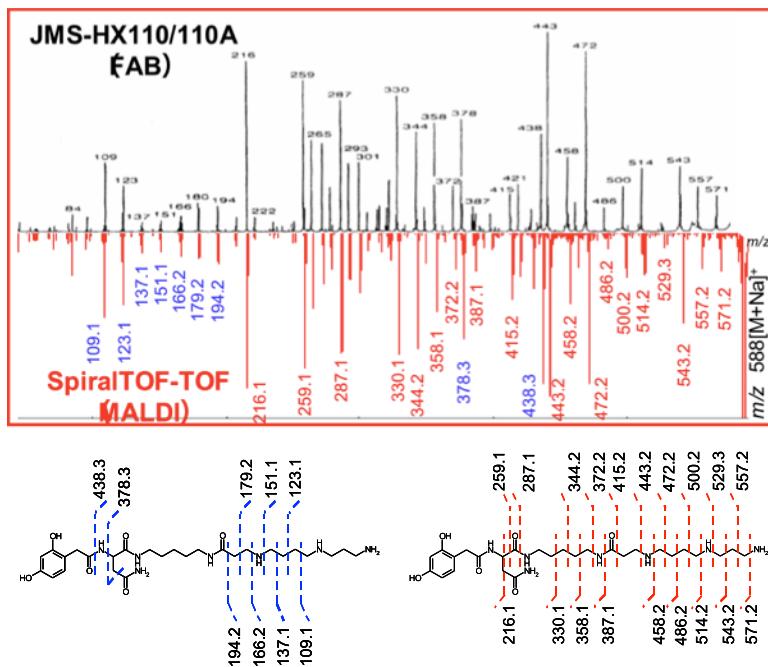


Fig. 7 JSTX-3の構造と、ナトリウム付加分子[M+Na]⁺のモノアイソトピックイオンをプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンスペクトル

を示した。従来のTOF-TOFの選択能では、プリカーサーイオンの同位体ピークも含まれた形で、フラグメントイオンを生成するため、プロダクトイオンスペクトルの各開裂経路についても同位体ピークが観測される。その結果、2u程度しか離れていない場合、各開裂経路の同位体ピークが重なってしまうため、明確に分離することは難しい。以上の結果から、本装置のらせん軌道イオン光学系由来の高いプリカーサーイオン選択能を活かすことで、対象となる化合物の分析が容易となることが分かる。

3. JMS-S3000 SpiralTOFTM MALDI-TOF-TOFタンデム質量分析計で得られるプロダクトイオンスペクトル

はじめに述べた通り、MALDI-TOF-TOFはHE-CIDによるプロダクトイオンスペクトルを得ることができると言われているものの、今までに市販されてきた装置の間では、装置の種類によって得られるスペクトルが異なり、また過去にHE-CIDプロダクトイオンスペクトルの基準と考えられていた4-sector tandem MSのそれとも異なることが指摘されている¹⁴。そこで、ここでは幾つかの化合物に関して、JMS-S3000 SpiralTOFTM MALDI-TOF-TOFタンデム質量分析計で得られたプロダクトイオンスペクトルの特長を示し、また可能な範囲で過去に4-sector tandem MSで得られたプロダクトイオンスペクトルとの比較を試みる。

3.1. 天然有機化合物

天然有機化合物の構造決定は、一つの分析手法のみでは全く不可能であり、多次元NMR、タンデム質量分析、円偏光二色性分光などの技法を駆使して行われることが一般的である。NMRでは難しい、長いアルキル鎖中に含まれる不飽和結合の位置決定や、繰り返し構造の多いポリエーテル化合物の構造決定には、HE-CIDで特徴的に起こるチャージリモートフラグメンテーション^{15, 16} (Charge-remote Fragmentation; CRF)が有効であることが知られており、高品質なHE-CIDプロダクトイオンスペクトルを与える弊社製4-sector tandem MSが、これらの天然有機化合物の構造決定に使用してきた実績がある^{17, 18, 19}。そこで、弊社製4-sector tandem MS、JMS-HX110/HX110を用いて構造決定された2つの天然有機化合物に関して、そのプロダクトイオンスペクトルをJMS-S3000 MALDI-TOF-TOFと比較した。

ジョロウグモ(Nephila clavata)の毒腺に含まれるアシルポリアミンJoro Spider Toxin (JSTX)シリーズの1成分であるJSTX-3のプロダクトイオンスペクトルと、構造に対する各イオンの帰属をFig. 7に示す。上向きのスペクトルが、JMS-HX110/HX110 4-sector tandem MS (ADS11ズーム付きアレイディテクタ装着、FABイオン化法)で得られたもの、下向きのスペクトルがJMS-S3000 MALDI-

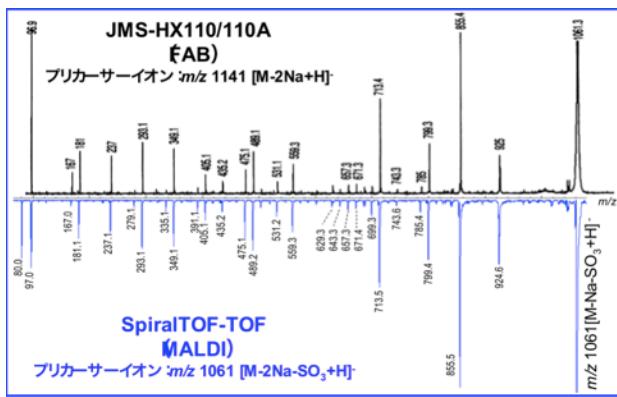


Fig. 8 Yessotoxinのプロダクトイオンスペクトル

TOF-TOFで得られたもので、スペクトルのパターンを含めて情報量的には全く同一と言つても過言ではない。プリカーサーイオンは何れの場合もナトリウム付加分子 $[M+Na]^+$ で、第1MSでモノアイソトピックイオンのみを選択した。

Fig. 8には、下痢性貝毒の一種であるYessotoxin (YTX)のプロダクトイオンスペクトルを示す。Fig. 7と同じく、上向きのスペクトルが³、JMS-HX110/HX110 4-sector tandem MS (ADS11ズーム付きアレイディテクタ装着、FABイオン化法) で得られたもの、下向きのスペクトルがJMS-S3000 MALDI-TOF-TOFで得られたものである。YTXは 1) 梯子状のポリエーテル、2) 末端が硫酸エステル、という構造的特徴を持つ。負イオンモードで測定することにより、末端の硫酸エステルの負電荷がチャージサイトとなって典型的なCRFを示すスペクトルが得られている。

3.2. 脂質

HE-CIDによるCRFは、脂肪酸の炭素鎖中の2重結合の位置を決定する有効な手法であることが知られている^{15, 16}。ここでは、その可能性を確認するため、最も単純なトリアルギリセロールであるトリ

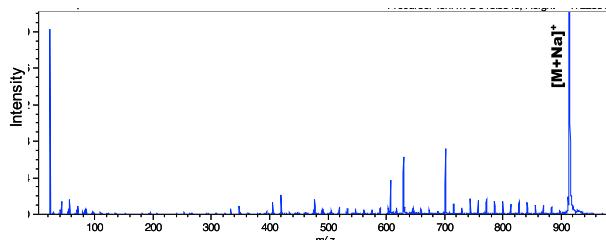


Fig. 9 トリステアリンのナトリウム付加分子からのプロダクトイオンスペクトル

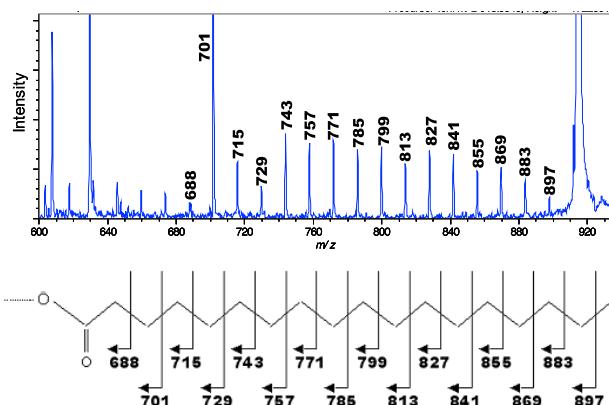


Fig. 10 トリステアリンのナトリウム付加分子のプロダクトイオンスペクトル (m/z 650～920 の拡大) と、ピークの帰属

ステアリンをモデル化合物として、脂肪酸炭素鎖が開裂したフラグメントイオンが観測されることを確認した。(Fig. 9, 10)

3.3. ペプチド

HE-CIDによってロイシン(Leu)とイソロイシン(Ile)の区別が可能であること²⁰は良く知られている事実である。LeuとIleの区別の重要性は、全ゲノムが解読され、タンパク質データベースが良く整備されている生物種の研究においては、極めて低くなってしまったが、タンパク質データベースが整備されていない生物種の研究においては今でも重要な課題である。LeuとIleを共に含むモデルペプチドとしてrenin substrate tetradecapeptideのプロダクトイオンスペクトルを測定し、4-sector tandem MSで測定したものと比較した(Fig. 11)。LeuとIleの区別に必要な、da, dbイオンが明確に観測されており、4-sector tandem MSから得られたプロダクトイオンスペクトルとの一致度も極めて高いことがわかる。

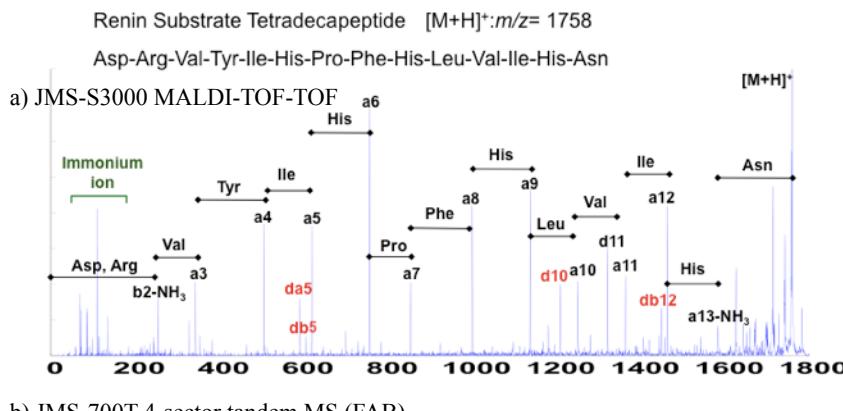


Fig. 11 Renin substrate tetradecapeptideのプロダクトイオンスペクトル

はじめに述べた通り、本MALDI-TOF-TOFでは第IMSを通過するのにかかる時間が相対的に長いことで、metastable decayに由来するプロダクトイオンは非常に観測されにくくなっているが、特異なアミノ酸配列を持ったペプチドにおいては、本MALDI-TOF-TOFにおいてもある程度の量のmetastable decay ionが観測され、極めてゆっくりとしたmetastable decayが起こっていることを示唆する興味深いデータを得た。これについては講演時にデータを示すので、議論をお願いしたい。

4. 謝辞

海産ポリエーテルYessotoxin (YTX)を快くご提供下さいました、大阪大学大学院理学研究科の村田道雄教授に心より感謝申し上げます。

参考文献

- T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, Y. Kammei, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1969 (2005).
- T. Satoh, H. Tsuno, M. Iwanaga, and Y. Kammei, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **54**, 11 (2006).
- T. Satoh, T. Sato, and J. Tamura, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1318 (2007).
- W. E. Stephens. *Phys. Rev.*, **69**, 691 (1946).
- W. C. Wiley and I. H. McLaren, *Rev. Sci. Instrum.*, **26**, 1150 (1955).
- B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk and V. A. Zagulin, *So. Phys. JETP*, **3745** (1973).
- W. P. Poschenrieder, *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Phys.*, **6**, 357 (1972).
- H. Wollnik and A. Casares, *Int. J. Mass Spectrometry*, **227**, 217 (2003).
- M. Yavor, A. Verentchikov, J. Hasin, B. Kozlov, M. Gavrik and A. Trufanov, *Physics Procedia* **1** 391 (2008)
- M. Toyoda, M. Ishihara, S. Yamaguchi, H. Ito, T. Matsuo, R. Reinhard and H. Rosenbauer, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 163 (2000).
- D. Okumura, M. Toyoda, M. Ishihara and I. Katakuse, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 349 (2003).
- M. Ishihara, M. Toyoda and T. Matsuo, *Int. J. Mass Spectrom.*, **197**, 179 (2000).
- E. N. Nikolaev, A. Somogyi, D. L. Smith, C. Gu, V. H. Wysocki, C. D. Martin and G. L. Samuelson, *Int. J. Mass Spectrom.*, **212**, 535 (2001).
- E. Pittenauer, Allmaier, G., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2009, **12**, 137-155
- J. Adams, *Mass Spectrometry Rev.*, **9**, 141 (1990).
- C. Cheng, M. L. Gross, *Mass Spectrometry Rev.*, **19**, 398 (2000).
- H. Naoki, M. Murata, T. Yasumoto, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 179(1993)
- M. Murata, H. Naoki, S. Matsunaga, M. Satake and T. Yasumoto, *J. Am. Che. Soc.*, **116**, 7098-7107 (1994)
- M. Satake, Y. Tanaka, Y. Ishikura, Y. Oshima, H. Naoki and T. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.*, **46**, 3537-3540 (2005)
- R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults J. T. Watson, *Anal. Chem.*, **59**, 2621-2625 (1987).