

自由電子レーザーを用いた
レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

内藤 康秀, 粟津 邦男

大阪大学大学院 工学研究科自由電子レーザー研究施設光量子プロセス工学講座
(〒573-0128 大阪府枚方市津田山手2-9-5)Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
Using a Free-Electron Laser

Yasuhide NAITO and Kunio AWAZU

Department of Photon Processing Engineering, Institute of Free Electron Laser,
Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128

(Received December 9, 2002)

This commentary article provides short accounts of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and time of flight mass spectrometry (TOFMS), particularly perspective views of MALDI using an infrared light source (IR-MALDI), and MALDI in conjunction with a tunable infrared free-electron laser (FEL-MALDI) as a state-of-the-art IR-MALDI methodology. The benefits and precautions to use FEL in MALDI are discussed. A novel approach to address the low-sensitivity issue of FEL-MALDI, simultaneous exposure to UV and FEL, is proposed. In the proposed method, each laser can be adjusted to minimize the excess energy under the conditions of rapid heating, which allows analyte molecules to be desorbed and ionized. The current status of the development and preliminary data are reported.

Key Words: Free-electron laser (FEL), Laser desorption/ionization, Time of flight mass spectrometry (TOFMS)

1. 緒言

ライフサイエンス研究の領域では、遺伝子の全塩基配列解析(ゲノミクス)の先にあるテーマとして、プロテオミクスやメタボロミクスの名称で概念化された発現系や代謝系の大規模解析が隆盛を迎えつつある。解析の対象となる分子種は極めて多種多様であり、分析手段として質量分析法が欠かせない存在になっている。その基盤となる技術は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)¹⁾に代表されるソフトイオン化法である。これにより、凝縮状態にある巨大生体分子でも破壊することなく気化し、高精度で分子量測定できるようになった。

現在、質量分析法のルーチン分析における質量上限は10 kDa*を優に超えており、一部の蛋白質については分子全体を測定対象とすることも可能である。しかし、実際の蛋白質大規模解析においては、アミノ酸配列特異的に作用する酵素で蛋白質を分解し、蛋白質酵素消化物の質量および部分配列情報を質量分析法で取得し、データ

ベース検索により元の蛋白質を同定する手法(ペプチドフィンガープリント法、ペプチドシークエンスタグ法)が主流である²⁾。これらは特に、蛋白質混合物をゲル電気泳動で分離したのち、個々の蛋白質スポットを解析する際には、ゲルに埋め込まれた蛋白質を同定できる重要な手法となっている(インゲル消化法)。電気泳動や酵素消化の作業は極めて煩雑で熟練を必要とする。このため、一連の工程をロボットにより自動化した装置も開発されているが、解析成功率の点で熟練した手作業を超える装置の実現は難しく、処理速度の向上には容易に結びつかないのが現状である。上記の手法は、酵素消化物(ペプチド断片)から蛋白質全体の情報を再構築する、ボトムアップのアプローチといえる。その対極として、まず蛋白質分子全体の情報(精密分子量)を取得し、その分子量に基づいて精密に分離した蛋白質分子を細かく分解し、破片イオンの質量から蛋白質の一次構造や翻訳後修飾など、詳細な蛋白質分子情報を取得するアプローチも提案されている(トップダウンプロテオミクス)³⁾。これは質量分析法の高

* Daは原子質量単位ダルトン(Dalton)のこと。1個の¹²C原子の質量の1/12を1 Daと定義し、1.6605 × 10⁻²⁷kgに等しい。1 kDaは1,000 Daである。

度な利用法であり、酵素消化の工程を省いて解析処理の高速化を実現する手法として期待されている。

ソフトイオン化法の登場とそれに続く質量分析法の急速な技術革新は、遺伝子産物の網羅的解析という壮大な構想を現実のプロジェクトに変えた。しかし、遺伝子産物を完全に網羅するには分析能力の向上が必須であり、最も根本的な取組みとしてソフトイオン化法のさらなる改良が追求されている。その課題は(1)高感度化、(2)質量上限の拡大、の2点に集約される。また、蛋白質複合体の分析を可能にするような「超ソフトイオン化法」の実現も望まれている。これにより、プロテオミクスにおける質量分析法の役割は、単に蛋白質同定や構造解析に留まらず、蛋白質の相互作用解析に際して汎用性の高い分析手段を提供し、「機能プロテオミクス」と呼べる新たな学問領域の可能性をもたらすであろう。

当研究施設では、赤外域で波長可変性を持つ自由電子レーザー(FEL)を光源としたMALDI法の開発により、従来のMALDI法を超える高質量域、イオン化の選択性、高感度の実現を目指している。この解説では、MALDI法と飛行時間型質量分析(TOFMS)について概説し、我々が進めているFEL-MALDI-TOFMS開発の現状を報告する。

2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)

MALDIでは、試料分子を拡散させたマトリックス化合物にパルスレーザーを照射して、マトリックス分子とともに試料分子を気化、イオン化させる。マトリックスは、(1)レーザーのもたらす過剰なエネルギーを吸収、緩和する緩衝材、(2)プロトン授受により試料分子に電荷を与える、化学イオン化の反応試薬、(3)試料分子同士を引き離し、凝集力を弱める保持材、の役割を担っており、それら全てが生体高分子をイオン化するための要件である。この他に、吸収波長特性、乾燥時の結晶状態、適用可能な溶媒、純度などの性質が重視され、レーザーの波長や試料の種類に応じて様々な化合物が利用されている。マトリックス結晶の形態変化の速度と度合いは、内部応力の大きさを左右し、混合相の密度や緩和過程、生成イオンの速度分布や内部励起状態などに影響する。マトリックスの性質はまた、イオン抽出電場などの装置パラメータの選定においても重要である。N₂レーザー(337 nm)用のマトリックスとしてはかなりの数のものが知られているが、代表的な化合物として、2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)、*o*-cyano-4-hydroxycinnamic acid(CHCA)、3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid(sinapinic acid)が挙げられる。

MALDIのイオン化機構では、まず、レーザー光がマトリックス分子に吸収されて電子励起状態が形成される。このときマトリックスはエネルギー緩衝材として作用する。電子状態が振動励起状態に緩和する過程で、照射部分のマトリックス結晶表面は急速加熱され、気化が起こる。マトリックス中に拡散して分子間相互作用を弱められた試料分子も、熱分解することなく同時に気化する。

また、電子励起状態の緩和はピコ秒のスケールで進行するので、レーザー照射時の温度上昇速度はレーザーのパルス幅に依存する。MALDIに適した急速加熱条件を充たすパルス幅は、一般に0.1ナノ～数百ナノ秒程度と考えられる。

気化によって高圧の非平衡混合相が形成される。この後に続く過程は、マトリックスや試料の性質、イオン源の構成などにより多少異なるが、一般的には、照射部分の内部応力上昇にともない混合相の噴出(plume)が発生し、この中でプロトン授受などの化学イオン化反応、再結合反応、クラスター分解、衝突緩和、拡散などが同時に進行すると考えられている。この過程は極めて複雑で未解明の問題も多く残っているが、イオン信号量にも影響する重要な過程である。MALDIは、凝縮相で既に電荷を獲得している試料分子を気相中に脱離させる技法であるとともに、気相に引き出した中性の試料分子に電荷を付与する側面も有する。前者として検出されるイオンは主にアルカリイオン付加分子で、このため積極的にアルカリハライドを添加してイオン信号量を増加させる測定も行われている。

赤外光源を用いたMALDI(IR-MALDI)は、MALDI開発の当初より試みられており、Er-YAGレーザー⁴⁾やCO₂レーザー⁵⁾などが用いられ、IR用マトリックスもsuccinic acidなどいくつか提案されている。IR-MALDIは分子振動によって吸収される波長帯を用いることから、UV-MALDIよりもソフトなイオン化法として期待される。すなわち、振動状態を直接励起することにより、エネルギー過剰を抑えた急速加熱を目指している。実際に、IR-MALDIでは二本鎖DNAなどの高質量のイオンが検出されている⁶⁾。しかしこれまでの研究で、IR-MALDI質量分析の感度はUV-MALDIよりも劣ることが分かっている。UVとIRの吸光度の違いから、UV-MALDIではレーザー光がマトリックス結晶の表面付近で吸収されて深部まで届かないのに対し、IR-MALDIではマトリックス結晶の深部までレーザー光が到達し、より大きな体積が一度に気化するため試料の消耗が激しく、信号積算を繰り返して感度を改善することが困難なためである。

3. 飛行時間型質量分析(TOFMS)

TOFMSは、電場で加速されたイオンが一定距離を慣性運動する時間の差を利用した質量分析法である⁷⁾。加速領域を一齐に飛び出したイオンの一群は、場の存在しない領域(field free region)である飛行管内を慣性運動する間に質量分離され、飛行管の終端に配置した検出器に到達する。その結果、イオンの質量電荷比ごとに異なる時刻にイオン信号が検出される。このイオン信号量を時系列的に計測することにより質量(電荷比)スペクトルが得られる。飛行管に入射するイオンはパルス化されている必要があるため、イオンをパルス状に生成するMALDIはTOFMSのイオン源として最適である。また、MALDIによって生成されるイオンは通常1～数価であり、高分子量の試料では質量電荷比が大きくなるので、質量上限が理

論上存在しないTOFMSはMALDI生成イオンの分析に最適である。

今日のTOFMS装置は、飛行管の終端にイオンミラーを設け、飛行管の始端に検出器を配置して飛行管内でイオンを往復させて検出するリフレクトロンモード⁸⁾や、加速領域における遅延引き出し機構(delayed extraction)^{9,10)}を備えており、また検出器やA/D変換器などの信号処理系の進歩もあって、生体分子のような高質量域の質量分析にも十分適用できる高い質量精度と分解能を有するに至った。また、MALDI-TOFMSは極めて高い感度を原理上約束されている。TOFMS装置はイオンを直線的に飛行させる極めて単純な構成であるため、他の多くの質量分析装置のように質量分離器の透過特性によるイオン損失が問題になることはない。また、“イオンを捨てながら”質量範囲を掃引しなければならないマスフィルタ型の質量分析と違い、MALDI-TOFMSは生成イオンを100%の効率で利用できる。したがって、特に高感度が要求される生体分子の質量分析では、MALDI-TOFMSは最も有用な分析手段になっている。

4. 自由電子レーザー(FEL)を用いたMALDI

FELは、マイクロバンチ化された高速電子線が真空中で規則的に蛇行する際のコヒーレント放射光を利用したレーザーで、発振波長を連続的かつ任意に選択できるうえ、生体分子に数多く見られる中赤外域の固有吸収波長に対応するレーザー光源として希少である¹¹⁾。FELは高出力のパルスレーザーであるが、階層化した特殊なパルス時間構造を有する。巨視的には、FELはマイクロ秒オーダーの時間幅をもつパルス(マクロパルス)の繰り返しであるが、一つのマクロパルスはさらにピコ秒オーダーのパルス(マイクロパルス)が等間隔に連なるパルストレインで構成される。したがってFELのパルス特性を考える場合には、マクロパルスのパルス幅、周期、平均パワーの他に、マイクロパルスのパルス幅、周期、パルスあたりのエネルギーも要素になる。当施設で供用されているFELは、平均パワーが典型値で20 mW、マクロパルス幅15 μ s、マクロパルス周期50 ms、マイクロパルス幅5 ps、マイクロパルス周期45 ns、マイクロパルスあたりのエネルギーは10 μ J程度である。

IR-MALDIの光源としてFELを用いる場合、その波長可変性は極めて魅力的である。波長可変のIRレーザー光源には、FEL以外にも光パラメトリック発振(OPO)レーザーが良く知られている。OPOレーザーはナノ秒オーダーのパルス幅を有し、アイドラー光を用いると4 μ m程度までの波長域を出力できる。IR-MALDIの光源としても用いられているが、成功例はEr-YAGレーザーと同じ3 μ m付近に限定され、波長を変えて測定した例はほとんどない¹²⁾。この波長域ではO-H伸縮の吸収が強く、波長による選択性は得られない。対照的にFELは4~20 μ mを出力するが、この波長域では基質による赤外吸収特性の差異が著しく、レーザー波長に依存した選択的イオン化の可能性が強く示唆される。例えば蛋白質では、5.7 μ mと6.1 μ mにアミド

結合の伸縮運動による吸収があり、IR-MALDIに利用することで蛋白質の高感度検出や構造解析への展望が開ける。

しかしMALDI用レーザー光源には波長だけでなくパルス幅についての要請もあるので、FELの特殊なパルス時間構造は検討を要する。マクロパルスについて言えば、MALDIでは200 nsを超えるレーザーパルス幅は不適とされているのに対し、マクロパルス幅15 μ sは明らかに長すぎる。一方、マイクロパルスのパルス強度は2 MWに達するので、イオン化が個々のマイクロパルスによって引き起こされる可能性は十分考えられる。しかしピコ秒レーザーによるMALDIでさえ、これまでほとんど検討されていない。また、遅延引き出し法におけるイオン引出し電圧パルスの遅延時間がおおよそ100 nsであることを考慮すると、ブルーム内での緩和過程などを含めたMALDIの全過程が完結する時間長に比べてマイクロパルス間隔45 nsは短く、個々のマイクロパルスは独立しているとして扱えない。

これまでFELを用いたレーザー脱離イオン化実験はVanderbilt大学のグループにより試みられており、ゲル電気泳動で用いられるポリアクリルアミドゲル中のペプチドを、FEL(5.5~6.3 μ m)によりイオン化してTOFMSにより分析した例が示されている¹³⁾。この場合のイオン化プロセスは、レーザー脱離イオン化、あるいはポリアクリルアミドをマトリックスにしたMALDIと考えられる。将来的に、電気泳動後の蛋白質スポットをFELビームで走査して直接に質量分析するような応用が期待される。しかし測定感度の点において従来のIR-MALDIと同様の問題を抱えており、UV-MALDIを超えるスペクトル品位は得られていない。照射に用いられたFELはマイクロパルス幅1 ps、マイクロパルス周期350 ps、マイクロパルス強度 6.3×10^9 W/cm²であり、ポッケルセルを用いてパルス幅5 μ sのマクロパルスから100 ns幅のマイクロパルストレインが切り出されている。我々が用いているFELとはパルス時間構造の詳細が異なり、イオン化プロセスにおける我々のFELの優位性も見出されている¹⁴⁾。

固定波長でのIR-MALDIおよびFELを用いるIR-MALDIの課題を克服するため、我々はFELとUVレーザーを同時に照射するMALDI法(FEL/UV-MALDI)の開発を目指している。その原理をFig. 1に示した。UV、FELともに単体ではMALDIにおける急速加熱条件に満たない強度に調整し、それぞれが電子励起と振動励起の役割を担う。MALDIの初段階である急速加熱を緻密に制御することが狙いである。これにより、過剰エネルギーを極限に抑えたイオン生成条件を達成するとともに、FELの波長制御により選択的振動励起を行い、基質選択的なイオン化を実現する。

この原理に基づくと、UVレーザーが作用するマトリックス結晶表面の領域のみ気化し、試料の急激な消耗は免れる。また、気相における化学イオン化に寄与する電子励起した分子種や電離種も大量に発生し、イオン化効率の向上が見込まれる。さらに、急速加熱条件下で過剰エネルギーを十分に抑制できれば、UV-MALDIやIR-MALDI

5. FEL/UV同時照射実験

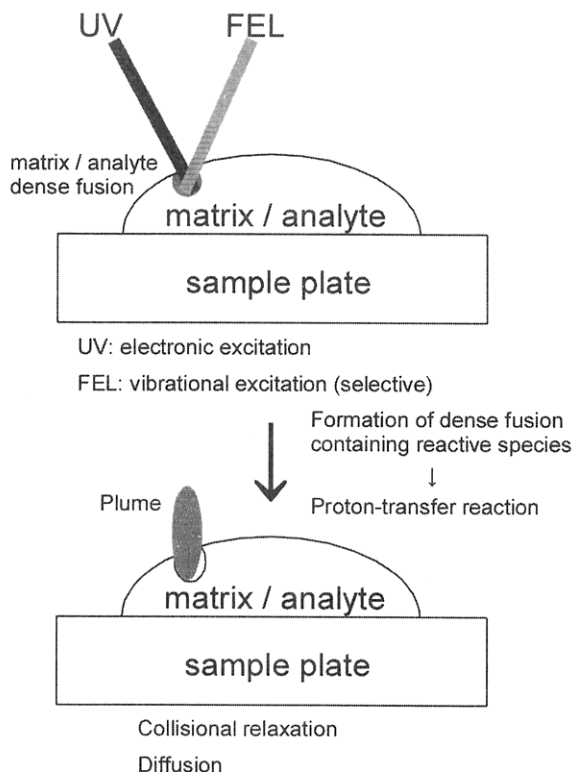


Fig.1 Principle of FEL/UV-MALDI.

をも凌ぐ「超ソフトイオン化法」として、従来は質量分析の測定対象になり得なかった高分子量蛋白質や蛋白質複合体などの検出を可能にするであろう。

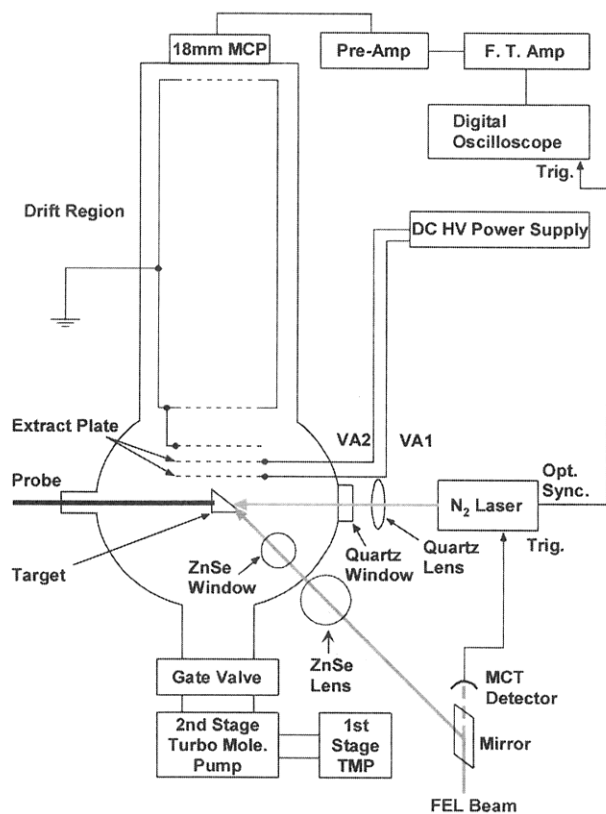


Fig.2 TOF mass spectrometer for the simultaneous exposure to FEL and N₂ laser.

これまでにFEL/UV-MALDIの技法を確立するため、質量分析部をTOFMSとした原理実証用装置の構築を進めてきた。Fig. 2に装置の概略を示した。TOFMSはR. M. Jordan社製のガス分析用リニア・リフレクトロンモード飛行時間型質量分析計を改造したもので、飛行管の長さは約1 m、加速電圧は最大5 kVである。試料台はステンレス製のプローブ(8 mmφ)で、イオンの飛行軸に対して直交方向に挿入する。FELビームはZnSeレンズにより集光し、ZnSe真空窓を通してプローブ正面方向から入射した。N₂レーザー(LSI社製VSL-337ND)のビームは石英レンズにより集光し、石英真空窓を通してプローブ前方斜め45°方向から入射した。FELとUVの同期を得るために、FELビームを光路の途中で分割し、MCT検出器(Vugo社製R005)でFELパルスを電気パルスに変換して、これをN₂レーザーのトリガースourceとした。プローブから約5 mmの間隔に配置されたグリッドに電位を与えてイオンの引き出しを行う。プローブは浮遊電位または高電圧(~4 kV)を印加して使用する。イオンは引き出しグリッドとアース電位の円筒電極との間の領域で加速され、さらにイオン収束用のアイツェルレンズ電極とリフレクトロンモード用の偏向電極対(これらは本実験では常にアース電位)を通過した後、アース電位の飛行管に導入される。飛行管の終端にはイオンミラー電極群とリニアモード用MCP検出器が配置されており、飛行管の入口付近にもリフレクトロンモード用MCP検出器が配置されている。本実験ではイオンミラー電極をゼロ電位として、リニアモードでの検出を試みた。MCP検出器および各電極に印加する高電圧は、いずれもR. M. Jordan社製AREF電源により供給した。MCP出力信号をプリアンプ(サンシン電機製PA-2A)およびファーストタイミングアンプ(サンシン電機製N-2320)で増幅し、ファーストディスクリミネータ(サンシン電機製N-2440)で波形整形した後、デジタルオシロスコープ(Tektronix製TDS684B)で観察、記録した。

照射実験系の評価を行うため、マトリックス化合物である2,5-dihydroxybenzoic acid(DHB)のみを試料に用いてFEL/UV同時照射実験を行った。試料台のターゲット面にDHB溶液(メタノール/水(1:1), 10 mg/ml)2 μlを滴下し、室温常圧下で自然乾燥させた。焦点がターゲット面上になるようにレンズを配置し、FELビーム、UVレーザービームともに数百ミクロン程度のスポット径に収束させた。CCDカメラによる観察および感熱フィルムにより、FELとUVのスポットがほぼ一致するように光軸を調整した。このときのおおよそのエネルギー密度は、FEL(マクロパルス)が10⁴ J/m²、UVが10³ J/m²と計算され、それぞれ単体でも急速加熱条件を充たしていると考えられる。事実、それぞれ単体で照射したときにもTOFスペクトルが観察された。Fig. 3にTOFスペクトルの一例を示す。それぞれ、FEL/UV同時照射時の結果からUV照射結果を差し引いた、差スペクトルとして表示している。プラス側に現れているピークは同時照射によるイオン化率の向上を示している。波長6.0 μmのFELをUVと同時に照射した場合

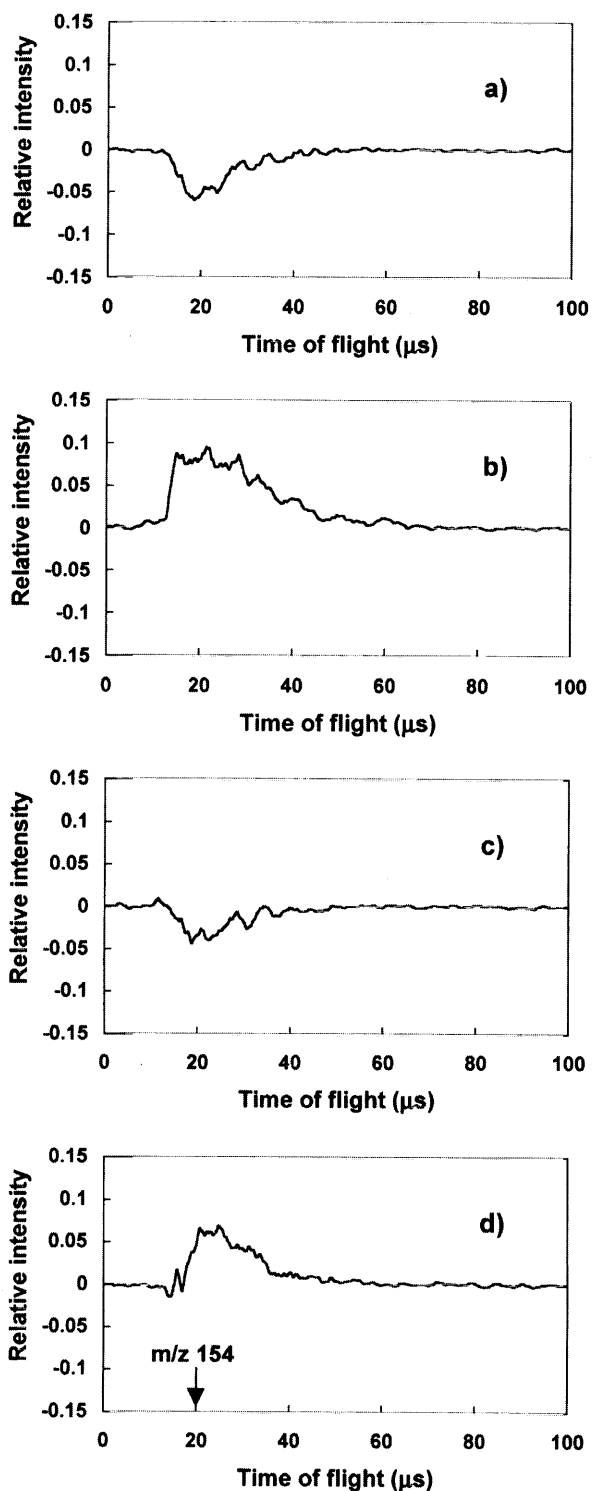


Fig.3 Differential TOF spectra of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB); subtracting the result of UV-only exposure case from the results of simultaneous FEL/UV exposure cases. FEL wavelengths are: a) 5.5 μm , b) 6.0 μm , c) 6.5 μm , d) 7.0 μm . The average power of FEL is 15 mW in every case.

に最大の効果が観測された。波長6.0 μm はDHBの振動吸収に一致する。FEL波長に依存して、FEL/UV同時照射時のTOFスペクトルが変化することは確認できたが、TOF装置自体の性能の問題により、今回のような既知試料の場合でもピークの帰属は著しく困難である。そこで現在、

操作パラメータと電極構造の最適化を視野に入れた、シミュレーションおよび運動論的解析に着手している¹⁵⁾。また、ターゲット面を非電導性フィルムで絶縁してからプローブに高電圧バイアスを印加するなどの工夫により、スペクトルの品位(強度と分解能)と測定の再現性が改善されつつある。

6. 総括

MALDIとTOFMSの概要とともに、FELをイオン化光源にしたIR-MALDIの特長と問題点を解説した。FELとUVレーザーを併用したFEL/UV-MALDI-TOFMSの構想について述べ、その開発状況と予備実験結果を報告した。FEL/UV同時照射時でのTOFスペクトルのFEL波長依存性、およびUV単独照射時と比較してのイオン化率の向上を確認している。今後はTOFMSの性能を改善することにより、蛋白質などの高分子量試料を用いてFEL/UV-MALDI-TOFMS実験を行い、この技法の確立を目指してゆく。さらに、等電点電気泳動ゲルやアフィニティメンブレンの直接照射による脱離イオン生成などを応用例にして、実用性の検証を展開する計画である。

謝辞

FEL/UV同時照射実験でご助力いただきました石井克典氏、鈴木幸子博士、ならびに自由電子レーザー発振にご尽力いただいております三菱電機システムサービス隈昭一氏、田中幹朗氏に深く感謝いたします。

本研究は、文部科学省の知的クラスター創生事業「光量子プロセスによる生体分子制御技術の創生」の一環として推進されている。

参考文献

- 1) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, and T. Yoshida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2** (1988) 151.
- 2) 磯部 敏明, 高橋 信弘: プロテオーム解析法, 実験医学別冊ポストゲノム時代の実験講座 **2** (羊土社, 2000).
- 3) F. W. McLafferty, E. K. Fridriksson, D. M. Horn, M. A. Lewis, and R. A. Zubarev: *Science* **284** (1999) 1289.
- 4) A. Overberg, M. Karas, U. Bahr, R. Kaufmann, and F. Hillenkamp: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4** (1990) 293.
- 5) A. Overberg, M. Karas, and F. Hillenkamp: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5** (1991) 128.
- 6) S. Berkenkamp, F. Kirpekar, and F. Hillenkamp: *Science* **281** (1998) 260.
- 7) W. C. Wiley and I. H. McLaren: *Rev. Sci. Instrum.* **26** (1955) 1150.
- 8) B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, and V. A. Zagulin: *Sov. Phys. JETP* **37** (1973) 45.
- 9) S. M. Colby, T. B. King, and J. P. Reilly: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (1994) 865.
- 10) R. S. Brown and J. J. Lennon: *Anal. Chem.* **67** (1995) 1998.
- 11) 粟津 邦男, 永井 昭夫, 曾沢 勝夫: *レーザー研究* **26** (1998) 369.
- 12) K. L. Caldwell, D. R. McGarity, and K. K. Murray: *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 1374.
- 13) M. B.-Knorr, D. R. Ermer, K. E. Schriver, and R. F. Haglund: *J. Mass Spectrom.* **37** (2002) 254.
- 14) 内藤 康秀, 佐々木 理江, 部谷 学, 粟津 邦男: *レーザー研究* (2002) submitted.
- 15) Y. Naito, R. Sasaki, M. Heya, and K. Awazu: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* (2002) submitted.