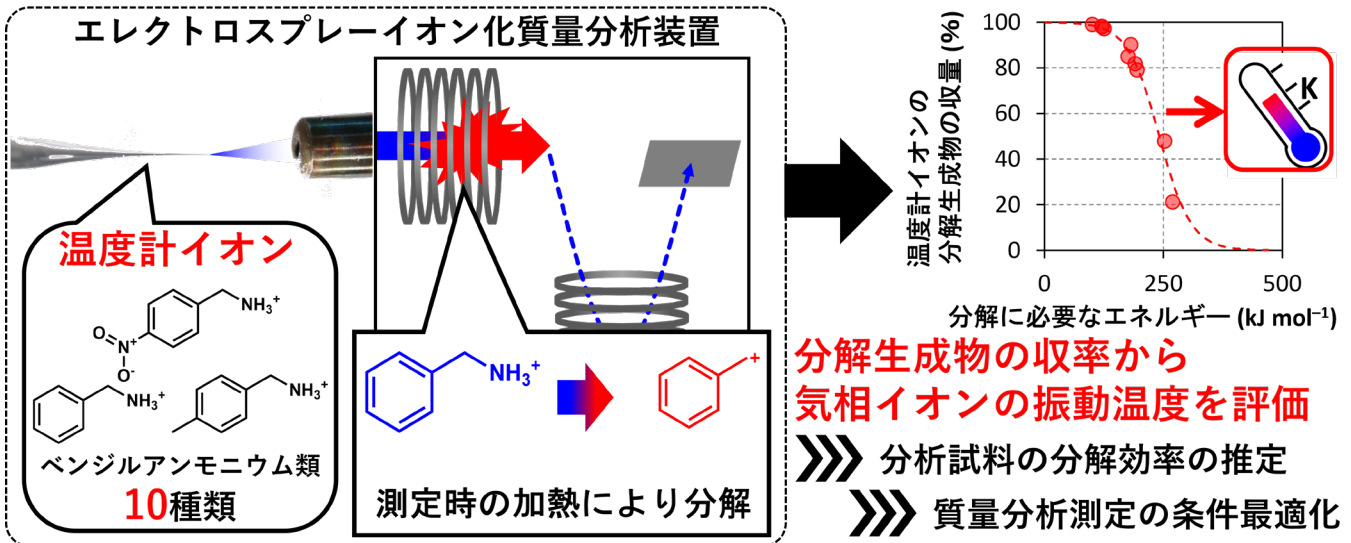


## 本研究のポイント

- エレクトロスプレーイオン化質量分析法の評価に適した新しい温度計イオンを発見
- 質量分析測定条件への温度指標の導入のために適した温度計イオンを計算機シミュレーションで推定
- 生体分子の化学分析の精度向上による、疾患バイオマーカーのスクリーニングの効率化に期待



概要図 温度計イオン・ベンジルアンモニウム類による気相イオンの振動温度の評価法. 本研究では、エレクトロスプレーイオン化質量分析法で生成する気相イオンを対象としました.

## 概要

本研究では、質量分析測定における分解生成物の見落としによる定量値の誤差や、マススペクトルピークの誤同定の原因となるイオン分解を評価する新たな「温度計イオン」となる分子を発見しました。 エレクトロスプレーイオン化質量分析はタンパク質や代謝物のような気相で不安定な生体分子を分解させることなく測定できるという特徴から生体分子の分析に広く用いられています。しかしながら、例えば、ノルアドレナリンやアデノシン三リン酸など一部の代謝物については測定の際に分解を伴い、正確な分子量の測定が困難になることが報告されています。今回、質量分析測定の際に起こる気相イオンの分解効率を評価するために、計算機シミュレーションを用いて温度計イオンの探索を行い、ベンジルアンモニウム類が最適な化合物であることを見出しました。本研究成果により、生体分子の気相イオンの振動温度の推定を実現し、生体分子の化学分析の高精度化への寄与が期待されます。なお、この技術の詳細は、2022年8月3日に発行された米国化学会出版の学術誌 Journal of The American Society for Mass Spectrometry 誌を参照ください。

下線部は【用語解説】参照

## 開発の社会的背景

質量分析法は気相イオンの質量電荷比を計測する手法であり、生体分子を含む有機化合物の分子量や分子構造の

推定、定量分析などに用いられています。質量分析法では試料化合物を気相イオンすることが不可欠ですが、このイオン化時に測定対象の試料分子に与えるエネルギーによって、イオン分解が起こり、対象分子由来のイオンの質量電荷比が正確に計測できなくなることが問題となっています。

近年、エレクトロスプレーイオン化法の開発により、タンパク質や代謝物など気相で不安定な生体分子を分解することなく気相イオン化して計測することが可能となりました。この特徴を生かしてエレクトロスプレーイオン化質量分析法は、生命科学研究や、疾患バイオマーカーの探索、創薬、診断などに幅広く活用されています。しかしながら、質量分析測定におけるイオン分解に伴う問題は完全には克服されておらず、一部の代謝物については測定の際に分解を伴うことが報告されています。実際に、ノルアドレナリンやアデノシン三リン酸など生命活動において重要な役割を担っている分子においても、誤同定されている例が散見されます。また、分解生成物の見逃しは、測定対象の生体分子の量を過小評価し、誤った分析結果を与える原因ともなります。そこで、生体分子の化学分析の高精度化のために、分析試料のイオン分解効率を事前に推定し、質量分析結果を補正する手法の開発が求められています。

## 研究の内容

生体分子の分析に適したエレクトロスプレーイオン化法では、大気圧下で生体分子を気相イオン化し、生成した気相イオンを真空中に輸送し、質量分析を行います。この気相イオンを真空中に輸送する際に通過する低真空領域において、測定対象イオンと残留ガス分子の衝突により、イオンの加熱が起こります。イオンの温度上昇に伴いイオンは分解し、分解生成物が生じます。このように、エレクトロスプレーイオン化質量分析法で起こるイオン分解は、イオンの温度と関連しています。このイオンの温度は、「温度計イオン」を測定することで推定することができます。この「温度計イオン」は、イオンの温度を表す内部エネルギーとイオンの分解速度、分解エネルギーの関係がわかっている化合物のことで、気相イオンの振動温度を推定することができます。これまで気相イオンの温度測定のための「温度計イオン」として、ベンジルピリジニウム類が広く用いられてきました。しかしながら、生体分子の測定に適したエレクトロスプレーイオン化法では、従来のイオン化法に比べてイオン分解を起こしにくい、温和な条件で試料分子の気相イオン化を行います。そのため、低温のイオンが生成し、ベンジルピリジニウム類の大部分は分解せず、イオンの温度評価は困難でした。

そこで、本研究ではベンジルピリジニウム類に比べて低温で分解するという特徴を持つ「ベンジルアンモニウム類」を、新しい「温度計イオン」として見出し、詳細に評価を行いました。このベンジルアンモニウム類は、温度上昇に伴う分解によってベンジルカチオン類とアンモニアのみを生じ、副生成物はありません。ベンジルアンモニウム類の分解はベンジルカチオン類とアンモニアの生成という単一の過程で、温度計イオンに適した特徴を有しています。従って、ベンジルアンモニウム類の分解により生成するベンジルカチオンの生成速度と温度の関係を明らかにすることで、気相イオンの温度評価のための「温度計イオン」として利用することができるようになります。これまで、気相イオンの分解速度と温度の関係を明らかにするためには、真空中においてイオンに与えるエネルギーを精密に制御した高度な実験装置を用いる必要がありました。本研究では、量子化学に基づく計算機シミュレーションでも気相イオンの分解速度を精密に推定できることを確認し、高度な実験装置を必要としない温度計イオンの評価法を確立しました。具体的には、10種のベンジルアンモニウム類を用いて、計算機シミュレーションにより分解速度を求めました。10種の中で代表的な5種の結果を図1に示します。基本構造である(3)ベンジルアンモニウムを基準にすると、(1)メトキシベンジルアンモニウムや(2)メチルベンジルアンモニウムは、それぞれ電子供

与基であるメトキシ基とメチル基を有するため、(3) ベンジルアンモニウムに比べて分解が起こりやすくなります。これは、メトキシ基、またはメチル基の存在によって分解生成物であるベンジルカチオンの正電荷が非局在化し、安定化するためです。一方、(4) トリフルオロメチルベンジルアンモニウム、(5) ニトロベンジルアンモニウムは、それぞれ電子吸引基であるトリフルオロメチル基、ニトロ基を有するため、(3) ベンジルアンモニウムに比べて分解が起こりにくくなりました。これは、トリフルオロメチル基、ニトロ基の存在によって分解生成物であるベンジルカチオンが不安定化するためです。

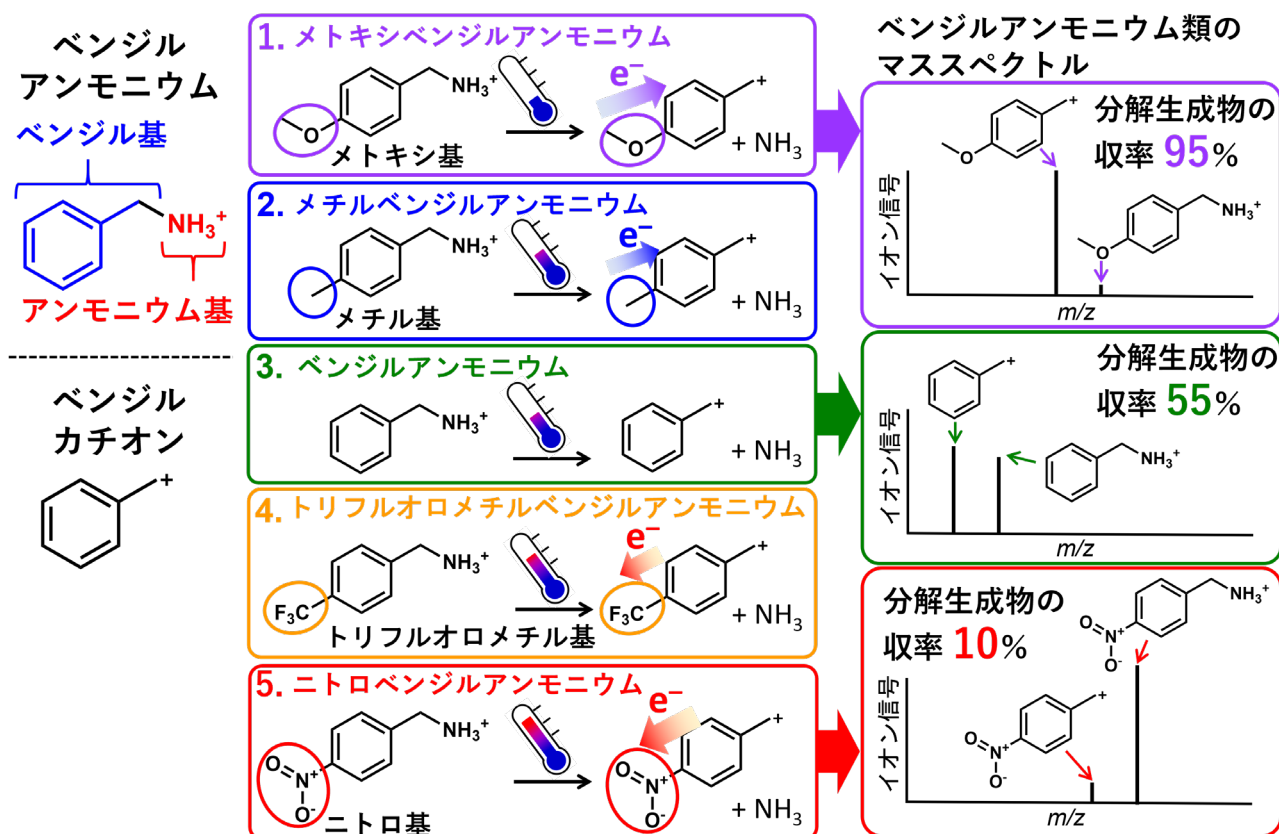
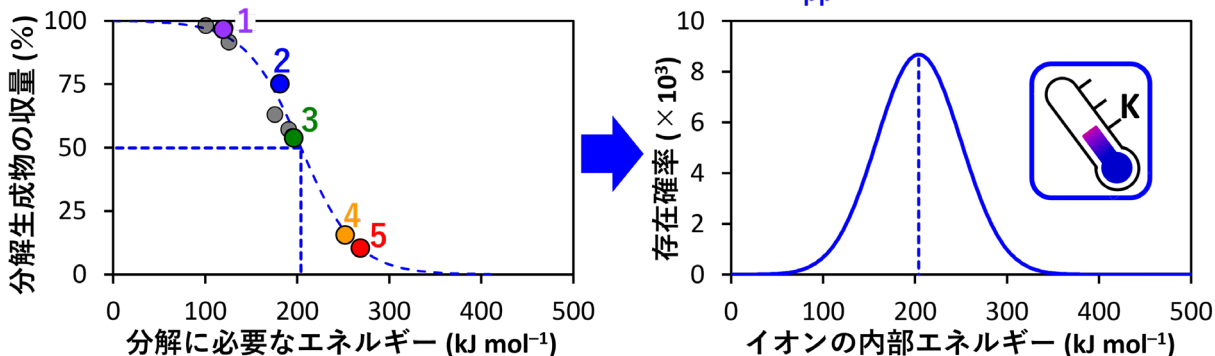


図1 ベンジルアンモニウムとベンジルカチオンの構造、ベンジルアンモニウム類の分解過程の模式図およびマススペクトルの測定例。例として、(1) メトキシベンジルアンモニウム、(2) メチルベンジルアンモニウム、(3) ベンジルアンモニウム、(4) トリフルオロメチルベンジルアンモニウム、(5) ニトロベンジルアンモニウムを示しました。(1) メトキシベンジルアンモニウムが最も分解されやすく、(5) ニトロベンジルアンモニウムが最も分解されにくい化合物です。マススペクトルに示されたベンジルアンモニウム類とその分解生成物であるベンジルカチオン類の信号量の比から分解生成物の収率を求めました。

図1右では、分解されないままのベンジルアンモニウム類と分解生成物であるベンジルカチオンのイオン信号量の比から、分解生成物の収率を評価しました。この収率を、計算機シミュレーションで求めた10種のベンジルアンモニウム類それぞれの分解エネルギーに対してプロットした結果を図2左に破線で示しました。プロットに記載した1から5の数字は、図1に示した5種のベンジルアンモニウム類の番号に対応しています。図2では一例として、大気圧中のエレクトロスプレーイオン化により生成したベンジルアンモニウム類を真空中へ輸送するために必要な電極電圧を変えた2種類の実験条件A、Bでの結果を示しました。どちらの条件においても、ベンジルアンモニウム

類の分解に必要なエネルギーが大きくなると分解生成物の収率が小さくなること、ならびに収率の実測値(図2の丸印)は破線で示す分解の理論曲線とよく一致することがわかりました。図2右は、このイオン分解の理論曲線から計算したベンジルアンモニウム類の内部エネルギーの分布で、内部エネルギーのピーク値が大きくなるほどイオンが高温であることを表しています。したがって実験条件AよりもBの方が、イオンの温度が高いことを示しています。実験条件AとBの違いは、大気圧で生成したイオンを質量分析装置の真空中に輸送するために必要な周波数1 MHz帯の高周波電圧の値です。実験条件A、Bでは、それぞれイオンの輸送のため電極に75 V、300 Vの高周波電圧を印加しており、実験条件Bの方が、Aよりも高い電圧を印加しているため、大気圧から真空へのベンジルアンモニウムの輸送効率が高い条件でした。しかしながら、実験条件AよりもBのほうが、イオンの温度が高く、イオン分解が起こりやすい条件であることが図2に示されています。質量分析測定における最適な測定条件は、大気圧から真空へのイオンの輸送効率が高く、かつイオン分解が起こりにくい条件です。本研究で提案したベンジルアンモニウム類を「温度計イオン」として用いることで、生体分子の気相イオン化の際に起こるイオンの加熱と、それに伴うイオン分解の収率の評価が可能となります。イオン輸送効率、分解効率の両方を考慮することで、質量分析測定の際の最適な実験条件の探索が容易となります。さらに、「温度計イオン」の使用によって質量分析測定におけるイオン分解の影響の評価が可能となり、実験日や装置、測定条件が異なる場合でも、同じ分析条件で測定結果を比較することができます。これによって、測定結果の信頼性の向上が期待できます。

### 実験条件A (イオン輸送のための電極電圧 75 V<sub>pp</sub>)



### 実験条件B (イオン輸送のための電極電圧 300 V<sub>pp</sub>)

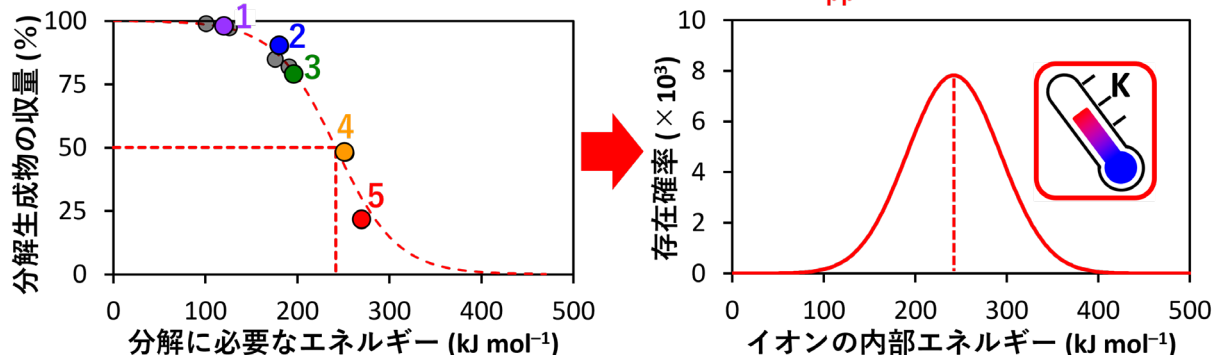


図2 (左) エレクトロスプレーイオン化質量分析法によって生成したベンジルアンモニウム類の分解生成物の収率と、計算機シミュレーションで求めた分解エネルギーの関係。10種のベンジルアンモニウム類についてプロットしました。プロットの1から5の数字は、図1に示したベンジルアンモニウム類に対応しており、1 (紫) . メトキシベンジルアンモニウム、2 (青) . メチルベンジルアンモニウム、3 (緑) . ベンジルアンモニウム

ウム、4 (橙) . トリフルオロメチルベンジルアンモニウム、5 (赤) ニトロベンジルアンモニウムです。イオン分解の理論から予測される理論分解曲線を破線で示しました。

(右) 理論分解曲線からベンジルアンモニウム類の内部エネルギーを求めた結果、実験条件 A よりも B のほうが、大きな内部エネルギーを持つ気相イオンが生じ、イオン分解が起こりやすい条件であることがわかりました。ここで示したように、異なる解離エネルギーを持つ 10 種のベンジルアンモニウム類の分解生成物の収率を評価することで、イオンの温度である内部エネルギーの平均値と分散を知ることができます。

## 用語解説

### 質量分析

気相イオンと電場や磁場の相互作用によりイオンの質量電荷比を計測する手法。

### マスペクトル

質量分析測定により得られる、イオンの信号量を縦軸、質量電荷比( $m/z$ )を横軸として示した2次元グラフ。イオンの信号量はイオンの存在量と関連し、質量電荷比( $m/z$ )は、気相イオンの分子量と電荷に関連する。

### マスペクトルピーク

マスペクトル中に存在するイオンの信号のこと。

### 温度計イオン

イオンの分解速度と、分解エネルギー、温度の関係が明らかになっている化合物の総称。ベルギー王国リエージュ大学の Edwin De Pauw 教授が温度計イオンとして提案した、ベンジルピリジニウム類が特に有名。温度計イオンの分解に必要なエネルギーの値は既知であるため、エレクトロスプレーイオン化質量分析法により温度計イオンの分解生成物の収率を計測することで、気相イオンの温度と関連する内部エネルギー分布を得ることができる。得られたイオンの内部エネルギー分布は、イオンの振動温度に相関する。

### エレクトロスプレーイオン化質量分析

溶液をキャピラリー(細管)に流し、高電圧を印加することで気相イオンを生成し、質量分析を行う手法。タンパク質、代謝物のような気相で不安定な生体分子を分解させることなく、測定することが可能であるという特徴から、生体分子の分析に広く用いられる。しかしながら、近年、エレクトロスプレーイオン化による生体分子の分解が起こる事例が多数報告されており、イオン分解の評価のための温度計イオンの開発が求められている。

### ノルアドレナリン

代謝によって芳香族アミノ酸・チロシンから合成される化合物。脳内の神経伝達の機能を有している。ストレスホルモンとしても知られており、生体内の濃度とストレスの関連があると報告されている。

### アデノシン三リン酸(ATP)

生体内においてエネルギーの貯蔵・放出を担っている化合物。「生体のエネルギー通過」とも形容され、地球上に存在する生物において普遍的に存在する。

## 気相イオン

電荷を帯びた気体状分子のこと。本研究では、正の電荷を帯びた正イオンを対象にした。

## 計算機シミュレーション

人の手では計算困難な複雑な現象を、計算機を用いて模擬的に計算すること。本研究では、イオンの分解エネルギー、分解速度を求めるために、分子軌道法による計算を実施した。分子軌道法とは、分子・イオンを構成する原子核、および電子の相互作用に基づいて、その諸性質を計算する手法の一つ。原子軌道の線形結合で表される分子軌道によって、分子を構成する個々の電子の状態を計算する。本研究では、ベンジルアンモニウム類の基底状態の電子配置に加えて、1電子および2電子励起配置をクラスター展開法で、3電子励起配置を摂動法で計算するCCSD(T)を用いて、ベンジルアンモニウム類の分解に必要なエネルギーを求めた。CCSD(T)法により、実験で得ることが難しいイオンの分解に必要なエネルギーを高精度に推定できた。本研究では、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構の計算機システムを使用して計算した。

## ベンジルアンモニウム類

ベンジル基とアンモニウム基を持つ正イオンのこと。分解によってベンジルカチオン類を生じる。化学構造は図1を参照。

## 振動温度

イオンの内部振動に由来する温度。

## 分解速度

イオンの分解による分解生成物の時間変化率を表す。イオンの分解エネルギーが小さくなると分解速度は大きくなる。

## 分解エネルギー

任意の時間において、イオン分解により対象のイオンの存在量が  $1/e$  に減少するために必要なエネルギー。

### 本研究に関する問い合わせ先

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

分析計測標準研究部門 応用ナノ計測研究グループ

上級主任研究員 浅川 大樹

d.asakawa@aist.go.jp