COMMENTARY

ESI-MS によるミセル分子量解析

Analysis of Micelle Weight by ESI-MS

野原 大輔*

Daisuke NOHARA

(Received March 2, 1999; Accepted April 22, 1999)

In mass spectrometry, electrospray ionization (ESI) method made it possible to measure the molecular weight of biopolymer accurately by producing multiply charged ions of the target molecule from the solution phase. Moreover, due to the softness of this method, the molecular weight of aggregates formed by noncovalent interactions can be measured. This article explains the applicability of ESI method to measurement of the micelle weight and the method of analysis of observed results.

はじめに

質量分析計の進歩の速さは最近特にめまぐるしい。数年前までの状況とは隔世の感がある。イオン化法、分析法、データ処理法いずれにおいても斬新なアイデアが次々と具体化、装置化されてきている。特に、生体高分子について精度の高い質量測定と構造情報の獲得に大きな役割を果たすようになった。

近年、質量分析計におけるイオン化法の一つとして、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法が開発され^{1,2)}、その改良・発展に目覚ましいものがある。この方法によれば水溶液中から目的分子の多価イオンを発生させることができ、生体高分子の質量を直接的に正確に求めることが可能となった^{3~5)}。さらに、この方法は溶液相からの直接の穏やかなイオン化法であることから、分子内の共有結合を切断させないのみならず、条件によっては非共有結合性相互作用による分子会合体を会合状態のままで観測できる^{6,7)}ことが知られている。タンパク質分子間やタンパク質とペプチド間^{8,9)}、タンパク質とリガンド^{10~13)}、レセプターとリガンド^{14,15)}、酵素・基質・インヒビター間^{16~19)}、抗原・抗体間²⁰⁾の複合体などさまざまな非共有結合性相互作用による分子会合体の観測結果が報告されている。

現在、ESI 法は二つの大きな優れた特徴を備えているように思われる。一つは多価イオン生成による高分子量物質の質量測定の可能性であり、いま一つは分子会合体の質量測定の可能性である。近い将来には質量分析計が分子の会合・解離の定量的評価を可能にするような分析装置へと発

展して欲しいとの期待をこめて、本稿ではこの二つの特質を活用した新たな挑戦として、分子会合体の一つの典型であるミセルの質量測定の可能性とその解析方法について述べたいと思う。

ミセルの分子量測定には現在でもさまざまな方法がある。光散乱法、蒸気圧降下法、浸透圧法、沈降平衡法、ゲルクロマトグラフィー、電気泳動 (SDS-PAGE) 法、粘度測定法などである。これらによれば、直接法といえども、いくつかの仮定に基づく推算値あるいは平均値としての分子量が算出されることになり、さらに間接法では、標準物質に対する相対値 (内挿値、外挿値) としてあまり精度のよくない分子量が求められることになる。大きなミセル粒子の場合は電子顕微鏡により直接的に幾何学的なサイズが観測できるが、分子量を得ることはできない。

質量分析計によってミセルの質量を直接測定することができれば、上述の各種分子量測定法とはかなり質を異にする結果を得ることができ、その意義は大きい。以下に、この分野への ESI 法適用の可能性^{21~23)}を明らかにしたいと思う。用いた質量分析装置は Analytica of Branford 社製の ESI イオン源を備えた JEOL AX505HA である。

ESI による高分子量物質の質量測定

ESI 法になじみのうすい読者もおられるかもしれないので、この方法による最も典型的な測定結果の一例を Fig. 1 に示した。筆者らの測定したニワトリ卵白リゾチームの ESI マススペクトルである。プロトン化されたリゾチーム分子 (M: 14,307) の多価イオン分布、すなわち、プロトン付加による荷電数 z が 7 から 12 にわたるリゾチーム分子由来のイオンが $[M+zH]^+/z$ の質量の位置に検出されている。これらの分布から deconvolution のソフトを使用なり、各ピークの質量をもとに平均値を算出するなどしてリゾチームのかなり正確な分子量を得ることができる。

* 名古屋市立大学薬学部薬品製造工学教室 (〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)
Department of Chemical Reaction Engineering, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University (3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan)

Lysozyme

Fig. 1. ESI mass spectrum showing the distribution of multiply charged ions of lysozyme.

Fig. 2. ESI mass spectrum of dilute aqueous solution of decyltrimethylammonium bromide (DTAB).

後に述べる内容との混同を避けるために、このスペクトルは、同一分子種のプロトン付加数の異なることによる多価イオン分布であることに留意しておいていただきたい。

正イオンと会合体成長プロセスの観測例

カチオン性界面活性剤である decyltrimethylammonium bromide $C_{10}H_{21}N^+(CH_3)_3Br^-$ (DTAB, $M_{ac}: 280$) の希薄溶液からの ESI マススペクトルの一例を Fig. 2 に示した。こうした塩の場合の ESI 法による観測では正イオンが検出され、プロトン付加分子は見当たらない。すなわち、 $C_{10}H_{21}N^+(CH_3)_3$: 200 が検出されている。部分拡大した挿入図で m/z が 479 と 481 のピークに着目していただき

い。 ^{79}Br と ^{81}Br の存在比は 51% と 49% である。2 個の DTAB 分子が会合した場合、そのなかの二つの Br が ^{79}Br が二つであれば質量は 558, ^{79}Br と ^{81}Br が一つずつであれば 560, ^{81}Br が二つであれば 562 という 3 種類の会合体が存在する。558 から $^{79}Br^-$, 562 から $^{81}Br^-$, および 560 から $^{79}Br^-$ あるいは $^{81}Br^-$ がそれぞれ 1 個抜けると質量が 479 と 481 の 2 種の正イオンが生成する。この観測結果は 2 量体から 1 個のプロマイドイオンの脱離した正イオンを検出したことを示している。さらに、Fig. 2 において、会合体の成長過程がそれぞれ脱プロマイドイオンによる正イオンとして検出されていることがうかがえる。この成長過程が、ESI イオン源中での溶液の濃縮によって起こるも

Fig. 3. Example of ESI mass spectrum of micelle solution of octyltrimethylammonium bromide (OTAB).

Fig. 4. Schematic ESI mass spectrum showing the distribution of multiply charged ions of the molecule with molecular weight M in the coexistence of its aggregated dimer.

のか、試料の濃度に依存して変化するものかなどについては未だ検討していない。

ミセル溶液の ESI による観測例

臨界ミセル濃度 (CMC) 以上でミセル溶液を観測した結果の一例を Fig. 3 に示した。試料は octyltrimethylammonium bromide $C_8H_{17}N^+(CH_3)_3Br^-$ (OTAB, M_a : 252, CMC: 0.14 M) である。試料溶液は濃度 0.56 M, 純水中に他の添加物なしで溶解させたもので、 $2\mu L/min$ で syringe pump による連続定量注入法 (インフュージョン法) によりイオン源に導入された。ここに示したスペクトルは、この装置におけるキャピラリー・スキマー間電圧 80 V にて観測したものである。上述の DTAB の場合と同様、OTAB の分子イオンはもちろん、プロトン化された分子に相当する $m/z=253$ にピークは現れず、 $[(OTAB)-Br^-]^+=172$, $[2(OTAB)-Br^-]^+=424$ の正イオンとして検

Fig. 5. Schematic ESI mass spectrum showing the distribution of aggregates illustrated by singly, doubly, and triply charged ions.

出されている。 m/z が 1,500 から 6,000 くらいの領域に、一見雑然としているが、会合体らしきものの分布が得られていることに注目しておいていただきたい。

会合体の ESI による解析法

Fig. 4 は分子量 M の分子に ESI 法によりプロトンが付加した場合に示す多価イオン分布なのであるが、同時にこの分子の会合体 (ここでは 2 量体とする) が存在する場合に現出する多価イオン分布の特徴を模式的に表したものである。通常の ESI マススペクトルでは M にプロトンが 9~11 個付加したイオンとして 9+, 10+, 11+ という実

線で示したスペクトルが得られるのであるが、これらのピークの上に奇数値のイオン、すなわち、 $[2M+19H^+]^{19+}/19$, $[2M+21H^+]^{21+}/21$ に相当する m/z の位置に破線で示すようなピークが現れた場合、系中に非共有結合性会合体 (2 量体) が存在することを意味する。こうした場合には、例えば実線で示された $10+$ としたピークの強度は $[M+10H^+]^{10+}/10$ によるものだけではなく、 $[2M+20H^+]^{20+}/20$ による寄与も含んでいると考えなければならない。

さて、Fig. 5 に示すのは、今回紹介しているような会合体の正イオンの場合を想定して (負の対イオンを X^- とし) 1 価および多価イオンによる会合体の質量分布を示す模式図である。Fig. 1 で示したような同一分子種の多価イオン分布ではない。1 価、2 価、および 3 価の正イオンそれぞれが示す質量分布である。ただし、ある分子量分布をもった特定の一つの会合体群が 1 価、2 価、あるいは 3 価と姿を変えて現れたものではない。実線のピーク間隔は会合体を構成している monomer の質量間隔 M であり破線と実線の間隔は $M/2$ 、点線と点線および点線と実線の間隔は $M/3$ になっている。1 価のイオンで示される会合体の隣合うピーク間の半分の位置に 2 価イオンで示される会合体の質量分布が、 $1/3$ および $2/3$ の位置に 3 価のイオンで示される質量分布が顕著に現れるということである。もちろん、1 価のイオンを示すように見える実線のピークには 2 価および 3 価のイオンによる寄与も含まれている。

ミセル溶液における分子会合体の解析例

上述の解析法を Fig. 3 の OTAB の観測結果に適用したのが Fig. 6 である。高質量側の会合体分布らしき領域に現

Fig. 6. ESI mass spectrum of a micelle solution of octyltrimethylammonium bromide (OTAB) in water without other additives. The major peaks, *, are in a series, at intervals of the monomer molecular weight of OTAB and their individual peak intensities include those of singly, doubly, and triply charged ions. The peaks represented by • only show doubly charged ions. (Reproduced with permission from "The possibility of the direct measurement of micelle weight by electrospray ionization mass spectrometry" by D. Nohara *et al.*, *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 1998. Copyright 1998, John Wiley & Sons Limited.)

れたピークの m/z を検討してみると、OTAB 分子の会合数 m の会合体に対応した $[m(OTAB)]^+$ のピークは存在しないというだけではなく、 $[m(OTAB)+H^+]^+$ あるいは $[m(OTAB)+2H^+]^{2+}/2$ のようなプロトン化された分子に相当するピークもなく、ほとんどすべてが OTAB 分子の会合体から Br^- が 1 個、2 個、あるいは 3 個脱離した m/z に対応するピークで説明されうる。すなわち、*印を付したピークは $1+$, $2+$, $3+$ のイオンの総和であり、•印を付したピークは 2 価イオンであり、隣接した *印ピーク間の $1/3$, $2/3$ の位置に数は少ないが $3+$ イオンの存在する領域もある。*印のピーク強度には、正確にはわからないが •印の 2 価のイオンの寄与分も、場合によっては 3 価イオンの寄与分も含まれている。例えば、 $m/z=1938$ に相当するピークには $[8(OTAB)-Br^-]^+$, $[16(OTAB)-2Br^-]^{2+}/2$, および $[24(OTAB)-3Br^-]^{3+}/3$ の 3 本のピークがそれぞれ独自の寄与分をもって含まれている。ここでは、•印のピークの頂点を機械的に結び合わせて 2 価のイオンで示される会合体分布が図中の点線で近似的に描かれている。この点線が *印のピークを切る位置までの高さ分を、*印ピーク中の 2 価イオンのピーク強度の取り分とする。同様に 3 価イオンの取り分も *印ピークに含まれている場合もある。こうした近似を採用すれば、2 価および 3 価イオンの取り分を引き去った残分が 1 価イオンの取り分である。こうした操作を図示したのが Fig. 7 である。それぞれの価数で表される分布を加え合わせて再構成したものが Fig. 8(a) である。Fig. 6 の対応する m/z 領域のスペクトルを拡大したのが Fig. 8(b) であり、(a) によりほとん

Fig. 7. Relative intensity distribution of doubly (a), triply (b), and singly (c) charged ions. (Reproduced with permission from "The possibility of the direct measurement of micelle weight by electrospray ionization mass spectrometry" by D. Nohara *et al.*, *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 1998. Copyright 1998, John Wiley & Sons Limited.)

Fig. 8. Comparison of the reconstructed spectrum with the observed one; reconstructed, (a); observed, (b). (Reproduced with permission from "The possibility of the direct measurement of micelle weight by electrospray ionization mass spectrometry" by D. Nohara *et al.*, *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 1998. Copyright 1998, John Wiley & Sons Limited.)

Fig. 9. Actual molecular weight distribution derived from doubly charged ions. (Reproduced with permission from "The possibility of the direct measurement of micelle weight by electrospray ionization mass spectrometry" by D. Nohara *et al.*, *Rapid Commun., Mass Spectrom.*, 1998. Copyright 1998, John Wiley & Sons Limited.)

どすべての主要なピークを説明できていることがわかる。2価イオンの分布で表される会合体はそれぞれ m/z が $[m(\text{OTAB}) - 2\text{Br}^-]^2/2$ の位置にあるものである。これらを2倍してBr 2個分の質量を加えたものが $m(\text{OTAB})$ となるが、議論の単純化のためBr分を考慮しないで2価イオンでの分布をそのまま2倍して得られた分子量分布が Fig. 9 である。別法で推算した OTAB のミセル分子量²³⁾は4,500~6,500の領域に存在すると考えられ、この領域を Fig. 9 の横軸の下に表示した。推算値の領域に、観測された会合体の主たる分布が存在していることが見てとれる。3価のイオンによるピーク数は少ないが、これらからもほぼ同じ結果が得られる。いまのところ、価数の多いイオンによって示される分布に基づいて推定した方が本来の分子量分布としては大きい値が求まる。OTAB の場合、そのようにして求めた平均分子量が、文献値か

ら推算された値とよい一致を示していることから、測定の際にはできるだけ価数の多いイオンによるきれいな分布が観測できることが大切ではないかと思われる。

おわりに

ここで紹介した手法は未だ試行段階のものである。ミセルが単分散ではなく、ある種の分布をもつこと^{24), 25)}も議論の対象となるであろうし、ESIのプロセス中には脱溶媒過程が含まれていたり、会合体の解離過程なども含まれていると考えられる。これらがどのように影響しているかなど、今後種々の相関をとりながら洗練させていかなければならない。問題は山積みされている。それにもかかわらず、ESI法によってミセルのような分子会合体でも、その本来の分子量が解析できる可能性は見えたといつてよいと思われる。定量性と系統性をもった操作方法の可能な ESI 装置への改良・開発とともに内容が充実していくものと期待している。

文 献

- 1) S. F. Wong, C. K. Meng, and J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.*, **92**, 546 (1988).
- 2) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
- 3) J. A. Loo, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 644 (1995).
- 4) K. Biemann, *Protein Sci.*, **4**, 1920 (1995).
- 5) M. Przybylski and M. O. Glocker, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **35**, 806 (1996).
- 6) E. C. Huang, B. N. Pramanik, A. Tsarbopoulos, P. Reichert, A. K. Ganguly, P. P. Trotta, T. L. Nagabhushan, and T. R. Covey, *J. Am. Soc., Mass Spectrom.*, **4**, 624 (1993).
- 7) Y. Li, J. Shirasaka, M. Kouzai, T. Kaneko, and M. Tsuchiya, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 459 (1997).
- 8) R. R. O. Loo, D. R. Goodlett, R. D. Smith, and J. A. Loo, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4391 (1993).
- 9) H. Wendt, E. Durr, R. M. Thomas, M. Przybylski, and H. R. Bosshard, *Protein Sci.*, **4**, 1563 (1995).
- 10) R. Feng and Y. Konishi, *J. Am. Soc., Mass Spectrom.*, **4**, 638 (1993).
- 11) K. J. Light-Wahl, B. L. Schwartz, and R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5271 (1994).
- 12) V. Katta and B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8534 (1991).
- 13) A. K. Ganguly, B. N. Pramanik, A. Tsarbopoulos, T. R. Covey, E. Huang, and S. A. Fuhrman, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6559 (1992).
- 14) B. Ganem, Y.-T. Li, and J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6294 (1991).
- 15) A. Miranker, C. V. Robinson, S. E. Radford, and C. M. Dobson, *FASEB J.*, **10**, 93 (1996).
- 16) B. Ganem, Y.-T. Li, and J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7818 (1991).
- 17) K. J. Lumb, R. T. Aplin, S. E. Radford, D. B. Archer, D. J. Jenes, N. Lambert, D. A. MacKenzie, C. M. Dobson, and G. Lowe, *FEBS Lett.*, **296**, 153 (1992).
- 18) J. A. E. Kraunsoe, R. T. Aplin, B. Green, and G. Lowe, *FEBS Lett.*, **396**, 108 (1996).
- 19) M. Baca and S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3992 (1992).
- 20) T. Staroske, A. J. R. Heck, P. J. Derrick, and D. H. Williams, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **46**, 69 (1998).

- 21) 野原大輔, 大越 崇, 酒井朝也, 日本薬学会第 118 年会講演要旨集, 4, 110 (1998).
- 22) 野原大輔, 尾藤真由美, 酒井朝也, 日本生物物理学会第 36 回年会講演予稿集, S28 (1998).
- 23) D. Nohara, T. Ohkoshi, and T. Sakai, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 12, 1933 (1998).
- 24) N. Funasaki, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 43, 87 (1993).
- 25) J. Israelachvili, "Intermolecular & Surface Forces," Academic Press, London (1992), p. 347.

Keywords: Electrospray ionization, ESI, Molecular aggregates, Micelle weight, Octyltrimethylammonium bromide