COMMENTARY

なぜリフレクトロンモードで MS/MS 様の測定が可能なのか

Why Can Reflectron Mode in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Perform MS/MS-like Analysis?

田中耕一^{1*}・吉野健一^{2,3}・絹見朋也⁴・高山光男⁵Koichi TANAKA,^{1*} Ken-ichi YOSHINO,^{2,3} Tomoya KINUMI,⁴ and Mitsuo TAKAYAMA⁵¹ 株式会社島津製作所田中耕一記念質量分析研究所 *Koichi Tanaka Mass Spectrometry Research Laboratory, Shimadzu Corporation, Kyoto, JAPAN*² 神戸大学自然科学系先端融合研究環・バイオシグナル研究センター,³ 大学院医学研究科質量分析総合センター ² *Biosignal Research Center, Organization of Advanced Science and Technology, and* ³ *The Integrated Center for Mass Spectrometry, Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe, JAPAN*⁴ 独立行政法人産業技術総合研究所計測標準研究部門有機分析科バイオメディカル標準研究室 *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), National Metrology Institute of Japan (NMIJ), Organic Analytical Chemistry Division, Bio-Medical Standard Section, Tsukuba, IBARAKI, JAPAN*⁵ 横浜市立大学大学院国際総合科学研究科質量分析学研究室 *Mass Spectrometry Laboratory, International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University, Yokohama, JAPAN*

By measurement of post-source decay (PSD) product ion mass spectrum, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) enable mass spectrometry/mass spectrometry (MS/MS)-like analysis to obtain structural information. We will explain the basics of MS/MS-like analysis in reflectron mode of MALDI TOFMS by comparing post-source decay product ion mass spectrum acquired by the standard reflectron and the curved field reflectron.

(Received October 8, 2008; Accepted October 8, 2008)

1. はじめに

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 [Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight Mass Spectrometry (TOFMS)] のリフレクトロンモードは、リニアモードに比べて質量分解能が向上します。これによって精密なマススペクトルを測定できることはとても有益なことです。MALDI TOFMS におけるリフレクトロンの有用性はこれだけではありません。

リフレクトロンを備えた飛行時間 (Time-of-Flight: TOF) 型質量分析計は、複数の質量分離部を備えたタンデ

ム質量分析計とは異なるにもかかわらず、また時間的タンデム質量分析法 (Tandem Mass Spectrometry in Time: Tandem MS in Time) が可能なイオントラップ型の質量分析計とも異なるにもかかわらず、Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (MS/MS) 様の測定、擬似的な MS/MS が可能です。プロダクトイオンマススペクトルを測定し、リニアモード、リフレクトロンモードによる通常の測定では得にくい分子の構造情報に結びつくデータを得ることが可能となります。

本稿では、一般的なりフレクトロンとカーブドフィールドリフレクトロン (Curved Field Reflectron) を比較しな

* Correspondence to: Koichi TANAKA, *Koichi Tanaka Mass Spectrometry Research Laboratory, Shimadzu Corporation, 1 Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, JAPAN*, e-mail: tanaka-ms@shimadzu.co.jp
田中耕一, 株式会社島津製作所田中耕一記念質量分析研究所,
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1

本解説は株式会社島津製作所田中耕一記念質量分析研究所から 2007 年 7 月 29 日に発行された MALDI-MS Technical Report No. 3, 「なぜリフレクトロンモードで MS/MS が可能なのか？」に記載された内容を元に加筆、再編集したものです。本誌解説の投稿規程に準じ、質量分析の初学者、専門分野外の読者を対象とした平易な記述を心がけたため、一部、科学的に詳細な記述を割愛しています。

Fig. 1. 通常型リフレクトロンを備えた飛行時間型質量分析計を用いた PSD プロダクトイオンの検出. [文献 1 の図 1 を転載, 改変]

がら, なぜタンデム質量分析計とは異なる MALDI TOF 型質量分析計を用いて MS/MS 様の測定が可能となるのかを解説します.

2. ポストソース分解 (Post-Source Decay: PSD)

質量分析に利用されるイオン化法の中で, イオン化の際, 分子がフラグメンテーションを起こすことなく気相のイオンが生成する一群の方法をソフトイオン化法と言います. MALDI 法はこのソフトイオン化法の一つですが, MALDI 法で生成したイオンの中には, イオン生成時には分解しなくても, イオン自身をもつ過剰な内部エネルギーによって検出器に到達するまでに分解するものがあります. この現象はメタステーブルイオン分解 (Metastable Ion Decay) と呼ばれ, 分解するイオンは準安定イオン, もしくはメタステーブルイオンと呼ばれています.

分子内の結合の解離エネルギーよりも高い内部エネルギーをもって生成したイオンは, 時間が経過すれば必然的に分解してしまいます. イオン源では分解しなくても, イオンの加速が完了した後, 電場, 磁場が存在しないドリフト空間に入ってからリフレクトロンや検出器に到達するまでの空間で分解することがあります. MALDI TOFMS では, このイオンのメタステーブル分解を, イオン源以降で

の分解という意味でポストソース分解 (Post-Source Decay: PSD) と呼んでいます.

PSD を促進させるためには, イオンの内部エネルギーを高めるために照射するレーザー強度を強くする方法や, CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) など, イオンの内部エネルギーが高まりやすいホットマトリックスと呼ばれているマトリックスを用いる方法があります.

広義の PSD は, このドリフト空間におけるメタステーブル分解に加え, ドリフト空間の残留ガス分子との衝突によって起こる分解も含まれています. 微量の残留ガス分子に頼らず, 積極的に不活性ガスを導入してガス分子と衝突させてフラグメンテーションを誘起させることも可能です. この場合はメタステーブル分解というよりも衝突誘起解離 (Collision-Induced Dissociation: CID) に属するイオンの分解です.

3. 通常型のリフレクトロンを用いた PSD プロダクトイオンの検出

Fig. 1 は, 一般的なリフレクトロンモードにおける PSD と PSD プロダクトイオンマススペクトル (PSD マススペクトル) の測定を模式的に示しています.

分解前のプリカーサーイオン (Precursor Ion) を ●⁺ で表し, それぞれプリカーサーイオンの 3/4, 2/4, 1/4 の質量をもつ PSD プロダクトイオンがドリフト空間で生成したと仮定しています (Fig. 1B).

イオン源 (Ion Source) を抜け, 質量分離部であるドリフト空間 (Drift Space) に入ったメタステーブルイオンは, 過剰な内部エネルギーをもっているため, リフレクトロンに入る前に分解します (Fig. 1A). ドリフト空間に入ってから分解したとしても加速は完了していますのでそのまま

略語

CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸), CID: collision-induced dissociation (衝突誘起解離), MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化), PSD: post-source decay (ポストソース分解), TOF: time-of-flight (飛行時間), TOFMS: time-of-flight mass spectrometry (飛行時間型質量分析法), MS/MS: mass spectrometry/mass spectrometry (タンデム質量分析法)

Fig. 2. 通常型リフレクトロンを用いた PSD プロダクトイオンの検出とマスペクトルの測定. [文献 1 の図 2 を転載, 改変]

等速運動を続けます。すなわち、質量が減少してもプリカーサーイオンと等しい速度で飛行を続けるわけです。リニアモードの場合は、この分解の後から検出器に到達するまでの間に加速や減速されることはありませんので、質量が変化しても飛行時間に変化はなく、計測される m/z 値は分解前のプリカーサーイオンと同じになります。したがって、リニアモードの場合はプリカーサーイオンも PSD プロダクトイオンもマスペクトル上では同じピークとして検出されます。

一方、リフレクトロンモードでは、質量の異なるプリカーサーイオンと PSD プロダクトイオンは分離されます。ドリフト空間を飛行している PSD プロダクトイオンは、分解していないプリカーサーイオンと同じ速度で飛行していますが、減少した質量の分だけ運動エネルギーは減少しています。この運動エネルギーの違いがリフレクトロンに入射してからの飛行距離に影響してきます。リフレクトロンは、たとえば坂道を登るようなものですので、運動エネルギーが減少している PSD プロダクトイオンは、坂道を登る勢いがプリカーサーイオンほどありません。そのためプリカーサーイオンに比べてリフレクトロンの奥に入っていくことはできません (Fig. 1A & C)。その結果、リフレクトロンに入ってから質量 (m/z) の大きなイオンほど飛行する距離は長くなり、飛行時間も長くなります。

リフレクトロンによって反転してきたイオンを検出器 (Detector) で検出し得られたマスペクトルが Fig. 1D です。リフレクトロンモードでは、プリカーサーイオンと PSD プロダクトイオンの飛行時間が異なるので、それぞれ異なる m/z をもったイオンとして分離されます。

4. 通常型のリフレクトロンを用いて PSD プロダクトイオンマスペクトルを取得する際の問題点

これまで説明してきたように、リフレクトロンモードでは、プリカーサーイオンと PSD プロダクトイオンを異なる m/z をもったイオンとして分離することは可能です。しかし、分離したすべての PSD プロダクトイオンを、リフレクトロンモードの特徴である高い質量分解能で測定できるわけではありません。

一般的リフレクトロンにおいては、効率よくイオンを検出し高い質量分解能を得るために必要なエネルギー収束や方向収束が効果的に行われる領域 (Effective Area) は V_0 近傍のみです (Fig. 1C)。この Effective Area は、マスペクトル上ではプリカーサーイオンの m/z 近傍に限られます。ドリフト空間で生成した PSD プロダクトイオンは、質量が小さくなったことで運動エネルギーが減少します。そのためにリフレクトロンの坂道を途中までしか登れず、Effective Area に入ることができないわけです。その結果、得られるマスペクトルは、プリカーサーイオンだけが低い質量分解能をもったピークとして観測でき、PSD プロダクトイオンは、質量分解度の低いブロードなピークとして検出されるか、イオンの軌道がずれて検出することができません。またブロードなピークとして検出されたイオンも、プリカーサーイオンの m/z から離れれば離れるほど質量分解度の悪いピークとして観測されます (Fig. 1D)。

このような拡散したプロダクトイオンも効率よく、かつリフレクトロンモードの特徴である質量分解度の高いマスペクトルとして検出するためには、それぞれの PSD プロダクトイオンの運動エネルギーに適切なリフレクトロン電圧を設定して測定を繰り返し、それぞれの測定における有効な部分 (Effective Area) をつなぎ合わせてマスペク

Fig. 3. カーブドフィールドリフレクトロンを用いた PSD プロダクトイオンの検出とマスペクトルの測定. [文献 1 の図 3 を転載, 改変]

トルを再構成する必要があります (Fig. 2).

Ion Source において 20 kV で加速する場合を例に挙げて説明します. 加速電圧が 20 kV の場合, 通常はリフレクトロン電圧も 20 kV (厳密には $20 + \alpha$ [kV]) に設定されます. この条件では, Fig. 1D のマスペクトルと同様, プリカーサーイオンは高い質量分解能を保った状態で測定できますが, プリカーサーイオンよりも m/z の小さな PSD プロダクトイオンは高い質量分解能で測定することはできません (Fig. 2 Spectrum A).

リフレクトロン電圧を 15 kV に設定すると, プリカーサーイオンの 3/4 の質量をもった PSD プロダクトイオンだけは高い質量分解能で測定することができます (Fig. 2 Spectrum B). この場合, プリカーサーイオンは 20 keV の運動エネルギーをもっていますので, リフレクトロンを通り抜けてしまい, 反転させ検出することはできません. 1/2 の質量をもったイオンや 1/4 の質量をもったイオンも高い質量分解能で測定することができません.

同様に, 10 kV にすると 1/2 の質量をもったイオンのみ (Fig. 2 Spectrum C), 5 kV にすると 1/4 の質量をもったイオンだけを高い質量分解能で測定することができます (Fig. 2 Spectrum D).

実際の測定では, すべての PSD プロダクトイオンを高い質量分解能で測定するために 10 以上に分割して各収束範囲を測定する必要があります. そのため質量分解度の高

い PSD マスペクトルを得るためには通常のマスペクトルの測定に比べて 10 倍以上のサンプルと時間を消費してしまうことになります.

さらなる問題点は, PSD プロダクトイオンを高い質量分解能で測定できたとしても, 検出されたそれぞれのピークの m/z 値が高質量側にずれることです. リフレクトロン電圧を減少させたためにその分イオンを反転させるまでの時間や, 反転させてリフレクトロンから出射させるまでの時間が延びてしまいます. その分飛行時間が長くなりますので, 検出する際の見かけの m/z は大きくなってしまいます.

したがって, 分割して測定した PSD マスペクトルを再構成する際は, 各々のセグメントに対して適切な質量校正を個別に行い, 伸びてしまった横軸を調節したうえでつなぎ合わせる必要があります. 一般的にはこの作業は測定解析用のソフトウェアを利用して行います.

5. カーブドフィールドリフレクトロンを用いた PSD プロダクトイオンの検出

Johns Hopkins 大学の Robert J. Cotter 教授によって発明されたカーブドフィールドリフレクトロンは, 収束可能な領域が広いという特長を備えています. カーブドフィールドリフレクトロンでは, プリカーサーイオンのみならず, すべてのプロダクトイオンを収束可能な Effec-

Table 1. PSD マスペクトル測定におけるカーブドフィールドリフレクトロンと通常型リフレクトロンとの比較

	感度	測定時間	容易さ	定量性・再現性	試料消費量
カーブドフィールドリフレクトロン	○比較的高い	○短い	○容易	○比較的高い	○比較的少ない
通常型リフレクトロン	△比較的低い	×長い	×複雑	×低い	△比較的多い

Fig. 4. デフレクターを利用したプリカーサーイオンの選択

- (a) イオン源において●⁺と○⁺2種類のイオンが生成したとします。質量は、●⁺<○⁺です。
- (b) 2種類のイオンはイオン源から同時にドリフト空間に入りますが、質量 (m/z) の差から●⁺イオンのほうが先に偏向板を通過します。このときのデフレクターの電圧は、●⁺イオンが正確にリフレクトロンに入射するように設定されています。その後で質量の大きな○⁺イオンがデフレクターを通過します。そのときは、デフレクターの電圧を変え、○⁺イオンの軌道を曲げてリフレクトロンに入射させないようにします。この図には示していませんが、●⁺イオンよりも質量の小さなイオンは●⁺イオンよりも早くデフレクターを通過します。そのときもデフレクターの電圧を変えてイオンをリフレクトロンに入射しないようにします。
- (c) ●⁺イオンがデフレクターを通過した後、リフレクトロンに入射する前に一部のイオンが分解して PSD プロダクトイオンが生成します。リフレクトロンに入射する直前までは、分解していないプリカーサーイオンと PSD プロダクトイオンの飛行時間は同じです。リフレクトロンに入射した後は、それぞれの質量 (m/z) の違いによって飛行時間が異なりますので、プリカーサーイオンと PSD プロダクトイオンが分離されます。

tive Area に入れることが可能となり、収束させた状態で一度に検出することができます (Fig. 3A, B, & C). すなわち、PSD マススペクトルを得るために、リフレクトロン電圧を変化させ、サンプルを消費しながら何度も測定し、スペクトルをつなぎ合わせる必要はありません (Fig. 3D). 収束できないイオンを捨てることもありません。

1度のレーザー照射で全範囲の PSD プロダクトイオンが検出でき、PSD マススペクトルを得る方法としては一般的なリフレクトロンを用いた方法よりもカーブドフィールドリフレクトロンを用いたほうが感度は高くなります (Table 1).

6. デフレクター (偏向板) を用いた プリカーサーイオンの選択

PSD プロダクトイオンは、一定の条件を満たせばイオン源で生成したすべてのイオン (プリカーサーイオン) から生じます。試料が単一の化合物であれば、生成した PSD プロダクトイオンは、原則として単一のプリカーサーイオンに由来していますので、PSD プロダクトイオンの情報によって解析対象の化合物の構造情報を得ることが可能となります。試料がペプチドであれば、アミノ酸配列の情報を得ることが可能となります。

一方、試料が、タンパク質のトリプシン消化物のように複数のペプチドや化合物の混合物である場合は、異なるペプチドや異なる化合物由来の PSD プロダクトイオンが混在したマススペクトルが得られることになります。そのためにせっかくプロダクトイオンマススペクトルを得たとし

ても、その情報から構造を導き出すことは困難です。これでは MS/MS 様の測定ができるとは言えません。

通常の、空間的な MS/MS (Tandem MS in Space) においては、プロダクトイオンマススペクトルを取得する際、特定の m/z をもったプリカーサーイオンを一段目の質量分離装置で選択し、そのイオンを解離させています。

PSD を利用した解析においては、イオン源とリフレクトロンとの間のドリフト空間にデフレクター (偏向板)[†]を設置し、これを制御することによって、特定の時間を通してイオン群だけをリフレクトロンに入射させることが可能となります (Fig. 4). これによって、試料が混合物であっても特定のイオンに由来する PSD プロダクトイオンのマススペクトルを取得することが可能となり、擬似的な MS/MS を行うことができます。

PSD プロダクトイオンは、MALDI のイオン源で生成し

[†] デフレクター (偏向板) とは、イオンの軌道と垂直に電位差を設けて、飛行中のイオンの軌道を曲げるためのデバイスです。飛行時間型質量分析計において、同様にプリカーサーイオンの選択を行う「イオンゲート」と呼ばれるデバイスがあります。このデバイスもデフレクターの一種です。「イオンゲート」の名称はイオンの遮断・通過を切り替える機能を強調するために付けられたものです。デフレクターは Fig. 4 のように金属板を2枚平行に並べた構造をしています。イオンゲートにはこのほかに針金を格子状に並べた構造のものもあります。技術的には全く同じではありませんが類似している部分も多々あります。本解説の趣旨は、デフレクターとイオンゲートの差異を理解していただくことが目的ではありませんので、プリカーサーイオンを選択するデバイスを「デフレクター」の名称で統一しました。

Fig. 5. Renin Substrate の MALDI TOF マススペクトル (A) と PSD マススペクトル (B). [文献 1 の図 5 を転載, 改変]

たイオンがイオン源以降のドリフト空間で分解して生成したものです。PSD プロダクトイオンの m/z 自体は分解前のイオンと比べて減少していますが、加速が完了した状態でドリフト空間に入っていますので、ドリフト空間で分解した後も分解しないプリカーサーイオンと同じ速度で同時にデフレクターを通過します。したがって、デフレクターを使って特定のプリカーサーイオンを選択することによって、そのイオンから生成した PSD プロダクトイオン群を同時に選択することができます。

7. PSD マススペクトルの測定例

Fig. 5 は、カーブドフィールドリフレクトロンを備えた MALDI-TOF 型質量分析計を用いて、ペプチドの一つ Renin Substrate を測定した例です。

Fig. 5A が通常のリフレクトロンモードで測定したマススペクトルです。試料分子のプロトン付加分子 $[M+H]^+$ のほかに、低質量側にマトリックス由来のイオンが観測されています。

Fig. 5B が Renin Substrate のプロトン付加分子 $[M+H]^+$ をプリカーサーイオンとした PSD マススペクトルです。この測定では、目的の $[M+H]^+$ だけをリフレクトロンに入射させるために、特定の時間以外に通過するイオンはデフレクターにより偏向させて、リフレクトロンに入射しないように設定し、測定しています。

相対的に強い信号強度で観測されているプリカーサーイオン $[M+H]^+$ 以外に、多数の PSD プロダクトイオンが観測されています (Fig 5B)。 a_n , b_n , c_n は、ペプチドのアミノ酸配列を反映したイオン群であり、このマススペクトルでは専ら a シリーズのイオンが観測されています。また低質量領域には、構成アミノ酸の情報を得ることができる

Immonium Ion 群が観測されています。カーブドフィールドリフレクトロンを用い、これらのイオンのすべてを同時に測定しているため、つながり目のない PSD マススペクトルが得られています。

また、PSD マススペクトルを、横軸の m/z の領域を分割することなく同時に測定できるということは、同一条件で発生した PSD プロダクトイオンを測定することが可能となります。それゆえに、すべての PSD プロダクトイオンを半定量的に検出することができ、比較的再現性よく PSD マススペクトルを得ることが可能となります (Table 1)。

8. おわりに

これまで説明してきたように、PSD プロダクトイオンを利用する MS/MS 様の解析法は、ソフトイオン化とは言えエレクトロスプレーイオン化法に比べて過剰な内部エネルギーもったイオンを生成させる MALDI 法と、リフレクトロンを備えた飛行時間型質量分析計の特徴を活かした方法です。

さらにカーブドフィールドリフレクトロンによって、通常のリフレクトロンを用いて PSD マススペクトルを測定する際のデメリットを克服し、一般的な MS/MS を行う感覚で PSD プロダクトイオンマススペクトルを得ることが可能となっています。

文 献

- 1) “なぜリフレクトロンモードで MS/MS が可能なのか?”, MALDI-MS Technical Report No. 3, 株式会社島津製作所 田中耕一記念質量分析研究所, 京都 (2007).

Keywords: Post-source decay, Time-of-flight mass spectrometer, Matrix-assisted laser desorption/ionization, Curved field reflectron