MALDI インソース分解質量分析法における マトリックス開発の現状と今後の展望

Developments in Matrix Molecules for MALDI-ISD Mass Spectrometry

浅川大樹

Daiki ASAKAWA

国立研究開発法人 産業技術総合研究所
計量標準総合センター 分析計測標準部門

(Received June 1, 2016; Accepted July 4, 2016)

1. はじめに

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) を用いたタンパク質の同定は、ペプチドマスマフィンガープリンティング (PMF) と呼ばれる手法により行われるのが一般的である。PMFはまずタンパク質のジスルフィド結合を切断し、トリプシンなどの消化酵素で消化し、生成した消化ペプチドをMALDI-MSで測定、得られたマスマスペクトルをMASCOT (Matrix Science) などのデータベースと照合するというプロセスで行われる。PMFでのタンパク質同定において重要なことは消化ペプチドの質量を正確に計測することであり、生体分子をフラグメンテーションさせることなくイオン化することができるMALDI-MSはこの用途に適した計測法である。

上記のように、MALDIはフラグメントフリーのソフトイオン化として利用される一方で、試料に照射するレーザーの強度を上げて測定を行うことで、試料分子のフラグメンテーションを誘起することができる。このフラグメンテーションは大きく2種類に分けられ、それぞれMALDIイオン源での分解、インソース分解 (ISD)¹⁾と飛行時間型質量分析計内での分解、ポストソース分解 (PSD)²⁾として知られている。PSDは単分子分解であり、使用マトリックスには依存せず、試料イオンの性質や内部エネルギーによってフラグメンテーション経路が決定され、衝突誘起解離 (CID) と類似のフラグメンテーションが起こることが多い。一方、MALDI-ISDはマトリックス分子から試料ペプチド主鎖のカルボニル酸素原子に水素ラジカルが移動することに伴うフラグメンテーションである³⁾。このメカニズムからも推測されるように、MALDI-ISDで得られる結果は使用したマトリックスに依存する。近年、MALDI-ISD測定におけるマトリックス開発や分解メカニズムの研

究が活発に行われており、より微量の試料を正確に同定することが可能となってきた。本解説ではMALDI-ISDのマトリックス開発の現状と今後の展望を中心に述べたいと思う。

2. MALDI-ISDのマトリックス

MALDI-ISDは1995年にBrown, Lennonによって、ペプチドおよびタンパク質のc', y', z'イオンを生成するフラグメンテーションとして報告された¹⁾。本報では2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (2,5-DHB) がマトリックスとして用いられていた。その後、高山によってジヒドロキシ安息香酸およびトリヒドロキシ安息香酸異性体のMALDI-ISD用マトリックスとしての能力が検討されており、2,5-DHBがMALDI-ISDに最も適していると報告されている⁴⁾。近年の研究報告により、安息香酸誘導体では、5-アミノサリチル酸 (5-ASA)⁵⁾、2-アミノ安息香酸 (2-AA)⁶⁾などがより優れたMALDI-ISD用マトリックスとなることが明らかにされている。

一方、福山らはナフタレン骨格を有するマトリックス、1,5-ジアミノナフタレン (1,5-DAN) をマトリックスとして用いることで、MALDI-ISDによりペプチド・タンパク質中のジスルフィド結合の切断が効率的に起こることを明らかにした⁷⁾。さらにQuintonらは1,5-DANによるMALDI-ISDはジスルフィド結合の切断のみでなく、ペプチド結合主鎖のN-C α 結合を効率的に切断し、ペプチド・タンパク質のシーケンシングに有用であることを示した⁸⁾。このナフタレン系化合物についても5,1-アミノナフトール (5,1-ANL)、1,5-ジヒドロキシナフタレン (1,5-DHN) などのMALDI-ISD用マトリックスが報告されている⁹⁾。

さらに、最近、新しいMALDI-ISDのメカニズムとして酸化性マトリックスを用いることで、水素ラジカル引き抜きによりC α -C結合の切断が起こることが明らかにされている¹⁰⁾。水素引き抜きMALDI-ISDに適したマトリックス

連絡先: d.asakawa@aist.go.jp

としては、サリチル酸を酸化性官能基であるニトロ基で誘導体化した5-ニトロサリチル酸 (5-NSA)¹⁰⁾や電荷移動錯体のドナー分子として有名なTCNQを骨格とする誘導体¹¹⁾などが報告されている。さらに最近、この5-ニトロサリチル酸の異性体スクリーニングによって、3-ヒドロキシ4ニトロ安息香酸 (3H4NBA) などの優れたマトリックスが見つかり、今後の発展が期待される¹²⁾。また、ホルミル基は酸化還元両方の反応を誘起するため、5-ホルミルサリチル酸をマトリックスとして用いると水素付加および引き抜きのMALDI-ISDが同時に観測される¹⁰⁾。

これまで述べた代表的なMALDI-ISD用マトリックスを

図1. 代表的なMALDI-ISD用マトリックス。

図1に、ペプチドのフラグメンテーション過程を図2に示す。MALDI-ISDの詳細なフラグメンテーションメカニズムについては筆者が*Mass Spectrometry Reviews*誌に寄稿した総説¹³⁾に記載してあるので参照いただきたい。図2に示したように水素付加、および水素引き抜きMALDI-ISDは異なるフラグメントを与えるため、同一の試料にこれら2種類のマトリックスを用いて測定を行い、結果を比較することでペプチドのアミノ酸配列解析を確実に行うことができる¹⁴⁾。

3. MALDI-ISD測定に適したマトリックスの条件

これまでにMALDI-ISDに適したマトリックス分子について紹介したが、ここではMALDI-ISDに適したマトリックスの状態について述べる。MALDIのマトリックスとして液体マトリックスなども用いられることがあるが、MALDI-ISDはマトリックス結晶にレーザーを照射することで誘起される反応であり、液体マトリックスや非結晶性マトリックスを用いた場合には起こらない¹⁵⁾。具体例として図3に2,5-DHBと1,5-DAN、これらのマトリックス2,5-DHBと1,5-DANを2:1で混合し、液体マトリックスとして使用した場合のMALDI-ISDスペクトルを示す。2,5-DHBおよび1,5-DANを単独でマトリックスとして用いた場合、MALDI-ISDによりc'イオンが生成することがわかる。一方、これらのマトリックスから構成される液体マトリックスを用いた場合には、図3cに示したようにc'イオンは全く検出されなかった。次に、2,5-DHBと1,5-DANを1:1で混合して使用した場合の例として、マトリックス結晶の偏光顕微鏡写真、およびイメージング測定結果を図4に示す。偏光顕微鏡の結果から、この混合マトリックスでは縁に結晶が生成し、中央部は非結晶となることが確認

図2. MALDI-ISDのメカニズム。(D. Asakawa, *Mass Spectrom. Rev.*, 35, 535-556 (2016) より転載。)

できる。イメージングの結果から、プロトン化分子はすべてのスポットから生成する一方で、MALDI-ISD由来の c' イオンは緑のマトリックス結晶からのみ検出される。つまり中央の非結晶部からはプロトン化分子は生成するが、MALDI-ISD由来のイオンは観測されない。より詳細なメカニズムの議論は総説¹³⁾を参照していただきたいが、これらの実験結果から、MALDI-ISDにおけるラジカル生成にはマトリックス結晶へのレーザー照射が必要であることが強く示唆されている。

次にマトリックス結晶へのレーザー照射により生成したペプチドラジカルの反応について述べる。まず水素付加のMALDI-ISDでは図2aに示したように、生成したペプチドラジカルは $N-C_\alpha$ 結合の切断により、 c' と z ラジカルを生じる。この z ラジカルはさらなるフラグメンテーションにより w イオンを与えるが、ブルーム中でマトリックスと衝突することにより z' を生成する反応も競争的に起こる。同様

に、水素引き抜きMALDI-ISDでは生じたペプチドラジカルのフラグメンテーションと、マトリックスによる再度の水素引き抜きによる $[M-2H]$ の生成が競争的に起こる(図2b)。このフラグメンテーションとマトリックスとの衝突によるラジカル再結合反応のどちらが優先的に起こるかはMALDIブルーム内での試料とマトリックスの衝突頻度に依存すると考えられる。この衝突頻度は使用マトリックスに依存し、MALDIで生成するイオンの初速度の測定から見積もることができると報告されている¹⁶⁾。MALDI-ISDの実験においては試料イオンの初速度が低い、すなわち試料とマトリックスの衝突頻度が低いほど分解が優先的に起こるという結果が得られており、MALDIの理論的なモデルと一致する^{11), 17), 18)}。このMALDIで生成するイオンの初速度測定はMALDI-ISDのマトリックス開発において重要な情報を与える。

4. MALDI-ISDのアプリケーションの展望

還元性マトリックスを用いたMALDI-ISDは $N-C_\alpha$ 結合の選択的な切断という電子捕獲解離(ECD)¹⁹⁾、電子移動解離(ETD)²⁰⁾と一部共通のフラグメンテーションを伴う。MALDI-ISDはタンパク質の直接シーケンシングが可能といった利点が報告されていながら²¹⁾、その後登場したECD, ETDほど脚光を浴びることはなかったように思う。この原因は二つあると筆者は考えている。一つ目はイオン源内での分解反応であるため、混合物試料に適用できないこと、二つ目はMALDI-ISDの効率が低いことである。そのため、測定には単離した数十pmol以上のペプチド・タンパク質試料が必要であった。

一つ目の混合物試料に適用できないという制限は、MALDI-ISDでは試料中に含まれるすべての成分(ペプチド)がフラグメントイオンを与えるため、混合物試料に対しては極めて複雑なスペクトルを与え、解析が不可能となることに由来する。これは、FTICRなどの高分解能質量分析計を用いてISDイオンの精密質量測定を行うことによって、シーケンシングに必要なISDイオンとそれ以外のイオンを区別することが可能となる²²⁾。またMALDI-ISDで生成したイオンをMS/MS測定することにより、当該イオンのより詳細な構造情報を得ることもできる²³⁾。この方法を用いることでチューブリンのアイソフォームも

図3. サブスタンスPのMALDI-ISDマスペクトル。マトリックスとしては(a) 2,5-DHB, (b) 1,5-DAN, (c) 2,5-DHBと1,5-DANを2:1のモル比で混合し作成したイオン液体を使用した。(Asakawa, et al., *J. Phys. Chem. B*, **117**, 2321–2327 (2013) より転載。)

図4. 2,5-DHBと1,5-DANを1:1のモル比で混合し作成した結晶のMALDIイメージング結果。試料としてサブスタンスPを加えた。左から光学イメージ、サブスタンスPの $[M+H]^+$ のイオンイメージ、 c'_9 のイオンイメージ、 $[M+H]^+$ と c'_9 のイオンイメージの重ね合わせ。(Asakawa, et al., *J. Phys. Chem. B*, **117**, 2321–2327 (2013) より転載。)

混合物のままMALDI-ISDによって直接分析が可能となった²⁴⁾。さらにこの方法を応用したISDイオンのC末端識別法²⁵⁾なども提案されており、より確実なシーケンシングが行えるようになる。さらにハードウェアだけでなく、混合物に適用するためのイメージング測定ベースのソフトウェアも開発されている²⁶⁾。これらの分析メソッド開発により、MS/MS測定と同様にとはいかないが、数種類のペプチド混合物試料であれば解析が可能となりつつある。

2つ目のMALDI-ISDの効率が低い点は、本解説で紹介したようにMALDI-ISD用マトリックス開発により改善されている。最近、著者らが提案したMALDI-ISDにおけるN-C α 結合の切断効率評価法によると、2,5-DHBは0.12%であるのに対し、1,5-DANでは4.79%であった²⁷⁾。すなわち、1,5-DANというマトリックスの発見によってMALDI-ISDの効率は約40倍に向上したことがこの結果から示される。実際に1,5-DANを用いたMALDI-ISDのアプリケーションは生理活性タンパク質のシーケンシング⁸⁾や、病理切片中タンパク質のイメージング²⁸⁾、ヘモグロビンミュータントの変異アミノ酸残基の決定²⁹⁾などが報告されている。近年MALDI-ISDの報告は増加の傾向にあり、さまざまなグループが新規参入し論文報告を行っている^{29)~32)}。MALDI-ISDの測定には特殊な装置が必要なく、通常のMALDI-TOFで行えるため、導入へのハードルは低い。本解説の読者の中からMALDI-ISDに興味をもち、実験を行う方がでてくれればと願っている。

このように本解説ではMALDI-ISDのマトリックス開発の重要性について述べた。しかしながら、最も広く用いられているマトリックス1,5-DANにおいても前述のようにN-C α 結合の切断効率は僅か4.79%であり、より優れたMALDI-ISD用マトリックスが必要であると筆者は考えている。

文 献

- 1) R. S. Brown and J. J. Lennon, *Anal. Chem.*, **67**, 3990 (1995).
- 2) B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann, and E. Jaeger, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 105 (1992).
- 3) M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 1044 (2001).
- 4) M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 420 (2001).
- 5) M. Sakakura and M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 979 (2010).
- 6) N. Smargiasso, L. Quinton, and E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **23**, 469 (2012).
- 7) Y. Fukuyama, S. Iwamoto, and K. Tanaka, *J. Mass Spectrom.*, **41**, 191 (2006).
- 8) L. Quinton, K. Demeure, R. Dobson, N. Gilles, V. Gabelica, and E. De Pauw, *J. Proteome Res.*, **6**, 3216 (2007).
- 9) I. Osaka, M. Sakai, and M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **27**, 103 (2013).
- 10) D. Asakawa and M. Takayama, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **22**, 1224 (2011).
- 11) D. Asakawa and M. Takayama, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 4016 (2012).
- 12) Y. Fukuyama, S. Izumi, and K. Tanaka, *Anal. Chem.*, **88**, 8058 (2016).
- 13) D. Asakawa, *Mass Spectrom. Rev.*, **35**, 535 (2016).
- 14) D. Asakawa and M. Takayama, *J. Mass Spectrom.*, **47**, 180 (2012).
- 15) D. Asakawa, D. Calligaris, N. Smargiasso, and E. De Pauw, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 2321 (2013).
- 16) B. Spengler and D. Kirsch, *Int. J. Mass Spectrom.*, **226**, 71 (2003).
- 17) D. Asakawa, N. Smargiasso, and E. De Pauw, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **24**, 297 (2013).
- 18) D. Asakawa, M. Sakakura, and M. Takayama, *Int. J. Mass Spectrom.*, **337**, 29 (2013).
- 19) R. A. Zubarev, N. L. Kelleher, and F. W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3265 (1998).
- 20) J. E. Syka, J. J. Coon, M. J. Schroeder, J. Shabanowitz, and D. F. Hunt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 9528 (2004).
- 21) V. Katta, D. T. Chow, and M. F. Rohde, *Anal. Chem.*, **70**, 4410 (1998).
- 22) D. Asakawa, D. Calligaris, T. A. Zimmerman, and E. De Pauw, *Anal. Chem.*, **85**, 7809 (2013).
- 23) D. Suckau and A. Resemann, *Anal. Chem.*, **75**, 5817 (2003).
- 24) D. Calligaris, C. Villard, L. Terras, D. Braguer, P. Verdier-Pinard, and D. Lafitte, *Anal. Chem.*, **82**, 6176 (2010).
- 25) D. Asakawa, N. Smargiasso, and E. De Pauw, *Anal. Chem.*, **86**, 2451 (2014).
- 26) T. A. Zimmerman, D. Debois, G. Mazzucchelli, V. Bertrand, M. C. De Pauw-Gillet, and E. De Pauw, *Anal. Chem.*, **83**, 6090 (2011).
- 27) D. Asakawa, N. Smargiasso, and E. De Pauw, *J. Mass Spectrom.*, **51**, 323 (2016).
- 28) D. Calligaris, R. Longuespée, D. Debois, D. Asakawa, A. Turtoi, V. Castronovo, A. Noël, V. Bertrand, M. C. De Pauw-Gillet, and E. De Pauw, *Anal. Chem.*, **85**, 2117 (2013).
- 29) R. Théberge, S. Dikler, C. Heckendorf, D. H. Chui, C. E. Costello, and M. E. McComb, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **26**, 1299 (2015).
- 30) S. Nicolardi, L. Switzar, A. M. Deelder, M. Palmblad, and Y. E. van der Burgt, *Anal. Chem.*, **87**, 3429 (2015).
- 31) X. Yu, N. P. Sargaeva, C. J. Thompson, C. E. Costello, and C. Lin, *Int. J. Mass Spectrom.*, **390**, 101 (2015).
- 32) C. L. McMillen, P. M. Wright, and C. J. Cassidy, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **27**, 847 (2016).