

## MALDI 法におけるプロトン化アミノ酸の生成効率とプロトン親和力の相関測定

(新潟薬科大学・薬)○柘植雅士、利根川篤史、三浦奨大、星名賢之助

【序】マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 法はエレクトロスプレーイオン化法と並び、熱に不安定な生体分子などのソフトイオン化法として広く利用されている。1990 年代の精力的な研究によりマトリックス剤の選定及び適したレーザー波長・フルエンスに関する知見が蓄積されてきた。その結果、現在利用されている MALDI システムでは数フェムト～数十ピコモル程度の試料で分析が可能である。しかしながら、質量分析法は破壊的測定法であるため試料を回収することができず、生体由来の試料等は入手・精製が困難である場合が多いため、測定感度の更なる向上が待たれている。

測定感度の向上を目指す上で MALDI のイオン化メカニズムの理解が不可欠である。MALDI 過程は「レーザー照射による脱離過程」、「レーザー光による一次イオン化過程 (マトリックス剤のイオン化)」、「分子間反応による二次イオン化過程 (試料のイオン化)」の三段階に分けることができる。イオン化過程に関しては Karas や Knochenmuss のグループを中心に精力的な研究が行われてきたが、分子レベルでの機構解明には至っていない。本研究では試料のイオン化が起きる二次イオン化過程に着目した。

二次イオン化過程における主な反応過程としてプロトン移動、陽イオン化、電子移動反応がある。MALDI 質量スペクトルでは大部分の試料分子 (A) がプロトン化された形で観測されるため、プロトン移動反応 (1式) が最も重要な過程であると考えられている。



ここで、M はマトリックス、A は試料を表している。このプロトン移動反応は反応のギブスエネルギー変化 ( $\Delta G$ ) が負の場合には、非常に効率良く進行することが知られている。

図1に反応 (1) のエネルギーダイアグラムを示す。

図中に示したように反応のギブスエネルギー変化はマトリックス剤と試料分子のプロトン親和力 (PA、反応「 $\text{X} + \text{H}^+ \rightarrow \text{XH}^+$ 」のエンタルピー変化  $\Delta H$ ) の差として表すことができる。反応 (1) が熱平衡に達した場合、 $\text{MH}^+$  と  $\text{AH}^+$  の生成比は  $\Delta G$  に依存すると予想される。そこで本研究では、生体分子の主要な Building Block であるアミノ酸を対象として、MALDI 機構におけるプロトン化による二次イオン化過程を調べた。

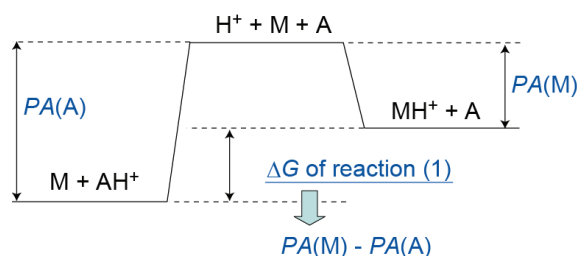


図1 反応 (1) のエネルギーダイアグラム。PA(X) は X のプロトン親和力を表す。

【実験】MALDI 装置 (Bruker Daltonics, autoflex III) を用いてスペクトル測定を行った。マトリックスとして  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸 (CHCA,  $5 \times 10^{-2}$  M in  $\text{H}_2\text{O}$  and MeCN)、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB, 0.13 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ) を、試料としてアミノ酸 12 種の水溶液 ( $5 \times 10^{-9}$  ~  $5 \times 10^{-1}$  M) を用いた。マトリックス溶液 0.5  $\mu\text{L}$  ないしは 1  $\mu\text{L}$  を試料プレート上に滴下した直後にアミノ酸溶液 1  $\mu\text{L}$  を滴下し、30 分程度で自然乾燥させることにより混合試料を作成した (Dried Droplet 法)。各混合比の試料を 3 つ作成した。

紫外レーザー光 (355 nm, < 100  $\mu\text{J}$ , 200 Hz) により脱離・イオン化させ、リフレクトロン型 TOF により検出した。試料の結晶状態によりシグナル強度にばらつきが生じるため、レーザー照射スポットを 10 ショット毎にランダムに移動させながら 2000 回積算して質量スペクトルとした。各試料に対し 2 回スペクトル測定を行い、計 6 つの質量スペクトルを得た。

【結果と考察】各アミノ酸に対して、試料プレート上に滴下するマトリックス (M) とアミノ酸 (A) の混合比 ( $C = \text{A}^0/\text{M}^0$ ) を  $10^{-7}$  から 10 の間で変化させてスペクトルを測定した。図2にマトリックスとして CHCA を、アミ

ノ酸としてヒスチジンをを用いた場合のプロトン化ヒスチジン (AH<sup>+</sup>)とプロトン化 CHCA (CHCA・H<sup>+</sup>)シグナル強度比のサンプル濃度依存性を示す。C = 10<sup>-4</sup>~10<sup>-2</sup> の領域においてシグナル強度比 (AH<sup>+</sup>/MH<sup>+</sup>)が直線的に増加している。C > 10<sup>-2</sup> の領域ではレーザー照射により生じるプロトンソース MH<sup>+</sup>が枯渇するため、試料の混合比が増大してもシグナル強度比の増加が抑制されている。

反応 (1) が熱平衡状態に達していると仮定すると、

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[AH^+][M]}{[A][MH^+]} \quad (2)$$

の関係式が成り立つ。また、MALDI プルームでは大部分が中性分子であるため、

$$\frac{[A]+[AH^+]}{[M]+[MH^+]} \approx \frac{[A]}{[M]} \approx \frac{A^0}{M^0} = C \quad (3)$$

と近似される。(2)、(3)式から[AH<sup>+</sup>]=[MH<sup>+</sup>]となる混合比 C<sub>e</sub>においては、

$$\ln C_e = -\frac{\Delta G^0}{RT} \quad (4)$$

の関係が得られる。そこで、すべての試料に対して図2と同様のプロットを作成し、強度比が 1 (AH<sup>+</sup>=MH<sup>+</sup>)となる混合比 C<sub>e</sub>を決定した。反応 (1) のギブズエネルギー変化 (ΔG<sup>0</sup>=PA(M)-PA(A)) に対して C<sub>e</sub>をプロットしたものを図3に示す。CHCA では Pro、Phe を除く7種のアミノ酸が 1450 K の熱平衡状態として再現された。また、DHB では His、Lys を除く 10 種のアミノ酸に対し 2050 K の熱平衡状態として再現された。このことは、アミノ酸のプロトン化過程は反応 (1) のマトリックスとアミノ酸の衝突反応により進行するというメカニズムを支持する。しかしながら、相関関係から外れるアミノ酸が見られたことから、マトリックスとアミノ酸の相互作用に依存した他のプロトン化過程の存在が示唆される。相関関係からの逸脱の大きさは、混合比として 10~100 倍であり、MALDI 過程におけるその寄与は決して小さくない。可能性として、アモルファス状態の混合試料に存在する水素結合による局所構造に由来した効果が考えられる。その局所構造に依存して MALDI プルームにおけるマトリックス・アミノ酸 2 量体の存在量が増えるため、この 2 量体を経由した直接的なプロトン化過程の寄与が試料の組み合わせにより大きく異なると予想される。

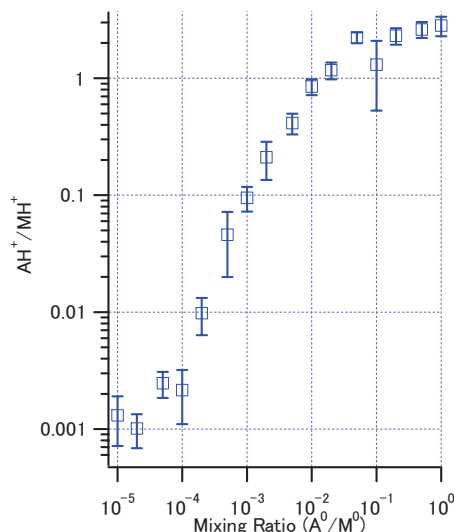


図2 His/CHCA におけるサンプル混合比とプロトン化シグナルの強度比プロット

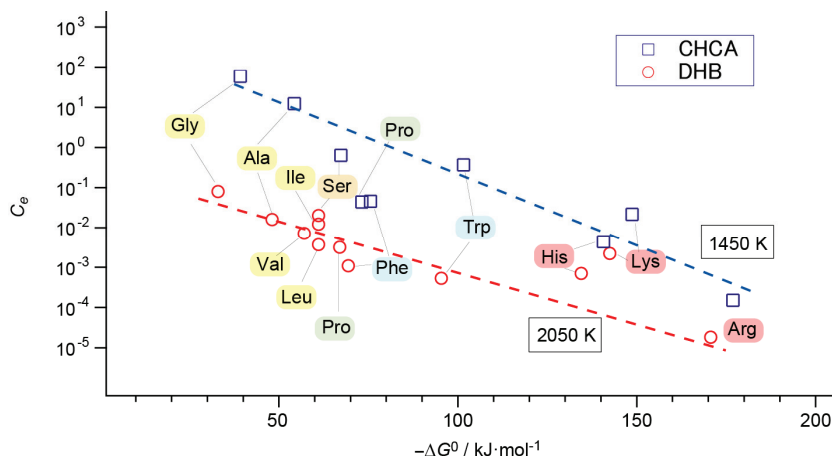


図3 C<sub>e</sub>と反応 (1) のΔG<sup>0</sup> の相関関係。破線は (4) 式による回帰分析結果を示す。