

イオンモビリティ衝突誘起解離質量分析と *ab initio* DFT 計算によるシアリルラクトース異性体イオンのフラグメンテーション機構の研究

(奈良女大理*, 奈良女大院人間文化**, 大阪府母子センター研***, JST・CREST[†], 日本ウォーターズ[‡])

○竹内孝江*, 藤田惇子**, 田尻道子***[†], 廣瀬賢治[‡], 和田芳直***

【序】ソフトイオン化の開発によって生体高分子のイオン化が可能となり、質量分析法は、高感度、高精度、迅速な同定法として糖鎖、オリゴ糖や糖ペプチドの構造解析には必要不可欠な方法になっているが、マスマスペクトルで観測されたイオンのフラグメンテーションを統一的に解明する理論は完成されておらず、構造解析は実測のマスマスペクトルから得られたいくつかの経験則に基づいて解釈されているのが現状である。

本研究では、シアル酸を部分構造にもつ 3'-sialyllactose (Neu5Ac α 2 \rightarrow 3 Gal β 1-4 Glc)、6'-sialyllactose (Neu5Ac α 2 \rightarrow 6 Gal β 1-4 Glc) のエレクトロスプレーイオン化(ESI)およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)マスマスペクトルにおけるフラグメンテーション機構を、イオンモビリティマスマスペクトロメトリー/質量分析法(IMS/MS 法)、*ab initio* 分子軌道法および密度汎関数理論(DFT)を用いて実験および理論的に検討した。

【MS 実験】 3'-sialyllactose および 6'-sialyllactose は市販試料(SIGMA)を DOWEX 陽イオン交換カラムを用いて脱塩後、1%ギ酸含有の 20%メタノール水溶液に溶解し、その 50mM 溶液を用いて飛行時間質量分析測定(TOFMS 測定)を、300mM 溶液を用いて IMS/MS 測定を行った。

ESI および MALDI 質量分析では、分子 M にプロトン H⁺やナトリウムイオン Na⁺が付加したプロトン付加分子[M+H]⁺やナトリウムイオン付加分子[M+Na]⁺が生成するが、H⁺や Na⁺の付加部位は一通りではなく、[M+H]⁺や[M+Na]⁺には同じ質量数をもついくつかの構造の混合物のマスマスペクトルが観測される。IMS/MS 装置(Waters SYNAPT HDMS)を用いて、3'-および 6'-sialyllactose の異なった構造の[M+H]⁺ (または[M+Na]⁺、[M+2Na]⁺) を IMS で分離した後、そのフラグメンテーションを TOFMS で観測した。IMS は N₂ ガス(0.5 mbar), Wave Velocity 150 または 1000 m/s, Wave Height 4.1 または 15.5V の条件下で行った。

【*ab initio* 計算】フラグメンテーション反応の始状態である 3'-sialyllactose および 6'-sialyllactose のすべての可能な[M+H]⁺および[M+Na]⁺、反応中間体イオン、遷移状態イオンおよび生成イオンの最適化構造とエネルギーを B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d)を用いて計算した。フラグメンテーション過程のポテンシャルエネルギー曲面を計算した。

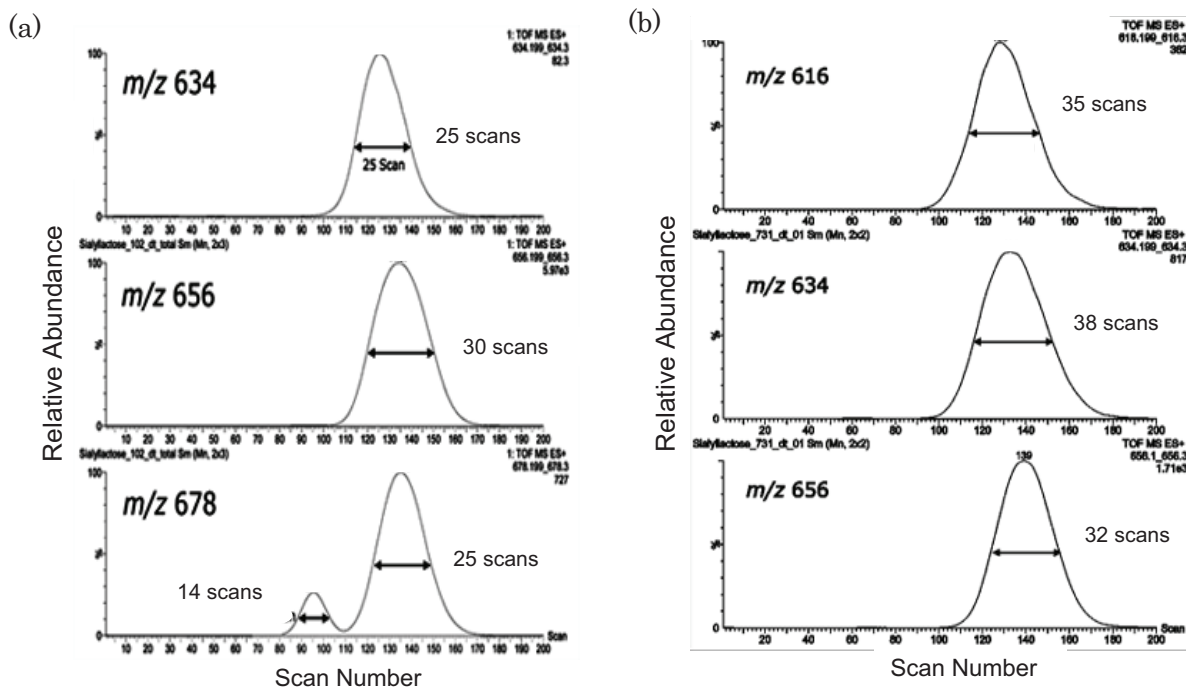


Fig. 1 3'-sialyllactose の IMS のマスドリフトグラム (a)脱塩処理前(b)脱塩処理後

【結果と考察】 Fig. 1 に 3'-sialyllactose の IMS のマスドリフトグラムを示した。(a)は脱塩処理前の試料、(b)は脱塩後の試料の結果である。横軸は Scan Number でイオンのドリフト時間に対応し、縦軸は最大ピーク強度を 100%にしたときの相対イオン強度である。脱塩前の試料では、 $[M+H]^+$ (m/z 634)、 $[M+Na]^+$ (m/z 656)および $[M+2Na]^+$ (m/z 678)が観測され、 m/z 678 イオンでは2つのピークが出現した。この2つのピークはドリフト時間が早い方から $[M+2Na]^+$ および $[(M+2Na)_2]^{2+}$ であった。一方、脱塩後試料では、 m/z 678 にピークは出現しなかった。 $[M+H]^+$ (m/z 634)、 $[M+Na]^+$ (m/z 656)の他に、 $[M+H]^+$ からの H_2O 脱離によるイオンが m/z 616 に出現した。

$[M+H]^+$ (m/z 634)のマスドリフトグラムのピークをドリフト時間によって3つに区分して、それぞれピークの衝突誘起解離(CID)スペクトルを、衝突エネルギー10, 15 および 20 eV で測定した。

大きな移動度をもつ $[M+H]^+$ ほど、また、衝突エネルギーが低いときほど、 H_2O 脱離による m/z 616 のピークの相対イオン強度が大きかった。

ドリフト時間が早い成分ほど Gal と Glc 間のグリコシド結合開裂による B_2 イオンがより多く生成した。この傾向は衝突エネルギーが低いときより顕著であった。

衝突エネルギーが増加するにつれてシアル酸の隣のグリコシド結合が開裂した B_1 イオンが増加した。これらの特徴は 6'-sialyllactose においても同様であった。

シアル酸残(Neu5Ac)基、ガラクトース残基(Gal)、グルコース残基(Glc)のすべての酸素、およびグリコシド結合酸素へのプロトン付加による安定化エネルギーの ab initio 計算結果から、Neu5Ac-Gal 間のグリコシド結合酸素に付加した場合がプロトン付加による安定化が最も大きいことがわかった。ポテンシャルエネルギー曲面の計算結果から、Neu5Ac と Gal の間のグリコシド結合の開裂の障壁エネルギーは小さく、このグリコシド結合は開裂しやすいことがわかった。また、Gal 残基の 2 位および 3 位からの H_2O 脱離の障壁エネルギーは低く、安定なプロダクトイオンを生成した。6'-は 3'-sialyllactose と比べ Gal 残基の周りの立体的な混み合いが少ないため、この部位からの H_2O 脱離は起こりやすいと予想される。