

# 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) の現状とその展望

茂里 康<sup>1\*</sup>・中田 誠<sup>2</sup>・絹見 朋也<sup>3</sup>

## MALDI-MSについて

ポストゲノム時代のニーズとして、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質などの生体分子や、薬物およびその代謝物を簡便に検出する手法の必要性が高まっている。質量分析法はこれらのニーズを満たす測定法であるが、機器のメンテナンスおよび測定操作の複雑さから、敬遠されてきた経緯がある。しかし田中耕一先生が開発し、ノーベル化学賞を授与された事でも有名になった、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) は、迅速・簡便・高感度という三拍子揃った優れた特徴を有するソフトイオン化法であり(図1)、従来のイオン化法で分解しがちであった生体分子のイオン化に向いている。その結果、1990年代半ばに市場に登場したMALDI-MSは、生化学に留まらず、医学・生物学に対しても飛躍的な発展をもたらした<sup>1,2)</sup>。本稿では、MALDI-MSの現状、問題点、その展望について概説する。

まず図2に、代表的なMALDI-MS用マトリックスの構造を示す。1980年代のMALDI-MS用マトリックス開発の黎明期には結果的に、日・独・米のグループが互いに開発を競っていた事になる。日本では、田中耕一先生が質量分析の別のイオン化法であるfast atom

bombardment (FAB) 法のマトリックスとして利用されていたグリセロールを、コバルトの超微粒子粉末と混ぜて、ソフトイオン化を行った。その結果、高分子やタンパク質の測定に成功した<sup>3)</sup>。一方ドイツのグループは、Karas教授とHillenkamp教授がニコチン酸を用いて、分子量が10,000以上のタンパク質のソフトイオン化に成功した<sup>4)</sup>。またロックフェラー大学のChait教授らのグループはケイ皮酸系の化合物に注目し、シナピン酸を用いたソフトイオン化に成功した<sup>5)</sup>。シナピン酸は現在でも、主にタンパク質の測定の際に、頻繁に用いられるマトリックスである。その後1990年代になり、Hillenkamp教授らは、水溶性が高く、ペプチド・糖鎖・高分子などの測定が可能で、不純物の存在下でも比較的測定が容易であるDHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) を用いたソフトイオン化に成功した<sup>6)</sup>。万能のように見えるDHBでも、針状の不均一な結晶という欠点がある。しかしDHBとMSA (5-methoxy-salicylic acid) とを9:1で混合することにより、マトリックスの性能を進化させたSuper DHBがその後開発された。一方Chait教授らはさらに、MALDI-MS用マトリックスのゴールドスタンダードとも言える、CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) の開発に、1992年に成功した<sup>7)</sup>。CHCAは取扱い

### MALDI-MSとは

試料を含む固体または液体のマトリックスに、レーザー光をパルス照射して、気相のイオンを生成させ、飛行時間型質量分析計等を組み合わせた質量分析法。

### 主な利用範囲

中・高分子量化合物 (タンパク質, ポリマー等) の質量分析の手段として汎用される。

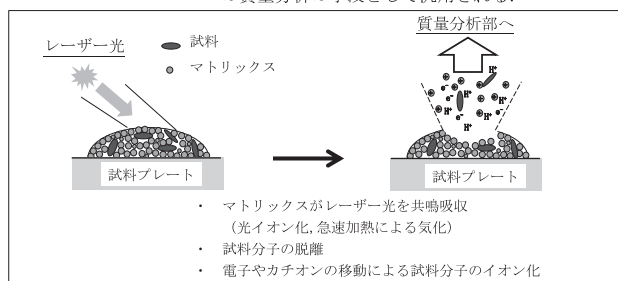


図1. マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS)

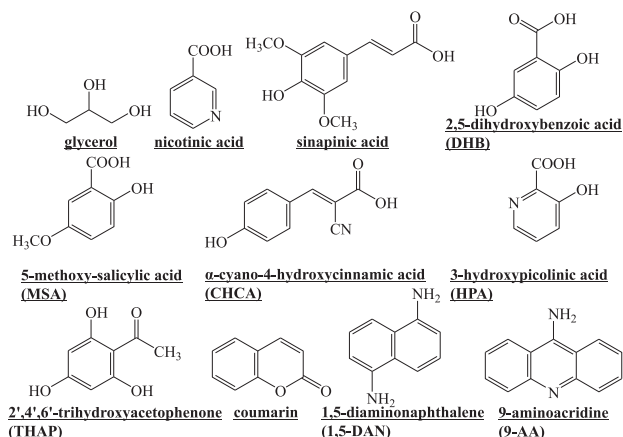


図2. MALDI-MS用マトリックス

\* 著者紹介 <sup>1</sup> (独) 産業技術総合研究所 (総括研究主幹) E-mail: yasushi.shigeri@aist.go.jp

<sup>2</sup> 株式会社ペプチド研究所 (品質管理部長) E-mail: nakata@peptide.co.jp

<sup>3</sup> (独) 産業技術総合研究所 (主任研究員) E-mail: t.kinumi@aist.go.jp

やすさ、高い再現性、および、ペプチドに限らない広い試料適用範囲を持っている。また、使用に際し、市販のCHCAを再結晶することにより、試料との混晶がさらに細かくなり、バックグラウンドノイズの低下が認められる。また2008年に開発された、CHCAの水酸基を塩素に置換したCl-CCA (4-chloro- $\alpha$ -cyanocinnamic acid) は、感度および配列包括度に向上が認められ、第二世代のマトリックスと言える。その後、各種マトリックスが下記のように開発された。核酸関連物質の測定に向いているHPA (3-hydroxypicolinic acid) やTHAP (2',4',6'-trihydroxyacetophenone)、糖脂質などの測定に用いられる coumarin 120 に代表されるクマリン系の化合物、強い還元作用によりペプチドやタンパク質中のシステイン同士のジスルフィド結合を還元し、ジスルフィド結合部位の推定に活用できる1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN)、塩基性の性質のため、負イオンを測定する negative mode でイメージング質量分析の際によく使用される、9-aminoacridine (9-AA) などがある。

このようにこれまで約30年近くMALDI-MS用マトリックスの研究開発が進められたが、現在よく使われているマトリックスは、依然としてケイ皮酸系の化合物であるCHCAや、シナピン酸、DHBなどである。質量分析法の中でMALDI-MSは、前記のような各種利点を有するが、使用するレーザーの波長領域に吸収帯を持つマトリックスが、必ず必要である。さらに測定の際には、脱塩した試料とマトリックスの混晶が、良好に形成されなければならない。これまでのマトリックスの多くは、マトリックス自身の分子イオンピーク ( $m/z$  値およそ100~250) や、マトリックス由来のピーク ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  付加イオンピーク、脱水ピーク、多量体ピーク) がMALDI-MS測定の際に観察され、低分子化合物の測定には向いていない。MALDI-MSを本当の意味での万能な質量分析法にするためには、低分子化合物の検出や、既存の方法ではイオン化しにくい高分子量のタンパク質、糖、炭水化物などに最適な、高機能化マトリックスを開発する必要がある。そこでランダム化合物ライブラリー (東京大学創薬オープンイノベーションセンター供与、約13,000化合物) を用いて、ペプチドを測定サンプルとして新規マトリックスを探索した。結果的には、感度(リン酸化ペプチドなど)、分解能(ペプチドマスマインガープリント) に関して、CHCAを凌駕する化合物は、あいにく見つけることはできなかった。しかしマトリックス機能を有する化合物の中には、導電性を意味する $\pi$ 共役系を持つ物が多数認められた。MALDI-MSの一般的な分析部は、飛行時間型である。生成したイオンは加速電圧を印加されて、検出部まで飛行していく。その際には、試料混晶を置いたサンプルプレートは、理論上導電性を有する必要がある。つまりマトリックス自身も導電性を有していれば、MALDI-MSの測定に有利である可能性が示唆された<sup>8)</sup>。さらにマトリックススクリーニ

ングの際に、カルボニル化合物と脱水縮合し、ヒドラゾンを生じる、ヒドラジンおよびヒドラジド化合物も多数見いだされた。そこで逆転の発想を行い、これらのヒドラジンおよびヒドラジド化合物とガス状アルデヒドである、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドと反応させ、ヒドラゾン反応物がそのままマトリックスとして機能する reactive matrix を開発し、ワンステップで気体分子をMALDI-MSで検出する手法を開発した<sup>9)</sup>。

## MALDI-MSの展望

MALDI-MS関連の最近の進展としては、マルチターン型、スパイラル型、イメージング質量分析法、微生物同定技術などがあげられる。マルチターン型は、分析部は飛行時間型ながら多重周回軌道を採用し、コンパクトさを追求したものである<sup>10)</sup>。一方、(株)日本電子から発売されているスパイラル型は、分析部は同じ飛行時間型を採用しているが、らせん状の軌道を持ち、飛行距離が約17 mという驚くべき飛行距離で、精密質量分析測定が可能であり、工業分析などの用途が期待できる<sup>11)</sup>。イメージング質量分析法については、疾患診断、マーカー探索、品質管理などの工業分析における利用が期待されるが、薬物動態解析における利用も有望視されている<sup>12)</sup>。微生物同定技術での利用に関しては、主にリボソームタンパク質をマーカーとして、既存のrRNAの遺伝子配列解析と併用することにより、精度の向上や安価、解析が容易などの長所がある<sup>13)</sup>。近年ではプランクトンのような、他の生物種にも利用されつつある<sup>14)</sup>。

基本的にMALDI-MSは、操作は簡便・迅速という長所があるが、混晶の状態、レーザーの照射位置やパワーにより得られるスペクトルが劇的に変化する場合が多い。油断は禁物である事を最後に述べておく。

## 文 献

- 1) Dreisewerd, K.: *Chem. Rev.*, **103**, 395 (2003).
- 2) Dreisewerd, K.: *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 2261 (2014).
- 3) Tanaka, K. et al.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 4) Karas, M. and Hillenkamp, F.: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 5) Beavis, R. and Chait, B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **3**, 432 (1989).
- 6) Strupat, K. et al.: *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **111**, 89 (1991).
- 7) Beavis, R. et al.: *Org. Mass Spectrom.*, **27**, 156 (1992).
- 8) Yasuda, A. et al.: *Eur. J. Mass Spectrom.*, **19**, 29 (2013).
- 9) Shigeri, Y. et al.: *J. Mass Spectrom.*, **49**, 742 (2014).
- 10) Aoki, J. and Toyoda, M.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **61**, 23 (2013).
- 11) Sato, H. et al.: *Mass Spectrom.*, **2**, A0014 (2013).
- 12) Takai, N. et al.: *Mass Spectrom.*, **3**, A0025 (2013).
- 13) Teramoto, K.: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **59**, 85 (2013).
- 14) Laakmann, S. et al.: *Mol. Ecol. Resour.*, **13**, 862 (2013).