

〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

## AXIMA-TOF<sup>2</sup>™ —新規 MALDI TOF/RTOF 質量分析計による生体高分子分析

島 圭介・市村克彦

### SUMMARY

With the development of proteomics, biological researchers are increasingly using mass spectrometer. Hence, it is required for the analytical instruments to analyze the many kinds of biomolecules immediately and easily. The AXIMA-TOF<sup>2</sup>™, a MALDI TOF-TOF system features a novel, dual ion gate capable of high resolution precursor ion selection and high energy CID cell. This instrument has a superior ability of protein identification. In addition, it can be applied to the study of different classes of biomolecules. The following three features show that AXIMA-TOF<sup>2</sup>™ can contribute to the analysis of biomolecules.

- 1) The unique curved field reflectron enables the acquisition of all PSD and CID fragment ion without stepping the reflectron voltage.
- 2) High energy CID-MS/MS can generate and detect a large amount of valuable product ions to get structural information.
- 3) The high performance monoPULSE ion gate can select target ion correctly from crowded MS spectra of complex samples such as mixtures and be able to measure MS/MS spectra.

Key words: matrix-assisted laser desorption/ionization, collision-induced dissociation, post source decay, TOF<sup>2</sup>, proteomics.

### 1. はじめに

MALDI (Matrix-assisted laser desorption/ionization)-TOF (Time-of-flight) 質量分析計はタンパク質等の生体高分子の分析に広く用いられている。MALDI-TOFMS は ESI (Electrospray ionization) 法と比較して試料の取り扱いが容易で、操作も簡便であり、質量分析計になじみが薄い研究者でも容易に使いこなすことができる。

プロテオーム解析においては、2次元電気泳動や高速液体クロマトグラフィーによって分離したタンパク質を迅速に同定する手段として、MALDI-TOFMS (Mass spectrometry) を用いたペプチドマスフィンガープリント (PMF) 法が盛んに用いられている。また、ペプチド断片の MS/MS 測定を行ない、観測された MS/MS スペクトルを基にしたデータベース検索によりタンパク質を同定する方法 (MS/MS イオンサーチ) は ESI 法で一般的に行われているが、MALDI 法においても同様に一般的となってきた。

しかしながら、これまでの MALDI-TOFMS の多くはイオン選択の分解能が高くないため、各イオンのピークが近接している場合はそれぞれを個別に選択し MS/MS 測定を行なうことができないという制約があった。また、MALDI-TOF/TOF 型のタンデム質量分析計は、PSD (Post source decay ; ポストソース分解) によって生じたフラグメントイオンをロスしてしまうという問題もあった<sup>1)</sup>。

さらには、タンパク質の同定に加えて翻訳後修飾や代謝物の解析も細胞機能の解析を行うためには重要であり、これらの解析に MALDI-TOFMS が利用される頻度も増えてきているが、実際の応用例は限られている。

本稿では、これらの点を踏まえて新たに開発された AXIMA-TOF<sup>2</sup> を紹介する。実際の分析例を示しながら、導入した新技術の生体高分子分析における有効性を示していく。

Application of AXIMA-TOF<sup>2</sup>™—Novel MALDI TOF/RTOF mass spectrometry for biopolymer analysis.

Keisuke Shima, Katsuhiko Ichimura; 株式会社島津製作所 分析計測事業部ライフサイエンス研究所

Correspondence address: Keisuke Shima; Shimadzu Co., Ltd. Life Science Business unit, Analytical & Measuring instrument division, 1, Nishinokyo-Kuwabaracho Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan.

## 2. 構成と特徴

装置の模式図を Fig. 1 に示す。装置は質量分析計本体と制御用 PC から構成されている。AXIMA-TOF<sup>2</sup> は、これまで AXIMA-CFR 及び、-CFRplus で培われてきた当社独自の Curved field reflectron (CFR) 技術を発展的に継承して開発された。Curved field reflectron とは PSD と CID (Collision-induced dissociation; 衝突誘起解離) によって生じた全てのフラグメントイオンを検出できる技術である<sup>2,3)</sup>。Fig. 2 に CFR による MS/MS 測定の原理を示す。イオンゲートを通じたプリカーサイオンから CID もしくは PSD により生成したフラグメントイオンがリフレクトロンで反射されるためには、各々のイオンの運動量に最適な電圧値を設定する必要がある。汎用の装置では段階的に電圧をコントロールするため、各ステップにおけるキャリブレーションと積算が必要である。CFR は曲線状の電場を有しているため、そのような煩雑な操作が必要ない。そのため、1 スキャン中に全てのイオンを収束することができ、1 回のレーザー照射で全質量範囲の MS/MS スペクトルが得られる。この非常に明るいイオン光学系により、特に MS/MS における高感度を達成している。

2004 年に、Curved field reflectron の開発者である Johns Hopkins University の Robert J. Cotter が「CFR を搭載したタンデム飛行時間型質量分析装置」の開発に関する論文を報告し<sup>1)</sup>、その後、島津/Kratos によって AXIMA-TOF<sup>2</sup> の製品化開発が進められた。AXIMA-TOF<sup>2</sup> は、高感度で質が高く情報量の多い MS/MS 解析を可能とすべく従来品である AXIMA-CFRplus を元に改良とさらなる高性能化が図られている。

### 2.1. 検出部

質量分離を行うための検出部は飛行時間型 (Time-of-flight; TOF) 質量分析計を採用している。高分子量試料用の Linear と高分解能・高精度用の Refletron の二つのモードを有している。前述のとおり、Refletron には高分解能と広分子量範囲を実現する島津グループの特許技術である CFR 技術を採用している。Curved field のデザインに改良を加えた結果プロダクトイオンの有効検出範囲が更に広がり、より高感度・高精度な MS/MS スペクトル分析を行えるようになった。

### 2.2. イオンゲート

MS/MS スペクトルは、MS スペクトル中の目的とするイオンが開裂して生じるフラグメントイオンの分子量を観測する。従って、目的イオンが開裂する前に目的以外のイオンを排除する必要がある。本装置では二つの Bradbury-Nielsen 型ワイヤーゲート<sup>4)</sup> を組み合わせた独自の monoPULSE 技術<sup>5)</sup> を採用している。Fig. 3 にその原理を示す。二つのワ

イヤーゲートはそれぞれ ±500 V から 0 V へ高電圧パルサーで瞬時に切り替えられる。ワイヤーに電圧が印加されている時には、イオンは通常の飛行軌道から外れ、ゲートに電圧が印加されていない時だけイオンは通過することができる。Fig. 3 の (2) と (3) にあるように最初のゲートはイオンゲートが開くタイミングを、二つ目のゲートはイオンゲートが閉じるタイミングを決める。最適なゲート間の距離と高電圧の ON-OFF の時間を調整することで、イオン選択分解能を、単一ワイヤーゲートを使用した場合の 100 から 400 まで大幅に向上することができた。

### 2.3. CID セル

高エネルギー CID を実現するために、コリジョンガスを導入できる CID セルを飛行管中に設置した<sup>1,6)</sup>。CID における衝突エネルギーは目的となるイオンが CID セルに入る直前に持っているエネルギーに比例する。AXIMA-TOF<sup>2</sup> ではイオンは 20 kV で加速されたエネルギーを持ったまま CID セルに導入されるため、He ガスをコリジョンガスとした場合に数十 eV という高い衝突エネルギーを実現することができた。

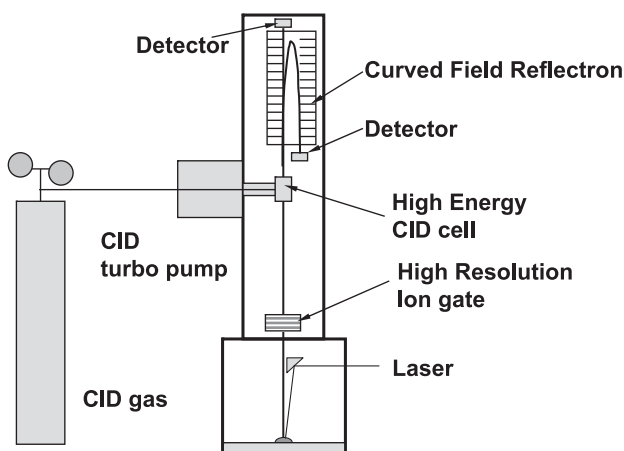


Fig. 1. Schematic diagram of AXIMA-TOF<sup>2</sup>™ main unit.

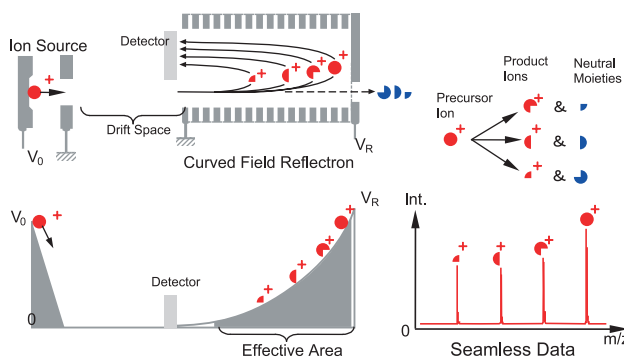


Fig. 2. Scheme of Curved Field Reflectron.

### 3. 実験

#### 3.1. 試料

すべての試薬は Analytical Grade のものを使用した. MALDI 用のマトリックス  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) と 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB) は LaserBio Labs 社 (Sophia-Antipolis, France) から購入した. Trifluoroacetic acid (TFA),  $\text{NaHCO}_3$ , 標準ペプチド ACTH1-17 ならびに L-A-Lysophosphatidylcholine Oleoy 1 (Lyso-PC-18:1) 標準脂質は Sigma 社 (Poole, UK) より購入した. また酵素消化標準試料, Bovine catalase (BC), Bovine glutamic dehydrogenase (BGD), Bovine serum albumin (BSA), Myoglobin と Conalbumin は Michrom Bioresources Inc 社 (CA USA) から購入した. Methanol, Acetone と Acetonitrile (ACN) は Rathburn 社製 (Walkerburn, UK) を使用した.

#### 3.2. 試料調製

ACTH (fragment1-17) は ACN と 0.1%TFA 水溶液の 1:1 (v/v) 混合液に, 酵素消化標準溶液は 10 mM Ammonium bicarbonate (pH 7) に溶解し, 濃度 2 pmol/ $\mu\text{L}$  になるように調整した. ペプチド用のマトリックス溶液は ACN と 0.1% TFA 水溶液に溶解させた CHCA (5 mg/mL) 溶液を使用した. 0.5  $\mu\text{L}$  の試料溶液と 0.5  $\mu\text{L}$  のマトリックス溶液を専用の試料ターゲットに添加し, ターゲット上で混合, 風乾した. 標準脂質 Lyso-PC は 30 mM  $\text{NaHCO}_3$  Methanol 溶液に 50 pmol/ $\mu\text{L}$  の濃度になるように調整した. まず 15 mg/ml に調整した DHB アセトン溶液を 0.3  $\mu\text{L}$  ターゲットに添加し, 脂質溶液を 0.8  $\mu\text{L}$  添加した後さらに 0.3  $\mu\text{L}$  添加して風

乾させた.

### 4. 結果

本装置で新しく導入した高エネルギーCID と高選択イオンゲート monoPULSE の特長を実際の応用例を示しながら詳述する.

#### 4.1. 高エネルギー CID

Fig. 4 に高エネルギーCID を用いた MS/MS スペクトルの一例を示す. 高エネルギー (20 kV) CID によって, ペプチド結合が開裂した b 系列, y 系列のイオンに加えて, 更にアミノ酸側鎖が開裂した w 系列, d 系列のイオンが検出されている. 側鎖が開裂したイオンの情報により, 質量が同一のロイシンとイソロイシンを区別することができるため, ペプチドの配列解析に有効である (Fig. 5). さらに, PSD スペクトルで検出されたイオンは CID スペクトルにおいても検出されている. これは, CFR の機構上フラグメントイオンを減速, 再加速する必要が無いために PSD で生じたイオンを漏れなく検出できるからである<sup>2,3</sup>. また, CID と PSD の切り替えは制御 PC 上のボタン操作により約 30 秒間で行なえる. 従って, CID-MS/MS で得られたスペクトルが複雑な場合は, よりシンプルな PSD のスペクトルを測定し, フラグメントイオンの帰属に利用することも容易である.

高エネルギー CID-MS/MS は, ペプチドだけではなく多様な化合物の構造解析に活用することが可能である. 脱離イオン化時の過剰エネルギーによる PSD では, 大きなエネルギーを発生する CHCA などの所謂“熱い”と言われてい

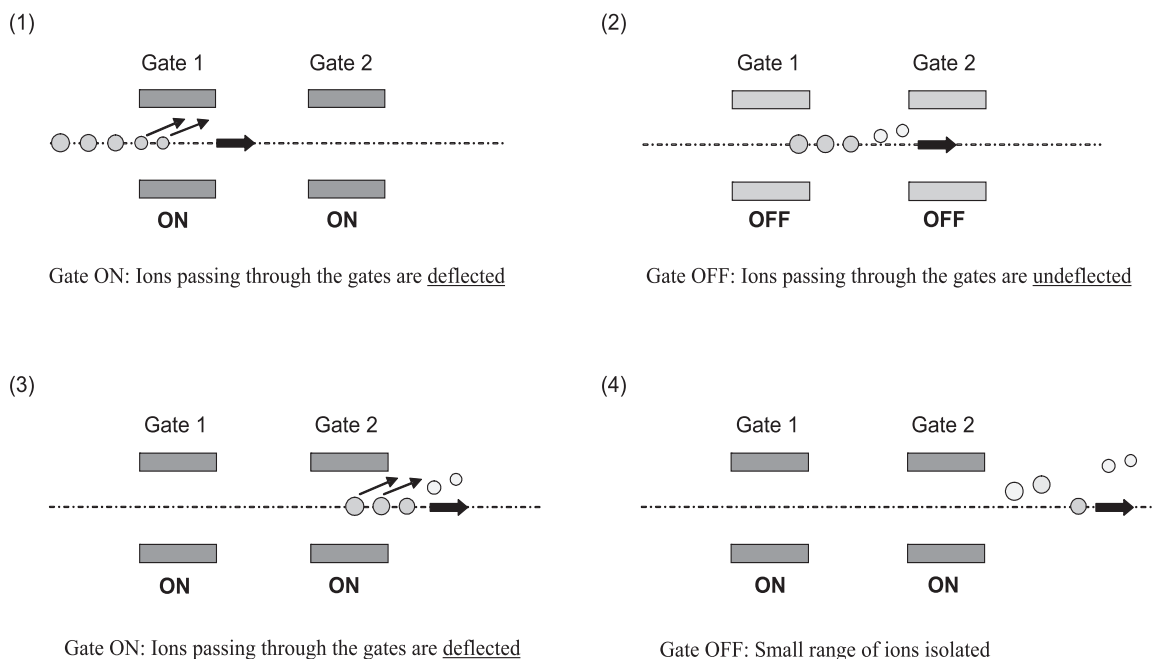


Fig. 3. Schematic diagram of monoPULSE™ ion gate.

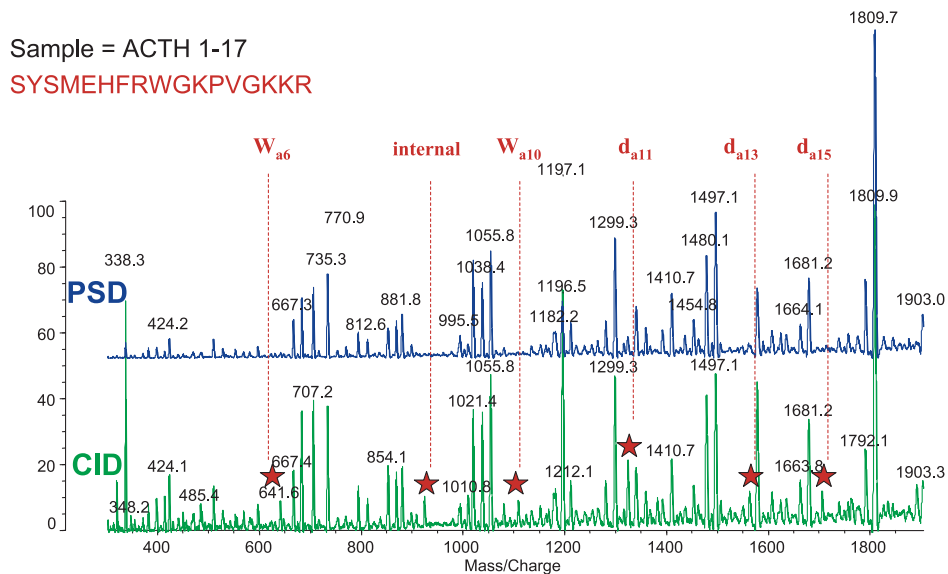


Fig. 4. MALDI-MS/MS spectra of ACTH (fragment 1-17) (2093.93 Da) acquired in post-source decay (PSD) mode (top) and in CID mode (bottom).

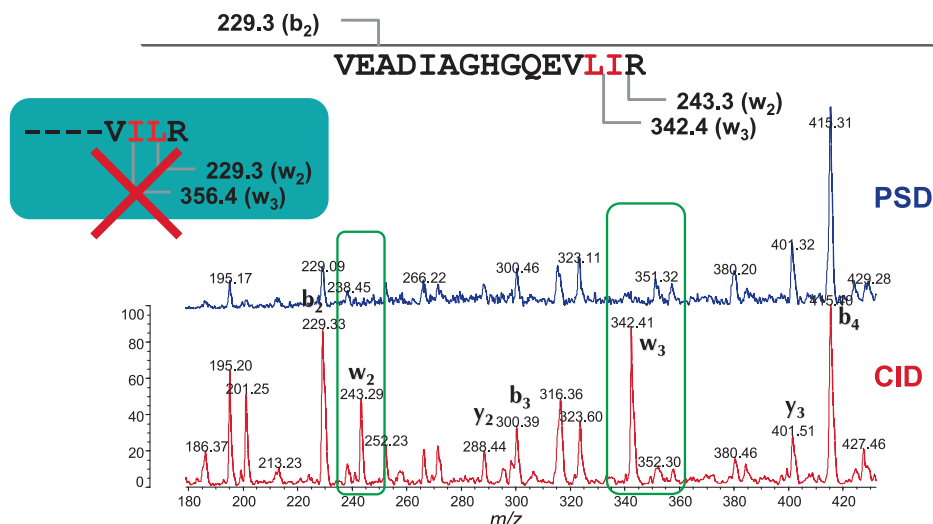


Fig. 5. MALDI-MS/MS spectra of myoglobin digest ( $m/z$  1606) acquired in post-source decay (PSD) mode (top) and in CID mode (bottom).

る特定のマトリックスを使った場合しか良好な MS/MS スペクトルを測定することができなかった。しかしイオンを加速したエネルギーによる CID ではマトリックスの種類に関係なく質の高い MS/MS スペクトルの測定が可能である。Fig. 6 (a) に“冷たい”マトリックスである DHB を使った脂質 Lyso-PC (18:1) の PSD スペクトルを示す。この PSD スペクトルから脂質の大まかな構造情報を得ることができる。しかし、PSD スペクトルではアルキル鎖中の二重結合の位置を決定するにはフラグメントイオンの情報が不足している。Fig. 6 (b) に Lyso-PC (18:1) の CID スペクトル (下段) と PSD スペクトル (上段) の比較を示した。図からも明らかなように CID スペクトルでは多くのフラグメントイオンが観測されている。Fig. 6 (c) Fig. 6 (d) は CID

スペクトルの一部をさらに拡大したものである。14 Da 間隔でフラグメントイオンが検出されており、構造式に示しているように各イオンの帰属が可能である。 $m/z$  331 から 385 の間には 54 Da のギャップがあり、アルキル鎖の開裂によるフラグメントイオンは検出されていない。このことは、アルキル鎖の 9-10 位に二重結合が存在することを強く示唆するものである<sup>7)</sup>。このように一般的に CID に適さないといわれている“冷たい”マトリックスでも、高エネルギー CID により構造解析に必要なフラグメントイオンを多数取得することができた。この分析例が示すように脂質では DHB、ペプチドでは CHCA というように測定対象によって最適なマトリックスは様々である。ペプチドの中でも、糖ペプチドには DHB が適しているというようにマト

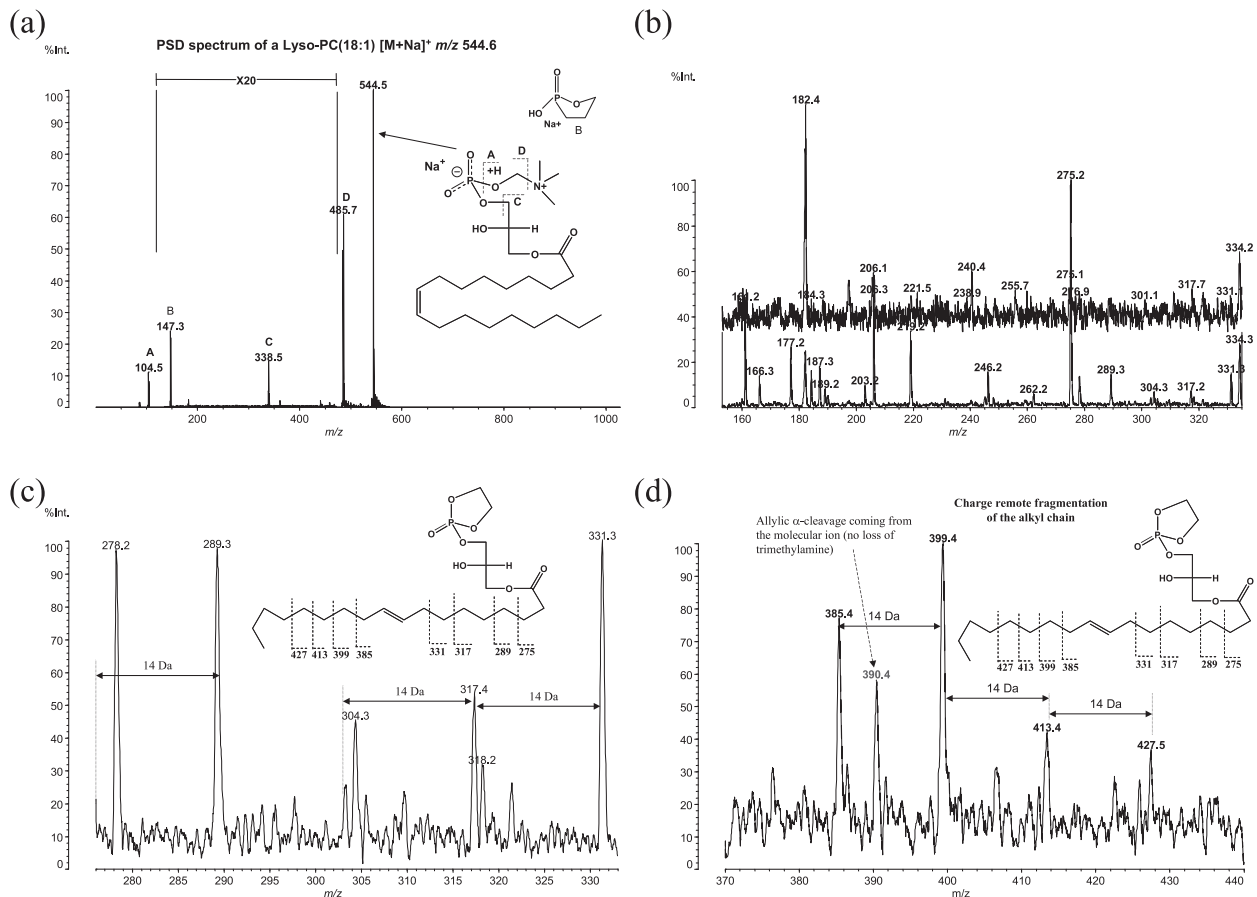


Fig. 6. (a) Entire mass range of the PSD spectrum of sodiated lyso-phosphatidylcholine; (b) A selected mass range of the PSD (top) and CID (bottom) MS/MS spectra (c) enlargement of the CID spectrum corresponding to the mass range  $m/z$  275–335; and (d) mass range  $m/z$  370–445.

リックスを種々選択する必要がある。マトリックスの種類を選ばずに構造情報豊富な MS/MS スペクトルが得られるということは、つまり、ペプチド、脂質、糖鎖など多種多様な化合物に加えて糖ペプチドのような複合化合物に対しても高エネルギーCIDによる構造解析が有効であるということを示す。

#### 4.2. 高選択イオンゲート monoPULSE

プロテオーム解析において、電気泳動や HPLC によるタンパク質、ペプチドの分離分画は必要不可欠な技術である。これらの手法で試料を分離分画することにより、はじめて質量分析によるタンパク質の同定が可能になる。しかし、HPLC と比べて分離能が高く多くのタンパク質を分離できる二次元電気泳動においても、1 スポット中に複数のタンパク質が含まれ解析が煩雑になることはそれ程珍しくない<sup>8)</sup>。このような試料の酵素消化物は、各々のペプチドのピークが近接しているために MS/MS スペクトル測定時のプリカーサイオンの選択に支障を来すことがままある。MS/MS スペクトルを測定するためには、目的となるイオンを高い分解能で選択する必要がある。

高選択イオンゲート monoPULSE でプリカーサイオンを

選択し、タンパク質の同定を行った例を Fig. 7 に示す。モデルサンプルとして、Conalbumin トリプシン消化物を用いた。Fig. 7 (a) に示されているように、モノアイソトピック質量がそれぞれ  $m/z$  1329.6, 1331.5, 1334.5 と近接した三つのペプチドについて、タンパク質の同定を試みた。 $m/z$  値が2しか差がないピークでも個別にプリカーサイオンの選択が可能であり (Fig. 7 の (b)), MS/MS スペクトルの測定, Mascot<sup>9)</sup> によるタンパク質同定を行うことができた (Fig. 7 の (c))。

もう一つの実施例を, Fig. 8 に示す。これは Bovine catalase (BC), Bovine glutamic dehydrogenase (BGD) と Bovine serum albumin (BSA) の消化ペプチド溶液をそれぞれ 2:1:1 に混合した試料の MS スペクトルである。挿入図に示している  $m/z$  1581.7, 1577.8 と 1567.7 のペプチドイオンを選択し、MS/MS スペクトルを測定した。Table 1 にイオン選択分解能を 200 と 100 とした時に得られた MS/MS スペクトルをデータベース検索にかけたときの Mowse<sup>9)</sup> スコアを示す。 $m/z$  1567.7 の MS/MS スペクトルは両者で大きな差は無く、BSA の 322-334 位の消化ペプチドであることを同定できた。その一方で  $m/z$  1577.8 と 1581.7 の MS/MS スペクトルではイオン選択分解能 200 と 100 で同定結果に大き

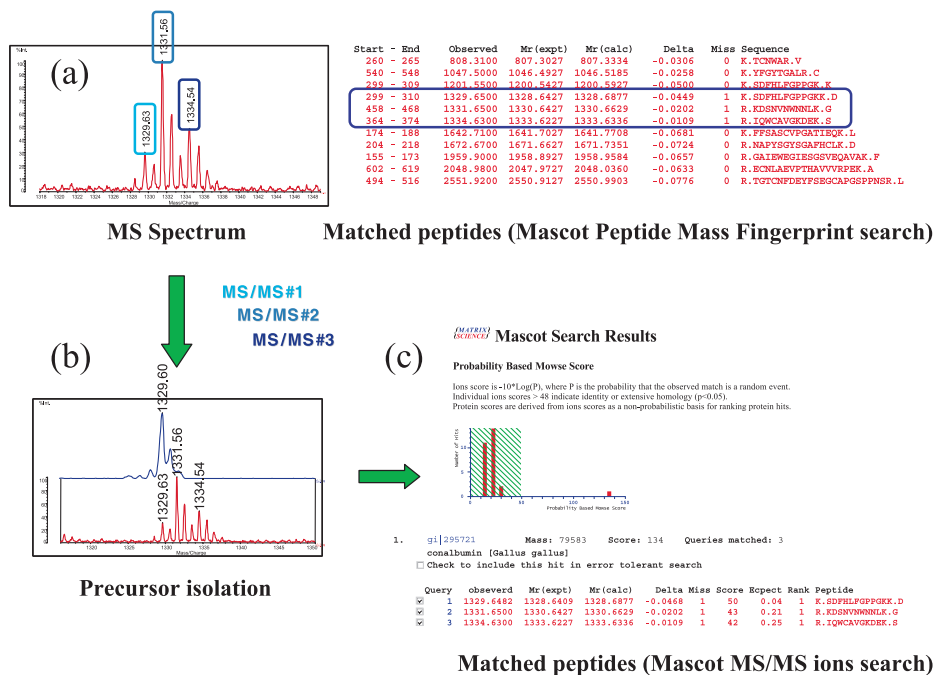


Fig. 7. High resolution precursor ion selection from the crowded mass spectrum and protein identification.

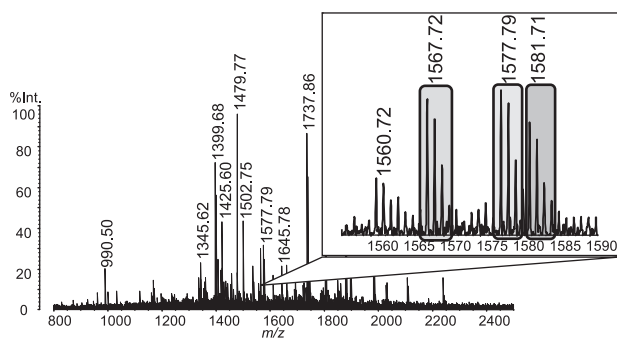


Fig. 8. MS spectrum of a mixture of digested three proteins.

な差が出た。イオン選択分解能 200 では両者とも Table 1 に示すような配列をもつペプチドであると高いスコアで有意な検索結果を得ることができたが、分解能 100 ではスコアが低くなりデータベース検索で有意な検索結果を得ることはできなかった。イオン選択の分解能を下げるとスコアが低くなった原因は、1つの MS/MS スペクトル中に複数のペプチド由来のフラグメントイオンが混在してしまったからである。このように複数のタンパク質由来の酵素消化物が混合している混みあった MS スペクトルにおいて、イオン選択の分解能がタンパク質同定結果に影響することが示された。試料を細かく分画しようとする、前処理の高難度化および試料のロスに繋がるおそれがあるが、イオン選択の分解能が高ければ分画は少なく済む。結果としてタンパク質同定結果の向上にも繋がる。また、HPLC と MALDI をオフラインで連結する LC-MALDI<sup>10)</sup> と組み合わせることにより、細胞・組織抽出物のような複雑な混合試料にお

Table 1. MS/MS ion search results of three trypsin digested peptides in complex mixture solution.

	gate resolution >200	gate resolution 100
m/z 1567.72 BSA 322-334	score 47	40
m/z 1577.8 BC 300-313	69	10
m/z 1581.7 BG 67-79	32	14

いても手間と時間をかけずに分析することが可能となる。

## 5. まとめ

今回、高エネルギー CID やプリカーサイオン選択の高分解能化が生体高分子の分析において有用であることを、実際の分析例を用いて示した。高エネルギー CID セルと高選択イオンゲート monoPULSE を導入した AXIMA-TOF<sup>2)</sup> はペプチドやタンパク質のみならず様々な生体高分子に対して高い質の情報量の多い MS/MS スペクトルを得ることが可能である。

- CFR 技術により PSD と CID によって生じたすべてのイオンを検出することができる明るいイオン光学系により、特に MS/MS における高感度を達成している。
- 高エネルギー CID により情報量が多い豊富なフラグメントイオンを生成させることができるため、構造解析に有用である。
- 多数の成分が含まれた混合試料においても目的のプリカーサイオンを正確に選択し、MS/MS スペクトルを測定できる。

このような特徴から、本装置はタンパク質同定から翻訳後修飾の解析にいたるまで広い範囲で生体高分子分析の分野に貢献することが期待される。

#### 文 献

- 1) Cotter RJ, Gardner BD, Iltchenko S, English RD. Tandem time-of-flight mass spectrometry with a curved field reflectron. *Anal Chem* 2004;76:1976–1981.
- 2) Cornish TJ, Cotter RJ, Todd PJ. A curved field reflectron time-of-flight mass spectrometer for the simultaneous focusing of metastable product ions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1994;8:781–785.
- 3) Cornish TJ, Cotter RJ. A curved-field reflectron for improved energy focusing of product ions in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1993;7:1037–1040.
- 4) Bradbury NE, Nielsen RA. Absolute values of the electron mobility in hydrogen. *Phys Rev* 1936;49:388–393.
- 5) Bowdler AR, Brookhouse I, Raptakis E. An ion selector with a plurality of deflection zones. UK patent 2005; GB2413213(A).
- 6) Cotter RJ, Gardner BD, English RD, Iltchenko SA. USA patent 2004;WO 2004/077488.
- 7) Belgacem O, Bowdler A, Brookhouse I, Brancia FL, Raptakis E. Dissociation of biomolecules using a ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight/curved field reflectron tandem mass spectrometer equipped with a differential-pumped collision cell. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006;20:1653–1660.
- 8) Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y and Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:9390–9395.
- 9) www.matrixscience.com.
- 10) Connolly J, Openshaw M, Rasso R, Martin R, Ojima N. AXIMA-TOF<sup>2</sup>™ を用いた LC-MALDI システムによる混合物中の複数タンパク質の同時同定. 島津評論 2006;63:11–18.