

〔特集：タンパク質分析のための最新質量分析装置〕

電場型フーリエ変換質量分析計 Orbitrap の仕組みと性能,  
そして LTQ Orbitrap について

窪田 雅之

## SUMMARY

Combining patented Orbitrap technology with the LTQ linear ion trap, Thermo Scientific's LTQ Orbitrap enables faster, more sensitive and more reliable detection and identification of compounds in complex mixtures. Its outstanding mass accuracy, mass resolution and reliable high sensitivity MS<sup>n</sup> performance make it a clear alternative to existing hybrid time-of-flight systems. Furthermore, Intelligent Data Dependent (IDD) instrument control provides unmatched flexibility with parallel scanning and MS/MS detection on both detector, LTQ and Orbitrap. This hybrid system displays its greatest force on Omics applications.

Key words: FTMS, Orbitrap, ion-trap, high-resolution, high-mass accuracy.

## 1. 最初に

プロテオーム解析における蛋白質の同定にはイオントラップ型と飛行時間型などの質量分析装置が使われている。イオントラップ型はMS/MSによる解析能力やその扱い易さ、飛行時間型は質量分解能、分析精度の高さを特徴とする。本来はどちらの能力も高いものが望まれるが、蛋白質データベースが充実してきたこともあり、MS/MSスペクトルのパターンマッチングで解析、同定できるケースが増えてきており、蛋白質を同定するだけであればイオントラップ型で能力は十分である。実際に世界中の多くの研究者がイオントラップ型MSを使って蛋白質同定を行っている。しかし、近年の研究では同定だけでなく、2D-Gelなどで行ってきた蛋白質の発現量差異解析を同定解析と同時にを行い、バイオマーカーを探索しようとする試みが盛んに行われている。LC-MSはゲルベースの実験に比べると再現性が高く、測定時間が短いことからハイスループットに実験を行えるメリットがある。さらに、ゲルでは泳動できない膜蛋白質や、分離できないペプチドを探索対象とすることができ大きなメリットがある。このような差異解析はMS/MSスペクトルではなくMSスペクトルで量を見積もるため、選択性は装置の質量分解能がそのまま反映される。蛋白質同定と発現量差異解析を行うにはMS/MSスペクトル

と高い質量分解能のMSスペクトルが同時に必要となってくる。このようなアプリケーションに対応するために質量分析計LTQ Orbitrapが開発され、これは大量のイオンをハンドリングできるリニアイオントラップ型のLTQ<sup>1)</sup>と、最新技術によって作られたOrbitrapアナライザ<sup>2)</sup>を組み合わせたハイブリッド型質量分析計である。

ここでは、Orbitrapの仕組みと基本性能、そしてLTQ Orbitrapについて紹介する。

## 2. Orbitrap アナライザ

## 2.1. アナライザの仕組み

Orbitrapアナライザは従来の質量分析計とは全く異なる、新しい原理に基づいた質量分析装置である。OrbitrapはFig. 1のように中心電極と碗のような形状をした電極①、②の3つの電極で構成されている。イオンはアナライザに向けて一定の電圧で加速され、同じエネルギーを持ってOrbitrap内に入る。すると、中心電極と電極①、②の間の電位差によってイオンは中心電極の回りを周回運動する。このとき、質量の異なるそれぞれのイオンは同じエネルギー(E)を持っているため、エネルギー保存則 $E=mv^2/2$ (E:エネルギー, m:イオンの質量, v:速度)に従い、イオンの質量によって周回する速さが違ってくる。この“速さ”の検出には、イオンが中心電極を周回する過程で電極①、

New technologies and performances on the LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer.

Masayuki Kubota; サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社 C&MS 営業本部 プロダクトマーケティング

Correspondence address: Masayuki Kubota; Thermo Fisher Scientific K.K., Product Marketing Group, C&MS Sales Department, C-2F, 3-9 Moriya-cho, Kanagawa-ku, Yokohama 221-0022, Japan.

(受付 2006 年 12 月 1 日, 受理 2007 年 1 月 25 日, 刊行 2007 年 3 月 15 日)

②に生じる誘導電流を検出し、周波数として“速さ”を検出している。軽いイオンは速度が速く、周波数は高くなる。逆に質量の大きなイオンは速度が遅くなり、周波数も低くなる。観測される誘導電流はこれらの周波数の合成波として観測、記録され、この波形をフーリエ変換することで質量スペクトルが得られる。この点でFT-ICR型MSに代表されるフーリエ変換型MSの一種といえる。

## 2.2. Orbitrapの性能

前述のようにOrbitrapはフーリエ変換型MSであるので、非常に高い質量分解能と分析精度が特徴である。飛行時間型MSの質量分解能が15,000程度であるのに対して、

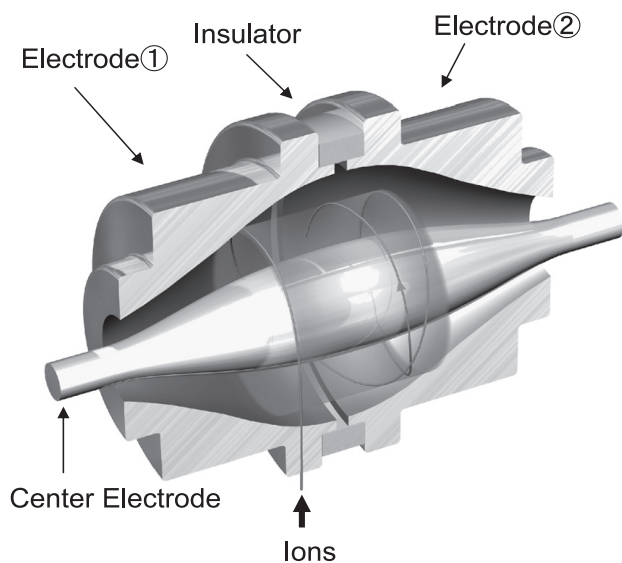


Fig. 1. Orbitrap.

Orbitrapは60,000(約1秒/スキャン)という高い分解能を有している。この分解能はFig. 2に示すように硫黄の同位体<sup>34</sup>Sと2つの<sup>13</sup>Cが含まれた同位体ピークの質量差0.0109 uを分離、識別することが可能である。フーリエ変換型MSの特徴である質量分解能は誘導電流を記録している時間に比例し、分解能を半分の30,000に設定すると、測定時間も約半分の0.5秒/スキャンとなる。また、分析精度は内部標準物質を入れないときで3 ppm、内部標準物質を入れることで2 ppmというFT-ICRMSに匹敵する能力を持っている。

## 3. LTQ Orbitrap

### 3.1. 装置の概略

LTQ OrbitrapはFig 3のような構造になっている。単体でLTQという製品名で販売しているリニアイオントラップとOrbitrapアナライザを組み合わせた構造で、リニアイオントラップ部分は単体製品LTQと同じ検出器をリニアイオントラップの左右に搭載するDual検出器仕様となっている。また、リニアイオントラップとOrbitrapの間にはC-Trapという特殊な形状のデバイスがあり、これがOrbitrapへイオンを送り出す役目をしている。このようにリニアイオントラップ、C-Trap、Orbitrapの3つのイオントラップデバイスが組み合わさった構造となっており、これらのトラップを駆使することでLTQ Orbitrapにはさまざまな機能、測定モードがあり、またLC-MSとしてルーチンで分析ができる。

### 3.2. オートゲインコントロール (AGC)

LTQ Orbitrapの性能維持に大きな役割を果たしている

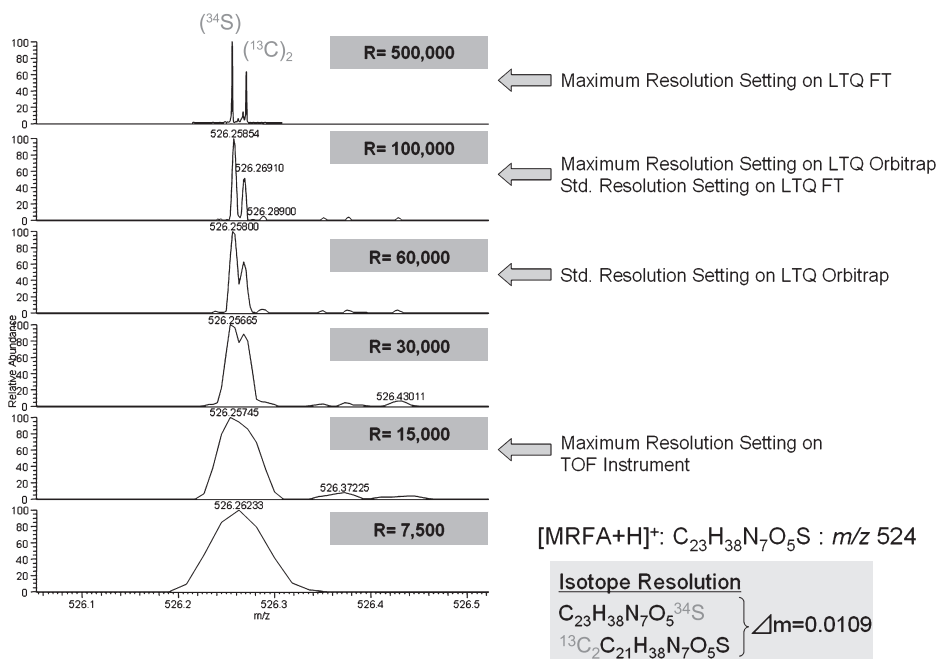


Fig. 2. Spectrum peak separation vs. mass resolution on the isotopic ion peaks of C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>N<sub>7</sub>O<sub>5</sub>S.

AGC 機能<sup>3)</sup>, そしてハイブリッド MS を最大限に活かした平行分析, そして3つのトラップを駆使して分析精度を向上させる Smart Lock Mass 機能<sup>4)</sup> について紹介する. この新しい Orbitrap アナライザはリニアイオントラップとハイブリッド化することで高い性能をルーチン的に使用できるようになっている. その大きな理由はイオン量の制御にある. 質量分析計の分析対象であるイオンは荷電粒子であるため, イオン同士はクーロン反発力によって斥力が働いている. 分析計の工作精度や性能を上げて, イオンが斥力によって空間的に広く分散していると, 質量分解能や分析精度をあげることができない. そのため, 大きく性能を損なわない程度にイオン量を制限する必要がある. しかし, LC-MS では時々刻々と試料濃度が変化していくため, データポイント毎にイオン量を制御することが不可欠である. この問題を解決するために開発された機能がオートゲインコントロール (AGC) であり, 1996 年から市販されているイオントラップ型質量分析計 LCQ において採用され, 今では技術的にも確立されたものとなっている. AGC は Fig. 4 に示すように, データとして記録するスキンの直前に短時間のスキュン (プリスキュン) を実行する. このプリスキュンで刻々と変わるイオン量をリアルタイムで計測し, Orbitrap に最適なイオン量に制御できる. ここまでのすべての動作は前段の LTQ のみで行われ, 最適な量にコントロールされたイオンのみ Orbitrap に送り出される. このようすることで大量のイオンを注入して Orbitrap を汚染してしまう心配はない. この AGC 機能によって標準物質を用いなくても 3 ppm という高い分析精度を維持できる.

### 3.3. 平行分析

LTQ Orbitrap では, リニアイオントラップと Orbitrap の両方を並行して動作させることが可能である. Orbitrap が誘導電流の周波数を記録している時間は, 分解能 60,000 で 0.7 秒である. この 0.7 秒の間, 前段のリニアイオントラップの

独立した検出器を使って, MS/MS スペクトルを取得することができる. イオントラップ型 MS であるため, 質量分解能や質量精度は高くないが, MS/MS スペクトルのパターンマッチングで解析するデータベース検索には高い能力を有する. この分析により, 一回の LC-MS 分析でペプチドの精密質量測定と MS/MS によるシーケンス情報の両方を取得することができる. MS/MS は, データディペンデントスキュン機能によって装置がリアルタイムで MS スペクトルを解析し, MS/MS を行うターゲットを決めていく. 分解能 60,000 の設定時では, 並行して3つから4つの MS/MS スペクトルを取得可能で, 最終的には約 1 秒間の間に 1 精密質量スペクトルと 3~4MS/MS スペクトルを取得することができる.

このようにペプチドの MS/MS スペクトル情報だけでなく, 精密分子量情報があるとデータベース検索時の候補を絞り込むことができることから, Fig. 6 のようにより正確な同定が可能となり, 分析結果全体で誤同定, 偽陽性を低減できる.

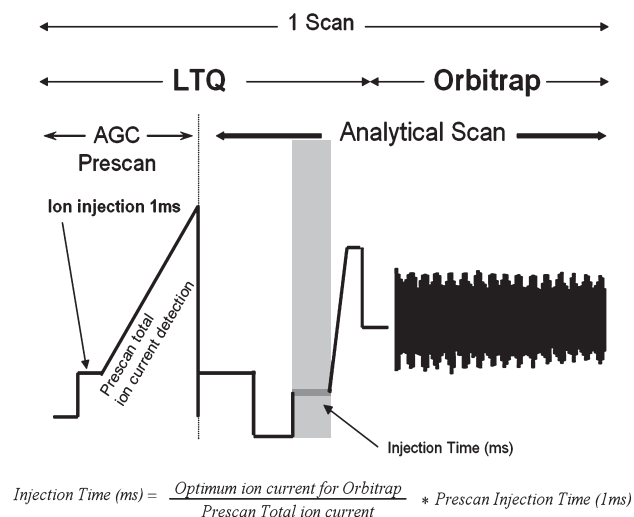


Fig. 4. Automatic Gain Control (AGC).

1. ....Store the linear ion trap with analyte ions
2. .... Transfer ions to the C-trap
3. .... Accelerate ions into Orbitrap as an ion packet
4. .... Ions oscillate between electrode 1 and 2
5. .... Detect ions with an ion image current

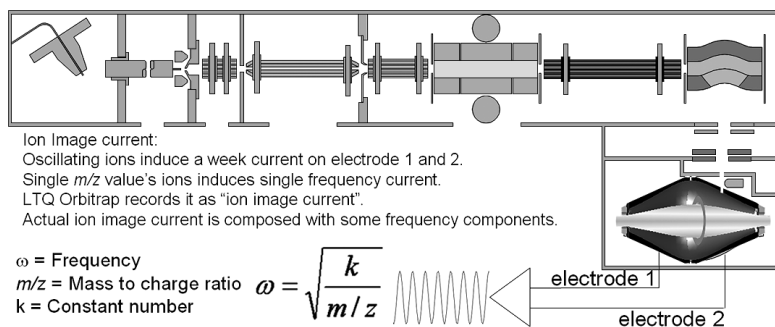


Fig. 3. Schematic of LTQ Orbitrap.

### 3.4. Smart Lock Mass 機能

Orbitrap は標準物質による質量校正をしなくても 3 ppm という高い質量精度があるが、この精度を保つためには装置のキャリブレーションを 1 週間に一回程度の頻度で行う必要がある。しかし、発現量差異解析を目的とした場合、再現性試験を含めた多くのサンプルを分析するため、分析精度を長期に安定させる仕組みが必要であった。LTQ Orbitrap はリニアイオントラップと Orbitrap の 2 つのアナライザのハイブリッドであるが、この 2 つのトラップの間に C-Trap という特殊な形状のトラップが存在する。通常、これはイオンにエネルギーを与えて Orbitrap に向けて加速するデバイスであるが、イオンを一時的に保管する場所として利用することができる。内部標準物質となるイオンのみをリニアイオントラップで分離し、これを C-Trap に送って貯めておく。リニアイオントラップで再度、分析対象となるイオンを貯めて、C-Trap の内部標準イオンと混ぜ

てから Orbitrap に導入する。このようにすることで常に安定した強度で内部標準物質由来のシグナルを得ることができ、安定した質量校正を行うことで 2 ppm という分析精度を実現することができる。また、この方法を使うことで、MS 測定にしか適用できなかった内部標準法を MS/MS 測定に適用することも可能となる。また、内部標準物質としては、移動相や環境中から混入してくる既知物質（フタル酸、シロキサン）を使うことができ、特に試薬などを準備する必要はない。

### 4. 発現量差異解析への応用

近年、さまざまな質量分析計を使って発現量差異解析が行う試みられている。これには質量分析計の性能・機能だけでなく、ラベル化試薬などを使った様々なアプローチがなされている。いずれの方法もサンプル処理や、相対定量を行うときの基準の取り方などまだ解決すべき課題が残っている。しかし、対象となるサンプルがあまりにも複雑な混合物であるために、従来の質量分析計では十分な解析ができないことも分かってきた。特にダイナミックレンジと分解能に対する要求が高いのではないかと推察される。ダイナミックレンジはアナライザの性能だけでなく、エレクトロスプレーイオン化のダイナミックレンジが影響するために評価するのが難しいが、1000 倍程度が現実的な範囲であるとみられる。これは LTQ Orbitrap が AGC によって制御できるダイナミックレンジの 10 分の 1 以下であり、イオン化による影響の方が大きいと思われる。一方、もうひとつの要求である分解能はアナライザ自体の性能であり、定量精度に大きく影響する。たとえば、BSA のみのトリプシン消化物を LC-MS で分析した例を Fig. 7 に示す。下段のユニット分解能 MS（このデータは前段の LTQ を使ってパラレル分析で得られた。）では 2 つのピークが重なって

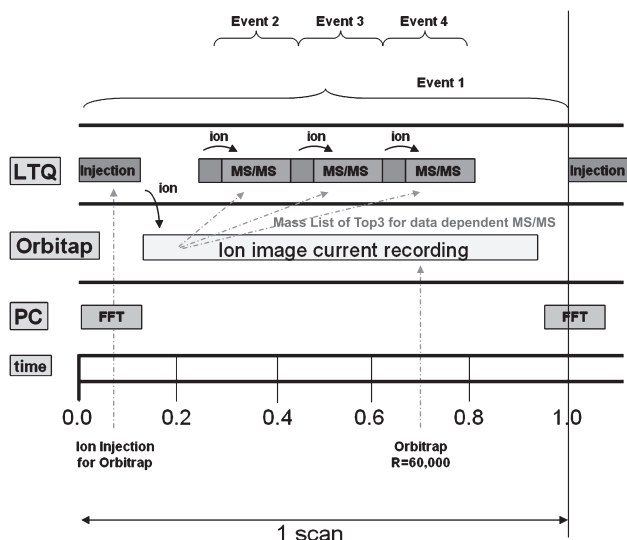


Fig. 5. Diagram of the parallel detection on LTQ and Orbitrap.

Database: SwissProt, Homo Sapiens

	Peptide Sequence	Theoretical mass	Delta (ppm)	Delta mass (mms)	Protein Description	M.W.
2 ppm (8)	DLSLDDFK	952.4627	0.0	0.0	Peroxiredoxin 3	27675
	FSISPDLSLS	952.4627	0.0	0.0	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 11	43487
	AEVTEEFK	952.4627	0.0	0.0	snRNA activating protein complex 43 kDa subunit	42967
	IAETDFEK	952.4627	0.0	0.0	dnaJ homolog subfamily C member 7	56405
	HSYQVYR	952.4627	0.0	0.0	Neuroepithelial cell transforming gene 1 protein	67698
	TQWAQYR	952.4627	0.0	0.0	Rab GTPase binding effector protein 1	99305
	AEDYEVVK	952.4627	0.0	0.0	Rho-associated protein kinase 1	158076
	HWEDIPR	952.4627	0.0	0.0	Otoferlin	226594
5 ppm (15)	SHPDNOVR	952.4601	2.7	-2.6	Methyl-CpG binding domain protein 3-like 2	22681
	HNSPQQNK	952.4601	2.7	-2.6	Myosin Vc	202666
	SMMNLQTK	952.4596	3.2	3.1	DNA topoisomerase 1	90669
	NTSSDSLTK	952.4587	4.2	-4.0	Probable histone-lysine N-methyltransferase, H3 Lysine-9 specific	81802
	STESSIGSGK	952.4587	4.2	-4.0	Latrophilin 3 precursor	161710
10 ppm (17)	YMQQNIK	952.4675	5.0	4.8	Neural-cadherin precursor	99789
	QYMQLGGR	952.4675	5.0	4.8	Surfeit locus protein 4	30374
	LEMEFQR	952.4562	6.8	-6.5	Ventral anterior homeobox 2	30374
	EMVFPSSR	952.4562	6.8	-6.5	Coagulation factor VIII precursor	266841

Fig. 6. Proposal peptide number within 2, 5 and 10 ppm mass tolerances.

ない。これに対し、定量の対象とするイオン  $m/z$   $823.053 \pm 2$  mmu の範囲でマスクロマトグラムを描かせると、ひとつのピークとして正確に面積値を求めることが可能となる。BSA 標品ですらこのような結果になることを考えると、非常に複雑なサンプルとなるバイオマーカー探索には質量分解能が必要不可欠であることが分かる。

さらに、実際のバイオマーカー探索では、目的物が事前に決まっているのではなく、コントロールサンプルと比較するなどして有意な変動がある対象を見つける必要がある。これらの作業はソフトウェアが実行する。ソフトウェアは人間の目のようにデータを経験と照らし合わせてみてくれないため、LC-MS システムに起因する変動成分をできる限り減らす必要がある。この LC-MS システムにおける変動とは、LC に起因する時間軸、MS に起因する質量軸のズレであり、変動しないことが重要である。しかし、LC、特に蛋白質解析に用いられるキャプラリー LC は溶出時間の安定性が決してよいとは言えず、場合によっては 1 分近くず

れることもある。また、カラムを交換することで容易に変動するものでもある。結局、LC-MS システム上で現実的に変動を抑えることができるのは、物理量である質量軸だけとなり、LTQ Orbitrap の質量精度はここで大きな役割を果たす。ソフトウェアはデータファイル間の時間軸のズレのみを補正（アライメント）し、多変量解析を実行する。もちろん、この時点で、Fig. 7 の例のように質量分解能による各溶出ピークの面積値への影響は甚大である。このようにしてアライメント、多変量解析を専用ソフトウェア SIEVE で実行した結果の一例を Fig. 8 に示す。

Fig. 8 の左下の図はファイル間の変動（変動比率）の大きなものを濃い色で表示している。それぞれのスポットをクリックすることで、比較した各ファイルのマスクロマトグラムや MS/MS による同定結果を表示することができる。このように発現量差異解析、特に蛋白質をターゲットにした解析では質量分解能、分析精度と同定のための MS/MS が同時に取得できている必要がある。

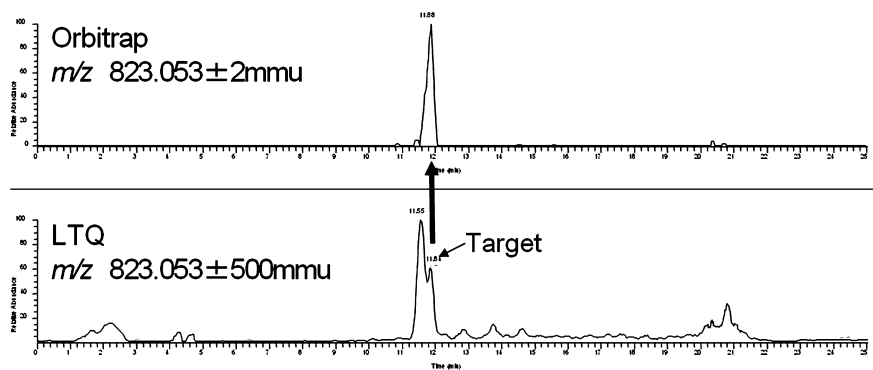


Fig. 7. Mass resolution effect on chromatographic peak detection.

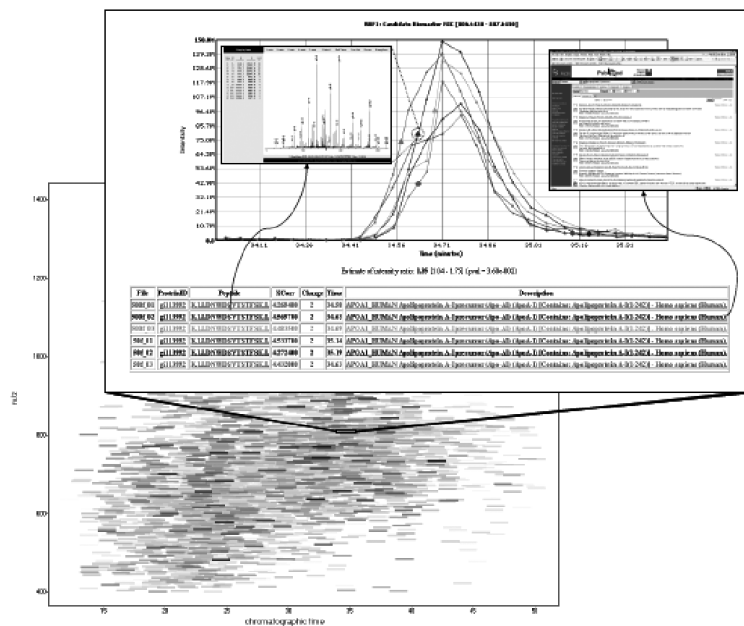


Fig. 8. Automated Differential Expression Analysis software (SIEVE).

## 5. まとめ

LTQ Orbitrap は様々な機能があり、分析メソッドも自由に組むことができる。ここではそのごく一部を示した。翻訳後修飾や、蛋白質以外の脂質や糖に対しては多段階の MS/MS (MS<sup>n</sup>) を組み合わせ、部分構造をさらに詳細に解析することも可能である。出荷を開始したのが 2005 年であり、Orbitrap を使った論文はまだ少ないが、装置の自由度が高いため、今後、多くのユーザーから効率的な分析メソッドや応用例が発表されていくことが期待されている。

## 文献

- 1) Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002;13:659–669.
- 2) Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 2005;40:430–443.
- 3) Schwartz JC, Zhou XG, Bier ME. U.S. Patent 1996; 5,572,022.
- 4) Olsen JV, de Godoy LMF, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M. Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 2006;4:2010–2021.