

量子ドット技術を利用したソフトイオン化法

バイオから環境まで応用可能な新しい質量分析技術の開発

量子ドット技術を応用して作成したゲルマニウムナノドットを用いた新しいソフトイオン化質量分析法を開発した。従来は、高分子量化合物を分解せずにイオン化(ソフトイオン化)するためには、試料に応じた補助剤を選択して添加する必要があったが、本法では、試料を測定用基板に塗布するだけで簡単にイオン化することができる。この技術を用いて、バイオ関連試料の高感度分析や、従来法では測定が困難であった臭素系難燃剤の簡易迅速分析などが可能になった。

AIST has successfully developed a novel matrix-free soft ionization mass spectrometry technique. In this technique, by irradiating laser shots on the sample simply deposited on germanium quantum dots, mass spectra can be easily observed without obstructive peaks. So far, highly sensitive analysis at 10^{-16} mol level for peptides and analysis of brominated flame-retardants have been demonstrated. This technique is further applicable for wide range of samples not only biomaterials such as proteins, peptides, and oligosaccharaides, but also industrial materials such as synthetic polymers and additives.

従来のソフトイオン化法の課題

質量分析法では、測定対象化合物をイオン化し、その質量電荷比 (m/z) の違いによってイオンを分離し、検出する。試料分子の分解が起こらないような条件で温和にイオン化し、分子量関連ピークを観測すれば、試料の分子量情報を得ることができる。このようなイオン化法を総称して、ソフトイオン化法という。例えば、高分子量化合物にレーザー光を直接照射して質量分析すると、試料分子の分解物のピークが観測されるが(図1a)、試料にイオン化補助剤(マトリックス剤)を混合してレーザー光を照射すると、試料分子を分解せずに質量分析することができる(図1b)。この手法は、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)と呼ばれる技術であり、タンパク質や合成ポリマーなどの高分子量化合物を測定するための技術として広く利用されている。しかし、MALDI法では、試料に

加える補助剤の種類や混合比などの最適な条件を測定ごとに検討しなければならず、測定にはある程度の予備検討時間や熟練が要求される。しかも、補助剤に由来する妨害ピークが多く発生するため、分子量が1000以下のペプチドや添加剤などの分析が困難であるという課題がある(図2)。そのため、新しい医薬の開発のためにプロテオーム解析を行うバイオ関連分野や、有害な化学物質の迅速・簡易分析を行う環境関連分野をはじめ、現在MALDI法を利用している多くの分野で、補助剤を用いない新しいイオン化法での質量分析技術の開発が望まれていた。

補助剤を用いないソフトイオン化法の先行技術として、数10ナノメートルの微細な細孔構造をもつ多孔質シリコンに試料を塗布し、レーザー光を照射してイオン化する方法が提案されている。しかしながら、多孔質シリコンは脆く、レーザー光照射によって多孔質構造が容易に破損するた

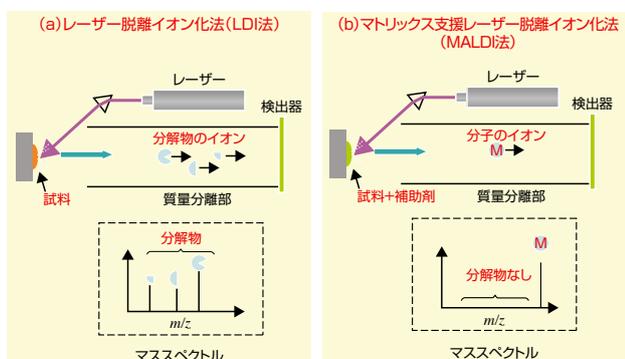


図1 レーザー脱離イオン化質量分析法(LDI-MS)と、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法(MALDI-MS)の違い
プレート上に析出した試料に直接レーザー光を照射すると、試料分子は分解する。そこで、試料に補助剤を加えてレーザー光照射すると、ソフトイオン化が達成され、試料分子のイオンを質量分析することができる。

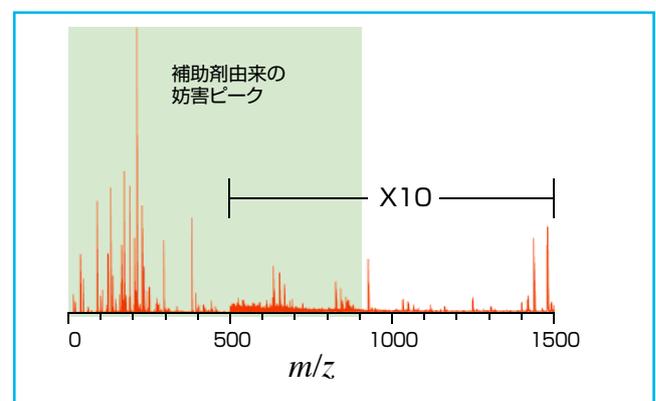


図2 MALDI-MS法によるマススペクトル
MALDI法では、過剰に加えられた補助剤に由来するピークが強く観測されるため、試料ピークを妨害する。

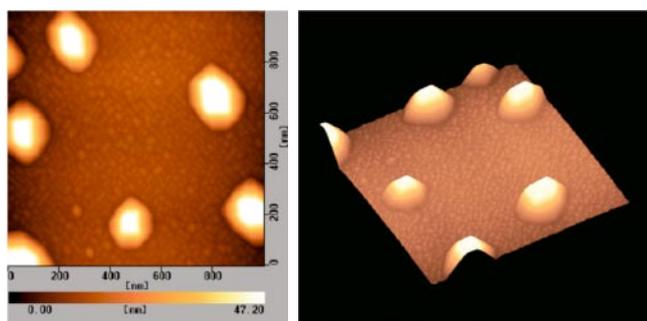


図3 ゲルマニウムナノドット基板表面の原子間力顕微鏡画像
左：平面図。右：鳥瞰図。シリコン単結晶上に、直径約200ナノメートル、高さ約50ナノメートルのゲルマニウムナノドットが成長している。

め、測定の妨げとなるが多かった。この研究では、レーザー光照射によって基板表面に発現する強力な電磁場を利用すれば、多孔質体を用いなくてもソフトイオン化が達成できるという仮説を立て、質量分析法による環境計測技術開発を行ってきた環境管理技術研究部門と、ナノ構造設計を利用した熱電エネルギー変換技術の開発を行ってきたエネルギー技術研究部門との共同研究として、イオン化基板の探索を行ってきた。

新しいソフトイオン化法

われわれは、ドット状の構造体にレーザー光を照射すると、光近接場効果によってドット先端部に強力な電磁場が発生し、それがドット上に吸着している試料分子の脱離・イオン化を引き起こすのではないかと考えた。そして、単結晶シリコン上に数10～数100ナノメートルのゲルマニウムドットを成長させた「ゲルマニウムナノドット基板」をイオン化に利用する新しいソフトイオン化質量分析法を開発した。

図3に、ゲルマニウムナノドット基板の表面の原子間力顕微鏡（AFM）画像を示す。この微細な表面構造は、次世代コンピュータの記憶素子やレーザーの発光素子などへの応用が期待されている「量子ドット」の代表的な作製法であ

る分子線エピタキシー（MBE）法を用いて作製した。超高真空中で400℃以上に加熱したシリコン単結晶（100）面にゲルマニウム分子線を照射し、エピタキシャル成長を行うと、シリコン結晶とゲルマニウム結晶の格子定数の違いから、微細な凸状のゲルマニウム表面構造が出現する。われわれは質量分析用のソフトイオン化基板として最適化するために、数10～数100ナノメートルのドーム状の構造を作製した。このように形成されたゲルマニウムのドット構造は、基板のシリコン単結晶から連続した結晶層を形成しており、基板に強固に結合しているため、レーザー光照射によって剥離したり、破損することはない。また、任意のサイズと分布をもつドット構造体を得ることができる。本研究でもナノメートルサイズの量子ドットから1マイクロメートル程度の大きなドット構造まで試作を行い、質量分析における検出感度との関係を調べている。

図4に、ゲルマニウムナノドット基板を用いたソフトイオン化質量分析法（以下、ナノドットイオン化法という）の測定方法を示す。試料調製はゲルマニウムナノドット基板の表面へ、試料溶液を1 μ l程度塗布し、乾燥させるだけでよい。そのため、MALDI法では不可欠であった補助剤などに関する試料調製のノウハウは不要である。試料を塗布したプレートを、MALDI-MS測定で用いられている市販のレーザー脱離イオン化質量分析装置に導入し、試料スポットにレーザー光を照射すれば、マススペクトルを観測することができる。一連の作業が数分程度で完了するため、極めて迅速かつ簡便に測定を行うことができる。この方法は特別な装置改造などは不要であるため、市販のレーザー脱離イオン化質量分析装置が機種を問わずそのまま利用することができる。

この方法により、タンパク質、ペプチド、糖質、合成ポリマー、添加剤など、様々な化合物の測定を試みたところ、補助剤を用いなくて試料を分解せずにイオン化することが可能であった。しかも、従来のMALDI法では測定が困難

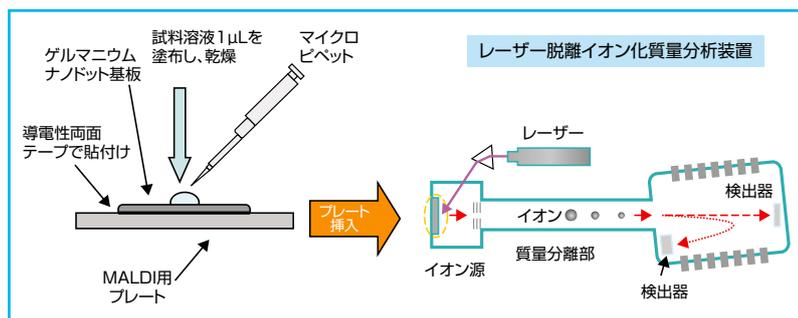


図4 ゲルマニウムナノドットを用いたソフトイオン化質量分析の測定方法

測定試料の調製は、ゲルマニウムナノドット基板に試料溶液を塗布し、乾燥するだけでよい。試料を塗布したプレートを、レーザー脱離イオン化質量分析装置のイオン源に設置し、試料スポットにレーザー光を照射すると、高分子量化合物を分解せずにイオン化して、分子量情報をもつマススペクトルを観測することができる。

あるいは不可能であった試料の分析も可能であった。以下、その代表的な測定例を紹介する。

プロテオーム解析への応用

細胞あるいは生体組織に存在するタンパク質を、ゲノム情報と関連付けて網羅的に解析するプロテオーム解析では、ソフトイオン化質量分析法が発見タンパク質を同定するための常套手段として用いられている。例えば、疾患の原因となるタンパク質を同定し、その構造や機能を解析すれば、その情報をもとに新しい医薬品を設計・開発することができる。図5にプロテオーム解析の流れを示す。まず、生体組織などからタンパク質を抽出し、二次元電気泳動などによってタンパク質を分離した後に、酵素を用いてタンパク質を消化し、ペプチド断片を得る。次に、ソフトイオン化質量分析法によってペプチド断片の正確な分子量を測定し、インターネット経由でプロテオームデータベース検索してタンパク質を同定する。この方法をペプチドマスフィンガープリント(PMF)法という。同定されたタンパク質の機能解析などを行い、疾患に関係するタンパク質を明らかにして、新しい医薬品の設計・開発を行う。すなわち、プロテオーム解析では、ソフトイオン化質量分析法によって正確にタンパク質を同定することが、解析の成否に関わる重要な役割を果たしている。

タンパク質同定には、現在、MALDI法が良く用いられている。一例として、図6aにウシ血清アルブミンをトリプシンで消化して得られたペプチド断片のMALDIマススペクトルを示す。質量900以下の領域では補助剤由来の妨害ピークのために、ペプチド断片を検出することが極めて困難である。このように、MALDI法では、イオン化補助剤由来のピークの妨害のために検出できるペプチド断片の数

が限られ、タンパク質同定結果の信頼性が低下することが大きな課題であった。

一方、ナノドットイオン化法では、補助剤を用いないため、妨害ピークの影響を受けない。例えば、図6bに示した例では、MALDI法では観測できなかった質量900以下の領域で14本ものペプチド断片が検出されている。このように、ペプチド断片の検出が可能な質量範囲が拡大することによって、PMF法によるタンパク質同定の信頼性が飛躍的に向上する。さらに、この方法の検出限界を調べたところ、わずか800 amol (8×10^{-16} mol) のペプチド試料を検出することができた(図7c)。ペプチドの高感度分析が可能となることで、ごくわずかしかなかったためにこれまで見逃されてきた疾患に関わる重要なタンパク質を発見・同定できる可能性が高まった。ナノドットイオン化法は、プロテオーム解析において、タンパク質同定を行うための有効な解析手段になりうるものであり、新しい医薬品開発の促進に役立つ重要な技術に発展することが期待される。

臭素系難燃剤の迅速分析への応用

プラスチック材料は燃焼しやすいため、火災を防止するために難燃剤が添加されている。特に、建材や電子・電気機器などには、高い難燃効果を発揮するハロゲン系難燃剤が用いられている。ポリプロモジフェニルエーテル(PBDE)は、代表的な臭素系難燃剤の一種であり、ジフェニルエーテルに最大で10個の臭素原子が結合した構造をもつ。人体への悪影響も懸念されており、欧州連合では、本年7月に発効予定のRoHS指令(欧州連合が実施する特定有害物質規制)によって、電子・電気機器での使用が禁止される(10臭素化体は規制から除外された)。この規制により、PBDEを含む電子・電気製品は欧州へ輸出できなくなるため、製

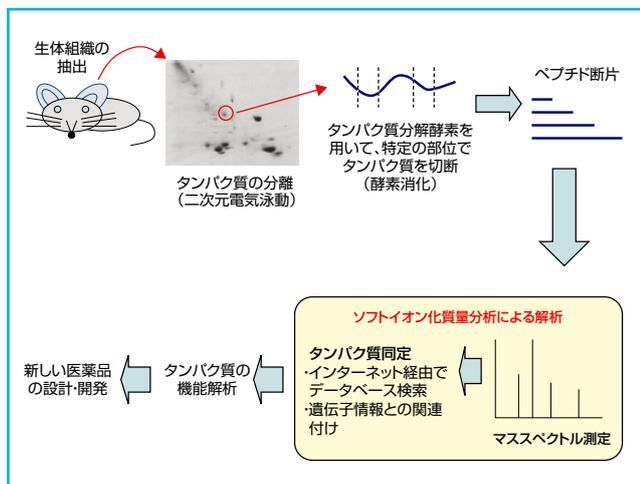


図5 プロテオーム解析の流れ

生体組織から抽出・分離したタンパク質を酵素処理してペプチド断片を得る。これをソフトイオン化質量分析し、断片の分子量をデータベース検索すれば、タンパク質を同定することができる。

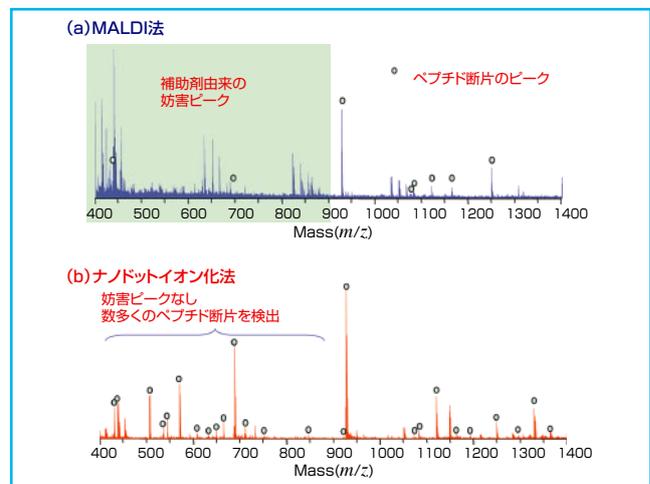


図6 タンパク質の酵素消化物(ペプチド断片)の測定例

(a) MALDI法では、補助剤由来の妨害ピークにより、観測できるペプチド断片の数が少ない。(b) ナノドットイオン化法では、妨害ピークの影響を受けることなく、数多くのペプチド断片を観測することができた。

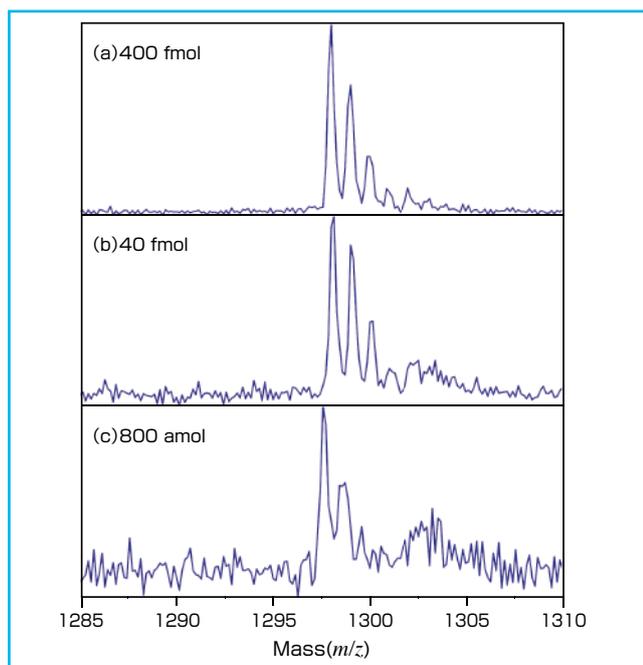


図7 ナノドットイオン化法によるペプチド試料(アンジオテンシンII)のマススペクトル

品中にPBDEが含まれているか否かを迅速に判定する必要がある。PBDEの分析には、ガスクロマトグラフ/質量分析法(GC/MS)が用いられているが、臭素の数や結合位置の違いにより数多くの異性体が存在するうえ、分離の際に分解しやすいため、その測定は容易ではない。そこで、ソフトイオン化質量分析法を用いてPBDEの簡易迅速分析法の開発を試みた。

まず、MALDI法を用いてデカブロモジフェニルエーテル(PBDEの10臭素化体)の測定を試みた(図8a)。様々な補助剤を用いて測定を行ったが、全く試料ピークを観測することができなかった。また、著者らの知る限り、MALDI-MSによるPBDEの測定例は報告されていない。一方、ナノドットイオン化法を用いてデカブロモジフェニルエーテルを測定したところ、わずか100 ngの試料でも明確なピークを検出することができ、同位体分布も観測できた(図8b)。既存のGC/MS法では、数時間～数日程度の時間が必要であるが、本法は、わずか10分以内で簡単に分析できる。しかも、多検体の試料を連続して測定することが可能であるため、PBDEの迅速・簡便なスクリーニング手法への応用が期待される。

今後の展開

本法は補助剤の混合が不要であるため、多検体試料の迅速な自動分析に適しており、バイオ関連分野や環境関連分野でのハイスループット分析への応用が期待される。また、既存の質量分析法では分析が困難であった臭素系難燃剤なども測定可能であり様々な高分子量添加剤の簡易分析にも

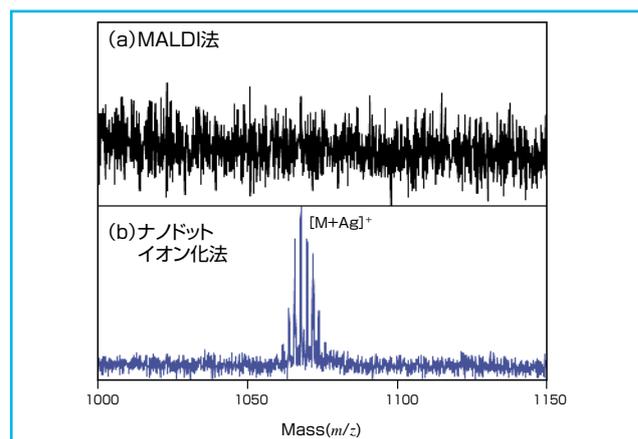


図8 臭素系難燃剤(デカブロモジフェニルエーテル)の測定例
(a) MALDI法。(b) ナノドット基板によるソフトイオン化質量分析法(カチオン化剤:銀塩)。

適している。ここで紹介したほかにも、糖質や、添加剤など様々な試料のイオン化に成功しており、その応用範囲は広いと考えられる。

現時点では、詳細なイオン化機構が明らかではないため、その原理解明を行いながら、より高感度かつ汎用性の高いナノドットイオン化基板の開発を行って実用化を目指し、本法を新しいソフトイオン化質量分析技術として確立したいと考えている。

関連情報

- 特願 2005-131588「質量分析用イオン化基板及び質量分析装置」
- プレス発表 2006年2月17日:「バイオから環境まで応用可能な新しい質量分析技術の開発に成功」
- 日刊工業新聞、化学工業日報:2006年2月20日、Tech on:2006年2月21日、日刊水産経済新聞:2006年2月20日、電波新聞:2006年3月2日
- 研究開発者:環境管理技術研究部門 佐藤浩昭、清野晃之、鳥村政基、田尾博明、エネルギー技術研究部門 山本淳

● 問い合わせ先

独立行政法人 産業技術総合研究所

環境管理技術研究部門 計測技術研究グループ

研究員 佐藤 浩昭

E-mail: sato-hiroaki@aist.go.jp

〒305-8569 茨城県つくば市小野川16-1 つくば西