

比較的新しいタンデム質量分析 (MS/MS) 技術について



高 橋 豊

1 はじめに

この記事では、質量分析 (mass spectrometry, MS) の測定技術の一つであるタンデム質量分析 (mass spectrometry/mass spectrometry, MS/MS) に関して、比較的新しい技術であるデータ依存的取得法 (data dependent acquisition, DDA) とデータ非依存的取得法 (data independent acquisition, DIA) について紹介する。

2 MS/MS の測定法

2.1 MS/MS¹⁾とは

質量分析について余り詳しく無い方のために、まずは「MS/MS」について説明しておく。MS/MSとは、MSが二つ繋がっていることから推察できると思うが、簡単に言えば質量分析を2回行うことである。MSは質量分析計 (mass spectrometer) を使って行う分析法である。質量分析計もMSと略すことが出来るが、質量分析のMSと混同してしまうので、ここでは質量分析計のことはMS装置と書くことにする。MS/MSには、二台のMS装置を連結したMS/MS装置を用いる方法 (空間的MS/MS) と、一台のMS装置で行う方法 (時間的MS/MS) があるが、ここでは前者を用いた場合について述べる。そして、MS/MSには、広義では5種類の方法があるが、定性分析で最もよく用いられる「プロダクトイオン分析」がDDA, DIA共に用いられる技術なので、ここではその方法について、四重極-飛行時間質量分析計 (quadrupole time-of-flight mass spectrometer, QTOF-MS) を用いた場合を例に簡単に触れておくことにする。なお、これ以降、MS/MSはプロダクトイオン分析を指すこととする。QTOF-MSの概略を図1に示す。

QTOF-MSでマススペクトルを測定する場合、イオン源で生成したイオンはすべてQ (MS1) を通過して、TOF (MS2) でイオンの m/z 分離が行われてマススペクトルが取得される。一例として、ゴーヤの抽出液をLC/MSで測定した時の、ある物質のマススペクトルを図2に示す。ここでメインピークとして観測されてい

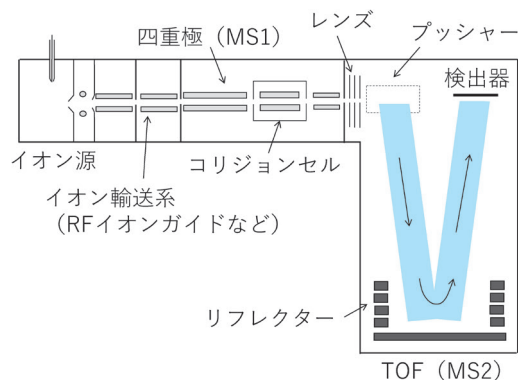


図1 QTOF-MSの概略図

る m/z 182 イオンがどんな物質に由来するのか知りたい、と言う時、MS/MSが有効である。 m/z 182 イオンを前駆体 (プリカーサー) としたMS/MSを行う場合、Q (MS1) の電圧を m/z 182 イオンのみが通過できるように設定する (実際の測定では、 $\pm 1 \sim 2$ の幅をもたせる)。Qを通過した m/z 182 イオンは、後段のコリジョンセルに進入し充填されている不活性ガス (窒素やアルゴン) と衝突することで励起され、結合が開裂して断片化を起こす。断片化して生成するイオンをプロダクトイオンと言い、プロダクトイオンをTOFで m/z 分離して得られたスペクトルをプロダクトイオンスペクトルと言う。 m/z 182 イオンをプリカーサーとしたプロダクトイオンスペクトルを図3に示す。プロダクトイオンの m/z 値およびプリカーサーイオンとプロダクトイオンの m/z 差は、 m/z 182 イオンの元になる分子の部分構造を示すため、どんな物質なのか?を知る手がかりと成り得る。実際に未知成分の構造推測をする場合には、イオン種を特定し、分子式推定などを併用するが、ここではそれらの工程は省略する。

上で述べたMS/MSでは、分析者自身がターゲットイオンの m/z を指定する必要がある。そのためには、一度MS/MSの設定をせずにマススペクトルを取得する工程を経る。貴重な試料の場合には、一度の測定でマススペクトルとプロダクトイオンスペクトルの両方取得したいという要求があり、そのための技術の一つがDDA

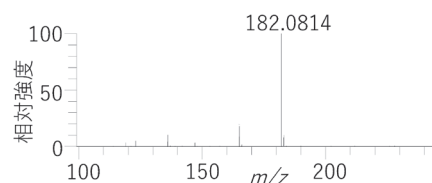


図2 ゴーヤ抽出液のLC/MSで得られたある物質のマススペクトル

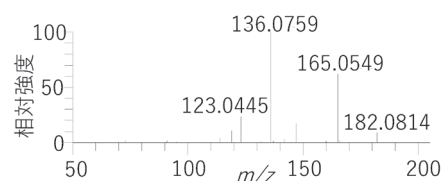


図3 図2で検出された m/z 182 イオンスペクトル

About the Relatively New Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) Technique.

である。次の項では、DDA について説明する。

2.2 DDA²⁾

DDA では、あらかじめイオン強度に対する^{しきいち}閾値を設定パラメーターとして設定し、LC/MS などでもマススペクトル取得時に設定強度を超えたイオンが観測された場合、次の測定ではそのイオンをプリカーサーに設定して自動的に MS/MS が実行され、プロダクトイオンスペクトルが取得される。したがって、分析者自身がプリカーサーイオンを設定する必要がなく、一度の測定でマススペクトルとプロダクトイオンスペクトルの両方取得することが出来る。未知試料であって、その試料を特徴付ける成分の構造を推測したいという要求に対して、非常に有用な方法である。

一つのマスペクトルで複数のイオンが設定した閾値以上になることは多々あり、何個のイオンをプリカーサーとして選択するか、もあらかじめ測定条件として設定しておく。この数を多く設定すると、一つのマスペクトルで観測されたイオンに対しては多くのプロダクトイオンスペクトルを取得することが出来るが、この数が多すぎると、MS/MS を行っている間に、次に LC から流れてくる成分が検出されないという可能性がある。近年 UHPLC による高速分析が MS 装置を検出器とした場合にも主流であり、サンプリングポイントの減少や共溶出成分の取りこぼしが起こり易くなっている。更に、閾値以下の低強度のイオンは、そもそも MS/MS の対象にすらならないという問題がある。

このような DDA の課題を解決するために開発された方法が DIA である。

2.3 DIA³⁾

DIA は、MS/MS の前に得られたマススペクトルのデータに依存せず、網羅的にプリカーサーイオンを設定して MS/MS を実行する方法である。具体的にはプリカーサーイオンの m/z を単一の値ではなく幅で設定し、その位置をずらしながら繰り返し MS/MS を実行する。例えば m/z 200~800 の範囲を、100 の m/z 幅で設定して DIA を行くと、それぞれ 100 の m/z 幅に入るイオンがすべてプリカーサーとして MS/MS が実行され、6 枚のプロダクトイオンスペクトルが取得される。この方法の利点は、設定した m/z 範囲の全イオンの MS/MS が実行されるために網羅的なことである。一方欠点は、プリカーサーイオンが混合状態であることである。混合状態のプリカーサーイオンから取得されたプロダクトイオンスペクトルは当然混合状態であり、プリカーサーイオンとプロダクトイオンの紐づけ作業を、デコンボリューションに依って行う必要がある。

DIA により得られたプロダクトイオンスペクトルの質は、デコンボリューションソフトの機能に大きく依存する。また、最近の DIA 対応の装置では、MS/MS の高速化が進み、1 秒間に 200 枚のプロダクトイオンスペクトルを取得可能な装置が登場してきた。高速での MS/MS が可能になれば、DIA におけるプリカーサーイオンの m/z 幅を狭く設定しても、限られた時間内で多くの

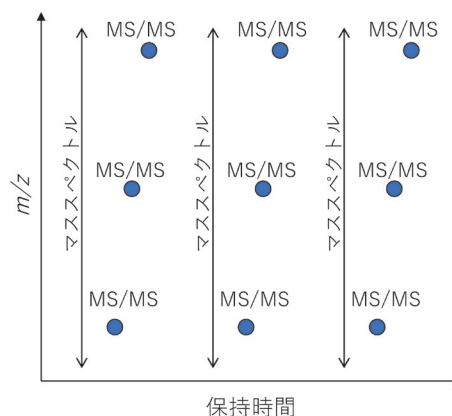


図4 DDA におけるデータ取得イメージ

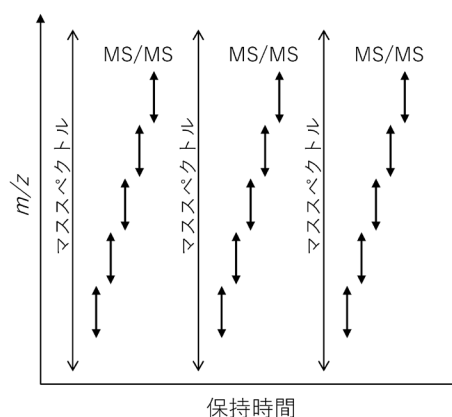


図5 DIA におけるデータ取得イメージ

MS/MS が実行できるため、デコンボリューションの機能に余り依存することなく、高品質なプロダクトイオンスペクトルが取得できる。但し、プロダクトイオンスペクトルの取得時間を短く設定した場合、長く設定した場合と比較すると原理上感度は低下するので、適切な条件設定が重要である。DDA と DIA のデータ取得イメージを、それぞれ図4と図5に示す。

3 ま と め

MS/MS は、選択反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) と呼ばれる技術で定量分析にも用いられるが、今回は、主に定性分析に用いられる比較的新しい MS/MS 技術を二つ紹介した。DDA, DIA 共に一長一短があるのでどちらが優れた技術であると言うことはなく、目的に応じて使い分ける必要がある。最近、プロテオミクスの分野を中心に、より網羅性のある DIA の方がよく使われるようになってきた感がある。

文 献

- 1) 藤井敏博, 上田祥久, 大柿真毅, 高橋 豊, “タンデム質量分析法 MS/MS の原理と実際”, p. 29 (2021), (講談社).
- 2) A. Michalski, J. Cox, M. Mann : *J. Proteome Res.*, **10**, 1785 (2011).
- 3) L. C. Gillet, P. Navarro, S. Tate, H. Röst, N. Selevsek, L. Reiter, R. Bonner, R. Aebersold : *M. Cell. Proteomics*, **11**, O111.016717 (2012).