

「物質現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」

平成 17 年度採択研究代表者

内藤 康秀

(光産業創成大学院大学光産業創成研究科 助教授)

「超高分解高速イメージング質量分析技術（質量顕微鏡）の構築」

1. 研究実施の概要

従来のスキャン型質量顕微鏡の性能を超える面分解能 $0.1 \mu\text{m}$ 、質量分解能 ($m/\Delta m$) 10,000、測定時間(1 サンプル当り) 数十分以内の超高分解能高速イメージング質量分析を実現するため、①多重周回飛行時間型イオン光学系 (MULTUM) のイオン引出しにレンズ系を挿入し、脱離イオン群の空間分布形状を正しく反映しているかを見る予備実験を行い、②MULTUM 部分の 3 次近似まで考慮した軌道計算を行い、理論的に初期角度が小さい場合は十分像が保持されることを確認し、③直線型飛行時間質量分析計に、空間分解能 $100 \mu\text{m}$ 、25ps の時間分解能を持つアレイ型ダイレイライン検出器を装着し、インスリンをテストサンプルとして質量スペクトルを取り初期の性能を持っていることを確認した。また、レーザー光の強度を広い面状で一様にする工夫を試みた。

2. 研究実施内容

1. 脱離イオンの空間的情報を保持した高指向性抽出

開発における最重要課題は、脱離イオン群の空間的情報を保持したイオン抽出である。このため以下の手順で検証実験を行った。①MALDI 法には均一に分布した試料を形成できる液体マトリックスを適用した。②試料プレートの直前で N_2 レーザー光をグリッド状のマスクに通し、6 個のポイントに分割して照射した。③脱離イオン群の像が MULTUM 入射部で結像するように、イオン源加速領域と MULTUM の中間に配置したアインツェルレンズおよび 4 重極トリプレットの印加電圧を最適化した。④MULTUM 出射部の電場セクター電位をパルス状にスイッチし、試料(アンジオテンシン II)のプロトン付加分子 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) のみを選択的に検出部へ送出した。⑤アンジオテンシン II $[\text{M}+\text{H}]^+$ の像が検出器の初段の MCP で結像するように、MULTUM 出射部と検出器の中間に配置した 4 重極トリプレットの印加電圧を最適化した。⑥MCP と蛍光プレートで構成した検出器によって蛍光像に変換されたイオン像を CCD カメラで撮像した。取得されたイオン像は 6 分割された形状を示し、レーザー光照射部位に対応する 6 個の点からイオンが脱離していると解釈できる。これにより、脱離イオン抽出においてイオン群の空間的情報が保持されていることが確認できた。MULTUM 質量分析計は 0,1,2,3...周とイオンを任意の周だけ周回することが可能である。イオン像の 6 分割形状は、周回数 0 周(直線型質量分析計に相当)では明瞭に保持されており、3 周後まで判別可能で

ある(図 1)。従来、マツダ電極は質量分解能を最大にするように調整されていたが、空間分解能を良くするように調整すべきであることが判明した。

2. MULTUM イオン像保持能力のシミュレーション

MULTUM 入射時におけるイオン分散角の許容量を把握するため、MULTUM の各電極が誤差なく理想的に配置されているとして、3 次近似まで考慮した軌道計算を行い、イオンの結像性がどの程度保持されるかを検証した。その結果、イオンビーム径 1 mm では分散角 0.01rad まで結像性が十分に保たれることが分かった。したがって、分散角 0.01rad 以下にイオンビームを平行化すれば、100 μm 程度の脱離イオン群(レーザーのスポット径 100 μm に相当)であれば MULTUM の前段にも像倍率 10 倍の対物レンズを配置して高倍率化できる見通しが得られた。今後、工作精度等を考慮して場の配置が崩れているときの軌道計算を行う予定である。

3. デイレイライン検出器による高速位置検出

開発におけるもう一つの最重要課題に、イオンを空間的、時間的に検出する技術がある。その高解像度と高速度の両立を実現するため、ディレイライン検出器に着目して適用性能を評価した。ディレイライン検出器は、MCP によって増幅された電子電流を検出するアノード電極が巻き線になっており、信号伝搬のパルス遅延時間から検出点の位置を計測する。直線型飛行時間質量分析計にディレイライン検出器を装着し、MALDI 生成イオンの検出を行った。その結果、①試料分子(インスリン)の $[M+H]^+$ ピークが観測された飛行時間スペクトルを取得し、②イオン像を画素分解能 100 μm で取得し、かつ、同一のレーザー照射部位に対してはイオン像の再現性が確認された。これにより、ディレイライン検出器を脱離イオンの空間的、時間的な検出に適用できることが確認できた。画素分解能は巻き線の間隔に依存し、アノードを独自開発することにより将来は 10 μm 程度に向上できる。現在の技術でも像倍率を 100 倍にすれば 1 μm までの面分解能を達成できる見通しが得られた。時間分解能は 25ps であり、周回数 3 周で質量分解能 ($m/\Delta m$) 10,000 に達するのに必要な時間分解能(質量 10u で 350ps、質量 1000u で 3.5ns)は十分得られている。

4. DFG レーザーのフラットビーム化

DFG レーザー光の照射スポット内で脱離イオンが均一に生成するように、レーザー光の空間的強度分布を一様に(フラットビーム化)する工夫を試みた。DFG レーザーの発振波長を変えてもフラットビーム化が行えるように、可変形鏡(ディフォーマブルミラー)を用いた反射型の集光光学系を構築した。イオン源に導入したときと同じ光路長になるように光学系をセットし、集光点に赤外線カメラを配置してビームプロファイルを計測した。その結果、直径約 500 μm の照射スポットにわたりほぼ一様な強度分布が得られるミラー制御条件を見出した。

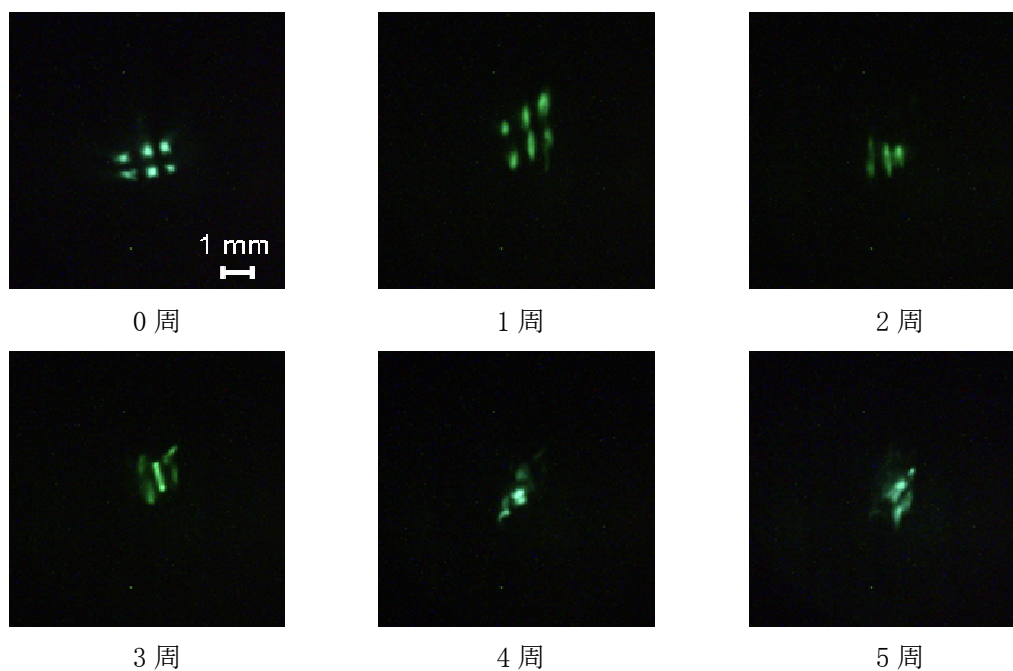


図1 MULTUM 質量分析計で取得したアンジオテンシンⅡのMALDI生成イオン像

3. 研究実施体制

(1)「内藤研究」グループ

①研究分担グループ長:内藤 康秀(光産業創成大学院大学 助教授)

②研究項目

- ・レーザー光学系の設計・製作
- ・マトリックスフリー高効率レーザー脱離イオン化法の確立
- ・高指向性・低分散脱離イオン群抽出法の確立
- ・二次元荷電粒子撮像システムの開発

(2)「豊田・藤井研究」グループ

①研究分担グループ長:豊田 岐聡(大阪大学理学研究科 助教授)

②研究項目

- ・多重周回飛行時間型質量分析計の製作と評価
- ・微小半導体構造の輸送特性への不純物などの不均一性の影響を調べる

(3)「粟津研究」グループ

①研究分担グループ長:粟津 邦男(大阪大学大学院工学研究科 教授)

②研究項目

- ・レーザー光学系の設計・製作

・マトリックスフリー高効率レーザー脱離イオン化法の確立

(4)「益田研究」グループ

①研究分担グループ長:益田 勝吉(サントリー生物有機科学研究所 主席研究員)

②研究項目

- ・細胞表層における膜蛋白質の調製
- ・高指向性・低分散脱離イオン群抽出法の確立
- ・マトリックスフリー高効率レーザー脱離イオン化法の確立

4. 研究成果の発表等

(1)論文発表(原著論文)

- 豊田岐聡, 西口克, マルチターン飛行時間型質量分析計のイオン像のシミュレーション, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 17-24, 2007.
- 内藤康秀, イメージング質量分析とは, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 39, 2007.
- Hisanao Hazama, Yoshiaki Takatani, and Kunio Awazu, Integrated ultraviolet and tunable mid-infrared laser source for analyses of proteins, *Proceedings of SPIE*, **6455**, 645507, 2007.
- 佐藤出, 鈴木-吉橋幸子, 間久直, 栗津邦男, 中赤外波長可変固体レーザーを用いた新規質量分析装置によるタンパク質のイオン化, レーザー研究(査読中)

(2)特許出願

平成 18年度特許出願:0件(CREST 研究期間累積件数:1件)