

質量分析データの正しい見方を知ってますか？

山本 慎也・中山 泰宗・福崎英一郎*

筆者らは生体内代謝産物の網羅的解析であるメタボロミクスを専門としており、代謝物の一斉分析に有用とされる質量分析計のヘビーユーザーである。近年、日本生物工学会大会においても、メタボロミクス研究者を中心とする質量分析を用いた研究が多く見られるようになった。質量分析には多くの専門用語があるが、残念ながら、現状ではそれらを正確に使い分けることができる学会員はそれほど多くない。また、分析機器メーカーが提供する質量分析用のソフトウェアにおいても、単位や表記が異なっていることがある。専門用語は複雑な概念や知識を意味集約したものであり、高いレベルでのコミュニケーションにおいて有用なツールであるが、異なった使用は誤解を招きかねない。そこで、本稿ではもっともユーザーが混乱している「質量」関連の用語について述べさせていただくこととした。これから質量分析計を使い始める、あるいはすでに使用している学会員が本稿を一読して頂くことで、読者たちのディスカッションの質の向上に少しでも貢献できれば幸いである。

なお、日本質量分析学会用語委員会が質量分析関係用語集を公表しているのでさらに詳しい情報を求める方はこちらを参照して頂きたい¹⁾。

質量数・相対質量・同位体・原子量（高校生レベル）

高校生になると質量分析において重要な物質量の基礎的概念を学ぶ。この部分が混乱している質量分析ユーザーが意外といるので、失礼ながら細かく述べさせてもらう。

原子は陽子、中性子、電子から成り、原子核中の陽子の数を原子番号という。いわゆる「水兵リーベ ほくのふね……」で覚える原子の順番が原子番号である。また、陽子と中性子の数の合計を「質量数」というが、質量数は「原子量」とは異なることに留意していただきたい。原子量を学ぶ前にはまず、「原子の相対質量」について理解しておく必要がある。相対質量とは、ある特定の重さを基準として他の物質の重さを相対的に表したものであり、原子の場合、質量数12の炭素 (^{12}C) を相対質量12とした時の原子1つ当たりの相対質量を「原子の相対質量」という。また、同じ元素の原子、すなわち陽子数

表1. 窒素の同位体

	^{14}N	^{15}N
陽子数（原子番号）	7	7
中性子数	7	8
質量数	14	15
原子の相対質量	14.0031	15.0001
天然存在比	99.636%	0.364%

が同じ原子の中で、中性子が異なる原子同士を互いに同位体 (isotope) という。そしてこれら同位体の相対質量に自然界における存在割合を考慮して平均化された見かけの原子の相対質量が「原子量」である²⁾。

たとえば、陽子7個、中性子7個の窒素原子の質量数は14であるため、「 ^{14}N 」と表記し、その相対質量は14.0031となる。また、陽子7個、中性子8個の窒素原子の質量数は15であるため、「 ^{15}N 」と表記し、その相対質量は15.0001である。当然、 ^{14}N と ^{15}N の両方とも、原子番号（陽子数）は7であるため、どちらも窒素原子である。そして、天然存在比は ^{14}N が99.636%、 ^{15}N が0.364%であるため、窒素の原子量は14.00643となる（表1）。

u, Da（大学生レベル）

大学では「原子の相対質量」という言葉を代替する専門用語として、記号uで示される統一原子質量単位 (unified atomic mass unit) を学ぶ。1 uは質量数12の炭素原子1原子の質量の12分の1の質量であり、例えば ^{14}N の質量は14.0031 uと表すことになる。同じ意味でDa (Dalton) も用いられる。また、記号amuで表される原子質量単位 (atomic mass unit) もuやDaと同じ意味として用いられることがあるが、amuは質量数16の酸素が基準として使われていた歴史的背景から、複数の意味が存在しているため、現在は使用が推奨されていない。最新の大学生向けの教科書ですらamuを用いているものがあるが、使用しないように注意していただきたい³⁾。

m/z , exact mass（質量分析計ユーザーレベル）

質量分析では、横軸に m/z 、縦軸に強度をプロットし

* 著者紹介 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻（教授） E-mail: fukusaki@bio.eng.osaka-u.ac.jp

たマススペクトルが得られる。 m/z とはイオンの質量を u とイオンの電荷数で割って得られる値であり、無次元量のため単位を持たない。また、 m/z は必ず斜体で表記することが決められている。分析機器メーカーによってはマススペクトルの横軸にDaなどの単位が表示されているものや、 m/z が斜体になっていない質量分析用のソフトウェアを提供しているので今後修正されることを願っている。また、 m/z の代わりに「質量電荷比」という言葉が使用されることをまれに見かけるが、推奨されない。この理由は「電荷」と「電荷数」は異なるからである。 m/z の日本語訳として「質量電荷数比」ならば理解できるが、今のところマススペクトルの横軸に正式に使用できるのは m/z のみである⁴⁾。

次に、質量分析計でサンプルを分析し、得られたデータの中からターゲット化合物のデータを抽出する場合を考えてみよう。質量分析では m/z によりターゲット化合物を特定するため、まず初めに m/z の理論値を計算する必要がある。この時に分子量を m としてターゲット化合物の m/z を計算するユーザーがいるが、間違いである。その理由を説明するために、例として4,4'-Methylene bis(o-chloroaniline) (MBOCA) (図1)の m/z について考えてみよう。分子量とは各原子の原子量の和であるため、組成式 $C_{13}H_{12}Cl_2N_2$ のMBOCAの分子量は267.1538となる。しかし、前述のように、各元素にはさまざまな同位体が存在するため、同位体の組み合わせが異なるMBOCA、つまり、質量が異なるMBOCAがいくつか存在することになる。天然存在比を考慮すると各MBOCAの質量とそれらの天然存在比の関係を表2に示した。もっとも多く存在する質量は天然存在比が最大の同位体の質量を用いて計算した値となり、266.0378 u となる。この時の同位体組成において 1×10^{-3} u 以下まで計算した質量をモノアイソトピック質量といい、マススペクトルで観測対象とする m/z 計算する場合は通常この質量を m として考えることになる。MBOCAの場合、分子量は267.1538であるが、モノアイソトピック質量は266.0378 u となるため、分子量を m として m/z を計算してしまうと別の化合物に着目してしまう。

精密質量を計測できない質量分析計で、水素や炭素の

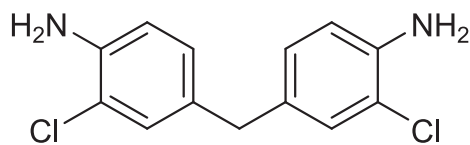


図1. 4,4'-Methylene bis(o-chloroaniline) (MBOCA)

表2. MBOCAの同位体パターン

質量 (u)	存在比 (%)
266.0378	100.0*
268.0348	63.9
267.0411	14.1
270.0319	10.2
269.0382	9.0
271.0352	1.4

*質量266.0378 u の存在比を100とする

ように他の同位体の天然存在比が極端に少ない原子で構成されている低分子化合物の場合は分子量とモノアイソトピック質量の整数値が同じになるので問題にならない。たとえばglycineのモノアイソトピック質量は75.0320で、分子量は75.0666であるため、整数値ではどちらも75である。しかし、MBOCAのように同位体の天然存在比が大きい塩素のような元素を含む化合物を分析する場合や、精密質量を取得する場合は分子量とモノアイソトピック質量が異なる。原子量や分子量が原子・分子の見かけの質量であることを意識して m/z を計算する必要がある。

m/z を計算する時に質量分析ユーザーに推奨したいソフトウェアがChemBioDraw (Cambridge Soft Corporation, Cambridge, MA)である。これは化学構造式の描画と情報検索の総合ツールであり、描画した化合物の各質量とその存在比を簡単に表示させることができる(表2)。

モノアイソトピック質量は(calculated) exact massとも呼ばれる。モノアイソトピック質量やexact massが計算上の質量であるのに対し、実測の質量を(measured) accurate massと呼ぶ。Exact massやaccurate massは 1×10^{-3} u 以下まで計算した質量の場合に用いられる。Exact massに対し、整数値を用いて計算した質量をnominal massと呼ぶ。

質量分析装置のスペックあれこれ

さて、ここまでは単位の定義などを事細かに説明してきた。重箱の隅をつつくような内容に感じる読者もいるかもしれないが、一部の質量分析装置ではこれらの違いを明確に区別できるため、実用上も大切な内容なのである。続く項目では実用上における精密質量の重要性について述べたい。

話を円滑にすすめるために、まずは質量分析装置のスペックについて書いていきたい。精密質量に重要な項目は質量精度 (mass accuracy) と分解能 (resolution) で

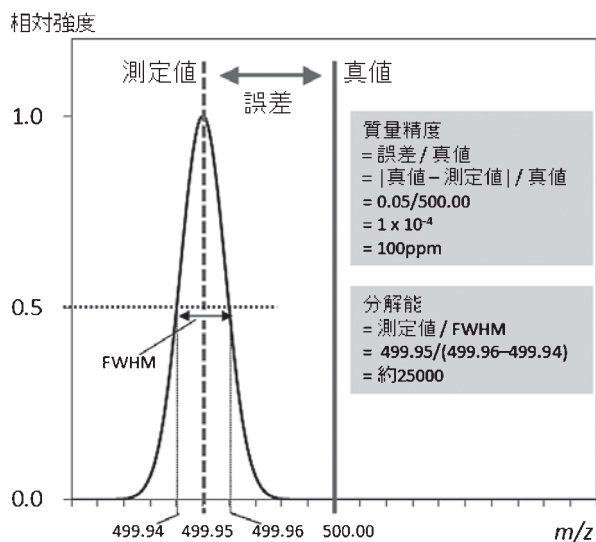


図2. 質量精度と分解能の計算方法. m/z 500の化合物ピークを例に測定値より分析に用いた質量分析装置の質量精度と分解能を計算している.

ある. 市販されている各社のカタログをみると質量精度 5 ppm, 分解能 10,000などの数字が見られる. 質量精度の ppm とは一般的に用いられている百万分率 (parts per million) と同様のもので, この場合は測定された m/z (accurate mass) が真値 (exact mass) からどれくらいずれているかを表している. つまり 1 ppm とは m/z の有効数字が 5 桁くらいはあるということになる. 分解能は半値全幅 (FWHM, full width at half-height maximum) を用いて比較されるのが一般的で, カタログスペックは特定ピークの m/z を FWHM で割った値が記載されているのが通例である. 実際の計算方法を m/z 500 の化合物ピークを用いて図2に記載する.

なお, 余談ではあるが分析化学において精度 (accuracy) と確度 (precision) は明確に区別されており, それぞれ値のばらつき加減, 真値からのズレを表す. したがって本来であれば質量精度は質量確度と表すほうが正確かと思われる. また分解能が本来の精度に近い意味合いの指標である. どのような経緯で現在の定義になっているのかは分からないが, 他の分析分野の方は注意されたい.

実用上の精密質量あれこれ

まずは質量精度について述べる. 実用面において質量精度は検出されたピークから由来化合物の分子式を推定するのに重要である. たとえば炭素 1 個と水素 2 個の組み合わせは窒素 1 個と整数での質量が同じである (このように整数での四捨五入値が同じ, 異なる組成の組み合わせは isobaric と呼ばれる). しかし正確には 0.01426 u

の質量差がある. したがって 1 ppm の質量精度を持つ装置であれば m/z 1000 くらいの化合物は CH_2 と N の違いを確実に分けることができるのである. 実際に 1 ppm の質量精度があれば m/z 200 程度の化合物は分子式を一意に決めることができる⁵⁾. より大きい分子であっても質量精度が上がると候補分子を大きく絞ることができ, ペプチド断片を質量分析に供してデータベースよりタンパクの同定をする際に重要となってくる⁶⁾. 実際に分子式を絞り込む際は, m/z と質量精度だけではなく, 同位体の天然存在比より計算したアイソトープ比なども利用している⁵⁾.

クロマトグラフ/質量分析計で生体サンプルなどを分析する際は, 目的の化合物が他のものと共溶出していることもあり, 分解能も重要になってくる. 質量精度が高くても分解能が足りないとピークが分離せずピークトップがずれて正確な質量を得るのが困難になってしまう. また分解能が高くなれば化合物内の isobaric なアイソトポマーを分離することも可能になり, 分子式の絞り込みなどに役立てることができる. タンパクの分析においてはそれ以外にも重要な役割がある. 一部のイオン化法ではタンパクのような高分子は多価イオンとして検出される. この場合, 検出されたイオンの価数がわからなければ化合物の質量が求められない. 生体分子のアイソトポマーは約 1 m/z ごとに検出されるのでアイソトポマー間の m/z を求めることで, 価数を計算するのである (価数は m/z 差の逆数となる). たとえば価数 2 ならばアイソトポマー間の差は約 0.5 となる (図3参照). また, 高分解能の装置を使うことで isobaric なピークを分けることも可能になる. 以上のように精密質量は分子式の推定や

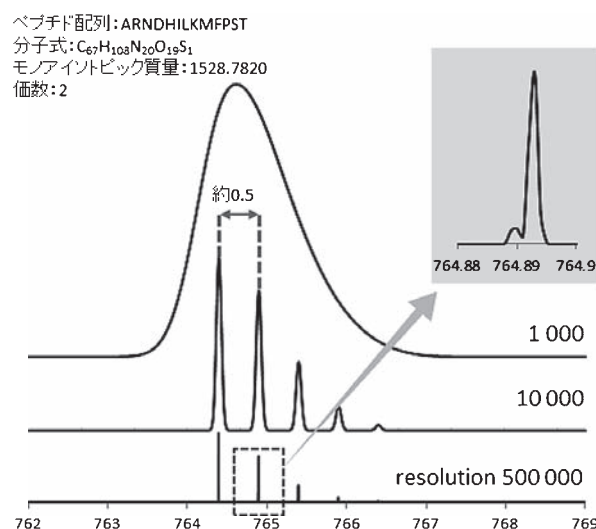


図3. ペプチド分析と分解能

タンパクの同定などに重要であり、質量の定義を間違えるとこれらの結果は正確に導き出せないおそれがある。

おわりに

研究を行うにあたり、他の研究者とのコミュニケーションは重要な活動の一環であり、ディスカッションを円滑にすすめるためには共通した言語を使う必要がある。そこで本稿では質量分析の基礎的な単位について執筆した。これらは取り扱いを間違えると正確な議論が行えないにも関わらず、曖昧な運用をされていることが多い。

本稿を通して少しでも多くの人に正確な質量分析の単位を知ってもらい、今後の議論に役立ててもらえたと願うところである。

文 献

- 1) <http://www.mssj.jp/Japanese/Publication/Glossary/>
- 2) 基礎化学教育研究会：優しく学べる基礎化学，p. 20，森北出版 (2003)。
- 3) 吉野健一：化学と生物，**47**, 6 (2009)。
- 4) 吉野健一：J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **56**, 4 (2008)。
- 5) Kind, T. et al.: BMC Bioinformatics, **7**, 234 (2006)。
- 6) Clauser, K. R. et al.: Anal.Chem., **71**, 2871 (1999)。



イラスト 基礎からわかる 生化学 —構造・酵素・代謝—

坂本順司 著 A5判，292頁，2色刷，定価3360円，裳華房

本書の特徴は、イラストが多いことだ。イラストは、分子レベルの解説図と日常的な事物の絵で構成されている。私自身、「生化学」を学生に教える時、イラスト（といえない拙い絵が多数ではあるが）をししばしば用いて説明する。化学式はもちろん、細胞の内部やヒトや動物など冷汗をかきつつ描いているが、その都度「分かりやすくして便利な図が欲しい」と切実に思うのである。ヒトの場合、視覚から外部の情報を得る割合は五感のうち8割を占めるそうであるから、知識をビジュアル化して理解することは、大変重要で有効な手段だといえる。特に生化学は、目に見えない生体内反応を扱うため、どうしても想像力を働かせて理解する必要がある。教える側に立つと、あれもこれもと教えたくなるのだが、そこをグッと抑えて必要な知識を分かりやすくまとめたセンスは素晴らしい。

本書は3部で構成されている。第1部は生体物質の「構造」について、第2部は「酵素」について、その種類や反応から速度論にいたるまで幅広く学ぶ。そして第3部で物質の「代謝」について学ぶ。特に第2部のスタイルは、生化学の教科書として珍しい。通常であれば、タンパク質の項目で酵素とは何かを学習し、速度論を学び、次いで個々の代謝系で個々の酵素反応を理解する構成であろう。しかし本書では、酵素が生体反応で中心的役割を担っている重要性を踏まえて、酵素を多角的に取り上げている。その中には、バイオテクノロジー産業で利用されている酵素の話題も取り上げられており、続く第3部の代謝を理解する助けとなるばかりでなく、バイオテクノロジー産業における生化学の重要性を理解できる内容となっている。

また本書には、生化学の理解に必要な「化学のエッセンス」も掲載されている。例えば、滴定やpHの定義や化学結合の種類といった事柄であるが、復習が（他書を調べずに）1冊でできて新たな知識も学べるため、是非とも生化学が苦手な人に推薦したい。

（鈴鹿工業高等専門学校 小川亜希子）