



## エレクトロスプレーによる多電荷・巨大タンパク分子イオンの生成

John B. Fenn 博士の業績

山下 雅道

### 生体分子の質量測定とエレクトロスプレー

分子ほどに小さな質量を知るには、分子をイオンとしたうえで、電場や磁場により生成したイオンに力を加え、イオンの運動の軌跡などから測定する。イオンの質量（質量/電荷比）を運動の軌跡などから精度よく求めるには、運動への擾乱じょうらんのない真空中で測定する。質量分析の第一歩は分子からイオンを生成することにある。ところで生体を構成する分子の中には、双極子モーメントの大きな水分子との親和性が高いために、加熱して蒸発させ真空中に導入することの困難な極性分子が多くある。そのような分子はイオンとして液体中に溶存していたり、あるいはイオンとの親和性が高い傾向にある。John B. Fenn 博士は、巨大タンパク分子の多電荷イオンをエレクトロスプレー法により生成し質量分析する方法を作り上げたことで 2002 年ノーベル化学賞を受賞した。エレクトロスプレーは溶液中の生体分子を選択的に効率よく、しかもソフトに壊さず分子イオンとして試料液中から取り出せる。これに加えて、多電荷イオンを生成し質量/電荷比を小さな値とすることで、分析計の質量走査範囲を格段に拡大でき、分子量 10 万におよぶタンパク分子も分析可能であるという優位性をもっている。

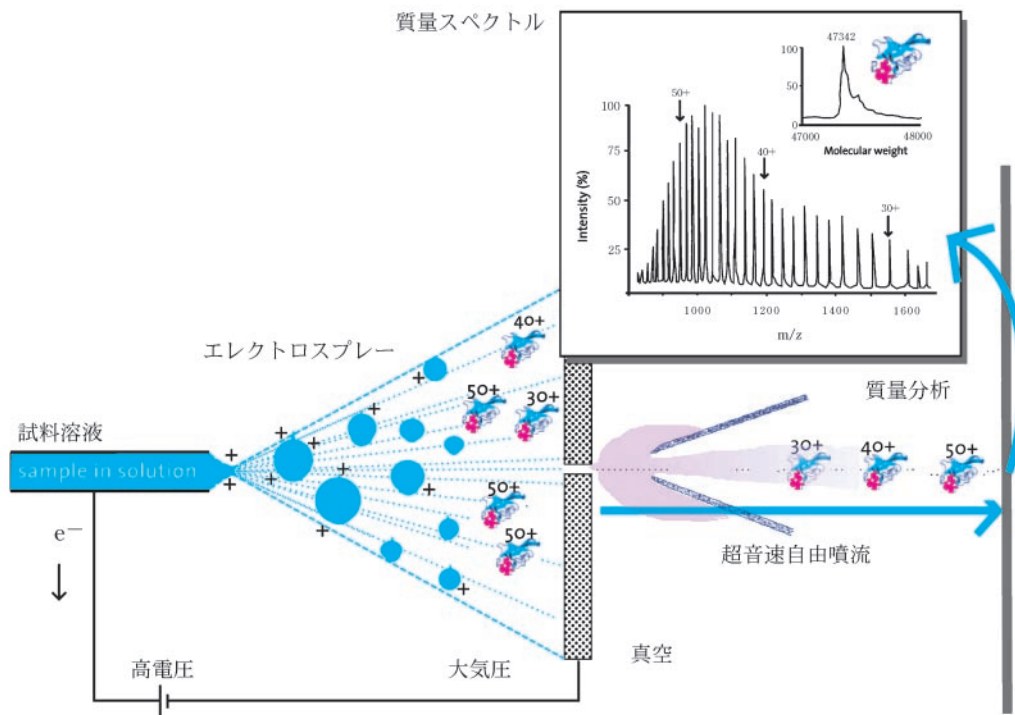
エレクトロスプレー質量分析の初出論文が掲載されたのは 1984 年 9 月の *J. Phys. Chem.* 誌である。この号は、当時 Yale 大学に在職していた Fenn の 65 歳（年金支給開始で通常ならば引退）を祝う特集であった。Fenn もその発展に寄与した分子線化学でノーベル賞を 1986 年に受賞する Harvard 大学の Herschbach 教授が暖かい序文<sup>1)</sup>をこの号に寄せている。さて、同誌巻頭にまとめられた 1984 年までの Fenn の発表論文リストのページに続いて綴られたのが Yamashita & Fenn のエレクトロスプレー論文<sup>2)</sup>である。この論文は Fenn 特集号の冒頭の論文であり、かつ上の論文リストの挿尾とうびを飾った。その論文の題名は、“Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme” とされ、年齢 65 を越えて、生体分子の質量分析という新しい研究分

野に転進することを高らかにうたった。超音速自由噴流や分子線化学、気体分子反応について築きあげてきた Fenn の学問の基盤の上に、ノーベル賞という輝かしい評価を得たエレクトロスプレーを見事に花咲かせたのである。

### エレクトロスプレーによるイオン化技術の要石

生体分子を質量分析するのに、試料分子を分解することなくソフトにイオンとし、さらにそのイオン化が生体分子に選択的であり、また多電荷イオンを高効率で生成するという技術を開発するにはいくつかの要石かなめいしがあった。エレクトロスプレー現象そのものはおよそ一世紀前にも知られ、Yale 大・物理教室の Zeleny は 1914 年に記載<sup>3)</sup>している。Dole はポリスチレンポリマーの（電子付加）イオンをエレクトロスプレーで生成し、超音速自由噴流によりそのイオンを共存する気体の流れにより加速して大きな運動エネルギーを与え、阻止電圧法でポリマー分子の質量を測定し 1968 年に報告<sup>4)</sup>している。Dole らのとったイオン化過程や真空中へのイオンの導入で何が起こり、したがってマクロ分子イオンの分析法として活用するには何が改善されなければならなかったかは、Fenn らによるエレクトロスプレーイオン化過程や真空中への導入で生起する現象の解明を待って初めて明らかになった。

Fenn がエレクトロスプレーに興味を持ったのは、重い分子を軽い分子の気体に混ぜて真空中に超音速自由噴流で導入すると、流体力学的に重い分子は加速されて高エネルギーの分子線を生成できるという Fenn らが創始した方法を Dole が採用したことにあった。気体のつまった部屋の壁に小さな孔をあけ、気体分子を真空中に導くとする。孔の径が気体分子の自由行程（他の分子と衝突してから次に衝突するまでに運動する距離）よりも小さければ、運動する気体分子でたまたまその小さな孔の部分に向かった分子が真空の部屋側に漏れ出る。孔の径を大きくしていくと、孔（ノズル）に向かって気体の流れ、ノズルの一番狭いスロート部で音速にまで加速さ



ノーベル財団 Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002 「生体のマクロ分子の質量分析および核磁気共鳴」(9 October 2002) より

図1 巨大な生体分子のエレクトロスプレーイオン化法

れる自由噴流が形成される。ノズルから流れ出る流速（音速）は、気体の温度による熱エネルギーと気体の主成分分子の分子量により決まる分子の並進速度で規定される。分子の並進速度は同じ温度では質量の $-1/2$ 乗に比例するので、重い分子の熱的な運動の速度は遅い。しかし、ノズルを通る流れの速度は気体の主成分分子の分子量で決まるので、重い分子は加速され、真空の部屋の中に導入されたあとの運動エネルギーは、ノズルに流れこむ前のソースでの熱的なエネルギーより増大する。これをシードビーム法と呼び、Doleの阻止電圧法によるマクロイオンの質量測定に応用された。DoleとFennとの出会いは、エレクトロスプレーの成書<sup>5)</sup>でのFennによる序文に詳しい。

さて、エレクトロスプレーでは、気化しにくい生体分子の溶液を溶存状態のままイオン化する。注射針に試料溶液を送り高電圧を印加すると、電界により帯電した液体が引き出され、注射針の先に円錐状の液柱が形成される。円錐の尖った先端には、その曲率半径に反比例して強くなる急峻な電場勾配がつけられる。強い電界は、帯電した細い液柱をちぎり、プラス（負の高電圧を印加するときはマイナス）の多くのイオンを表面にのせた帯電液滴が注射針の先端から噴霧される。このような強い電界中での噴霧のプロセスにより、高密度にイオン（プラスイオンを生成する場合には一般的に水素イオン）を

噴霧液滴の表面にのせることができる。試料分子が液滴に含まれれば、液滴から溶媒分子が蒸発した後に、その分子と液滴表面の多数のイオンが会合し、多電荷イオンが生成される。電界により噴霧することで多電荷イオンを容易に生成できる特質は、類似のイオン化法、たとえば注射針周囲の強い気流により液体試料を噴霧するといった方法に対するエレクトロスプレーの優位性を際立たせている。分子量が10万にもおよび巨大な生体分子を多電荷イオンにすることで、エレクトロスプレー法は普通の質量分析計でこれらの巨大分子の分析を可能にした。

大気圧下でエレクトロスプレーにより液滴を噴霧すると、周囲の気体が熱浴となり帯電液滴からの溶媒分子の蒸発を促進できる。帯電液滴から溶媒分子が蒸発すると、液滴表面のイオン同士の反発が表面張力を上回るようになる。液滴を球状の形態にまとめている表面張力が弱くなると、周囲からの摂動により表面波が励起され、液滴はいくつかの小滴に分裂する。液滴の分裂は体積に比べて表面積を大きなものにし、さらに蒸発は加速される。周囲気体の熱浴効果は、蒸発の潜熱により冷却される液滴にエネルギーを供給して、迅速な蒸発を進める。熱浴気体の効果は、蒸発の促進ばかりではない。イオンや電子が電界で加速され高いエネルギーを得て、たとえば分子イオンに衝突してそれを分解してしまうような反

応を熱浴気体は抑止する。すなわち、熱浴分子との頻繁な衝突により電界中で加速される荷電粒子のエネルギーを常温での熱エネルギー以上には上げない効果を期待できる。負イオンを生成するエレクトロスプレー<sup>6)</sup>では、尖った先端から電子が容易に放出される。熱浴気体に電子親和性の強い分子を加えることにより、電子などの引き起こす放電反応を抑制する。このように、エレクトロスプレーによるイオン化は、正負いずれの分子イオンであっても、およそ試料溶液中に溶存していたとかわらない状態で分子イオンを得ることができ、試料分子を分解しないソフトなイオン化法と特徴づけられる。

Fennの貢献の大きなものは、通常の質量分析計で測定可能な範囲の分子量をもつ生体分子を試料として用いることにより、測定された質量スペクトルからエレクトロスプレーイオン化においてどんな現象が関与しているのかを明らかにしたことにある。エレクトロスプレーによれば、分子を分解してフラグメントイオンを生じたりすることなく、もとの分子の質量をそのままに残すインタクトな分子イオンを与えることを実証した。エレクトロスプレーの動作条件によっては、溶媒和した分子イオンが得られることを示し、エレクトロスプレーを実用的なイオン化源としていくための指針を与えた。また、試料溶液を送る注射針に印加する電圧を増大させた場合には、試料溶液中ですでに存在しているような分子イオンを引き出すといったエレクトロスプレーの様相とは全く別種のイオン化過程に遷移することも示した。

### 流体力学と質量分析の出会い

初めにも述べたように、分子イオンの精度の高い質量分析は周囲の気体分子などとの衝突による効果为了避免のため真空中でなされる。そこで、大気圧下でエレクトロスプレーにより生成した分子イオンを質量分析するため真空中へ導入しなければならない。このときに、熱浴気体も分子イオンと同時に真空中に膨張しながら噴出する。エレクトロスプレーを実用的なイオン源へと発展させるには、この真空中への自由噴流についての深い理解が求められた。

ところで、Fennの真骨頂は、流体力学と化学をつなぎ分子線化学を始めたところにある。Fennは1940年にYale大学で溶液化学の研究により学位を取得した後、ラムジェットエンジンの開発に携わり、また米海軍研究所のロンドン駐在勤務中(1955~56年)にドイツの分子線研究に触れた経験から、超音速自由噴流を活用した分子線化学の創始者の一人となった。とりわけ、重い分子を混ぜて高エネルギーの分子線を生成するシードビーム法はFennの得意技であった。この技術に関連する一つの応用は、ガスクロマトグラフと質量分析計をつなぐインターフェースとして用いられるジェットセパレーターである。ヘリウムなどの軽いキャリアーガスの

中に含まれる重い試料分子を濃縮して質量分析計に導入するために、超音速自由噴流を用い、噴流の中心部での重い分子の割合が分子の熱的な並進速度の質量依存性もあって増大する効果が活用されている。

エレクトロスプレーでのFennの貢献は、真空中にノズルから噴出する超音速自由噴流中で気体が断熱膨張し急激に温度が下がり、分子の凝縮が進行することへの鋭い洞察のもとに、そのような凝縮を防止する手だてを工夫したことにある。噴流中の温度は膨張する前の試料ガスの絶対温度の1/100ほどにも急激に低下するので、凝縮性の分子が膨張する噴流中に存在するなら容易に凝縮する。膨張の過程で気体分子の密度もまた急激に低下するので、分子間の衝突もやみ、自由噴流中での反応の生成物は凍結されて保存される。このように自由噴流中では温度と密度が急激に低下するので、凝縮現象を初めとする気体反応の素過程を探るのに自由噴流をそれらの反応の場として活用することになった。Fennは、気体分子の凝縮の素過程を超音速自由噴流法により調べていた経験<sup>7)</sup>もあって、エレクトロスプレー技術を実用化する要点に、このような凝縮過程を制御する必要のあることを的確に探り当てることができた。

さて、分子イオンと極性をもつ分子との間の相互作用は(電荷を有する二つの粒子間に働くクーロン力による相互作用に次いで)強く、またその作用は遠くまで達する。これに基づいて、分子イオンと極性分子の会合反応の断面積は大きい。生体分子を溶解する溶媒は極性の高い分子からなる。エレクトロスプレーイオン源のスプレー領域でせっかく溶媒分子が蒸発して裸の生体分子イオンを生成しても、真空中への自由噴流に溶媒分子が含まれると、瞬く間に分子イオンは溶媒和して大きな雪だるまになってしまう。雪だるまとなった分子イオンを質量分析しても、分子の質量は求めることができない。この問題に対する流体力学的な解決は、電界により帯電液滴のノズルに向かう運動と対向して乾燥した熱浴気体を流すことであった。除湿器からの乾燥空気まろを竿に吊した洗濯物にあて水分を風で吹き飛ばす、という誰でも日常に行う工夫を、蒸発した電荷をもたない溶媒分子を対向流で押し流して除去し、竿に吊す部分を、帯電液滴を真空中への試料導入部方向へと電界により駆動するのに置き換えたものといえる。分子イオンのみが真空中に導入されて、雪だるまとならずに質量分析することが可能になった。

エレクトロスプレーの開発は、後からみれば誰でも思いつく発想を、理詰めで積み上げてその有用性を実証したのであり、その発想が単純なだけに応用範囲は広いものになった。さらに、Fennの流体力学的な学問的背景は、エレクトロスプレーを液体クロマトグラフなどの分析器と質量分析計のインターフェースとして確立するのに、キャピラリーノズルを用いて電界に逆らって分子イ



オンを流体力学的に輸送し真空中に導く技術の発明にも役立った。このようにして、多電荷イオンによる巨大な生体分子のエレクトロスプレー質量分析法<sup>8)</sup>が Fenn のもとで確立されたのである。

### Fenn 博士を育てた Berea College

肌の色，国籍，宗派，政治信条を問わず，実力あるものをグループに加え研究機会を与えその能力を發揮させるという，いわばアメリカの「強さ」を一人の科学者のなかに具現する暖かな Fenn 博士の人柄は，リベラルな Yale 大学に在籍していたことにもよろうが，ケンタッキー州のアパラチア山中にある Berea College に学んだことによるところが大きい。Fenn の父親は Rutgers 大学を出た電気技師，母親は Columbia Teacher's College を出て，アラスカ州シトカ (Sitka) で知り合い，ともに伝道学校で教えた。その後家族はニュージャージーに移り，Fenn は 1917 年 6 月 15 日ニューヨークで生まれた。1929 年に始まる大恐慌は父親の職を奪い，家族は職を求めて Berea に移り住み，Fenn はハイスクールおよび大学を Berea College (1934 ~ 1937 年，集中して単位を取得し 3 年で大学を繰り上げ卒業) にて過ごした。Berea College はキリスト教に基づく大学であり，「学び，働き，奉仕する」が基本に掲げられている特色ある大学である。Fenn もいろいろな学内の仕事に従事していたが，大学に勤務していた年上の婦人 Magee と高校在学時に知り合い，後に結婚する。新婚旅行で最初に立ち寄った食堂は，Berea から 100 km ほど南下した Corbin の道端にあったケンタッキーフライドチキンの元祖となった店だという。Fenn 博士の雄弁さや米国東部知識人としての豊かな資質，そして何よりも溢れ出る暖かいユーモアは，夕食に際して学生を代表してスピーチする役を務めるなどした Berea 時代から鍛えられた。

Berea College の歴史は南北戦争 (1861 ~ 1865) 直前にさかのぼり，急進的な奴隷解放運動の一環としてケンタッキーの山中に開学された。ケンタッキーは南部に属したものの，アパラチア山地は奴隷制労働によるプランテーションが展開されるには貧しく，当時北部諸州での工業化を進めた鉄鋼業のための採炭地として「解放」奴隷や東欧からの新たな移民労働者を吸収していた。聖書にある「神は一つの血をもつ地上の全ての人々を造った」という言葉を実現するものとして，南部でありながら奴隷制の希薄であったアパラチア山地の Berea に開学されたという。米国の他地域からのアパラチア山地の隔絶と，そこで継承維持されてきた古いアメリカ文化の特徴は Foxfire Book<sup>9)</sup>にうかがい知ることができる。Berea College は，貧しい家庭の多いアパラチア山地の向学心に富む優れた子女を対象に，学費を徴収することなく，性や肌の色にかかわらず学ばせてきている。1866 年の学生数 187 のうち過半を占める 97 人は黒人であっ



写真 1 ノーベル賞授賞式会場での John B. Fenn 博士と筆者

た。南北戦争後ややあって復活した南部政治勢力は黒人・白人を差別し分離する法 (1960 年代の公民権運動で廃されるまで続く) のもとに，Berea College に黒人を対象とする分校を別に開くよう強制した。Gould<sup>10)</sup>が告発している「科学的」な装いをこらした人種差別の正当化や，被差別階層や人種への教育投資を無駄なものとして抑制するような動きに真っ向から反対する教育の理念とその実践が，Berea College の百年を越す歴史に刻まれているのは刮目に値する。Fenn 博士のノーベル化学賞受賞を後世に伝える記念額は，この Berea College に掲げられる。

2002 年 12 月 10 日，ストックホルムでの授賞式後のノーベル晩餐会<sup>ばんさんかい</sup>で Fenn 博士によりなされた科学とその使徒への賛辞からなるスピーチを紹介しておこう。

長く，今なお熱い思いを寄せる分子線技術にかかわる研究生活において何人かの偉大な求道者となした会話の逐一を思い起こすことができます。その中でもっとも印象深いのは I. I. ラビとの会話です。彼は真の科学の使徒であり，原子核の磁気的な特性を測定する共鳴法を発展させた業績で 1944 年ノーベル物理学賞を受賞しました。彼との会話において，究極の真理を求める人間の精神の力に対するたゆむことのない忠誠さに基づいたラビの雄弁に私は深く突き動かされたのです。私にとり，この人間の精神の真髄は，科学の精神でもあります。私の愛する偉大なアメリカの詩人，ウォルト・ホイットマンの詩作「草の葉」の数行に，美しくもその真髄がとらえられています。いま私に授けられた名誉への感謝の意を表し，その詩の数行を皆さんと分かち合いましょう。

もの静かにたゆまぬ蜘蛛  
私は小さな高台にそれが独り いるのを認めた  
取り巻く空虚で広大な周囲を どう探るのかを認めた  
それは その身から 糸を、糸を、糸を 繰り出す  
絶えず糸を巻きほぐし、疲れをしらず糸を放つ

そして あなたは、魂に誓い、  
あなたの立つ地において  
囲まれ、放たれ、宇宙の測りしれぬ海に  
絶えることない思考、推測、投影、  
それらを繋ぐ球体を求めて  
あなたの求める橋が架かるまで、  
延びやかな錨がもやうまで  
浮かぶ蜘蛛の糸の飛びゆきて  
いずこに掛かるまで、吾が魂に誓い  
(Walt Whitman; "Leaves of Grass" より、訳：山下)

アーメン

#### 文 献

- 1) C. E. Kolb, D. R. Herschbach : *J. Phys. Chem.*, **88**, 4447 (1984).
- 2) M. Yamashita, J. B. Fenn : *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451

- (1984).
- 3) J. Zeleny : *Phys. Rev.*, (2<sup>nd</sup> Ser.), **10**, 69 (1914).
- 4) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines : *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).
- 5) R. B. Cole : "Electrospray Ionization Mass Spectrometry", (1997), (John Wiley & Sons, New York).
- 6) M. Yamashita, J. B. Fenn : *J. Phys. Chem.*, **88**, 4671 (1984).
- 7) M. Yamashita, T. Sano, S. Kotake, J. B. Fenn : *J. Chem. Phys.*, **75**, 5355 (1981).
- 8) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse : *Science*, **246**, 64 (1989).
- 9) E. Wigginton : "The Foxfire Book : Hog Dressing, Log Cabin Building, Mountain Crafts and Foods, Planting by the Signs, Snake Lore, Hunting Tales, Faith Healing, Moon", (1972), (Anchor Press/Doubleday, New York).
- 10) S. J. Gould : "The Mismeasure of Man", (1996), (Norton, New York).

山下雅道 (Masamichi YAMASHITA)

宇宙科学研究所 (〒229-8510 神奈川県相模原市由野台 3-1-1)。東京大学理学部卒。理学博士(東京大学)。現在の研究テーマ 宇宙生物学ほか。主な著書 "宇宙環境利用の基礎と応用"(分担執筆)(コロナ社)。趣味 カエルとオタマジャクシなどの写真撮影、ハイキング、料理、工作。

E-mail : yamashita@surc.isas.ac.jp

## 新刊紹介

### NMR 分光法 原理から応用まで

日本分光学会 測定法シリーズ 41

阿久津秀雄・嶋田一夫・鈴木榮一郎・西村善文 編

本書は、NMR 分光学の基礎を平易に解説し、実用的な応用例を紹介することに主眼を置き、構成されている。第 I 部：NMR の基本原理(1~7 章)、第 II 部：NMR のハードとソフトの実際(8~12 章)、第 III 部：NMR の応用展開(13~16 章)として、基礎理論と分光計の原理、スペクトル測定法、スペクトル解析法、実際の応用例の順に構成され、生体物質の検出と構造解析を中心にまとめている。入門者にも理解でき、また関連分野の研究者にも関心が持てるよう配慮され、奥深く幅広い NMR 分光法の特徴を表している。

(ISBN 4-7622-3009-X・A5 判・269 ページ・4,000 円+税・2003 年刊・学会出版センター)

### 生体と電磁界

上野照剛・重光 司・岩坂正和 編

送電線のそばに住んだり、電気毛布や携帯電話を使用し続けたりすると、電磁界や電磁波のせいで白血病や乳がん、脳腫瘍になるかもしれない、という話を聞いたことのある人は多いのではないだろうか。ややもすると話題性がかりが先行し、科学的な解釈や裏づけが後手に回ってしまいがちなこうした話題について、本書は最近の科学的な研究を平易な表現で解説している。全体は 16 章からなるが、そのうち多くの章で 1990 年代後半から 2002 年までの文献が引用されている。特に家庭用電気機器から発生する生活環境レベルの低周波電磁界による生体影響について、分子、細胞、実験動物レベルから、ヒト実験および疫学データまで、実に幅広い見聞をカバーしている。電磁界の健康影響について知りたい人にとって必読の良書である。

(ISBN 4-7622-3011-1・A5 判・342 ページ・5,810 円+税・2003 年刊・学会出版センター)