

ESI 法を用いた生体分子イオンの構造と性質の解明

(横浜市大院・理) ○深瀬智史、小口豊、野々瀬真司

【序】 孤立状態での蛋白質の構造とその物性を解明することはプロテオミクス研究において、重要な意味をもつ。本研究ではエレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) で生成した蛋白質多電荷イオンを二重質量分析・衝突反応装置を用いて、気相中での衝突反応の観測をした。衝突反応には Lysozyme (14306[amu]) を用いて、ピリジン (Py) との電荷移動反応を行った。Lysozyme は細菌などの細胞壁を構成する多糖類を加水分解する酵素であり、4 個のジスルフィド結合 (S-S 結合) によって、堅牢な構造をしている。この 4 個の S-S 結合を切断したものについても同様の実験を行い、蛋白質立体構造と反応性の関係について調べた。

【実験】 実験装置の概略を図 1 に示す。この装置は ESI イオン源、四重極質量分析計室、衝突反応セル室、飛行時間型質量分析室から構成され、それぞれが独立に差動排気されている。

1. ESI 法による蛋白質イオンの生成

蛋白質試料溶液を 8kV 程の高電圧をかけたキャピラリーから噴霧させ、荷電粒子を含む液滴を生成する。そこへ乾燥窒素ガスをフローし、荷電液滴から溶媒を蒸発させる。このように大気中で孤立分子イオンを生成し、真空中へと導入する。

2. 蛋白質イオンの衝突反応の観測

ESI 法によって蛋白質をイオン化すると、複数の H^+ が付着した多電荷イオンが生成する。四重極質量分析計で特定の電荷数 z の蛋白質イオンを質量選別する。これを八極子イオントラップを用いた衝突反応セルに導き、Py 等の気体分子と衝突反応させた。反応による生成イオン種を反射型飛行時間型質量分析計で質量分析し、検出した。

3. Lysozyme 内ジスルフィド結合の切断

蛋白質立体構造の違いによる反応性を検討するため、 $C_4H_{10}O_2S_2$ からなる還元剤、Dithiothreitol (DTT, 154.25[amu]) を用いて Lysozyme 内の S-S 結合を切断した。Lysozyme 溶液に DTT を混合して、一晚室温保存し、60°C で数時間保温したものを用いて同様の実験を行った。

【結果・考察】 上記の実験装置を用いて、Lysozyme と S-S 結合を切断した Lysozyme (Lysozyme+ DTT) 多電荷イオンの Py との衝突によるプロトン移動反応について検討した。図 2 は各試料の飛行時間型質量スペクトルである。このときは四重極質量分析計の直流電位をゼロにしてあり、質量選別は行っていない。(a) が Lysozyme についてであり、7~12 個の H^+ が付着した多電荷イオンが観測された。(b) は Lysozyme を DTT で処理し、S-S 結合を切断したものの質量スペクトルである。7~16 個の H^+ が付着した多電荷イオンが観測された。次に四重

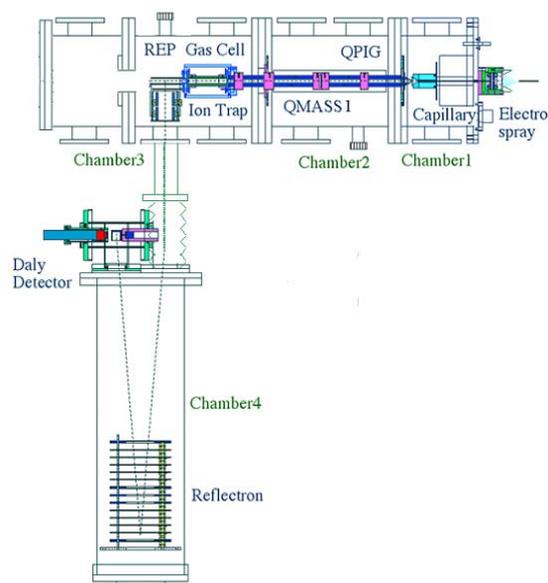


図 1 ESI 二重質量分析・衝突反応装置の概略。

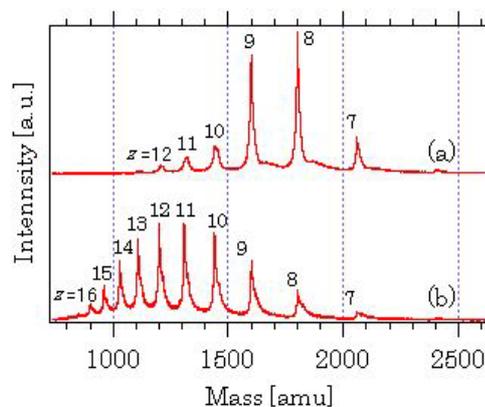


図 2 (a) Lysozyme, (b) Lysozyme+DTT の飛行時間型質量スペクトル。

極質量分析計によって特定電荷数 z のイオンを質量選別して、Py と衝突反応をさせた。図 3,4 にその結果を示した。図 3 は電荷数 $z=9$ について質量選別した Lysozyme の質量スペクトルであり、図 4 は電荷数 $z=9$ について選別した Lysozyme の S-S 結合を切断したもの、Lysozyme+DTT の質量スペクトルである。これら図中の(a)は衝突反応セル中にバッファーガスとして He のみを充満させた場合のスペクトル、(b)は He に加えて一定量の Py を衝突反応セルに導入したものである。 $z=9$ について比較すると、Lysozyme +DTT の方が反応性が小さいことがわかる。Py の導入による反応生成物イオンは親イオン $[\text{Protein} \cdot z\text{H}]^{z+}$ 、親イオンから電荷数が減少したイオン $[\text{Protein} \cdot (z-m)\text{H}]^{(z-m)+}$ ($m=1,2,\dots$)、および Py に H⁺ が付加したイオン $\text{Py} \cdot \text{H}^+$ の生成が観測された。これらの結果から、下式で示すような衝突反応によって蛋白質イオンから Py へのプロトン移動反応が誘起されることがわかった。

$$[\text{Protein} \cdot z\text{H}]^{z+} + \text{Py} \rightarrow [\text{Protein} \cdot (z-m)\text{H}]^{(z-m)+} + \text{Py} \cdot \text{H}^+$$

質量スペクトル中の親イオン、生成物イオンの強度比から、蛋白質イオンから Py へのプロトン移動の反応速度を見積もった。図 5 がその結果である。図 5 は縦軸が相対的反応速度定数 k の対数、横軸は親イオンの電荷数 z である。Lysozyme、Lysozyme+DTT どちらの場合も電荷数増大に伴って、反応速度定数 k は増加した。その要因は、蛋白質内 H⁺ の電荷同士のクーロン反発力である。また、Lysozyme では電荷数 8 と 9 との間でその反応速度が急激に増加していることがわかった。これは 9 個目以上の H⁺ は蛋白質表面に露出しており、Py との接近が容易となり反応性が増大したのではないかと考えられる。Lysozyme+DTT の場合は電荷が大きくなるにつれ、単調に緩やかに反応速度が上がる。S-S 結合切断によって H⁺ がタンパク質表面に露出すると考えられるが、その要因以上に蛋白質内の自己溶媒和の影響が強いのではないかと考えている。

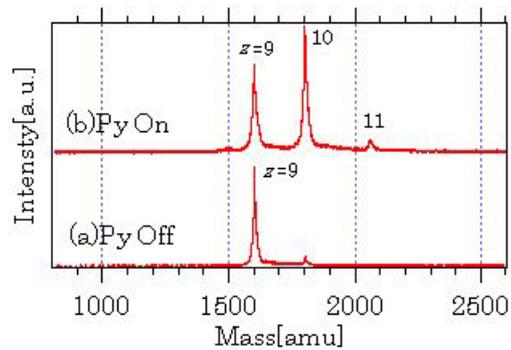


図 3 Lysozyme($z=9$)の質量スペクトル。(a)衝突反応セル中に He のみ導入(b)He に加えて Py を導入したもの。

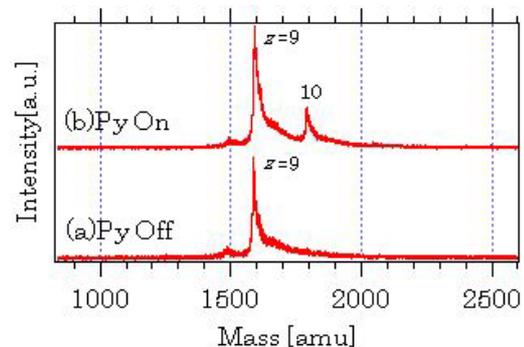


図 4 Lysozyme+DTT($z=9$)の質量スペクトル。(a)衝突反応セル中に He のみ導入(b)He に加えて Py を導入したもの。

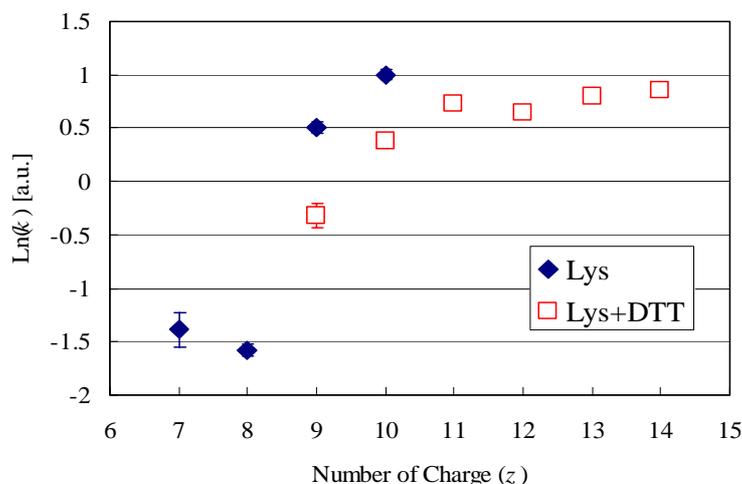


図 5 Lysozyme, Lysozyme+DTT イオンから Py へのプロトン移動反応の速度定数 k とイオンの電荷数 z との関係。
◆は Lysozyme、□は Lysozyme+DTT の反応速度定数 k をそれぞれ表す。