

電子移動解離を用いた翻訳後修飾 ペプチド解析への新たな取組み

(阪府大院理¹・阪大院工²・阪大院理³・産総研⁴・大阪府母子医療センター⁵)

○早川滋雄¹・橋本雅美¹・植田友里¹・長尾博文²・川村和哉³・豊田岐聡³・
茂里 康⁴・地頭所眞美子⁴・和田芳直⁵

【序】 ゲノム解析が行われた現在にあって、プロテオーム解析やメタボローム解析が生体分析に重要な部分を占めつつある。2002年ノーベル化学賞の対象になったイオン化法の開発以降、機器分析の中で最も高感度な分析手法である質量分析法は、微量分析を必要とする生体分析など現代科学の発展に不可欠な役割を担っている。しかし、タンパク質などの生体試料では分子量の測定からだけではアミノ酸配列など化合物を決定することは不可能であり、構造解析は質量分析法における大きな課題となっている。質量分析法における従来の構造解析手法である衝突活性化解離(Collisionally Activated Dissociation: CAD)では、生体内でのタンパク質の機能を決定する翻訳後修飾部位が脱離して、その位置決定が不可能であるという問題がある。そのため、リン酸化、糖鎖付加、脂質付加などの翻訳後修飾部位を決定できる構造解析手法の発展が強く期待されている。

当研究室では、アルカリ金属ターゲットからの電子移動を用いる解離は、従来のCADと非常に異なった解離を与えることを、電荷逆転質量分析法による研究で明らかにしてきた。[1] この手法を、生体分子の構造解析に適応することを試みるために、大阪大学との共同研究により装置開発を行った。その装置を用いて、翻訳後修飾の一種であるリン酸化ペプチドの電子移動解離において、リン酸化部位の決定とアミノ酸配列が決定できることが分かったので報告する。

【実験】 大阪大学と共同で開発したアルカリ金属蒸気をターゲットとして導入することが可能なMS/MS質量分析装置を図1に示す。[2] Collision cellは反応室を取り換えることにより、希ガスの導入も可能である。MS-I部はエレクトロスプレーイオン化法(ESI)を使用することが可能な日本電子製JMS-HX110質量分析装置で、MS-IIは日立製M-80質量分析装置の電場部を用いている。機種異なる2つの質量分析装置を結合させているため、イオンの焦点位置が異なる。これを改善し強度の減少をなくすため、自作のQuadrupole lensを入れている。リン酸化ペプチドは産業技術総合研究所で合成されたものを用いている。ESIでイオン化された2価のプロトン化ペプチドは5kVで加速されMS-I部で質量選択される。質量選択されたイオンは衝突室で希ガスターゲットまたはアルカリ金属ターゲットと衝突し、解離生成した1価と2価のフラグメントイオンはMS-II部で質量分析されCID(Collision Induced Dissociation)スペクトルとして測定される。

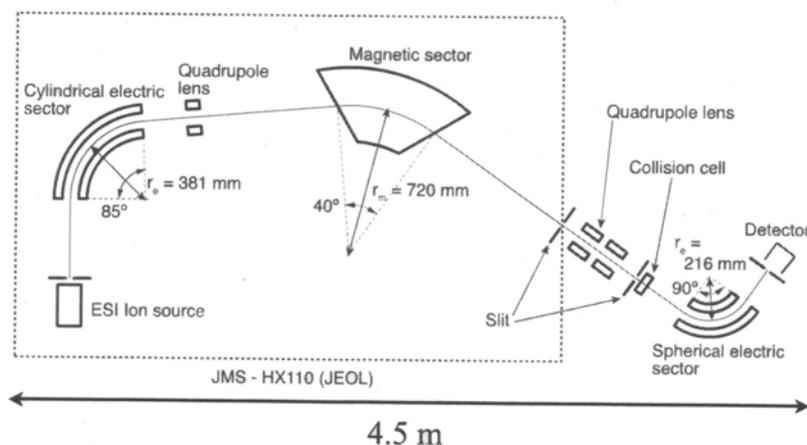


Fig. 1. Schematic diagram of MS/MS instrument in which alkali metal targets can be used.

【結果と考察】

2価プロトン化されたリン酸化ペプチド(YGGMHRQET(p)VDC)のCIDスペクトルを Fig.2 に示す。[3] a)と b)のターゲットはそれぞれ Xe と Cs である。希ガスターゲットではCAD過程による $[M+2H]^{2+}$ より低質量側のピークが主に観測され、アルカリ金属ターゲットでは電子移動解離 (Electron Transfer Dissociation: ETD) 過程による1価イオンからの解離のピークが主に高質量側で観測された。2価のフラグメントイオンに対する1価のフラグメントイオンのピーク面積比はCsターゲットの場合はXeターゲットの10倍であり、CADよりもETDの有効性を示している。

Fig.3にCsターゲットでのスペクトルを拡大して示す。 H_2 や H_2O 脱離が主なピークとして観測され、その他にリン酸基が脱離していない5つのcイオン(2重線)と4つのzイオン(実線)が観測された。これらのピークの間はアミノ酸の配列を示している。電子移動過程では、電子捕獲解離(ECD)と同様にリン酸基の脱離のないN-C α 骨格開裂が起こることが分かる。Fig.4にリン酸基が2つついたペプチドのCsターゲットを用いたCIDスペクトルを示す。リン酸基が2つの場合にも、リン酸基の位置決定とアミノ酸配列が分かる。

アルカリ金属を用いたETDは、CADに比べ10倍程度の効率をもち、翻訳後修飾基を保持したままN-C α 骨格開裂を起こすため翻訳後修飾基の位置特定や、ペプチドの構造解析に有用であると考えられる。

参考文献

- [1] S.Hayakawa, J. Mass Spectrom. 2004; 39: 111. S.Hayakawa et al., J. Am.Chem.Soc. 2007; 129: 7936. S.Hayakawa et al., J. Am.Chem.Soc. 2008; 130: 7645. Sasaki et al., J.Mass Spectrom. in press.
- [2] S.Hayakawa et al., J.Chem.Phys. 2006; 124: 224320. S.Hayakawa et al., Int. J. Mass Spectrom. 2007; 266: 122.
- [3] S.Hayakawa et al., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008; 22: 567.

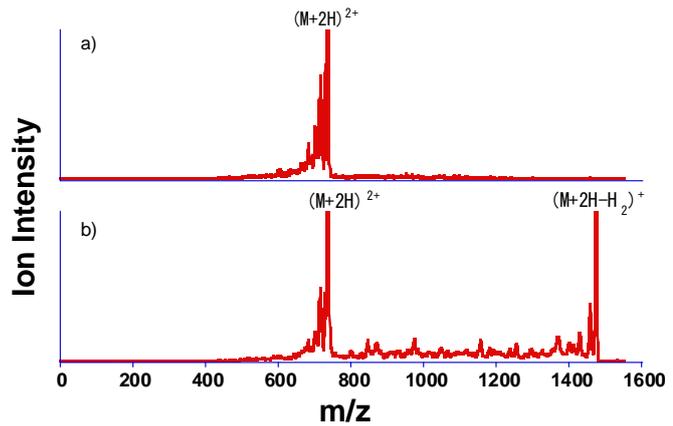


Fig.2. CID spectra of the doubly protonated phosphopeptide.

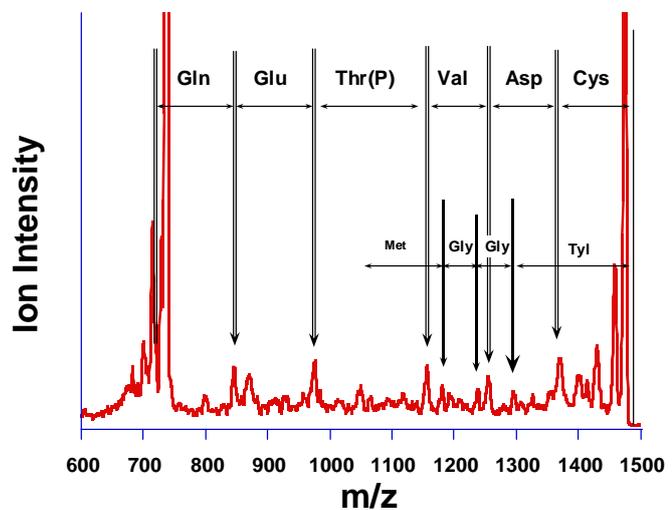


Fig.3 CID spectrum expanded in the m/z region of the singly charged fragment ions formed with the Cs target.

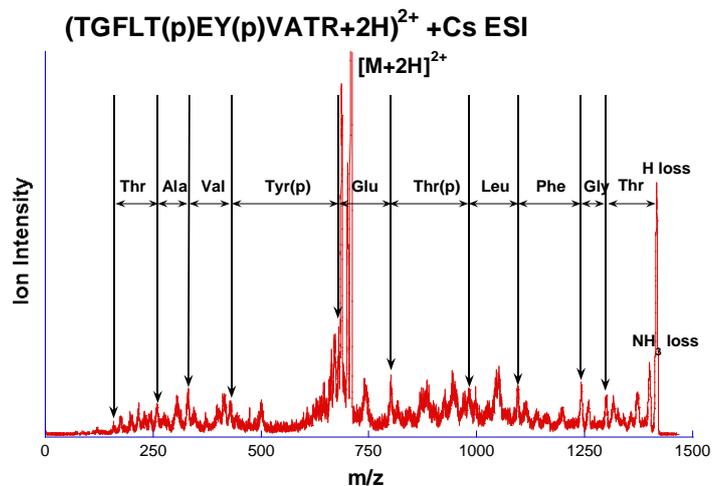


Fig.4 CID spectrum of the doubly phosphorylated peptide on collision with the Cs target.