

温度を変化させた蛋白質イオンのプロトン移動反応と構造転移

(横浜市立大学 ナノシステム科学専攻)

岡村拓哉, 山下和樹, 野々瀬真司

【序】蛋白質は分子生物学的、医学的に大きな注目を集めている生体分子であり、その構造や機能の解明は非常に重要な研究といえる。しかし、生体内にある蛋白質は、内部自由度が大きいことや準安定な構造が多いため、構造の揺らぎが多く、そして、他の生体分子に加えて無数の水分子が周囲にあり、それらの複雑な相互作用のために、生体分子の協調的な振る舞いを原子・分子 1 個 1 個から調べることは困難である。そこで、蛋白質の孤立系における構造と反応性を観察することが本研究の趣旨である。

本実験では、ESI 法 (エレクトロスプレーイオン化法) によって生成された多電荷の蛋白質イオンを真空中に導入し、付加しているプロトンが標的分子へ移動する「プロトン移動反応」を観察し、その反応速度定数について検証した。特に、この反応の温度依存性について研究した。

【実験】本実験では、ESI イオン源を備えた二重質量分析装置を用いた。装置の概要は、ESI イオン源により蛋白質試料溶液の荷電液滴を生成、脱溶媒和室における孤立イオン化、四重極質量分析計でのイオンの選別、440 ~ 300K の範囲で温度可変のガスセル内での標的分子との衝突反応、飛行時間型質量分析計によって生成物の質量測定という流れになっている。実験によって得られたマススペクトルからプロトン移動の絶対反応速度定数を算出し、蛋白質イオンの反応性と構造の温度による変化について検証した。

本実験では、蛋白質試料に Cytochrome c ・ Lysozyme ・ myoglobin など、標的分子としてプロトン親和力 (PA) の小さいものから、n-Propylamine ・ n-Butylamine ・ Pyridine ・ t-Butylamine ・ Diethylamine ・ Dipropylamine ・ Dimethylpyridine ・ Triethylamine の 8 つを使用した。

【結果と考察】各電荷数の Cytochrome c イオンと 7 つの標的分子との衝突反応後のスペクトルから、各々のプロトン移動絶対反応速度定数を見積もった。(図 1) いずれの標的分子の場合でも、蛋白質イオンの電荷数の増大と共に、反応速度は

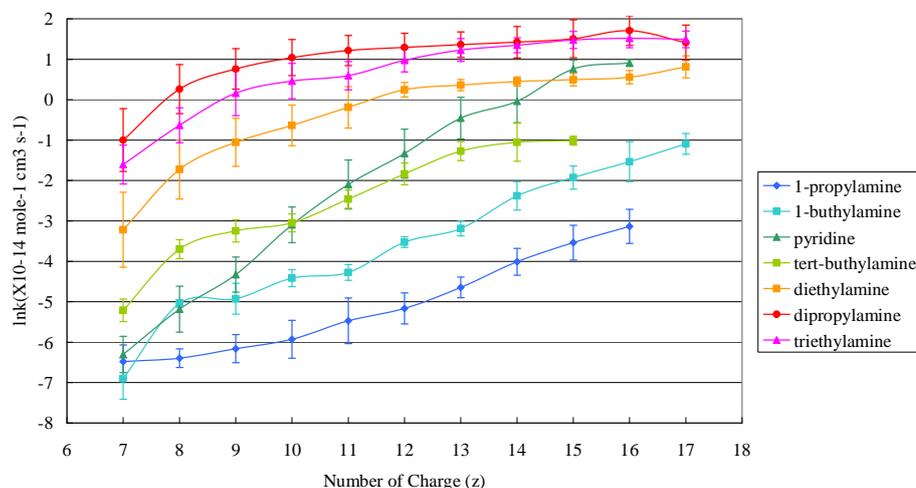


図 1, Cytochrome c イオンのプロトン移動の絶対反応速度定数

増大するという結果が得られた。これは、蛋白質イオンに付加したプロトンが増加すると、プロトン同士のクーロン反発によって蛋白質イオンの PA が小さくなるため、また、蛋白質イオンの構造が unfolding することによって標的分子が接近し易くなるため、と考えられる。

次に、ガスセル内の温度を変化させて測定を行った結果を示す。図2は電荷数(z)15の Cytochrome c 多電荷イオンを選別し、Pyridine (Py)と衝突反応させたときの温度毎のマススペクトルである。また、この反応の親イオン(選別したイオン)と生成物イオンの分岐比を図3に示す。Pyridine を導入すると、Cytochrome c イオンから Pyridine へとプロトンが移動し、電荷数が減少した生成物イオンが増大していることが確認できる(図2(b).(c))。そして、反応場の温度を変化させることで、生成物イオンの分布が大きく変化している事が分かる(図2(c)~(f))。さらに分岐比からも、各生成物イオンの割合が温度と共に劇的に変化していることが確認できる。特に、320K 付近にて急激に電荷数の低い $z=9,10,11$ の生成物イオンの割合が減少し、逆に電荷数の高い $z=12,13,14$ のイオンが高くなるという結果が得られた。これは、この 320K 付近で Cytochrome c イオンの立体構造が変化しているためと考えられる。このような傾向は、 $z=15$ 以外の Cytochrome c イオンでの反応においても観測された。また、以下の様なマススペクトルについて反応速度定数を見積もり、この温度依存性の結果からも Cytochrome c イオンの構造について考察をした。

同様の実験について、蛋白質試料を換えることで蛋白質試料ごとの比較、標的分子を Pyridine から Dimethylpyridine に換えることで標的分子のプロトン親和力と立体障害の影響についてなどの網羅的な測定を行い、蛋白質イオンの反応性と構造変化の温度依存性について様々な知見を得た。

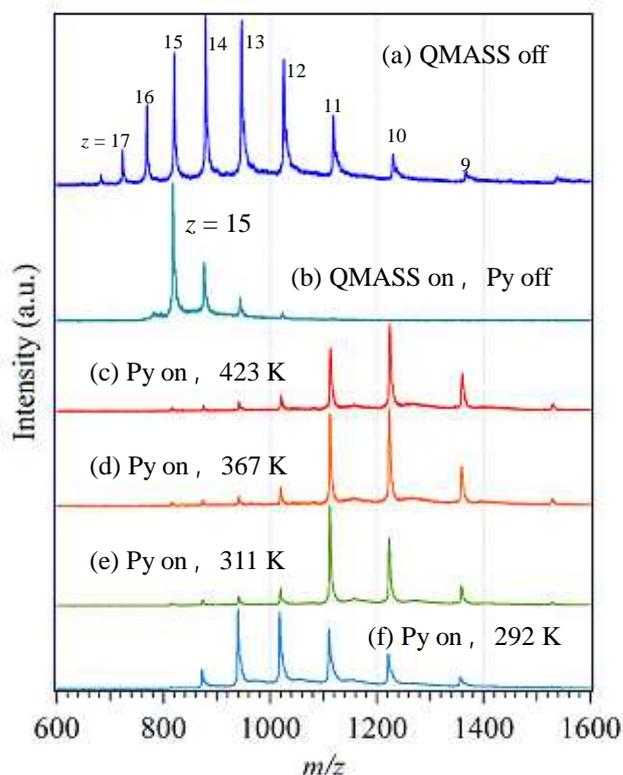


図2, Cytochrome c イオン($z=15$)と Pyridine (Py) との反応に関するマススペクトル

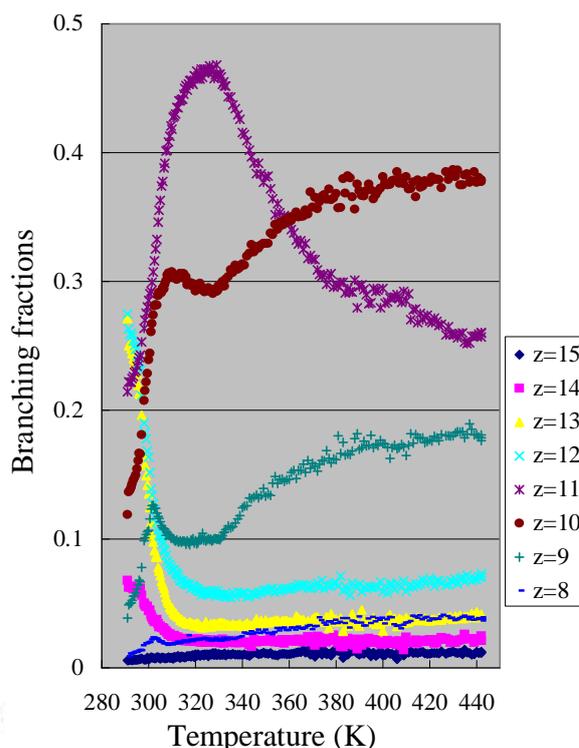


図3, Cytochrome c イオン($z=15$)と Pyridine との反応による生成物イオンの分岐比の温度変化