

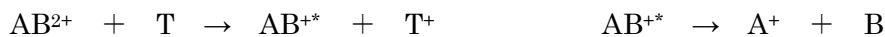
## ジスルフィド結合を含んだプロトン化ペプチドについての 高エネルギー電子移動解離と低エネルギー電子移動解離

○松本真哉\*・笹岡江美子\*・藤原亮正\*・早川滋雄\*・長尾博文\*\*・豊田岐聡\*\*\*・和田芳直\*\*\*\*・田尻道子\*\*\*\* (阪府大院理\*・阪大科学教育機器リノベーションセンター\*\*・阪大院理\*\*\*・阪府立母子保健総合医療センター\*\*\*\*)

【序】プロテオーム解析は、生体高分子の構造や機能を知る上で重要な手段であり、ジスルフィド結合したペプチドの分析は、たんぱく質の二次構造を決定する上で、重要な役割を果たす。今回 S-S 結合をもつペプチドと、S-S 結合を開環したペプチドである環構造を形成するのに必要な S-S 結合の元となる Cysteine を Alanine に置換したペプチドを用いて、電子移動解離における S-S 結合の影響を調べた。

【実験】ジスルフィド結合を持つペプチドとして今回は Vasopressin (Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly) と Cys を Ala で置換した [Ala<sup>1,6</sup>]Vasopressin (Ala-Tyr-Phe-Gln-Asn-Ala-Pro-Arg-Gly) を用いて測定を行った。試作の磁場型タンデム質量分析装置で高エネルギー電子移動解離 { HE-ETD (High Energy - Electron Transfer Dissociation) } を測定し、市販のリニアイオントラップ質量分析装置で低エネルギー電子移動解離 { LE-ETD (Low Energy - Electron Transfer Dissociation) } を測定した。

HE-ETD は、10kV に加速したプレカーサーイオンをアルカリ金属ターゲットと衝突させ、ps オーダーで起こると考えられる電子移動により解離させる方法である。LE-ETD は数 10eV のイオンを負イオンとイオントラップ内で反応させ電子移動を起こす。機構として以下の通りである。



(AB=プレカーサーイオン, T=アルカリ金属ターゲット、もしくは負イオン)

またペプチド骨格開裂フラグメントは以下の図 1 に従い命名されている。HE-ETD, LE-ETD のどちらの過程からも N-Cα 骨格開裂により c-type, z-type イオンを主に検出することが報告されている<sup>1)2)</sup>。

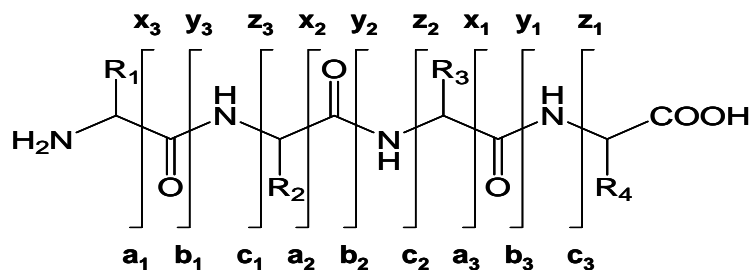


図 1 ペプチド骨格開フラグメントの命名

【結果と考察】測定した HE-ETD, LE-ETD スペクトルを図 2 に示す。HE-ETD { 図 2 (a), (c) }, LE-ETD { 図 2 (b), (d) } を比較した際、HE-ETD (a), (c) では LE-ETD (b), (d) と比べ、観測されたピークがより多く、かつ  $m/z$  200 以下にピークを観測している。 $m/z$  200 以下のピークは構成アミノ酸の情報をもつインモニウムイオンと呼ばれるものである。全てのスペクトルで z3 以外の z-type イオンがシリーズで検出されている。これはアミノ酸配列中の C 末端に近い Arg がプロトン

を保持するため、骨格開裂を起こした際に C 末端を含む z-type イオンを検出しやすいためと考えられる。z3 イオンが検出されていない理由として Pro が電子移動により N-Ca 結合の開裂を起こしても Pro の環状構造によりフラグメントイオンとして検出されないためである<sup>3)</sup>。LE-ETD(b)のみではアミノ酸の完全な配列決定が不可能であるが、HE-ETD(a)ではシリーズで観測された y-type イオンによりアミノ酸配列の決定が可能となる。

Vasopressin は S-S による環構造が形成されているためフラグメントイオンを検出するには S-S 結合の環開裂と主鎖の解離を必要とする。(a), (b)の両方で観測されるように 主鎖の開裂と S-S 結合が開裂したフラグメントイオン{例 (z5, b4)}もしくは C-S 結合が開裂したフラグメントイオン {例 (z4-S, b5+S)}を主に検出している。観測された z4 イオンと z4-S イオンの強度を比較した際、z4-S イオンの方が強く観測され、z4-S イオンの対となる c5+S イオンが観測されていない。このことは N-Ca 骨格開裂と Cys 側鎖の C-S 結合が協奏的に開裂し、電荷は z4-S フラグメントに帯電していると考えられることができる。

以上より y,z-type 両シリーズから HE-ETD スペクトルは S-S の環構造を持つペプチドに対しても、アミノ酸配列の同定が可能であり、ジスルフィド結合を含むペプチドは電子移動による解離により、S-S 結合よりも C-S 結合を優先して開裂すると考えることができる。このことをアミノ酸配列の類似した{ Vasotocin ( Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly ), Oxytocin ( Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly ) }からも検証を行った。

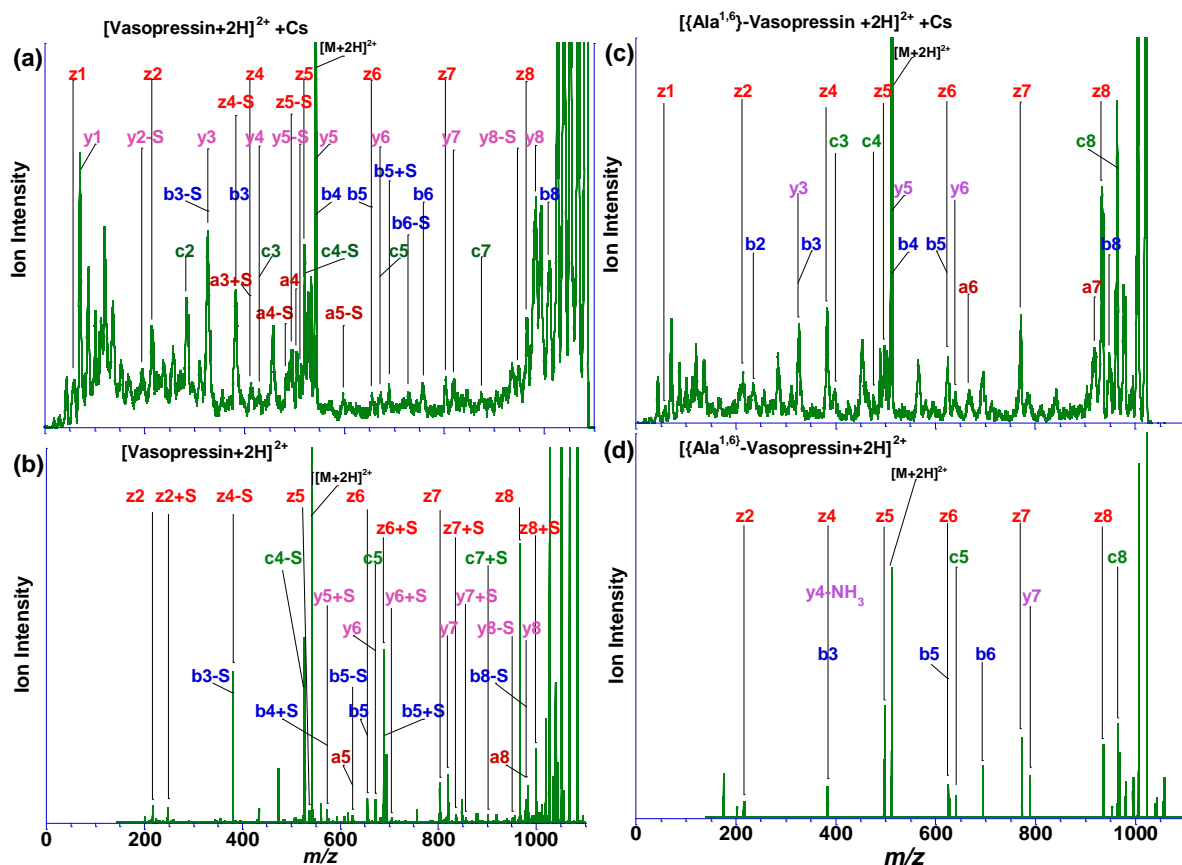


図 2 HE-ETD スペクトル(a) Vasopressin,(c) [Ala<sup>1,6</sup>]Vasopressin  
LE-ETD スペクトル(b) Vasopressin,(d) [Ala<sup>1,6</sup>]Vasopressin

- 参考文献 1) Syka, J. E. P.; et,al,. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, 9528–9533.  
2) Hayakawa, S.; et. al. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, 567–572.  
3) Hayakawa, S.; et.al. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 7936–7949.