

## 蛋白質及びペプチドイオンのプロトン移動反応の温度依存性

(横浜市立大学 ナノシステム科学専攻)

山下和樹・岡村拓哉・荒川諒太・野々瀬真司

【序論】近年、生体分子の構造の解明は X 線解析・NMR 等を用いる事で大きく進展してきた。しかし、蛋白質がとる可能性のある構造は膨大であり、また蛋白質構造の物理学的安定性の基盤も完全に理解されていない。これらの局所構造を解明するにあたり、ESI 法で生成した蛋白質・ペプチドイオンを温度毎に pyridine (Py) などの標的分子と衝突反応させ、その結果から反応速度定数を見積もり、蛋白質・ペプチドイオンのプロトン移動反応の温度依存性について検証した。

【実験概要】タンデム型質量分析装置を用いて、蛋白質多電荷イオンの質量選別を行った。ESI 法で荷電液滴を生成し、窒素ガスで溶媒を蒸発して気相状の孤立した多電荷イオンとして真空中に取り出した。次に四重極質量分析計(QMASS)でイオンを選別し、衝突反応セルへと導入し、標的分子と衝突反応させた。セル内では温度を約 443K~300K まで変化させ、それぞれの温度での蛋白質多電荷イオンに標的分子を衝突させ、プロトン移動反応を誘起した。反応後のイオンは最後に飛行時間型質量分析計で質量解析し、Daly 検出器で検出した。

【結果と考察】QMASS で電荷数  $z=17$  の myoglobin を選別し、プロトン移動反応を誘起した際の温度毎のマススペクトルを図 1 に示す。また、親イオン、生成物イオンの分岐比を図 2 に示す。Py を導入した事で試料イオンからプロトンが Py へ移動して低電荷のイオンが増大し、更に温度が低下するに連れて生成物イオンの分布が劇的に変化する事が分かる。高温から低温になるに連れて  $z=12, 13$  の割合はいったん減少した後に増加するが、逆に  $z=14-16$  ではいったん増加した後に減少する、という傾向を示した。以上の結果から温度変化に伴い、反応性が大きく変化する事が分かる。

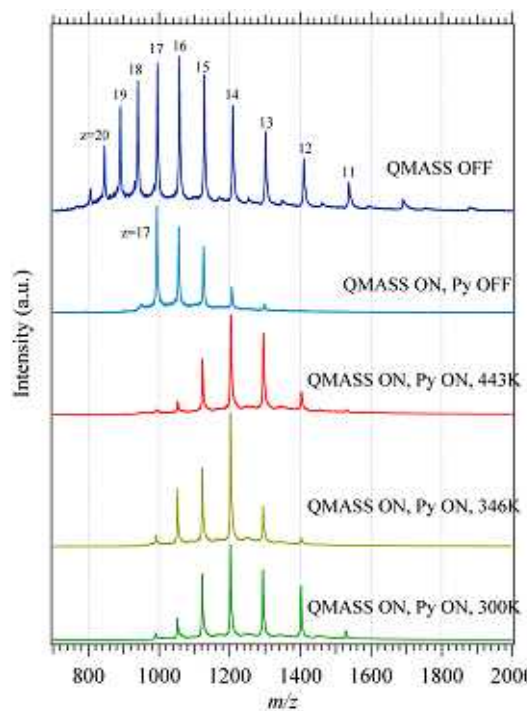


図 1 . Myoglobin( $z=17$ )と Pyridine との反応に関するマススペクトル .

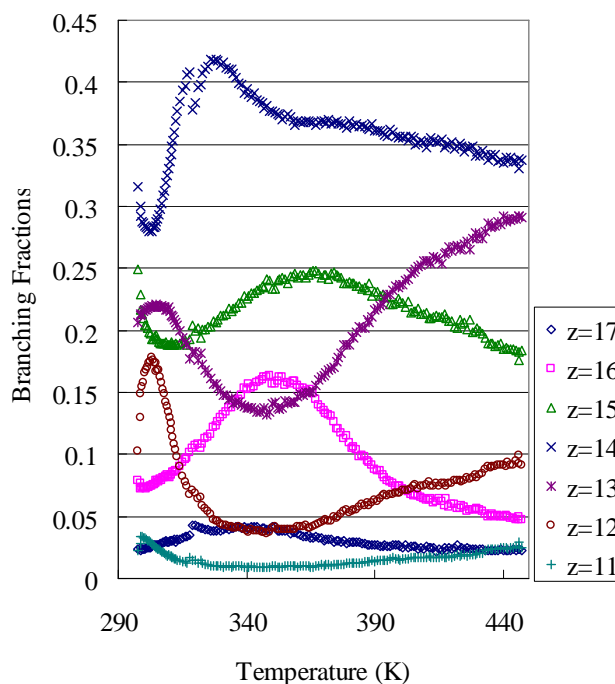


図 2 . Myoglobin( $z=17$ )と Pyridine との反応による生成物イオンの分岐比の温度変化 .

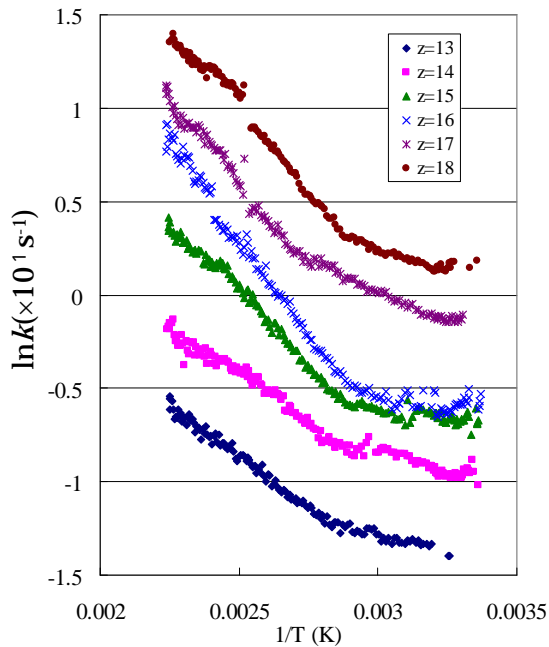


図3. myoglobin の単分子解離の反応速度に関するアレニウスプロット.

$z$	$E(\text{eV})$	$A(\text{s}^{-1})$
13	0.074	36
14	0.064	41
15	0.088	130
16	0.119	420
17	0.100	335
18	0.115	763

表1. 活性化エネルギーと頻度因子の値.

図3に myoglobin の単分子解離の反応速度に関するアレニウスプロットを表す。単分子解離の場合、内部温度が大きいと分子内振動が大きくなりプロトンを解離し易くなり、結果として反応速度定数は低下した。表1にアレニウスプロットより見積もった活性化エネルギーと頻度因子の値を示す。活性化エネルギーには  $z$  依存性が無く、また頻度因子は  $z$  が大きくなるに連れて高くなる傾向を示した。つまり、プロトンが解離する指標である活性化障壁は電荷数に依存せずを決まるのに対して、頻度因子(プロ

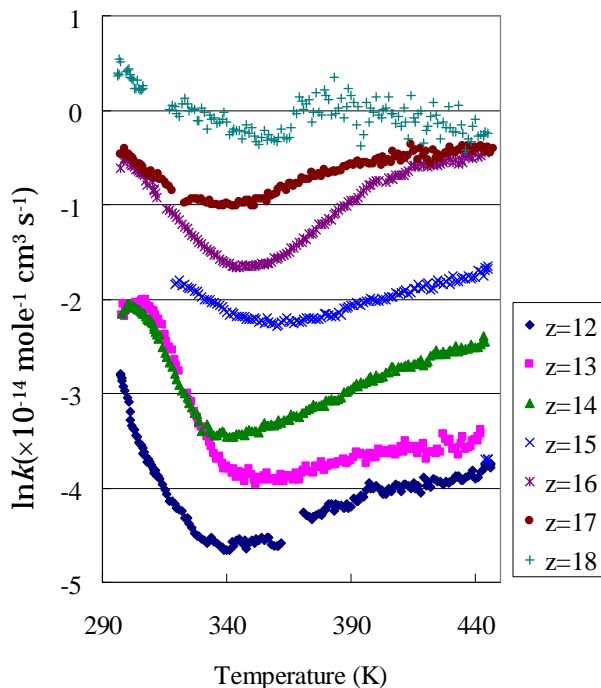


図4. Myoglobin と Py との proton 移動の絶対反応速度定数.

トンの熱振動の速度)は電荷数が高い程高くなる傾向を見せた。通常、電荷数が高い時、プロトン同士が反発し合い unfolding する。unfolding した時、分子が解けるために構造が柔軟になり、頻度因子が高くなると考えられる。結果として頻度因子が高いと反応速度定数が大きくなるという結論に至った。図4は myoglobin に Py を導入し、プロトン移動反応を誘起した際の温度毎の絶対反応速度定数を表している。この時の反応性は単分子解離と比べて大きく変わり、単純な結果とはならなかった。反応速度定数はプロトンが標的分子に移動し、娘イオンが生成される度合いを示すので、標的分子と接近し易いようプロトンがイオン全体から露出している程大きくなる。今回得られたデータより、温度変化でイオンの構造(特にプロトンの露出)が敏感に変わることが分かった。温度が低くなるに毎に構造は unfolding から folding するようになる。unfolding するとクーロン反発力・自己溶媒和が共に小さいのに対し、folding すると逆にクーロン反発力・自己溶媒和が共に大きくなる。クーロン反発力が大きいと反応速度が大きく、小さいと反応

速度が小さくなる。逆に自己溶媒和が大きいと反応速度が小さく、大きいと反応速度が大きくなる。Myoglobin は温度が低くなるに連れて 340K 付近で立体構造が変化し、分子内のクーロン反発力が大きくなる。クーロン反発したプロトン同士は外側へと露出し、反応性が高くなったと考えられる。