

蛋白質およびペプチド多電荷イオンの プロトン移動反応の温度依存性と立体構造

(横浜市立大学大学院 ナノシステム科学専攻)

山下和樹・荒川諒太・須藤彩子・町田圭史・横山佳南子・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 1-Propylamine (1-Pr) 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 450K~280K 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 $z=10$ の Lysozyme 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。1-Pr を導入した事で試料イオンからプロトンが 1-Pr 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親イオン $z=10$ の割合は、一定だったのが 360K から上昇し始める、娘イオン $z=9$ と $z=8$ の割合は低温で徐々に逆転する、という複雑な反応性の傾向を示した。

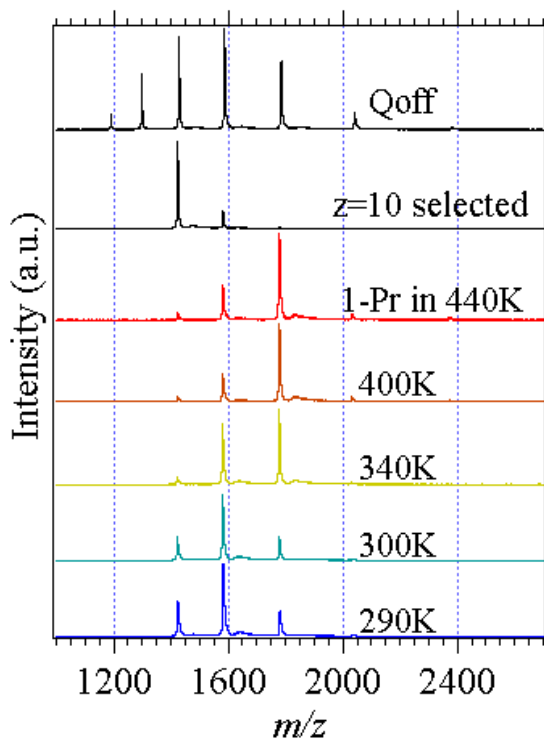


図 1 . Lysozyme($z=10$)と 1-Propylamine との反応に関するマスペクトル。

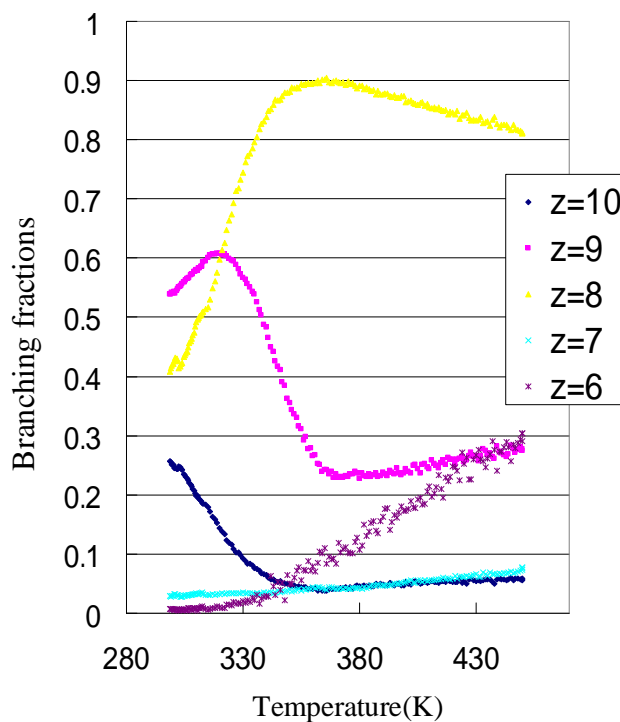


図 2 . Lysozyme($z=10$)と 1-Propylamine との反応による生成物イオンの分岐比の温度変化。

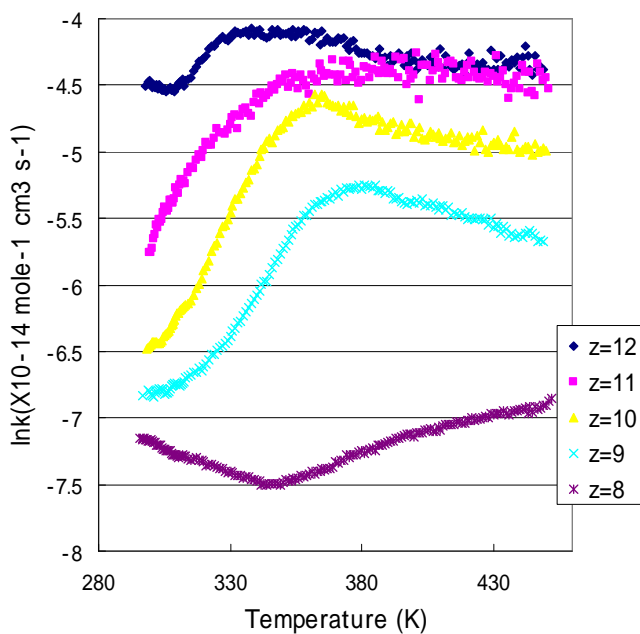


図3. Lysozyme と標的分子 1-Pr とのプロトン移動反応を誘起した際の反応速度定数。

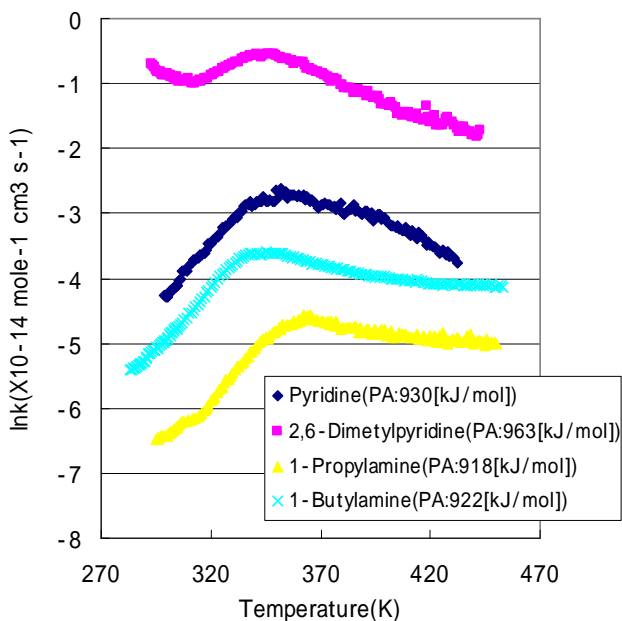


図4. Lysozyme(z=10)と標的分子ごとの反応速度定数。

特筆すべき点は PA の大きい 2,6-Dimethylpyridine を用いた場合、320K から k が上昇したことにある。低温での k の上昇は運動エネルギーの低下による電荷-双極子の引力的相互作用が有効に働く事が主な要因と考えられるが、急激な傾向の変化は folding による電荷の非局在化、つまり温度変化による立体構造の変化を表していることになる。この図から比較的 PA の低い分子では見られなかった 320K での構造変化を高い PA を持つ分子を用いる事で観測できたことが分かる。結果として蛋白質の温度に依存したより詳細な立体構造の変化は標的分子の持つ PA から追求できると考えられる。

図3は Lysozyme に 1-Pr 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。反応速度定数(k)は試料蛋白質のプロトンが標的分子に移動し、電荷数の小さい娘イオンが生成される度合いを示すので、試料分子と標的分子が接近し易い環境が形成される程、その値は上昇する。一般的に蛋白質は温度が低くなる毎に構造は unfolding から folding することが知られており、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と考えられる。クーロン反発力が大きいと k が大きく、小さいと k が小さくなり、逆に自己溶媒和が大きいと k が小さく、大きいと k が大きくなる。

今回得られたデータを見てみると、 k は温度変化に則して敏感に変化している事が分かる。 $z=11,10,9$ は低温になるに連れて上昇していた k が 360K を境に急激に低下する傾向を示した。 $z=12$ は近い傾向を示したが、低温で k が下がり、また変化する値の幅が小さいことが分かる。これは高電荷によるプロトン同士が強く反発して広まった構造を取り、大きな構造変化が起きづらいためと考えられる。 $z=8$ はそれまでの z と全く違い、低温になるに連れて k は下がり、340K を境に上昇するという傾向を示し、これは電荷数に依存して Lysozyme の立体構造が大きく変化していることを表している。

図4は Lysozyme($z=10$)に対して様々なプロトンアフィニティ(PA)を持つ標的分子を導入した際の反応速度定数を表している。標的分子には Pyridine, 2,6-Dimethylpyridine,

1-Propylamine, 1-Butylamine を用いた。これらの分子の PA はそれぞれ 930, 963, 918, 922(kJ/mol)である。反応速度の値における差異はあるものの PA の低い3つの分子を用いた場合は温度低下で k が全く同じ傾向を示したが、