

ESI 法による生体分子多電荷イオンのプロトン移動反応と立体構造

(横浜市大大学院 ナノシステム科学専攻)

須藤彩子、山下和樹、荒川諒太、町田圭史、横山佳南子、野々瀬真司

【序】本研究では ESI 法でイオン化する事によってよりソフトな状態で真空中に導入され孤立状態となった生体分子多電荷イオンに、標的分子(生体分子多電荷イオンから H^+ を奪う分子)を衝突させ、それに伴うプロトン移動反応の温度変化を観測した。さらにその反応速度定数を算出し、生体分子の立体構造について考察を行った。

【実験】実験には自作の ESI 源を備えた四重極質量分析計(QMASS)と飛行時間型質量分析計(TOF-MS)の二重質量分析計を使用した。ESI 源で生体分子多電荷イオンを生成し、その中から特定の電荷数のイオンを四重極質量分析計で選別し、衝突反応セルで生体分子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させた。最後に飛行時間型質量分析計を用いて衝突反応によって生成したイオン種の質量分析を行った。また、衝突反応セルでは温度変化も並行して行い、衝突反応の温度依存性について検討した。

【結果と考察】

Ubiquitin 多電荷イオン(QMASS で電荷数 $z=7$ を選別)と 1-butylamine(1-bu)の衝突反応から得られたマスペクトルを Figure 1 に示す。縦軸は相対イオン強度(a.u.)、横軸は質量/電荷(m/z)である。

はじめに Q-MASS で選別を行わずかつ 1-bu を衝突させなかった場合のスペクトルを観測し、次に電荷数 7 の Ubiquitin イオンを Q-MASS で選別しその自己乖離を観測し、その後 1-bu を衝突させ温度を下げいった。QMASS で選別を行った場合 $z=8$ 以上のピークがなくなっていることから $z=7$ を選別できていることがわかる。さらに 1-bu を衝突させたことによって $z=7$ の親イオンと $z=6$ 以下の娘イオンの強度比が大きく変化していることが確認でき、生体分子多電荷イオンと標的分子の間にプロトン移動反応が起こっていることがわかる。

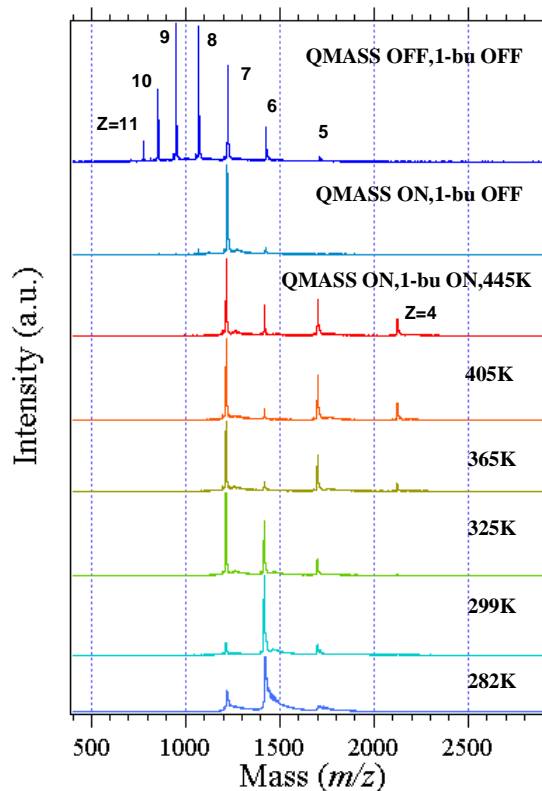


Figure1 1-Butylamine と反応した場合の Ubiquitin イオン($z=7$ 選別)の温度別マスペクトル.

高温(445K)では $z=6\sim 4$ の娘イオンが同じくらいの強度で検出できているが、中温(405K)になるにつれ $z=5$ のイオンの強度が増大する。低温(299K)になると今度は $z=6$ のイオンが多くなり、親イオンも減少し、ほとんど $z=6$ イオンだけが観測されるようになっている。このように温度によって反応生成物の分布が大きく変化することがわかる。

このマスペクトルの結果から親イオンと娘イオンの分岐比を温度ごとに算出した結果を Figure2 に示す。このグラフから、 $z=7$ の親イオンが 320K 付近で一気に減少し $z=6$ の娘イオンと強度比が逆転するが、300K 付近からはまた親イオンが増え始め反応性が下がることが分かる。

Figure3 は QMASS で電荷数 12~6 を選別しそれぞれの反応性を同じ条件で比較するため、実験時の圧力の差を調整し絶対反応速度定数を見積もったグラフである。

$z=7$ を選別した場合は 320K 以下での反応性の変化が目立っているが、 $z=12\sim 9$ を選別した場合は温度が低下するにしたがって緩やかに反応速度が上がっていきることが確認できる。また $z=6$ を選別した場合は $z=7$ とは全く異なった反応の振る舞いを見せた。このように、親イオンがどの電荷数であるかによって反応性が大きく変わってくる事が分かる。

このように、温度によって反応性が大きく変化する要因として、生体分子の三次元立体構造の変化が考えられる。ふつう、温度が低下すると生体分子自身の分子運動が緩やかになるのでプロトンは外れにくくなるはずだが、この実験結果から反応のメカニズムはそう単純ではないことがわかる。生体分子が温度によって反応性を敏感に変化させている理由には Unfolding 状態から Folding 状態への立体構造の変化、それにとまなうプロトンの遮蔽、自己溶媒和によるプロトン電荷の非局在化などの要因が考えられる。

また、QMASS で選別する電荷数によっても反応の振る舞いが大きく変わることが今回の実験で分かった。Ubiquitin イオンの場合 $z=12\sim 8$ と $z=7,6$ で反応性に違いが出ている。これは、 $z=8$ と 7 でその部分のプロトンがあるかないかによって立体構造が大きく変化していると考えられる。

温度変化や選別するイオンの他に、衝突させる標的分子によっても反応性が大きく変わった。さらにデータを取りため、考察をより深いものにしていきたい。

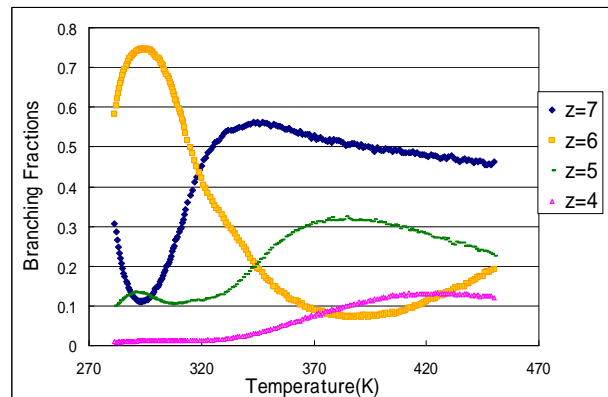


Figure2 Ubiquitinイオン($z=7$ 選別) から 1-bu への H⁺移動反応の分岐比の温度依存性 .

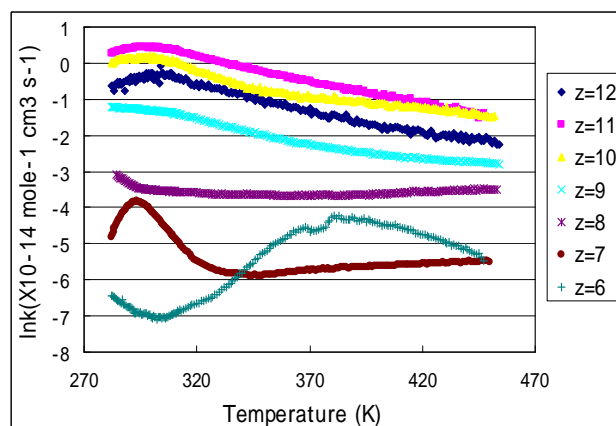


Figure3 Ubiquitin イオン($z=6\sim 12$ 選別)から 1-bu への H⁺移動反応の絶対反応速度定数の対数値 .