

## プロトン移動反応による ubiquitin イオンの立体構造変化に関する研究

(横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科)

たにむらいたいじゅ みやざわまさと あきやまひろき いそのひでお ののせしんじ  
 ○谷村大樹・宮澤雅人・秋山寛貴・磯野英雄・野々瀬真司

### Conformation change of ubiquitin ion probed by proton transfer reaction

(Graduate School of Nanobioscience, Yokohama City University)

○T. Tanimura, M. Miyazawa, H. Akiyama, H. Isono, S. Nonose

#### 【序論】

生体分子は通常、ほかの生体分子や周囲の水分子と相互作用をすることで機能している。その相互作用の機構を解明できれば、生命現象を理解することにつながるが、相互作用は極めて複雑で、液相中での解析は困難である。そこで本研究では、エレクトロスプレーイオン化法を用いて、生体分子を多電荷イオンとして真空中に孤立させた。孤立状態の生体分子には周囲との相互作用がないため、生体分子 1 分子としての振る舞いを見ることが出来る。当実験では気相中での性質を見るために、生体分子多電荷イオンに標的分子を衝突させて、イオンと標的分子の間で起こるプロトン移動反応の温度依存性について調べた。試料生体分子には ubiquitin を用いた。ubiquitin は 76 のアミノ酸からなるタンパク質で質量は 8564Da、生体内では主に、不要なタンパク質に取り付いて分解酵素の指標となっている。塩基性アミノ酸残基数は 12 で、N 末端と合わせて 13 か所にプロトンの付加できる部位が存在する。

#### 【実験】

実験は ESI-QMASS-TOFMASS タンデム質量分析装置で行った。生体分子を気相中に孤立させる手法として、今回はエレクトロスプレーイオン化法(ESI 法)を用いた。ESI 法はソフトイオン化法の一つであり、生体分子のような大きな分子でも変性やフラグメンテーションを引き起こさずに、気化、イオン化が可能である。ESI で生成した ubiquitin の多電荷イオンを四重極質量分析計(QMASS)に導入して、特定の電荷数を持つイオンのみを選別した。選別したイオンを次に、イオントラップと反応系を兼ねる Gas Cell に導入した。Gas Cell 内では、しばらくイオンをトラップし、標的分子を導入してイオンとの間にプロトン移動反応を引き起こした。Gas Cell 内部には、温度調節の機能が備わっている。その機能を用いて、約 450K から 290K の間でプロトン移動反応の温度依存性を調べた。今回は、3,5-dimethylpyridine, ethylenediamine, 1,3-propanediamine(pda)を標的分子として用いた。飛行時間型質量分析計(TOFMASS)に反応後のイオンを導入して、質量 - 電荷比別に分離した。最後に、分離したイオンを検出器で信号として検出し、プロトン移動反応後のマススペクトルを得た。得られたスペクトルデータを解析し、分岐比やプロトン移動反応の反応速度定数のプロットを作成し、反応の温度依存性を考察した。

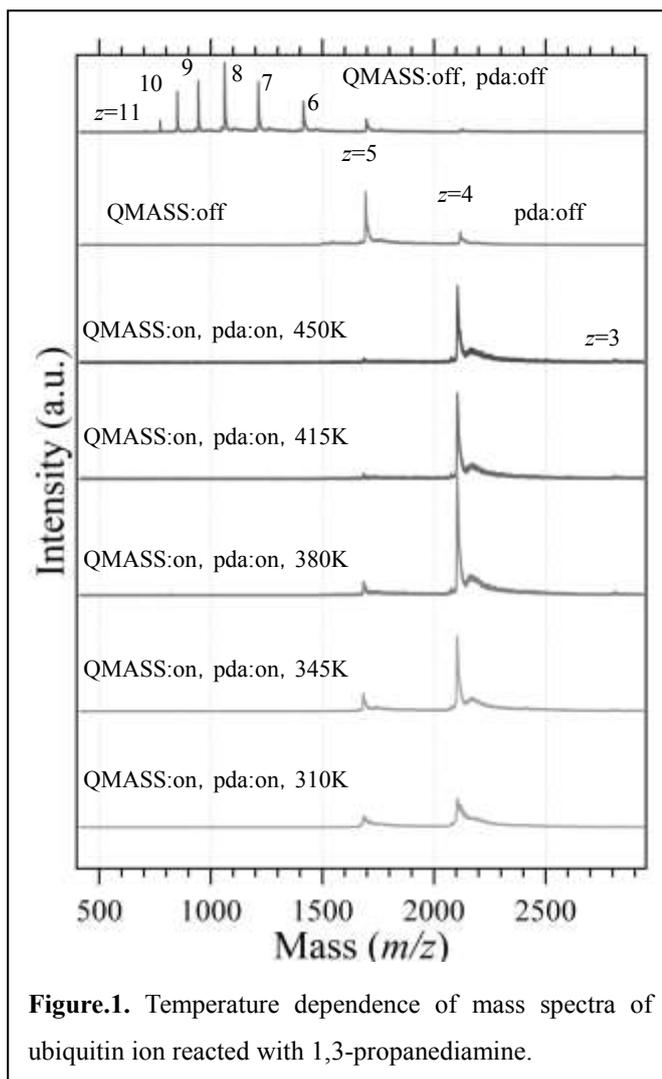


Figure 1. Temperature dependence of mass spectra of ubiquitin ion reacted with 1,3-propanediamine.

## 【結果】

ubiquitin の多電荷イオン(電荷数 5)に、標的分子である pda を反応させた際のマススペクトルを Figure.1 に示す。最上段は QMASS による選別と標的分子の導入なし、2 段目は電荷数 5 のイオンのみを選別したマススペクトルである。それ以下は標的分子を導入して、徐々に温度を下げていった際のスペクトルである。Figure.2 に、電荷数 9 から電荷数 5 までの ubiquitin 多電荷イオンに、pda を反応させた際の反応速度定数を示す。電荷数 7 以上のイオンについては、室温付近までは温度低下とともに反応速度が上昇し続ける。それに対して、電荷数 6 では 400K あたりまでは反応速度は上昇し、そこから反応性は次第に下がっていった。電荷数 5 については温度低下とともに反応速度は単調減少している。

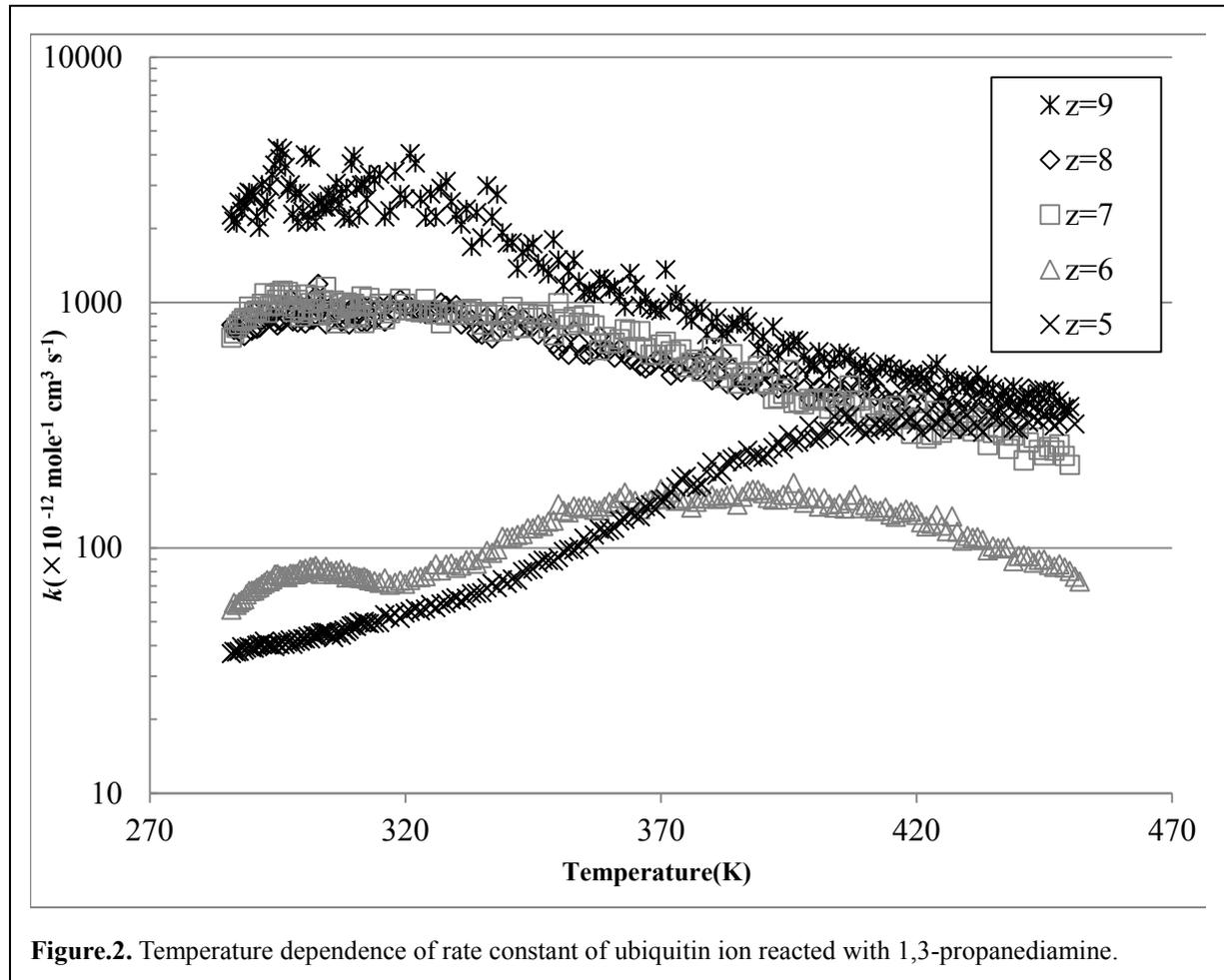


Figure.2. Temperature dependence of rate constant of ubiquitin ion reacted with 1,3-propanediamine.

## 【考察】

Figure.1 を見ると、標的分子を導入したことにより、選別した電荷数(電荷数 5)以外のピーク(電荷数 4, 3)もスペクトルに表れてきている。したがって、ubiquitin の多電荷イオンから pda にプロトンが移動する、プロトン移動反応が起きていることがわかる。高温域では電荷数 4 のピークが大きく出ているが、温度低下とともに電荷数 5 のピーク強度がだんだんと増してきている。これより、反応性が温度依存していることを読み取ることができる。Figure.2 にみられる反応速度定数の温度依存性には、様々な要因がかかわってくる。その要因の一つとして、ubiquitin 多電荷イオン内でのクーロン反発の作用があげられる。温度が低くなるほど ubiquitin はよりコンパクトな構造をとろうとし、分子内のプロトン同士の距離が近づいていく。プロトン同士の距離が狭まりクーロン反発力が増大した結果、プロトンが分子から脱離しやすくなり、反応性は上昇することとなる。電荷数 7 以上については電荷数が十分大きく、その分クーロン反発の作用も強いので、反応性が温度低下とともに上昇し続けていると考えられる。電荷数 6 についても同様に、反応性の上昇はクーロン反発の増大によるものだと考えられる。その後の反応性の減少は、プロトンが側鎖との間に水素結合を形成するためだと考えられる。電荷数 5 に関しては、反応性が温度低下とともに減少し続けている。これは十分にプロトンの数が少なく、ubiquitin がコンパクトな構造をとってもクーロン反発力がそれほど大きくならないためだと考えられる。ポスター発表では温度依存性にかかわる、ほかの要因についても考察を行う。