

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 ささおかは やと うすいゆう ののせしんじ
 ○谷村大樹・宮澤雅人・秋山寛貴・笹岡映也人・臼井優・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. Sasaoka, Y. Usui, 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。そこで当研究では、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でき。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と時間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、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、イオンファンネルによって収束・パルス化した。その後、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 に導入して、標的分子とイオンとの間にプロトン移動反応を引き起こした。Gas Cell には温度と反応時間を調節する機能が備わっている。その機能を用いて、

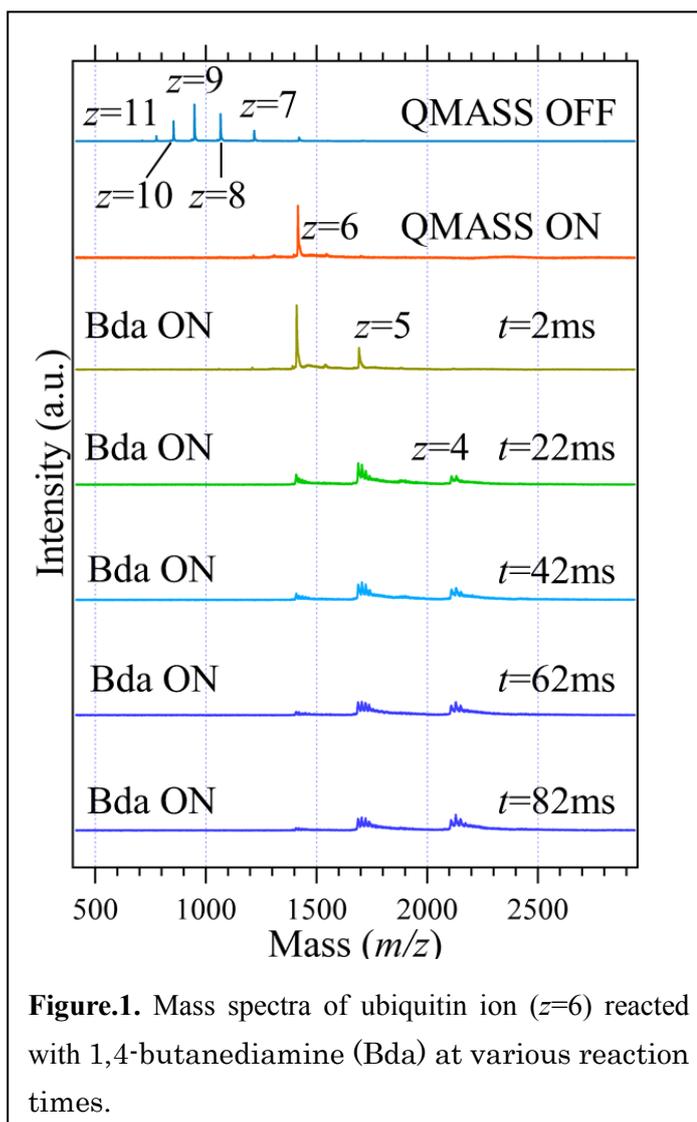


Figure.1. Mass spectra of ubiquitin ion ($z=6$) reacted with 1,4-butanediamine (Bda) at various reaction times.

温度 T が約 290K から 450K, 反応時間 t が 1~87ms の間でプロトン移動反応の温度依存性, 反応時間依存性を調べた。今回は, 1,4-butanediamine (Bda) 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, 質量分析を行った。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, 時間依存性を考察した。

【結果】

ubiquitin の多電荷イオン(電荷数 6)に, 標的分子である Bda を反応させた際のマスペクトルを, 反応時間を横軸にとって figure.1 に示した。Gas Cell 内の温度は 320K 程度に保った。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 6 のイオンのみを選別したマスペクトルである。それ以下は標的分子を導入して, 徐々に反応時間を増した際のマスペクトルである。figure.2 に, 電荷数 6 のイオンに Bda を反応させた際に生じるイオン種の, 反応時間に関する分岐比を示した。figure.1, 2 から, 反応時間が増すほど, より低電荷数のイオンの存在割合が大きくなっていることがわかる。反応時間が増すと電化数 5, 4 のピークの近辺にもピークが観測されていた。

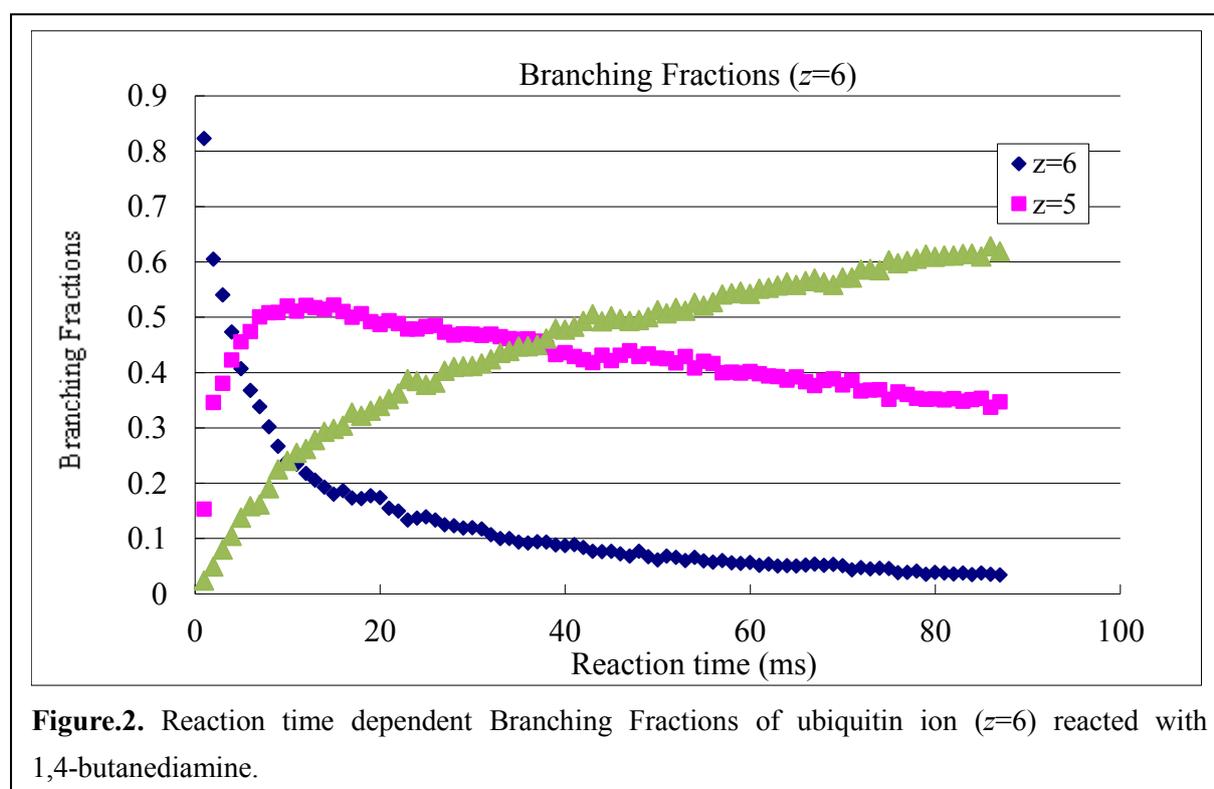


Figure.2. Reaction time dependent Branching Fractions of ubiquitin ion ($z=6$) reacted with 1,4-butanediamine.

【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 6)以外のピーク(電荷数 5, 4)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 bda 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。反応時間の短い段階では電荷数 6 のピークが大きく出ているが, 反応時間の増大とともに電荷数 6 は指数関数的に減少し, 電荷数 5 の割合が増していく。さらに反応時間が長くなると, 電荷数 5 が減少し, 電荷数 4 が増加してきている。t=80ms のあたりでは電荷数 6 はほぼ存在しなくなる。これは, イオンが Gas Cell に滞在する時間が増え, 標的分子との衝突回数が増すことで, プロトン移動の逐次反応が促進されるためである。figure.1 にある, 反応時間が増すことによって生じた電化数 5 と 6 近辺のピークは, ubiquitin 多電荷イオンに Bda が 1 つ以上取りついたイオン由来である。これらは, 比較的低温の条件下でイオンと Bda との衝突回数が増したために形成された。ポスターでは, 反応速度定数に関する考察, 温度依存性に関する考察も行う。