

1E15

液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いたミオグロビン水和クラスターイオンの光解離

(学習院大・理) ○浅見祐也, 河端里奈, 河野淳也

Photodissociation of hydrated myoglobin ion by IR laser-ablation of droplet beam (Gakushuin Univ. Faculty of Science)○Hiroya Asami, Rina Kawabata, Jun-ya Kohno

[序] タンパク質は生体中で多様な高次構造を形成し、特異な機能を発現している。この時、周囲の生体環境とタンパク質の構造は密接に結びついており、その溶媒効果には古くから興味を持たれている。近年、レーザー脱離法[1]やESI法[2]の発展に伴い、巨大な生体分子を非破壊的に気化し、赤外分光によってその微細構造を決定する手法が確立してきた。しかしながら、タンパク質レベルの巨大分子を標的にした分子計測手法は未だ十分とは言えず、新たな手法開発が急務である。本研究では、生体の筋肉中で酸素の貯蔵を担うミオグロビン(Mb)の水和クラスターを孤立気相中で観測した。従来 X 線回折より、Mb は結晶中に多量の水分子が分布していることが指摘されており、その活性中心と言える鉄原子を内包するポルフィリン骨格(Heme)の周囲においても多数の水分子の存在が確認されている。(図 1) 特に Mb は Soret 帯というポルフィリン骨格を持つタンパク質に特徴的な吸収帯を持つため、これに相当する紫外-可視光を照射することにより、この Heme 周囲から選択的に解離する水分子の観測が期待できる。本研究ではこの波長依存性を調べることで解離スペクトルを測定し、溶液中の吸収スペクトルとの比較から気相と溶液の構造の違いを明らかにした。

[手法] 10 mM の塩酸中に Mb を 200 μ M 溶解させた試料溶液(pH 2.1)を作成した。この溶液を市販の液滴ノズルから 10 Hz でパルス射出し、直径 70 μ m の液滴を生成した。この液滴をメカニカルブースターポンプ及びターボ分子ポンプで 2.0×10^{-6} Torr 程度に差動排気された真空槽へ導入した。この真空槽にはワイリーマクラレン型の 4 枚板加速電極が設置されている。2 つのスキマーを介しこの電極部へ誘導された液滴に、水分子の吸収帯である 3590 cm^{-1} に波数を合わせた赤外レーザー光を照射した。この時液滴中の Mb は、レーザー蒸発の際にプロトン付加体イオンを生じ、パルス電場により真空中に気相単離される。生成した様々なイオン分子は、赤外光照射から 2 μ s 後に電極で加速され、リフレクトロン型の TOF 質量分析計により観測される。[3] また、この加速のトリガーパルスより 100 ns 後に紫外-可視レーザー光を高出力 OPO レーザー(Continuum, Horizon OPO)から照射することで、効率的な光解離信号の観測を行った。

[結果, 考察] ミオグロビン水和クラスターの気相単離と光解離: 図 2 に Mb イオンの質量スペクトルを示した。1 価から 3 価までの Mb イオンが顕著に観測されるが、各ピークの幅は 500-1500 m/z と大きな幅を持っているため、Mb 単量体だけでなくその水和クラスターが同時に観測されている

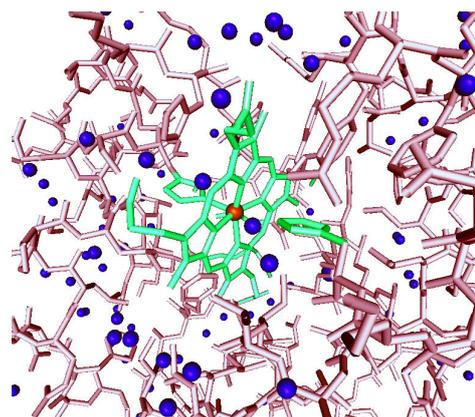


図 1. ミオグロビン Heme 周囲の水和構造 (PDB, 1A6N). Heme 構造を緑でハイライトし、その Heme 中の鉄原子を赤丸、結晶水の位置を青丸で示した。

と考えられる。また赤外光照射のフラグメントとして Heme(616 m/z)の信号も同時に観測された。この信号は試料溶液の調製で行う塩酸添加でもわずかに増加する。一方、低質量側のスペクトルには単量体から 15 量体までのプロトン化水クラスターが感度良く観測された。この時、400 nm の高強度の可視光(6.5 mJ/pulse)を照射すると、単量体から 3 量体までの領域で顕著な水クラスターイオン信号の増加がみられた。さらにこれらの信号の増加と同時に Mb の 1 価及び 2 価のイオン信号が減少していることから、この水イオン信号の増加は Mb が可視光を吸収することで生じる光解離に起因する。また照射する可視光の強度を 0.7 mJ/pulse 程度に下げると、水単量体の解離信号強度が減少し、5 量体までの水クラスターが解離信号として得られる。このことは、照射する光強度によって Mb 水和クラスターが異なる解離様相を示すことを示唆している。

気相と溶液の Mb 水和構造の違い: 図 3a

に Mb 水溶液の紫外-可視吸収スペクトルを示した。本研究の液滴生成で用いた試料溶液と同じ pH 2.1 で調製した溶液と、生体環境に近い pH 7.0 で調製した溶液での吸収スペクトルを比較したところ、吸光度の λ_{\max} は pH の低下によって 50 nm 程度のブルーシフトを示した。また pH の低い方がピークの半値幅も 3 倍程度大きく、ブロードに観測された。従来 Mb は pH 7 付近で Soret ピーク(400 nm 付近)を持つが、pH の低下によって Heme の構造が変化し、その吸収が大きくブルーシフトすることが報告されており[4]、この結果を支持する。一方、気相単離された Mb 水和クラスターイオンの光解離によって生じる水単量体から 5 量体までのイオン信号強度の波長依存性を図 3b に示す。観測された各々のスペクトルの形状は若干異なっているものの、いずれも共通して 395 nm 付近に顕著なピークが観測された。この結果は、2 種の pH で測定した溶液中の λ_{\max} やピーク幅と比較しても大きく異なっており、孤立気相状態の Mb 水和クラスター固有の吸収と帰属できる。特に、pH 2.1 の試料溶液から気相単離した Mb イオンの吸収が溶液中の中性に近い領域に観測される点は大変興味深い。本発表では Mb イオンの相対強度比の pH 依存性や解離信号のレーザー光強度依存性も踏まえて、より詳細にこの解離スペクトルを議論する。

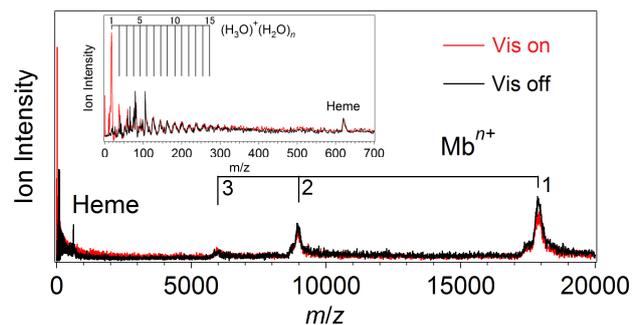


図 2. 可視光(400 nm)照射前後の Mb 正イオン質量スペクトルの比較。観測された 1-3 価の Mb イオンをマークして示した。また水和クラスターが観測される低質量側を拡大し、図中に示した。

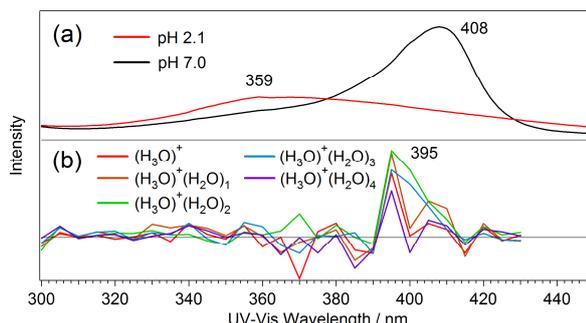


図 3. Mb 水溶液の吸収スペクトル(a)と Mb 水和クラスターイオンの光解離スペクトル(b)の比較。スペクトル(a)には液滴中と同じ pH に相当する pH 2.1 と生体環境である pH 7.0 の吸収スペクトルをそれぞれ示した。またスペクトル(b)には光解離で得られた水単量体から 5 量体までのイオン信号をモニターした解離スペクトルを示し比較した。イオン強度は照射したレーザー光強度に対して線形に規格化した。

[文献][1] H. Asami, M. Tsukamoto, Y. Hayakawa, H. Saigusa, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, **12**, 13918-13921. [2] T. R. Rizzo, J. A. Stearns, O. V. Boyarkin, *Int. Rev. Phys. Chem.* 2009, **28**, 481-515. [3] J. Kohno, T. Kondow, *Chem. Phys. Lett.* 2008, **463**, 206-210. [4] D. Puett, *J. Biol. Chem.* 1973, **248**, 4623-4634.