

Insulinおよびinsulin chain Bイオンの立体構造と プロトン移動反応に関する研究

¹横浜市大院

○臼井 優¹, 笹岡 映也人¹, 王子 星ゆり¹, 石井 亮¹, 野々瀬 真司¹

Steric Structures and Proton Transfer Reactions of Insulin and Insulin Chain B Ions

○Yu Usui¹, Hayato Sasaoka¹, Hoshiyuri Oji¹, Ryo Ishii¹, Shinji Nonose¹
¹Department of Nano bioscience, Yokohama City University, Japan

【Abstract】 Peptide or protein involved in biomolecules function different types from the structure of the original materials. The purpose of this research is to study the three-dimensional structures of the biomolecular ions in reactions with gaseous molecules. We studied the tertiary structures of insulin (Ins) ions and insulin chain B (Ins B) ions in the gas phase. We used a tandem mass spectrometer with electrospray ionization (ESI). We changed temperature and reaction time of the collision cell. The target molecules used were 1, 4-butanediamine (Bda). By time-dependent measurement, we kept constant in temperature and changed reaction time from 1 to 87ms. By temperature-dependent measurement, we kept constant in reaction time and changed temperature of the gas cell from 289 to 452K.

Keywords: Proton transfer, Absolute reaction rate constant, Reaction time, Temperature dependence

【序】

生体分子中のペプチド、タンパク質は水分子などの溶媒分子に取り囲まれ水素結合などによって本来の物質としての構造とは異なる形で機能している。タンパク質多電荷イオンに、標的分子を衝突させ、得られたマススペクトルから生体分子の立体構造について考察を行った。質量分析法の中でもエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法は非常にソフトなイオン化法として知られ、タンパク質などの分子量の大きい分子の分析にきわめて有効である。本研究ではこのESIを用いて気相insulinとinsulin chain Bイオンを考察した。本研究では、気相insulinとinsulin chain Bイオンの反応時間依存性と温度依存性について調べた。

【実験方法】

ESI法を用いて真空中における孤立状態の多電荷イオンを生成した。次にQ-MSによって特定の電荷数のイオンを選別し、反応時間、温度可変のガスセル内に導入させ標的分子とのプロトン移動反応を起こさせた。生成した各イオンをTOF-MSによって質量選別し、検出器で検出してマススペクトルを得た。衝突反応セルの時間と温度を変化させ、衝突反応の時間依存性と温度依存性について検討した。プロトンを奪える能力のある標的分子には1,4-butanediamine(Bda)を使用した。Ins Bでは、dithiothreitol(DTT)を加えてS-S結合を切断することにより生成した。時間依存測定では、衝突セルの温度を一定にして、反応時間を1msから87msまで変化させた。

【結果・考察】

[A_{total}] を全てのイオン強度、[A] を親イオンの強度、 k をプロトン移動の反応速度定数、 t を反応時間、標的分子の強度を[Bda]とする。PTはプロトン移動反応、AはプリカーサーイオンであるIns 4+の強度、A₀はIns 2+、3+、4+合計の強度となる。プリカーサーイオンである4+のイオン強度は反応時間80msでは、温度の増加に伴い増加した。以上の結果、より低温では複数のコンフォーマーの存在が示唆される。[A₀] を全てのイオン強度、[A] を親イオンの強度、 k をプロトン移動の反応速度定数、 t を反応時間、標的分子の強度を[Bda]とする。タンパク質と標的分子との二次反応を擬一次反応として近似した。

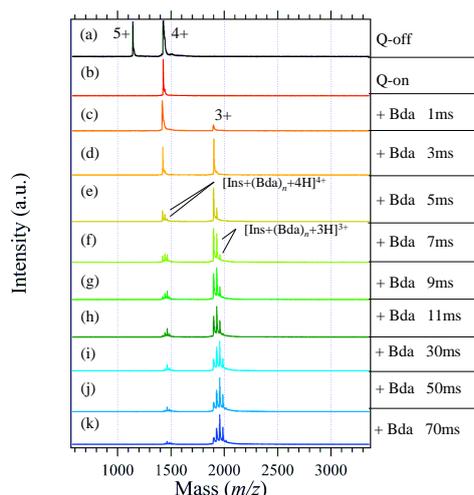


Fig.1. Mass spectrum of parent and product ions in the reaction of insulin 4+ with Bda for reaction time at 336K.

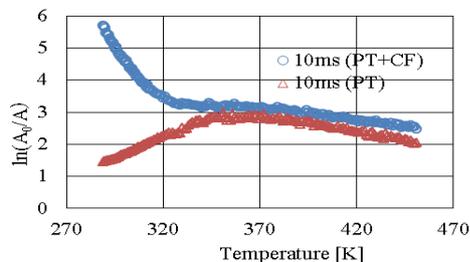


Fig.2. The reaction rate in proton transfer of the 4+ sorting spectrum by changed temperature, in reaction time 10ms of insulin ions.

電荷の非局在化により反応速度が上昇し、350K 付近からプロトンの自己溶媒和により反応速度が低下した。

【参考文献】

[1]S. Nonose, T. Okamura, K. Yamashita and A. Sudo, *Chem. Phys.*, **419** 237-245 (2013).

$$[Bda] \gg [A]$$

$$k = k' [Bda]$$

$$[A] = [A_0] \exp(-kt)$$

$$\ln([A_0] / [A]) = kt$$

試料は水とメタノールと酢酸が混合している溶媒に溶かし測定を行った。各ペプチドに付加するプロトンの数は塩基性アミノ酸の数と N 末端によって決まる。プロトン同士のカーボン反発や単分子解離反応により、付加するプロトンの数は理論上より少なくなる。温度依存性測定では、反応時間を 10ms にしてガスセルの温度を 289K から 452K まで変化させた。PT はプロトン移動反応、CF は複合体生成反応で、A はプリカーサーイオンである Ins 4+の強度、A₀は Ins 2+、3+、4+の合計の強度となる。4+の PT 反応速度は 289K から 452K では温度の増加に伴って減少した。これは温度の減少に伴い、高温では広がった構造

であるのに対し、低温ではコンパクトな構造に変化するためと考えられる。プロトン移動反応において温度を高温から低温にすると、