

蛋白質多電荷イオンの衝突反応

(横浜市大・国際総合) 野々瀬真司, 深瀬智史, 横山雄一, 小口豊

【序】生体中における電子移動・プロトン移動などの反応過程を詳細に理解するためには、凝縮相にある生体分子を孤立状態で観測する必要がある。本研究では、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)を用いた二重質量分析・衝突反応装置を用いて hemoglobin、cytochrome c 等の蛋白質の多電荷イオンを生成し、その衝突反応について研究した。

【実験】実験装置の概略を図1に示す。この装置はESIイオン源、四重極質量分析計室、衝突反応セル室、飛行時間型質量分析計室から構成され、それぞれ独立に差動排気されている。

1. ESI法による生体分子イオンの生成

hemoglobin、cytochrome c 等の蛋白質を試料として含む溶液を、4-6kVの高電圧をかけたキャピラリーから噴霧させ、荷電粒子を含んだ液滴を生成させる。乾燥窒素ガスをフローさせて、荷電液滴から溶媒を蒸発させ、大気中で孤立分子イオンを生成させ、真空中へ導入する。

2. 生体分子イオンの衝突反応の観測

特に、ESI法を用いて蛋白質をイオン化した場合には、複数個の H^+ が付着した多電荷イオンが生成する。自作の四重極質量分析計で特定の電荷数 z の蛋白質イオンを質量選別する。これを、8極子イオントラップを用いた衝突反応セルに導き、ピリジン等の気体分子と衝突させる。反応によって生成したイオン種を、リフレクトロンを用いた飛行時間型質量分析計で質量分析し、検出する。

【結果と考察】上記の実験装置を用いて、hemoglobin、cytochrome c 等の蛋白質の多電荷イオンとピリジン分子との衝突によるプロトン移動反応について検討した。循環系で酸素の運搬に携わる hemoglobin は、サブユニット α (15053 amu) と β (15954 amu) の各2個ずつから構成される。ESI法を用いてこれをイオン化すると、 $\alpha_2\beta_2$ の4次構造が分解され、孤立状態にある α 、 β のイオンが生成された。四重極質量分析計の直流電位をゼロにして得られたサブユニット α と β の多電荷イオンの飛行時間型質量スペクトルを図2に示す。この質量スペクトルでは、蛋白質に8~18個の H^+ が付着した多電荷イオンが観測された。四重極質量分析計によって特定の電荷数 z のサブユニット α 、 β のイオンを質量選別し、ピリジンと衝突反応させた。その結果を、図3,4に示す。図3は電荷数 z が15の α を質量選別した場合、図4は電荷数 z が10の β を質量選別した場合である。これらの図中で、(a)は衝突反応セル中にバッファーガスとして He のみを充満させた場合の質量スペクトルである。一方、(b)はHeに加えて

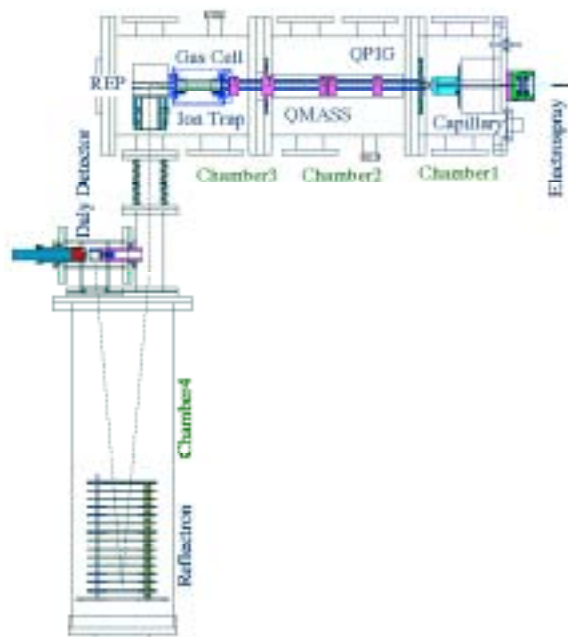


図1. 二重質量分析・衝突反応装置の概略。

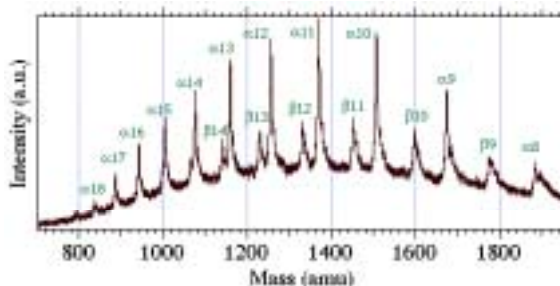


図2. hemoglobinサブユニット α の多電荷イオンの飛行時間型質量スペクトル。

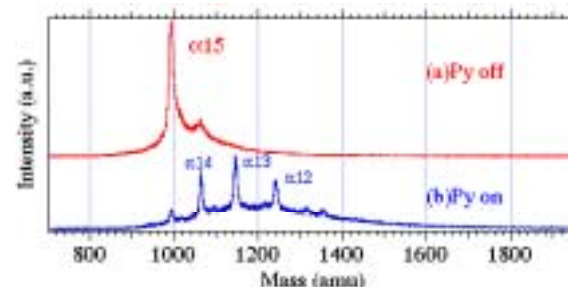


図3. hemoglobinサブユニット α ($z = 15$)とピリジンとの衝突反応。(a)はHeのみを充満させた場合、(b)はHeに加えてピリジン(Py)を導入した場合である。

一定量のピリジン(Py)を衝突反応セルに導入した場合である。ピリジンの導入による反応生成物イオンとして、親イオン、 $[\text{Protein}\cdot z\text{H}]^{z+}$ よりも電荷数が1~3個ほど少ない蛋白質イオン、 $[\text{Protein}\cdot(z-m)\text{H}]^{(z-m)+}$ ($m=1\sim 3$)、およびピリジンにプロトンが付加したイオン、 $\text{Py}\cdot\text{H}^+$ の生成が観測された。これらの結果から、下式で示すように衝突によって蛋白質イオンからピリジンへのプロトン移動反応が誘起されることが分かった。



同様に、cytochrome c 多電荷イオンとピリジンとの衝突反応についても検討した。cytochrome c は細胞内で電子伝達に参与する蛋白質で、構造が比較的柔軟であることが知られている。hemoglobin の場合と同様に、ピリジンとの衝突によって、cytochrome c イオンからピリジンへのプロトン移動反応が誘起された。

質量スペクトル中の親イオンと生成物イオンとの強度比から、蛋白質イオンからピリジンへのプロトン移動の反応速度を見積もった。その結果を図5に示す。この図において横軸は親イオンの電荷数 z 、縦軸は相対的な反応速度定数 k の対数である。いずれの蛋白質の場合でも、親イオンの電荷数が増大するに伴って反応速度定数 k が急激に増加した。また hemoglobin では、いずれの電荷数 z においても、サブユニットの反応速度定数 k よりもサブユニットの方が若干大きくなった。さらに cytochrome c の反応速度定数 k は、hemoglobin の、よりもかなり大きくなることが分かった。電荷数 z の増大によって反応速度定数 k が急激に増加する要因として、以下のようにふたつのことが考えられる。ひとつの要因は電荷どうしのクーロン反発力である。すなわち、 z の増大によって H^+ どうしのクーロン反発力が増加するため、蛋白質への H^+ の結合力が小さくなることである。もうひとつの要因は蛋白質イオンの構造である。すなわち、電荷数 z の増大するに従って蛋白質イオンの構造がほどける、すなわち unfolding が起こるに伴い、 H^+ が蛋白質表面に露出するようになるので、ピリジンが H^+ に接近しやすくなると考えられる。また、cytochrome c の反応速度定数 k が hemoglobin の、よりもかなり大きいのは、cytochrome c の構造が hemoglobin よりも柔軟であるため、cytochrome c イオンの構造が hemoglobin よりもほどけた形状をとっていると思われる。

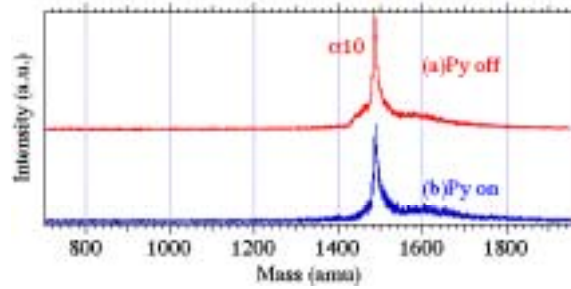


図4. hemoglobinサブユニット ($z=10$)とピリジンとの衝突反応。(a)はHeのみを充満させた場合、(b)はHeに加えてピリジン(Py)を導入した場合である。

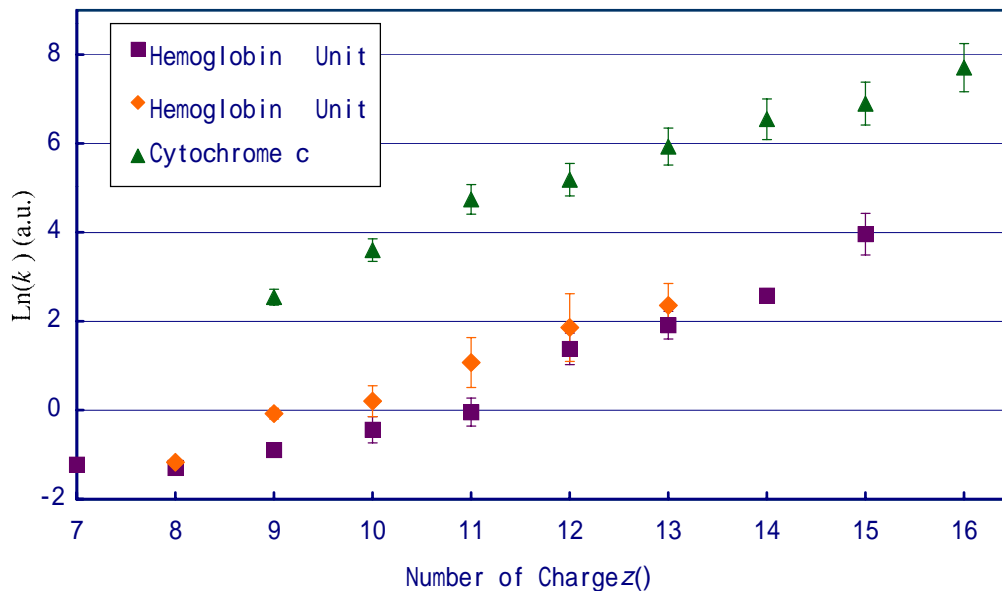


図5. 蛋白質イオンからピリジンへのプロトン移動反応の速度定数 k とイオンの電荷数 z との関係。