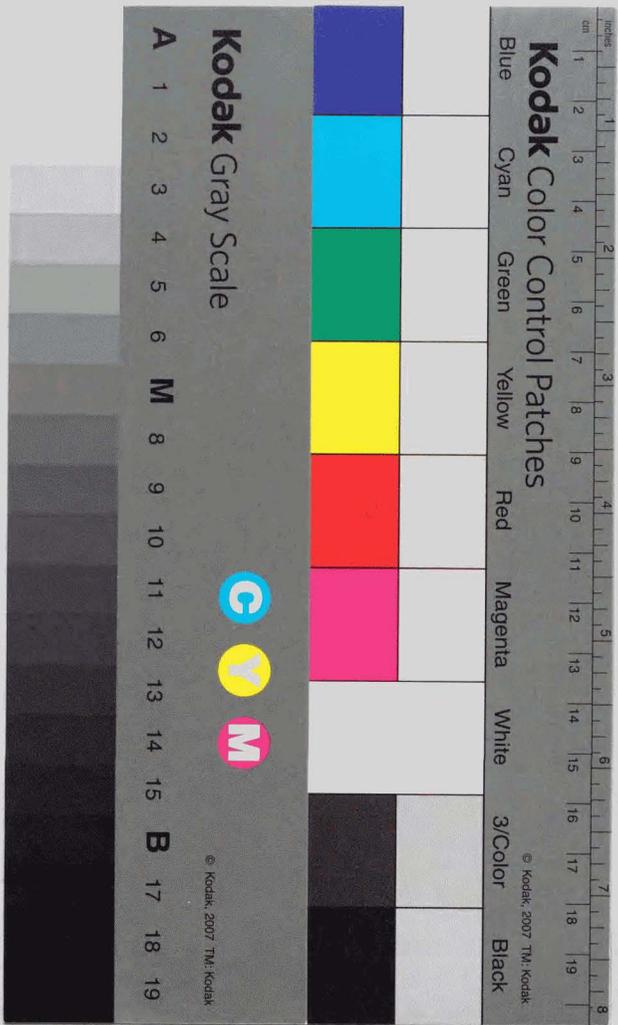


質量分析法によるペプチド及びタンパク質の
一次構造解析に関する研究

平成9年8月

石川 啓一郎



①

質量分析法によるペプチド及びタンパク質の
一次構造解析に関する研究

平成9年3月1日

石川 啓一郎

用語と略号

Ionization methods

CI	Chemical ionization. (化学イオン化法)
EI	Electron ionization. (電子衝撃イオン化法)
ESI	Electrospray ionization. (エレクトロスプレーイオン化法)
FAB	Fast atom bombardment. (高速原子衝撃法)
FD	Field desorption. (フィールドデソープション)
MALDI	Matrix-assisted laser desorption ionization. (マトリックスアシステッドレーザーデソープションイオン化法)
SIMS	Secondary ion mass spectrometry. (2次イオン質量分析法)

Instrumentation and experimental methods

B	Magnetic field. (磁場)
CAD	Collisionally activated dissociation. (衝突活性化開裂) *CAD* is used when translational energy of an incident ion is lower than ~100eV.
CID	Collision-induced dissociation. (衝突誘起解離) *CID* is used when translational energy of an incident ion is higher than ~1 keV.
E	Electric field. (電場)
FFR	Field free region influenced by neither electric nor magnetic fields. (無場領域)
GC/MS	A technique utilizing a gas chromatograph interfaced to a mass spectrometer. (ガスクロマトグラフ/質量分析法)
HPLC	High performance liquid chromatography. (高速液体クロマトグラフィー)
LC/MS	A technique utilizing a liquid chromatograph interfaced to a mass spectrometer. (液体クロマトグラフ/質量分析法)
QMS	Quadrupole mass spectrometer. (四重極質量分析計)
MS-I,	The first and second mass analyzers of tandem mass spectrometer.
MS-II	(タンデム質量分析計の第一及び第二質量分析部)
MS/MS	A technique utilizing mass analyzers in tandem; tandem mass spectrometry. (タンデム質量分析法)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis. (ソジウムドデシルサルフェイトポリアクリルアミドゲル電気泳動)
TQMS	Tandem quadrupole mass spectrometer. (タンデム四重極質量分析計)
TOFMS	Time-of-flight mass spectrometer. (飛行時間型質量分析計)

Scanning of spectra

CNLS	Constant neutral loss scan. (ニュートラルロススキャン)
LSBE	Linked scan at constant B/E. (B/Eリンクドスキャン、B: magnetic field, E: electric field)

Chemical substances

AcOH	Acetic acid. (酢酸)
ACN	Acetonitrile. (アセトニトリル)
AMAT	α -Mating factor. (α メイティングファクター)
ANG I	Angiotensin I. (アンギオテンシン I)
ANG II	Angiotensin II. (アンギオテンシン II)
ATZ	Anilinothiazolinone. (アニリノチアゾリノン)
Ata	3-Amino tetradecanoic acid. (3-アミノテトラデカン酸)
BCA	Bovine β -casein. (ウシ β カゼイン)
BA	Bovine albumin. (ウシアルブミン)
BI	Bovine insulin. (ウシインシュリン)
BRAD	Bradykinin. (ブラジキニン)
CCKO	CCK-octapeptide. (CCKオクタペプチド)
CYT	Cytochrome C. (シトクロムc)
D9BR	des-Arg ⁹ -bradykinin. (デスArg ⁹ ブラジキニン)
DMF	Dimethylformamide. (ジメチルフォルムアミド)
DNA	Deoxyribonucleic acid. (デオキシリボ核酸)
DYNR	Dynorphin (1-13). (ダイノルフィン 1-13)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid. (エチレンジアミン四酢酸)
ELRP	Eledoisin-related peptide. (エレドイシンリレイテッドペプチド)
HEL	Hen-egg lysozyme. (ニワトリ卵白リゾチーム)
HHM	Human hemoglobin. (ヒトヘモグロビン)
HLY	Human placental lysozyme. (ヒトリゾチーム)
LENK	Leu-enkephalin. (ロイシンエンケファリン)
MENK	Met-enkephalin. (メチオニンエンケファリン)
MeOH	Methanol. (メタノール)
MTET	2-Methoxyethanol. (2-メトキシエタノール)
NBA	3-Nitrobenzyl alcohol. (3-ニトロベンジルアルコール)
OA	Octaalanine. (オクタアラニン、H-(Ala) ₈ -OH)
ODS	Octadecylsilica. (オクタデシルシリカ)
PhH	Benzene. (ベンゼン)
PITC	Phenyl isothiocyanate. (フェニルイソチオシアネート)
PTC	Phenylthiocarbonyl. (フェニルチオカルバミル)
PTH	Phenylthiohydantoin. (フェニルチオヒダントイン)
Pyr	Pyroglutamic acid. (ピログルタミン酸)
RNA	Ribonucleic acid. (リボ核酸)
TFA	Trifluoroacetic acid. (トリフルオロ酢酸)
TMSD	Trimethylsilyl diazomethane. (トリメチルシリルジアゾメタン)
TPCK	L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone. (L-1-トシルアミド-2-フェニルエチルクロロメチルケトン)

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane. (トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
SUBP	Substance P. (サブスタンスP)
VAG	[Val ⁵]-angiotensin I. ([Val ⁵]アンギオテンシン I)
VSAG	[Val ⁵ , Ser ⁹]-angiotensin I. ([Val ⁵ , Ser ⁹]アンギオテンシン I)
WGA	Wheat germ agglutinin. (小麦胚芽アグルチニン)

General terms

Da	An atomic mass unit (¹² C = 12 Da). (原子質量数)
eV	Electron volt = 96.487 kJ/mol = 23.06 kcal/mol. (電子ボルト)
fmol	Femtomole. (10 ⁻¹⁵ mol)
FSC	Fused silica capillary. (溶融シリカ毛細管)
HRMS	High resolution mass spectrometry. (高分解能質量分析法)
M ⁺	The ionized molecule. (分子イオン)
[M+H] ⁺	The ion formed by protonation of a molecule. (プロトン化分子)
[M+Na] ⁺	The ion formed by Na ⁺ addition to a molecule. (ナトリウム付加分子イオン)
Ma	Molecular mass at the most abundant isotopic distribution. (最も存在比の多い同位体の質量)
Mr	Relative molecular mass. (同位体平均分子量)
MS	Mass spectrometry. (質量分析法)
MW	Molecular weight. (分子量)
m/z	Mass-to-charge ratio. (質量/電荷比)
pmol	Picomole. (10 ⁻¹² mol)
RF	Radio frequency. (ラジオ周波数)
S/N	Signal to noise ratio. (信号/雑音比)
UV	Ultraviolet absorption. (紫外吸収)
φ	Phenyl group. (フェニル基)

目 次

Faint, illegible text listing chapters and page numbers, typical of a book's table of contents.

目次	ページ
用語と略号	
タンパク質アミノ酸の略号表	
図・ペプチドのシーケンスイオンの構造と略号	
第1章 緒論 -----	1
1.1 ペプチド、タンパク質の機能と一次構造	
1.2 タンパク質の一次構造決定法の進歩	
1.3 従来法の分析感度と問題点	
1.4 質量分析法による一次構造解析の発展	
1.5 質量分析法による一次構造解析の特徴と問題点	
1.6 本研究の概要	
第2章 高速原子衝撃 (FAB) によるペプチドの質量分析法 -----	10
2.1 緒言	
2.2 実験	
質量分析	
試料調製	
2.3 結果と考察	
FAB及びFAB-衝突誘起解離 (CID) スペクトルのマトリックスによる	
変化	
ペプチドの化学修飾によるFAB及びFAB-CIDスペクトルの変化	
重水素ラベル法による γ イオン生成における水素転移反応の解析	
2.4 本章のまとめ	
第3章 高速原子衝撃 (FAB) 質量分析法によるペプチドのアミノ酸配列推定 31	31
3.1 緒言	
従来の研究と問題点	
本研究の目的	

3.2 実験	
3.3 アミノ酸配列推定法の概要	
アミノ酸配列推定法のアルゴリズム	
スコアの計算	
スペクトルデータの変換	
3.4 既知ペプチドのFABスペクトルの解析結果	
3.5 ペプチドの分子量とアミノ酸配列の総数及びCAPSでスペクトルとの	
整合性を判定するアミノ酸配列の数の関係	
3.6 本章のまとめ	
第4章 環状ペプチドの高速原子衝撃 (FAB)-衝突誘起解離 (CID) 質量分析法	
によるアミノ酸配列解析 -----	57
4.1 緒言	
質量分析法による環状ペプチドのアミノ酸配列解析の問題点	
本研究の目的	
4.2 実験	
4.3 結果と考察	
グループIのペプチドP1、P1'のアミノ酸配列解析	
グループIIのペプチドP2、P2'のアミノ酸配列解析	
環状ペプチドのイオン分解スキームとレトロシーケンスの判別	
4.4 本章のまとめ	
第5章 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) によるペプチド及びタンパク質	
の質量分析法 -----	81
5.1 緒言	
5.2 実験	
質量分析装置	
ペプチド、タンパク質及び溶媒	
5.3 結果と考察	
標準的なペプチド、タンパク質のESIスペクトル	

	タンパク質の多価イオン化におけるイオン化条件や立体構造の関係 ESI-MSによるタンパク質の測定感度、質量決定精度	
5.4	本章のまとめ	
第6章	エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法による高速液体クロマトグラ フィー (LC) と質量分析 (MS) 法の直接結合 ----- 98	
6.1	緒言	
6.2	実験 LC/MS装置 ペプチド及びタンパク質	
6.3	結果と考察 ESI法によるLC/MSインターフェイスの検討 ニワトリ卵白リゾチームのトリプシン消化ペプチド混合物のLC/MS 測定 ポストカラムモディファイアを用いたESI-LC/MS法の検討	
6.4	本章のまとめ	
第7章	高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-LC/MS) 法による天然及び遺伝子組み換えタンパク質の同定 ----119	
7.1	緒言	
7.2	実験 質量分析 液体クロマトグラフィー タンパク質の調製 タンパク質の酵素消化	
7.3	結果と考察 ESI-LC/MS法によるオンライン脱塩-質量分析法による遺伝子組み 換えヒトリゾチームにおけるアミノ酸置換の同定 ウシβカゼインの天然変異体の解析 遺伝子組み換え小麦胚芽アグルチニンの翻訳後修飾の解析	

7.4	本章のまとめ	
第8章	エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析及び高速原子衝撃 (FAB) タンデム質量分析法によるイネ萎縮ウイルス (RDV) 外殻タンパク質の 点変異解析 ----- 144	
8.1	緒言 ウイルスタンパク質の分子量測定における問題点 RDVの構造と外殻タンパク質P8 本研究の目的	
8.2	実験 外殻タンパク質P8の分離精製と酵素消化 質量分析	
8.3	結果と考察 RDVの普通系及び強毒系 (RDV-O及びRDV-S) から得られた P8タンパク質のESIスペクトル ESIスペクトルからのP8タンパク質の分子量計算 FAB-MS及びFAB-MS/MSによるトリプシン及びV8プロテアーゼ消化物 のペプチドマッピングとアミノ酸配列推定	
8.4	本章のまとめ	
第9章	ペプチド多価イオンの衝突活性化開裂 (CAD) によるイオン分解機構 ----- 161	
9.1	緒言 ペプチドのイオン分解を利用した一次構造解析の問題点と多価イオン の質量分析法による新たな可能性 ペプチド多価イオンのイオン分解機構に関する従来の研究 本研究の目的	
9.2	実験 質量分析 ペプチド、タンパク質試料	

9.3	結果	
		シトクロムcのトリプシン消化ペプチド多価イオンのCADスペクトル
		生理活性ペプチド多価イオンのCADスペクトル
		リシン置換オクタアラニンのCADスペクトル
9.4	考察	
		ペプチド多価イオンにおける分子内プロトン移動反応と イオン分解機構
		分子内プロトン移動によるクーロンエネルギーの変化
		シトクロムcのトリプシン消化ペプチド多価イオンのCADスペクトル
		生理活性ペプチドのイオン分解
		リシン置換オクタアラニンのCADスペクトル
		クーロン効果と化学的効果の関係
		塩基性アミノ酸の相対位置のイオン分解への影響
9.5	本章のまとめ	
第10章	総括	189
10.1	高速原子衝撃 (FAB) 及びFAB-衝突誘起解離 (CID) / 衝突活性化開裂 (CAD) 法の特徴と問題点	
10.2	エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の特徴と問題点	
10.3	本研究から得られた知見	
10.4	今後の課題と展望	
	発表論文等	195
	付録 (アミノ酸配列解析プログラムCAPS)	
	謝辞	

第1章 緒論

1.1 ペプチド、タンパク質の機能と一次構造

ペプチドやタンパク質は、天然に存在する約20種類のアミノ酸が厳密に決まった順序で縮合した、一次的なポリペプチド鎖を基本骨格としている。これらは、生体内の加水分解、酸化・還元反応等を触媒する酵素やそれを調節するホルモン、または病原菌や毒素の侵入に対する免疫作用として働く抗体等として、生体機能の発現と調節の殆ど全てを直接に担う極めて重要な物質である。例えば、ヒトの体内で働いているタンパク質は、約10万種類にのぼると推定されている。タンパク質が機能を発現するためには、ポリペプチド鎖の折り畳みによって固有の立体構造を形成することが必須であるが、その基礎となる鎖間の相互作用を規定するのは、アミノ酸配列を始めとする一次構造である。タンパク質の一次構造には、アミノ酸配列の他、糖やリン酸等によるアミノ酸の側鎖の修飾、金属イオンその他の補助因子の結合、及びジスルフィド結合によるポリペプチド鎖間の橋かけ等が含まれる。タンパク質その他の生体物質の構造決定においては、大量の生体試料からフトレートや塩類、または類縁化合物等を除去して必要量の目的物質を得るために、膨大な費用や時間、労力が必要とされることが少なくない。例えば、神経ペプチドのエンケファリンの場合は、構造決定に必要な約1mgの試料を得るために、10万頭もの豚が用いられた。近年の遺伝子組み換え技術の進歩により、超微量にしか存在しない有用タンパク質を大量に作る事が可能となった。しかし、このことにより分析感度への要求が軽減されるよりは、むしろ遺伝子組み換えにより種々のタンパク質を効率よく発現させるための条件検討のため、微量タンパク質を迅速に同定する技術への期待が益々高まりつつある。

1.2 タンパク質の一次構造決定法の進歩

ペプチドやタンパク質の一次構造解析には、N末端から逐次的にアミノ酸残基を切断するEdman分析法¹⁾(図1-1参照)に基づいて、1967年にEdmanとBeggが開発したアミノ酸配列の自動分析装置、プロテインシーケンサが用いられてきた。その後、ペプチドを精密に分離できる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) や気相シ

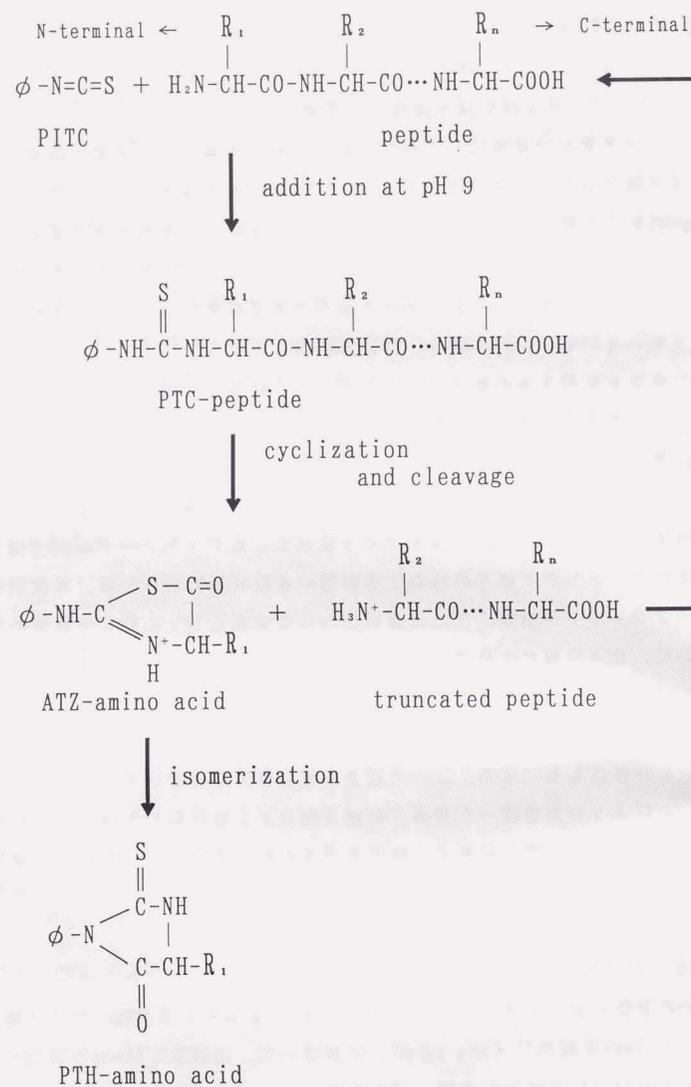


図1-1 Edman分解反応のスキーム (φ:フェニル基)

ーケンサの開発により、従来の液相のものに比べ約1,000倍の感度向上がもたらされた。

一方、タンパク質のアミノ酸配列が、遺伝子DNAの塩基配列としてコードされていることを利用する方法も多く用いられている。タンパク質の生合成の際には、DNAの塩基配列がmRNA前駆体に転写された後、スプライシングを受けてタンパク質のアミノ酸配列をコードする成熟mRNAが生成する。この成熟mRNAに相補的なDNA (cDNA) の塩基配列を解析することにより、生合成直後の前駆体タンパク質のアミノ酸配列が推定できる。この方法は、タンパク質レベルでは解析が困難な巨大タンパク質や、極微量にしか得られないタンパク質の全一次構造の迅速な決定に有効である。タンパク質側からとDNA側からの一次構造解析は、それぞれの特長を生かして、相補的に利用されている。

1.3 従来法の分析感度と問題点

市販のプロテインシーケンサの検出感度は、1ピコ (10⁻¹²) モル程度で分析所要時間は、1残基当たり約1時間である。Edman分解法は、N末端からの分析なので、N末端がブロックされているタンパク質は分析できない。ピログルタミル化 (Pyr) やアセチル化によりブロックされているときは、これらを認識して除去する酵素 (ピログルタミルペプチダーゼやNアシルアミノ酸遊離酵素) で処理することにより分析可能であるが、長鎖のペプチドでは酵素が作用しにくい場合がある。その他のプロテインシーケンサの欠点として、試料 (特に小ペプチド) の溶出による感度低下と側鎖の修飾により親水性の増加した修飾アミノ酸 (糖鎖が付加したアスパラギン酸、トレオニン、セリン等) が、直接同定できないこと等がある。

また、DNA側から得られるアミノ酸配列の知見は、あくまで前駆体タンパク質の推定構造であり、成熟タンパク質に見られる翻訳後修飾による化学的変化が含まれないので、タンパク質側からの確認・修正が不可欠である。また、タンパク質のアミノ酸配列をコードするcDNAの単離のためにも、タンパク質の部分的なアミノ酸配列の知見が必要である。

1.4 質量分析法による一次構造解析の発展

質量分析によるペプチドやタンパク質の一次構造解析の研究は、古くから行わ

れてきた。1980年以前の分析法では、タンパク質を部分加水分解等で断片化して得たペプチド混合物を揮発性の誘導体に変換し、真空中で加熱気化させ、化学イオン化 (Chemical ionization, CI) 法や電子衝撃 (Electron ionization, EI) 法等でイオン化する際に生成するフラグメントピークの解析により、その構造を推定した。ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) 法と組み合わせて用いられるポリアミノアルコール法²⁾や直接導入測定に適したパーメチレーション法³⁾等の優れた誘導体法が開発されたが、試料の誘導体化反応が煩雑なことや必要な試料量が比較的多い等の理由で、広く普及するには至らなかった。

質量分析法の生体物質の構造解析における適用範囲の拡大を目指して、不揮発性物質や熱に不安定な物質を、分子構造を保持したままイオン化できる方法の探索が続けられ、固体や溶液状態の試料から直接イオン化を行う”脱離型”イオン化法と総称されるいくつかの優れた方法が開発された。これらは、試料を非常に急速に加熱した場合、分子の分解反応よりも単分子状のイオンの”脱離”が優先して起こるといふ現象を利用している。特に、1981年にBarberら⁴⁾が開発した高速原子衝撃 (Fast atom bombardment, FAB) 法は、マトリックスと呼ばれるグリセリン等の低揮発性の液体に溶解した試料に、数kVに加速したアルゴンやキセノンの中性原子ビームを照射する方法で、断片化や誘導体化なしに長鎖のペプチドであるウシインシュリン (bovine insulin, BI, MW 5,733.6) をイオン化できることが示された。FAB法は、装置や測定方法の簡便さのため急速に普及し、単離したタンパク質を化学的にまたは酵素消化によって限定分解し、生成したペプチド混合物の分子量を測定するいわゆる”FABマッピング”⁵⁾といわれる方法が開発され、プロテインシーケンサを補完する汎用性のある方法として広く用いられている。

さらに、FAB法の数年後に開発されたエレクトロスプレーイオン化法 (Electrospray ionization, ESI)⁶⁾やマトリックスアシステッドレーザーデソリプションイオン化 (Matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)法⁷⁾により、それまで不可能だった分子量10万を超えるタンパク質を、分子構造を保持したまま真空中の単分子状のイオンに変換できることが示された。これらの方法により、タンパク質の分子量を、0.1から0.01%の精度で測定できるようになった。精密な分子量測定により、DNAの塩基配列やプロテインシーケンサによって解

析されたアミノ酸配列の正当性を、全体として調べることができる。また、既に広く普及していたFABマッピングは、必ずしもタンパク質全体のアミノ酸配列について情報が得られるとは限らない。その原因は、限定分解によって生成した広い分子量や化学構造を持つペプチド断片を同程度の感度で測定することが困難であることや、限定分解反応が十分に進行せず、生成するはずのペプチドが観測されなかったり、非特異的な分解反応によって予想しない断片が生成することにより、スペクトルの解析が複雑になるためである。タンパク質の精密な分子量測定により、FABマッピングのこのような欠点を補完できるようになった。しかも、ESIやMALDI法は、高い精製度のタンパク質試料の構造的均一度に関する情報も与えることができる。これは、長い間研究されてきた既知タンパク質の中にも、これまで知られていなかった微小な構造不均一性が見い出されることから、タンパク質化学に大きなインパクトを与えた。

難揮発性物質の新しいイオン化法と平行して、混合試料の一斉分析を目的とする、分離手段と質量分析法のオンライン化技術の開発が進められた。これにより、粗製試料の分離精製とMS測定を一段階で行うことができ、必要試料量や分析時間を大幅に節減することができる。混合物の高感度で精密な測定法として既に確立したGC/MS法の類似として開発された、液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) 法は、生体物質のような難揮発性物質の混合試料の一斉分析に利用されている。また、質量分析計を2台連結し、初段の質量分析計を分離手段として用いるタンデム質量分析 (MS/MS) 法は、質量分析法の迅速性が分離段階でも発揮されることから、特に重要な方法になった。イオン源で生成したイオンが質量分析計を通過する割合は、四重極型でも10%、磁場型では1%未満であり、MS/MS法の場合はこの自乗で減少するので、検出器に到達するイオンの絶対量は、通常のMSよりも桁違いに少なくなってしまう。しかし、MS/MS法でのノイズの減少が信号強度の減少より大きいと、検出されるイオンの絶対量の減少に拘わらずS/N比は逆に向上するという利点が生ずる。また、1段目と2段目のMSの間で、ガス衝突等により積極的にイオン分解を起こさせることにより、分子イオンは強いフラグメントイオンによる構造情報が少ないという、FABやESI等の難揮発性物質のイオン化法に共通した欠点を補うことができる。

1.5 質量分析法による一次構造解析の特徴と問題点

高真空中で試料の分離・分析を行う質量分析法では、バックグラウンドノイズの原因となる夾雑物質の影響を最小限にできるため、原理的に高い検出感度が得られる。また、真空中での試料の分離・検出は μ 秒オーダーで行われるので、試料の前処理やスペクトルの解析に要する時間を除いた正味の分析時間は極めて短く、基本的には非常に迅速な方法である。また、プロテインシーケンサでは、目的タンパク質を単離する必要があるのに対し、混合試料を直接測定できることも大きな特徴である。一方、スペクトルを測定するためには、試料をイオンに変換しなくてはならないという制約がある。試料が、真空中の加熱・気化できる場合は、EIまたはCI法を用いて中性分子から電子を奪ったり、カチオンやアニオンを付加させることにより、イオン化を行うことは比較的容易である。しかし、ペプチド、タンパク質、糖類、核酸等多くの生体物質は、生体内で機能するために水溶性である必要があり、必然的に極性が高く揮発性のない物質が多い。揮発性の誘導体に変換する方法に代わって、FAB、ESI、MALDI法等のいわゆる難揮発性物質のイオン化法が開発されたことにより、質量分析法が生体物質の構造解析において、本来の高感度や迅速性を発揮できる可能性が急速に開かれつつある。中でもESIやMALDI法は、バックグラウンドノイズが極めて低いため、フェムト (10^{-15}) モルレベル⁹⁾の検出感度が得られる。その結果、少なくとも標準試料の測定感度においては、プロテインシーケンサと同等かそれ以上のレベルに達した。N末端がブロックされたり、糖鎖やリン酸基等が結合したタンパク質も解析できることから、これまでも質量分析法はプロテインシーケンサを補完する手段として活用されてきたが、今後益々重要性を増すことが期待されている。

反面、複雑なイオン化現象を利用するため、実試料で期待される感度が得られない等の問題に対処するための理論的指針を得にくいことや、質量分析法において重要かつ基礎的な現象であるイオン分解を非経験的に予測できないため、未知試料のスペクトルから、演繹的に一次構造を導くことが困難であること等は、質量分析法の広範な普及を妨げる要因となっている。種々のペプチドのスペクトルを集積し、経験的にイオン分解の規則性を見出す試みも行われているが、20種類のアミノ酸が作り出す膨大な数のアミノ酸配列の内、どれだけの種類のペプチドのデータを集積すれば、最小限必要な経験則が得られるかが明らかでない。非経

験的なスペクトルのシミュレーションにより、実験量を節約できれば理想的であるが、比較的小きなペプチドでも数十~数百個の原子を含むため、イオンの立体配座を推定するだけでも、最高速のコンピュータの能力をも遥かに超える膨大な計算が必要なことが、その困難さを象徴している。

1.6 本研究の概要

本研究では、質量分析法によるペプチドやタンパク質の一次構造解析におけるスペクトル解析法や測定感度の向上について検討した。本研究の特徴は、イオン化やイオン分解機構に関する限られた知見を経験的要素で補うことにより、実試料の測定・解析においても、質量分析本来の高感度や迅速性を実現できる方法の開拓を試みた点にある。具体的には、FAB法やESI法等におけるイオン化現象やイオン分解機構の解明、及びこれらを用いたアミノ酸配列推定やLC/MS法によるタンパク質混合試料の高感度測定法について研究した。本論文は、緒論と総括を含めて10章からなり、各章の概略は以下の通りである。

第2章から第4章では、主にFAB法によるイオン化現象やイオン分解機構の解明、及びこれらを用いたアミノ酸配列推定法について研究した。ペプチドのFABスペクトルには、ペプチド鎖の一カ所の開裂により生成する、元のペプチドのN末端またはC末端部分を含むイオン(アミノ酸配列(amino acid sequence)を反映したイオン:シーケンスイオン)が観測され、アミノ酸組成が既知の場合には高い確度でその配列順序を推定できる。しかし、アミノ酸組成が未知の場合には、アミノ酸配列の総数が膨大となり、8量体以上のペプチドの解析は困難とされていた。第2章では、より解析が容易なFABスペクトルを測定する方法やペプチドのイオン分解における分子内水素転移反応の機構を検討した。第3章では、ペプチドのFABスペクトルからアミノ酸配列情報を最大限に引き出す方法を検討するため、経験的なイオン分解様式に基づいて、可能性の高いアミノ酸配列をコンピュータで検索する方法"CAPS"を開発した。この方法により、アミノ酸組成が未知の条件でも、10数量体のペプチドのアミノ酸配列を高い確度で推定できることが分かった。第4章では、FAB-衝突誘起解離(CID)スペクトルにより2カ所以上のペプチド結合の開裂によるフラグメントイオンを観測し、微生物由来の環状ペプチドのアミノ酸配列を解析した。しかし、環状ペプチドの場合、CIDスペクトルのみからペプチド

結合の方向性を判別することは困難で、部分加水分解やEdman分解等の併用が必要であることが分かった。

第5章から第9章では、主にESI法におけるイオン化現象やイオン分解機構の解明、及びLC/MS法によるタンパク質混合試料の高感度測定法について研究した。第5章では、ESIイオン源を備えたタンデム四重極質量分析計を試作し、タンパク質のイオン化条件、検出感度、質量決定精度等について検討した。生体由来のタンパク質は、ESI法のイオン化効率を著しく阻害するナトリウム塩等と共存することが多い。微量なタンパク質の脱塩は、通常の透析やゲル濾過等の方法では、高い回収率や精製度を得ることが困難である。第6章では、溶液の電気伝導度や表面張力等の物理化学的性質とタンパク質のESIイオン化効率の関係を検討し、塩類を含む微量タンパク質やペプチド混合試料の高感度測定を可能とするLC/MSインターフェイスを検討した。第7章ではこの方法により、大量の塩を含む微量の遺伝子組み換えタンパク質の高感度測定や、微小な構造不均一性を有するタンパク質の組成解析を行った。第8章では、ESI、FAB-MS、FAB-MS/MS法によるイネ萎縮ウイルスの外殻タンパク質のアミノ酸置換や翻訳後修飾の解析を行った。アレー検出器を備えた磁場型質量分析計とESI法の結合により、疎水性や凝集性が高く、溶媒に溶けにくいタンパク質の精密な分子量を測定し、アミノ酸置換を正確かつ迅速に同定できることが分かった。ESIによる多価イオン生成は、MS/MS法によるペプチドの一次構造解析にも新たな可能性をもたらした。電荷間の反発によりイオン分解が促進されたり、1分子の多価プリカーサーイオンから複数の娘イオンが生成する可能性があり、1価イオンに比べて多くの構造情報が得られることが期待される。第9章では、特定の結合位置で選択的に分解するペプチドに着目し、ペプチド多価イオンのイオン分解における分子内クーロンエネルギーの役割を明らかにした。第10章は、本論文の総括である。

文献

1. P. Edman, *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
2. a) K. Biemann, F. Gapp and J. Seibl, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 2274 (1959).
b) K. Biemann, *Chimia*, **14**, 393 (1960).
c) K. Biemann, In "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", G. R. Waller; editor. Wiley-Interscience; New York, p405 (1972).
3. a) B. C. Das, S. D. Gero and E. Lederer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 211 (1967).
b) E. Vilkas, E. Lederer, *Tetrahedron Lett.*, 3089 (1968).
4. a) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325 (1981).
b) M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Anal. Chem.*, **54**, 645A (1982).
5. K. Biemann and S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 1 (1987).
6. a) C. K. Meng, M. Mann and J. B. Fenn, *Z. Phys. D*, **10**, 361 (1988).
b) M. Mann, C. K. Meng and J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **61**, 1702 (1989).
c) J. B. Fenn, M. Mann and C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
7. a) K. Tanaka, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, Presented at the Second Japan-China Joint Symposium on Mass Spectrometry (abstract), Takarazuka Hotel, Osaka, Japan, Sept 15-18 (1987).
b) M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **78**, 53 (1987).
c) M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **60**, 2301 (1988).
8. J. A. Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Anal. Biochem.*, **179**, 404 (1989).

第2章 高速原子衝撃 (FAB) によるペプチドの質量分析法¹⁾

2.1 緒言

1981年にBarberら²⁾が開発した高速原子衝撃 (Fast atom bombardment, FAB) 法と、それまで主に半導体等無機材料の表面分析に用いられていた、2次イオン質量分析 (Secondary ion mass spectrometry, SIMS) 法³⁾との最も大きな違いは、グリセリン等の液体マトリックスの使用により、粒子線照射による試料の分解を軽減したことにある。イオン化条件が比較的ソフトなため、断片化や誘導体化なしにウシインシュリン (bovine insulin, MW 5,733.6, BI) 等分子量数千までの不揮発性化合物のプロトン化分子 ($[M+H]^+$) を生成し、分子量測定が可能となった⁴⁾。反面、フラグメントイオンが殆ど生成しない場合もあり、構造情報に乏しいという欠点もある。また、イオン化に必須であるマトリックスに由来するバックグラウンドイオンが、殆ど全ての質量数にノイズを与えるため、試料に由来するフラグメントイオンが生成しても、強度が弱い場合には判別が困難になることが多い。

ペプチドは、N末端のアミノ基やリシン、アルギニン、ヒスチジン等の塩基性アミノ酸の側鎖等にプロトンが付加し易い塩基性部位があるので (タンパク質アミノ酸の略号と構造、残基質量数等については、巻頭の表を参照されたい)、グリセリン等のマトリックスに溶解した状態で、既に一部は正味の正電荷を持つイオンになっている。数kVに加速したキセノン等の希ガスの原子で、マトリックス表面をスパッタリングすることにより、比較的容易に $[M+H]^+$ を生成することができる。真空中に叩き出された $[M+H]^+$ のプロトンは、分子内移動反応によりペプチド結合のアミド窒素に付加することにより、イオン化時に付加された過剰の内部エネルギーと共にペプチド結合の開裂を誘発し、アミノ酸配列を反映したフラグメントイオンを生成する。図2-1は、 $[\text{Val}^5, \text{Ser}^9]$ アンギオテンシン I (DRVYVHPFSL, MW 1,231.6, VSAG) のFABスペクトルである。FABスペクトルから得られる情報は、大きく分けて3種類に分類できる。アミノ酸のイモニウムイオン ($\text{H}_2\text{N}^+=\text{CHR}$) が観測される m/z 160以下の領域 (a)、 $[M+H]^+$ 領域 (c) 及び (a) と (c) に挟まれた領域 (b) である。それらから得られる情報には、固有の特徴がある。領域

Immonium Ions

Protonated Molecules

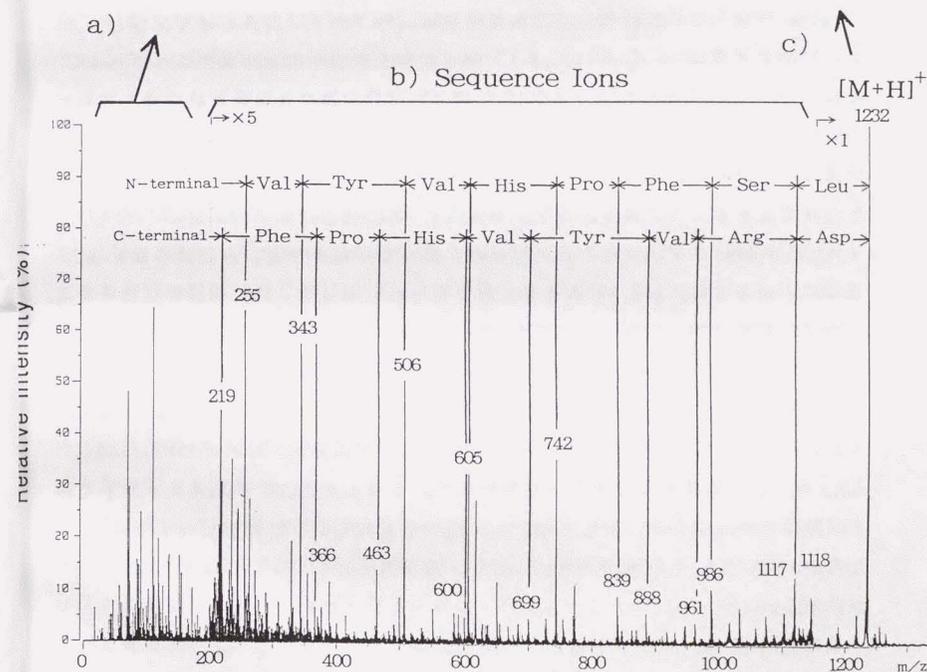
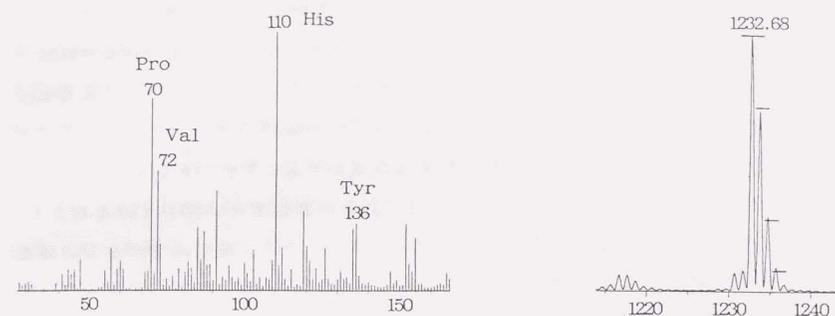


図2-1 $[\text{Val}^5, \text{Ser}^9]$ アンギオテンシン I (DRVYVHPFSL, MW 1,231.6, VSAG) のFABスペクトル。a)イモニウムイオン、b)シーケンスイオン及びc)プロトン化分子 ($[M+H]^+$) が観測される領域

(c) の $[M+H]^+$ は、最も基本的な情報であるペプチドの分子量を与え、アミノ酸分析データの確認やアスパラギン酸/アスパラギン及びグルタミン酸/グルタミンの判別が可能となる。また、ペプチドの組成や純度の推測ができる。未知試料の場合でも、試料の由来などから幾つかの可能性が絞られたり、一次構造が既知のタンパク質の酵素消化物のような場合には、分子量情報のみでペプチドを同定できることもある。また、アミノ酸組成が未知の場合でも、Gly-Gly ($C_4H_8N_2O_2$, 114.043) と Asn ($C_4H_8N_2O_2$, 114.043) 等の様に元素組成が一致している場合を除けば、高分解能測定により求めた精密質量数から、アミノ酸組成を絞ることができる。例えば、リシン (128.095) とグルタミン (128.059) は整数質量では区別できないが、精密質量では 36mDa の差があり、分子量 1,000 程度までのペプチドでは、高分解能 (HRMS) 測定により、かなりの確度でこれらを区別できる。さらに、 $[M+H]^+$ に含まれる同位体ピークの強度分布は、ペプチドの元素組成を反映しており、VSAG の元素組成 ($C_{5.8}H_{8.8}O_{1.5}N_{1.5}$) から計算された同位体分布をスペクトルに重ねて示した。ペプチドは、通常 C、H、O、N、S の元素しか含まないので、同程度の分子量のペプチドの同位体分布はほぼ同様であるが、同位体分布に特徴のある元素 (Cl、Br 等) が結合した場合には、それらの有無や結合数を確認する有力な手がかりとなることがある。また、領域 (a) で観測されるアミノ酸のイモニウムイオンも同様にペプチドのアミノ酸組成に関する情報を与え、分子量情報を補完することができる。図 2-1 のスペクトルでは、 m/z 70, 72, 110, 136 等のピークは、それぞれプロリン、バリン、ヒスチジン、チロシンのイモニウムイオン (I_P , I_V , I_H , I_Y) であると推定される。VSAG に含まれる 9 種類のアミノ酸のうち、これら以外のアミノ酸 (アスパラギン酸、アルギニン、フェニルアラニン、セリン、ロイシン) については、イモニウムイオンに相当する質量数 (それぞれ 88, 129, 120, 60, 86) に明確なピークが見られない。このように、イモニウムイオンピークが観測された場合は、対応するアミノ酸が含まれていることを支持する根拠になるが、逆にそれらが観測されないアミノ酸が含まれていないとは言えないことが分かる。

領域 (b) には、ペプチド鎖の一方所の開裂により生成する、元のペプチドの N 末端または C 末端部分を含むイオン (アミノ酸配列 (amino acid sequence) を反映したイオン: シーケンスイオン) が観測され、(a) や (c) からは得られない

ペプチドのアミノ酸配列に関する情報を与えるため、特に重要である。図 2-1 のスペクトルの例では、ペプチドはほぼ純粋で、かつアミノ酸配列が既知であるため、N 末端や C 末端のシーケンスイオンを帰属し、アミノ酸配列を確認するのは比較的容易である。しかし一般には、領域 (b) で観測されるイオンは強度が低く、試料中の不純物による妨害を受けやすい。VSAG のアミノ酸配列に基づくイオンの帰属によると、N 末端のシーケンスイオンは殆どアシリウムイオン (a タイプ) であるが、 m/z 1,118 のみは C 末端側が $-CO-NH_2$ (c タイプ) である。(ペプチドのシーケンスイオンの構造と略号⁵⁾ は、巻頭の図を参照されたい) また、C 末端のシーケンスイオンは殆どが γ タイプであるが m/z 888 のみは x タイプである。ペプチド結合の位置により観測されるイオンのタイプが異なることがあり、かつどのタイプのイオンが観測されるかが予測できないことは、未知ペプチドの解析を困難にする要因である。さらに、スペクトル上には N 末端や C 末端のシーケンスイオンが混在しているので、帰属を誤る危険性がある。また、スペクトルの領域 (b) にはシーケンスイオンとして帰属されていないが比較的強いピークが数多く見られる。これらは、主鎖・側鎖の両方の分解に起因するイオンと考えられ、スペクトルの解析を複雑にしている。

FAB 法の開発により、ペプチドのスペクトルの「測定」は容易となったが、特に未知試料の場合、スペクトルの「解析」は容易でないことが多い。解析を困難とする原因は上に述べたこと以外に、以下の様な点がある。第一には、イオン分解は励起状態でのイオン反応を扱うので、計算で予測することが殆ど不可能である。第二に、ペプチドが長鎖になるに従って、20 種類のタンパク質アミノ酸から生成するアミノ酸配列の数が、天文学的な数になってしまうため、スペクトルの解析の任意性が増加する事がある。第三に、イオン分解の規則性が単純でないことと、膨大なアミノ酸配列のため、スペクトルを経験的に予測するための法則性を見出すことも容易でないことである。スペクトルの解析における困難を克服するには、より構造情報が豊富で解析が容易なスペクトルを測定すること、または複雑なスペクトルでも解析できる方法を考案することが考えられる。前者については本章で、後者については次章で検討した。

ペプチドのスペクトル解析の信頼性を向上させるためには、イオン分解機構についての基礎的な研究を積み重ねることが重要である。アミノ酸配列情報に富む

スペクトルを測定する方法を見出すための基礎的知見を得るため、ペプチドのイオン分解に関与している水素転移やプロトン移動反応の研究が必要である。本研究では、交換可能な水素（N末端のアミノ基、C末端のカルボキシル基、ペプチド結合のアミド基等に結合した水素）を、重水素で交換したペプチドのFAB-MS及び衝突誘起解離（Collision-induced dissociation、CID）スペクトルを測定し、イオン分解に伴う分子内水素転移反応を解析した。

2.2 実験

2.2.1 質量分析

FABスペクトルの測定には、日本電子（株）製JMS HX-100型及びHX-110/110A型二重収束質量分析計を用いた。HX-100型はEB/E（E:電場、B:磁場）の3セクタータンデム、HX-110/110A型はEB/EBタイプの4セクタータンデム質量分析計である。イオンの最大加速電圧と最大質量は、それぞれ5kVにおいて4,500Da（HX-100）及び10kVにおいて14,000Da（HX-110）である。質量分解能は、1,000から2,000となるよう主スリットとコレクタースリットの幅を設定した。質量分析計の制御及びスペクトルデータの取り込みは、日本電子（株）製JMA-DA5000（HX-100）またはJMA-DA7000（HX-110）を用いた。データ取り込みは、積算モードで行った。このモードでは、磁場を掃引する間、一定の時間ごとに検出器の信号レベルをRAMに取り込み、測定終了時にデータファイルを作成して磁気ディスク上に保管する。波形データとして取り込まれたスペクトルについて、データシステム上でピーク判定を行い、質量数-強度値の対で表されるバーグラフデータに変換した。

特定質量のプリカーサーイオンが、イオン源と第一電場との無場領域（第一無場領域）で分解して生成した娘イオンのスペクトル（CIDスペクトル）の測定には、HX-100型質量分析計の第一電場と磁場を用いたB/Eリンクドスキャン

（Linked Scan at Constant B/E、LSBE）法⁹⁾により行った。衝突励起を起こさせるため、第一無場領域に装着した衝突室にヘリウムガスを導入した。プリカーサーイオン（質量 M_p ）が一定質量 M_n の中性種を失って生成した娘イオン（質量 M_n ）のスペクトル（ニュートラルロススペクトル）では、 $(B/E)^2/(1-E')$ を一定とするようなスキャン（Constant Neutral Loss Scan、CNLS）⁹⁾を行った。ここで、 $E' = E/E^0 = (M_p - M_n)/M_p$ 、 E^0 はプリカーサーイオンを通過させる電場強度である。

2.2.2 試料調製

ペプチド試料、アンギオテンシン I（DRVYIHPFHL、MW 1,295.7、ANG1）、デスArg⁹ブラジキニン（RPPGFSPF、MW 903.5、D9BR）、ロイシルグリシルグリシン（MW 245.1、LGG）及びメチオニンエンケファリン（YGGFM、MW 573.2、MENK）は、（株）ペプチド研究所から購入したものをそのまま用いた。凍結乾燥したペプチド約1 μ gを、ステンレス試料台（1.5 \times 5mm）上で約2 μ lのグリセリン/水混合液（容積比1:10）に溶解し、日本電子（株）製アトムガンを用いて6kVに加速したキセノンの原子ビームを照射してFABイオン化を行った。マトリックスに、3-ニトロベンジルアルコール（NBA）⁷⁾を用いるときは、ペプチドを約1 μ lの水に溶解した後、約1 μ lのマトリックスを添加し混合した。ペプチドをアセチル化するには、試料台上に採取した乾燥ペプチド約1 μ gを、約2 μ lの無水酢酸に溶解し、常温で数分間反応した後、約0.2 μ lのグリセリンを加えてスペクトルの測定を行った。ペプチドのフェニルチオカルバミル（PTC）化は、トリフルオロ酢酸（TFA）でpHを8.5~9.0に調整した0.4M N,N-ジメチルアリルアミン溶液中、窒素気流下で40 $^{\circ}$ C、1時間フェニルイソチオシアネート（PITC、半井化学（株）製、5%ヘプタン溶液）とのカップリング反応を行った（図1-1参照）。ペプチドのアミノ基やカルボキシル基やペプチド結合のアミド窒素に結合した水素等は、水溶液中では速やかに交換反応を起こしている。これらの水素を重水素に置換して重水素化ペプチドのFABスペクトルを測定するときには、試料台上に採取した乾燥ペプチドを約2 μ lのD₂O（CEA社製）に溶解し、再び温風で蒸発乾固する操作を数回繰り返した後、約0.2 μ lのglycerol-(OD)₃（CEA社製、CH₂OD-CHOD-CH₂OD、D3GL）を混合して行った。

2.3 結果と考察

2.3.1 FAB及びFAB-CIDスペクトルのマトリックスによる変化

ペプチドのFABスペクトルにおけるマトリックスの効果について調べるため、広く用いられているマトリックスであるグリセリン（図2-2(a)）及びNBA（図2-2(b)）を用いて、ANG1のスペクトルを測定した。どちらも、 $[M+H]^+$ が明確に観測されたが、絶対強度は(a)の方が約2倍程度強かった。(a)中の m/z 277, 369, 461等（ $92n+1$ ）は、グリセリンのクラスターイオン（*印）である。 m/z 500以上には、 a_n や c_n （ $n=3\sim 9$ ）のN末端のシーケンスイオンが観測された。(b)のスペクトル

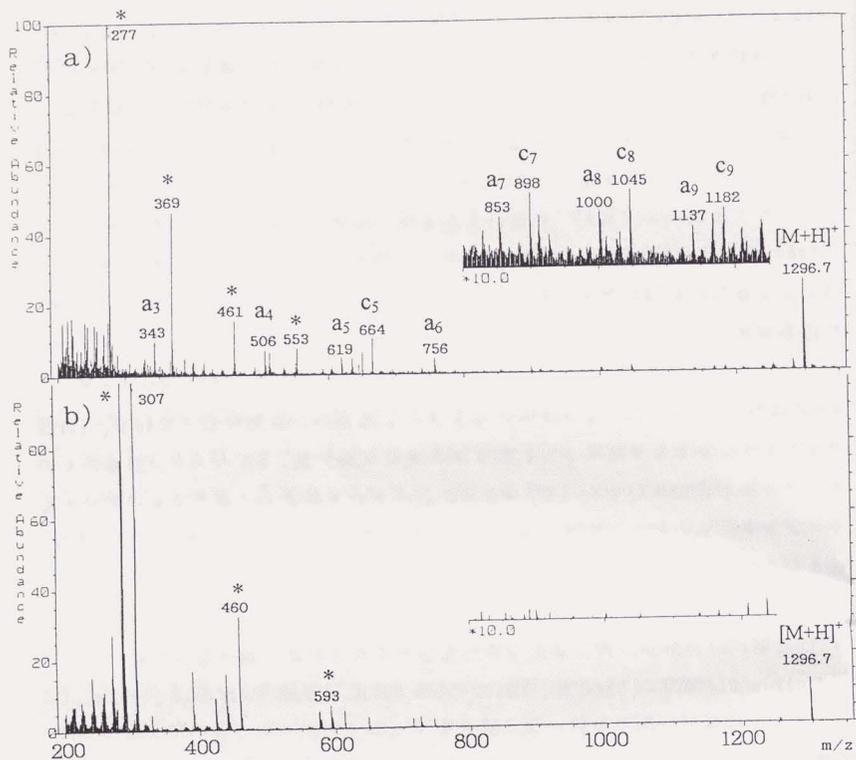


図2-2 アンギオテンシン I (DRVYIHPFHL, MW 1,295.7, ANGI) のFABスペクトル
マトリックス: a)グリセリン、b)3-ニトロベンジルアルコール

では、低分子領域にマトリックスのクラスターイオン ($153n+1$) やそれに関連したイオン (*印) が現れたが、ペプチドに由来するフラグメントイオンは、殆ど観測されなかった。ANGIのFABスペクトルでは、イオン化に用いるマトリックスの種類により、フラグメントイオンの生成割合に大きな差があり、グリセリンを用いたときNBAに比べて、アミノ酸配列解析を表すフラグメントイオンが強く観測されることが分かった。グリセリンをマトリックスに用いたとき、フラグメント生成が多かったことは、NBAを用いたときに比べて①イオン化時に $[M+H]^+$ に与えられた過剰の内部エネルギーが多かったか、または前節で述べたように、ペプチド結合の開裂はアミド窒素へのプロトン付加によって促進されると考えられることから、②アミド窒素へのプロトン付加が、その他の塩基性部位に比較して多かったことが考えられる。

上記2種類のマトリックスを用いた場合について、LSBE法によるANGIのFAB-CIDスペクトルを比較した。(図2-3) aやb- NH_3 タイプのイオンでは、マトリックスによる違いが見られなかったが、マトリックスにグリセリンを用いた時に強く観測された c_n ($n=3, 4, 5, 8, \star$ 印) は、NBAを用いた場合には全く見られなかった。図2-2のノーマルスキンスペクトルから、マトリックスにより生成する $[M+H]^+$ の構造やエネルギー状態に差があることが推定されたが、一般にCIDスペクトルでは、イオン化時に付与された、プリカーサーイオンの過剰の内部エネルギーによって、スペクトルは大きく変化しないと考えられている。 c_n イオンの生成にのみ大きな違いが見られたことから、マトリックスによる差は $[M+H]^+$ の過剰の内部エネルギーよりも、プロトン付加位置の分布の違いに起因することが推定された。気相の単分子状態のペプチドに付加したプロトンは、速やかな分子内移動を起こすと考えられるが、イオン化室から第一無場領域に移動するまでの少なくとも約1 μ 秒の間は、プロトン付加位置の分布は分子内移動によってランダム化されていないことが推測される。また、 c_n イオン以外のシーケンスイオンの相対強度に差が見られなかったことは、イオン化時のプロトン付加位置の違いが、ペプチド結合間の開裂の選択性には殆ど影響しなかったことを示している。重水素ラベル法による c_n イオン生成機構の研究⁸⁾ から、 c_n イオン生成時に分子内転移する水素は、N末端のアミノ基やC末端のカルボキシル基等の交換可能な水素に由来しないことが明らかにされた。これより、 c_n イオン生成時には、 α 位のメチレン水素等の引き抜き反

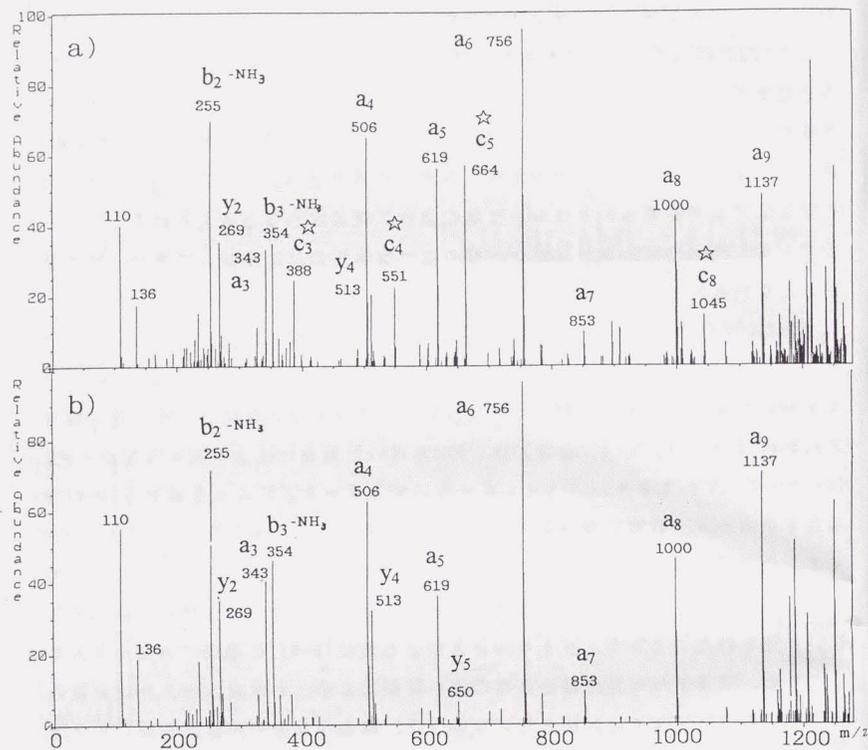


図2-3 アンギオテンシン I (DRVYIHPFHL, MW 1,295.7, ANGI) のプロトン化分子のFAB-CIDスペクトル
マトリックス: a)グリセリン、b)3-ニトロベンジルアルコール

応が起きていることが推定された。マトリックスとの相互作用の違いによるペプチドの立体的な配座の違いが、イオン分解時の α 位のメチレン水素の引き抜き反応の起こりやすさに影響を与え、CIDスペクトルでの c_n イオンの生成割合の差が生じたことも考えられる。

2.3.2 ペプチドの化学修飾によるFAB及びFAB-CIDスペクトルの変化

図2-4 (a, b) は、D9BRのNアセチル化によるFABスペクトルの変化を表している。ペプチドのN末端のアミノ基をアセチル化することにより、分子量は $-\text{CH}_2\text{CO}-$ に相当する42Da増加し、N末端のシーケンスイオン (a, b, c) もいずれも42Da増加した。しかし、図から見られるようにスペクトルの相対的模式は殆ど変化しないので、a), b)のスペクトルの比較から、N及びC末端のイオンを判別することができる。アセチル化反応は、試料プローブ上でペプチドを無水酢酸に溶解させ、常温で数分間反応させるだけでよいので、反応前後のスペクトルを測定することは容易である。また、重水素化無水酢酸 ($(\text{CD}_3\text{CO})_2\text{O}$) を等量混合して、アセチル基を含むピークを3Da離れたダブルレットとして測定することにより、1回の測定でN末端のイオンを判別する方法も提案されている⁹⁾。図2-5は、D9BRのNアセチル化によるFAB-CIDスペクトルの違いを表している。アセチル化により、N末端のシーケンスイオンはいずれも $-\text{CH}_2\text{CO}-$ に相当する42Da増加したが、a, c, yタイプのシーケンスイオンの相対強度には殆ど変化がなかった。アセチル化前後のCIDスペクトルを比較することにより、ペプチドの混合試料のスペクトルでも、N及びC末端のイオンを判別できることが利点である。カルボキシル基のメチル化反応も、C末端のシーケンスイオンをソフトさせ、同様の目的に利用することができる。

図2-6は、PTC化ANGIのFAB (a) 及びFAB-CIDスペクトル (b) である。FAB-CIDスペクトル (b) では $[\text{M}+\text{H}]^+- (\phi-\text{NH})+\text{H}$ (m/z 1339) や $[\text{M}+\text{H}]^+-\text{PTC}$ (m/z 1296) に相当する y_{10} が、著しく強く観測された。PTCグループ (135Da) を失うフラグメンテーションは、N末端のシーケンスイオンに共通して起こることを利用して、CNLS法により135Daの中性グループを失ったイオンのみのスペクトルを測定した。図2-4(c)は、PTC化D9BRのCNLSスペクトルである。図2-4(a, b)のFABやFAB-CIDスペクトルに比べ、N末端のシーケンスイオン ($a_n, b_n, c_n, n=1\sim 7$) のみが、極めて選択性よく測定された。ペプチドのPTC化反応は、微量で短時間に行えることか

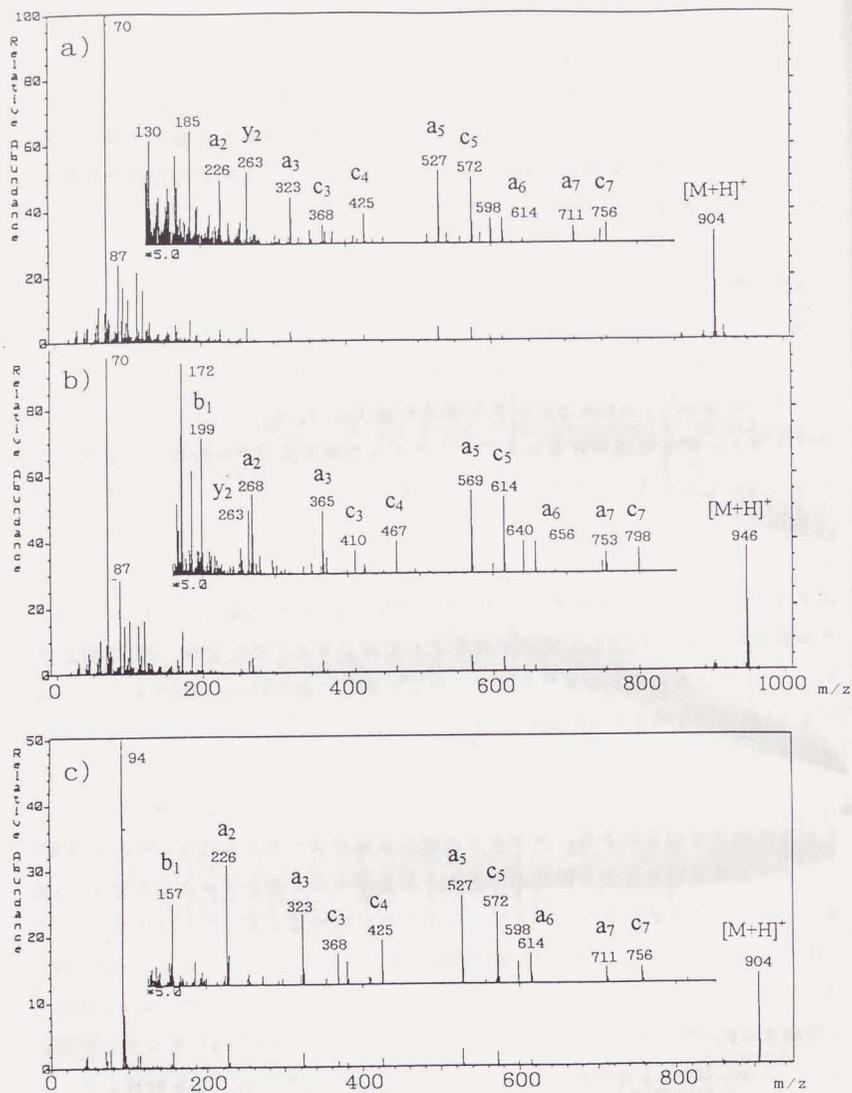


図2-4 a) デスArg⁹ブラジキニン (RPPGFSPF, MW 903.5, D9BR) 及び
 b) Nアセチル化D9BRのFABスペクトル
 c) フェニルチオカルバミル (PTC) 化D9BRのニュートラルロススペクトル
 共通の中性グループとしてPTC (135Da) を失ったイオンを選別し、
 N末端のシーケンスイオンを選択的に測定

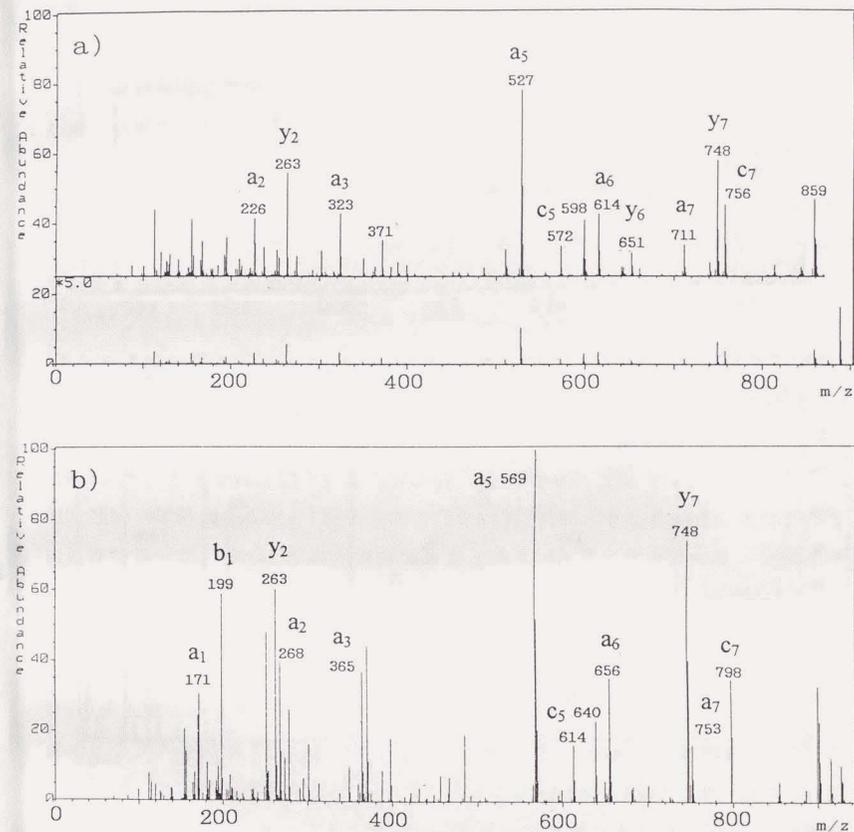


図2-5 a) デスArg⁹ブラジキニン (RPPGFSPF, MW 903.5, D9BR) 及びb) Nアセチル
 化D9BRのプロトン化分子のFAB-CIDスペクトル

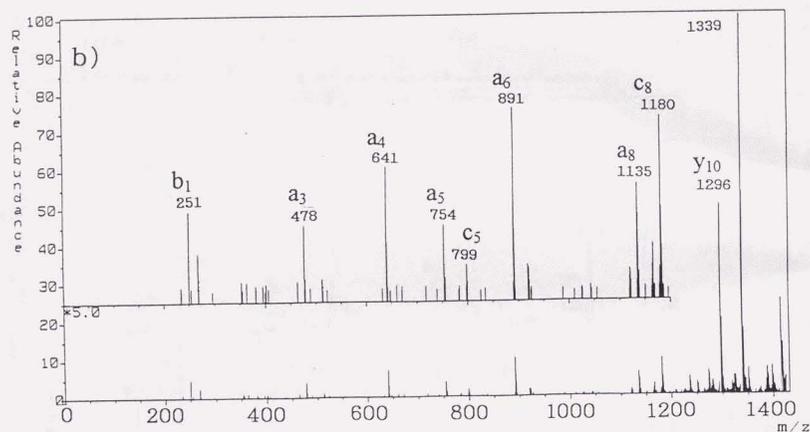
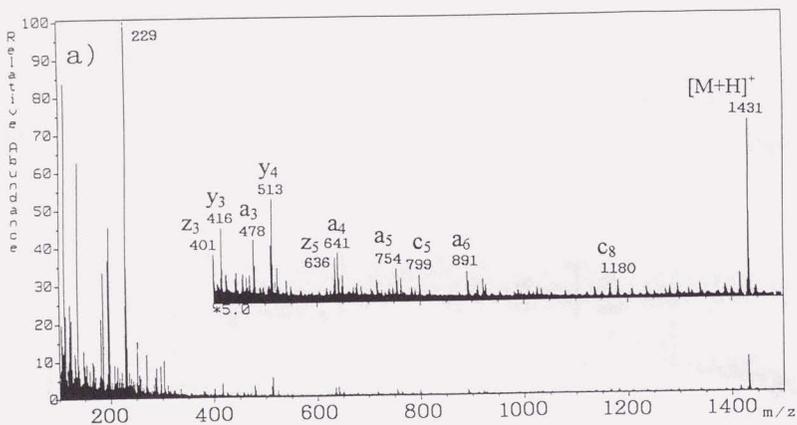


図2-6 フェニルチオカルバミル (PTC) 化アンギオテンシン I (DRVYIHPFHL, MW 1,295.7, ANGI) の (a) FAB及び (b) FAB-CIDスペクトル
 (b) m/z 1339: $[M+H]^+ - (C_6H_5-NH) + H$
 m/z 1296: $[M+H]^+ - PTC$ (y_{10})

ら、CNLS法との組み合わせにより、解析が容易なCIDスペクトルの測定に有用である。但し、この場合でも a_n 、 b_n 、 c_n 等のシーケンスイオン間の相対強度は単純でなく、一義的な帰属が可能であるとは限らない。

2.3.3 重水素ラベル法による y イオン生成における水素転移反応の解析

ペプチド結合で分解してできるC末端のシーケンスイオンである y タイプのイオンは、単純な結合開裂で予想される質量よりも2Da多いことが知られている⁵⁾。それが、プロトン付加と分子内水素転移によることは明らかだったが、どの位置の水素が転移するかについては、直接調べられたことはなかった。Biemannらのスキーム^{5a)}では、 α 位の水素の引き抜きが仮定されたが、重水素化マトリックスD3GLを用いて置換可能なHをDで交換することにより、 α 位等の重水素交換されない水素が転移するかどうかを検証した。

y タイプのイオンの測定は、FAB及びLSBE法によるFAB-CIDスペクトルを測定した。3量体の合成ペプチドLGG (MW 245.1) は、N末端のアミノ基に2個、C末端のカルボキシル基に1個、ペプチド結合のアミド基に2個と、合計5個の置換可能な水素がある。図2-7から分かるように、マトリックスにグリセリン及びD3GLを用いて測定したFABスペクトルでは、 $[M+H]^+$ または $[M+D]^+$ は (MW+1、図2-7(a)) 及び (MW+7、図2-7(b)) に観測された。LGGの交換可能な水素5個が、全て重水素に置換されたことがわかった。 $[M+D]^+$ の同位体分布から見積もった重水素置換率は、約90%だった。 y_2 に相当するイオン ($H_2N^+-CH_2-CONH-CH_2-COOH$, m/z 133) は、D3GLを用いた場合のLGGのFAB及び $[M+D]^+$ のFAB-CIDスペクトル共に5Da増加し m/z 138だった。図2-8に示すように、転移した水素はHではなくDだったことが確認され、交換不能な α 位の水素の引き抜き反応は関与していないことが分かった。同様のことは、5量体のペプチドMENK (YGGFM, MW 573.2) のFAB (図2-9) 及びFAB-CIDスペクトル (図2-10) でも確認された。このペプチドでは、 y_2 (m/z 297)、 y_3 (m/z 354) 及び y_4 (m/z 411) に相当するイオンがD3GLを用いた場合それぞれ5, 6, 7Da増加し、転移した水素が重水素であることが確認された (図2-11)。同様の結果は、3量体のペプチド (Phe-Phe-Phe, MW 459.2) をD3GLを用いてイオン化した研究¹⁰⁾でも報告された。

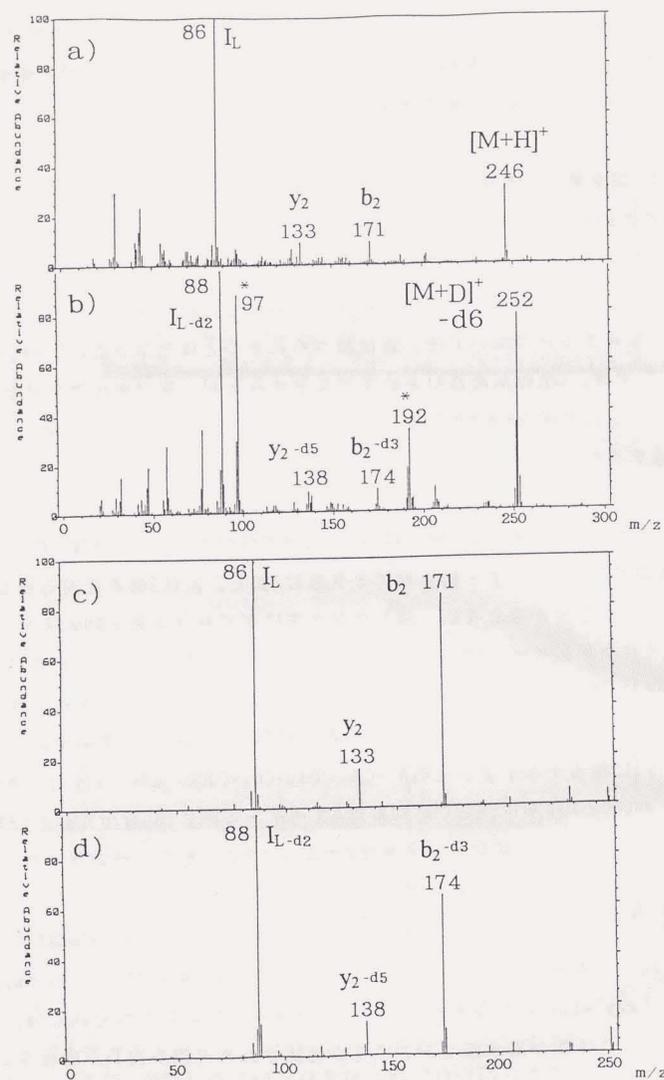
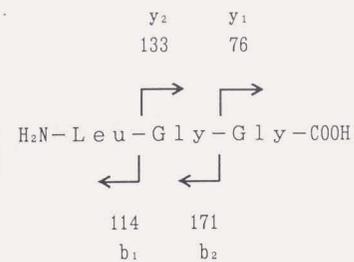


図2-7 ロイシルグリシルグリシン (Leu-Gly-Gly, MW 245.1, LGG) の(a)FAB及び(b)[M+H]⁺のFAB-CIDスペクトル、及び重水素化LGGの(c)FAB及び(d)[M+D]⁺のFAB-CIDスペクトル



a) LGG

b) LGG-d6

m/z	assignment	m/z	assignment
86	I _L NH ₂ ⁺ =CH-C ₄ H ₉	88	I _L -d2 ND ₂ ⁺ =CH-C ₄ H ₉
133	y ₂ H ₃ N ⁺ -CH ₂ -CONH-CH ₂ -COOH	138	y ₂ -d5 D ₃ N ⁺ -CH ₂ -COND-CH ₂ -COOD
171	b ₂ H ₂ N-CH(C ₄ H ₉)-CONH-CH ₂ -CO ⁺	174	b ₂ -d3 D ₂ N-CH(C ₄ H ₉)-COND-CH ₂ -CO ⁺

図2-8 重水素化ロイシルグリシルグリシンのFAB-CIDスペクトルの帰属

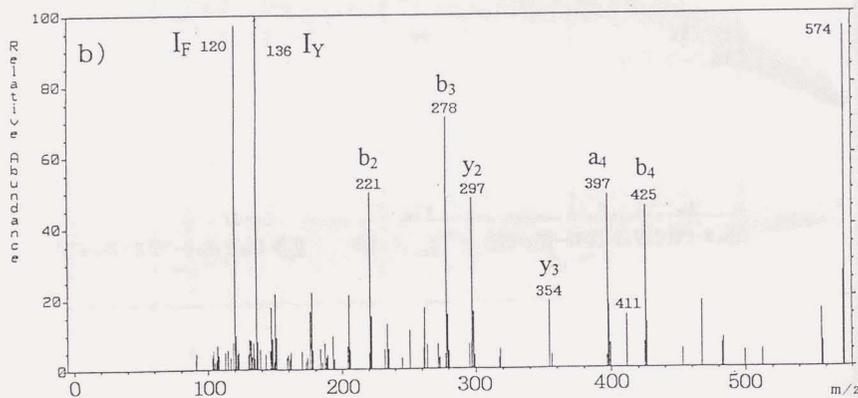
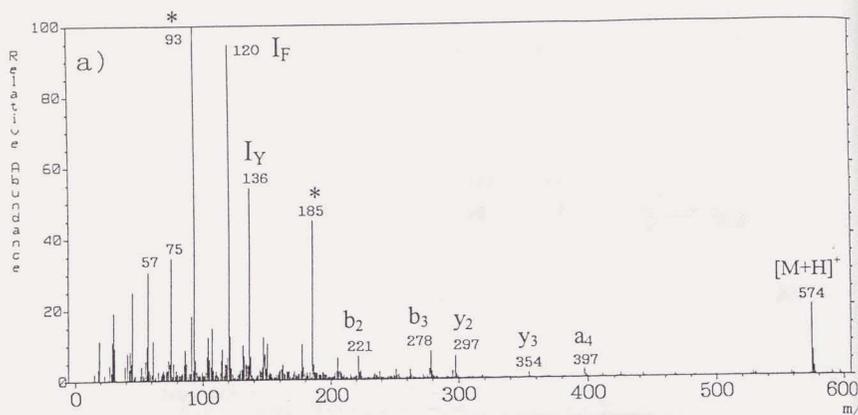


図2-9 メチオニンエンケファリン (YGGFM, MW 573.2, MENK) (a)FAB
及び(b)[M+H]⁺のFAB-CIDスペクトル

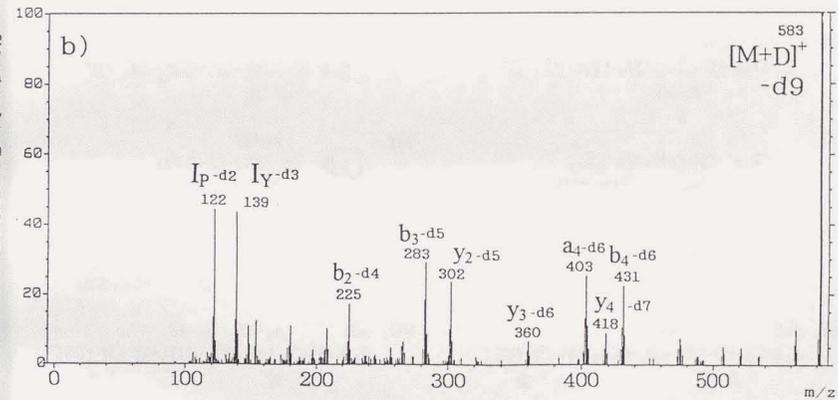
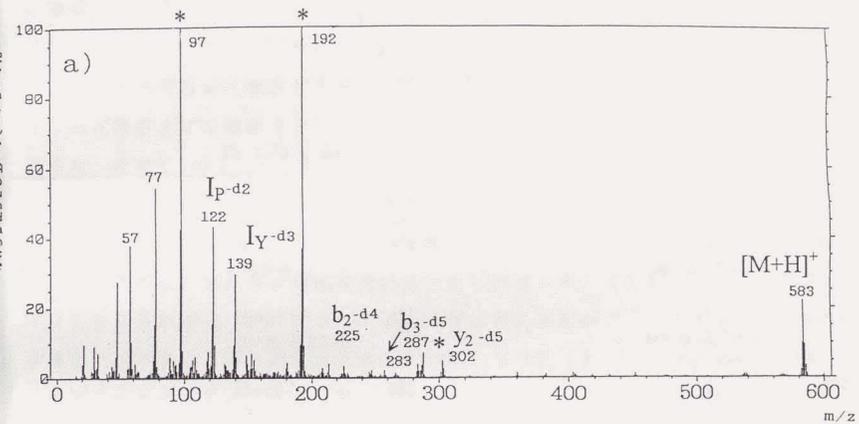


図2-10 重水素化メチオニンエンケファリンの(a)FAB及び(b)[M+D]⁺の
FAB-CIDスペクトル

文献

1. 未発表データ
2. M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325 (1981).
3. A. Benninghoven and W. K. Sichterman, *Org. Mass Spectrom.*, **12**, 595 (1977).
4. M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, B. N. Green, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 936 (1982).
5. a) K. Biemann and S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 1 (1987).
b) K. Tomer, *Mass Spectrom. Rev.*, **8**, 445 (1989).
6. K. R. Jennings and R. S. Mason, In "Tandem Mass Spectrometry", F. W. McLafferty Ed., Wiley, New York, 197 (1983).
7. J. Meili and J. Seibl, *Org. Mass Spectrom.*, **19**, 581 (1984).
8. W. D. van Dongen, C. G. de Koster, W. Heerma and J. Haverkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 241 (1993).
9. H. R. Morris, M. Panico, M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 623 (1981).
10. D. R. Mueller, M. Eckersley and W. J. Richter, *Org. Mass Spectrom.*, **23**, 217 (1988).

第3章 高速原子衝撃 (FAB) 質量分析法によるペプチドのアミノ酸配列推定¹⁾

3.1 緒言

3.1.1 従来の研究と問題点

Barberら²⁾により高速原子衝撃 (Fast atom bombardment, FAB) 法が開発される以前は、無修飾ペプチドの測定には、フィールドデソープション (Field desorption, FD) 法³⁾が用いられた。下西ら⁴⁾は、手動のEdman分解によりN末端からアミノ酸を順次切断する毎に、切り取られたアミノ酸と切れ残りのペプチド断片をFD-MSにより同定するアミノ酸配列解析法を開発した。この方法は、プロトン化分子 ($[M+H]^+$) から求められるペプチドの分子量変化を利用するので、スペクトルの解釈に曖昧さが入りにくく、殆どの場合に唯一のアミノ酸配列を導くことができる。また、スペクトルをコンピュータで解析することより⁵⁾、タンパク質の酵素消化物のような複雑な混合物でも直接解析できることが、プロテインシーケンサと比較して有利な点である。一方、Edman分解を用いるため、N末端がブロックされたタンパク質には適用できない等プロテインシーケンサと共通の欠点があった。試料量や反応時間を要する溶液中での化学反応でペプチド鎖を切断する代わりに、質量分析計の中で起こるイオン分解を利用してペプチドのアミノ酸配列を推定できれば、質量分析の高感度と迅速性を十分に発揮できる可能性がある。そこで、FD法により生成したペプチドの $[M+H]^+$ の衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) スペクトルからアミノ酸配列を推定する解析プログラムが開発された⁶⁾。この方法では、 $[M+H]^+$ から求められた分子量値を満たす全てのアミノ酸組成について、それらから発生させた全てのアミノ酸配列とスペクトルとの整合性を数値化し、可能性の高い候補配列を列挙することができる。しかし、ペプチドの分子量の増加に伴って、FD法によるイオン化が困難になると共に、分子量値を満たすペプチドの全アミノ酸配列の数が天文学的単位にまで増加するため、適用できるペプチドの分子量は800程度に限定された。

3.1.2 本研究の目的

FAB法の出現により、測定可能な分子量が一挙に10倍近く拡大し、分子量数千の無修飾ペプチドのスペクトルが、得られるようになった⁷⁾。また、第2章で検討したように、ペプチドのFABスペクトルには、アミノ酸配列を反映したフラグメントイオン(シーケンスイオン)が観測されることがわかった⁸⁻⁹⁾。しかし、既知ペプチドのFABスペクトルの検討¹⁰⁾から、スペクトルのみから唯一の配列を導くことは困難な場合が多いこと、また、アミノ酸配列全体に関する情報が得られるとは限らず、部分的な配列の推定に止まる場合があることがわかった。

本研究では、全てのアミノ酸配列を検索することなく長鎖ペプチドのFABスペクトルを迅速に自動解析し、アミノ酸配列を推定する方法の開発を目的とした。特に、スペクトルのみから唯一の配列を導くことが困難な場合や部分的な配列情報しか得られない場合にも、FABスペクトルに含まれるアミノ酸配列の情報を最大限に抽出することを目標に、候補となるアミノ酸配列の検索方法やそれらを序列化するための確からしさを指標の算出方法を最適化した。また、本法を既知ペプチドのスペクトルの解析に適用し、得られた結果からペプチドのアミノ酸配列解析における有用性を評価した。

3.2 実験

FABスペクトルの測定は、日本電子(株)製JMS HX-100型二重収束質量分析計及び同社製JMA-DA5000データシステムを用いた。質量分解能は、2,000(10%谷)でイオンの加速電圧は5kVとした。スペクトルの測定は、積算モードで行った。このモードでは、磁場をスキャンする間のイオン信号を、一定の時間間隔でA/D変換し、メモリー上で積算した。m/z 100から1,800まで、30回のスキャンを繰り返し、32,000点から構成されたプロファイルデータを得た。測定後、閾値(通常ベースピークの0.1%)やピーク間の谷の判定条件(30~50%)を設けてピーク判定を行い、質量数-強度値の対からなるバーグラフデータに変換した。質量数は、水素による過剰質量としてm/z 1,000当たり0.5を差し引き、小数点以下を四捨五入して整数化した。スペクトルデータは、モデムを介して富士通 M-380型コンピュータシステムに転送した。アミノ酸配列の解析プログラム(Computer-aided Peptide Sequencing, CAPS)は、FORTRAN77でコードした。

ペプチド約1 μ gをステンレスの試料台上で2 μ lの10%グリセリン水溶液に溶解した。正イオンモードの測定では、約1 μ lの1N HClを加えた。試料は、6kVのキセノン中性原子を照射した。ペプチド試料は、(株)ペプチド研究所から購入したものをそのまま用いた。本文中で用いたペプチドの略号は、以下の通りである。ロイシンエンケファリン(leu-enkephalin, LENK)及びメチオニンエンケファリン(met-enkephalin, MENK)、エレドイシンリレイテッドペプチド(eledoisin-related peptide, ELRP)、CCKオクタペプチド(CCK-octapeptide, CCKO)、ブラジキニン(bradykinin, BRAD)、アンギオテンシンI及びII(angiotensin I及びII, ANGI, ANGI)、サブスタンスP(substance P, SUBP)、 α メイトイングファクター(α -mating factor, AMAT)、ダイノルフィン1-13(dynorphin (1-13), DYNR)。

3.3 アミノ酸配列推定法の概要

3.3.1 アミノ酸配列推定法のアルゴリズム

本法では、候補となるアミノ酸配列は、スペクトルとの整合性を調べながら、短いペプチド鎖を逐次的に延長する事により組み立てた。最終的なアミノ酸配列を得るまでのアルゴリズムを図3-1に示した。アミノ酸配列を延長する過程では、配列は"部分配列"として、最終的なペプチドの配列に対応する"候補配列"と区別した。アミノ酸の略号は主に1文字の省略形を用いたが、LとI、KとQは整数分子量が同じで区別できないため、それぞれ"L"と"K"で代表させた。従って、ここでは20種類のタンパク質アミノ酸のうち、18種類が区別されることになる。

はじめに、3個のアミノ酸の並べ替えによる全ての配列を発生させる。例えば、'GGG'、'GGA'、'GGS'、…、'WWY'、'WWW'のような具合である。18 \times 18 \times 18 (=5,832)種類の部分配列について、その分子量MW_sと候補配列の一部に含まれる確からしさを指標である"スコア"を計算する。部分配列や候補配列に対するスコアの算出の仕方については、次節で述べる。スコアによって序列化された部分配列は、上位から一定の数(通常100個)だけが選択され、それ以下は切り捨てられる。同時にMW_sは、FABスペクトルの[M+H]⁺から求められるペプチドの整数分子量MW_pと比較される。MW_sがMW_pより小さい場合には、その配列は更にアミノ酸を延長して次の世代の部分配列を生成するために保存する。MW_sがMW_pと一致した場合に

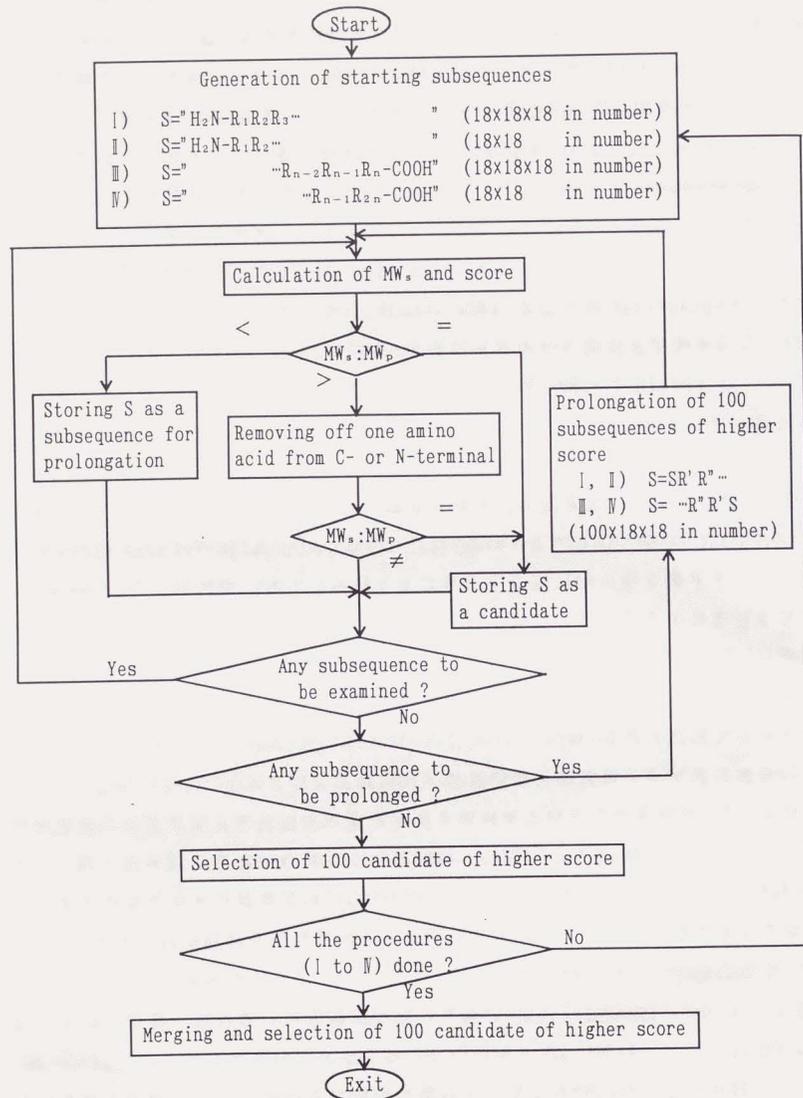


図3-1 アミノ酸配列推定プログラムCAPSのアルゴリズム

は、候補配列として保存する。MW_sがMW_pより大きい場合には、C末端のアミノ酸を1個削除して再びMW_sとMW_pを比較する。

発生した全ての部分配列について上記の作業を終えたとき、次世代の部分配列として保存された配列の数を調べる。その数がゼロでなければ、それらの部分配列に対して、以下のようにしてそのC末端側にアミノ酸を2個ずつ延長する。例えば、部分配列が'RDV'であれば、'RDVGG'、'RDVGA'、'RDVGS'、...、'RDVWW'等のような18×18 (=324) 個の次世代の部分配列が生成される。元の部分配列 (例えば100個) 各々について324種類の延長された配列 (合計32,400個) を生成しそれらのスコアとMW_sを計算し、さらに次世代の部分配列の元となる配列を選別する。全ての部分配列のMW_sがMW_pより大きくなってしまふまでのプロセスを繰り返す。結果として、スコアの順に並べられたペプチドの候補配列が得られる。

以上の作業を、以下の合計4通りの初期条件で繰り返す。すなわち、アミノ酸配列をN末端側から組み立てる場合及びC末端側から組み立てる場合のそれぞれについてアミノ酸の数を3個から始める場合及び2個から始める場合の組み合わせである。(図3-1のI~IV) これらの条件で得られた候補配列はスコアに従って序列化され、最終的な結果となる。

3.3.2 スコアの計算

ある部分配列について、予想されるシーケンスイオンの質量数 m_j^* が図3-2のフラグメントスキーム^{9, 11)}によって計算される。(シーケンスイオンの略号は、巻頭の図を参照) 開裂に関与するペプチド結合のアミド窒素側がプロリンの場合((a)及び(c))とそれ以外のアミノ酸の場合((b)及び(d))、また、測定モードが正イオンの場合((a)及び(b))と負イオンの場合((c)及び(d))では、用いられるシーケンスイオンの種類や質量数が異なる。(b)の c_i 、 y_i 、 z_i 等のシーケンスイオンに示した"+2H"は、プロトン付加と分子内水素転移により水素2個分の質量が上乘せされることを意味する¹²⁾。スコアは、これらの質量数に現れたピーク強度の平均として求められる。

$$S = \sum_{j=1}^N I(m_j^*) / N \quad (N: \text{部分配列から予想されるシーケンスイオンの数}) \quad \dots(1)$$

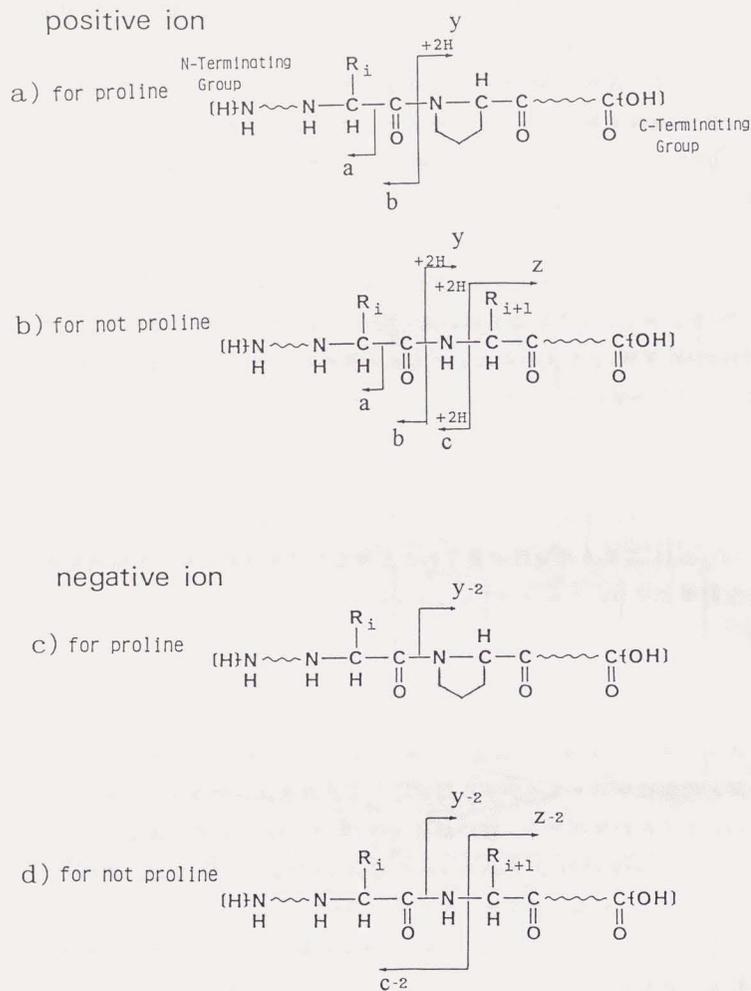


図3-2 ペプチドのFABスペクトルで観測される主なシーケンスイオン
 ペプチド結合のアミド窒素側がプロリンの場合 ((a)及び(c)) と
 それ以外のアミノ酸の場合 ((b)及び(d))、測定モードが正イオン
 の場合 ((a)及び(b)) と負イオンの場合 ((c)及び(d))。イオンの
 略号は、巻頭の図・ペプチドのシーケンスイオンの構造と略号を参照

ここで、N末端から組み立て始められた部分配列 ' $R_1R_2\cdots R_i\cdots R_k$ ' について考
 える。 R_i はN末端から数えて*i*番目のアミノ酸を表す。 R_i と R_{i+1} の間の開裂によっ
 て生成するN末端のシーケンスイオンは、正イオンの場合主に a_i 、 b_i 、 c_i であり、そ
 れらのイオンの質量数は、

$$m^s(a_i) = \sum_{j=1}^i M_j - 27 \quad \cdots (2)$$

$$m^s(b_i) = \sum_{j=1}^i M_j + 1 \quad \cdots (3)$$

$$m^s(c_i) = \sum_{j=1}^i M_j + 18 \quad \cdots (4)$$

で与えられる。 M_j は、アミノ酸 R_i の残基質量数(整数値)である。(タンパク質
 アミノ酸の略号と構造、残基質量数等については、巻頭の表を参照されたい。) 部
 分配列がアミノ酸を延長されてできる候補配列の分子量は、最終的に MW_P となる
 ことを仮定して、 R_i と R_{i+1} の間の開裂によって生成する、C末端のシーケンスイ
 オンの質量数は、

$$m^s(y_{n-i}) = MW_P - m^s(b_i) + 2 \\ = MW_P - \sum_{j=1}^i M_j + 1 \quad \cdots (5)$$

$$m^s(z_{n-i}) = MW_P - m^s(c_i) + 4 \\ = MW_P - \sum_{j=1}^i M_j - 14 \quad \cdots (6)$$

で与えられる。図3-3は、実際の測定スペクトルを例に、N、C両末端のシーケンス
 イオンの帰属を示した。部分配列をC末端から組み立て始めるときも、同様にN、
 C両末端のシーケンスイオンの質量数を計算する。(図3-4) 負イオンモードでス
 ペクトルを測定したときは、N末端のシーケンスイオンは $m^s(c_i) - 2$ 、C末端のシー
 ケンスイオンは $m^s(y_{n-i}) - 2$ と $m^s(z_{n-i}) - 2$ を用いた。(図3-2(c)、(d)参照)

3.3.3 スペクトルデータの変換

スコアは、シーケンスイオンの質量数に現れたピーク強度の平均として求めら
 れる(式(1))が、スコアの値が配列の確からしさを適正に評価できる様に、測定
 スペクトルの強度値に対して、以下の補正がなされる。この際には、FABスペクト

ルの次のような性質を考慮した。第一に、ペプチドの分子量以下の各質量数には、バックグラウンドイオンが現れるので、スコアに考慮されるシーケンスイオン強度からこのバックグラウンドによる強度のレベルを差し引く必要がある。質量数 m におけるバックグラウンドイオンとシーケンスイオンを区別する閾値 $I^{TH}(m)$ は

$$I^{TH}(m) = [(m^+ - m)I(m^-) + (m - m^-)I(m^+)] / (m^+ - m^-) \quad \dots(7)$$

で与えられる。ここで m^- 、 m^+ は、それぞれ $m-25$ から m 及び m から $m+25$ の範囲で最小のピーク強度を示す質量数を表す。さらに、閾値 I^{TH} は前後 25Da の範囲で平均化し、質量数 m での強度値 $I(m)$ から差し引いた。

$$I'(m) = I(m) - \sum_{i=m-25}^{m+25} I^{TH}(i) / 51 \quad \dots(8)$$

第二に、安定同位体による寄与を 20 種類のタンパク質アミノ酸の平均的な値を用いて近似的に補正した。 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S の各元素の存在比から、質量数 m のイオンの $m+1$ 及び $m+2$ の同位体イオンの強度は、以下の式で近似した。

$$I^{18O}(m+1) / I'(m) \doteq 5.5 \times 10^{-4} \times m \quad \dots(9)$$

$$I^{18O}(m+2) / I'(m) \doteq 6.3 \times 10^{-5} \times m + 1.5 \times 10^{-7} \times m^2 \quad \dots(10)$$

ここで $I'(m)$ は、式(8)で求めた質量数 m におけるピーク強度である。式(9)は、主に ^{13}C に由来する。式(10)の第一項は ^{18}O と ^{34}S に由来し、第二項は ^{13}C と ^{15}N を 1 原子ずつ含むイオンと ^{13}C を 2 原子含むイオンに由来する。式(9)、(10)から導かれる以下の式を質量数の低い側から高い側へ順次適用した。

$$I''(m) = I'(m) \times (1 + 6.1 \times 10^{-4} \times m + 1.5 \times 10^{-7} \times m^2) \quad \dots(11)$$

$$I''(m+1) = I'(m+1) - I'(m) \times 5.5 \times 10^{-4} \times m \quad \dots(12)$$

$$I''(m+2) = I'(m+2) - I'(m) \times (6.3 \times 10^{-5} \times m + 1.5 \times 10^{-7} \times m^2) \quad \dots(13)$$

強度値が負の値となる場合は、ゼロで置き換えた。

最後に、ピーク強度に質量数による重み付けを行った。

$$I'''(m) = k \times I''(m) \times m \quad \dots(14)$$

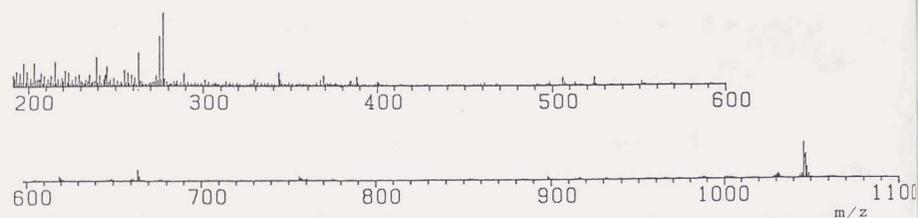
ここで k は、最大のピーク強度値を 10,000 に規格化するための定数である。

これらの補正を加えたスペクトルの例を図 3-5 に示す。スペクトルの内質量数 200 以下の領域は、マトリックス由来のバックグラウンドイオンが強いのでスコアの計算には用いなかった。質量数 200 以上のピークのうち m/z 239, 275, 277, 367, 369 (*印) は、マトリックスのグリセリンに由来するピークとして無視した。

3.4 既知ペプチドの FAB スペクトルの解析結果

本法の有用性や問題点を明らかにするため、市販の 5 から 13 量体の合成ペプチドの正イオン FAB スペクトルについて、アミノ酸組成を既知または未知の条件でアミノ酸配列推定を行った。解析結果は、スコアによって序列化された一連 (通常 10 から 20 個程度) の候補配列として得られる。表 3-1 では、解析結果の良否を簡便に評価するため、正しい配列が候補配列に現れた順位を示した。アミノ酸組成が既知の条件 (A) では、全てのペプチドで正しいアミノ酸配列が、候補の第 1 位に得られた。アミノ酸組成が未知の条件 (B) でも、殆どのペプチドで、正しいアミノ酸配列が候補の上位に得られた。一方、SUBP、AMAT 等の様に、正しい配列が候補配列の中に含まれていなかった場合も、必ずしも推定が完全な失敗であったとは限らない。表 3-2 に、ANGI、CCKO、SUBP、BAM-12P、DYNR、AMAT について、上位 10 個の候補配列を示した。ANGI (a) の場合は、最上位は正しい配列だが、つづく 2 配列は同じアミノ酸組成で順序が一部異なっている。表中の全ての配列の C 末端側は 'YLHPP' の配列が共通している。これは、ANGI の FAB スペクトルに、 m/z 343, 388, 506, 551, 619, 664, 756, 898 等の N 末端イオンが強く観測されているためである。BAM-12P (e) の場合、正しい配列 ('YGGFMRRVGRPE') は第 5 位に現れている。この例では、上位の候補の多くは ' X_1X_2 GFX $_3$ X $_4$ RVGRPE' で表され、正しい配列では 'YG' である ' X_1X_2 ' の部分が 'GY' に変わったり、'MR' となるべき ' X_3X_4 ' が 'TW' や 'WT' に置き換えられていることが分かる。

a) Observed spectrum



b) Modified spectrum

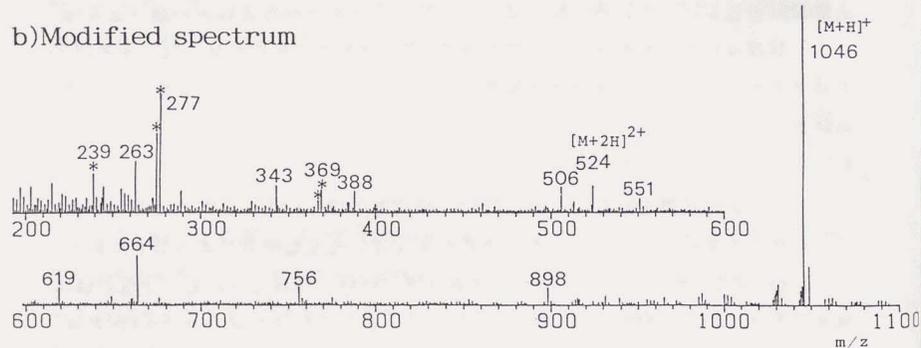


図3-5 アンギオテンシン II (DRVYIHPF、MW 1,045.5、ANGII) の(a)FABスペクトル及び(b)3.3.3のスペクトルデータ変換法に従って、バックグラウンドイオンや安定同位体による寄与を補正し、質量数による重み付けを行ったスペクトル

表3-1 CAPSによる生理活性ペプチド(既知試料)のアミノ酸配列推定結果

Peptide	Sequence ^{a)}	Molecular weight	Order ^{b)}		
			(A)	(B)	(C)
leucine-enkephalin	YGGFL	555	1	2	2
methionine-enkephalin	YGGFM	573	1	2	2
eledoisin-related peptide	KFLGLM-NH ₂	706	1	1	1
angiotensin III (human)	RVYLHPF	930	1	1	1
angiotensin II (human)	DRVYLHPF	1045	1	1	1
des-Arg ⁹ -bradykinin	RPPGFSPF	903	1	1	1
CCK-octapeptide	DYMGWMDF-NH ₂	1062	1	69	-
bradykinin	RPPGFSPFR	1059	1	1	1
[Tyr ⁹]-bradykinin	RPPGFSPYR	1075	1	1	1
angiotensin I (human)	DRVYLHPFHL	1295	1	1	1
[Val ⁵]-angiotensin I	DRVYVHPFHL	1281	1	1	1
[Asn ¹ ,Val ⁵]-angiotensin I	NRVYVHPFHL	1280	1	1	3
[Val ⁵ ,Asn ⁹]-angiotensin I	DRVYVHPFNL	1258	1	1	1
[Asn ¹ ,Val ⁵ ,Asn ⁹]-angiotensin I	NRVYVHPFNL	1257	1	1	15
[Val ⁵ ,Ser ⁹]-angiotensin I	DRVYVHPFSL	1231	1	1	2
lysyl-bradykinin	KRPPGFSPFR	1187	1	1	1
tyrosyl-bradykinin	YRPPGFSPFR	1222	1	1	1
methionyl-lysyl-bradykinin	MKRPPGFSPFR	1318	1	11	11
substance P	RPKPKFFGLM-NH ₂	1346	1	-	-
BAM-12P	YGGFMRRVGRPE	1423	1	5	5
dynorphin (1-13)	YGGFLRRLRPKPK	1602	1	4	-
α -mating factor	WHWLKLRPGKPMY	1682	1	-	-

^{a)} See "Table of abbreviations of protein amino acids" in the beginning of this book. The pairs of amino acids L and I, and K and Q are put in the same class and denoted as 'L' and 'K', respectively.

^{b)} The rank at which the correct sequence is found in the candidates obtained (A) with prior knowledge of amino acid composition, (B) without prior knowledge of them but with a given identity of the C-terminal functional group (-COOH or -CONH₂) and (C) without prior knowledge of both amino acid composition and an identity of the C-terminal functional group.

表3-2 既知ペプチドのFABスペクトルの解析により得られたアミノ酸配列

a) angiotensin II
DRVYLHPF

Order	Sequence ¹⁾	Score
1	<u>DRVYLHPF</u> ²⁾	2478
2	<u>DVRYLHPF</u>	2445
3	<u>RDVYLHPF</u>	2398
4	<u>TLRYLHPF</u>	2391
5	<u>LTRYLHPF</u>	2388
6	<u>KKNYLHPF</u>	2375
7	<u>VDRYLHPF</u>	2374
8	<u>SPWYLHPF</u>	2365
9	<u>DVGYYLHPF</u>	2357
10	<u>SSPVYLHPF</u>	2352

b) CCK-octapeptide
DYMGMDF-NH₂

Order	Sequence	Score
1	<u>DYNPYHAGK</u> -NH ₂	981
2	<u>DYNPYHANA</u> -NH ₂	979
3	<u>DYNPYHAAN</u> -NH ₂	978
4	<u>DYNPYHAGK</u> -NH ₂	976
5	<u>DYNYPHAGK</u> -NH ₂	975
6	<u>FMNYPHAGK</u> -NH ₂	974
7	<u>DYNYPHANA</u> -NH ₂	973
8	<u>FMNYPHANA</u> -NH ₂	972
9	<u>DYNYPHAAN</u> -NH ₂	971
10	<u>FMNYPHAAN</u> -NH ₂	970

e) BAM-12P
YGGFMRRVGRPE

Order	Sequence ^{a)}	Score
1	<u>YGGFTWRVGRPE</u>	2582
1	<u>YGGFWTRVGRPE</u>	2580
3	<u>GYGFTWRVGRPE</u>	2569
3	<u>GYGFWTRVGRPE</u>	2567
5	<u>YGGFMRRVGRPE</u> ^{b)}	2560
5	<u>YNFTWRVGRPE</u>	2549
5	<u>YNFTWRVGRPE</u>	2547
8	<u>GYGFMRRVGRPE</u>	2547
9	<u>YGFGTWRVGRPE</u>	2527
9	<u>YFMRRVGRPE</u>	2525

f) dynorphin (1-13)
YGGFLRRRLPKLK

Order	Sequence ^{a)}	Score
1	<u>YGCNWLREPPKLLK</u>	2151
2	<u>YGGFAKLREPPKLLK</u>	2124
3	<u>YGCNWLRLPKLK</u>	2115
4	<u>YGGFLRRRLPKLK</u> ^{b)}	2111
4	<u>YGGSRCLREPPKLLK</u>	2111
6	<u>YGCNWLREPPKLLK</u>	2109
7	<u>YGCNWLREPPKLLK</u>	2107
8	<u>YGGFSPKREPPKLLK</u>	2106
8	<u>YGGFSPKREPPKLLK</u>	2105
10	<u>YGCNWLRRHWKLLK</u>	2105

c) substance P
RPKPKKFFGLM-NH₂

Order	Sequence ¹⁾	Score
1	<u>RPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1491
2	<u>GVPKPKKFFVWY</u> -NH ₂	1466
3	<u>RPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1462
4	<u>GVPKPKKFFVWY</u> -NH ₂	1445
5	<u>GVPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1443
6	<u>VGPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1425
7	<u>RPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1420
8	<u>GPVKPKKFFWD</u> -NH ₂	1418
9	<u>GVPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1417
10	<u>RPKPKKFFWD</u> -NH ₂	1412

d) substance P³⁾
RPKPKKFFGLM-NH₂

Order	Sequence ¹⁾	Score
1	<u>RPKPKKFFGLM</u> -NH ₂ ²⁾	2334
2	<u>GVPKPKKFFGLM</u> -NH ₂	2319
3	<u>RPKPKKFFWD</u> -NH ₂	2300
4	<u>RPKPKKFFPG</u> -NH ₂	2288
5	<u>GVPKPKKFFWD</u> -NH ₂	2284
6	<u>RPKPKKFFMM</u> -NH ₂	2262
7	<u>RPKPKKFFGLM</u> -NH ₂	2257
8	<u>RPKPKKFFMM</u> -NH ₂	2257
9	<u>RPKPKKFFGLM</u> -NH ₂	2251
10	<u>GVPKPKKFFMM</u> -NH ₂	2248

g) α-mating factor
WHWLKLPKPKPMY

Order	Sequence ^{a)}	Score
1	<u>SHVWLKLPKPKPMY</u>	719
1	<u>HSVWLKLPKPKPMY</u>	719
3	<u>SHVWLKLPGLWGY</u>	715
3	<u>HSVWLKLPGLWGY</u>	715
5	<u>SHVWLKLPKPKPMY</u>	710
5	<u>HSVWLKLPKPKPMY</u>	710
7	<u>SHVWLKLPGLCRF</u>	706
7	<u>HSVWLKLPGLCRF</u>	706
9	<u>SHVWLKLPGLCRF</u>	705
9	<u>HSVWLKLPGLCRF</u>	705

^{a)} See "Table of abbreviations of protein amino acids" in the beginning of this book. The pairs of amino acids L and I, and K and Q are denoted as 'L' and 'K', respectively. Underlining indicates the parts identical with the correct sequences.

^{b)} The correct sequence.

^{c)} The result of sequence elucidation obtained by using an improved detection system.

SUBP(c)やAMAT(g)では、正しい配列は上位100個の候補配列には含まれていなかったが、それらのスコアを算出してみると上位に現れる筈の高い値を示した。これらの場合は、正しい配列の前駆配列が、部分配列をスコアで選別する段階で捨てられてしまったためである。このように、最終的に高いスコアを与える配列が100%候補配列に含まれる保証はない。しかし、重要な配列が部分配列の選別段階で落ちるのはむしろ稀な例であり、通常は上位100個程度の部分配列のみを次の段階に残すことで十分である。

正しい配列が、最終結果に含まれるか否かは、解析に用いられたスペクトルの質が大きく影響する。表に示したSUBPやAMATの結果では、殆どの配列は部分的に正しい配列を含んでいる。上位の配列は、正しい配列の1個か2個のアミノ酸が整数分子量の等しいアミノ酸の組に置換してできていることが多い。例えば、SUBPでの'PKPKKFF'やAMATでの'WLKPKPG'である。SUBPでは、N末端のアルギニンが、整数分子量が同じである'GV'や'VG'に置換している。これらのアミノ酸の置換によって変化が見られるはずのシーケンスイオンが強く観測されないために、スコアの明確な差が現れなかったためと考えられる。また、解析で考慮していないタイプのフラグメントイオンが誤ってシーケンスイオンと帰属されて高いスコアを与えてしまう可能性もある。CCKO ((b)) やDYNR ((f)) の候補配列は、正しい配列との類似性が比較的低かった。DYNRの候補配列は、共通して正しい配列のN末端部分である'YG'及びC末端部分である'PKLK'を含んでいる。中間部分の配列には、規則性が見られない。この例では、正しい配列が上位に現れたのは偶然であると推測される。CCKOの場合には、正しい配列は部分的にも候補配列の中に見いだされなかった。これらのペプチドでよい結果が得られなかったのは、スペクトルの質が不十分で正しい配列を選別するためのスコアが、十分に機能できなかったことが主な理由であると考えられる。

配列解析の結果は、スペクトルの質に大きく依存することが分かったので、検出感度の改善を試みた。コレクタースリットとイオンマルチプライアーの間で、イオンを再加速(ポストアクセレーション)¹³⁾して、高質量領域の測定感度を向上させる方法の効果を調べた。図3-6(a)は、ポストアクセレーションを行わなかった場合、図3-6(b)はこれを行った場合である。図は相対強度で表してあるが、ポストアクセレーションにより、SUBPの[M+H]⁺イオンの絶対強度は約3倍に

substance P

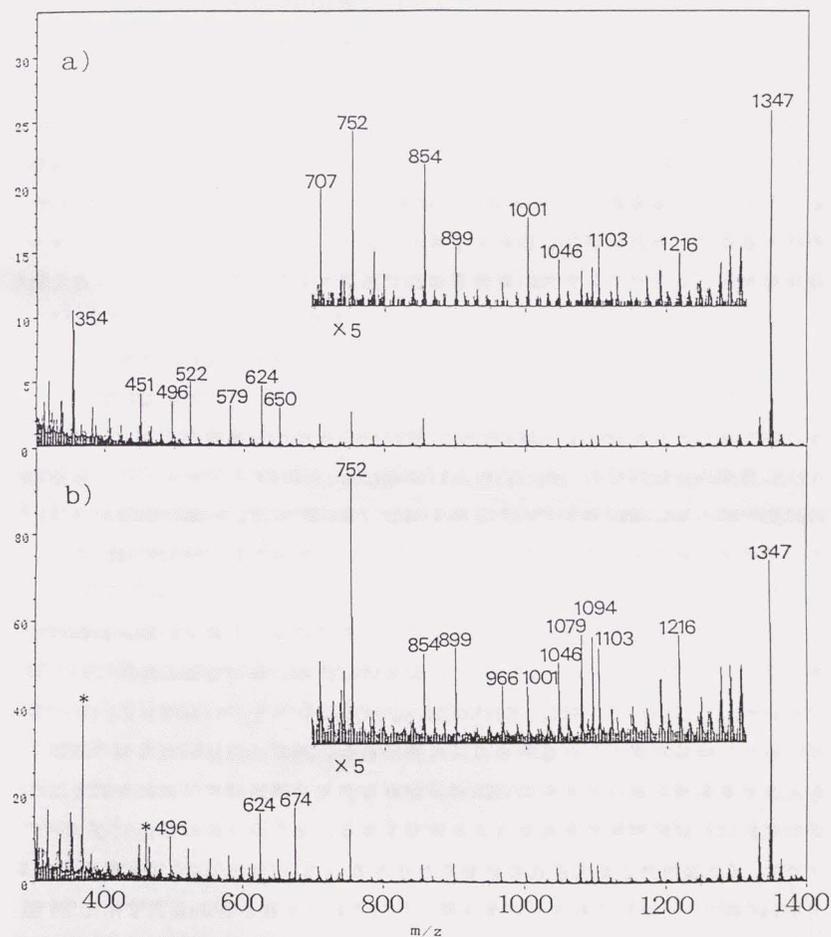
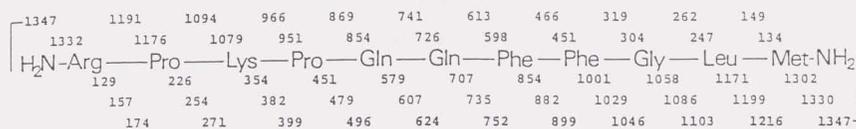


図3-6 サブスタンスP (MW 1,346.7、SUBP) のFABスペクトルでポストアクセレーションを行わなかった場合(a)と行った場合(b)の比較

なった。これらのスペクトルの解析結果は、表3-2(c)及び(d)に対応している。ボストアクセレーションにより、特に高質量領域のスペクトルの質が向上したことにより、SUBPの正しい配列が候補の第一位に得られた。

表3-2の結果から推測されるように、FABスペクトルの解析により得られたアミノ酸配列は、特に末端近くの配列に曖昧さが大きいことが分かった。この部分に関係するシーケンスイオンが、スペクトルの低質量及び高質量領域に現れるため、明確にピークを観測しにくくなるのが原因であると考えられる。つまり、FABスペクトルでは、低質量領域にはバックグラウンドイオンが強く、シーケンスイオンの誤った帰属の原因となる。例えば、AMATで上位の候補配列のN末端部分に誤った配列である'SHV'や'HSV'が、優先的に現れているのはこれが原因である。既に述べたように、質量数200以下の領域は解析に用いなかった。そのため、末端近くの配列情報は、高質量領域に依存する傾向がある。しかし、高質量領域のイオンは強度が弱いことが多いので、配列を明確に推定することが困難になるものと考えられる。

上に述べたように、正しい配列が候補配列の上位に得られなかった場合でも、候補配列は少なくとも部分的には正しい配列を反映していた。本法はFABスペクトルと多少なりとも整合する一連のアミノ酸配列を検索する機能があり、スペクトルから部分的な配列情報しか得られない場合にも、スペクトルからアミノ酸配列の情報を最大限に抽出するという目標をかなり達成できた。一連の候補配列は、スコアの上では僅かの違いしかないのに、さらに可能性を絞り込むには、人手による詳しいスペクトルの解析が必要である。

アミノ酸組成が既知の条件では、全てのペプチドについて正しい配列が候補の第一位に得られた。このように、アミノ酸組成は非常に有効な制限条件として働いていることが分かる。特に、スペクトルが曖昧になりやすい末端付近の配列推定で誤った帰属をすることを防ぐのに有効である。アミノ酸組成が未知の場合でも、低質量領域に現れるイモニウムイオンからアミノ酸組成の可能性を絞ることができれば、配列解析の精度の向上が期待できる。また、天然に存在するペプチドでは、C末端がアミド化されていることがある¹⁴⁾。これまでは、C末端基がカルボキシル基(-COOH)であるという条件で推定を行ったが、表3-1(C)では、C末端がアミド化されている可能性も考慮した条件で推定を行った。-COOH(45Da)が

-CONH₂(44Da)に変わると、同じアミノ酸配列でも、分子量やC末端のシーケンスイオンの質量が1Da減少するが、配列解析の結果には殆ど影響がなかった。C末端のアミド化の有無は、分子量及びシーケンスイオンの解析から、ほぼ確実に同定できることが分かった。

表3-3は、ANGIの負イオンFABスペクトル(図3-7)の解析結果である。得られた候補配列は、正しい配列と殆ど関連が見られなかった。その他のペプチドでも、負イオンスペクトルの結果は、正イオンスペクトルよりも著しく劣っていた。これは、負イオンモードでは、正イオンに比べてイオン強度が弱くS/N比も低いためであると考えられる。また、N末端のシーケンスイオンが観測されにくいことも要因である。負イオンスペクトルは、正イオンスペクトルと相補的に用いることにより、有用な情報を与えるものと考えられる。

3.5 ペプチドの分子量とアミノ酸配列の総数及びCAPSでスペクトルとの整合性を判定するアミノ酸配列の数の関係

与えられたN個のアミノ酸の並べ換えで発生する配列の総数P1は、アミノ酸の重複がなければ、単純にN!である。P1は、12量体のペプチドでは479,001,600に上るが、本法でスコアにより選別した部分配列の総数Q1は、P1の約1/12,000の38,264種類に過ぎない。アミノ酸組成が未知の場合に可能な全ての配列の数P2は、与えられた分子量を満たすアミノ酸組成の各々について全ての並べ換えを行って生成する配列の数の和である。例えば、分子量1,045のANGIの場合では、分子量を満たすアミノ酸組成は34,623通りあり、それらの全ての並べ換えで発生するアミノ酸配列の総数P2は、17,687,293,637(約177億)種類という天文学的な数になる。このような膨大な配列を扱うのは、高速のコンピュータを用いても現実的ではない。これに対して、本法でスペクトルとの整合性を判定しスコアを算出した部分配列の総数Q2は、P2の約1/30,000に当たる565,467に過ぎない。M-380型コンピュータを用いたときのCPU時間は数秒以内で、486DX/2型CPU内蔵のパーソナルコンピュータの場合でも1分以内で結果を得ることができた。図3-8に、P1、Q1、P2、Q2のペプチドの分子量やアミノ酸の数に対する依存性を示した。Q1及びQ2は、P1、P2に比べ分子量やアミノ酸の数によって比較的僅かな増加ししかしないことが分かる。本法が、長鎖ペプチド(MW 2,000以上)にも迅速に適用できることを表している。

表3-3 アンギオテンシンII (DRVYLHPF) の負イオンFAB
スペクトルの解析結果

Order	Sequence ^{a)}	Score
1	<u>D</u> KKFKHLM	1412
2	<u>D</u> KKFKHDE	1388
3	SRKFKHDE	1365
4	GWKFKHDE	1359
5	SRKFKHLM	1358
6	GWKFKHLM	1351
7	ENKFKHDE	1350
8	KDKFKHDE	1349
9	RSKFKHDE	1348
9	NEKFKHDE	1348

^{a)} See "Table of abbreviations of protein amino acids" in the beginning of this book. The pairs of amino acids L and I, and K and Q are denoted as 'L' and 'K', respectively. Underlining indicates the parts identical with the correct sequences.

^{b)} The correct sequence 'DRVYLHPF' was found at the 27th rank.

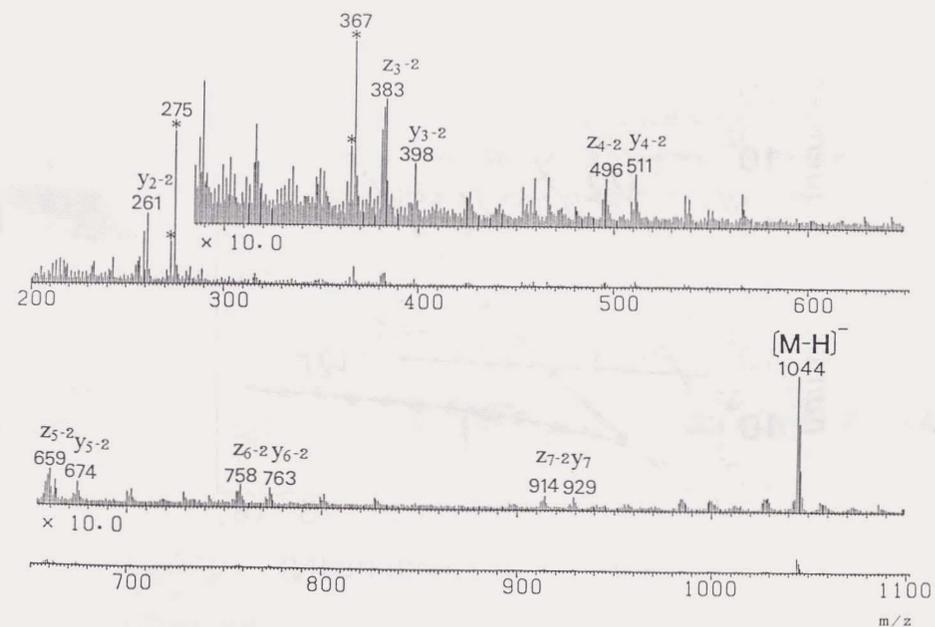


図3-7 アンギオテンシンII (DRVYLHPF, MW 1,045.5, ANGI) の負イオンFAB
スペクトル

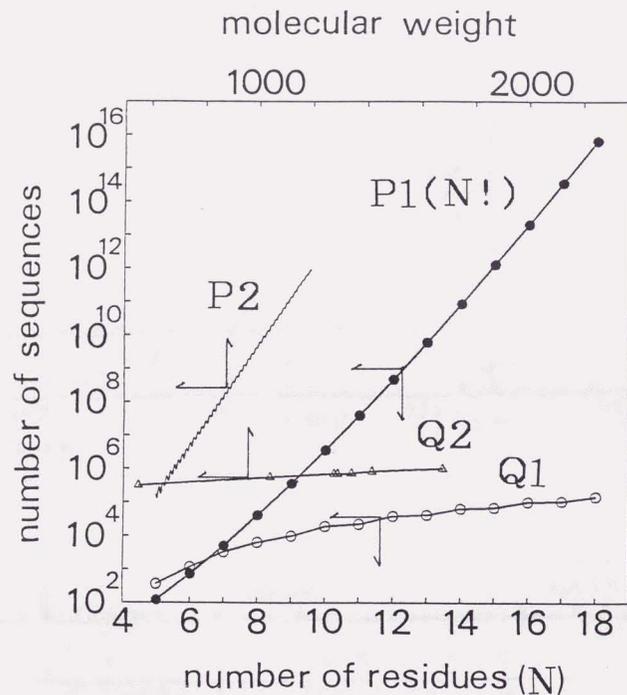


図3-8 ヘプチドの分子量とアミノ酸配列の総数及びCAPSでスペクトルとの整合性を判定するアミノ酸配列の数の関係

- P1: アミノ酸組成既知のペプチドの全てのアミノ酸配列の数
- Q1: アミノ酸組成既知の条件でCAPSで選別した部分配列の総数
- P2: アミノ酸組成未知のペプチドの全てのアミノ酸配列の数
- Q2: アミノ酸組成未知の条件でCAPSで選別した部分配列の総数

3.6 本章のまとめ

アミノ酸組成が未知の条件でも、15量体程度までのペプチドのスペクトルを数分以内に解析できるアミノ酸配列解析法"CAPS" (付録にプログラムリストを添付した)を開発した。CAPSは、スペクトルと整合性の高いアミノ酸配列を候補配列として列挙することにより、スペクトルに含まれる配列情報を有効に抽出できることがわかった。ペプチドの分子量の増加によって、計算量が殆ど増加しないため、計算時間によるペプチドの分子量的な制約は事実上解消した。例えば、i-48 6DXクラスのパーソナルコンピューターを用いた場合でも、実用的な計算時間で分子量数千のペプチドが解析できる。一方、ペプチドの分子量の増加と共にシーケンスイオンの強度が減少する傾向があり、配列推定に困難が見られた。タンデム質量分析 (MS/MS) 法は、長鎖ペプチドでも質のよいCIDまたは衝突活性化開裂 (Collisionally activated dissociation, CAD) スペクトルを測定できる方法であるが、本章では割愛した。CAPSのCIDスペクトルへの適用については、次章で未知環状ペプチドの解析において検討した。また、イオン分解の様式が非経験的または経験的に予測可能となり、解析プログラムに組み込むことができれば、配列推定の確度は飛躍的に向上することが期待される。イオン分解の非経験的な予測の可能性については、第9章においてペプチド多価イオンのCADスペクトルについて検討した。

文献

1. a) K. Ishikawa and Y. Niwa, Presented at the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, (1988).
b) K. Ishikawa and Y. Niwa, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, 13, 373 (1986).
c) 丹羽、石川、化学技術研究所報告、86, 96 (1991).
2. M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 325 (1981).
3. H. D. Beckey, "Principles of Field Ionization and Field Desorption Mass Spectrometry", Pergamon, Oxford (1977).
4. Y. Shimonishi, Y-M. Hong, T. Kitagishi, T. Matsuo, H. Matsuda and I. Katakuse, *Eur. J. Biochem.*, 112, 251 (1980).
5. a) Y. Shimonishi, Y-M. Hong, T. Kitagishi, I. Katakuse, T. Matsuo, H. Matsuda, S. Hara, T. Ikenaka and Y. Izumi, *Chem. Lett.*, 499 (1981).
b) T. Matsuo, H. Matsuda and I. Katakuse, *Biomed. Mass Spectrom.*, 8, 137 (1981).
c) T. Matsuo, T. Sakurai, H. Matsuda, H. Wollnik and I. Katakuse, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 57 (1983).
6. T. Sakurai, T. Matsuo, H. Matsuda and I. Katakuse, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 396 (1984).
7. a) M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler and B. N. Green, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 936 (1982).
b) A. Dell and H. R. Morris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106, 1456 (1982).
c) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler, G. V. Garner, D. B. Gordon, L. W. Tetler and R. C. Hider, *Biomed. Mass Spectrom.*, 9, 265 (1982).
d) M. Barber, R. S. Bordoli, G. J. Elliott, N. J. Horoch and B. N. Green, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 110, 753 (1983).
- e) A. M. Buko, L. R. Phillips and B. A. Fraser, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 324 (1983).
8. a) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and L. W. Tetler, *Org. Mass Spectrom.*, 16, 256 (1981).
b) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler and E. T. Whalley, *Biomed. Mass Spectrom.*, 8, 337 (1981).
c) K. L. Rinehart Jr, L. A. Gaudio, M. L. Moore, R. C. Pandey, J. C. Cook Jr, M. Barber, R. D. Sedgwick, R. S. Bordoli, A. N. Tyler and B. N. Green, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6517 (1981).
d) M. Barber, R. S. Bordoli, G. V. Garner, D. B. Gordon, R. D. Sedgwick, L. W. Tetler and A. N. Tyler, *Biochem. J.*, 197, 401 (1981).
e) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Biomed. Mass Spectrom.*, 9, 208 (1982).
f) I. Katakuse and D. M. Desiderio, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 54, 1 (1983).
g) D. H. Williams, G. Bojesen, S. Santikarn, F. de Angelis, P. B. Oelrichs and J. Macleod, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, 46, 427 (1983).
h) A. M. Buko, L. R. Phillips and B. A. Fraser, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 387 (1983).
i) A. M. Buko, L. R. Phillips and B. A. Fraser, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 408 (1983).
9. D. H. Williams, C. V. Bradley, S. Santikarn and G. Bojesen, *Biochem. J.*, 201, 105 (1982).
10. a) H. R. Morris, M. Panico, M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101, 623 (1981).
b) W. A. König, M. Aydin, U. Schulze, U. Rapp, M. Hohn, R. Pesch

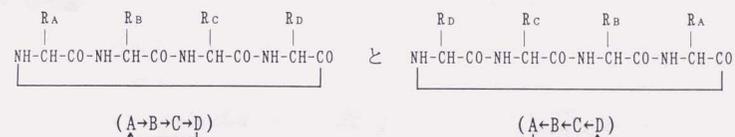
- and V. N. Kalikhevitch, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.*, **46**, 403 (1983).
11. a) S. Seki, H. Kambara and H. Naoki, *Org. Mass Spectrom.*, **20**, 18 (1985).
 b) P. Roepstorff, P. Hojrup and J. Moller, *Biomed. Mass Spectrom.* **12**, 181 (1985).
12. a) K. Biemann and S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 1 (1987).
 b) K. Tomer, *Mass Spectrom. Rev.*, **8**, 445 (1989).
13. a) R. J. Beuhler and L. Friedman, *Nucl. Instrum. Methods*, **170**, 309 (1980).
 b) R. J. Beuhler, *J. Appl. Phys.*, **54**, 4118 (1983).
14. G. E. Schulz and R. H. Schirmer, "Principles of Protein Structure", Springer-Verlag, Heidelberg (1979).

第4章 環状ペプチドの高速原子衝撃 (FAB) -衝突誘起解離 (CID) 質量分析法によるアミノ酸配列解析¹⁻³⁾

4.1 緒言

4.1.1 質量分析法による環状ペプチドのアミノ酸配列解析の問題点

環状ペプチドには、グラミシジン⁴⁾のような抗菌作用やシクロスポリン⁵⁾のような免疫抑制作用など様々な生理活性を持つ物質が多い。ペプチド鎖の環状構造のため、鎖状ペプチドに比べて溶液中での立体構造が束縛されていることが、こうした生理活性を発現する反応場の形成に役立っていると考えられる。また一方では、この環状構造は、N末端を閉鎖してプロテインシーケンサによる解析を困難にする等、構造解析の上でも大きな影響がある。ペプチド結合 (-CO-NH-) には方向性があるため、アミノ酸の結合関係が同じでもペプチド結合の方向性により2種類の構造が区別されることになる。例えば、



は、互いにアミノ酸の結合関係が同じでペプチド結合の方向性が逆の”レトロシーケンス”の関係にある。(以下では、それぞれc(A-B-C-D)及びc(D-C-B-A)と略記する。)レトロシーケンスの判別は、環状ペプチドに特有の問題の一つである。

高速原子衝撃 (Fast atom bombardment, FAB) 法の開発以前には、環状ペプチドを鎖状の小ペプチドに断片化後揮発性の誘導体に変換し、電子衝撃 (Electron ionization, EI) 法による測定が行われた。この方法では、断片化のための部分加水分解の際にジケトピペラジン中間体を経る転移反応⁶⁾ (図4-1参照) が起こることがあり、レトロシーケンスの判別に曖昧さが生ずる。これに対して、FAB-衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) スペクトルによる環状ペプチドの構造解析の利点は、CIDによる分解反応ではこうした転移反応が起きにくいことや、分解反応をリアルタイムで観測できるため、分解の程度の調節が容易であることである。FAB-CID法による未知ペプチドの構造解析の初めての例であるHCトキシン (toxin from *Helminthosporium carbonum*) では、それまで報告され

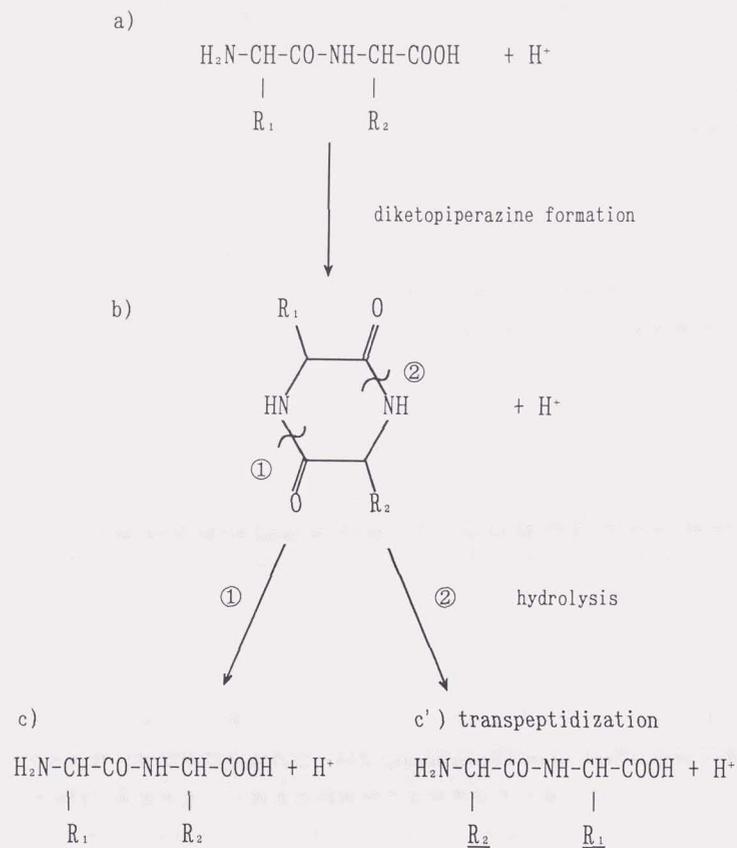


図4-1 ジケトピペラジン生成反応によるペプチドの転移反応

ていた構造 (c(AEO-Ala-Ala-Pro)、AEO: 2-amino-9,10-epoxy-8-oxodecanoic acid) は、正しい配列 (c(Pro-Ala-Ala-AEO)) のレトロシーケンスであることが明らかとなった⁷⁾。

4.1.2 本研究の目的

ペプチド系抗菌性物質は、環境汚染を引き起こさない新しい農業として関心が持たれている。そのうちバチルス菌が生産する抗菌性ペプチドには、一連の類似したアミノ酸配列の環状ペプチドが報告されており、イチュリン (Iturin) グループとして分類されている⁸⁾。(表4-1参照) これらは、アミノ酸配列が類似している他、炭素数14から17の脂肪族性のβアミノ酸 (H₂N-CH(C_nH_{2n+1})-CH₂-COOH、n=11~14) を共通して持っていることが特徴である。表中のイチュリン D、E、バチロマイシン (bacillomycin) Fb、Fc等は、現在のところ完全な一次構造は解明されておらず、環状ペプチドの構造解析の困難さを示している。本研究では、バチルス菌が生産した2つのグループの未知ペプチドについて、FAB-CID法によるアミノ酸配列解析を行うと共に前章で開発したアミノ酸配列解析法"CAPS"が、環状ペプチドのスペクトルの解析にどの程度適用できるかを検討した。また、環状ペプチドのイオン分解スキームのレトロシーケンスの判別における役割を明らかにした。

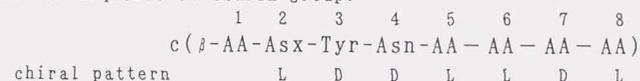
4.2 実験

土壌から採取した2種類の未同定のバチルス菌 (bacillus subtilis I及びII) を、3%ペプトン、0.5%酵母抽出液、0.5%NaClを含む媒体中で30°Cで3日間震盪しながら培養した⁹⁾。培養液は、9,000rpmで10分間遠心分離し、上澄み液を塩酸でpH3.0とし、白い沈殿を発生させた。沈殿物のうち80%エタノール可溶分を遠心分離し、溶媒を除去した後、50mM NaHCO₃溶液に溶解し水で透析した。さらに、日立製作所製3053カラム (10φ×150mm) を用いた逆相LCで精製した。0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む40から60%アセトニトリル (ACN) のグラジエントで溶出した。バチルス菌I及びIIから得られたPyricularia oryzae等の重要な菌類の成長を抑制する抗菌性ペプチド¹⁰⁾を、それぞれグループI及びIIと名付けた。本研究では、各グループから分離されたそれぞれ2種類のペプチド (グループI: P1,

表4-1 イチュリンググループに属する環状ペプチドのアミノ酸配列

Antibiotic	Asx ²	AA ⁵	AA ⁶	AA ⁷	AA ⁸
Iturin A ^{a)}	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser
Iturin C	Asp	Gln	Pro	Asn	Ser
Iturin D	Asn	^{o)}	Pro	^{o)}	Ser
Iturin E	Asn	^{o)}	Pro	^{o)}	Ser
Bacillomycin D	Asn	Pro	Glu	Ser	Thr
Bacillomycin F	Asn	Gln	Pro	Asn	Thr
Bacillomycin Fb	Asn	^{d)}	Pro	^{d)}	Thr
Bacillomycin Fc	Asn	^{d)}	Pro	^{d)}	Thr
Bacillomycin L	Asp	Ser	Gln	Ser	Thr
i-Bacillomycin L ^{b)}	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr
Mycosubtilin	Asn	Gln	Pro	Ser	Asn

general sequence of Iturin group:



- ^{a)} The peptides in the group I analyzed in this study were identified as iturin A.
- ^{b)} The peptide in the group I analyzed in this study were identified as a new variant of bacillomycin L tentatively named as i-bacillomycin L in the table.
- ^{c)} In iturin D and E one amide is replaced by an carboxylic acid and methyl ester group, respectively. The position of Asx² was excluded for this replacement but no further assignments had been done.
- ^{d)} One or two amide(s) are replaced by carboxylic acid(s) in bacillomycin Fb and Fc, respectively. The position of Asx² was excluded for this replacement but no further assignments had been done.

P1'、グループII: P2, P2') について、FAB-CID法による構造解析を行った。

ペプチドの完全加水分解は、脱気した試料チューブ内で6N HCl中110°Cで24時間反応し、部分加水分解は1N HCl中100°Cで15分間反応した。加水分解反応に用いたペプチドの量は、各20μgである。ペプチドの部分加水分解物の一部は凍結乾燥後、Tarrら¹¹⁾の方法による手動Edman分解反応(図1-1参照)を行った。アミノ酸組成は、日立製作所製835型アミノ酸分析装置を用いて測定した。ペプチド(約10μg)の遊離カルボキシル基のメチル化反応は、メタノール(MeOH)/ベンゼン(PhH)=2:7(vol/vol)溶媒9μl中で1μmolのトリメチルシリルジアゾメタン(TMSD)を用い、室温で30分間反応した。

FABスペクトルの測定は、日本電子(株)製JMS HX-100型二重収束質量分析計を用いた。ペプチド試料約5μgを1μlのトリクロロ酢酸と0.5μlのグリセリンに溶解し、0.2μlの3-ニトロベンジルアルコール(NBA)¹²⁾を加えた。FABの一次粒子は、6kVに加速したキセノン原子を用いた。B/Eリンクドスキャン(Linked Scan at Constant B/E, LSBE)法¹³⁾によるCIDスペクトルの測定時には、イオン源と電場の間の第一無場領域に装着した衝突室にヘリウムガスを導入した。スペクトルデータは、日本電子(株)製DA-5000データシステムにより、32,000点のデータポイントから構成されたプロファイルデータとして取り込んだ。数回のスキャンを積算した後、10点のスムージングをかけ、バーグラフデータに変換した。

4.3 結果と考察

4.3.1 グループIのペプチドP1、P1'のアミノ酸配列解析^{1, 3)}

ニンヒドリン試験では、ペプチドそのままでは陰性を、塩酸での加水分解物は陽性を示し、P1、P1'が環状ペプチドであることを示唆した。アミノ酸分析結果から、水溶性のアミノ酸としてプロリン、セリン、チロシン、Glx(GluまたはGln)、Asx(AspまたはAsn)を、1:1:1:1:3のモル比で含んでいることが分かった。図4-2のFABスペクトルから求めたP1、P1'の分子量は、それぞれ1,042.7±0.1(a)及び1,056.5±0.1(b)であった。アミノ酸分析では区別できなかったAsxとGlxは、m/z 87と101に観測されたイモニウムイオンから、それぞれアスパラギンとグルタミンであると推測された。アミノ酸Pro₁Ser₁Tyr₁Gln₁Asn₃の残基質量の合計(817 Da)とFABスペクトルから測定した分子量値との差は、残基質量数がそれぞれ

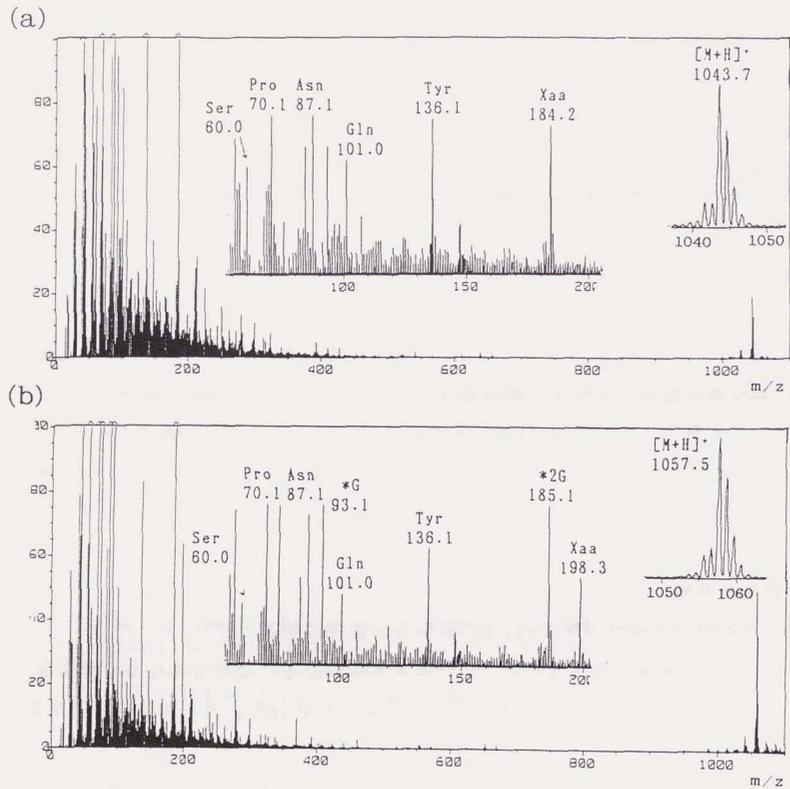
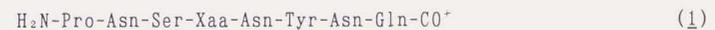


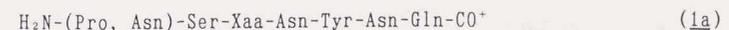
図4-2 グループIの環状ペプチドP1(a)及びP1'(b)のFABスペクトル
(トリクロル酢酸/グリセリン/3-ニトロベンジルアルコール=10:5:2)

れ225 (P1) と239 (P1') の脂肪族性アミノ酸を含んでいることを示唆した。この値は、イチュリングループの抗菌性ペプチドに含まれている炭素数14と15のβアミノ酸¹⁴⁾、3-アミノテトラデカン酸 ($H_2N-CH(C_{11}H_{23})-CH_2-COOH$, P1) 及び3-アミノペンタデカン酸 ($H_2N-CH(C_{12}H_{25})-CH_2-COOH$, P1') (両者ともXまたはXaaと略記する) の残基質量数に一致した。また、FABスペクトルに炭素数14及び15のXaaから予測されるイモニウムイオン ($H_2N^+=CH-C_{11}H_{23}$: m/z 184, $H_2N^+=CH-C_{12}H_{25}$: m/z 198) のピークが観測されたことも、このアミノ酸の存在を支持した。アミノ酸組成は、表4-1のイチュリンAと一致した。

図4-3(a)は、P1のプロトン化分子 ($[M+H]^+$, m/z 1,043.7) のCIDスペクトルである。娘イオンは、環状の $[M+H]^+$ はペプチド結合の一カ所が開裂してできた鎖状のアシリウムイオン中間体が生成し、これが逐次・併発的にC末端側のアミノ酸残基を失って分解するスキーム (図4-4) に従うと仮定した¹⁵⁾。スペクトルの主なピークは、イチュリンAのアミノ酸配列中の-Gln-Pro-間のペプチド結合の開裂により生成したアシリウムイオン



からの分解で説明された (図4-3(a))。さらに、この帰属を確認するためアミノ酸組成を既知の条件でCAPSプログラム¹⁶⁾で解析した。CAPSは基本的に鎖状ペプチドのスペクトルにしか対応していないが、図4-4に示した鎖状のアシリウムイオン中間体を経るイオン分解スキームに従うと仮定した場合には、C末端の-OH基が欠損した鎖状ペプチドの配列を求めるとして、環状ペプチドのスペクトルにも対応できる。図4-4のスキームでは、アミノ酸R₁とR₂の間で結合が開裂した場合について示したが、他のペプチド結合の開裂によって生成する異性体のアシリウムイオンの寄与も考えると、合計8種類のプリカーサーから生成した娘イオンの重ね合わせになると考えられる。この環状ペプチドの場合は、全ての可能なアミノ酸配列は、840 (7!/3!) 通りあるが、CAPSプログラムは、最も選択性高く生成するアシリウムイオンのアミノ酸配列を8×840通りのアミノ酸配列の中から選別することになる。表4-2(a)は、最も多量に生成したと考えられるアシリウムイオンの配列は、構造(1)を支持する



であることを示した。括弧内のプロリンとアスパラギンの並び順は、手掛かりと

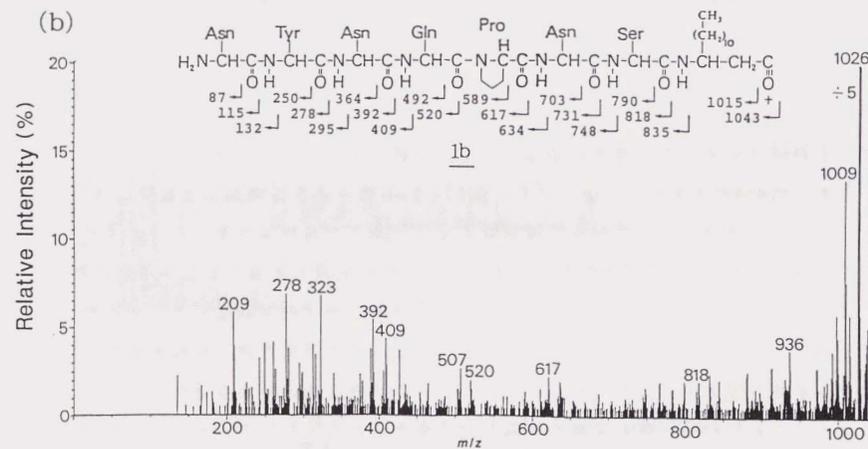
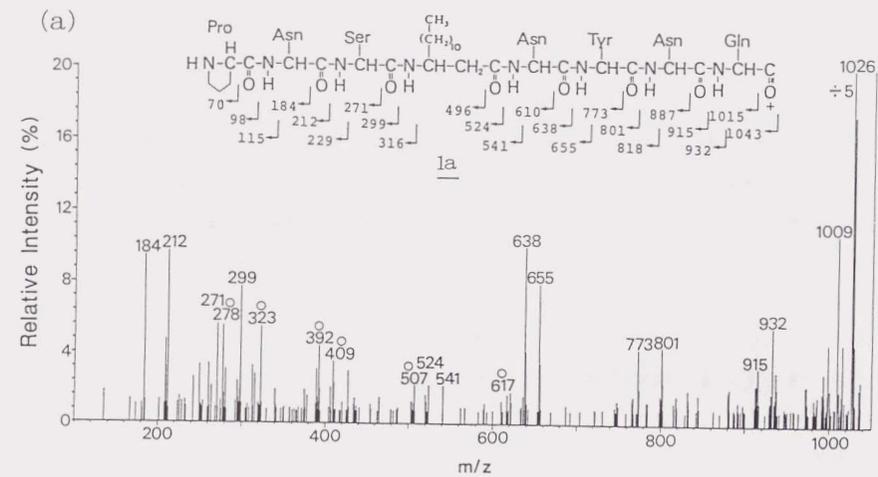


図4-3 グループ I の環状ペプチドP1のプロトン化分子の(a)FAB-CID
スペクトル及び(b)スペクトル(a)から推定された構造(1a)で帰属
された娘イオンを除いたスペクトル

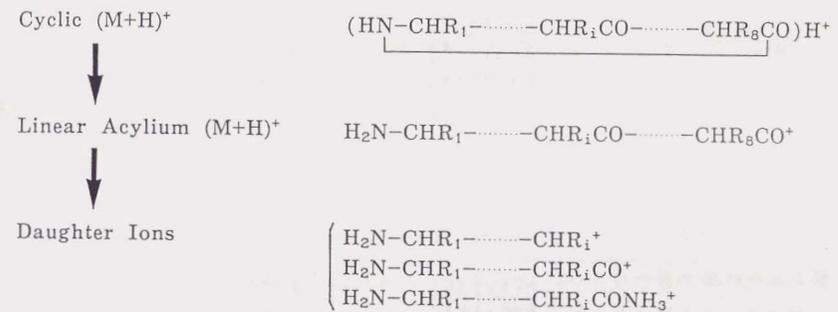


図4-4 FAB-CIDスペクトルにおける環状ペプチドのイオン分解スキーム
ペプチド結合の1カ所が開裂してできた鎖状のアシリウムイオン
中間体が逐次・併発的にC末端側のアミノ酸残基を失って分解する。

表4-2 環状ペプチドP1のFAB-CIDスペクトルのCAPSによる解析結果

a)

Order	Sequence	Score
1	<u>PNSXNYNQ</u>	4054
1	<u>NPSXNYNQ</u>	4054
3	<u>PNSXNYNQ</u>	3838
3	<u>NPSXNYNQ</u>	3838
5	<u>PNSXNYQN</u>	3621
5	<u>NPSXNYQN</u>	3621
7	<u>PNSXNNYQ</u>	3547
7	<u>NPSXNNYQ</u>	3547
9	<u>PNXSNNYQ</u>	3437
9	<u>NPXSNNYQ</u>	3437

b)

Order	Sequence	Score
1	<u>NYNQPNXS</u>	1472
1	<u>NYNQPNXS</u>	1472
3	<u>NYNXSQPN</u>	1420
3	<u>NYNXSQNP</u>	1420
5	<u>NYNXQSPN</u>	1420
5	<u>NYNXQSNP</u>	1420
7	<u>NYNQXSPN</u>	1418
7	<u>NYNQXSNP</u>	1418
7	<u>NYNQXSXP</u>	1418
7	<u>NYNQSXNP</u>	1418

- a) Candidate sequences obtained from the original FAB-CID spectrum.
 b) Candidate sequences obtained from the spectrum after eliminating the ions assigned by the first candidate of a).

なるイオンがスペクトルに現れなかったため、不明である。図4-3(a)から分かるように、スペクトルの主なピークは、(1a)の構造で帰属されたが、○印で示したピークのように無視できない強度の未帰属ピークが数本残っていた。(1a)の構造で帰属されなかった娘イオンは、別の位置で開環したアシリウムイオンからの分解で生成したと推測された。(1a)に次いで多く生成したアシリウムイオンを見出すため、(1a)の構造で帰属されるピーク m/z 184, 212, 229, 271, 299, 316, 610, 638, 655, 773, 801, 818, 887, 915, 932をスペクトルから除去した後(図4-3(b))、再度CAPSによる解析を行った。その結果得られたのが表4-2(b)で、



の構造のアシリウムイオンの生成を示唆している。構造(1a),(1b)から、P1及びP1'の構造として、



が得られた。(図4-5参照)

P1の部分加水分解物のFABスペクトル(図4-6)は、構造(1c)を支持した。部分加水分解に用いた条件下では、セリンやトレオニンのアミド窒素側のペプチド結合は、アシル転移反応により加水分解されやすいことが知られている¹⁷⁾。P1は、まずセリンのN末端側で加水分解されて鎖状になった後、より小さな断片に分解されたものと考えられる。図4-6のFABスペクトルでは、Xaaを含む断片のみが強く測定された。これは、Xaaの脂肪族性によりペプチドの界面活性が高くなったためと考えられる¹⁸⁾。P1の部分加水分解物のFABスペクトルが比較的単純で明快地解析できたことは、このような比較的選択的な加水分解とFABイオン化における選択的イオン化の結果であると考えられる。FAB及びFAB-CIDスペクトルから求められたアミノ酸配列及びペプチドの起源から、グループIのペプチドP1、P1'は、イチュリンA-2¹⁹⁾であることが結論された。

4.3.2 グループIIのペプチドP2、P2'のアミノ酸配列解析^{2, 3)}

ニンヒドリン試験では、ペプチドそのままでは陰性を、塩酸での加水分解物は陽性を示し、P2、P2'が環状ペプチドであることを示唆した。アミノ酸分析結果から、水溶性のアミノ酸としてトレオニン、チロシン、Glx、セリン、Asx(AspまたはAsn)を、1:1:1:2:2のモル比で含んでいることが分かった。図4-7のFABスペク

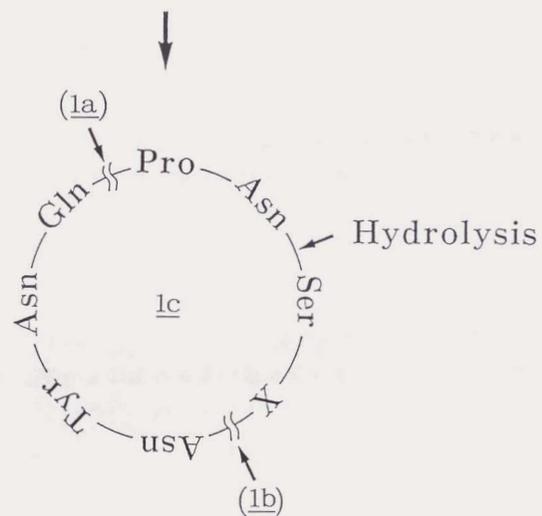
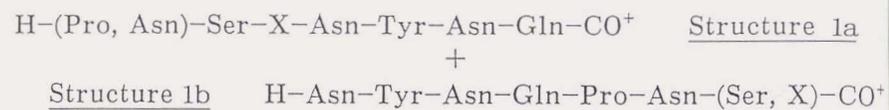


図4-5 FAB-CIDスペクトルにおけるグループ I の環状ペプチドのイオン分解スキーム
 スペクトルから推定されたアシリウムイオン(1a)(1b)から、環状ペプチドの構造(1c)が導かれた。

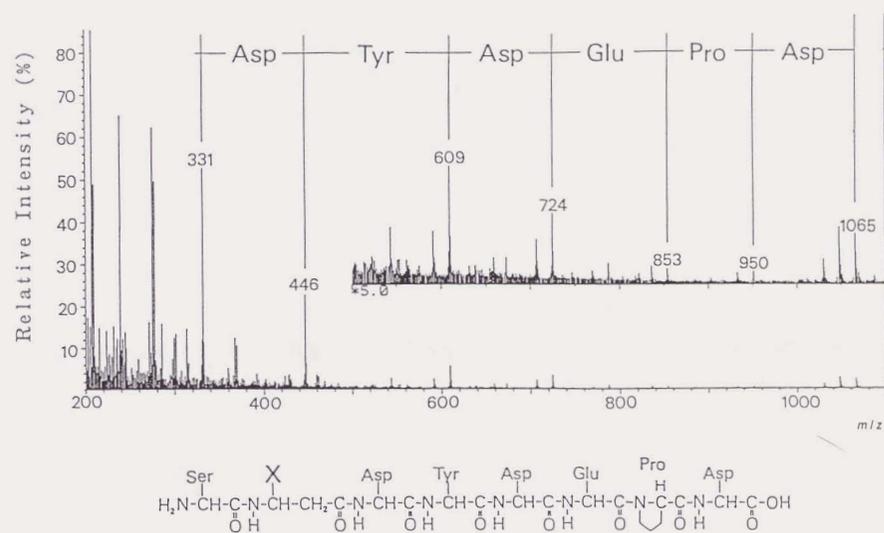
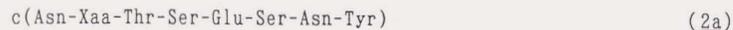


図4-6 グループ I の環状ペプチドP1の部分加水分解物のFABスペクトル

トルから、P2とP2'の分子量はそれぞれ 1020.5 ± 0.1 (A) 及び 1034.4 ± 0.1 (B) と測定された。アミノ酸分析では、区別できなかったAsxとGlxは、 m/z 87と102に観測されたイモニウムイオンから、それぞれアスパラギンとグルタミン酸であると推測された。アミノ酸Thr₁Tyr₁Glu₁Ser₂Asn₂の残基質量の合計(795 Da)とFABスペクトルから測定した分子量値との差(225 (P2) 及び239 (P2'))から、グループIのペプチドP1、P1'に含まれていた炭素数14と15のβアミノ酸、3-アミノテトラデカン酸及び3-アミノペンタデカン酸を含んでいることを示唆した。また、P1、P1'と同様に、FABスペクトルにXaaのイモニウムイオン(m/z 184、198)のピークが観測された。P2とP2'のアミノ酸組成Thr₁Tyr₁Glu₁Xaa₁Ser₂Asn₂から算出された元素組成は、それぞれC₄₆H₇₂O₁₆N₁₀ (P2) とC₄₇H₇₄O₁₆N₁₀ (P2')であり、図4-7の[M+H]⁺の同位体分布とよく一致した。

図4-8は、P2、P2'及び0-メチル化反応後のP2'の[M+H]⁺からのCIDスペクトルである。 m/z 340, 441, 528, 744, 858のピークは、それぞれAsn₁Xaa₁、Asn₁Xaa₁Thr₁、Asn₁Xaa₁Thr₁Ser₁、Asn₁Xaa₁Thr₁Ser₂Glu₁、Asn₂Xaa₁Thr₁Ser₂Glu₁の組成であると考えられた。これより、P2のアミノ酸配列はc(Asn, Xaa)-Thr-Ser-(Glu, Ser)-Asn-Tyrまたはこの逆回りの配列であると推測された。図4-8のP2(A)とP2'(B)のスペクトルを比較すると、対応するピークが全て14Da増加しており、P2とP2'の違いはXaaのみであることが分かった。P2'の0-メチル化反応により、 m/z 758と872のイオンが14Da増加し(図4-8(C))、遊離のカルボキシル基はグルタミン酸に由来することが確認された。

図4-7のFABスペクトルの低質量領域には、アミノ酸の結合関係を反映した2から3量体のアシリウムイオンが観測された。例えば、 m/z 189のピークは、H₂N-Thr-Ser-CO⁺ またはH₂N-Ser-Thr-CO⁺(ここでは[Thr, Ser]と略す)と帰属される。同様に、 m/z 202, 217, 278, 304, 327, 340, 392等のピークは、それぞれ[Ser, Asn]、[Glu, Ser]、[Asn, Tyr]、[Ser₂, Glu]、[Xaa, Thr]、[Asn, Xaa]、[Asn₂, Tyr]と帰属された。これらのイオンから、アミノ酸の結合関係を一義的に決定できるため、これまで述べた結果を総合して、アミノ酸配列は



またはこの逆回りの配列

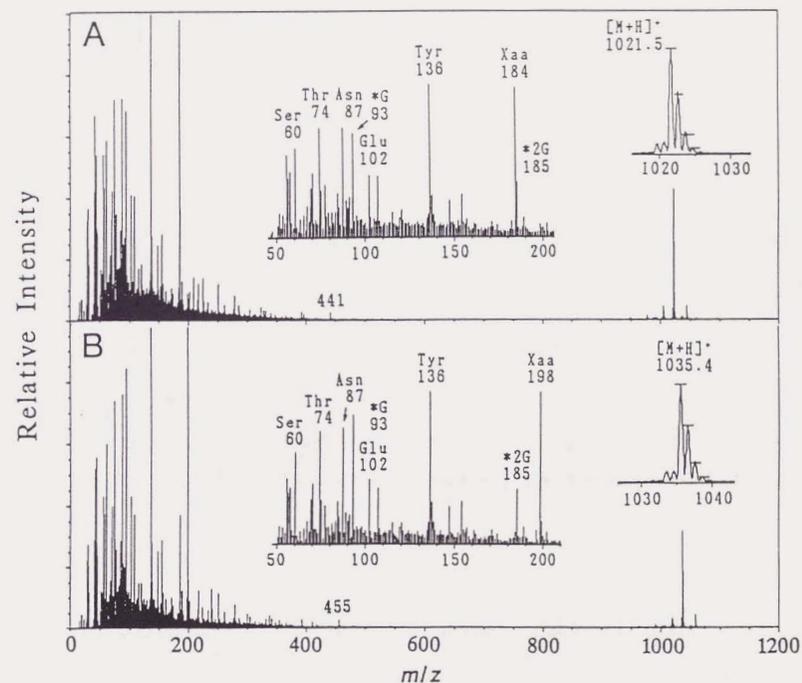


図4-7 グループIIの環状ペプチドP2(A)及びP2'(B)のFABスペクトル
(トリクロル酢酸/グリセリン/3-ニトロベンジルアルコール=10:5:2)

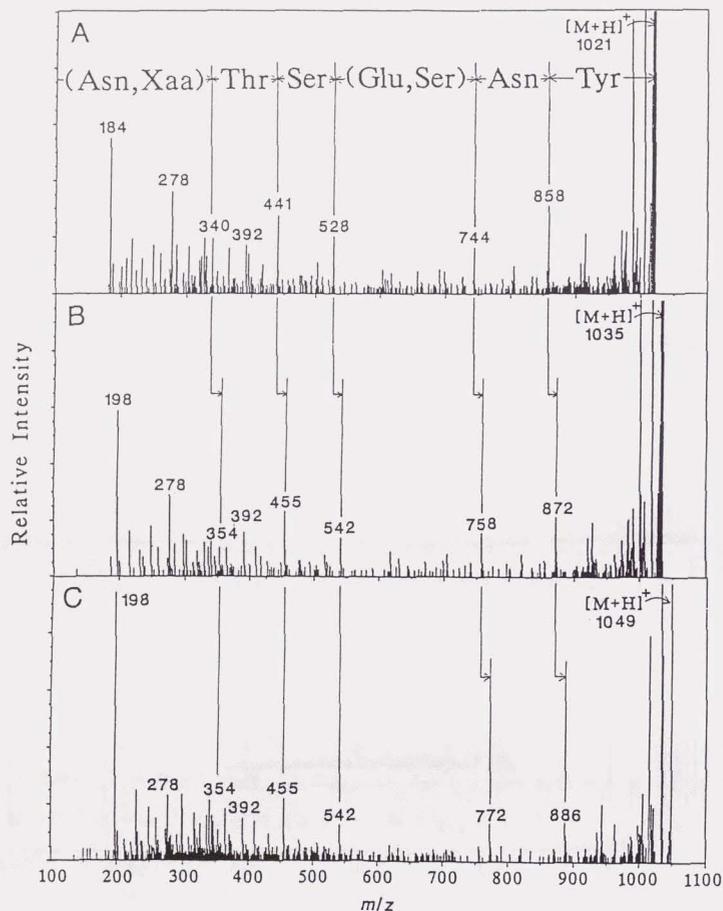
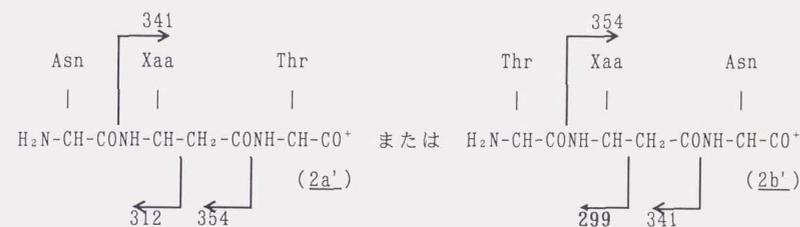


図4-8 グループIIの環状ペプチドP2(A)及びP2'(B)のプロトン化分子のFAB-CIDスペクトル
(C)は、P2'をO-メチル化した試料のFAB-CIDスペクトル

であることが分かった。

ペプチド結合の方向性に関する情報を得るため、FABスペクトルで観測されるフラグメントイオンのCIDスペクトルを検討した。m/z 278、250、392等にフラグメントイオンが見られ、 $\text{H}_2\text{N-Asn-Tyr-CO}^+$ または $\text{H}_2\text{N-Tyr-Asn-CO}^+$ (278) 及びこれらがCOを失ったもの (250) または $\text{H}_2\text{N-Asn-Tyr-Asn-CO}^+$ (392) で帰属された。しかし、ペプチドのアミノ酸配列の対称性のため (-Asn-Tyr-Asn-)、これらはペプチド結合の方向性を調べる目的には、利用できなかった。m/z 441 (P2) 及び445 (P2') のピークは、



と推測され、この目的に利用できると考えられた。図4-9にP2'のm/z 445のCIDスペクトルを示す。m/z 198はXaaのイモニウムイオンであると推定され、m/z 341, 354, 324, 337は(2a') (2b')のどちらの構造でも説明可能だった。しかし、m/z 299はβアミノ酸に特有の分解反応で、構造(2b')でしか説明できなかった。従って、P2及びP2'のアミノ酸配列は、(2b) (c(Thr-Xaa-Asn-Tyr-Asn-Ser-Glu-Ser)) であることが結論された。

この結論は、さらにペプチドの部分加水分解物のEdman分解反応によって検討した。図4-10(A)は、P2'の部分加水分解物のFABスペクトルである。○印を付けたピークは、ペプチドの脱水物である。m/z 359のピークは、Xaa-ThrまたはThr-Xaaと帰属された。このピークからはじめて、より長鎖のペプチドのピークを帰属した。m/z 474=359+115(Asp)、m/z 637=474+163(Tyr)、m/z 752=637+115(Asp)等のピークから、m/z 968=752+87(Ser)+129(Glu)は、 $\text{H}_2\text{N-(Thr, Xaa)-Asn-Tyr-Asn-(Ser, Glu)-COOH}$ またはこの逆の配列であると推定された。P1の場合 (図4-6) と同様に、P2'の部分加水分解物のFABスペクトルでも、脂肪族性のXaaを含む断片のみが強く

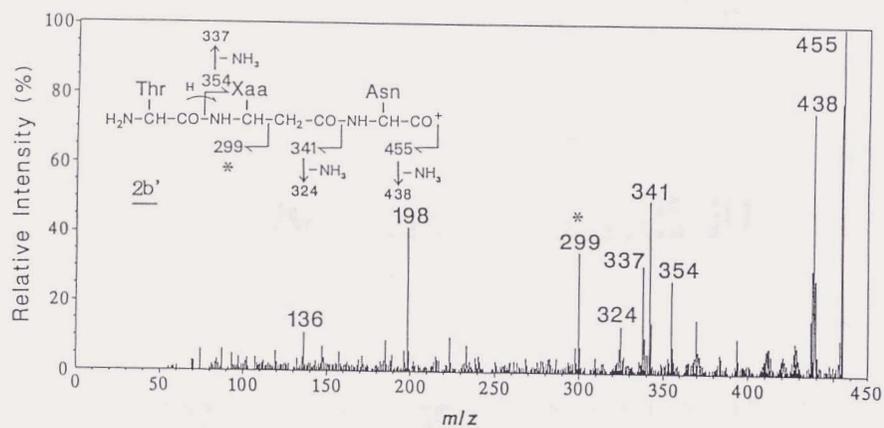


図4-9 P2'のFABスペクトルで観測されるフラグメントイオン (m/z 445) のFAB-CIDスペクトルの β アミノ酸に特有のフラグメントイオン (m/z 299) から、構造(2b')が推定された。

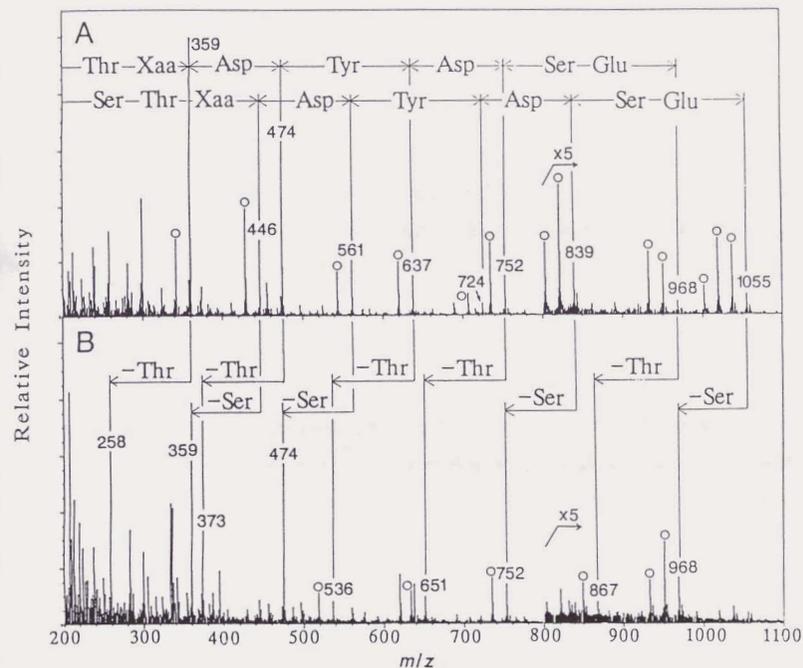


図4-10 グループIIの環状ペプチドP2'の(A)部分加水分解物のFABスペクトル (B)は、この部分加水分解物をEdman分解を1段階行った後のFABスペクトル

測定された。セリンやトレオニンのN末端側での選択的な加水分解とFABイオン化における選択的イオン化の結果、比較的単純で解析が容易なスペクトルを与えたと考えられる。図4-10(B)は、この部分加水分解物をペプチド混合物のままEdman分解を一段階行った後のFABスペクトルである。図4-10(A)のスペクトル中の m/z 359, 474, 637, 752, 968のピークは、それぞれ m/z 258, 373, 536, 651, 867にシフトした。質量数の差101は、トレオニンの残基質量数に対応しており、これらのペプチドがN末端にトレオニンを持っていることを示している。従って、 m/z 968のピークは、 H_2N -Thr-Xaa-Asn-Tyr-Asn-(Ser, Glu)-COOHであることが、明らかになった。同様に m/z 446から始まるペプチドのシリーズでは、Edman分解により質量数が87シフトしたので、N末端にセリンがあることが分かった。これより、 m/z 1055のピークのペプチドは、 H_2N -Ser-Thr-Xaa-Asn-Tyr-Asn-(Ser, Glu)-COOHであることが分かった。これらの結果は、上記のCIDスペクトルの解析結果(構造(2b))を支持した。部分加水分解とEdman分解の組み合わせにより、CIDスペクトルから得られたペプチド結合の方向性に関する知見を、より確実にすることができた。

4.3.3 環状ペプチドのイオン分解スキームとレトロシーケンスの判別

ペプチドのFAB-CIDスペクトル及び部分加水分解やEdman分解物のFABスペクトルから、グループI及びIIの環状ペプチドのアミノ酸配列が決定された。次に、決定された構造に基づいて帰属された、CIDスペクトルの娘イオンを合理的に説明できるイオン分解のスキームを検討した。主な娘イオンは、共通してアスパラギンをC末端に持っていることが分かった。これは、グループIのCIDスペクトルでは共通してプロリンをN末端に持つ娘イオンが強く観測された²⁰⁾ことと対照的である。(図4-11、スキーム1参照)グループIのペプチドは、他のアミノ酸よりもイミド窒素(-N-CO-)の塩基性が強いプロリンを含んでおり、この位置への選択的なプロトン付加により、Gln-Pro間のペプチド結合が選択的に開裂したものと推定される。これと類似の考え方で、グループIIのペプチドのイオン分解スキームについて、Asn-Tyrの間のペプチド結合が比較的選択的に開裂し、アスパラギンをC末端に持つ鎖状のアシリウムイオンが、C末端に電荷を保持しながら分解した考えられることでもできる。(図4-11、スキーム3参照)しかしながら、Asn-Tyrの間のペ

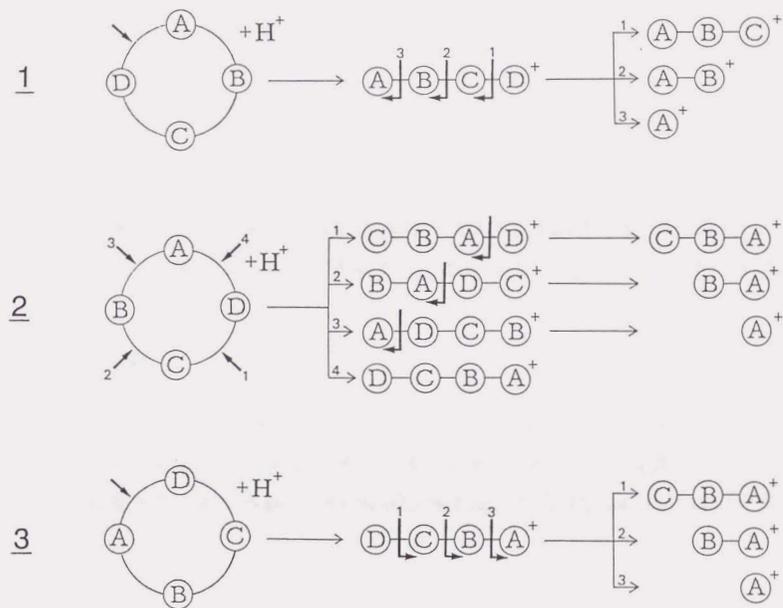


図4-11 FAB-CIDスペクトルにおけるグループI (1) 及びII (2, 3) の環状ペプチドのイオン分解スキーム

ペプチド結合が選択的に開環するとの報告は過去にない。別の可能性として、環状ペプチドの開環はいろいろなペプチド結合で起こり、その後のアシリウムイオンの分解がAsn-Tyrの間のペプチド結合での選択的に起こり、生成した断片のN末端側に荷電が残ったと考えることもできる。(図4-11、スキーム2参照) 図4-11のスキーム1と2のいずれのスキームから生成した娘イオンも、質量の上からは区別できないが(例えば、A-B-C⁺とC-B-A⁺、A-B⁺とB-A⁺は同じ質量)、元の構造は互いにレトロシーケンス(c(A-B-C-D)とc(D-C-B-A))である。どの様なスキームで分解したかが分からなければレトロシーケンスの区別は不可能であり、レトロシーケンスの判別を確実にするためには、環状ペプチドのイオン分解スキームに関する理解が進むことが重要である。最近、MS/MS/MS (MS³) といったより多段階のタンデム質量分析法によって、この問題を解決する試みが報告された²¹⁾。これに依れば、MS/MSにより生成したA-B-C⁺とC-B-A⁺等の娘イオンを、次の段階のCIDまたはCADパターンから区別できるので、イオン分解スキームに拘わらずレトロシーケンスの区別が可能となることが期待できる。

4.4 本章のまとめ

本研究で解析した抗菌性環状ペプチドは、どちらもイチュリンググループに属し、グループIはイチュリンA-2であると結論された。グループIIは、バチロマイシンL²²⁾ (c(Thr-Xaa-Asp-Tyr-Asn-Ser-Gln-Ser)) と極めて近く分子量は同じだが、下線のアミノ酸の側鎖のカルボキシル基のアミド化位置が異なる新規ペプチドであることが明らかになった。FAB-CIDスペクトルは、そうしたわずかな違いを明確に解析することができた。CAPSプログラムは、グループIのペプチドの様に、特定のペプチド結合で開裂したアシリウムイオンを経て娘イオンを生成するような場合には、鎖状ペプチドの拡張として利用できることが分かった。しかし、環状ペプチドのペプチド結合の方向性の決定にはやや困難があり、部分加水分解やEdman分解の併用が必要であることが分かった。

文献

1. a) K. Ishikawa and Y. Niwa, Presented at the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, (1988).
b) Y. Niwa and K. Ishikawa, Presented at the 11th International Mass Spectrometry Conference, Bordeaux, (1988).
2. a) K. Ishikawa, Y. Niwa, K. Hatakeda and T. Gotoh, *Org. Mass Spectrom.*, **23**, 290 (1988).
b) Y. Niwa, K. Ishikawa and T. Nishimura, Presented at the 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Tucson, (1990).
3. K. Ishikawa, Y. Niwa, K. Oishi, S. Aoi, T. Takeuchi and S. Wakayama, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, **19**, 395 (1990).
4. 丹羽、石川、化学技術研究所報告、**86**, 96-102 (1991).
5. P. Thibault, D. Faubert, S. Karunanithy, R. K. Boyd and C. F. B. Holmes, *Biol. Mass Spectrom.*, **21**, 367 (1992).
6. a) A. Ruegger, M. Kuhn, H. Lichti, H.-R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, A. von Wartburg, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1075 (1976).
b) D. H. Williams ed., *Specialist Periodical Reports: Mass Spectrometry*, **1**, Chapter 4, The Chemical Society, London, (1971).
7. R. J. Anderegg, K. Biemann, G. Buchi and M. Cushman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 3365 (1976).
8. M. L. Gross, D. McCrery, F. Crow, K. B. Tomer, M. R. Pope, L. M. Ciuffetti, H. W. Knoche, J. M. Daly and L. D. Dunkle, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5381 (1982).
9. K. Eckart, *Mass Spectrom. Rev.*, **13**, 23 (1994).
10. S. Wakayama, F. Ishikawa and K. Oishi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 939 (1984).
11. T. Namai, K. Hatakeda and T. Asano, *Tohoku J. Agric. Res.*, **36**, 1 (1985).
12. G. E. Tarr, *Anal. Biochem.*, **63**, 361 (1975).

12. J. Meili and J. Seibl, *Org. Mass Spectrom.*, **19**, 581 (1984).
13. R. K. Boyd, *Mass Spectrom. Rev.*, **13**, 359 (1994).
14. A. Isogai, S. Takayama, S. Murakoshi and A. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3065 (1982).
15. K. Eckart, H. Schwarz, K. B. Tomer and M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 6765 (1985).
16. K. Ishikawa and Y. Niwa, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, **13**, 373 (1986).
17. D. T. Elmore, *Peptides and Proteins*, Cambridge University Press, London (1968).
18. S. Naylor, A. F. Findeis, B. W. Gibson and D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6359 (1986).
19. F. Peypoux, M. Guinand, G. Michel, L. Delcambe, B. C. Das and E. Lederer, *Biochemistry*, **17**, 3992 (1978).
20. K. B. Tomer, F. W. Crow, M. L. Gross and K. D. Kopple, *Anal. Chem.*, **56**, 880 (1984).
21. C. Lange, C. Loutelier and R. S. Bordoli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 960 (1994).
22. F. Peypoux, M. T. Pommier, B. C. Das, F. Besson, L. Delcambe and G. Michel, *J. Antibiot.*, **37**, 1600 (1984).

第5章 エレクトロスプレーイオン (ESI) 化によるペプチド 及びタンパク質の質量分析法¹⁾

5.1 緒言

正の高電圧をかけた毛細管に微量の電解質を含む水溶液を通じると、電場から受ける力により陽イオンが毛細管の先端に集められ、円錐形のTaylorコーンが形成される。コーンの先端では局所的な高電場が生じ、電場による引き出しの力が液体の表面張力を上回ると、1 μ m程度の大きさの帯電した液滴が放射される。この「エレクトロスプレー現象」を利用した気相イオン化に関する研究は1960年代にさかのぼるが²⁾、1988年に分子量数万のタンパク質のエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization, ESI) 質量スペクトルが発表されて以来、高分子のイオン化法として注目されるようになった³⁾。ESI法は、複数のプロトンが付加した分子 ([M+nH]ⁿ⁺、以下では、単に「多価イオン」と略す) の生成により、装置の質量範囲をはるかに越えた高分子量のタンパク質でも測定できることに加え、ソフトなイオン化法でありフラグメント生成がほとんど無いこと等、優れた特徴を備えていることが明らかとなった⁴⁾。タンパク質の分子量は電気泳動法、ゲルろ過法、低角レーザー光散乱法、遠心分離法等によって測定されてきたが、いずれも分子量そのものよりも分子の立体的広がりに依存した方法であるため、誤差が数%に達することがある。これに対し質量分析法は、絶対的な分子量を測定するため、原理的に遥かに高精度・高分解能の測定が可能となった。

タンパク質は、固体状態では互いに多数の水素結合のネットワークによって結びついているため、分子同士を分離するためには、分子構造が破壊されるよりも遥かに大きなエネルギーを与えなくてはならない。しかし、希薄な溶液中では、多数の溶媒分子がタンパク質を溶媒和するため、タンパク質間の直接の水素結合は殆ど存在しないと考えられる。このように、試料分子を溶媒中で分子分散させることが、ESIイオン化を可能とする基本的な条件である。次に、タンパク質の精密な分子量を測定するためには、溶媒和したタンパク質から溶媒分子や微量の塩等の低分子を全て引き剥がして、最終的に単分子状のイオンを作り出すことが必要である。この脱溶媒過程では、溶媒の蒸発による液滴の粒径の減少に伴って、

静電噴霧によって付与された電荷が濃縮され、クローン反発力による液滴の分断 (Coulomb explosion) や液滴表面の高電場によるイオンの脱離 (Field emission) といった、イオン化現象に直接結びつく重要な現象が起きるものと考えられている。(図5-1参照) 脱溶媒には、噴霧室内の温度や気流、大気圧-真空の境界領域の温度や圧力、ここを通過するイオンの運動エネルギーや滞在時間等種々の条件が関わっている。また、精密な分子量を測定するためには、安定したイオン化によりS/N比が高いスペクトルが得られることが必要であり、安定したスプレーを維持することが重要である。このためには、スプレーニードルに供給する試料溶液の流速、電気伝導度、表面張力等に制限がある。例えば、流速は40 μ l/min以下、電気伝導度は5mM KCl水溶液相当以下である必要がある⁵⁾。また、溶液には水とメタノール等の親水性有機溶媒の混合物が用いられるが、水の割合が約80%以上では表面張力の増加のためスプレーが困難になる。タンパク質等分子内に複数の塩基性部位を持った化合物では、多価イオンが生成するが、流速や電気伝導度の増加による液滴の粒径の増加や帯電率の減少は、多価イオン化の減少やイオン化効率の低下の原因となる。

本研究では、以上のようなESI法の理論的基礎を踏まえ、微量タンパク質の精密な分子量測定により、遺伝子組み換え等によって導入されたアミノ酸置換等の同定を可能とするESIタンデム四重極型質量分析計を試作した。イオン源や大気圧-真空インターフェイス部の構造を最適化し、ESI-MS法によりどの程度の測定感度や分子量決定精度が得られるかを検討した。

5.2 実験

5.2.1 質量分析装置

Extrel社製タンデム四重極質量分析器(質量範囲1~2,000)に筆者らが設計・製作したESIイオン源、及びパーソナルコンピュータ(NEC社製PC-9801DA)による装置制御・データ処理装置を接続し、ESI-MS/MS装置(図5-2)を試作した¹⁾。タンパク質及びペプチド試料は、酢酸(AcOH)/メタノール(MeOH)/水(1:499.5:499.5、以下すべて体積比)溶液に溶解し、減圧下でテフロン製サンプルループ(内径0.25mm、外径1.6mm、容量20 μ l)に吸引した。試料溶液は、キャリア溶媒としてAcOH/MeOH/水(1:499.5:499.5)溶液を充填したISCO社製100D型シリンジボ

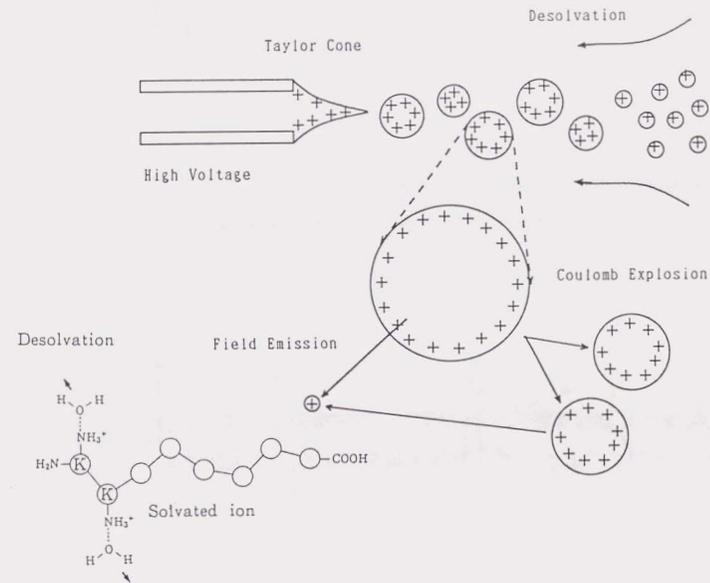
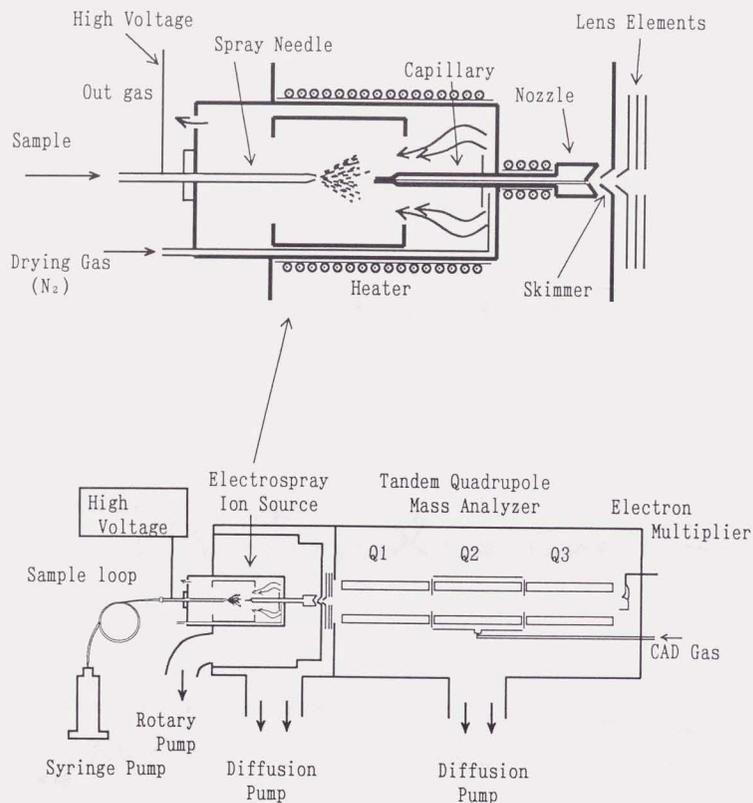


図5-1 ESI法によるペプチド、タンパク質のイオン化のスキーム

a) Electrospray Ion Source



b) ESI Tandem Quadrupole Mass Spectrometer

図5-2 ESIイオン源 (a) 及びESIタンデム四重極質量分析計 (b)

ンプを用いて、流速2 μ l/minでイオン源に供給した。スプレーニードルは、先端を細く削り、腐食防止のための白金チューブ（内径0.35mm、外径0.5mm、長さ4mm）を取り付けたステンレスチューブ（内径0.5mm、外径1.6mm）の鞘と、先端が白金チューブよりも約0.3mm突き出すように長さを調節したフューズドシリカキャピラリー（FSC）チューブ（内径0.1mm、外径0.35mm）の2重管構造とした。FSCチューブから流出する試料溶液を、ニードルの鞘に印加した4~5kVの高電圧により静電噴霧した。帯電液滴は、65~70°Cの窒素ガスの対向流（1~2l/min）により脱溶媒し、大気圧下で生成した帯電液滴は、ステンレスキャピラリー（内径0.5mm、外径1.6mm、長さ80mm）からサンプリングし、差動排気により質量分析部へ導入した。ノズルスキマ間の中間圧力領域でイオンを加速し、透過率を向上させたり、弱いガス衝突により脱溶媒を促進するため、キャピラリーはガラス管（内径2mm、外径6mm）の鞘で絶縁し、50~60Vの加速電圧を印加した。また、脱溶媒や多価イオン化の促進のため、噴霧室及びキャピラリー部分は、テープヒーターによって約100°Cに加熱した。

本装置は、MS/MS測定が可能であるが、本章の実験では、初段の四重極アナライザーをRF-DCモードで、2・3段目のアナライザーをRFモードで使用し、通常のESIスペクトルを測定した。スペクトルは、質量範囲1000当たり2~120秒のスキャンを行い、パルスカウンティング法により測定した。四重極質量分析計に別途製作したFABイオン源を装着し、質量分解能を確認したところ、分子量1,500以上では同位体を完全に分離できなかった。ペプチドやタンパク質は、殆どがこれ以上の分子量であるので、 m/z 当たり4~8点の強度データを取り込み、未分離の同位体ピークプロファイルの重心位置から、同位体の寄与を平均した分子量（Averaged molecular mass, Mr）を算出した。質量較正には、ニワトリ卵白リゾチーム（hen-egg lysozyme, HEL, Mr 14,306.1）の多価イオンピークを用いた。

5.2.2 ペプチド、タンパク質及び溶媒

アンギオテンシン I（angiotensin I, ANGI）、ダイノルフィン 1-13（dynorphin (1-13), DYNR）は、（株）ペプチド研究所から購入しそのまま使用した。ウシインシュリン（bovine insulin, BI）、シトクロムc（cytochrome C, CYT）、HEL、ヒトリゾチーム（human placental lysozyme, HLY）、ヒトヘモグロ

ピン (human hemoglobin, HHM)、ウシアルブミン (bovine serum albumin, BA) は、Sigma社から購入した。BAは、Millipore社の遠心限外濾過フィルタ (ウルトラフリーC3、排除限界分子量1万) で、脱塩後使用した。AcOH及びMeOHは、半井化学 (株) の高純度試薬 (SPグレード) を、水は超純水 (Millipore社製Milli-Q Jr.) により精製したものを使用した。

5.3 結果と考察

5.3.1 標準的なペプチド、タンパク質のESIスペクトル

図5-3は、分子量1,000から数千のペプチドのESIスペクトルである。a)のANGI (MW 1,295.7、DRVYIHPFHL、下線は塩基性アミノ酸。以下同じ) では1から3価、b)のDYNR (MW 1,603.0、YGGFLRRIRPKLK) では2から4価、c)のBI (MW 5,733.6) では4から6価のプロトンが付加した $[M+nH]^{n+}$ (図中では nH^+ と略記) が観測され、フラグメントイオンは殆ど観測されなかった。単一成分のスペクトルでも、多価イオンの価数の分布による複数のピークが現れることは、ESIスペクトルの特徴である。ペプチドの分子量と共に価数も増加するため、 m/z 値は僅かしか増加しないことが分かる。質量範囲の小さな四重極質量分析計でもタンパク質などの高分子が測定できる点で有利である。価数の上限は、概ね塩基性アミノ酸とN末端のアミノ基の数の和 (ANGI:4、DYNR:6、BI:8) で制限されていることが推測された。ANGIのスペクトルでは、多価イオンの同位体ピークが分離できたので、それらの間隔の逆数として容易に価数が求められた。例えば、 m/z 649付近のピークは、1Daの間に2本の同位体ピークが見られ、 m/z 433付近のピークは同じく3本の同位体ピークが見られることから、それらのイオンがそれぞれ2及び3価であることが明確に判別できた。DYNRでは、2価と3価イオンでは、3価イオンの方がややピーク幅が狭いことが読みとれたが、明確な価数の判定は困難だった。分子量1万以上のタンパク質では、 ^{12}C や ^{14}N 、 ^{16}O 等1種類の同位体のみを含むピーク

(Monoisotopic ion peak) の強度は測定が困難な程減少するので、分子量をMrで読みとる方が精度を得るために有利である。図5-4の分子量1万を越えるタンパク質では、各多価イオンピークの重心位置の m/z 値から、共通のMrを与える様な連続した価数を探す方法で価数を帰属した。また、単純には、任意の2本のピークの m/z 値から立てた次の連立方程式を解いて、ピークの価数を求めることもできる。

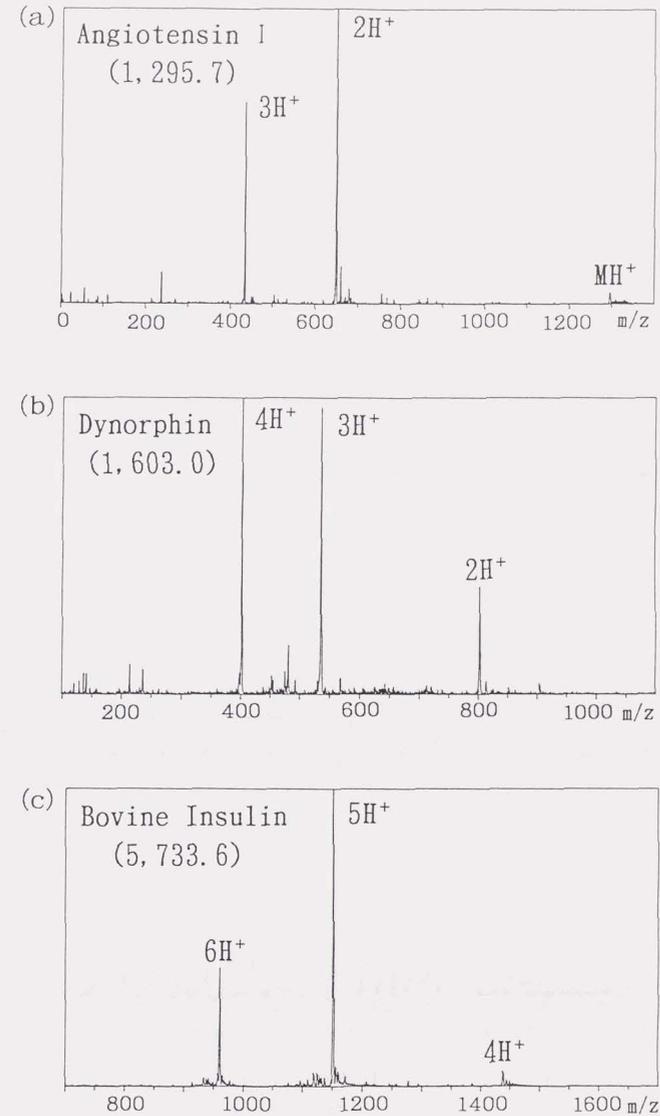


図5-3 分子量1,000から数千のペプチドのESIスペクトル
 a)アンギオテンシン I (DRVYIHPFHL, MW 1,295.7、ANGI)、
 b)ダイノルフィン 1-13 (YGGFLRRIRPKLK, MW 1,603.0、DYNR)、
 c)ウシインシュリン (MW 5,733.6、BI)

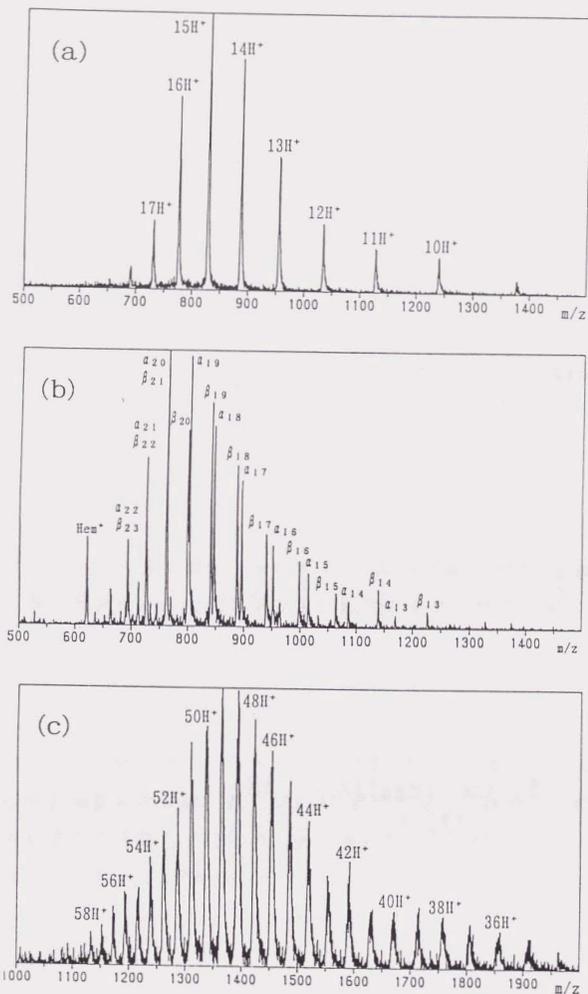


図5-4 分子量1万を越えるタンパク質のESIスペクトル
 a) シトクロムc Mr 12,360、試料量1.6pmol
 b) ヒトヘモグロビン Mr 15,126(α)、15,867(β)、試料量1.3pmol
 c) ウシアルブミン Mr 66,430、試料量3.0pmol

$$m_n = (Mr+nH)/n$$

$$m_{n+1} = (Mr+(n+1)H)/n+1$$

ここで、 m_n は2本のピークの内の高質量側のピークの m/z 値、 n はそのピークの価数、 H は水素の同位体平均原子量(1.00794)である。分子量約66,000のBAでは、58価までのイオンが観測され、スペクトルから求められた Mr (66,582)は、従来報告されていたアミノ酸配列から計算した値(66,266)より、300Da前後大きかった。これは、155位のチロシン(残基質量数163)の次にもう1残基のチロシンが読み落とされていたためであることが明らかにされた⁹⁾。ESI-MSによる精密な分子量測定がきっかけで、従来報告されていた一次構造の誤りが訂正された例である。

(b)のHHMでは、 α (15,126)と β (15,867)の2本の鎖が別れた状態で測定された。測定に使用した溶媒は、50%程度のMeOHを含んでいたため、変成してユニットが分離したものと考えられる。多価イオンの価数の分布による各成分が複数のピークとして現れるため、タンパク質が多成分になるに従ってスペクトルが複雑になるが、各多価イオンピークの m/z 値が正確に測定されれば、価数を決定して各成分の分子量を求めることが可能である。測定に用いたタンパク質の量は、CYTで1.6pmol、BAで3pmolであり、分子量の増加による測定感度の低下は殆ど見られなかった。

5.3.2 タンパク質の多価イオン化におけるイオン化条件や立体構造の関係

図5-5は、50%MeOH中に溶解したHELのESI-MSにおける価数分布とイオン化室の温度との関係である。イオン化室の加熱を行わなかったとき(a)には、8または7価を中心に11価までのイオンが観測された。脱溶媒を促進するため、イオン化室を100°C程度に加熱した場合(b)には、11価を中心に13価までのイオンが観測され、明らかに多価イオン化の促進が見られた。溶液中のタンパク質は、ペプチド鎖の折れ畳みにより、一定の熱力学的安定構造を取っている。ESI-MSによって生成した多価イオンの立体構造を直接観測することは困難であるが、溶媒がない単分子状態であることや、多価イオン化によるクーロン相互作用等の影響により、溶液中での立体構造からは大きく変化していることが推測される。HELは、4個の分子内ジスルフィド結合による立体的制約のため、ESIイオン化の過程でも比較的球状に近い構造を取り、内部に隠れた塩基性アミノ酸へのプロトン付加が起こ

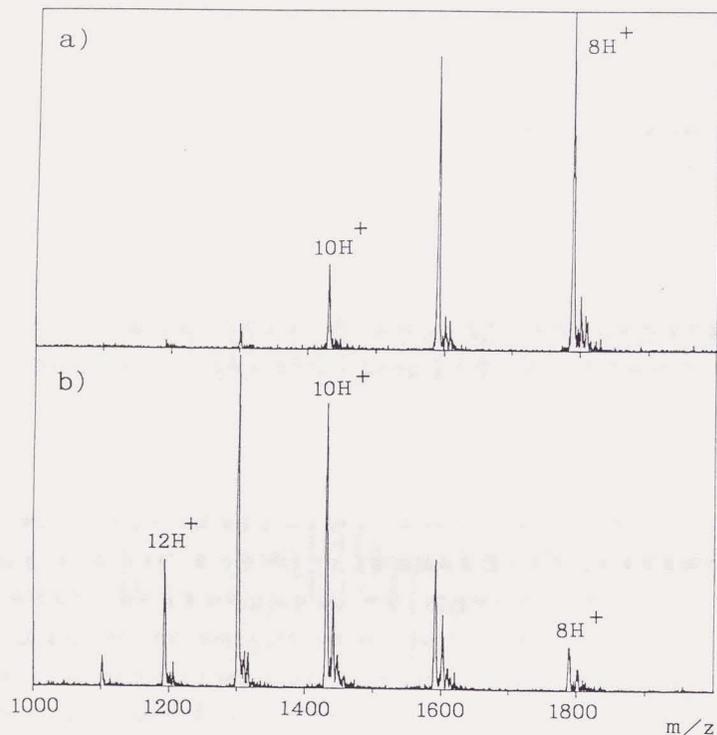


図5-5 ニワトリ卵白リゾチームのESIスペクトルにおけるイオン化室の温度の影響 ((a) 室温、(b) 100°C)

りにくいことが推測される。図5-5(b)では、イオン化室の加熱によってHELの立体構造がより大きく変化し、多価イオン化が進んだことが考えられる。以下の測定では、脱溶媒と多価イオン化の促進のため、イオン化室は100°C程度に加熱した。

また、HLYについて分子内の4個のジスルフィド結合を還元カルボキシアミドメチル化によって切断した場合について、同じイオン化条件での荷電分布を比較した。(図5-6)還元前のHLY (a)では15価までの多価イオンが観測されたのに対して、還元後 (b)では21価まで観測され、これはHLYに含まれる塩基性アミノ酸とN末端のアミノ基の数の和に一致した。ジスルフィド結合の切断により立体的制約が解消され⁷⁾、塩基性部位がタンパク質表面に露出して、プロトン付加が進んだものと推測される。

5.3.3 ESI-MSによるタンパク質の測定感度、質量決定精度

ESI-MSによるタンパク質の測定感度、質量決定精度を調べるため、AcOH/MeOH/水 (1:499.5:499.5) 混合溶媒中のHELの濃度を、徐々に低下させて測定したところ、 1.5×10^{-8} Mまで測定可能だった。(図5-7)この時の全イオン強度 (8~13 価のイオン強度の和) は542cpsで、6分の測定時間内に導入した試料量は18fmol (1.8×10^{-14} mol) だった。通常のプロテインシーケンサによる解析に必要とされる量 (~数pmol) に比べ、約2桁小さいことが分かった。図5-8に導入した試料濃度と観測された多価イオン強度の和の関係を示した。HEL及びBIの場合、濃度 10^{-9} から 10^{-7} Mの範囲ではイオン強度はほぼ直線的に増加したが、それ以上の濃度ではやや頭打ちの傾向が見られた。HELの場合、導入した分子の数に対する検出したイオンの数の比は約 10^{-5} だった。四重極アナライザーの透過率を10%とすると、大気圧-真空インターフェイス部のイオン取り込み効率は少なくとも 10^{-4} 以上と推定された。また、HELの分子量決定精度は、 1.5×10^{-8} M (2分間の測定中に導入した試料量 = 60fmol) で ± 3 、 1.5×10^{-7} M (同 = 0.6pmol) 以上で ± 2 であり、分子量からアミノ酸置換を同定するのに十分な精度が得られることが確認された。

HELのアミノ酸配列から得られた化学式 ($C_{613}H_{950}N_{192}O_{186}S_{10}$) から、同位体分布を算出した。(図5-9) HELの11価イオンピークの理論的なピーク幅は0.7で、ESIスペクトルで測定された半値幅は1.6だった。測定分解能は、1,000程度で、同位体ピークの分離に必要な分解能 (約14,000) よりかなり低いことを考慮すると、

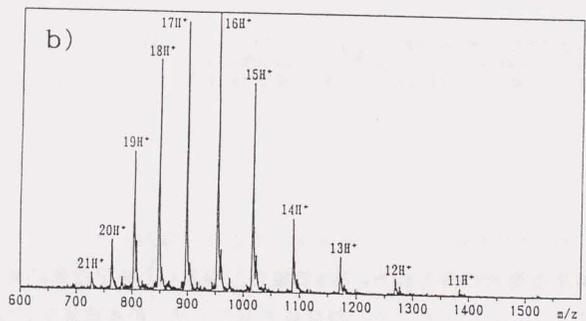
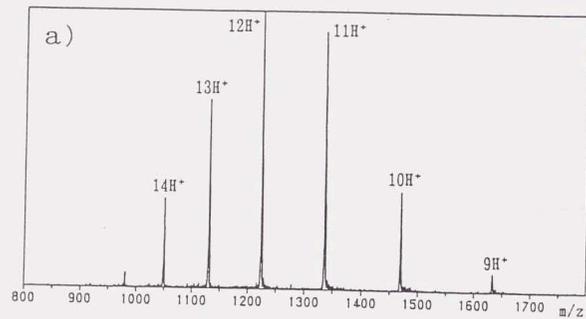


図5-6 ヒトリゾチームのESIスペクトルにおけるジスルフィド結合の還元の影響 ((a)還元前、(b)還元カルボキシアミドメチル化後)

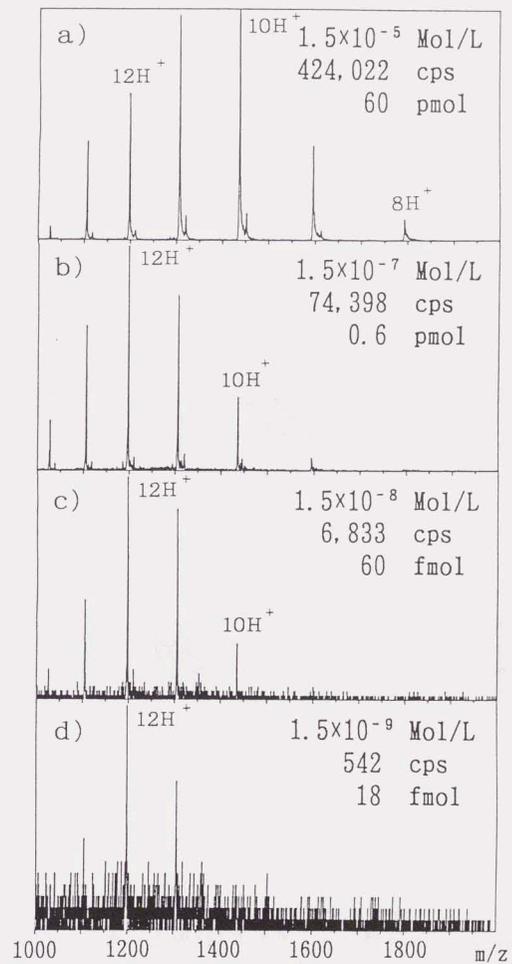


図5-7 ESI-MSによるタンパク質の測定感度
試料：ニワトリ卵白リゾチーム
溶媒：酢酸/メタノール/水=1:499.5:499.5

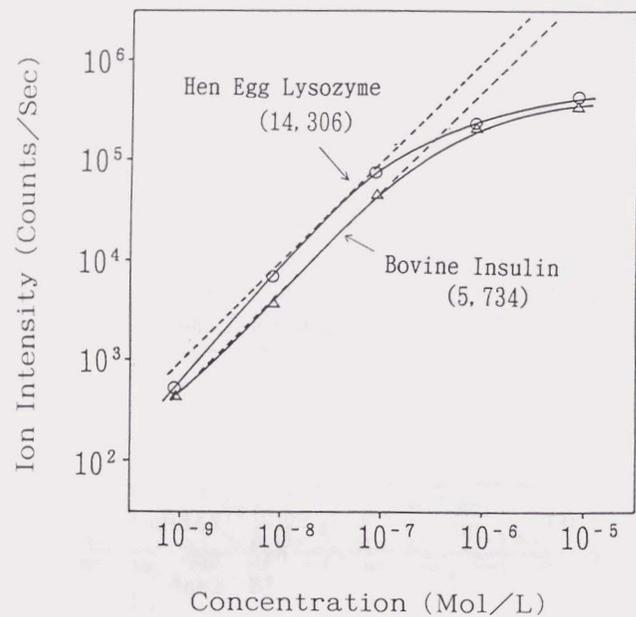


図5-8 ESIイオン源に導入した試料の濃度と観測された多価イオン強度の和の関係
 試料：ニワトリ卵白リゾチーム、ウシインシュリン
 溶媒：酢酸/メタノール/水=1:499.5:499.5

hen egg lysozyme ($C_{613}H_{950}N_{192}O_{186}S_{10}$; 14,306.1)

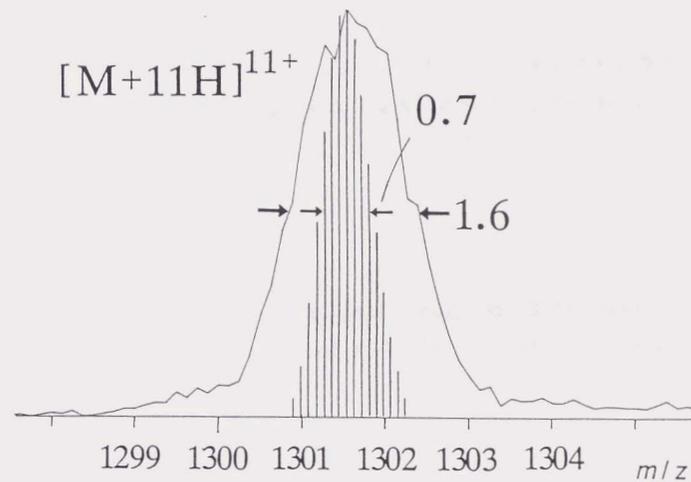


図5-9 ニワトリ卵白リゾチームのESIスペクトルで観測された11価イオンのピーク幅と理論的なピーク幅の比較

実測のピーク幅は妥当であると考えられる⁸⁾。本研究で用いたESIイオン源では、ほぼ完全な脱溶媒が達成できており、微量の無機塩等のアダクトによる影響は無視できると考えられた。また、大気圧-真空インターフェイス領域でのガス衝突による、タンパク質からの低分子グループ(H₂O等)の脱離等も殆ど起きていないことが確認された。

5.4 本章のまとめ

本研究で試作したESIイオン源において、イオン化条件やイオンの取り込み条件を最適化した結果、溶媒和したタンパク質から溶媒分子や微量の塩等の低分子をほぼ完全に分離し、単分子状のイオンを高真空中に導入し質量分析できることが分かった。標準的なペプチドやタンパク質の測定感度は、プロテインシーケンサによる解析に必要とされる量に比べて約2桁高く、分子量決定精度は0.01% (分子量1万当たり±1Da程度の誤差) が得られた。これより、本研究で開発したESI-四重極型質量分析計を用いて、分子量1万程度のタンパク質のアミノ酸置換を同定できるとの見通しが得られた。

文献

1. a) K. Ishikawa and Y. Niwa, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **22**, 25 (1990).
b) Y. Niwa and K. Ishikawa, *Peptide Chemistry*, 119 (1991).
c) 丹羽、石川、化学技術研究所報告、**86**, 96 (1991).
2. a) M. Dole, R. L. Hines, L. L. Mack, R. C. Mobley, L. D. Ferguson and M. B. Alice, *Macromolecule*, **1**, 96 (1968).
b) M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, and M. B. Alice, *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240 (1968).
3. a) C. K. Meng, M. Mann, J. B. Fenn, Presented at the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco, (1988).
b) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse, *Science*, **246**, 64 (1989).
4. a) R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman and H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.*, **10**, 359 (1991).
b) 平岡賢三、質量分析、39巻、3号、97 (1991).
c) P. Kebarle and L. Tang, *Anal. Chem.*, **22**, 972A (1993).
5. C. K. Meng, M. Mann, and J. B. Fenn, *Z. Phys. D. Atoms Molecules Clusters*, **10**, 361 (1988).
6. 古屋、明石、平山、福原、1991年度質量分析連合討論会(東京)講演要旨集 p216 (1991).
7. J. A. Loo, C. G. Edmands, H. R. Udseth and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **62**, 693 (1990).
8. J. R. Chapman, R. T. Gallagher, E. C. Barton, J. M. Curtis and P. J. Derrick, *Org. Mass Spectrom.*, **27**, 195 (1992).

第6章 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法による高速液体クロマトグラフィー (LC) と質量分析 (MS) 法の直接結合¹⁾

6.1 緒言

質量分析 (MS) 法とガスクロマトグラフィー (GC) との直接結合である GC/MS 法は、高分離能のキャピラリーカラムや高速スキャンが可能な質量分析装置の開発により、複雑な混合試料の一斉分析法として広く利用されている²⁾。緒論で述べたように、ペプチドやタンパク質のアミノ酸配列解析においても、1980年以前には、タンパク質を部分加水分解等で断片化して得たペプチド混合物を揮発性の誘導体に変換し、GC/MS法による測定が行われた。しかし、誘導体化反応が煩雑なことや比較的多量の試料が必要とされる等の難点があった。質量分析におけるイオン化法の進歩により、無修飾のペプチドやタンパク質の測定が可能となったことから、これらの不揮発性化合物の精密な分離に適用できる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と MS 法の直接結合である LC/MS 法の研究開発が推進されている³⁾。

前章の検討結果から、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法により分子量数万のタンパク質をイオンに変換し、質量分析可能であることが分かった。多価イオンピークの解析により、0.01%程度の誤差で同位体平均分子量 (Mr) を決定でき、ピコ (10^{-12}) モルレベルの遺伝子組み換えタンパク質の、アミノ酸置換等を同定できるとの見通しが得られた。しかし、生体由来の実試料の測定に適用する際には、以下のような問題点もある。ペプチドやタンパク質の ESI スペクトルでは、フラグメント生成は殆ど見られなかったが、一つの成分が価数の分布による複数のピークとして現れることや分子量が大きく異なる成分も、価数の増加により、近接した m/z 範囲に測定されることが分かった。このため、複数の成分を含む試料では、多数のピークが観測されて、スペクトルが込み合う傾向が見られた。また、ESI イオン化は、無機塩、界面活性剤その他の共存物質の影響を受け易いことが知られている⁴⁾。現実のタンパク質試料では精製過程で塩類が加えられたり、酵素などの失活を防ぐためのバッファー中で保存されるため、大量の電解質が共存することが多いが、透析や限外ろ過法による微量タンパク質試料の脱塩では、膜へ

の吸着によるロスが大きい。ESI-MS の高感度を生かすためには、ESI-MS 測定に要する試料量 (ピコモル程度) と同等スケールで、効率よく脱塩できる方法が必要である。ESI-MS 法を ESI-LC/MS 法へと拡張することにより、これらの問題が解決され、実試料の測定においても、ESI-MS 法の有用性を発揮できることが期待される。

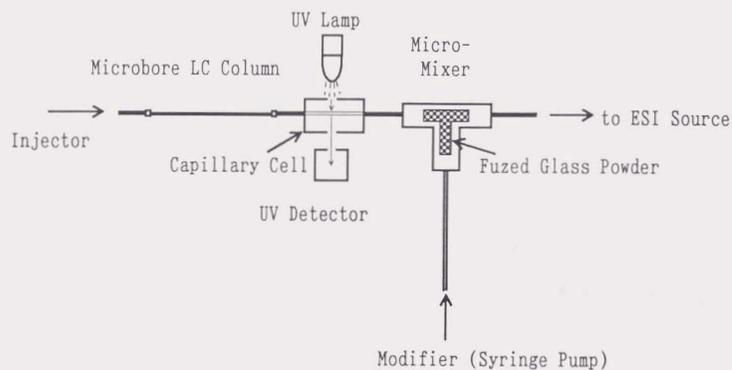
LC/MS 法は、GC/MS 法と比較して、一般に質量分析計の真空系に与える負担が大きいことが、LC/MS インターフェイスの技術的困難の一因になっている。例えば、キャピラリー GC のキャリアーガス流速は $1\text{ml}/\text{min}$ 程度であり、全量をイオン源の高真空中に導入可能である。一方、LC の溶離液の標準的流速も $1\text{ml}/\text{min}$ 前後であるが、これは大気圧下のガスに換算すると、 $1\text{l}/\text{min}$ 以上に相当する。ESI 法では、溶液状態から直接にイオン化を行うので、原理的に LC/MS インターフェイスとして適している。また、イオン化が、大気圧下での脱溶媒と平行して行われるため、LC の溶離液の一部しか高真空へ流入せず、真空系への負担が少ない等の利点がある。一方、イオン源に導入できる液体の流量や電気伝導度、表面張力等に制約があり、LC と ESI の操作条件を適合させるための、インターフェイスが必要である。本章では、塩類等を含むタンパク質混合試料の高感度測定を可能とする ESI-LC/MS インターフェイスの開発を目的とし、溶離液に添加するトリフルオロ酢酸 (TFA) によるイオン化効率の低下や、グラジェントによる表面張力変化によるスプレーの不安定化等の問題について検討した。特に、カラム出口 (ポストカラム) で第三成分 (修飾液、モディファイア) を混合することによって、溶離液の物理化学的性質を、ESI に適した条件に修飾する方法を試みた。

6.2 実験

6.2.1 LC/MS 装置

Extrel 社製タンデム四重極質量分析器をベースに、前章で試作した ESI-MS/MS 装置 (図5-2) に、マイクロスケールの逆相 LC 装置を接続し、ESI-LC/MS/MS 装置 (図6-1) を開発した¹⁾。LC の移動相には、0.1% の TFA を含むアセトニトリル (ACN) /水系を用い、2台のポンプ (日本分光工業 (株) 製 880-PU 型) を用いる高圧グラジェントを行った。移動相の流速は $0.2\text{ml}/\text{min}$ とし、ACN 濃度を 0 から 100% の範囲を毎分 1 から 4% の勾配でグラジェントした。インジェクター (Rheodyne 社製 752

a) ESI-LC/MS Interface



b) ESI-LC/MS/MS Instrument

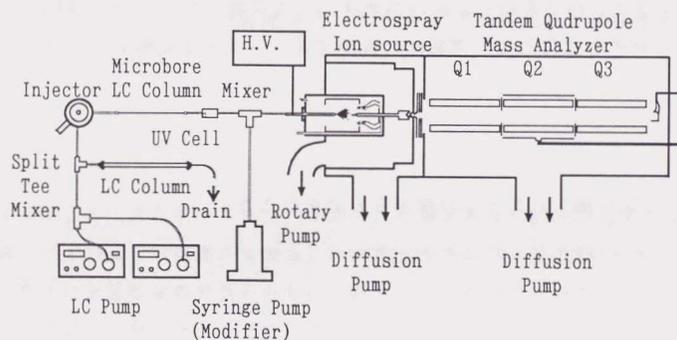


図6-1 ESI-LC/MSインターフェイス (a) 及びESI-LC/MS/MS装置 (b)

0型、容量0.5 μ l)の手前でオクタデシルシリカ(ODS)カラム(日本分光工業(株)製 Biofine RPC-SC18、内径4.6mm、長さ250mm)でスプリットを行うことにより、マイクロカラム(内径0.5mm、長さ150mmのフューズドシリカキャピラリー(FSC)チューブに粒径5 μ m、細孔径300ÅのODSを充填したもの)への流量を3 μ l/minに調節した⁵⁾。溶離液は、ポリイミドの外皮を剥がした内径0.05mmのFSCチューブをセルとするUV検出器(日本分光工業(株)製875-CE型、波長210nm)とモディファイアを添加するためのマイクロミキサーを経て、スプレーノードルに導入した。(図6-1(a))ポストカラムモディファイア(2-メトキシエタノール(MTET)/メタノール(MeOH)=1:1、以下すべて体積比)は、ISCO社製100D型シリンジポンプを用いて流速3 μ l/minで供給した。マイクロミキサーは、内径0.3mm、外径1.6mm、長さ20mmのガラスライニングステンレスチューブに、平均粒径60 μ mのガラスビーズを充填・熔融したもので、デッドボリュームは約2 μ lである。ESI-LC/MSスペクトルの測定では、初段の四重極アナライザーをRF-DCモードで、2・3段目のアナライザーをRFモードで使用した。スペクトルは、質量範囲1000あたり2~120秒のスキャンを行い、パルスカウンティング法により測定した。キャリブレーション等の測定では、20 μ lのサンプルループを介して、ISCO社製100D型シリンジポンプにより、試料溶液を直接ノードルに供給した。キャリアーには酢酸(AcOH)/MeOH/水(1:499.5:499.5)溶液を用い、流速は2 μ l/minとした。

6.2.2 ペプチド及びタンパク質

タンパク質標準試料として、市販のニワトリ卵白リゾチーム(hen egg lysozyme, HEL, Mr 14,306.1, Sigma社製)、ヒトリゾチーム(human placental lysozyme, HLY, Mr 14,692.7, Green Cross社製)、ウシインシュリン(bovine insulin, BI, Mr 5,734.0, Sigma社製)、シトクロムc(cytochrome C, CYT, Mr 12,360, Sigma社製)及びウシアルブミン(bovine albumin, BA, Mr 66,430, Sigma社製)を用いた。

小麦胚芽アグルチニン(wheat germ agglutinin, WGA, Mr ~17,000, Sigma社製)は、アミノ酸配列が僅かに異なるWGA1、WGA2及びWGA3の混合物である。HELやWGAは、分子内に4個及び8個のジスルフィド結合を含むため、酵素消化に先立って7Mグアニジン塩酸塩、10mM EDTA、0.5M Tris-HClバッファー(pH8.5)中でヨード

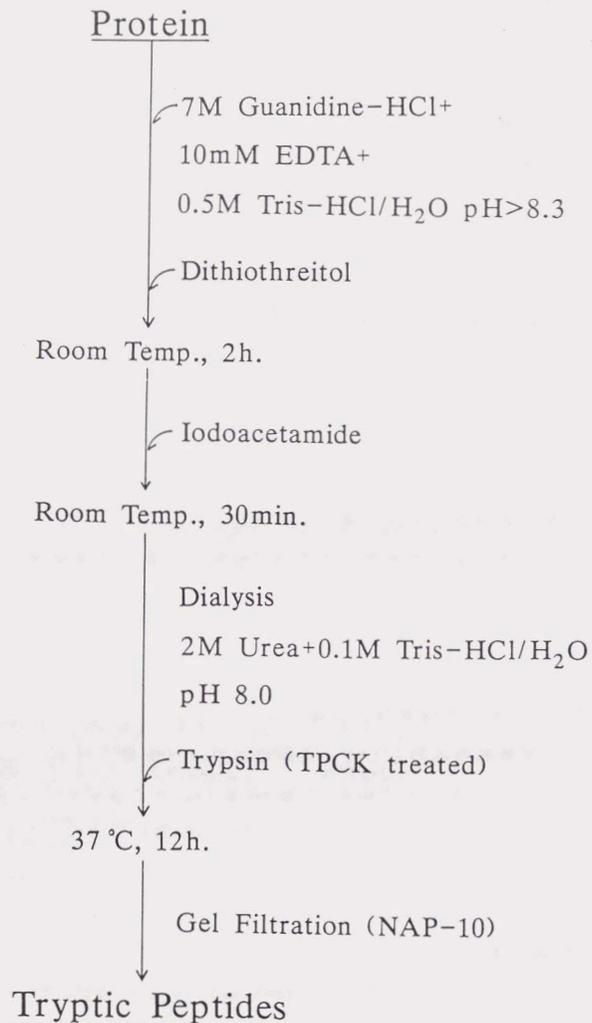


図6-2 タンパク質の還元カルボキシアミドメチル化反応及びトリプシン消化反応

アセトアミドにより、還元カルボキシアミドメチル化反応を行った(図6-2)。タンパク質は2M尿素、0.1M Tris-HCl (pH8.0) 中に透析し、トリプシン (Sigma社製、TPCK処理済み、酵素/基質比 1:10) で37°C, 12時間消化した。消化ペプチド溶液は、ゲルろ過カラム (Pharmacia社製、NAP-10) により30% AcOH水溶液に置換し、ESI-MS及びESI-LC/MS測定に用いた。

6.3 結果と考察

6.3.1 ESI法によるLC/MSインターフェイスの検討

6.1の緒言で述べたように、ESI法のイオン化効率は無機塩等の影響を受け易い。図6-3(a)は、AcOH/MeOH/水 (1:499.5:499.5) 溶媒中に 1.4×10^{-6} Mの濃度に調製したHLY、(b)は同一試料に50mM Na₂HPO₄、250mM NaClの塩を添加したときのESIスペクトルである。塩を添加した試料では、元のタンパク質の多価イオンピークが消滅し、Naと溶媒のクラスターと考えられる規則的なピークのみが現われている。(b)の試料に、10から100倍量の50% MeOH水溶液を加え、塩濃度を希釈しても、塩とタンパク質の相対量比が変わらないため、殆ど効果がなかった。生体由来の遺伝子組み換えタンパク質等で、イオン交換クロマトグラフィー等で精製を行った場合、上記のような高濃度の塩が添加されることが多く、 μ lスケールの試料から回収率よく脱塩できる逆相LCとの直接結合が必要である。しかし、ESI法でスプレーできる液体の量は、通常のLCの流速 (1ml/min前後) の10~100分の1に過ぎない。ポストカラムスプリットは最も単純な方法であるが、試料の利用効率は、スプリット比を越えることができない。ネブライジングガス等によりスプレーを補助して噴霧できる液体の量を増加させる方法⁶⁾も研究されているが、ESI法の感度は試料量よりも試料濃度に依存する傾向があるので、流量の増加は試料の利用効率の低下をもたらす。本研究では、タンパク質の高感度測定を目的として、マイクロカラムを用いることにより、流速をESIの最適条件 (2~3 μ l/min) に適合させ、溶離液全量をイオン源に導入する方法を採用した。

始めに、通常のESI測定で用いられる溶媒条件でLCを行い、LCと結合した場合にも、ESI法本来の高感度が得られるかどうかを調べた。移動相は、0.1% AcOHを含むMeOH/水の溶媒系を用い、MeOH濃度を40%で10分間保持した後、30分間で80%までグラジエントした。流速は3 μ lとし、溶離液は全量ESIイオン源に導入した。

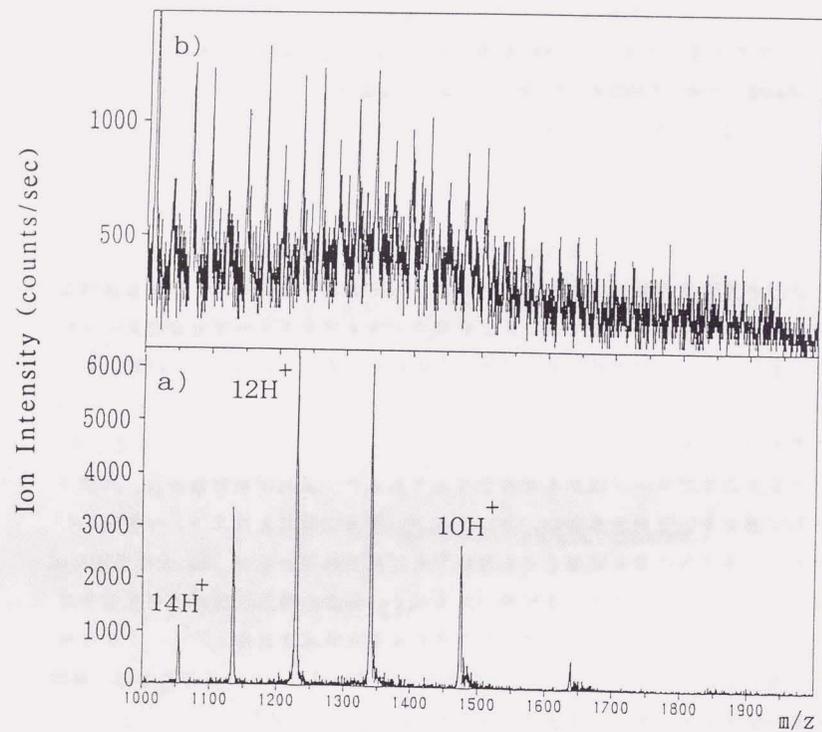


図6-3 ESIスペクトルにおける無機塩の影響
 (a)無添加、(b)50mM Na₂HPO₄、250mM NaCl
 試料：ヒトリゾチーム、 1.4×10^{-6} M
 溶媒：酢酸/メタノール/水=1:499.5:499.5

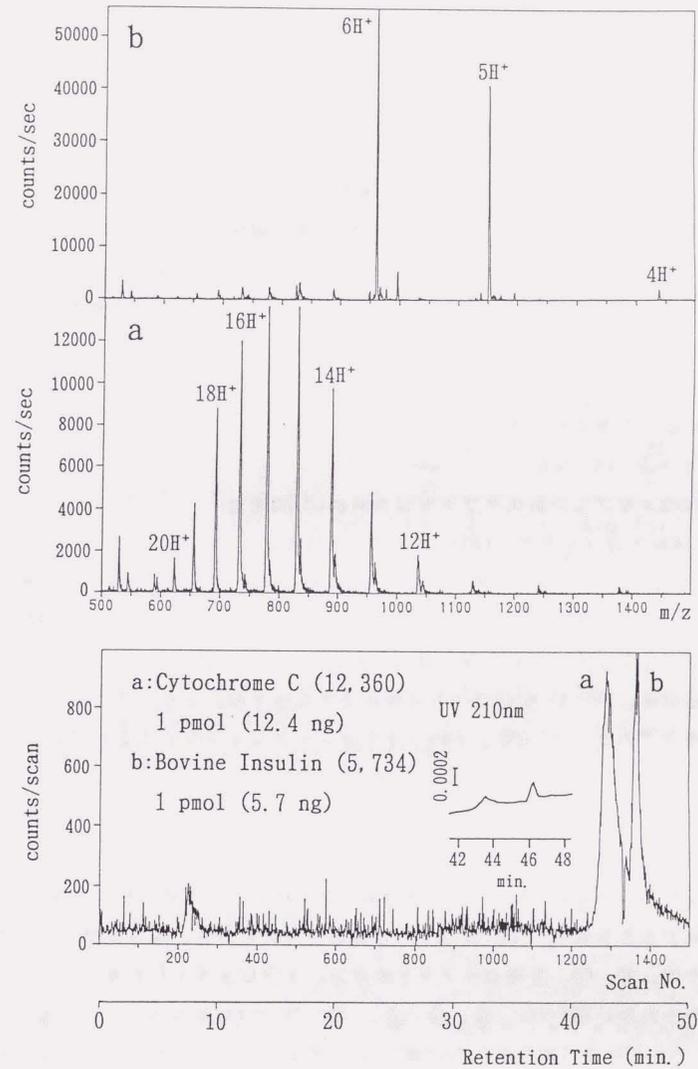


図6-4 タンパク質混合試料のESI-LC/MS測定
 多価イオンのトータルイオン（下段）、ESI-LC/MSスペクトル（上段）
 試料：(a)シトクロムc、(b)ウシインシュリン 各1pmol
 溶媒：0.1%酢酸を含むメタノール/水系、メタノール濃度を40%で
 10分間保持した後、30分間で80%までグラジエント

試料は、CYTとBI各1pmol含む40% MeOH溶液0.5μlをカラムに導入した。図6-4は、多価イオンのトータルイオン（下段）、及びピーク位置a及びbでのESI-LC/MSスペクトル（上段）である。BI (b) のTICピークの半値幅（27秒）は、UVピークのそれ（24秒）とほぼ同じで、イオン源におけるピークの広がりとは殆ど起きていなかった。CYT及びBIのスペクトルの全イオン強度（各多価イオンのピーク強度の和）はそれぞれ 7×10^4 、 1×10^5 cpsだった。スペクトルの取り込み時間（TICピークの半値幅 $\times 2 \sim$ 約1分）での平均試料濃度は、約 3×10^{-7} M ($=10^{-12}$ mol/3μl) と推定された。前章で、試料濃度とイオン強度の関係を測定した結果（図5-7参照）から予想されるイオン強度値は $8 \sim 9 \times 10^4$ cpsで、上記の測定結果とほぼ一致した。AcOHをバッファーとするLC/MS測定では、LCを介さずに試料を導入したときと同等の感度が得られることが分かった。

6.3.2 HELのトリプシン消化ペプチド混合物のLC/MS測定

6.3.1と同様の操作条件で、HELのトリプシン消化によって得られたペプチド混合物のLC/MS測定を行った。移動相は、0.1%のAcOHを含むMeOH/水を用い、MeOH濃度を30%で10分間保持した後、40分間で80%までグラジエントした。HELは合計16個のリシンとアルギニンを含み、還元カルボキシアミドメチル化及びトリプシン消化反応では、図6-5に矢印で示した箇所での加水分解により、ペプチド①～⑭の生成が期待された。図6-6は、多価イオンのトータルイオンクロマトグラム（下段）、及びUVクロマトグラム（上段）である。保持時間10分以下に現れた強いUV吸収は試料溶液（30% AcOH）中のAcOHによるものであるが、ESI-LC/MSスペクトルから、その付近には、ペプチド①、②、③、⑤、⑧等も溶出したことが分かった。（図略）これらのペプチドは、0.1%のAcOHを含むMeOH/水を用いた溶媒条件では、カラムにほとんど吸着されず、素通りしたものと考えられる。保持時間35分以上で溶出した④、⑥、⑨、⑩等のペプチド断片は、十分にカラムに吸着したため良い分離が得られた。図6-7は、⑥、⑨、⑨'、⑩、⑩'のESIスペクトルである。2価や3価のピークが明確に測定された。表6-1に示すように、ペプチド⑦及び分子量が測定質量範囲より小さかった⑪、⑫の3種類のペプチドを除いた全ての断片が、LC/MS法により同定された。ESI法は、比較的狭い質量範囲を測定するだけで、高質量のペプチドもカバーできるため、加水分解反応の進行が不十分で、予想外に

Hen Egg Lysozyme ($C_{613}H_{950}O_{136}N_{132}S_{10}$, 14,306.1)

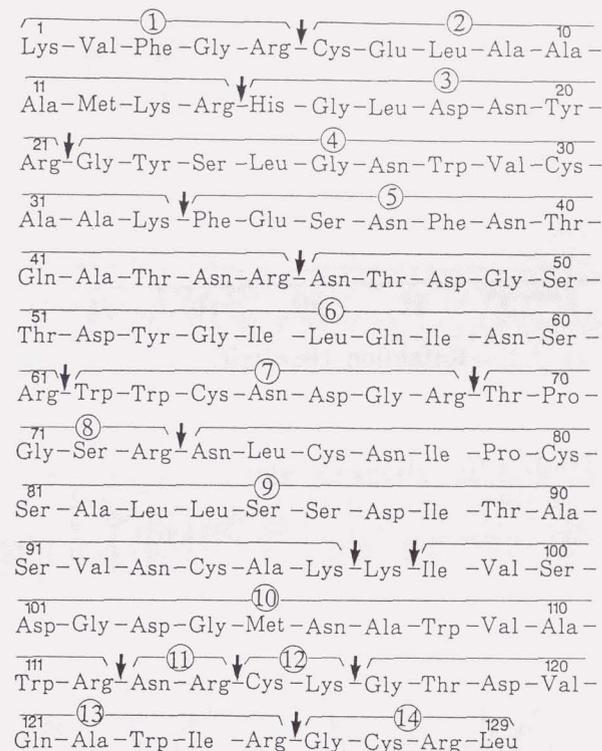


図6-5 ニワトリ卵白リゾチームの還元カルボキシアミドメチル化及びトリプシン消化反応により生成するペプチド

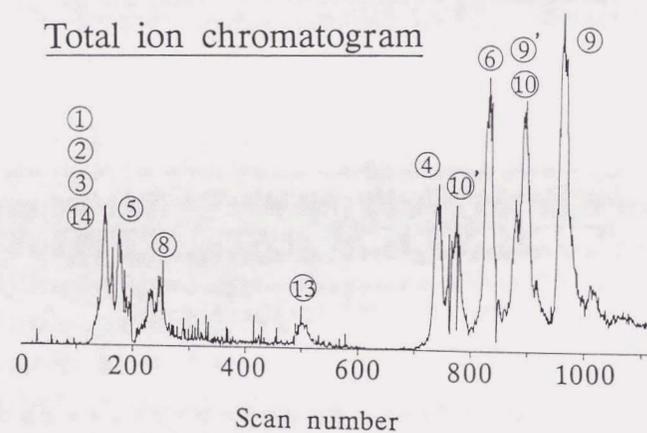
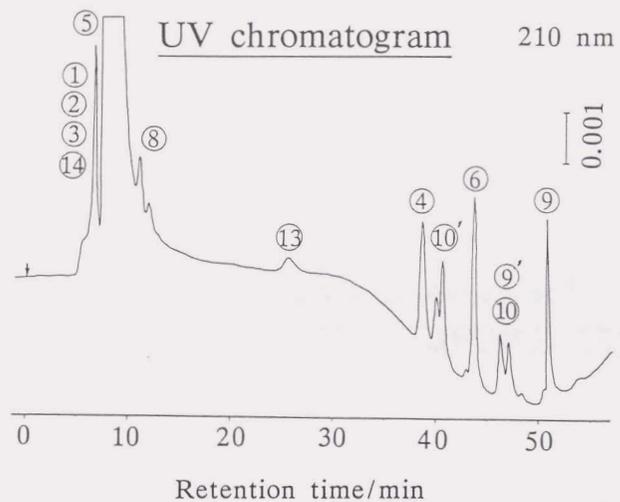


図6-6 ニワトリ卵白リゾチームのトリプシン消化ペプチドのESI-LC/MS測定
多価イオンのトータルイオン（下段）、UVクロマトグラム（上段）

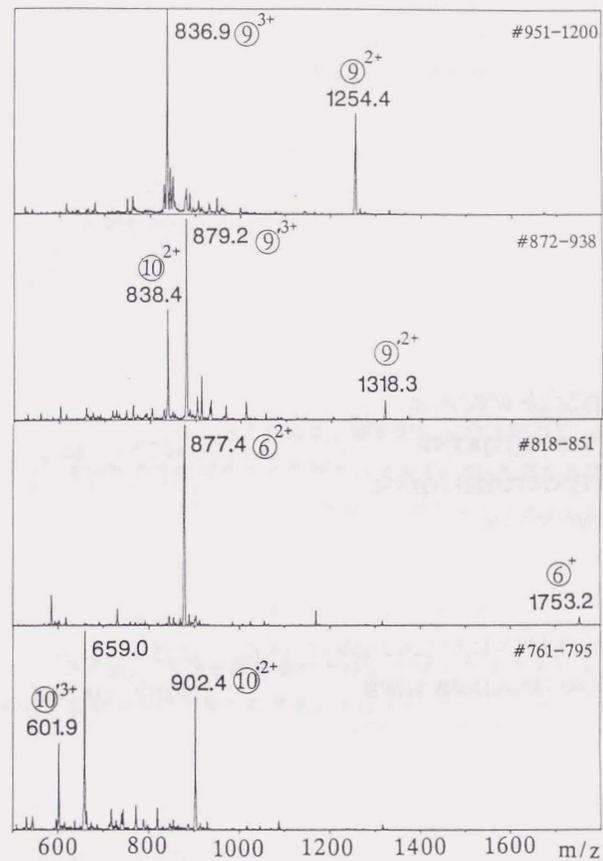


図6-7 ニワトリ卵白リゾチームのトリプシン消化ペプチドのESI-LC/MS測定
における断片⑥、⑨、⑨'、⑩（図6-5参照）のESI-LC/MSスペクトル

表6-1 ニワトリ卵白リゾチームの還元カルボキシアミドメチル化及び
トリプシン消化反応により生成するペプチドのESI-LC/MS測定結果

No.	Sequence	Mol. Weight	
		calculated	observed
①	KVFGR	605.4	605.4
②	CELAAAMKR	1048.5	1048.3
③	HGLDNYR	873.4	873.3
④	GYSLGNWVCAAK	1324.6	1324.1
⑤	FESNFNTQATNR	1427.6	1427.7
⑥	NTDGSTDYGILQINSR	1752.8	1752.8
⑦	WWCNDGR	992.4	-*
⑧	TPGSR	516.3	516.0
⑨	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAK	2507.2	2507.5
⑨'	NLCNIPCSALLSSDITASVNCAKK	2635.2	2634.6
⑩	IVSDGDGMNAWVAWR	1675.8	1674.8
⑩'	KIVSDGDGMNAWVAWR	1803.8	1802.8
⑪	NR	288.2	-
⑫	CK	249.1	-
⑬	GTDVQAWIR	1044.5	1044.7
⑭	GCRL	504.2	504.4

*not found

長鎖のペプチドが生成しても、見逃される危険性が少ない。LC/MS法では、各成分は比較的短時間で消失するが、広い分子量範囲のペプチドを、比較的狭い質量範囲のスキャンにより高速で取り込めることは、LC/MS測定におけるESI法の利点の一つである。

6.3.3 ポストカラムモディファイアを用いたESI-LC/MS法の検討

0.1%のAcOHを含むMeOH/水系を移動相に用いたLC/MS法では、ESI単体と同等の感度が得られることが分かったが、カラムにほとんど吸着されず、素通りするペプチドも見られた。タンパク質やペプチドの逆相LCでは、カルボキシル基の解離を抑えて疎水性を高めてカラムへの吸着を促すために、移動相に0.1%程度のTFAが添加される。AcOHは、TFAよりも酸性度が弱いため、親水性ペプチドをカラムへ吸着させられなかったものと考えられる。図6-8は、CYT (No.1)、HEL (No.2) 及びBA (No.3) 混合物の逆相LCクロマトグラムである。TFAの濃度を低下したり、AcOHを用いた場合には、HELはカラムに吸着できなくなることが分かった。図6-9は、 5×10^{-7} MのHELを含む50%ACN水溶液に、AcOHやTFAを添加した場合のESIスペクトルの8から13価の多価イオンの強度の和である。AcOHでは、0.1%程度添加した場合無添加に比べ数倍感度が向上したが、TFAを添加した時は、0.01%でも若干の感度低下が見られ、0.1%では無添加の10分の1近くにまで下がった。表6-2に、酸の添加による溶液のpHや電気伝導度の変化とESIによるイオン化効率に対する影響を示した。0.1%のTFAは、溶液の電気伝導度を3mS/cm以上に増加させることから、Taylorコーン先端部に高電場が形成されにくくなり、スプレーが不安定になることが一つの要因と考えられる。また、溶媒中の水の割合が約80%より多くなると、表面張力の増加のためスプレーが困難となり、測定感度が低下する傾向が見られた。これは、逆相LCでグラジエントを行う場合グラジエント初期での感度低下の原因となる。図6-10 (a) は、 7×10^{-7} MのHELを含む10~60%ACN水溶液に0.05%TFAを添加した溶液を、直接導入で測定した場合のトータルイオン強度の経時変化を示す。ACN濃度が10%の場合にはほとんど感度が得られず、30%以上の場合でもイオン電流は不安定だった。多くのペプチドはACN濃度30%以下で溶出するので、ペプチドのLC/MS測定は困難である。そこで、溶離液にモディファイアを添加して、表面張力を低下させる方法を試みた。上記の2倍の濃度のHEL溶液

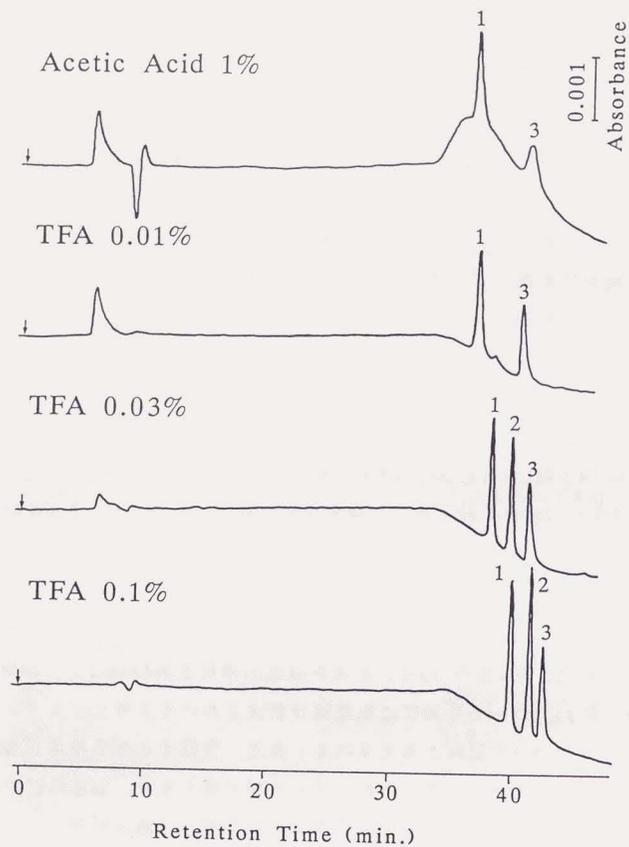


図6-8 タンパク質の逆相LCにおけるトリフルオロ酢酸の効果
 試料：シトクロムc (No.1)、ニワトリ卵白リゾチーム (No.2)、
 ウシアルブミン (No.3)

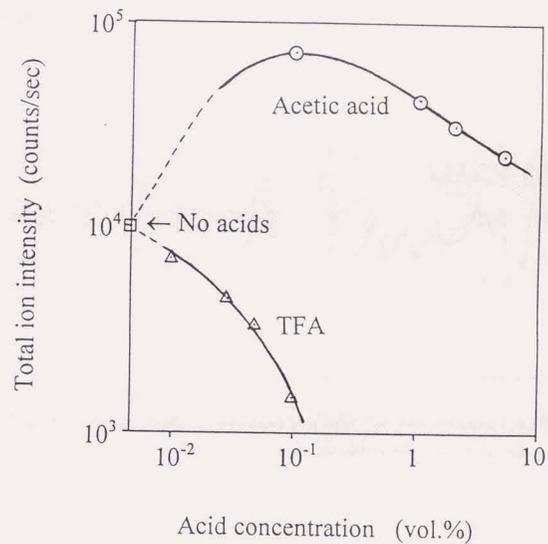


図6-9 タンパク質のESIスペクトルの測定感度に対する酸の添加効果
 試料：ニワトリ卵白リゾチーム $5 \times 10^{-7} M$
 溶媒：酢酸またはトリフルオロ酢酸を添加した50%アセトニトリル

表6-2 酸の添加による溶液のpHや電気伝導度の変化とエレクトロスプレーイオン化効率に対する影響

Acid	Concentration (vol.%)	pH	Conductivity ($\mu\text{S/cm}$)	Ion Intensity ^{a)} (kcps)
none ^{b)}	-	5.6	<1	9.19
acetic acid	0.1	3.6	39	71.7
	5.0			22.6
TFA ^{c)}	0.01	3.0	381	6.95
	0.1	2.2	3510	1.46

^{a)} Sum of the ion intensities of the protonated molecules (8^+ to 13^+) of HEL measured by the ion counting technique.

^{b)} Acetonitrile:water=1:1 (vol/vol)

^{c)} trifluoroacetic acid

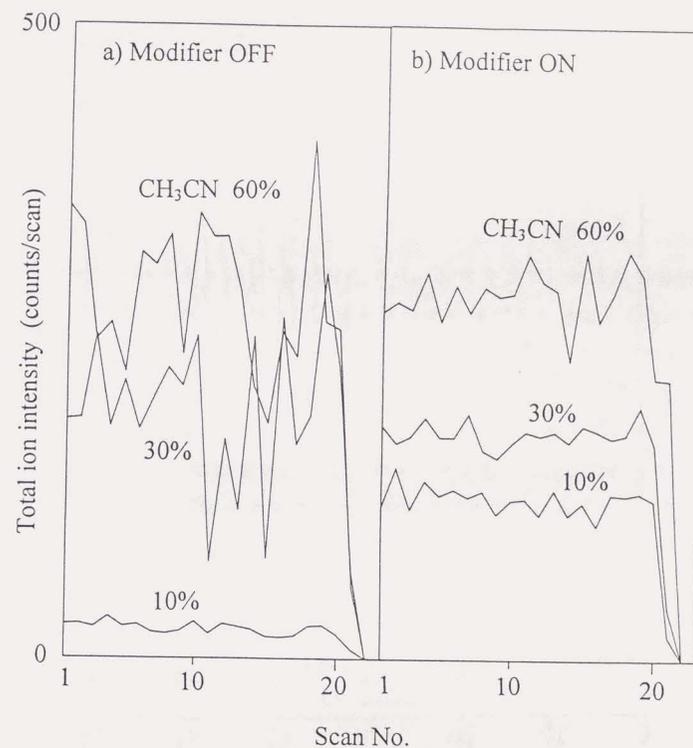


図6-10 タンパク質のESIイオン化効率及び安定性に対するモディファイアの効果
 試料：ニワトリ卵白リゾチーム $7 \times 10^{-7}\text{M}$
 溶媒：0.05%のトリフルオロ酢酸を添加した10~60%アセトニトリル
 モディファイア：メタノール/2-メトキシエタノール=1/1

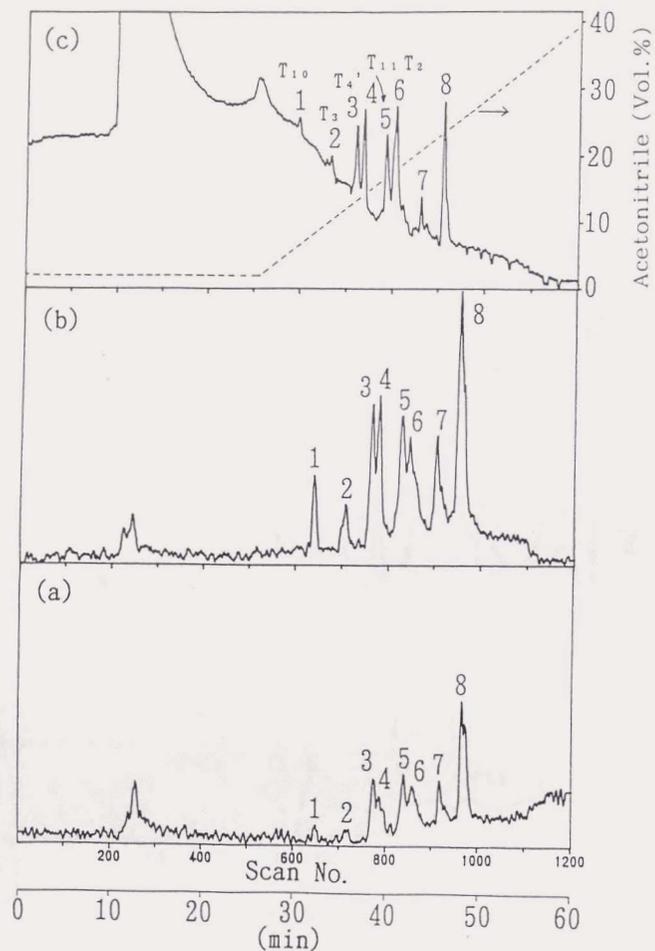


図6-11 ESI-LC/MS測定におけるモディファイアの添加効果
 モディファイア添加量 (a) 1 μ l/min及び (b) 3 μ l/minの場合の
 トータルイオンクロマトグラム及び(c)UVクロマトグラム
 試料：小麦胚芽アグルチニンのトリプシン消化物 (10 μ mol)
 溶媒：0.05%のトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル/水系、
 アセトニトリル濃度を4%で10分間保持した後、36分間で40%
 までグラジエント

(1.4×10^{-6} M) に、MeOHとMTETの1:1混合物を等量混合した場合 (図6-10(b)) は、ACN濃度に拘わらず、イオン電流の安定性が改善された。ACN濃度10%では、モディファイアの添加により、数倍の感度向上が見られた。WGAのトリプシン消化ペプチドを例に、0.05%のTFAを含むACN/水を移動相とするESI-LC/MS測定を行い、モディファイアの添加効果を調べた。(図6-11) UVクロマトグラム (c) に付したTnは、N末端からn番目のペプチド断片を意味する。(図7-7参照) モディファイアの添加量を、1 μ l/min (a) から3 μ l/min (b) とすることにより、グラジエント初期 (ACN濃度20%以下) を中心に、数倍の測定感度の向上が見られた。尚、モディファイアを全く添加しなかった場合は、グラジエントの全域に渡って、殆ど感度が得られなかった。

6.4 本章のまとめ

AcOHをバッファーとするESI-LC/MS測定では、LCを介さずに直接試料を導入した時と同等の感度が得られた。しかし、親水性の高いペプチドでは、カラムに吸着されず素通りしたものも見られた。ペプチドやタンパク質のカラムへの吸着を促すために必要なTFAの添加は、溶離液の電気伝導度を増加し、スプレーを不安定にした。ポストカラム法は、TFAによる感度低下を根本的には改善できなかったが、ACNの広いグラジエント範囲で安定したスプレーを可能にした。特にグラジエント初期には、モディファイアの添加により、数倍の感度向上が見られた。ESI-LC/MS法により、精製過程で添加された塩類等が共存する実試料の高感度測定や酵素消化ペプチドの一斉分析が可能であるとの見通しが得られた。

文献

1. a) K. Ishikawa and Y. Niwa, *Analytical Sciences*, 7, supplement, 967 (1991).
b) 石川、J. Tuominen、村木、長洞、地神、古賀、丹羽、質量分析、43, 325 (1995).
c) 石川、J. Tuominen、村木、長洞、地神、古賀、丹羽、物質工学工業技術研究所報告、3, 241 (1995).
2. a) S. Gaskell ed., "Mass Spectrometry in Biomedical Research", John Wiley & Sons, New York (1986).
b) C. N. McEwen and B. S. Larsen ed., "Mass Spectrometry of Biological Materials", Marcel Dekker Inc., New York, (1990).
c) T. Matsuo, R. M. Caprioli, M. L. Gross and Y. Seyama ed., "Biological Mass Spectrometry Present and Future", John Wiley & Sons, New York (1994).
3. K. B. Tomer, M. A. Moseley, L. J. Deterding and C. E. Parker, *Mass Spectrom. Rev.*, 13, 431 (1994).
4. I. Kay, A. I. Mallet, *Rapid Commn. Mass Spectrom.*, 7, 744 (1993).
5. M. P. Balogh, C. C. Stacey, presented at the 38th ASMS Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Tucson, 1209 (1990).
6. G. Hopfgartner, T. Wachs, K. Bean, J. Henion, *Anal. Chem.*, 65, 439 (1993).

第7章 高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-LC/MS) 法による天然及び遺伝子組み換えタンパク質の同定¹⁻⁴⁾

7.1 緒言

塩基配列解析技術の進歩により、天然由来の未知タンパク質のアミノ酸配列は、そのタンパク質をコードした遺伝子DNAの塩基配列から推定されることが多くなった。しかし、決定された塩基配列の確認・訂正の目的に加え、DNA側からは予測できない生成過程でのプロセッシングすなわち翻訳後修飾

(Posttranslational Modification、N末端のブロックやアミノ酸側鎖の修飾等) やその後の分離精製過程において生じた化学変化等の同定ため、タンパク質側の構造解析が必要である。特に、DNAの塩基配列自体にバリエーションがあったり、翻訳後修飾においてNまたはC末端の不揃いな切断 ("Ragged End" 構造⁵⁾) や糖鎖・リン酸等の結合⁶⁾等が起きた場合には、成熟タンパク質は僅かに構造が異なる複数の成分の混合物となることがある。分子量1万を越える高分子であるタンパク質では、数残基のアミノ酸が除去 (または付加) されたり、化学的変化を受けたりすることによる構造変化は、分子全体から見るといわば "微小な" 変異でしかない。高性能の電気泳動法やLC等を用いても、通常はこれらを分離・識別することは不可能であるため、タンパク質の微小な構造的な不均一性を正確に把握することは困難だった。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) 法⁷⁾の開発により、タンパク質の断片化とその後の再構成という過程を経ずに、タンパク質の組成と各成分の分子量を直接高精度・高分解能で測定可能となった。そのためESI-MS法は、タンパク質をそのまま測定できない高速原子衝撃 (FAB) 法に比べ、微小な構造変異を含むタンパク質の一次構造解析の精密さと信頼性を著しく向上させることが期待される。

第5章では、ESI-MS法によりpmolレベルのタンパク質の分子量を、0.01%の誤差で測定できることを確認した。また前章では、微量タンパク質混合試料の直接測定を目的とした、高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-LC/MS) 法について検討した。本章では、タンパク質の一次構造解析

におけるESI-MS及びESI-LC/MS法の有用性と問題点を検討するため、天然または遺伝子組み換えにより得られた未知タンパク質の同定・構造解析を行った。遺伝子組み換えにより、天然のタンパク質中のアミノ酸を1残基他のものに置換した試料では、アミノ酸の残基質量数の差をタンパク質の分子量変化として測定することにより、アミノ酸が正しく置換されたかを確認することができる。表7-1に、アミノ酸の残基質量数と置換によって生ずる質量変化を示した。質量差が1~2Daしかないアミノ酸の組を除けば、分子量が1Da程度の精度で測定できれば良く、誤差測定が0.01%の場合は、分子量1万程度のタンパク質についてアミノ酸置換を同定できることになる。このような試料の例として、酵母の遺伝子組み換えによってアミノ酸1残基の置換を行ったヒトリゾチーム (human lysozyme, HLY) の同定を試みた。また、DNAの塩基配列のバリエーションに由来するアミノ酸配列の違いや翻訳後修飾による微小な構造変異を含むタンパク質混合物の例として、ウシβカゼイン (bovine β-casein, BCA) 及び小麦胚芽アグルチニン (wheat germ agglutinin, WGA) の構造解析を行った。

カゼインは、牛乳中に3%程度含まれる総タンパク質の約80%を占める、分子量約24,000のリンタンパク質で、αs1、αs2、β、κの4種類のグループに分類されている。本研究では、ESI及びFAB-MSにより、僅かにアミノ酸配列が異なるBCAの5種類の変異体 (A1, A2, A3, B, C) の同定を試みた。また、WGAは細胞膜にある糖タンパク質や糖脂質等の糖鎖と特異的に結合して細胞の凝集、細胞分裂の誘発、細胞機能の活性化や障害を起こさせる物質の総称であるレクチンの一種である⁸⁾。レクチンの有用性はABO式血液型判定試薬として広く知られているが、特にWGAは悪性腫瘍細胞を選択的に凝集させることから、ガンの診断への応用が期待されている。天然のWGAは、アミノ酸配列の類似性からWGA1~3の3つのグループに分けられており、各グループはさらに僅かに異なる数種類の成分を含んでいる。本研究では、部位特異的アミノ酸置換による糖鎖認識部位の研究を行うため、酵母の遺伝子組み換えによって生産した分子量約17,000のWGA2の解析を行った。

7.2 実験

7.2.1 質量分析

Extrel社製タンデム四重極質量分析器 (質量範囲1~2,000) に筆者らが設計・

表7-1 アミノ酸の残基質量数と置換による質量変化

	G	A	S	P	V	T	C	L	I	N	D	K	Q	E	M	H	F	R	Y	W
1 Gly (G, 57)	14	30	40	42	44	46	56	56	57	58	71	71	72	74	80	90	99	106	129	
2 Ala (A, 71)		16	26	28	30	32	42	42	43	44	57	57	58	60	66	76	85	92	115	
3 Ser (S, 87)			10	12	14	16	26	26	27	28	41	41	42	44	50	60	66	76	99	
4 Pro (P, 97)				2	4	6	16	16	17	18	31	31	32	34	40	50	59	66	89	
5 Val (V, 99)					2	4	14	14	15	16	29	29	30	32	38	48	57	64	87	
6 Thr (T, 101)						2	12	12	13	14	27	27	28	30	36	46	55	62	85	
7 Cys (C, 103)							10	10	11	12	25	25	26	28	34	44	53	60	83	
8 Leu (L, 113)									0	1	2	15	15	16	18	24	34	43	50	73
9 Ile (I, 113)										1	2	15	15	16	18	24	34	43	50	73
10 Asn (N, 114)											1	14	14	15	17	23	33	42	49	72
11 Asp (D, 115)												13	13	14	16	22	32	41	48	71
12 Lys (K, 128)													0	1	3	9	19	28	35	58
13 Gln (Q, 128)														1	3	9	19	28	35	58
14 Glu (E, 129)															2	8	18	27	34	57
15 Met (M, 131)																6	16	25	32	55
16 His (H, 137)																	10	19	26	49
17 Phe (F, 147)																		9	16	39
18 Arg (R, 156)																			7	30
19 Tyr (Y, 163)																				23
20 Trp (W, 186)																				

製作したESIイオン源、及びパーソナルコンピュータ（NEC社製PC-9801DA）による装置制御・データ処理装置を接続したESI-LC/MS/MS装置（図6-1参照）を用いた¹⁾。質量スペクトルを測定する場合には、初段の四重極アナライザーのみRF-DCモードとし、2・3段目のアナライザーをRFモードで使用した。LCを介して試料を導入する場合は（ESI-LC/MS測定）、必要に応じて、カラム出口（ポストカラム）で第三成分（修飾液、モディファイア）を混合することによって、溶離液の物理化学的性質を、ESIに適した条件に修飾した。ポストカラムモディファイアは、2-メトキシエタノール（MTET）とメタノール（MeOH）の1:1（容積比）混合溶液を用い、ミクロミキサーを介して、ISCO社製100D型シリンジポンプから、流速3 μ l/minで供給した。ESI及びESI-LC/MS測定の操作条件については、前章の実験の項（6.2.1）を参照されたい。

FAB-LC/MS測定は、日本電子（株）製JMS SX-102A型二重収束質量分析計を用いた。カラムからの溶離液は、同社製空圧スプリッタを用いて流速を約6 μ l/minに調節し（スプリット比 15:1）、同社製MS-FF10型 Frit-FAB LC/MSインターフェイスに導入した。一次ビームは、6kVに加速したキセノン原子を用いた。

7.2.2 液体クロマトグラフィー

ESI-LC/MS測定には、内径0.5mm、長さ150mmのFSCチューブに粒径5 μ mのODSを充填したマイクロカラムを用いた。2台の高圧ポンプ（日本分光工業（株）製880-PU型）で0.2ml/minでグラジエントを行い、インジェクター（Rheodyne社製 7520型、容量0.5 μ l）の手前でODSカラム（日本分光工業（株）製 Biofine RPC-SC18、内径4.6mm、長さ250mm）を介してスプリットすることにより、マイクロカラムへの流量を3 μ l/minに調節した⁹⁾。マイクロカラムからの溶離液は、内径0.05mmのFSCチューブをセルとするUV検出器（日本分光工業（株）製875-CE型）と経て、ESIニードルに導入した。また、モディファイアを添加する場合は、図6-1に示したようにUV検出器の後にミクロミキサーを挿入して行った。移動相は、0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）を含むアセトニトリル（ACN）／水を用い、ACN濃度を0から100%の範囲を毎分1から4%の勾配でグラジエントした。

FAB-LC/MS測定には、セミマイクロのODSカラム（ジーエルサイエンス社製 Inertsil ODS-2、内径0.7mm、長さ150mm）を用い、2台の高圧ポンプ（島津製作所

製 LC-10AD型）により流速0.1ml/minでグラジエントを行った。移動相の組成とグラジエントの条件は、マトリックスとして0.8vol.%のグリセリンを添加した以外は、ESI-LC/MS測定と同様である

7.2.3 タンパク質の調製

市販のニワトリ卵白リゾチーム（半井化学（株）製、hen egg lysozyme、HEL、Mr 14,306.1）及びヒトリゾチーム（Green Cross社製、human placental lysozyme、HLY、Mr 14,692.7）をキャリブレーションに用いた。組み換え体は、図7-1に示したHLYのアミノ酸配列をコードした遺伝子を化学合成し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子組み換え実験を行って、115位のアミノ酸残基（天然型ではアルギニン）をヒスチジン（HLY-H115）、グルタミン酸（HLY-E115）、リシン（HLY-K115）及びグルタミン酸（HLY-Q115）に置換した¹⁰⁾。粗タンパク質は、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、50mM Na₂HPO₄、250mM NaCl水溶液中に0.3 μ g/ μ lの濃度でタンパク質を含む試料約10 μ lを質量分析用として得た。BCAは、Sigma社より購入したものをそのまま用いた。WGA2は、市販のWGA（豊年（株）製）から陽イオン交換カラム（Pharmacia社製 Mono S HR 5/5）を用いたグラジエント溶出（0-340mM 塩化ナトリウム、20mM クエン酸ナトリウム）により分離すると共に、アミノ酸配列¹¹⁾をコードした遺伝子を化学合成し、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に組み込んでWGA2を発現させた¹²⁾。粗製タンパク質は、20mM 酢酸ナトリウム水溶液に透析した後、Mono S、Mono Q（Pharmacia社製）、Mono Sの3段階の陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、遺伝子組み換えWGA2を得た。

7.2.4 タンパク質の酵素消化

BCAは、臭化シアン分解及びトリプシン消化を行った。WGA2は分子内に8個のジスルフィド結合を含むため、酵素消化に先立って7M グアニジン塩酸塩、10mM EDTA、0.5M Tris-HClバッファー（pH8.5）中でヨードアセトアミドにより、還元カルボキシアミドメチル化反応を行った。タンパク質は2M尿素、0.1M Tris-HCl（pH8.0）中に透析し、トリプシン（Sigma社製、TPCK処理済み、酵素/基質比=1:10）で37°C、12時間消化した。消化ペプチド溶液は、ゲルろ過カラム

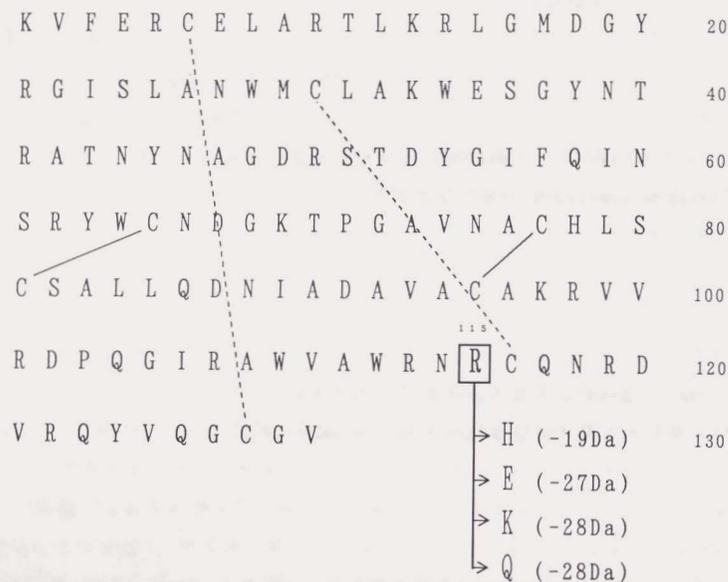


図7-1 ヒトリゾチームの一次構造
 遺伝子組み換えにより115位のアルギニンが、
 ヒスチジン、グルタミン酸、リシン及びグルタミンに
 置換された。
 C-Cは、ジスルフィド結合を表す。

(Pharmacia社製NAP-10)により30%酢酸水溶液に置換し、ESI-MS、ESI-LC/MS及びFAB-LC/MS測定に用いた。

7.3 結果と考察

7.3.1 ESI-LC/MS法によるオンライン脱塩-質量分析法による遺伝子組み換えHLYにおけるアミノ酸置換の同定^{1,4)}

本研究で用いた遺伝子組み換えHLYは、分離精製時に添加された大量のナトリウム塩(50mM Na₂HPO₄、250mM NaCl)中に存在した。第5章での検討から、ESI法におけるイオン化効率は無機塩等の電解質の影響を受け易いことがわかった。実際、ナトリウム塩共存下でのESI-MS測定では、HLYに由来するピークは全く検出されなかった。(図6-3参照)一方、利用できる試料量が僅かだったので、透析やゲル濾過等の通常の脱塩法は困難だった。μlスケールの試料から回収率よく脱塩し同時に質量分析を行うには、逆相LCと質量分析計の直接結合が可能な、ESI-LC/MS法が有効であると考えた。LCの流速をESI法の操作条件に適合させると共に、LCに導入した試料の全量をイオン源に導入して、タンパク質の高感度測定を行うため、前章で検討したマイクロカラムを用いる方法を採用した。

ペプチドやタンパク質の逆相LCでは、通常溶離液に0.1%程度のTFAを添加するが、前章で検討したようにESI-MSで良好な感度を得るためには、LCの分離能を低下させない範囲でTFA濃度は出来るだけ低いことが好ましい。TFA濃度と分離能の関係を調べたところ、HLYをカラムに吸着させるためには0.05から0.1%程度のTFAが必要であることが分かった。(図6-8参照)前章で検討したポストカラムモディファイアの添加により、TFAによりスプレーが不安定になることを改善したり、グラジェント初期における溶離液の表面張力を低下させてイオン化効率を改善できたが、TFAによる感度低下を根本的には解決できなかった。HLYは、ACN濃度50~60%付近で溶出するため、表面張力の調節の必要はなかった。モディファイアの添加は行わず、ACNのグラジェントに合わせてTFAの濃度を変化させることにより、ESI-MSの感度を得る方法を用いた。つまり、HLYを溶出させる段階ではTFAは存在しなくても分離に影響がないので、第1の溶離液(A:4%ACN/水)の中にのみ0.1%のTFAを添加し、第2の溶離液(B:60%ACN/水)にはTFAを添加しなかった。脱塩のためA:100%を120分保持した後、A:100%からB:100%の10分間のグラジェン

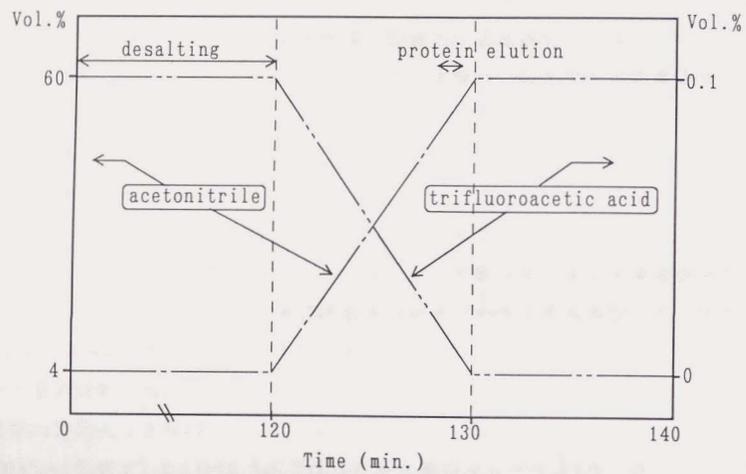


図7-2 モディファイアを用いないESI-LC/MS法におけるグラジエント法
 第1の溶離液：4%アセトニトリル/水+0.1%トリフルオロ酢酸
 第2の溶離液：60%アセトニトリル/水
 第1の溶離液100%で120分脱塩した後、10分間で第2の溶離液100%まで
 グラジエントを行い、タンパク質を溶出。

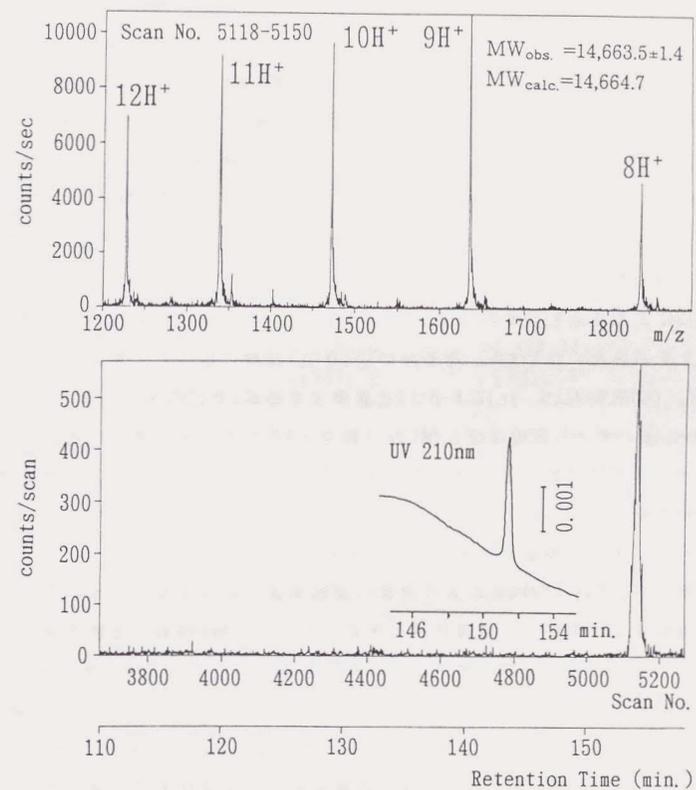


図7-3 遺伝子組み換えヒトリゾチーム (HLY-K115: $^{115}\text{R} \rightarrow \text{K}$) のESI-LC/MS測定
 m/z 1200から1900のトータルイオンクロマトグラム (下段) 及びESI
 スペクトル (上段)、挿入図は、210nmで測定したUVクロマトグラム

トを行い、HLYが溶出するグラジエント終了直前ではTFA濃度を減少させた。(図7-2参照)

図7-3は、HLY-K115 ($^{115}\text{R} \rightarrow \text{K}$) のESI-LC/MS測定におけるm/z 1200から1900のトータルイオンクロマト(下段)及びマススペクトル(上段)である。UV検出器で測定したタンパク質の保持時間は約151分で、吸光係数は 0.002cm^{-1} が得られた。150ngの標品HLYを測定したときのUV面積強度との比較から、カラムから溶出したHLY-K115の量は、110ng (7.5pmol)と求められた。8~12価のピークを基に外部標準による質量較正から求めた分子量Mrは $14,663.5 \pm 1.4$ で(表7-2(a))、計算値(14,664.7)との差は-1.2Daだった。表7-2(b)に示すように、すべての組み換えHLYについて $\pm 1\text{Da}$ 程度の誤差範囲で、測定結果と計算値が一致した。

内部標準法による質量較正を行うことにより、ESI-LC/MS測定における分子量測定精度の向上を試みた。図7-4は、等モルのHELをHLY試料に混合して測定を行った(a)HLY-R115、(b)HLY-H115、(c)HLY-Q115と基準とするHELの10価イオンピークである。HLYの10価イオンの質量数は、HELの10価及び9価イオンを基準とする内挿により決定した。内部標準法による分子量の測定誤差は $\pm 1\text{Da}$ 程度であり、外部標準法で行った時と殆ど差がなかった。誤差の要因は、質量較正の方法よりも、ピーク形のゆがみやノイズの影響が大きいものと推測された。

以上の結果から、ESI-LC/MS法により大量の塩類を含むピコモルレベルのタンパク質試料の直接測定が可能で、精密な分子量値からアミノ酸1残基の置換を確認できることがわかった。遺伝子組み換えで導入されたアミノ酸置換等をプロテインシーケンサで確認する場合には、酵素消化による断片化や得られたペプチドの分離精製等の煩雑な操作が必要で、それにともない試料量も必要とされる。ESI-LC/MS法は、質量数が異なるアミノ酸の間の置換を確認する高感度で迅速な方法であることが実証された。

7.3.2 BCAの天然変異体の解析^{2, 4*}

図7-5(a)は、BCAのESIスペクトルである。観測された13から25価の多価イオンのピークは、シトクロムc (CYT) のように構造的に純粋であることが確認されているタンパク質の場合よりも幅が広がった。これは、分子量が接近した複数の変異体の存在によることが推測されるが、分解能が不十分で個々の成分は分離でき

表7-2 ESI-LC/MS法による遺伝子組み換えヒトリゾチームの分子量測定結果

(a)多価イオンピークからの分子量の算出 (HLY-K115)

Charge No.	m/z	Mr ^{a)}
12	1,222.77	(14,661.15)
11	1,334.20	14,665.08
10	1,467.44	14,664.29
9	1,630.16	14,662.41
8	1,833.78	14,662.15
		av. 14,663.5 \pm 1.4

$$^a) \text{Mr} = (\text{m/z} - 1.0079) \times (\text{Charge No.})$$

(b)多価イオンピークから算出した分子量と計算値の比較

Sample	Theor. Calc. Mr ^{b)}	Exp. Calc. Mr ^{c)}	Diff.
Native HLY	14,692.7	14,691.6 \pm 0.6	-1.1
HLY-H115	14,673.6	14,674.5 \pm 0.9	+0.9
HLY-E115	14,665.6	14,664.7 \pm 0.5	-1.0
HLY-K115	14,664.7	14,663.5 \pm 1.4	-1.2

^{b)} Theoretically calculated Mr.

^{c)} Experimentally calculated Mr.

Hen Egg Lysozyme 10H⁺ Human Lysozyme 10H⁺

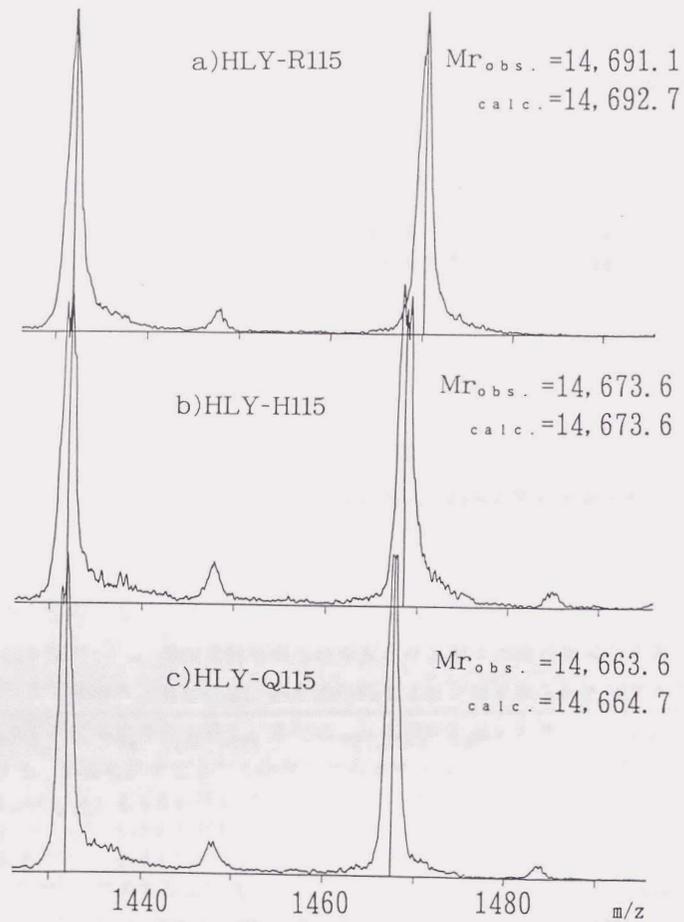


図7-4 遺伝子組み換えヒトリソチーム(a)HLY-R115、(b)HLY-H115、(c)HLY-Q115の10個イオンピーク
内部標準法により質量較正を行うため、等モルのニワトリ卵白
リソチームを混合した。

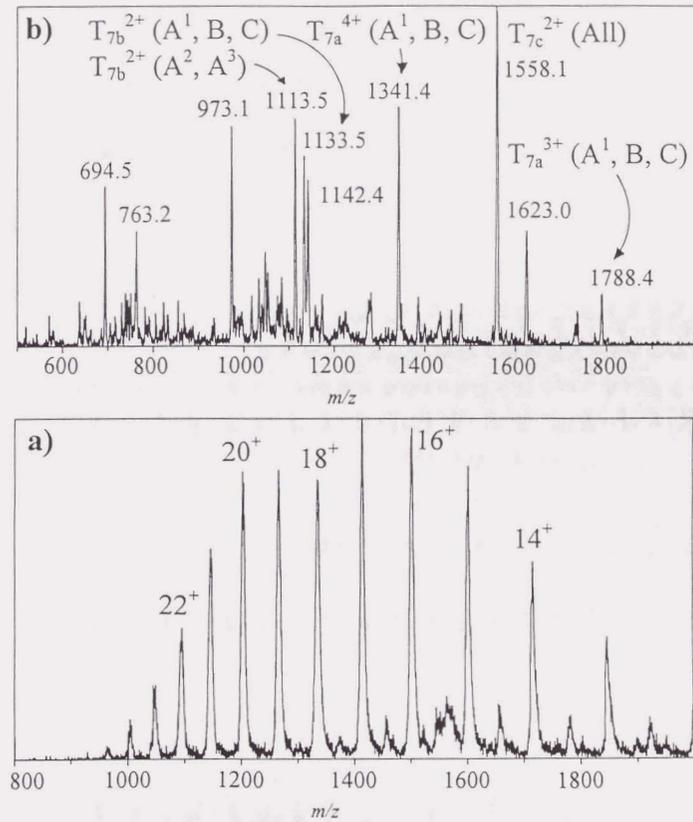


図7-5 (a)ウシβカゼイン及び(b)トリプシン消化ペプチド混合物の
ESIスペクトル
トリプシン消化ペプチドの帰属は表7-3を参照

表7-3 トリプシン消化ペプチドのESI及びFAB-MS測定によるウンカゼイン変異体 (A1, A2, A3, B, C) の同定

Code	Residues	Variant	Mr ^{a)}	Identified by ESI and/or FAB
T1	1	All	174.2	-, - ^{b)}
T2	2-25	All	2,966.8	-, -
T3	26-28	All	373.5	-, FAB
T4	29	All	146.2	-, -
T5	30-32	All	388.5	-, FAB
T6a	33-37	C	638.6	-, -
T6b	33-48	A1, A2, A3, B	2,062.0	ESI, -
T7a	49-97	A2, A3	5,319.2	ESI, -
		A1, B, C	5,359.3	ESI, -
T7b	49-68	A2, A3	2,223.6	ESI, -
		A1, B, C	2,263.6	ESI, -
T7c	69-97	All	3,113.7	ESI, -
T8	98-99	All	245.3	-, FAB
T9	100-105	All	645.8	-, FAB
T10	106-107	A1, A2, B, C	283.3	-, FAB
		A3	274.3	-, -
T11	108-113	All	747.9	ESI, FAB
T12	114-169	A1, A2, A3, C	6,361.3	ESI, -
		B	6,430.4	-, -
T13	170-176	All	781.0	ESI, FAB
T14	177-183	All	830.0	ESI, FAB
T15	184-202	All	2,185.6	ESI, FAB
T16	203-209	All	741.9	ESI, FAB

^{a)} Theoretically calculated Mr.

^{b)} Not found.

W G A 2

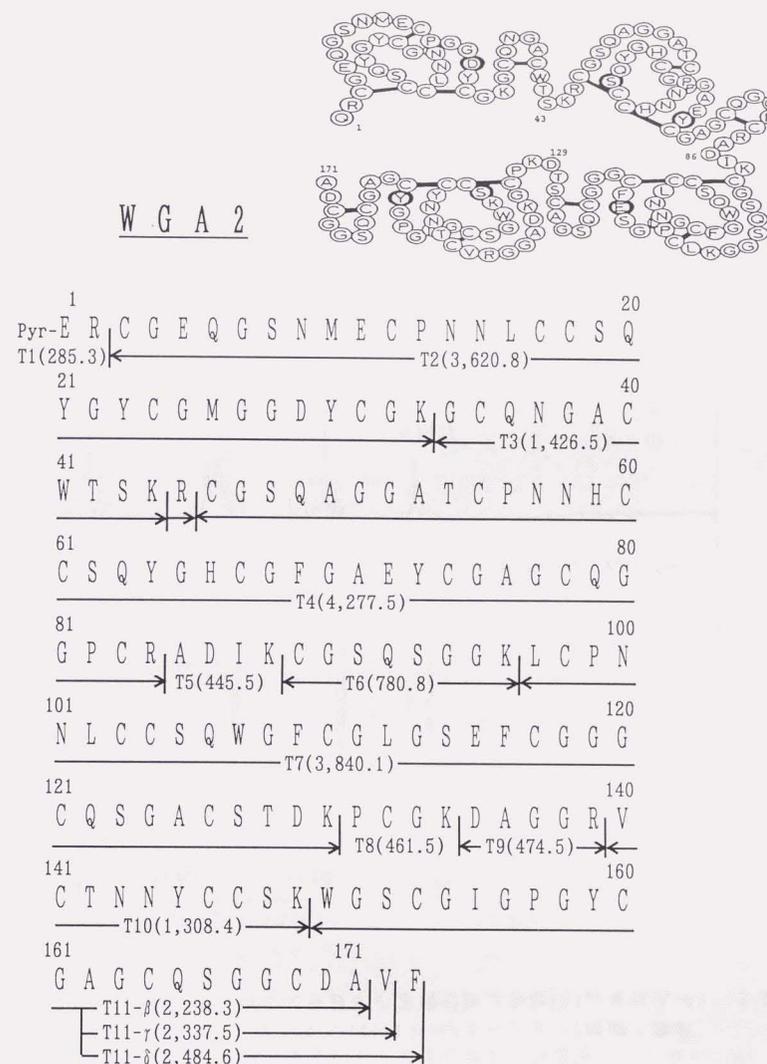


図7-7 小麦胚芽アグルチニン (WGA2) の一次構造とトリプシン消化ペプチドの分子量

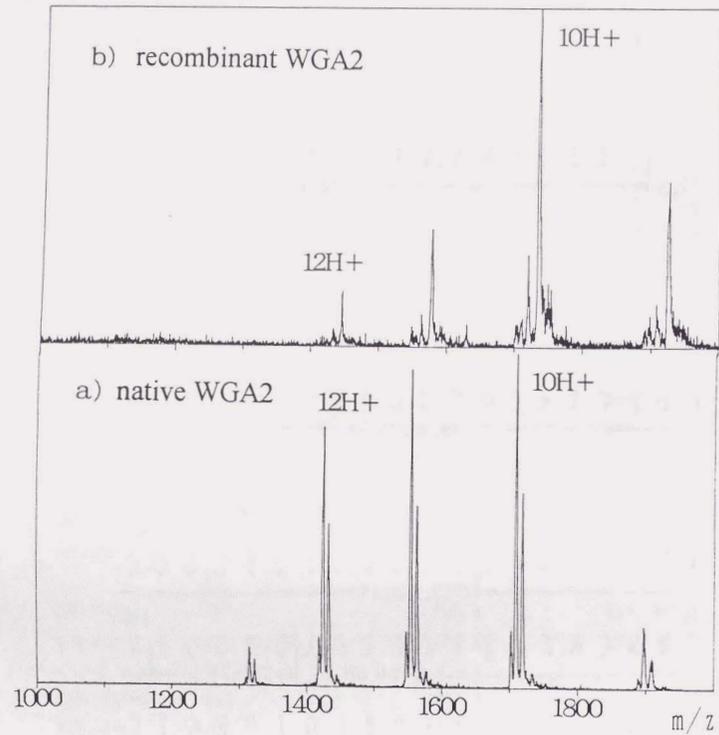


図7-8 (a)天然及び(b)遺伝子組み換え小麦胚芽アグルチニンのESIスペクトル
 溶媒：酢酸/メタノール/水=1:499.5:499.5

	mature protion		C-terminal propeptide					
pro WGA2	1	171					186	
	pGlu-	- - Cys-Asp-Ala-Val-Phe-Ala-Gly-	-	-	-	-	-Glu	
			↑	↑	↑	↑	↑	
			α	β	γ	δ	ε	
native WGA2			8	57	33	2	0	(%)
recombinant WGA2			2	4	14	77	3	

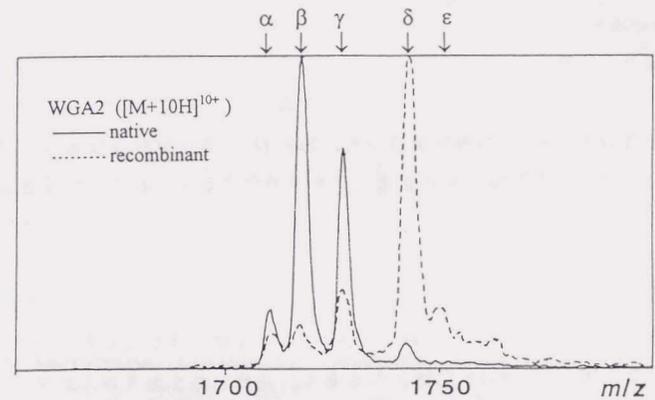


図7-9 天然及び遺伝子組み換えによって得られた小麦胚芽アグルチニンの
 ESIスペクトル中の10価のイオン ($[M+10H]^{10+}$)

プロトンを付加した10個のイオン ($[M+10H]^{10+}$) である。各グループのサブピークは、わずかに分子量の異なる成分に対応しており、天然から分離されたWGA2は少なくとも3成分の混合物であること、組み換えWGA2は天然と共通の分子量成分も含むが、主成分は天然よりも分子量が200Da前後大きいことがわかった。スペクトルから求められた各成分の分子量値の差はアラニン (残基質量数71Da) やバリン (同99)、フェニルアラニン (同147) 等のアミノ酸残基の質量数に一致した。従って、WGA2は産生される過程でC末端部の切断を受けるが、その際の切断部位に分布があり ($\alpha \sim \epsilon$)、組み換え体では主に天然と異なる位置 (δ : Phe-Ala間) で切断されたものと考えられる。これは、生物種の違い (天然: 小麦、組み換え体: 酵母) に起因するプロセッシングの違いによるものと考えられる。通常ESI法のイオン化効率は、タンパク質の構造やアミノ酸組成によって様々であり、ピーク強度は混合試料の相対濃度を直接反映しない。しかし、WGA2の様に末端部の数個のアミノ酸のあるなしによっては、イオン化効率は殆ど変化しないと考えられることから、ピークの相対強度は各成分のおよその存在比を反映するものと考えられる。(図7-9中程)

天然及び組み換えWGA2の分子量の差がC末端部の不揃いであることが推定されたが、これをさらに確認するため、S-S結合を還元しトリプシン消化して得られたペプチド混合物のESI-LC/MS測定を行った。図7-7に、トリプシンによって加水分解されると予測される部位と生成するペプチドの分子量を示した。ペプチドはACN濃度30%以下で溶出することや、溶出時間の異なる多数の成分を同時に感度よく測定するため、前章で検討したマイクロミキサーを介してポストカラムモディファイアを添加する方法を用いた。図7-10の左列は天然のWGA2、右列は組み換えWGA2である。トリプシンは、リシン及びアルギニンのC基側を選択的に加水分解するため、WGA2は合計11個 ($T_1 \sim T_{11}$) に断片化させる。天然と組み換え体ではタンパク質のC末端部を含む T_{11} の断片の分子量のみが異なり、天然のWGA2は、図7-9に示した β 及び γ 位で切断された構造に対応する $T_{11}-\beta$ (WGS...CDA, Mr 2,238.3) 及び $T_{11}-\gamma$ (WGS...CDAV, Mr 2,337.5) が検出されることが期待された。これに対し、組み換えWGA2では、主に δ 位での切断に対応した $T_{11}-\delta$ (WGS...CDAVF, Mr 2,484.6) が検出されることが期待された。図7-10に示したLC/MS測定では、天然のWGA2では $T_{11}-\beta$ (#7) 及び $T_{11}-\gamma$ (#9) が、組み換え体では $T_{11}-\delta$ (#7) が観測され、図7-9

native WGA2

recombinant WGA2

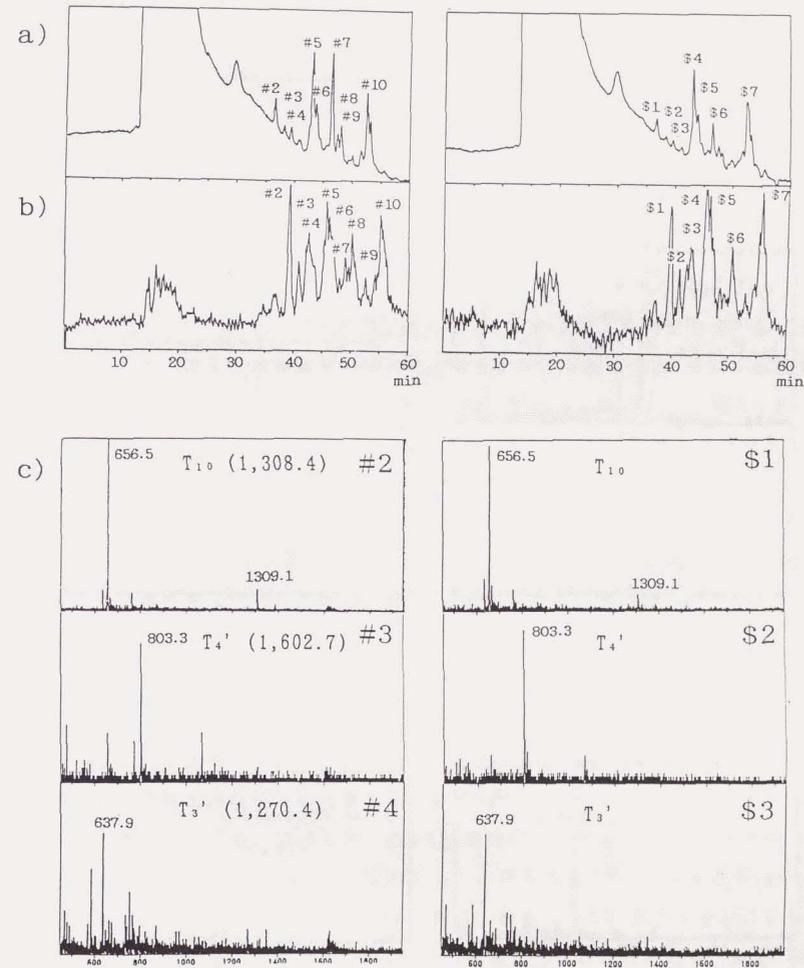


図7-10 天然及び遺伝子組み換え小麦胚芽アグルチニンの還元カルボキシアミドメチル化及びトリプシン消化ペプチドのESI-LC/MS測定
a)UVクロマトグラム、b)トータルイオンクロマトグラム、
c)ESIスペクトル

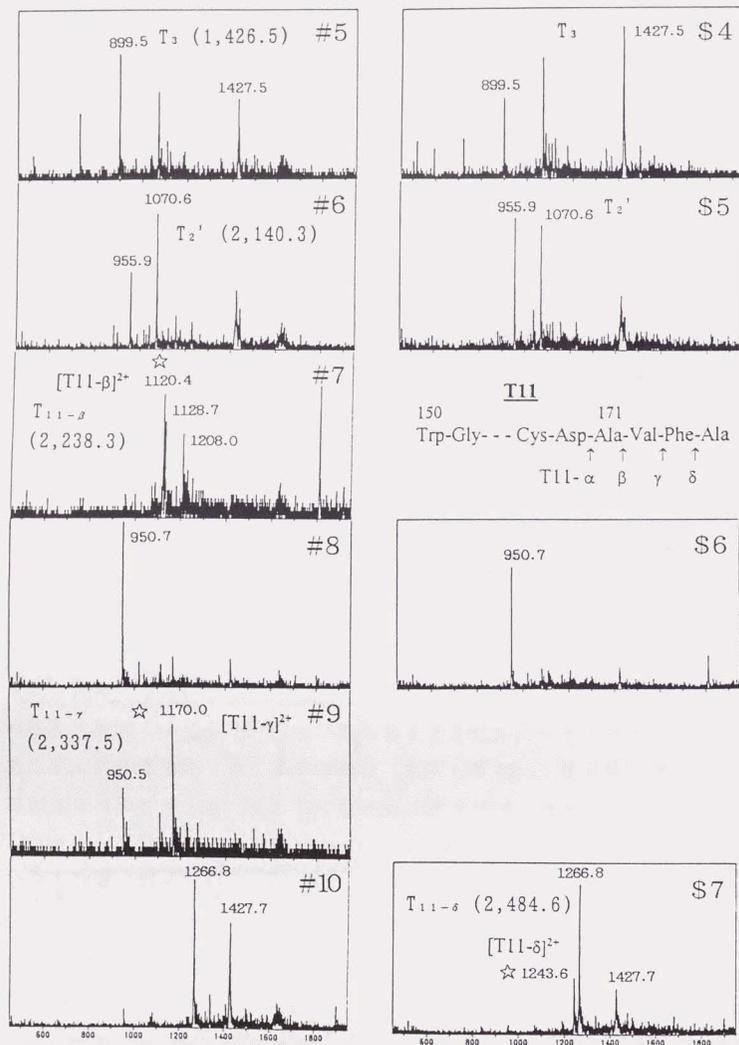


図7-10 (続き)

小麦胚芽アグルチニン (WGA2) のC末端を含む断片
 天然WGA2 : #7 (T11-β)、#9 (T11-γ)
 組み換えWGA2 : #7 (T11-δ)

のESIスペクトルの帰属を支持した。

ESI及びESI-LC/MS測定に要した試料量は、それぞれ約10pmol (10^{-8} g) 以下で、測定時間はESI-MSでは10分、ESI-LC/MSで1時間程度であった。ESI-MS法による精密な分子量測定により、微量のタンパク質混合物の詳細な組成解析が可能であることがわかった。ペプチド混合物を分離・精製しプロテインシーケンサーで解析する場合に比較して、同程度の試料量ではるかに迅速に結果が得られることがわかった。プロセッシングによるC末端部の不揃い、"ragged end"の解析は、N末端側からしかアミノ酸配列を解読できないプロテインシーケンサーの不得意とするところであり、質量分析法を用いるメリットが大きい。

7.4 本章のまとめ

本研究では、ESI-MSまたはESI-LC/MSスペクトルから求めた精密な分子量に基づくタンパク質の微小な構造変異の解析を行った。アミノ酸の内の1残基が置換された遺伝子組み換えHLYは、大量のナトリウム塩を含むバッファー中に保存されており、かつ200pmol程度の量しか得られなかった。ESI-LC/MS法によるオンライン脱塩-精密分子量測定により、バッファー中に保存された微量の遺伝子組み換えHLYの分子量を1-2Daの誤差で測定し、アミノ酸が正しく置換されていることが確認された。BCAは、アミノ酸配列のバリエーション以外にリン酸基結合数の分布が含まれる複雑なタンパク質である。ESIスペクトルから、分子量が接近した複数の変異体の存在が推測されたが、分解能が不十分で個々の成分の同定は困難だった。分子量が接近した多くの成分を含むタンパク質試料では、酵素消化等による断片化により補わざるを得ないのが現状である。また、ESI-LC/MS法は、DNAの塩基配列からは予測できず、プロテインシーケンサーによる解析も困難な遺伝子組み換えWGA2の翻訳後修飾の解析にも有効だった。WGA2ではスペクトルから少なくとも4種類の分子量成分が明確に観測され、DNA塩基配列データからこれらがC末端の"ragged end"構造に対応することがわかった。現在のところ、C末端側からアミノ酸配列を解読する確立された方法がないため、質量分析の有用性が発揮された例である。この結果は、酵素消化物のESI-LC/MS測定により確認された。BCAやWGA2で見られた翻訳後修飾は、DNA側からは予測できず、また、プロテインシーケンサーでの解析も困難であり、微量の試料で迅速に適用できる質量分析法の有用性が確

認された。ESI-LC/MS法が、さらにESI-LC/MS/MS法¹³⁾へと高度化され、より複雑なタンパク質にも適用可能となることが期待される。

文献

1. K. Ishikawa and Y. Niwa, *Analytical Sciences*, 7, supplement, 967 (1991).
2. J. Tuominen, K. Ishikawa and Y. Niwa, *Proc. Kyoto'92 Int. Conf. Biological Mass Spectrometry*, 264 (1993).
3. a) K. Ishikawa, H. Nagahora, Y. Jigami and Y. Niwa, *Proc. Kyoto'92 Int. Conf. Biological Mass Spectrometry*, 262 (1993).
b) H. Nagahora, K. Ishikawa, Y. Niwa, M. Muraki and Y. Jigami, *Eur. J. Biochem.*, 210, 989 (1992).
4. a) 石川、J. Tuominen、村木、長洞、地神、古賀、丹羽、質量分析、43, 325 (1995).
b) 石川、J. Tuominen、村木、長洞、地神、古賀、丹羽、物質工学工業技術研究所報告、3, 241 (1995).
5. a) D. J. Payne, P. W. Skett, R. T. Aplin, C. V. Robinson and D. J. C. Knowles, *Biol. Mass Spectrom*, 23, 159 (1994).
b) A. Dell, H. R. Morris, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106, 1456 (1982).
6. a) A. P. Hunter and D. E. Games, *Rapid Commn. Mass Spectrom.*, 9, 42 (1995).
b) A. P. Hunter and D. E. Games, *Rapid Commn. Mass Spectrom.*, 8, 559 (1994).
7. a) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science*, 246, 64 (1989).
b) R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogrzalek Loo, M. Busman, H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.*, 10, 359 (1991).
c) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga and H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, 62, 882 (1990).
8. a) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.*, 194, 501 (1987).
b) C. S. Wright, *J. Mol. Biol.*, 215, 635 (1990).
9. M. P. Balogh and C. C. Stacey, presented at the 38th ASMS Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1209 (1990).
10. M. Muraki, M. Morikawa, Y. Jigami and H. Tanaka, *Eur. J. Biochem.*, 179, 573 (1989).
11. C. S. Wright, F. Gavilanes and D. L. Peterson, *Biochemistry*, 23, 280 (1984).
12. H. Nagahora, K. Ishikawa, Y. Niwa, M. Muraki and Y. Jigami, *Eur. J. Biochem.*, 210, 989 (1992).
13. J. Shabanowitz, M. A. Moseley, A. McCormack, H. Michel, P. Martino, D. F. Hunt, K. B. Tomer and J. W. Jorgenson, Presented at the 38th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1497 (1990).

第8章 エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析及び高速原子衝撃 (FAB) タンデム質量分析法によるイネ萎縮ウイルス (Rice Dwarf Virus, RDV) 外殻タンパク質の点変異解析¹⁾

8.1 緒言

8.1.1 ウイルスタンパク質の分子量測定における問題点

電気泳動 (Sodium dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) は、タンパク質の分子量の簡便な測定法として広く用いられている。しかし、植物ウイルスの外殻タンパク質は、しばしば異常な泳動度を示し、SDS-PAGEによる分子量測定に大きな誤差を与えることが知られている²⁾。一般に、ウイルスタンパク質は疎水性や凝集性が非常に高いため、一次構造上のわずかな違いが、ゲル中での分子の立体構造に大きな違いを引き起こす場合があるものと考えられる。

質量分析 (MS) 法は、立体構造とは独立に絶対的な分子量を測定できるので、原理的にこのような誤差が生じない。従来、MS法によるウイルスタンパク質の同定や構造解析³⁾には、酵素や化学反応によって限定分解を行い、生成したペプチド断片を高速原子衝撃 (FAB) 法により測定する、いわゆる”FABマッピング”⁴⁾が主に用いられてきた。近年のエレクトロスプレー (ESI) 法⁵⁾やマトリックスアシステッドレーザーデソープションイオン化 (MALDI) 法⁶⁾の発展に伴い、前章で検討したような酵素等、細胞質の液状部分に含まれる水溶性タンパク質を中心に、精密な分子量測定によるアミノ酸配列や翻訳後修飾の解析が盛んに行われるようになった。第5章で述べたように、ESIイオン化のためには、溶媒和によってタンパク質分子間の水素結合のネットワークを切断し、分子分散させることが必須である。しかし、疎水性や凝集性が高いウイルスタンパク質は、通常ESI測定に用いられる水系の溶媒に溶けにくい⁷⁾。一方、ウイルスタンパク質を溶解し、かつESI測定で高い感度が得られるような溶媒系を見出すことも容易でない。こうした理由から、Henkleinら⁸⁾によるHIV-1型ウイルス (Human Immunodeficiency Virus) を構成するタンパク質のモデルペプチドの他には、ウイルスタンパク質の精密な分

子量測定に関する報告はなかった。

8.1.2 RDVの構造と外殻タンパク質P8

RDVは、12本の2本鎖RNAと数種類のタンパク質からなる直径約70nmの二重の殻に包まれた正12面体の粒子である。(図8-1) イネは、RDVが感染すると葉に白い斑点を生じ、成長が阻害される。これまでの研究で、通常系のRDV (Ordinary strain of RDV, RDV-0) よりも著しく強い成長阻害を引き起こす強毒系のRDV (Severe strain of RDV, RDV-S) の存在が見い出された⁹⁾。また、SDS-PAGEによるRDVの最外殻のタンパク質P8の分子量測定では、RDV-Sから得られたP8 (47kDa) はRDV-0由来のP8 (46kDa) に比べ、約1kDa大きいとの結果が得られた⁹⁾。P8タンパク質は、RDVを形作っている最も重要なタンパク質の一つであり、宿主細胞と直接相互作用して、ウイルスの増殖効率に大きな影響を与えることが考えられる。従って、P8タンパク質の約1kDaの分子量変化が、RDV-Sの引き起こす強い病態と関連していることが推測された。

図8-2は、RNAセグメントS8の塩基配列から推定した、P8タンパク質のアミノ酸配列である¹⁰⁾。420残基のアミノ酸の内、RDV-0ではイソロシニンである235番目のアミノ酸が、RDV-Sではトレオニンに置き換わっていることが推定された。P8の酵素消化物のSDS-PAGEによる測定結果では、このアミノ酸位置を含むペプチド断片に分子量変化が見られた¹¹⁾。また、P8タンパク質及びそのトリプシン消化ペプチドのHPLCフラクションをプロテインシーケンサによって解析し、RNAから推定されたアミノ酸配列の確認が試みられた¹¹⁾。しかし、アミノ酸の置換部位のN末端側近くにトリプシンの認識部位 (リシンまたはアルギニン) がないため、アミノ酸置換の確認はできなかった。また、P8タンパク質のN末端部分のアミノ酸配列も、プロテインシーケンサでは解読できず、N末端がブロックされていることが推定された。結果として、RNAから推定されたP8タンパク質のアミノ酸置換を、タンパク質側で確認することはできず、SDS-PAGE測定から推定された約1kDaの分子量差が事実かどうかの判別も困難だった。

8.1.3 本研究の目的

本研究の目的は、P8タンパク質の精密な分子量測定により、RNAから推定された

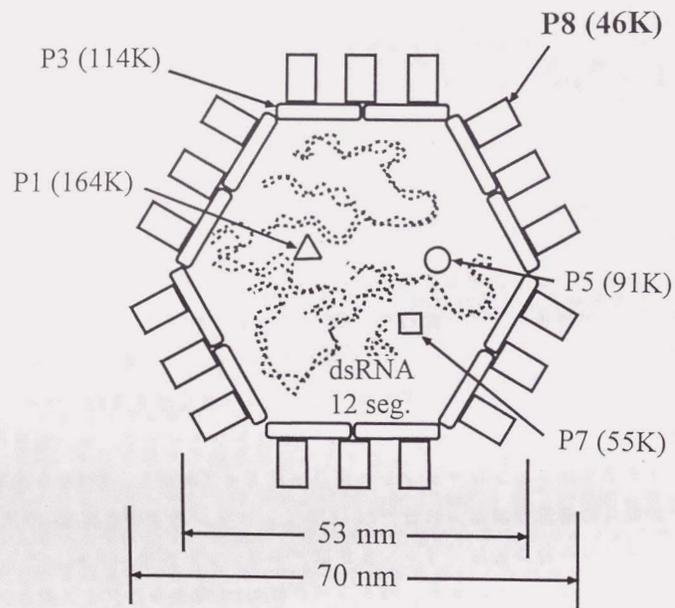


図8-1 イネ萎縮ウイルス (Rice Dwarf Virus, RDV) の構造 (断面図)
 SDS-PAGE測定から、強毒系のRDVでは、最外殻のタンパク質P8が、
 通常系 (46kDa) よりも約1kDa大きいことが推定された⁹⁾。

CH₃CO-S R Q M W L D T S A L L E A I S E Y V V 20
 R C N G D T F S G L T T G D F N A L S N 40
 M F T Q L S V S S A G Y V S D P R V P L 60
 Q T M S N M F V S F I T S T D R C G Y M 80
 L R K T W F N S D T K P T V S D D F I T 100
 T Y I R P R L Q V P M S D T V R Q L N N 120
 L S L Q P S A K P K L Y E R Q N A I M K 140
 G L D I P Y S E P I E P C K L F R S V A 160
 G Q T G N I P M M G I L A T P P A A Q Q 180
 Q P F F V A E R R R I L F G I R S N A A 200
 I P A G A Y Q F V V P A W A S V L S V T 220
 G A Y V Y F T N S F F G T I I A G V T A 240
 T A T A A D A A T T F T V P T D A N N L 260
 P V Q T D S R L S F S L G G G N I N L E 280
 L G V A K T G F C V A I E G E F T I L A 300
 N R S Q A Y Y T L N S I T Q T P T S I D 320
 D F D V S D F L T T F L S Q L R A C G Q 340
 Y E I F S D A M D Q L T N S L I T N Y M 360
 D P P A I P A G L A F T S P W F R F S E 380
 R A R T I L A L Q N V D L N I R K L I V 400
 R H L W V I T S L I A V F G R Y Y R P N 420

図8-2 イネ萎縮ウイルス (RDV) 外殻タンパク質P8のアミノ酸配列
 強毒系では、235位のIleがThrに置換することがRNA塩基配列から推定された¹⁰⁾。

P8タンパク質のアミノ酸置換を、直接タンパク質側で確認すると共に、SDS-PAGE測定から推定された約1kDaの分子量差が実際に存在するかどうかを検証することにある。また、水系の溶媒に溶けにくいP8タンパク質のESI測定を行うため、通常の検出器（イオンマルチプライア）の100倍程度の感度が得られる、アレー検出器を備えた磁場型質量分析計^{1,2)}の使用を試み、測定感度や分子量決定精度等を検討した。

8.2 実験

8.2.1 外殻タンパク質P8の分離精製と酵素消化

RDVのP8タンパク質は、ウイルスの核から高橋ら¹³⁾の方法により分離した。ウイルス懸濁液の80 μ lに0.01M MgCl₂と0.1M ヒスチジンを含むpH 6.2の緩衝液と4M MgCl₂を含むヒスチジン-Mg緩衝液20 μ lを加え、室温で10分間インキュベートした後、Beckman社製TL-100を用いて、200,000gで20分間遠心分離した。上澄み液について、再度同様に遠心分離した。P8タンパク質はPharmacia社製Superdex 200ゲル濾過カラムで精製した。移動相には、0.8M MgCl₂を含むヒスチジン-Mg緩衝液を用い、流速は0.4ml/minとした。タンパク質の分離状態は、280nmのUV検出器でモニターした。緩衝液中に得られたP8タンパク質は、水で透析を行った。溶液中の塩濃度が低下すると、タンパク質の凝集が見られた。そこで、約1mgのP8タンパク質を含む懸濁液を超音波によって分散させ、一部を酵素消化実験に用いた。残りの懸濁液は遠心分離し、上澄み液をESI-MS測定に用いた。

P8タンパク質は、0.1M 重炭酸アンモニウム (pH 8.0) を含む2M 尿素中でSigma社のTPCKトリプシンを用い、酵素/基質比1/40で37°Cで4時間消化した。また、P8タンパク質は0.05M 酢酸アンモニウム (pH 7.8) 中でMiles社のV8プロテアーゼを用い、酵素/基質比1/40で37°Cで18時間消化した。酵素消化液は、Pharmacia社製NAP-10ゲル濾過カラムで、30%酢酸 (AcOH) にバッファー交換し、FAB-MSによるペプチドマッピングを行った。

8.2.2 質量分析

マスマスペクトルの測定は、日本電子(株)製HX/HX110A型タンデム二重収束質量分析計を用い、同社製DA7000データシステムで、スペクトルデータの取り込み・

2次処理を行った。FAB測定には、同社製のMS-FAB11型原子ビームガンを用い、ESI測定には、Analytica of Branford社製ESIイオン源を用いた。第一質量分析部 (MS1) 及び第二質量分析部 (MS2) にそれぞれ装着された2,048チャンネルのアレー検出器¹⁴⁾を用いて、高感度測定を行った。MS1側のアレー検出器は、タンパク質のESI-MS測定に、MS2側のアレー検出器は、酵素消化ペプチドのFAB-MS/MS測定に用いた。スペクトルデータは、IBM-PC互換機に接続されたPrinceton Instruments社製ST120型光学式マルチチャンネルアナライザー制御装置で取り込んだ。

P8タンパク質水溶液は、0.1% AcOHを含む50% MeOH水溶液で20倍に希釈した。ESIイオン源に導入する際には、スプレーニードルの詰まりを防ぐため、1分間遠心分離した。50 μ lの試料溶液をサンプルループに導入し、2 μ l/minの流速で約3kVを印加したスプレーニードルに供給した。大気圧下のイオンを取り込むガラスキャピラリーの出口側電極は、初段のスキマーと等電位とし、イオン源の温度は180°Cとした。質量分析計のイオン加速電圧は7kV、質量分解能は1,000 (10%谷) である。質量較正は、アルカリ金属ヨウ化物 (LiI, NaI, KI, RbI, CsI) を、FABモードでイオン化して用いた。アレー検出器は、10%の質量分散が得られる角度 (イオンの入射角約25°) に設定した。ここで、質量分散はアレー検出器で同時に測定できる質量範囲の、検出器の中心に捕捉されるイオンの質量に対する割合で定義される。m/z 1,500から3,000までの測定では、MS1側のアレー検出器で各々約10秒間積算した、29セグメントの部分スペクトルを結合・編集して得られた。

未分離の酵素消化物のペプチドマッピングとアミノ酸配列解析は、FAB-MS及びFAB-MS/MSにより行った。ペプチド1~2 μ gを含む1 μ lの試料溶液をステンレスの試料台に加え、マトリックスのグリセリンと混合した。試料は、イオン源の高真空中で6kVのキセノン原子で照射した。FAB-MS測定では、通常の検出器を用い、加速電圧10kVで行った。質量分解能は、MS1、MS2とも1,000 (10%谷) とした。MS/MS法による衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) スペクトルの測定では、5kVを印加した衝突室にヘリウムガスを導入し、プリカーサーイオンの強度が50%に減少するよう調節した。MS/MSスペクトルは、m/z 150から1,600までMS2側のアレー検出器を用いて測定した。スペクトルは、質量分散7%の条件で48個のセグメントに分けて取り込んだ。

8.3 結果と考察

8.3.1 RDV-O及びRDV-Sから得られたP8タンパク質のESIスペクトル

図8-3(a)は、RDV-0から得られたP8タンパク質を微量に含む上澄み液を用いて測定したESIスペクトルである。価数の少ないピークは、高質量側へのブロードニングが顕著に見られた。 ^{13}C 等の同位体起因するピーク幅は、価数に依らず一定なので、 m/z 単位で測定した多価イオンのピーク幅は、価数に反比例するはずである。また、タンパク質の構造的不均一性に起因するピーク幅も、同様である。しかし、実測の多価イオンピークでのブロードニングの度合いは、価数の逆数よりも明らかに急激に増加した。従ってブロードニングの原因は、同位体やタンパク質の構造的不均一性のみでは説明できず、溶媒や塩類等の低分子の付加（アダクト生成）の寄与が考えられた。図のスペクトルでは、P8タンパク質の絶対濃度は、極めて低いと推測されることから、相対的に低分子の不純物の濃度が無視できなくなり、アダクト生成が促進されたことが考えられる。もう一つの要因としては、タンパク質の変性の度合いがある。スペクトルで観測されたP8の最高価数は 27^+ 程度であり、これはP8タンパク質に含まれる塩基性アミノ酸の数（ $33=24$ (アルギニン)+1(ヒスチジン)+8(リシン))の約80%に過ぎない。塩基性部位の多くが、タンパク質の球状構造の中にうずまっているために、プロトン付加が妨げられていることが推察される。価数の増加とともに、アダクト生成が少なくなることは、分子内のクーロン反発力によって、ペプチド鎖がほぐされて低分子が外れやすくなったとして説明できる。ESIスペクトルから M_r を求める場合には、未分離の同位体ピークプロファイルの重心位置の質量数が元になるので、アダクト生成によるブロードニングは M_r をプラス側に誤差を与える原因になる。RDV-Sから得られたP8タンパク質のESIスペクトルは、RDV-0からのものと荷電分布や多価イオンピークの形状などの特徴はほとんど差がなかった。

図8-3(b)は、RDV-0及びRDV-Sから得られたP8タンパク質のESIスペクトルの $[\text{M}+22\text{H}]^{22+}$ ピークの生データの波形である。上記のブロードニングの影響が見られるが、ピークの先端付近では、比較的幅が狭いことが分かる。例えば、ピークの半値幅は m/z で4.3、 M_r 換算で96Daであるが、同じく高さの70%でのピーク幅は、 m/z で1.6、 M_r 換算で35Daに過ぎない。後者は、P8タンパク質の元素組成（ $\text{C}_{2087}\text{H}_{3260}\text{N}_{548}\text{O}_{618}\text{S}_{16}$ ）から算出される $[\text{M}+22\text{H}]^{22+}$ ピークの理論的な同位体分布から

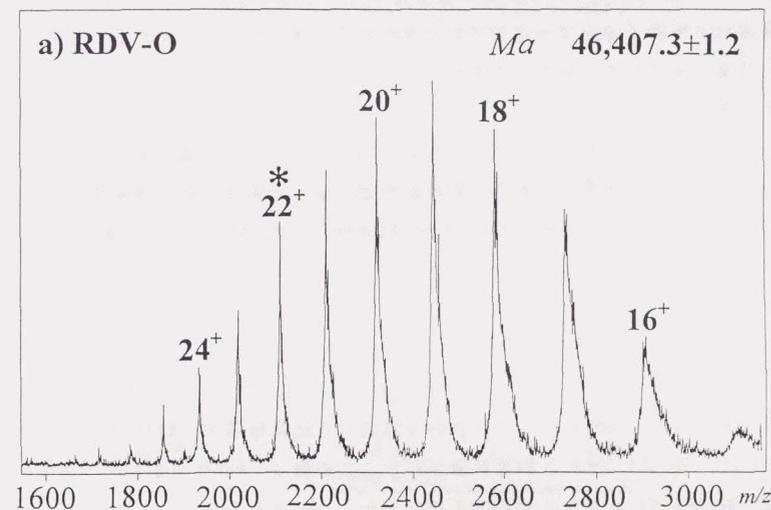
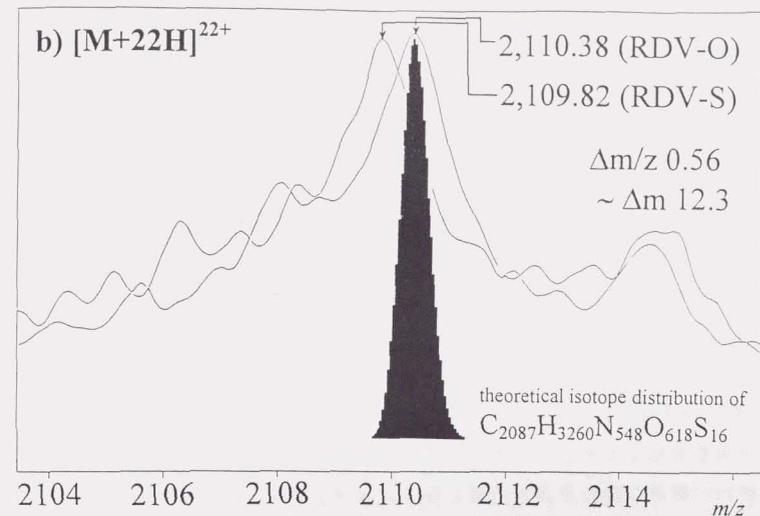


図8-3 イネ萎縮ウイルス（通常系）から得られたP8タンパク質のESIスペクトル
 M_a は、多価イオンピークのトップ位置から求めた、最も存在比の多い同位体イオンの質量。(b)は、 $[\text{M}+22\text{H}]^{22+}$ ピークの拡大図（通常系RDV-0及び強毒系RDV-S）。黒塗りは、RDV-0の元素組成から算出される $[\text{M}+22\text{H}]^{22+}$ ピークの理論的な同位体分布

のピーク幅の約3倍である。これは、P8タンパク質の同位体を分離するのに必要な分解能(約46,000)よりも、実際の分解能(1,000)がかなり低かったことから考えて妥当な値である¹⁵⁾。拡大したスペクトルでは、ピークの低質量側へのブロードニングも見ることが出来る。これらは、タンパク質の微小な構造不均一性や、フラグメント化によるH₂O等の低分子の脱離等の寄与が考えられる¹⁶⁾。

8.3.2 ESIスペクトルからのP8タンパク質の分子量計算

ESI-MSによるタンパク質の分子量測定では、通常未分離の同位体ピークプロファイルの重心位置の質量数に基づいて、同位体平均分子量(relative Molecular mass, Mr)が求められる。しかし一般に、ESIスペクトルにおいては、タンパク質の分子量の増加とともにアダクト生成や、構造不均一性によるブロードニングが観測され、精密なMrの算出が困難となる。本研究でも、分子量約46,000のウイルスタンパク質のESIスペクトルを測定することができたが、アダクト生成によると考えられる多価イオンピークのブロードニングが見られた。そのため、ピークの重心位置に基づいて正確なMrを算出することが困難になる。しかし、ピークトップの位置については、ブロードニングの影響が少ないので、図8-3(b)のようなノイズの少ない滑らかなピーク形が得られれば、その正確な位置を求めることができる。但し、ピークトップから得られるのは、最も存在比の多い同位体イオンの質量(Ma, mass of the most abundant isotope ion)であり、分子量1万を越えるタンパク質でも、正確にはMrとは異なっている。実際、P8タンパク質のMrは46,407.0であるのに対し、Maは46,406.5である。ノイズの少ないピーク形が測定できたのは、通常の検出器よりも約10倍のS/Nが得られるアレー検出器を用いたことによっている。表8-1は、RDV-0及びRDV-Sから得られたP8タンパク質のMaを、ESI-MSで測定された多価イオンピークから算出した結果を示す。RDV-0のP8タンパク質のMaは、46,407.3±1.2 Daと計算された。この値は、RNAの塩基配列から算出した値(46,364.5)よりも、約43Da大きかった。この過剰質量は、ウイルスタンパクで報告されているN末端のアセチル化¹⁷⁾による42Daの増加とほぼ一致した。RDV-0及びRDV-Sから得られたP8タンパク質の分子量の差は、-12.3±2.3Daで、イソロシニンからトレオニンへの置換による-12Daの差とよく一致した。ピーク形の滑らかさによりピークトップから正確な質量が決定できたことに加え、四重極質

表8-1 ESIスペクトルの多価イオンピークから算出したイネ萎縮ウイルス((a)通常系、(b)強毒系)のP8タンパク質の分子量

a) RDV-O (theor Ma^{a)} 46,406.5)

No. of Charge (a)	measd <i>m/z</i> ^{b)} (b)	exp calcd <i>Ma</i> ((b-1.00794)×a)	diff	
			Da	ppm
25	1,857.36	46,408.8	+1.8	+39
24	1,934.60	46,406.2	-0.8	-17
23	2,018.69	46,406.7	-0.3	-6
22	2,110.38	46,406.2	-0.8	-17
21	2,210.87	46,407.1	+0.1	+2
20	2,321.45	46,408.8	+1.8	+39
19	2,443.69	46,411.0	+4.0	+86
18	2,579.48	46,412.5	+5.5	+119
17	2,731.11	46,411.7	+4.7	+101
average ^{c)}		46,407.3 (diff +0.8)	±1.2	±26

b) RDV-S (theor Ma^{a)} 46,394.5)

No. of Charge (a)	measd <i>m/z</i> ^{b)} (b)	exp calcd <i>Ma</i> ((b-1.00794)×a)	diff	
			Da	ppm
25	1,856.81	46,395.1	+0.1	+2
24	1,934.10	46,394.2	-0.8	-17
23	2,018.25	46,396.6	+1.6	+34
22	2,109.82	46,393.9	-1.1	-24
21	2,209.92	46,387.2	-7.8	-168
20	2,320.78	46,395.4	+0.4	+9
19	2,443.02	46,398.2	+3.2	+69
18	2,578.64	46,397.4	+2.4	+52
17	2,730.66	46,404.1	+9.1	+196
average ^{d)}		46,395.0 (diff +0.5)	±1.1	±24

^{a)} The mass of the most abundant isotope ion

^{b)} The top position of the unresolved isotope peak profile

^{c)} The average of the experimentally calculated *Ma* with charge states 25 to 20

^{d)} The average of the experimentally calculated *Ma* with charge states 25 to 22 and 20

量分析計に比べて、磁場型質量分析計の分解能の高さや質量較正の安定性及び質量範囲の広さ等が、高い精度でMaを測定するのに有用であることがわかった。

8.3.3 FAB-MS及びFAB-MS/MSによるトリプシン及びV8プロテアーゼ消化物のペプチドマッピングとアミノ酸配列推定

表8-2は、RDV-0のP8タンパク質のトリプシン消化物をそのままFAB-MS測定を行い、予想されるペプチド断片の帰属を行った結果である。29種類の予測される断片のうち7種類は測定範囲(400~4,000Da)外だったが、8種類がスペクトルに観測された。"±"で示した観測された断片は、アミノ酸配列の全体に分布していた。全ての断片が観測されなかったことは、酵素消化反応が不十分だったためではないと考えられる。高質量領域のFAB-MS測定により、アミノ酸置換が予想されたT18(分子量約7,200)の測定を試みたが、該当する分子量領域にはピークを観測できなかった。ESI-MSによっても、この断片は測定できなかった。これは、T18にはC末端のアルギニンしか塩基性アミノ酸がないため、多価イオンが生成しにくいためと考えられる。

表8-3は、RDV-0のP8タンパク質のV8プロテアーゼ消化物のFAB-MS測定を行い、予想されるペプチド断片の帰属を行った結果である。アミノ酸置換が予想された断片V7は、分子量が(約9,700)大きいため測定できなかった。一方、タンパク質のN末端を含む断片V1の分子量は、予想されたN-アセチル化を支持した。RDV-Sのトリプシン及びV8プロテアーゼ消化物のFAB-MS測定結果は、RDV-0と同じだった。

図8-4は、(a)RDV-0のV8プロテアーゼ消化物のFAB-MS及び(b)タンパク質のN末端を含む断片V1のプロトン化分子のCIDスペクトルである。CIDスペクトルには、ペプチド鎖の1カ所の開裂により生成する、元のペプチドのN末端部分を含むイオン(アミノ酸配列(amino acid sequence)を反映したイオン:シーケンスイオン)が強く観測され、N-アセチル化を支持した。(シーケンスイオンの略号、a、b、d等については、巻頭の図を参照)タンパク質のN末端部分及びトリプシン消化後のN末端断片のアミノ酸配列が、プロテインシーケンサで読取できなかったのは、アセチル基によるブロックのためであることが分かった。

表8-2 イネ萎縮ウイルス(通常系)のP8タンパク質のトリプシン消化物のFAB-MS測定結果

No.	Residues	Sequence	MH ⁺	FAB-MS ^{a)}
T1	1-2	Ac-SR	304.5	/
T2	3-21	QMWLDTTSALLEAISEYVVR	2224.1	-
T3	22-57	CNGDTFSGLTTGDFNALSNMFTQL-SVSSAGYVSDPR	3759.7	-
T4	58-76	VPLQTMNSMFMVFSFITSTDR	2174.1	+
T5	77-82	CGYMLR	742.3	-
T6	84-91	TWFNSDTK	998.4	-
T7	92-104	PTVSDDFITTYIR	1527.8	-
T8	105-106	PR	272.1	/
T9	107-116	LQVPMSDTVR	1145.6	+
T10	117-128	QLNNLSLQPSAK	1312.7	-
T11	129-130	PK	244.1	/
T12	131-134	LYER	580.3	-
T13	135-140	QNAIMK	704.4	-
T14	141-154	GLDIPYSEPIEPCK	1560.8	+
T15	155-157	LFR	435.3	-
T16	158-187	SVAGQTGNIPMMGILATPPAAQQQ-PPFVAER	3229.7	+
T17	191-196	ILFGIR	718.5	+
T18 ^{b)}	197-267	SNAAPAGAYQFVVPWASVLSVT-GAYVYFTNSFFGTIIAGVTATATAA-DAATTFVPTDANNLPVQTDSR	7229.6	/
T19	268-285	LSFSLGGGNINLELGVAK	1789.0	+
T20	286-302	TGFCVAIEGEGFTILANR	1840.9	-
T21	303-336	SQAYYTLNSITQTPTSIDDFVSDFL-TTFLSCLR	3887.9	-
T22	337-377	ACGQYEIFSDAMDQLTNSLITNYM-DPPAIPAGLAF TSPWFR	4552.1	/
T23	378-381	FSEK	538.3	-
T24	382-383	AR	246.1	/
T25	384-396	TILALQNVDLNIR	1483.0	+
T26	398-401	LIVR	500.3	-
T27	402-415	HLWVITSLIAVFGR	1612.0	+
T28	416-418	YYR	501.2	-
T29	419-420	PN	230.1	/

^{a)} +:found, -:not found, /:out of measurement range (400-4,000 Da)

^{b)} fragment including the substitution site (235th Ile)

表8-3 イネ萎縮ウイルス（通常系）のP8タンパク質のV8プロテアーゼ消化物のFAB-MS測定結果

No	Residues	Sequence	MH ⁺	FAB-MS ^{a)}
V1	1-13	Ac-SRQMWLDTSALLE	1592.1	+
V2	14-17	AISE	419.2	-
V3	18-133	YVVRNCGDTFSGLTGDFNALS- MFTQLSVSSAGYVSDPRVPLQTM- SNMFVSFITSDRCGYMLRKTWF- NSDTKPTVSDDFITTYIRPRLQVP- MSDTRQLNLSLQPSAKPKLYE	13075.4	/
V3'	114-133	TVRQLNLSLQPSAKPKLYE	2300.9	+
V4	134-148	RQNAIMKGLDIPYSE	1734.9	-
V5	149-151	PIE	358.2	/
V6	152-187	PCKLFRSVAGQTGNIPMMGILAT- PPAAQQQFFVVAE	3815.9	-
V7 ^{b)}	188-280	RRRILFGIRSNAAIPAGAYQFVVP- AWASVLSVTGAYVYFTNSFFGTII- AGVTATATAADAATFTVPTDA- NNLPVQTD SRLSFSLSLGGGNINLE	9699.0	/
V8	281-293	LGVAKTGFCVAIE	1307.7	+
V9	294-295	GE	205.1	/
V10	296-342	FTILANRSQAYYTLNSITQTPTSID- DFDVSDFLTTFLSQLRACGQYE	5354.6	/
V11	343-380	IFSDAMDQLTNSLITNYMDPPAIP- AGLAFTSPWFRFSE	4264.0	/
V12	381-420	RARTILALQNVDLNIKLIIVRHL- WVITSLIAVFGRYRPN	4761.8	/

^{a)} +:found, -:not found, /:out of measurement range (400-4,000 Da)

^{b)} fragment including the substitution site (235th Ile)

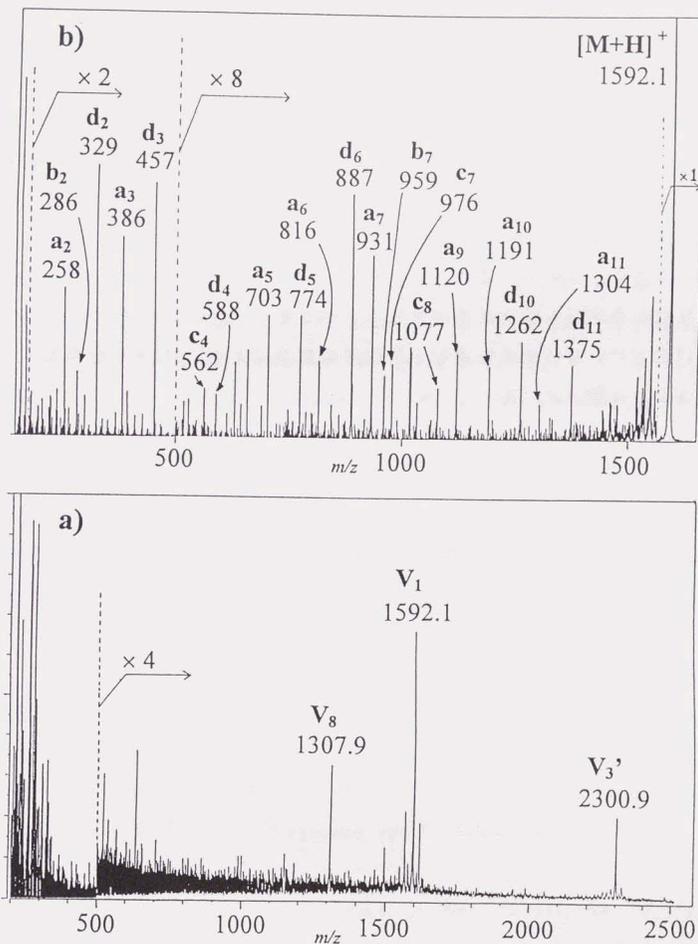


図8-4 (a)イネ萎縮ウイルス（通常系）から得られたP8タンパク質のV8プロテアーゼ消化物のFAB及び(b)P8のN末端を含む断片V₁のプロトン化分子のFAB-CIDスペクトル

8.4 本章のまとめ

ESI-MSによるタンパク質の精密な分子量測定及びFAB-MS及びFAB-MS/MSによる酵素消化物のペプチドマッピングにより、RDVの外殻タンパク質の株によるアミノ酸置換や翻訳後修飾を、迅速に解析することができた。その結果、SDS-PAGEから観測されたP8タンパク質の1kDaの分子量差は、植物ウイルスの外殻タンパク質がSDS-PAGEにおいてしばしば示す、異常な泳動度による見かけ上の現象であることが明らかとなった。

本研究では、高感度のアレー検出器を使用することにより、疎水性や凝集性が高く、通常的水系溶媒に殆ど溶けないウイルスタンパク質でも、ノイズの少ないスペクトルが得られた。溶媒や塩類等の付加によるブロードニングのため、ピークの重心位置を正確に求めることは困難だったが、ピークトップの質量数から、タンパク質の分子量を精密に算出することができた。今後、非常に疎水性や凝集性の高いタンパク質の測定に適した溶媒系の探索により、ESI法の適用範囲が更に拡大することが期待される。

文献

1. K. Ishikawa, T. Omura, Y. Koga, Y. Niwa and M. Tsuchiya, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **44**, 641 (1996).
2. Y. Sano and H. Inoue, *Bull. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.*, **1**, 99 (1985).
3. a) J. J. Gorman, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 96 (1992).
b) L. E. Henderson, H. C. Krutzsch and S. Oroszlan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 339 (1983).
4. C. K. Leonard, M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas and T. J. Gregory, *Biol. Chem.*, **265**, 10373 (1990).
5. S. J. Shire, P. McKay, D. W. Leung, G. J. Cachianes, E. Jackson and W. I. Wood, *Biochemistry*, **29**, 5119 (1990).
6. R. J. Cotter, *Nihon Iyo Masusupekutoru-gakkai Koenshyu*, **17**, 89 (1992).
7. K. Biemann and S. A. Martin, *Mass Spectrom. Rev.*, **6**, 1 (1987).
8. R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman and H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.*, **10**, 359 (1991) and the references therein.
9. M. Karas, U. Bahr and U. Giessmann, *Mass Spectrom. Rev.*, **10**, 335 (1991) and the references therein.
10. P. A. Schindler, A. Van Dorsselaer and A. M. Falick, *Anal. Biochem.*, **213**, 256 (1993).
11. P. Henklein, U. Schubert, O. Kunert, S. Klabunde, V. Wray, K.-D. Kloeppe, M. Kieb, T. Porstmann and D. Schomburg, *Pept. Res.*, **6**, 79 (1993).
12. I. Kimura, Y. Minobe and T. Omura, *J. Gen. Virol.*, **68**, 3211 (1987).
13. T. Omura, K. Ishikawa, H. Hirano, M. Ugaki, Y. Minobe, T. Tsuchizaki and H. Kato, *J. Gen. Virol.*, **70**, 2759 (1989).

11. T. Omura, Y. Takahashi, M. Tomiyama, I. Kimura and H. Hibino, *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **59**, 438 (1993).
12. J. A. Loo and R. Pesch, *Anal. Chem.*, **66**, 3659 (1994).
13. Y. Takahashi, M. Tomiyama, H. Hibino and T. Omura, *J. Gen. Virol.*, **75**, 269 (1994).
14. J. A. Hill, J. E. Biller, S. A. Martin, K. Biemann, K. Yoshitome and K. Sato, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **211**, 92 (1989).
15. J. R. Chapman, R. T. Gallagher, E. C. Barton, J. M. Curtis and P. J. Derrick, *Org. Mass Spectrom.*, **27**, 195 (1992).
16. R. B. Cody, J. Tamura and B. D. Musselman, *Anal. Chem.*, **64**, 1561 (1992).
17. a) J. J. Gorman, G. L. Corino and B. J. Shiell, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, **19**, 646 (1990).
b) C. Verde, A. Malorni and A. Parente, *J. Protein Chem.* **8**, 795 (1989).

第9章 ペプチド多価イオンの衝突活性化開裂 (CAD) によるイオン分解機構¹⁾

9.1 緒言

9.1.1 ペプチドのイオン分解を利用した一次構造解析の問題点と多価イオンの質量分析法による新たな可能性

質量分析法による未知ペプチドやタンパク質の一次構造解析の信頼性が、プロテインシーケンサに比べて劣る原因の一つには、イオン分解を経験的、または非経験的に予測できないことがある。(第1章参照) もし、従来とは異なる機構によってイオン分解を起こさせることが可能で、スペクトルが経験的、または非経験的に予測可能となれば、質量分析法による一次構造解析の飛躍的な進歩が期待できる。

質量分析法では、これまでほぼ1価イオンが対象とされてきたが、ESI法を用いれば、容易に多価イオンを生成できる²⁾。これにより、多価イオンの衝突活性化開裂 (Collisionally activated dissociation, CAD) を利用する新たな一次構造解析の可能性がもたらされた³⁾。すなわち、分子内での電荷間の反発によりイオン分解が促進されたり、多価のプリカーサーイオン1分子から複数の娘イオンが生成する可能性があり、1価イオンを分解した場合に比べて多くの構造情報が得られることが期待される。また、長鎖のペプチドは、多数の分子内水素結合を形成して折り畳まれた構造を取り易いため、いろいろなペプチド結合の開裂によるイオンが観測されにくい傾向がある。クーロン反発によって、真空中でのペプチド鎖のコンホメーションがより直線に近い状態になれば、長鎖ペプチドからもより多くの構造情報が得られる可能性がある。また、クーロン相互作用により1価イオンとは異なる、より単純なイオン分解の規則性が見いだされれば、スペクトルから信頼性高くアミノ酸配列を推定できることが期待される。

9.1.2 ペプチド多価イオンのイオン分解機構に関する従来の研究

ペプチド多価イオンのCADスペクトルの研究から、ペプチドに含まれる塩基性アミノ酸の位置と数が、イオン分解に影響することが明らかになった⁴⁻⁵⁾。例えば、

トリプシン消化物のようにC末端にリシンやアルギニンを持つペプチドの2価イオンでは、2個のプロトンは、主にN末端のアミノ基とC末端のリシンやアルギニンの側鎖に付加していると考えられる。2価イオンのCADスペクトルでは、N末端またはC末端に電荷を保持したままペプチド結合のCO-NH間で開裂したと考えられる、C及びN末端のアミノ酸配列を反映したフラグメントイオン（シーケンスイオン）y及びbイオンのシリーズが観測された⁵⁾。（シーケンスイオンの略号⁶⁾については、図9-1を参照）Barinagaら⁷⁾は、メリティン（melittin, Mr 2,846.5）の多価イオンのCADスペクトルを検討し、プロリンのN末端側での選択的なイオン分解とプリカーサーイオンの荷電数の増加に伴う分解挙動の変化を観測した。メリティンのC末端部のアミノ酸配列は-KRKRQQ-CONH₂（下線は塩基性アミノ酸を示す。以下同じ）で、4残基の塩基性アミノ酸が集中している。プリカーサーイオンの価数を2価から6価まで増加した場合、価数の増加に伴って、塩基性アミノ酸が少ないN末端付近での開裂を反映した長鎖のyイオンや短鎖のa、bイオンが強く観測された。

Rockwoodら⁸⁾は、分子内クーロン相互作用の多価イオンのCADへの影響について、“charge on a dissociation string”モデルを用いて、半定量的な考察を行った。このモデルでは、ペプチドに電荷を付与するプロトンは、リシンやアルギニン等の塩基性アミノ酸の側鎖に固定されており、それらはペプチド鎖上に等間隔に配置されていると仮定された。また、電荷はペプチド鎖上にあるものと仮定され、アミノ酸側鎖の物理的な長さは無視された。この条件で、塩基性部位に固定されたプロトンの間の反発力が多価イオンのCADに及ぼす影響を見積もったところ、ペプチド結合の解離エネルギー障壁の低下には殆ど寄与しないことが結論された。これに対し、多価イオンの熱力学的安定性には、クーロンエネルギーは大きな影響を与えた。これらの結果は、近距離力である化学結合力と遠距離力であるクーロン力の特性の違いによるものとして理解される。

Tangら⁵⁾は、生理活性ペプチドであるサブスタンスP (RPKPQQFFGLM-NH₂, SUBP)のCADスペクトルでは、特定のペプチド結合が非常に選択的に開裂し、対応するy及びbタイプのイオンの対が観測されることに着目し、環状中間体を経る分解スキームを提案した。このスキームでは、リシンの側鎖のε-アミノ基の存在が必須であり、アルギニンやヒスチジン等他の塩基性アミノ酸には直接適用できないことや、分解位置の選択性が生じることの直接の根拠に乏しい等の難点があった。

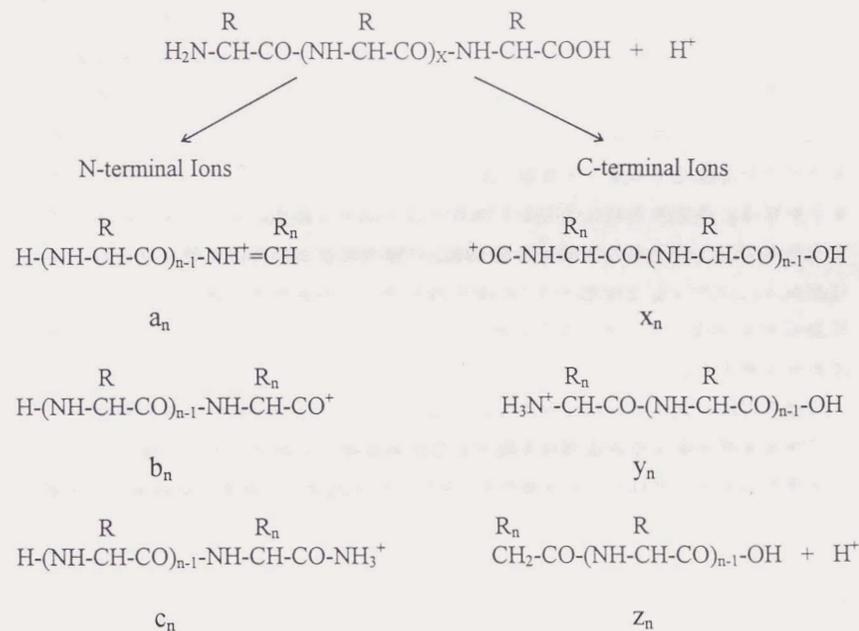


図9-1 ペプチドのCADスペクトルで観測される、主鎖の開裂により生成するシーケンスイオンの構造と略号

9.1.3 本研究の目的

従来の研究から、塩基性アミノ酸の位置や相対距離とイオン分解位置や選択性の関係、ブリーカーイオンの価数と分解し易さ等、ペプチド多価イオンの特徴的なイオン分解は、1価イオンの分解機構の単純な拡張では説明できないことが明らかとなった。多価イオンのイオン分解に対する分子内クーロン相互作用の影響を見積もるために用いられた"charge on a dissociation string"モデルは、メリテンのように塩基性アミノ酸の存在位置に偏りがあり、それらの外側で分解するペプチドには適用できなかった。また、このモデルでは分子内プロトン移動反応は考慮されなかった。しかし、塩基性アミノ酸の配置に偏りがあるペプチドでは、塩基性アミノ酸の密度の高い部位から低い部位に向かって、分子内を移動するプロトンを加速するような電場が形成されることが考えられる。ペプチドのイオン分解は、ペプチド結合のアミド窒素へのプロトン移動により促進されると考えられるので、分子内の電場勾配がイオン分解の位置選択性に影響を与える可能性がある。こうした理由で、ペプチド多価イオンの特徴的なイオン分解を合理的に説明するためには、分子内プロトン移動反応を考慮したイオン分解機構が必要であると考えられる。

本研究では、クーロン相互作用存在下での分子内プロトン移動反応を考慮したペプチド多価イオンの分解機構を見出すことを目的とした。さらに、規則的なアミノ酸配列を持つ合成ペプチドのCADスペクトルを測定し、提案した機構の妥当性の検証を試みた。

9.2 実験

9.2.1 質量分析

ESI及びESI-CADスペクトルの測定には、Extrel社製タンデム四重極質量分析器(質量範囲1~2,000Da)に、筆者らが設計・製作したESIイオン源を装着したESI-LC/MS/MS装置(図5-2参照)¹⁾を用いた。装置の詳細は、第5章2節の実験の項に記した。ペプチド試料は、酢酸(AcOH)/メタノール(MeOH)/水(1:499.5:499.5、以下すべて体積比)溶液に溶解し、20 μ lのループを介してISCO社製100D型シリンジポンプにより流速2 μ l/minで、直接スプレーノードルに供給した。通常の質量スペクトルを測定する場合には、初段の四重極アナライザーをRF-DCモードで、

2・3段目のアナライザーをRFモードで使用し、MS/MSスペクトルの測定時には、1・3段目のアナライザーをRF-DCモードとし、2段目のみRFモードで使用した。MS/MS測定における衝突ガスには窒素を用い、イオン源の電位(通常約10V)に対して2段目のアナライザーの中心電位を10から50V低く設定し、電荷当り10から50eVの衝突エネルギーを与えた。ガス圧(3mPa)は、全ての測定について一定とした。

9.2.2 ペプチド、タンパク質試料

N末端と鎖中のいろいろな位置のアラニン(A)をリシン(K)で置換したオクタアラニン(以後、[K¹, Kⁿ]-0Aと表す)の合成には、Chiron mimotopes社製マルチピンペプチド合成法⁹⁾を用いた。図9-2に本法の原理を、図9-3に合成のスキームを示した。ペプチドを結合させるポリプロピレン製のロッド(Rod)は、アクリル酸とジメチルアクリルアミドの存在下で放射線でグラフト重合させることにより導入したカルボキシル基に、リンカー(Linker)と呼ばれる化合物グループが結合されている(図9-2)。原料のFmoc-アミノ酸は、リンカーの末端の β -アラニンのアミノ基側に順次結合された。例えば、[K¹, K²]-0Aの場合には、セリンに続いて6残基のアラニンと2残基のリシンを順に結合し、H₂N-KKAAAAAAS-Linker-Rodを得た。最後に、6N HCl中25°C40時間の条件下でAla-Ser間の選択的な加水分解¹⁰⁾を行い、目的の[K¹, K²]-0Aをリンカーから切り離した。ペプチドは、日本分光工業(株)製4.6 \times 250mmのODSカラムを用いた逆相液体クロマトグラフィーによって精製した。

[Val⁵, Ser⁹]アンギオテンシンI ([Val⁵, Ser⁹]-angiotensin I, VSAG)、[Val⁵]アンギオテンシンI ([Val⁵]-angiotensin I, VAG)、 α メイトイングファクター(α -mating factor, AMAT)、ブラジキニン(bradykinin, BRAD)及びSUBPは、(株)ペプチド研究所から購入しそのまま使用した。シトクロムc(cytochrome C, CYT)は、Sigma社から購入した。CYTは、2M尿素、0.1M Tris-HCl (pH8.0)中に溶解し、トリプシン(Sigma社製、TPCK処理済み)を用い、酵素/基質=1:10の条件下、37°Cで12時間消化した。消化ペプチド溶液は、ゲルろ過カラム(Pharmacia社製NAP-10)により30% AcOH水溶液に置換した。

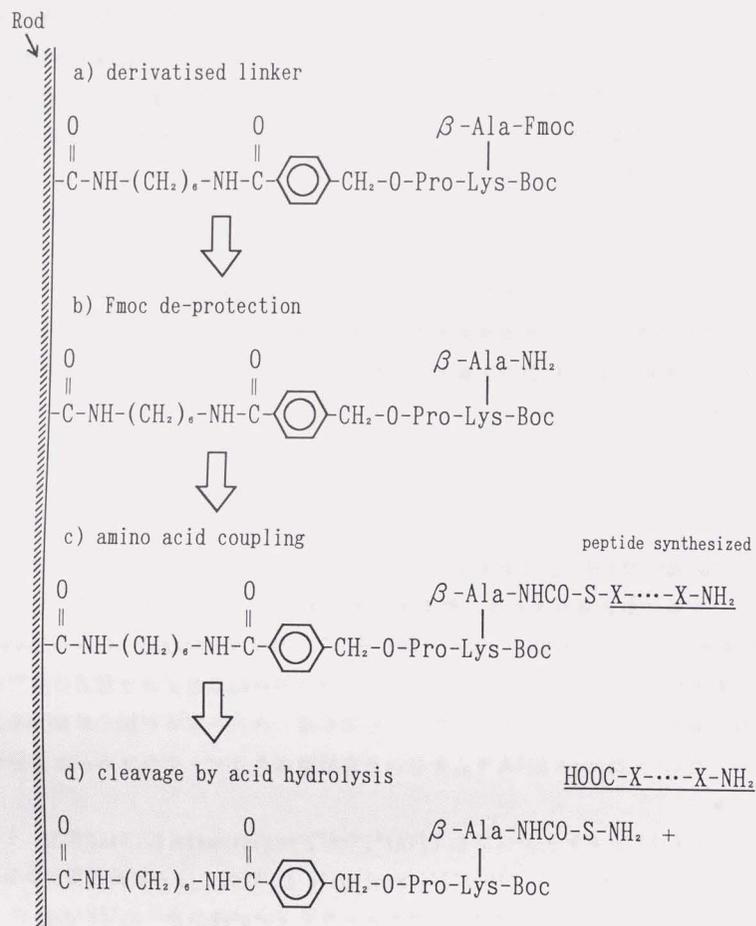


図9-2 マルチピンペプチド合成法の原理

AA: acetic acid
 AN: anisole
 DCC: dicyclohexylcarbodiimide
 DMF: N,N-dimethylformamide
 ED: ethanedithiol
 HOBt: 1-hydroxybenzotriazole
 MeOH: methanol
 PP: piperidine
 TFA: trifluoroacetic acid

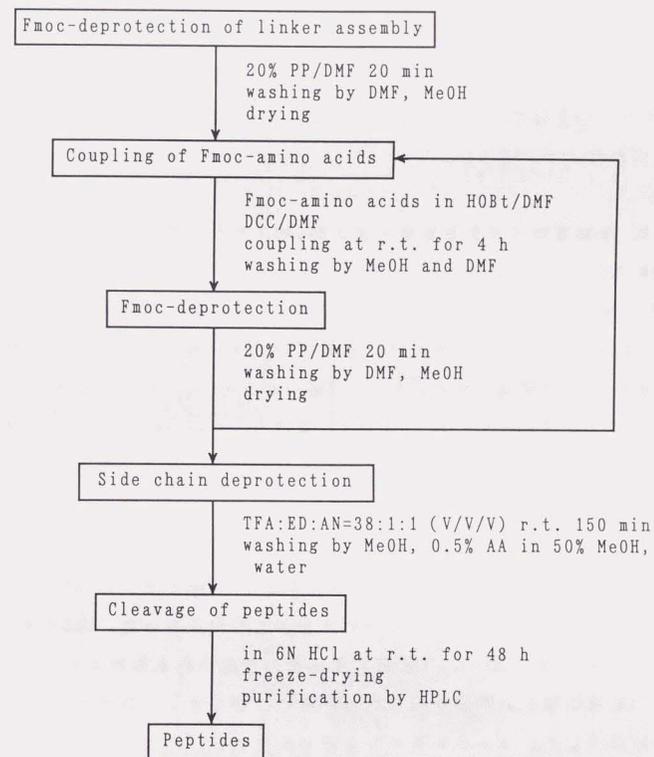


図9-3 マルチピンペプチド合成のスキーム

9.3 結果

9.3.1 CYTのトリプシン消化ペプチド多価イオンのCADスペクトル

CYTのトリプシン消化ペプチドのN末端から7番目の断片 T_7' (TGPLNLHGLFGR, Mr 1,168.3) は、ヒスチジン、アルギニン及びN末端のアミノ基の合計3個の塩基性基を持っている。未分離のトリプシン消化ペプチドのESIスペクトル (図9-4(a)) では、 T_7' の3価及び2価のイオンが観測されたので、それぞれのCADスペクトル (図9-4(b)及び(c)) を測定した。どちらも、1価のyイオンのシリーズが類似のパターンで観測され、プリカーサーイオン (*印) の価数による違いは殆ど見られなかった。3価イオンのCADスペクトル (図9-4(b)) で見られたm/z 649, 535のイオンは、2価イオンの質量数 (m/z 390.5) が T_7' の3価イオン (m/z 390.4) と重なる、N末端から13番目の断片 T_{13}'' (MIFAGIK, Mr 779.0) から生成したyイオンであると帰属された。

9.3.2 生理活性ペプチド多価イオンのCADスペクトル

図9-5は、BRAD (RPPGFSPFR, Mr 1,060.2) のESI-MS (a) 及び2価 (b) 及び3価 (c) イオンのCADスペクトルで、衝突エネルギーはそれぞれ80eV、120eVである。2価イオンのCADスペクトルでは、長鎖のN、C両末端のシーケンスイオン (a_n , b_n , y_n ; $n=6\sim 8$) が観測された。一方、3価イオンのCADスペクトルでは、短鎖のシーケンスイオン (a_n , b_n , y_n ; $n=3\sim 6$) 及びそれらの2価イオンが見られた。両者とも、低分子領域にはプロリン、フェニルアラニン、セリン等のイモニウムイオン (I : $H_2N^+=CHR$, I_P , I_F , I_S) が観測された。図9-6は、SUBP (RPKPQQFFGLM-NH₂, Mr 1,347.6) のESI-MS (a) 及び2価 (b) 及び3価 (c) イオンのCADスペクトルで、衝突エネルギーはそれぞれ100eV、60eVである。2価イオンのCADスペクトルでは、C末端付近の a_{10}^2 , b_{10}^2 , b_{10}^2 等のイオンが比較的多かった。3価イオンのCADスペクトルでは、2価イオンより衝突エネルギーが低いにも拘わらず、プリカーサーイオンの強度の著しい減少が見られると共に、娘イオンの種類が減少してスペクトルが単純化した。トータルイオン強度の60%は b_{10}^2 とこれと対になる y_1 であり、Leu-Met間のペプチド結合が、極めて選択的に開裂していることがわかる。同じ b_{10}^2 イオン (m/z 600) は、ESIスペクトル (図9-6(a)) にも比較的強く現れた。ESIイオン源の大気圧-真空インターフェイス部では、イオンの透過率を向上させ

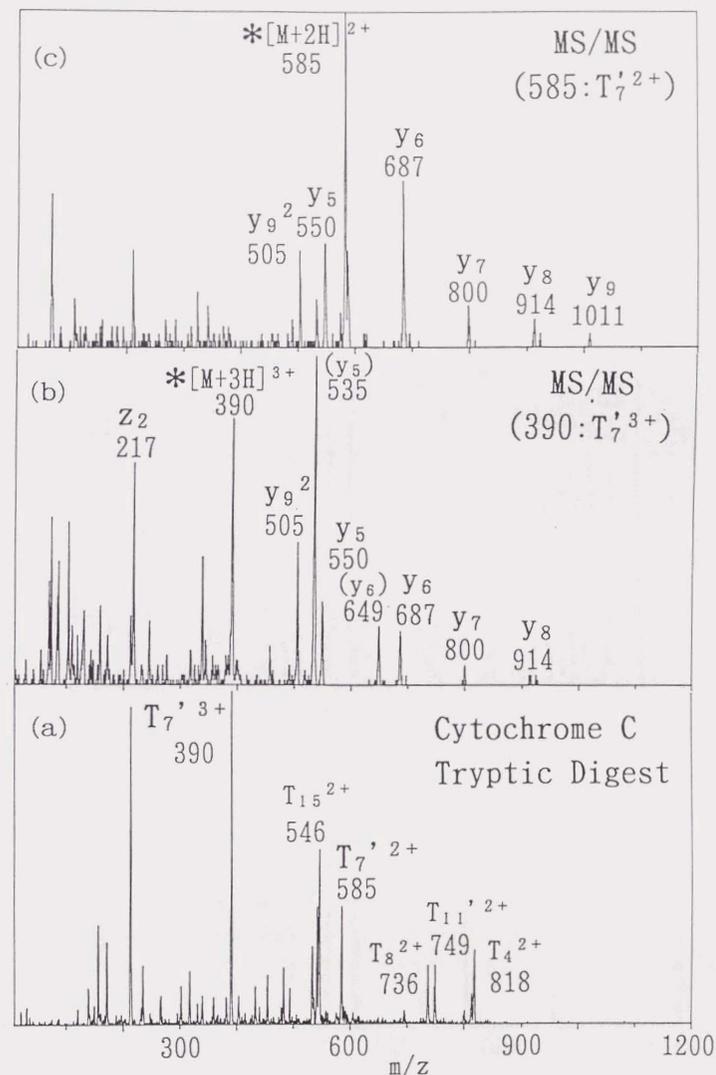


図9-4 (a)シトクロムcのトリプシン消化ペプチドのESIスペクトル、N末端から7番目の断片 T_7' (TGPLNLHGLFGR, Mr 1,168.3) の3価イオン(b)及び2価イオン(c)のCADスペクトル

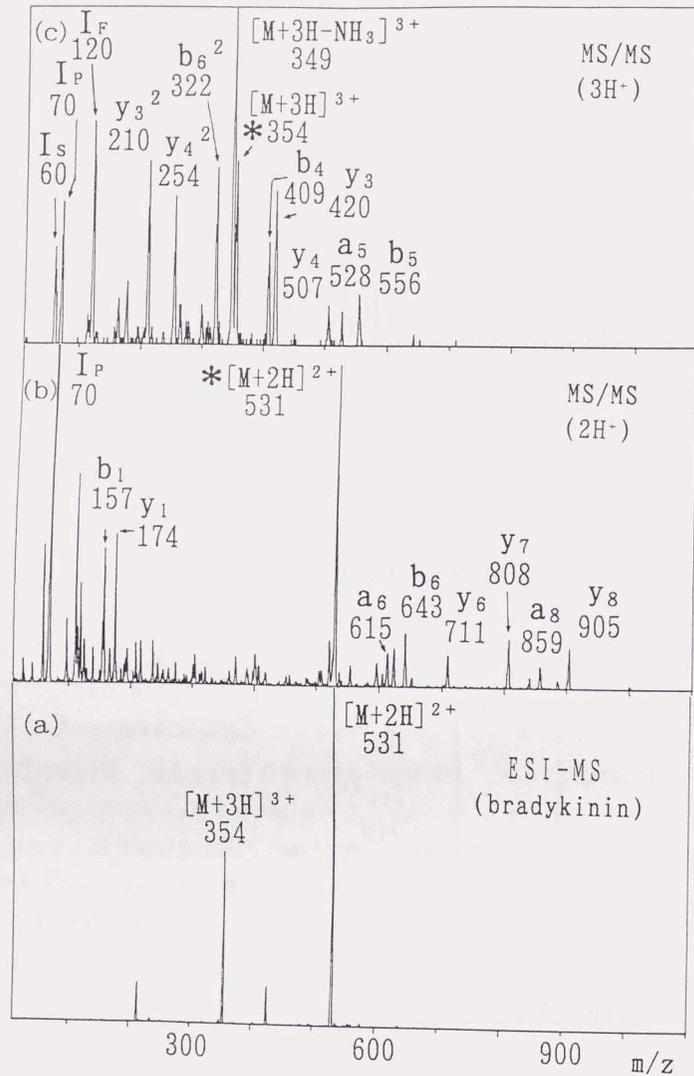


図9-5 ブラジキニン (RPPGFSPFR, Mr 1,060.2, BRAD) のESI (a) 及び2価 (b) 及び3価 (c) イオンのESI-CADスペクトル (衝突エネルギー: 80eV (b)、120eV (c))

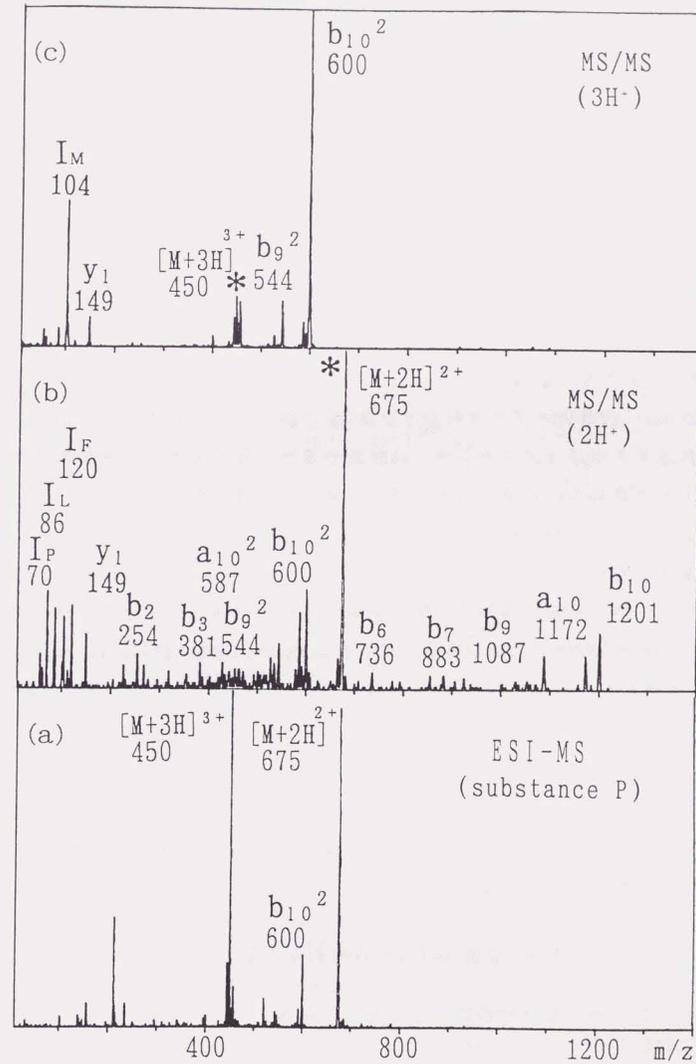


図9-6 サブスタンスP (RPKPQQFFGLM-NH₂, Mr 1,347.6, SUBP) のESI (a) 及び2価 (b) 及び3価 (c) イオンのESI-CADスペクトル (衝突エネルギー: 100eV (b)、60eV (c))

るため、ノズルスキマーの間には20~30Vの電位差を掛けた。(図5-2参照)しかし、通常のペプチドのESIスペクトルでは、この部分でのイオン分解は殆ど観測されなかった。SUBPのESIスペクトルで、3価イオンのCADにより生成したのと同じ b_{10}^{2+} イオンが測定されたことは、3価イオンの非常な壊れやすさを示すものと考えられる。SUBPのCADスペクトルの特徴は、次のようにまとめられる。プリカーサーイオンの価数の増加により、①イオン分解の効率が著しく増加し、それと共に②特定のペプチド結合の選択的開裂によりスペクトルが単純化した。また、③CADスペクトルで強く観測されたシーケンスイオンが、ESIスペクトルのフラグメントイオンとしても観測された。図9-7は、VSAG (DRVYVHPFSL, Mr 1,232.4) 及びVAG (DRVYVHPFHL, Mr 1,282.5) のESIスペクトル (a)、2価 (b) 及び3価 (c) イオンのCADスペクトルである。VSAGの3価イオンのCADスペクトルでは、娘イオンのほとんどがSer-Leu間のペプチド結合で分解した2価のシーケンスイオン b_8^{2+} であり、SUBPと共通する特徴 (プリカーサーの価数の増加に伴うイオン分解効率の増加とスペクトルの単純化) が見られた。但し、第三の特徴であるESIスペクトルのフラグメントイオンは、殆ど観測されなかった。これに対して、9位のセリンがヒスチジンに置換したVAGでは、2価イオンと3価イオンの分解挙動に大きな差は見られず、塩基性アミノ酸の位置や数が、イオン分解に密接に関連していることが分かった。図9-8は、SUBPやVSAGと同様の特徴が見られたAMAT (WHWLQLKPGQPMY, Mr 1,684.0) のCADスペクトルである。3価イオンのCADスペクトル (c) では、Gln-Pro及びMet-Tyr間の結合の開裂による b_{10}^{2+} や b_{12}^{2+} イオンが強く観測され、それらはESIスペクトル (a) にも現れた。表9-1にSUBP、VSAG、AMATの多価イオンのCADスペクトルで観測された主なシーケンスイオンをまとめて示した。これらのペプチドの3価イオンCADでは、塩基性アミノ酸が偏在するN末端から離れた、C末端近くのペプチド結合が選択的に開裂したことが分かった。

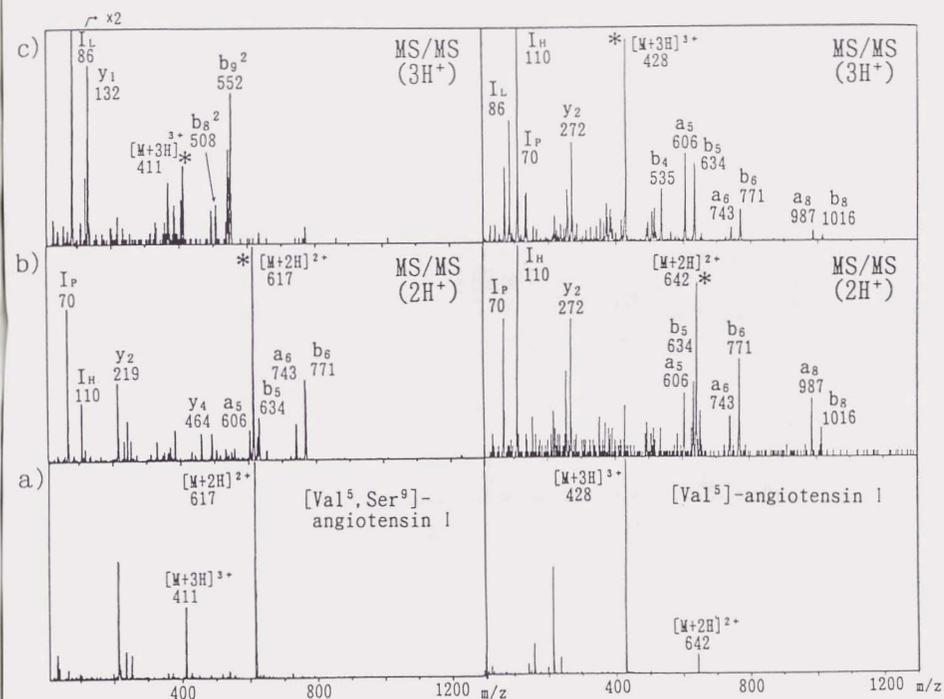


図9-7 アンギオテンシン I 部分置換体のESI (a) 及び2価 (b) 及び3価 (c) イオンのESI-CADスペクトル
 左列: [Val⁵, Ser⁹]アンギオテンシン I (DRVYVHPFSL, Mr 1,232.4, VSAG)
 右列: [Val⁵]アンギオテンシン I (DRVYVHPFHL, Mr 1,282.5, VAG)

9.3.3 リシン置換オクタアラニンのCADスペクトル

リシン置換オクタアラニン ($[K^1, K^n]-OA$, $n=2\sim 5$, Mr 700.8) のESIスペクトル (図略) では、2価の分子イオン $[M+2H]^{2+}$ が m/z 351.4 に強く観測された。ペプチドは、分子当たり3箇所の塩基性部位 (2残基のリシン及びN末端のアミノ基) があるにも拘わらず、3価の分子イオン $[M+3H]^{3+}$ は全く検出されなかった。図9-9は、衝突エネルギー24eVで測定した $[K^1, K^n]-OA$ の2価イオンのCADスペクトルである。プリカーサーイオンと娘イオンの強度比から、 $[K^1, K^2]-OA$ が最も容易に分解したことが分かる。スペクトルには、 b_5 、 b_6 、 b_7 のN末端イオンや y_1 、 y_2 等のC末端イオンが主に現れた。これらはいずれも、2残基のリシンが位置するN末端から離れた、C末端近くのペプチド結合での開裂によるシーケンスイオンである。図9-10は、 $b_5\sim b_7$ のN末端イオンや y_6 、 y_7 等のC末端イオンの相対強度を、第二のリシンの位置 n でプロットした。イオン強度は、娘イオンの強度の総和に対して規格化した。 n が小さいほど、すなわち2残基のリシン間の距離が近いほど $b_5\sim b_7$ のシーケンスイオンが強く、逆に y_6 、 y_7 等の長鎖のC末端イオンが弱い傾向があった。 $[K^1, K^4]-OA$ 及び $[K^1, K^5]-OA$ のCADスペクトルでは、N末端近くのペプチド結合での開裂による b_1 、 y_6 、 y_7 イオンが強く現れた。 $[K^1, K^3]-OA$ のCADスペクトルは、 $n=2$ と $n=4$ 、5のスペクトルの中間的性質を示した。 n が増加するに従って、低質量領域で見られるアラニンのイモニウムイオン (I_A : m/z 44) が減少し、 NH_3 を失ったリシンのイモニウムイオン ($I_{K'}$: m/z 84) が増加した。

9.4 考察

9.4.1 ペプチド多価イオンにおける分子内プロトン移動反応とイオン分解機構

ESI測定で用いる酸性の溶媒条件では、プロトンはN末端のアミノ基や塩基性アミノ酸のリシンやアルギニンの側鎖に選択的に付加し、ペプチドは正味の正電荷を帯びていると考えられる。溶液状態のペプチドの電荷は、溶媒和により安定化されている。ESIのイオン化過程では、帯電液滴の脱溶媒によりペプチド上にプロトンが残り、多価のプロトン化分子 $[M+nH]^{n+}$ が生成する。脱溶媒の進行と共にペプチド鎖の折り畳みが進み、溶媒和による電荷の安定化に代わって分子内イオン性水素結合が形成される。このイオン性水素結合の結合エネルギーは結合角の 180° からの歪みに大きく依存し、30から120kJ/mol程度の間で変化すると計算さ

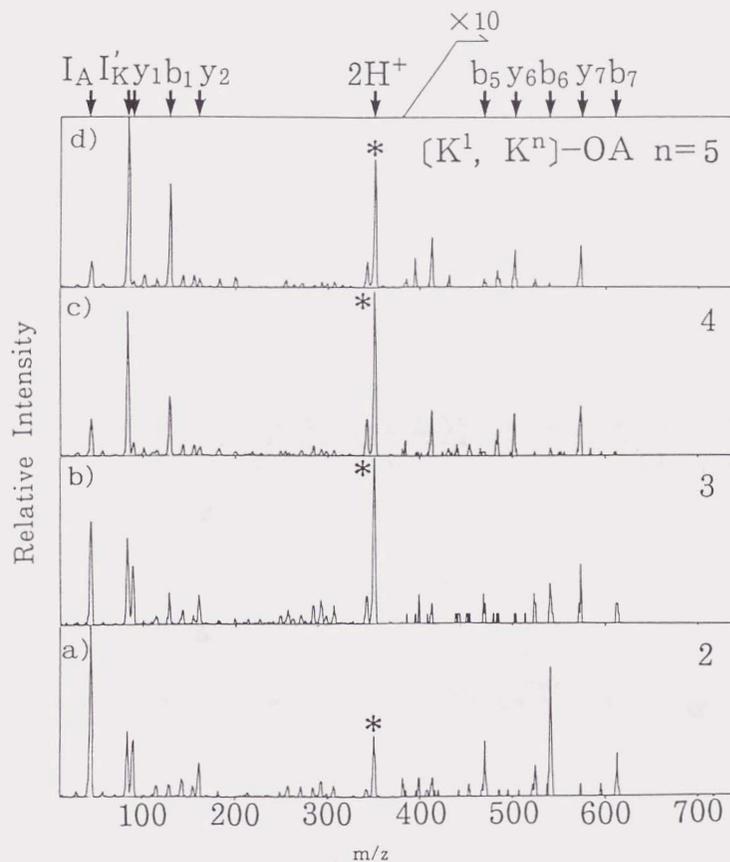


図9-9 リシン置換オクタアラニン ($[K^1, K^n]-OA$, $n=2$ (a)、 3 (b)、 4 (c)、 5 (d)) の2価イオン (m/z 351.4) のESI-CADスペクトル (衝突エネルギー: 24eV)

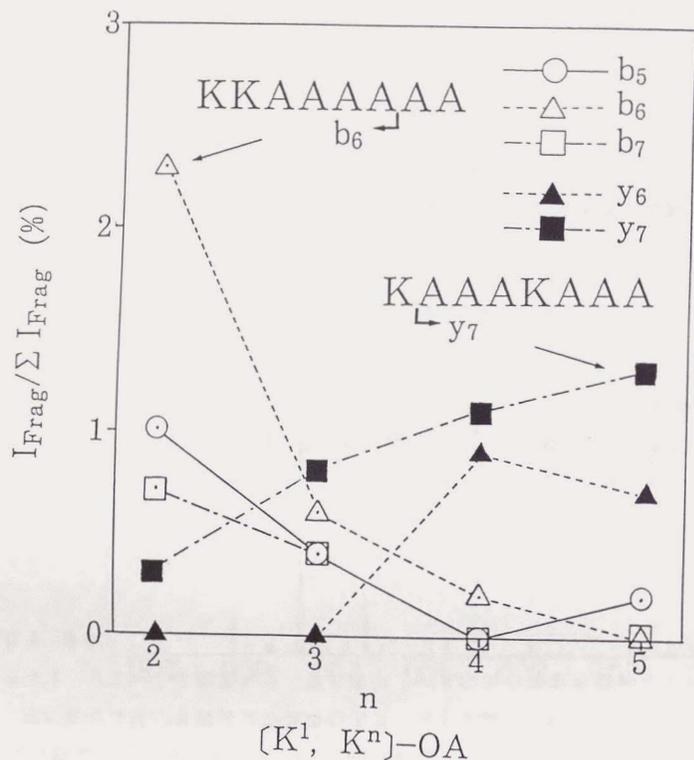


図9-10 リシン置換オクタアラニン ($[K^1, K^n]-OA$, $n=2\sim 5$) の2価イオンのESI-CADスペクトルで観測されたN及びC末端イオンの相対強度とリシンの位置nの関係

れている¹¹⁾。結合エネルギーが最大となる 180° の場合でも、ペプチド結合の結合解離エネルギー(約 $310\text{kJ/mol}^{89)$)の半分以下である。従って、ペプチド多価イオンのCADにおいては、ペプチド結合の開裂よりもイオン性水素結合の開裂が優先すると考えられる。分子内イオン性水素結合により、電荷が安定化された状態では、塩基性部位に付加したプロトンは分子内の複数の部位と弱く結合し、橋かけ状態になっていると考えられる。従って、イオン性水素結合の開裂は、いろいろなペプチド結合のアミド窒素への分子内プロトン移動反応の機会を提供する。真空中でのアミド窒素のプロトン親和力($866\text{kJ/mol}^{121)$)が比較的大きく、N末端のアミノ基やリシンの側鎖の ϵ -アミノ基のプロトン親和力(それぞれ $900\text{kJ/mol}^{122)$ 、 $964\text{kJ/mol}^{123)$)に匹敵することが、ペプチド結合へのプロトン移動を増加させる因子となる。(図9-11)衝突励起により、橋かけが切断される際に分子内でクーロン力が作用すると、プロトンが橋かけのどちらの側に移動するかに影響を与えることが考えられる。結果として、プロトンは固定電荷から離れた位置に移動しやすいと考えられ、イオン内部の電荷の非局在化を引き起こす。また、局在化したプロトンの数が多いほど、移動中のプロトンへのクーロン力が大きくなり、プロトン移動反応への影響が大きくなると考えられる。以上の多価イオンの分子内プロトン移動反応を考慮したイオン分解のスキームは、図9-12のように表される。

9.4.2 分子内プロトン移動によるクーロンエネルギーの変化

アミノ末端側に2残基のリシンを有する8量体のペプチドをモデルとし、分子内プロトン移動によるクーロンエネルギーの変化についての半定量的考察を行った。距離 r にあるプロトン間に作用するクーロン力は、クーロンの法則により

$$f(r) = 1/4\pi\epsilon_0 \cdot e/r^2 \quad (N=\text{kgmS}^{-2}) \quad \dots(1)$$

で与えられる。ここで e はプロトンまたは電子の電荷(電気素量、 $1.602 \times 10^{-19}\text{C}$)、 ϵ_0 は真空の誘電率($8.854 \times 10^{-12}\text{J}^{-1}\text{C}^2\text{m}^{-1}$)である。プロトンが r_1 から r_2 に移動したときに放出されるエネルギー ΔE_c は

$$\Delta E_c = \int_{r_1}^{r_2} f(r) dr = e^2/4\pi\epsilon_0 (1/r_1 - 1/r_2) \quad (J=\text{kgm}^2\text{S}^{-2}) \quad \dots(2)$$

である。ペプチド結合の単位長さは 3.6\AA であるので、隣接するアミノ酸に付加していたプロトンが5残基はなれたアミノ酸に移動した時の($r_1=3.6\text{\AA}$ 、 $r_2=21.6\text{\AA}$)クーロンエネルギーの変化は

gas phase proton affinity

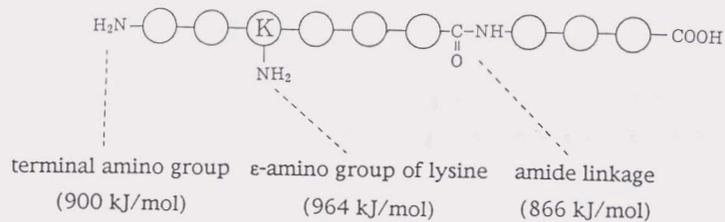


図9-11 N末端のアミノ基、リシン側鎖の ϵ -アミノ基及びアミド窒素の真空中でのプロトン親和力¹²⁾

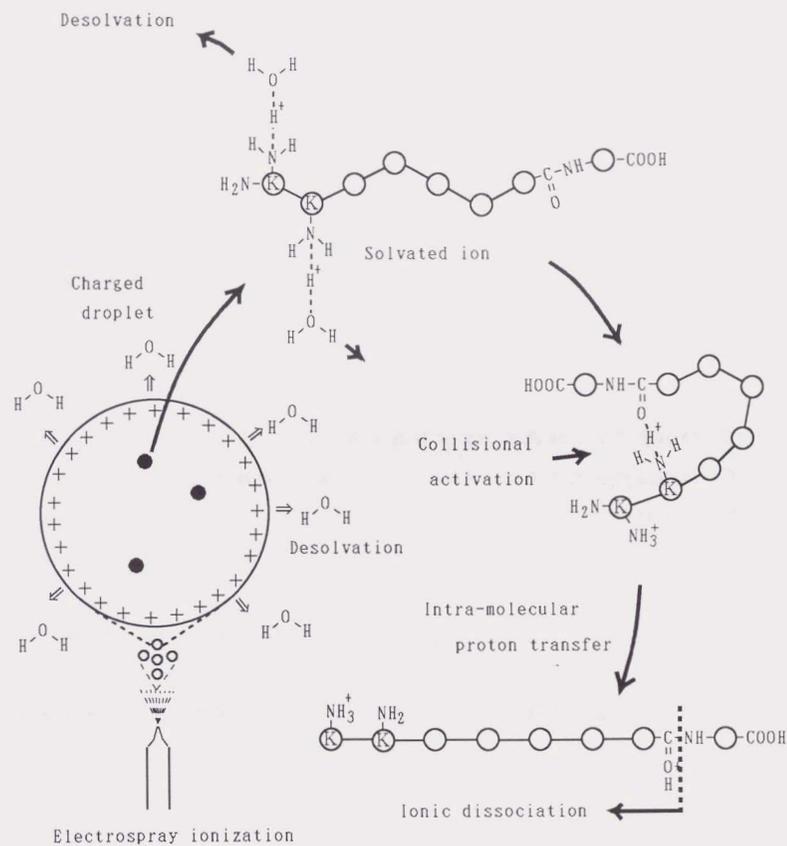


図9-12 ESI法により生成したペプチド多価イオンのイオン分解スキーム

$$\Delta E_0 = 5.31 \times 10^{-19} \text{ (J)} \div 3.2 \times 10^2 \text{ (kJ/mol)} \quad \dots (3)$$

となる。この値は、ペプチド結合の結合解離エネルギー（約310 kJ/mol⁸⁾）と同程度である。図9-13に、[K¹, K²]-OAにおける固定されたプロトンと分子内を移動するプロトンの間の距離とクーロンエネルギーの関係を示した。初めのプロトン付加位置はK¹及びK²のε-アミノ基と仮定する。K¹上のプロトンが固定され、K²上のプロトンが分子内を移動すると考えた場合、当然元の付加位置から遠い位置のアミド結合に移動した方が大きなクーロンエネルギーが放出されるためことになる。ここでは、ペプチドイオンが分解時にほぼ直線的な配座を取ることを仮定している。この仮定は、クーロン反発力によって直線的配座が熱力学的に安定になると考えられることにより正当化される。

9.4.3 CYTのトリプシン消化ペプチド多価イオンのCADスペクトル

トリプシン消化ペプチドでは、N末端のアミノ基とC末端のリシンまたはアルギニンにプロトンが付加して、多価イオンが生成されると考えられる。このため、2価イオンのCADスペクトルでは、あるペプチド結合の開裂によるbやyイオンが対で生成することが予想される。しかし、CYTのトリプシン消化ペプチドT₇'の2価及び3価イオンのCADスペクトルでは、yイオンの対となるbイオンが殆ど見られなかった。これは、yイオンに比べてbイオンがさらに小さいフラグメントに分解する傾向があるか、またはQ2を通過する際のガス衝突の間に中性化し易いためであると推測される⁵⁾。T₇'のCADスペクトルでは、電荷の反発によるイオン分解の促進や、1分子のプリカーサーイオンからの複数の娘イオンの生成等の多価イオンに特徴的な現象は見られなかった。トリプシン消化ペプチドでは、プロトン付加位置がN、C両末端に離れているため、分子内のクーロン相互作用が弱いと考えられる。

9.4.4 生理活性ペプチドのイオン分解

BRADにはN及びC末端にアルギニンがあるので、多価イオンを生成した時のプロトン付加位置は、トリプシン消化ペプチド同様、N、C両末端に分離していると考えられる。BRADの2価イオンCADスペクトルで比較的長鎖のシーケンスイオンが観測されたことは、分子内を移動するプロトンと、NまたはC末端のアルギニンに固

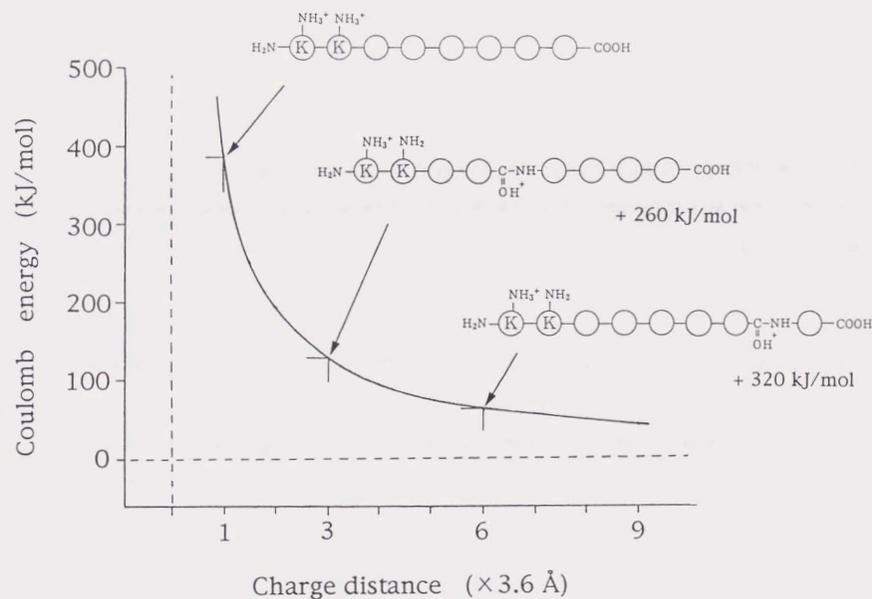


図9-13 リシン置換オクタアラニン ([K¹, K²]-OA) のK¹上のプロトンが固定され、K²上のプロトンが分子内を移動するとした場合における、プロトン間距離とクーロンエネルギーの関係。横軸は、ペプチド結合の単位長さ3.6Åの倍数で表した。

定されたプロトンの間のクーロン反発の影響が推定される。例えば、一方のプロトンがN末端側のアルギニンに固定された場合には長鎖のbイオンが生成し、逆にC末端側のアルギニンに固定された場合には長鎖のyイオンが生成したと考えられる。これらと対で生成するはずの短鎖のyやbイオンが観測されなかったのは、衝突ガスとの電荷交換によって中性化されたものと考えられる。また、相対的にyイオンがbイオンよりもやや多く観測されたことから、前節で述べたようにbイオンがyイオンよりも不安定であることが考えられる。

表9-1に示したSUBP、VSAG、AMAT等、多価イオンに特徴的なCADスペクトルが得られたペプチドに共通していることは、複数の塩基性アミノ酸がN末端近くに配置されていることである。これらの3価イオンのCADスペクトルでは、塩基性アミノ酸から離れた位置(C末端付近)で選択的な分解が見られた。分子内を移動するプロトンがN末端近くに固定されたプロトンからクーロン反発を受け、C末端付近でのイオン分解が促進されたことが推定された。2価のイオンのCADスペクトルで選択的な分解が少なかったのは、固定されたプロトンによる電場が小さく、クーロン反発が弱かったことが考えられる。一方、C末端部に塩基性アミノ酸が集中しているメリティンのCADスペクトルで、N末端付近での開裂を反映した長鎖のyイオンや短鎖のa、bイオンが強く観測されたことも、同様の機構で説明できる。

9.4.5 リシン置換オクタアラニンのCADスペクトル

図9-10から、2残基のリシン間の距離によってbやyイオンの相対強度が変化することが分かった。これらの変化は、ペプチド結合そのものの分解し易さの変化のためとは考えにくい。なぜなら、 $b_5 \sim b_7$ のイオンの生成に関わるペプチド結合は、 $[K^1, K^5]-OA$ から生成する b_5 を除いて、全てAla-Ala結合であるからである。これらの結果は、リシン残基が接近している場合に、より大きなクーロンエネルギーが振動エネルギーに転換されて、イオン分解が促進されることを示唆している。

9.4.6 クーロン効果と化学的効果の関係

プロリンのイミド窒素は、他のアミノ酸のアミド窒素よりも塩基性が高いことが知られている¹³⁾。AMATの3価イオンのCADスペクトルでは、プロリンのイミド窒素へのプロトン付加により生成したと考えられるb及びyイオンが強く観測され

た。この場合、分解位置の選択性は、クーロン力よりも化学的効果によって決定されたと推定される。メリティンの多価イオンのCADスペクトルでも、プロリンのN末端側での選択的なイオン分解が報告されている。しかし、SUBPの様にプロリンが塩基性部位の近くに位置する場合には、この位置での選択的な分解(b_5 や y_8)は観測されなかった。従って、局在した塩基性部位を持つペプチドでのプロトンの移動先を決める要因は、クーロン相互作用が最も重要で、クーロンの効果の差が少なくなる塩基性部位から遠い位置の間での選択性では、化学的な効果が現れるものと考えられる。

9.4.7 塩基性アミノ酸の相対位置のイオン分解への影響

9.4.2のモデルに従えば、 $[K^1, K^2]-OA$ のCADスペクトルでは、 b_7 イオンが最も生成し易いはずであるが、実際の測定ではむしろ b_6 イオンの強度が強かった。図9-13から分かるように、Ala⁶-Ala⁷のペプチド結合とAla⁷-Ala⁸のペプチド結合では、放出されるクーロンエネルギーには殆ど差がなく、ペプチド結合の相対的な分解しやすさ(=化学的効果)の方が選択性を左右しているためと推定される。生理活性ペプチドでは、イオン分解に影響を与える可能性があるいろいろなアミノ酸が含まれているため、CADスペクトルの解析が困難になるが、N末端付近に2個以上の塩基性アミノ酸が存在する場合には、 $[K^1, K^n]-OA$ と同様の特徴が見られた。例えば、SUBP (RPKPKQFFGLM-NH₂)は2個の塩基性アミノ酸(リシン及びアルギニン)がプロリンを挟んで存在するので、 $[K^1, K^3]-OA$ と類似の構造と見なすことができる。SUBPの2価イオンのCADスペクトルは、 a_{10}^2 、 b_9^2 、 b_{10}^2 等の2価の娘イオンの生成を除けば、 $[K^1, K^2]-OA$ や $[K^1, K^3]-OA$ と似た傾向(C末端付近のペプチド結合の選択的な開裂)が見られた。しかし、この傾向はVSAGやAMATの2価イオンのCADスペクトルでは見られず、塩基性アミノ酸がSUBPに比べて離れていることと関係があると推定される。つまり、2個の塩基性アミノ酸の間にVSAGでは-VYV-の3個のアミノ酸が存在し、AMATでは-WLQL-4個のアミノ酸が存在する。イオン化初期のプロトン付加位置の相対距離 r_1 によって、放出されるクーロンエネルギーが大きく影響される($\Delta E_e \propto (1/r_1 - 1/r_2)$) こと結果であると解釈される。

ΔE_e の値は、リシン等の側鎖の長さを考慮した場合には、9.4.2の計算よりも小さくとなると考えられる。例えば、隣り合った2個のリシンの ϵ -アミノ基間の距離は、

最も速い配置を取ったときには、ペプチド結合の単位長さの4倍にもなりうる。一方、3価イオンでは、移動するプロトンが2個のプロトンからクーロン反発を受けるため、放出される ΔE_0 は2価イオン場合の2倍近くに達する可能性がある。このことにより、SUBPやAMAT等の3価イオンのCADスペクトルが、2価イオンのそれよりも遙かに高いイオン分解効率と分解位置の選択性を示したことが説明される。

9.5 本章のまとめ

本研究の結果、次のことが明らかになった。

1. 分子内プロトン移動反応に伴って、クーロンエネルギーが多価イオンの振動エネルギーに転換され、イオン分解が促進されると共に分解位置の選択性を生じるイオン分解機構を提案し、ペプチド多価イオンのCADスペクトルの特徴を合理的に説明することができた。
2. 提案した機構に従えば、塩基性アミノ酸ペプチド鎖内での位置からペプチド多価イオンの分解しやすさと、その分解位置の選択性を予測できる。規則的なアミノ酸配列の合成ペプチド[K¹, Kⁿ]-OAのCADスペクトルは、ほぼ予測に近い挙動を示した。

本研究で提案した機構に依れば、イオンの内部エネルギーに転換されうるクーロンエネルギー ΔE_0 の概算は、アミノ酸配列から見積もることが可能である。ガス衝突等従来のイオンの励起では、イオンの運動エネルギーの内僅かの割合しか内部エネルギーに転換されず、また転換されるエネルギー量の予測は困難である。これに対してクーロンエネルギーは、発光等の2次的なエネルギーの放射が起きなければ、ほぼ定量的に内部エネルギーへ転換されると考えられる。多価イオン生成とその後の分子内プロトン移動反応は、イオンの励起エネルギーレベルを容易に見積もることができる極めて興味深いイオンの励起方法であるとも考えられる。同時に、多価イオンのイオン分解を非経験的に予測することにより、質量分析法によるペプチドの一次構造解析の信頼性を、向上させうる可能性を示唆している。

文献

1. a) K. Ishikawa, T. Nishimura, Y. Koga and Y. Niwa, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 933 (1994).
b) 石川、J. Tuominen、村木、長洞、地神、古賀、丹羽、物質工学工業技術研究所報告、**3**, 241 (1995).
2. a) C. K. Meng, M. Mann and J. B. Fenn, *Proceedings of the 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, San Francisco, CA, ASMS, East Lansing, p. 771 (1988).
b) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga and H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, **62**, 882 (1990).
c) R. D. Smith, J. A. Loo, R. R. Ogorzalek Loo, M. Busman and H. R. Udseth, *Mass Spectrom. Rev.*, **10**, 359 (1991).
3. a) J. A. Loo, C. G. Edmonds, H. R. Udseth and R. D. Smith, *Anal. Chim. Acta*, **241**, 167 (1990).
b) J. A. Loo, C. G. Edmonds and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **63**, 2488 (1991).
c) J. A. Loo, C. G. Edmonds and R. D. Smith, *Anal. Chem.*, **65**, 425 (1993).
4. X. -J. Tang, P. Thibault and R. K. Boyd, *Anal. Chem.*, **65**, 2824 (1993).
5. X. -J. Tang and R. K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 651 (1992).
6. a) P. Roepstorff and J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601 (1984).
b) K. Biemann, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, **16**, 99 (1988).
7. C. J. Barinaga, C. G. Edmonds, H. R. Udseth and R. D. Smith, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **3**, 160 (1989).
8. A. L. Rockwood, M. Busman and R. D. Smith, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **111**, 103 (1991).

9. a) A. M. Bray, N. J. Maeji and H. M. Geysen, *Tetrahedron Lett.*, 31, No. 40, 5811 (1990).
- b) R. M. Varerio, M. Benstead, A. M. Bray, R. A. Campbell and N. J. Maeji, *Anal. Biochem.*, 197, 168 (1991).
10. D. T. Elmore, *Peptides and Proteins*, Cambridge University Press, London (1968).
11. M. Meot-Ner, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 278 (1984).
12. R. W. Yeh, J. M. Grimley and M. M. Bursey, *Biol. Mass Spectrom.*, 20, 443 (1991).
13. K. B. Tomer, F. W. Crow, M. L. Gross and K. D. Kopple, *Anal. Chem.*, 56, 880 (1984).

第10章 総括

本研究では、近年開発された不揮発性高分子の新しいイオン化法である高速原子衝撃 (Fast atom bombardment, FAB) 法やエレクトロスプレーイオン化 (Electrospray ionization, ESI) 法、及びこれらと衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) や衝突活性化開裂 (Collisionally activated dissociation, CAD) 法との組み合わせ、または高速液体クロマトグラフィー (High performance liquid chromatography, HPLC) と質量分析 (MS) 法の直接結合 (LC/MS) 法による、ペプチドやタンパク質の一次構造解析におけるスペクトル解析法や測定感度の向上について研究した。(CIDとCADは、イオンの運動エネルギーの大小によって使い分けられている (~keV: CID、数~数十eV: CAD) が、以下では、両者を特に区別しない場合は、CID/CAD法と略した。)

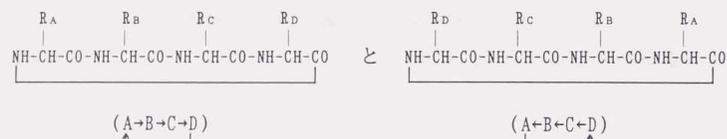
本章では、ペプチドやタンパク質の測定・解析におけるFAB、ESI、CID/CAD法、LC/MS法の特徴と問題点を整理すると共に、本研究から得られた知見を総括した。また、未解決の課題について議論し、質量分析によるペプチドやタンパク質の一次構造解析の今後を展望した。

10.1 FAB及びFAB-CID/CAD法の特徴と問題点

FAB法の開発により、断片化や誘導体化なしにペプチド等分子量数千の不揮発性化合物をイオンに変換し、質量分析が可能となった。FABまたはFAB-CID/CAD法によるペプチドの一次構造解析の特徴は、質量分析計の高真空中で起こるイオン分解を利用するため、通常の液相中での化学反応でペプチド鎖を切断する方法に比べて、高感度で迅速に結果が得られること、また分解反応をリアルタイムで観測できるため、分解の程度の調節が容易なことである。

FAB及びFAB-CID/CADスペクトルでは、ペプチド鎖の一方所の開裂により生成する、元のペプチドのN末端またはC末端部分を含むイオン (アミノ酸配列 (amino acid sequence) を反映したイオン: シーケンスイオン) が観測される。しかし、開裂した側 (N末端のシーケンスイオンではそのC末端側) の末端構造 (イオンタイプ) に複数の可能性があり、どのタイプのイオンが観測されるかを予測するこ

とは困難である。(シーケンスイオンの構造と略号については、巻頭の図を参照されたい。)さらに、スペクトル上にはN末端とC末端のシーケンスイオンが混在するため、帰属を誤る危険性がある。また、CIDスペクトルでは主鎖・側鎖の両方の分解に起因するイオンも生成し、スペクトルが複雑になることがある。これらの問題のため、未知試料のFAB及びFAB-CID/CADスペクトルの解析は容易でない。また、ペプチド結合(-CO-NH-)には方向性があるため、環状ペプチドの場合には、アミノ酸の結合関係が同じでもペプチド結合の方向性により2種類の構造が区別されることになる。例えば、



は、互いにアミノ酸の結合関係が同じでペプチド結合の方向性が逆の”レトロシーケンス”の関係にある。レトロシーケンスの判別は、環状ペプチドに特有の問題の一つである。

10.2 ESI法の特徴と問題点

ESI法の開発により、それまで不可能だった分子量10万を越えるタンパク質を、分子構造を保持したままイオンに変換し、質量分析が可能となった。スペクトルに観測される一連の多価イオン([M+nH]ⁿ⁺)から求められる精密な分子量値から、DNAの塩基配列やプロテインシーケンスまたはFABマッピングによって解析されたアミノ酸配列の正当性を、全体として調べることができる。しかも、精製したタンパク質試料の構造的純度に関する情報も与え、微小な構造不均一性を明らかにすることができる。ESI法は、バックグラウンドノイズが極めて低いため、プロテインシーケンスによる解析に必要とされる量に比べて2桁以上高い、フェムト(10⁻¹⁵)モルレベルの検出感度が得られる。

しかし、ESI法は、無機塩、界面活性剤その他の共存物質の影響を受け易い。また、スプレーを安定に持続させるためには、試料溶液の流速、電気伝導度、表面張力等に制限がある。これらの条件は、精製過程で塩類が加えられたり、酵素などの失活を防ぐためのバッファー中で保存された、生体由来のタンパク質試料の

測定や、ESI法を利用したLC/MSインターフェイスにおけるLCの溶離液や操作条件の適合における困難の原因となる。

また、タンパク質を溶媒中で分子分散させることが、ESIイオン化を可能とする基本的な条件である。このため、ESI法で用いられる水系の溶媒に難溶なタンパク質の測定は困難である。また、タンパク質の精密な分子量を測定するためには、溶媒和したタンパク質から、溶媒や微量の塩等の低分子を全て引き剥がして、最終的に単分子状のイオンを作り出すことが必要である。タンパク質の分子量の増加と共に、これらの低分子を完全に除去することが困難になる傾向があり、分子量測定の見積もりの誤差の原因となる。

10.3 本研究から得られた知見

本研究の結果、以下の知見が得られた。

1. アミノ酸配列解析法”CAPS”により、N末端やC末端のシーケンスイオンが混在し、かつ生成するイオンタイプが予測できないFABまたはFAB-CIDスペクトルから、15量体程度までのペプチドを迅速に解析できることが分かった。但し、環状ペプチドのレトロシーケンスの判別には、イオン分解スキームを仮定する必要があることが分かった。
2. ESI及びESI-LC/MS法により、試料の分離精製等で煩雑な操作が必要なプロテインシーケンスに比べ、高感度で迅速に遺伝子組み換えタンパク質等のアミノ酸置換や翻訳後修飾を同定できることが分かった。ESI-LC/MS法では、溶離液に添加されるトリフルオロ酢酸(TFA)による感度低下が避けられなかったが、オンライン化による試料量や測定時間の節減において、これを相殺するに十分な効果が得られた。
3. 多価イオンに付与されたクーロンエネルギーの一部が、分子内プロトン移動反応を介して、振動エネルギーに転換される機構を提案し、ペプチド多価イオンのCADスペクトルの特徴を合理的に説明することができた。イオン化初期とプロトン移動後のプロトン間距離の差から、放出されるクーロンエネルギーの大小を見積もることが可能で、塩基性アミノ酸のペプチド鎖内での位置から、

ペプチド多価イオンの分解しやすさや、その分解位置の選択性を予測できることが分かった。

10.4 今後の課題と展望

質量分析によるペプチドやタンパク質の一次構造解析の広範な普及を妨げている要因の一つである、イオン分解の理論的な予測が困難であるという状況が打開されるには、長期の基礎研究が必要とされるであろう。一方、20種類のタンパク質アミノ酸から生成する膨大なアミノ酸配列のため、スペクトルを経験的に予測するための法則性を見出すことも容易でない。これらの問題を克服するには、以下のような方策が考えられる。

第一には、比較的単純な経験則によって算出した"スコア"に基づいて、スペクトルに含まれる配列情報を抽出する方法であり、必ずしも唯一の配列を導くことができないというスペクトルの性質を考慮すると、有効な方法であると考えられる。質量分析のハード、ソフトの進歩により、高質量のペプチドやタンパク質のCID/CADスペクトルが測定可能となりつつあることから、長鎖ペプチドの解析に適用できるスペクトル解析法の開発が、今後も推進される必要がある。本研究で提案した"CAPS"の基本的な考え方(スペクトルとの整合性を調べながら、ペプチド鎖を逐次的に延長してアミノ酸配列を組み立てる方法)は、その後の多くの研究に取り入れられ、主にFAB-CID/CADスペクトルの解析法として発展した¹⁾。

第二は、最近報告が増えているMS/MS/MS (MS³)²⁾といった多段階のタンデム質量分析法(MSⁿ)の利用であり、スペクトルから演繹的に構造を導くことが期待できることから、今後さらに重要になるものと予想される。例えば、[M+H]⁺のCID (MS/MS)スペクトルでは、環状ペプチドのイオン分解スキームが未知の場合は、レトロシーケンスの区別は不可能だった。MS³によれば、イオン分解スキームに関する知見なしでも、レトロシーケンスの判別が可能となることが期待できる。

第三のアプローチは、イオン分解を経験的または非経験的に予測可能なスペクトルを測定する方法の開発である。本研究の結果、ペプチド多価イオンのイオン分解は、予測可能な規則性に支配される場合があることが明らかとなった。今後、規則的にデザインされたアミノ酸配列のペプチド等を用いた研究により、イオン分解機構の解明が進むことにより、質量分析法によるペプチドの一次構造解析の

信頼性の向上に繋がる可能性がある。

また、ESI法では、タンパク質の分子量の増加と共に、溶媒や微量の塩等の低分子を完全に除去することが困難になる傾向があり、ピークのプロードニングによる分子量測定誤差の原因となったり、アミノ酸配列のバリエーションや修飾アミノ酸等により、分子量が接近した複数の変異体を含む、複雑なタンパク質試料の解析が困難になる場合がある。ESIイオン源を備えたフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴 (FT-ICR) 質量分析計³⁾が開発され、同位体ピークを分離できる分解能 (>10,000) で、タンパク質が測定可能となったことから、タンパク質に付加した低分子の同定を通して、より"高純度な"イオンを生成する方法の開発が可能となろう。また、LC/MS法やキャピラリー電気泳動/質量分析 (CZE/MS) 法⁴⁾等の精密分離手段とMSのインターフェイス技術の進歩により、分離手段に用いられる標準的な溶離液や操作条件で、高感度な質量分析が可能となることが期待される。

これまでの生体関連物質の質量分析においては、新しいイオン化法の開発が、常に種々の技術革新を先導してきた。今後も新たなイオン化法の開発が続けられ、それに呼応した質量分析装置のハード・ソフトの進歩と相まって、より高度な計測・解析技術に発展することが期待される。

文献

1. a) M. M. Siegel and N. Bauman, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, 15, 333 (1988).
- b) R. S. Johnson and K. Biemann, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, 18, 945 (1989).
- c) D. Zidarov, P. Thibault, M. J. Evans and M. J. Bertrand, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, 19, 13 (1990).
- d) C. Bartels, *Biomed. Environm. Mass Spectrom.*, 19, 363 (1990).
2. C. Lange, C. Loutelier and R. S. Bordoli, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 8, 960 (1994).
3. B. E. Winger, S. A. Hofstadler, J. E. Bruce, H. R. Udseth and R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 4, 566 (1993).
4. R. D. Smith and H. R. Udseth, In "Applications of Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical and Biochemical Analysis", D. M. Radzick and S. M. Lunte; editor, (1993).

発表論文等

本研究に関する論文

1. "Identification of a Polymyxin Produced by a Symbiotic Microorganism Isolated from the Brown Planthopper, *Nilaparavata lugens*"
Y. Jigami, N. Harada, H. Uemura, H. Tanaka, K. Ishikawa, S. Nakasato, H. Kita and M. Sugiura
Agric. Biol. Chem., 50, 1637-1639 (1986).
2. "Computer-Aided Peptide Sequencing by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry"
K. Ishikawa and Y. Niwa
Biomed. Environm. Mass Spectrom., 13, 373-380 (1986).
3. "Computer-Aided Peptide Sequencing of an Unknown Cyclic Peptide from *Bacillus Subtilis*"
K. Ishikawa, Y. Niwa, K. Hatakeda and T. Gotoh
Org. Mass Spectrom., 23, 290-291 (1988).
4. "Sequence Determination of Unknown Cyclic Peptide Antibiotics by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry"
K. Ishikawa, Y. Niwa, K. Oishi, S. Aoi, T. Takeuchi and S. Wakayama
Biomed. Environm. Mass Spectrom., 19, 395-399 (1990).
5. "Identification of Recombinant Human Lysozyme at the Picomole Level by Electrospray-LC/MS"
K. Ishikawa and Y. Niwa
Analytical Sciences, 7, supplement, 967-970 (1991).
6. "Dynamic Transition of α -Helix to β -Sheet Structure in Linear Surfactin Correlating to Critical Micelle Concentration"
M. Osman, Y. Ishigami, K. Ishikawa, Y. Ishizuka and H. Holmsen
Biotechnol. Lett., 16, 913-918 (1994).
7. "Role of Coulomb Energy in Prompting Collisionally Activated Dissociation of Multiply Charged Peptides Formed by Electrospray"

Ionization"

K. Ishikawa, T. Nishimura, Y. Koga and Y. Niwa

Rapid Commun. Mass Spectrom., 8, 933-938 (1994).

8. 「ミクロカラム液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーおよび高速原子衝撃イオン化質量分析法による天然および遺伝子組み換えタンパク質の微小構造変異の解析」

石川啓一郎、J. Tuominen、村木三智郎、長洞 仁、地神芳文、古賀義紀、丹羽吉夫

質量分析、43, 325-338 (1995).

9. "Molecular Mass Measurement of Hydrophobic and Aggregative Virus Proteins to Confirm Sequence Variation and Post-translational Modification by Electrospray Ionization and Array Detection"

K. Ishikawa, T. Omura, Y. Koga, Y. Niwa and M. Tsuchiya

J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 44, 641-652 (1996).

参考論文

1. "Computer Aided Peptide Sequencing (CAPS) by FAB Mass Spectrometry"

K. Ishikawa and Y. Niwa

Proc. 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 1400-1401 (1988).

2. "Sequencing of Unknown Cyclic Peptide Antibiotics by FAB-MS"

Y. Niwa, K. Ishikawa and T. Nishimura

Proc. 38th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 269-270 (1990).

3. "Protein Analysis by Electrospray Ionization Mass Spectrometry"

K. Ishikawa and Y. Niwa

Nucleic Acids Symp. Ser., 22, 25-26 (1990).

4. "Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Proteins"

Y. Niwa and K. Ishikawa

Peptide Chemistry, 119-124 (1991).

5. 「タンパク質の質量分析—ペプチドの一次構造解析とタンパク質分子量の精密測定」

丹羽吉夫、石川啓一郎

化学技術研究所報告、86, 96-102 (1991).

6. "Expression and Secretion of Wheat Germ Agglutinin by *Saccharomyces Cerevisiae*"

H. Nagahora, K. Ishikawa, Y. Niwa, M. Muraki and Y. Jigami

Eur. J. Biochem., 210, 989-997 (1992).

7. "Identification of Recombinant Wheat Germ Agglutinin by Electrospray-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry"

K. Ishikawa, H. Nagahora, Y. Jigami and Y. Niwa

Proc. Kyoto'92 Int. Conf. Biological Mass Spectrometry, 262-263 (1993).

8. "Characterization of β -Casein by Electrospray- and Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography/Mass Spectrometry"

J. Tuominen, K. Ishikawa and Y. Niwa

Proc. Kyoto'92 Int. Conf. Biological Mass Spectrometry, 264-265 (1993).

9. 「ミクロカラム液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析法による遺伝子組み換えタンパク質の精密計測」

石川啓一郎、J. Tuominen、村木三智郎、長洞 仁、地神芳文、古賀義紀、丹羽吉夫

物質工学工業技術研究所報告、3, 241-250 (1995).

特許

1. 平5-40267 「ペプチドのアミノ酸配列推定法」

付録 アミノ酸配列解析プログラムCAPS

```

0010 *--- CAPS (COMPUTER AIDED PEPTIDE SEQUENCING)
0020 IMPLICIT INTEGER*2 (A-S)
0030 CHARACTER ACH*1,SEQUNC*24,DSN*20,NOTE*80,Y*1
0040 CHARACTER AT(20)*3
0050 COMMON INTE(2000),MASS(2000)
0060 COMMON/AMIN/ACH(20)
0070 COMMON/AMNW/MWA(20)
0080 COMMON/CAND/SEQUNC(100)
0090 COMMON/COMP/ACOMP(20)
0100 COMMON/PARM/ITRMLN, NAA
0110 COMMON/SCOR/SCORE(100),NSEQ,MAXNS,MINSCR,MAXNA,MJ
    UST
0120 COMMON/SPBC/MINMS,MAXMS,MWP
0130 *
0140 DATA AT/'GLY','ALA','SER','TRP','VAL','THR','CYS',
    'LEU','ASN',-
0150      'ASP','LYS','GLU','MET','HIS','PHE','ARG',
    'TYR','PRO','*','*','* '/'
0160 *
0170 POLA=1
0180 NAA=18
0190 *
0200 10 WRITE(6,'(27H SPECTRAL DATA SET NAME ==>)' )
0210 READ(5,'(A20)')DSN
0220 OPEN(10,FILE=DSN)
0230 READ(10,'(A80)')NOTE
0240 WRITE(6,'(1H ,A20)')DSN
0250 WRITE(6,'(1H ,A80)')NOTE
0260 WRITE(6,'(14H OK? (Y/N) ==>)' )
0270 READ(5,200)Y
0280 IF(Y.NE.'Y')THEN
0290   CLOSE(10)
0300   GO TO 10
0310 ENDIF
0320 WRITE(6,'(26H MOL WEIGHT (MAX.2000) ==>)' )
0330 READ(5,* )MWP
0340 IF(MWP.GT.2000)THEN
0350   CLOSE(10)
0360   GO TO 80
0370 ENDIF
0380 WRITE(6,'(46H KNOWLEDGE OF AMINO ACID COMPOSIT
    ION (Y/N) ==>)' )
0390 READ(5,200)Y
0400 IF(Y.NE.'Y')GO TO 40
0410 NACOMP=1
0420 20 M=0
0430 DO 30 I=1,NAA
0440   WRITE(6,'(1H ,A3,2H (,A1,5H) ==>)' )AT(I),ACH
    (I)
0450   READ(5,* )ACOMP(I)
0460 30 M=M+MWA(I)*ACOMP(I)
0470   WRITE(6,'(34H TOTAL RESIDUAL MOLECULAR WEIGHT
    =,I4)')M
0480   WRITE(6,'(2(1H ,A3,2H =,I3,5H   ))')(AT(I),A
    COMP(I),I=1,NAA)
0490   WRITE(6,'(14H OK? (Y/N) ==>)' )
0500   READ(5,200)Y
0510   IF(Y.NE.'Y')GO TO 20
0520   GO TO 50
0530 40 NACOMP=0
0540 50 WRITE(6,'(32H NO. OF CANDIDATES (MAX.100) ==>)' )
    ' )
0550   READ(5,* )MAXNS
0560 * READ MASS TO INTE TYPE DATA
0570   READ(10,100)NP
0580   READ(10,100)(MASS(I),I=1,NP)
0590   READ(10,100)(INTE(I),I=1,NP)
0600   CLOSE(10)
0610 100 FORMAT(20I4)
0620   CALL DATA(POLA,NP,MWP,MINMS,MAXMS)
0630 * SEQUENCE ELUCIDATION
0640   CALL CAPS(POLA,NACOMP)
0650 * OUTPUT
0660   DO 60 I=1,MAXNS
0670     IF(SEQUNC(I)(1:1).EQ.' ')GO TO 70
0680 60 WRITE(6,'(1H ,I3,3H ,A24,I6)')I,SEQUNC(I),
    SCORE(I)
0690 70 WRITE(6,'(27H CALCULATE AGAIN? (Y/N) ==>)' )
0700   READ(5,200)Y
0710   IF(Y.EQ.'Y')GO TO 10
0720 80 STOP
0730 200 FORMAT(A1)
0740 END
0750 *
0760 *--- MODIFY SPECTRAL DATA
0770 *
0780 SUBROUTINE DATA(POLA,NP,MWP,MINMS,MAXMS)
0790 IMPLICIT INTEGER*2 (C-S)
0800 DIMENSION INTE1(2000),MOMIT(10,2),NOM(2)
0810 COMMON INTE(2000),MASS(2000),OVFL(100)
0820 EQUIVALENCE (MASS(1),INTE1(1))
0830 *
0840 DATA NOM/6,5/
0850 DATA (MOMIT(I,1),I=1,6)/239,273,275,277,367,369/

```

```

0860 DATA (MOMIT(1,2),I=1,5)/271,273,275,365,367/
0870 *
0880 MINSEQ=200
0890 MINMS=MASS(1)
0900 MAXMS=MASS(NP)
0910 IF(MINMS.LT.MINSEQ-29)MINMS=MINSEQ-29
0920 IF(MAXMS.GT.MWP+33)MAXMS=MWP+33
0930 * CHANGE FORMAT
0940 NOVFL=0
0950 DO 10 N=NP,1,-1
0960 10 IF(MASS(N).LE.MAXMS)GO TO 20
0970 20 M=MASS(N)
0980 DO 30 I=MAXMS,MINMS,-1
0990   IF(M.EQ.I)THEN
1000     J=INTE(N)
1010     IF(J.EQ.-1)THEN
1020       J=10000
1030       NOVFL=NOVFL+1
1040       OVFL(NOVFL)=M
1050     ENDIF
1060     N=N-1
1070     IF(N.LE.0)GO TO 35
1080     M=MASS(N)
1090   ELSE
1100     J=0
1110   ENDIF
1120 30 INTE1(I)=J
1130 * THRESHOLD LEVEL
1140 35 MINMS=MINMS+25
1150   MAXMS=MAXMS-25
1160   DO 60 I=MINMS,MAXMS
1170     MIN1=10000
1180     DO 40 J=I-25,I-1
1190       IF(INTE1(J).LT.MIN1)THEN
1200         MIN1=INTE1(J)
1210         MAS1=J
1220       ENDIF
1230 40 CONTINUE
1240     MIN2=10000
1250     DO 50 J=I+1,I+25
1260       IF(INTE1(J).LT.MIN2)THEN
1270         MIN2=INTE1(J)
1280         MAS2=J
1290       ENDIF
1300 50 CONTINUE
1310 60 INTE(1)=((MAS2-I)*MIN1+(I-MAS1)*MIN2)/(MAS2
    -MAS1)
1320   MINMS=MINMS+2
1330   MAXMS=MAXMS-2
1340   DO 80 I=MINMS,MAXMS
1350     M=0
1360     DO 70 J=I-2,I+2
1370 70 M=M+INTE(J)
1380     INTE1(I)=INTE1(I)-M/5
1390     IF(INTE1(I).LT.0)INTE1(I)=0
1400 80 CONTINUE
1410 * ISOTOPE CORRECTION
1420   MAXMS=MAXMS-2
1430   DO 90 I=MINMS,MAXMS
1440     II=INTE1(I)
1450     INTE1(I)=II*(1+.6.1E-4+1+.5E-7*I**2)
1460     INTE1(I+1)=INTE1(I+1)-II*.5E-4*I
1470     INTE1(I+2)=INTE1(I+2)-II*(6.3E-5*I+1.5E-7*I*
    *2)
1480     IF(INTE1(I+1).LT.0)INTE1(I+1)=0
1490     IF(INTE1(I+2).LT.0)INTE1(I+2)=0
1500 90 CONTINUE
1510   MINMS=MINMS+2
1520 * BACKGROUND PEAKS
1530   DO 100 I=1,NOM(POLA)
1540     J=MOMIT(I,POLA)
1550     IF(J.LT.MINMS.OR.J.GT.MAXMS)GO TO 100
1560     INTE1(J)=-1
1570 100 CONTINUE
1580 * OVERFLOW PEAKS
1590   DO 110 I=1,NOVFL
1600     J=OVFL(I)
1610     IF(J.LT.MINMS.OR.J.GT.MAXMS)GO TO 110
1620     INTE1(J)=-1
1630 110 CONTINUE
1640 * WEIGHT
1650   M=0
1660   DO 120 I=MINMS,MAXMS
1670     IF(INTE1(I).GT.0)INTE1(I)=INTE1(I)*1/1000
1680     IF(INTE1(I).GT.M)THEN
1690       M=INTE1(I)
1700     IF(I.LT.MWP)J=M
1710   ENDIF
1720 120 CONTINUE
1730 * NORMALIZE
1740   AF=10000./J
1750   BF=10000./M
1760   DO 130 I=MINMS,MAXMS
1770     IF(INTE1(I).GT.0)THEN
1780       INTE(I)=INTE1(I)*AF
1790       INTE1(I)=INTE1(I)*BF
1800     ELSE
1810       INTE(I)=INTE1(I)
1820     ENDIF
1830 130 CONTINUE

```

```

1840 RETURN
1850 END
1860 *
1870 *----- SEQUENCE ELUCIDATION
1880 *
1890 SUBROUTINE CAPS(POLA,NACOMP)
1900 IMPLICIT INTEGER*2 (A-S)
1910 CHARACTER ACH*1,SEQUNC*24
1920 INTEGER*4 SUM1,SUM2,SUMPR1,SUMPR2
1930 DIMENSION NSP1(2),NSP2(2),NSPPR1(2),NSPPR2(2),IN
      (2)
1940 DIMENSION SEQ1(100,19),LCOMP(20)
1950 DIMENSION MWNP(6),MWP(6),MWNN(6),MWNN(6)
1960 DIMENSION MWCP(6),MWCPN(6),MWCNP(6),MWCNN(6)
1970 DIMENSION NOPP(2),NOPN(2),NONP(2),NONN(2)
1980 COMMON INTE(2000),SEQ2(100,20),SCR2(100)
1990 COMMON/AMIN/ACH(20)
2000 COMMON/AMNW/MWA(20)
2010 COMMON/CAND/SEQUNC(100)
2020 COMMON/COMP/ACOMP(20)
2030 COMMON/PARM/ITRML,NAA
2040 COMMON/PEPT/SEQ(20),NA
2050 COMMON/SCOR/SCORE(100),NSEQ,MAXNS,MINSCR,MAXNA,MJ
      UST
2060 COMMON/SPEC/MINMS,MAXMS,MWP
2070 COMMON/SQMS/MSP(100,2),NSP(2)
2080 COMMON/SQPK/MWSP(6,2,2),NOSP(2,2)
2090 *
2100 * SEQUENCE IONS
2110 DATA MWNP/-28, 0, 0, 0, 0, 0/
2120 DATA MWCP/ 2, 0, 0, 0, 0, 0/
2130 DATA NOPP/ 2, 1 /
2140 DATA MWNPN/-28, 0, 17, 0, 0, 0/
2150 DATA MWCNP/ 2,-13, 0, 0, 0, 0/
2160 DATA NOPN/ 3, 2 /
2170 DATA MWNNP/ 0, 0, 0, 0, 0, 0/
2180 DATA MWCNP/ 0, 0, 0, 0, 0, 0/
2190 DATA NONP/ 0, 1 /
2200 DATA MWNNN/ 15, 0, 0, 0, 0, 0/
2210 DATA MWCNN/ 0,-15, 0, 0, 0, 0/
2220 DATA NONN/ 1, 2 /
2230 *
2240 DIM1=6
2250 IF(POLA.EQ.1)THEN
2260 DO 10 I=1,DIM1
2270 MWSP(I,1,1)=MWNP(1)
2280 MWSP(I,1,2)=MWNP(1)
2290 MWSP(I,2,1)=MWCNP(1)
2300 10 MWSP(I,2,2)=MWCNP(1)
2310 DO 20 I=1,2
2320 NOSP(I,1)=NOPN(1)
2330 20 NOSP(I,2)=NOPP(1)
2340 ELSE
2350 DO 30 I=1,DIM1
2360 MWSP(I,1,1)=MWNN(1)
2370 MWSP(I,1,2)=MWNN(1)
2380 MWSP(I,2,1)=MWCNN(1)
2390 30 MWSP(I,2,2)=MWCNP(1)
2400 DO 40 I=1,2
2410 NOSP(I,1)=NONN(1)
2420 40 NOSP(I,2)=NONP(1)
2430 ENDIF
2440 * PARAMETERS
2450 NTMASS=1
2460 CTMASS=17
2470 MAXNA=20
2480 MAXNS2=(100+MAXNS)/2
2490 MJUST=MAXNA
2500 IF(ACH(NAA).NE.'P'.OR.MWA(NAA).NE.97)STOP
2510 IF(MAXMS.GE.MWP)MAXMS=MWP-1
2520 * INITIALIZE 1
2530 NSEQ=0
2540 MINSCR=32767
2550 DO 50 I=1,MAXNS
2560 50 SEQUNC(I)=' '
2570 DO 300 ITRMNL=1,2
2580 * INITIALIZE 2
2590 IF(ITRML.EQ.1)THEN
2600 LTRMNL=NTMASS
2610 RTRMNL=CTMASS
2620 ELSE
2630 LTRMNL=CTMASS
2640 RTRMNL=NTMASS
2650 ENDIF
2660 DO 300 INITNO=3,2,-1
2670 * INITIALIZE 3
2680 MJUST=MJUST+1
2690 IF(INITNO.NE.3)GO TO 80
2700 NA1=1
2710 NS1=0
2720 DO 70 I=1,NAA
2730 IF(NACOMP.NE.1)GO TO 60
2740 IF(ACOMP(I).EQ.0)GO TO 70
2750 60 NS1=NS1+1
2760 SEQ1(NS1,NA1)=1
2770 70 CONTINUE
2780 GO TO 90
2790 80 NA1=0
2800 NS1=1
2810 * INITIALIZE 4

```

```

2820 90 NS2=0
2830 IS2=1
2840 MINS2=32767
2850 * INITIALIZE 5
2860 DO 280 IS1=1,NS1
2870 MWP1=LTRMNL
2880 IF(NA1.EQ.0)GO TO 120
2890 DO 100 I=1,NA1
2900 100 SEQ(I)=SEQ1(IS1,I)
2910 NSPPR1(I)=0
2920 NSPPR1(2)=0
2930 SUMPR1=0
2940 DO 110 I=0,NA1-1
2950 IP=1
2960 IF(I.NE.0.AND.ITRML.EQ.2.AND.SEQ(I).EQ.NA
      A)IP=2
2970 IF(SEQ(I+1).EQ.NAA.AND.ITRML.EQ.1)IP=2
2980 CALL SQPEAK(MWP1,MWP1,1,NSPPR1,IP,SUMPR1)
2990 NSPPR1(I)=NSP(1)
3000 110 NSPPR1(2)=NSP(2)
3010 IN(1)=0
3020 IN(2)=0
3030 CALL DOUBLE(SUMPR1,IN)
3040 SUM1=SUMPR1
3050 IP=1
3060 IF(ITRML.EQ.2.AND.SEQ(NA1).EQ.NAA)IP=2
3070 CALL SQPEAK(MWP1,MW1,NA1,NSPPR1,IP,SUM1)
3080 CALL DOUBLE(SUM1,NSPPR1)
3090 GO TO 130
3100 120 NSP1(1)=0
3110 NSP1(2)=0
3120 SUM1=0
3130 NSPPR1(1)=0
3140 NSPPR1(2)=0
3150 SUMPR1=0
3160 IP=1
3170 CALL SQPEAK(MWP1,MW1,NA1,NSP1,IP,SUM1)
3180 130 NSP1(1)=NSP(1)
3190 NSP1(2)=NSP(2)
3200 * INITIALIZE 6
3210 140 DO 270 IA1=1,NAA
3220 NA=NA1+1
3230 SEQ(NA)=IA1
3240 * AMINO ACID COMPOSITION
3250 IF(NACOMP.NE.1)GO TO 170
3260 DO 160 I=1,NAA
3270 N=0
3280 DO 150 J=1,NA
3290 150 IF(I.EQ.SEQ(J))N=N+1
3300 IF(N.GT.ACOMP(I))GO TO 270
3310 160 LCOMP(1)=N
3320 * INITIALIZE 7
3330 170 MWS1=MW1+MWA(IA1)+RTRMNL
3340 IF(MWS1.GT.MWP)GO TO 270
3350 IF(NA1.EQ.0)GO TO 190
3360 IF(IA1.NE.NAA.OR.ITRML.NE.1)GO TO 180
3370 IP=2
3380 CALL SQPEAK(MWP1,MW1,NA1,NSPPR1,IP,SUMPR1)
3390 CALL DOUBLE(SUMPR1,NSPPR1)
3400 NSP1(1)=NSP(1)
3410 NSP1(2)=NSP(2)
3420 SUM1=SUMPR1
3430 180 IF(MWS1.EQ.MWP)THEN
3440 CALL JUSTMW(MW1,NSP1,SUM1,SCR)
3450 GO TO 270
3460 ENDIF
3470 * INITIALIZE 8
3480 IF(NA1.EQ.MAXNA-1)GO TO 270
3490 190 MWPR2=MW1
3500 NSPPR2(1)=NSP1(1)
3510 NSPPR2(2)=NSP1(2)
3520 SUMPR2=SUM1
3530 SUM2=SUM1
3540 IP=1
3550 IF(ITRML.EQ.2.AND.SEQ(NA).EQ.NAA)IP=2
3560 CALL SQPEAK(MW1,MW2,NA,NSP1,IP,SUM2)
3570 CALL DOUBLE(SUM2,NSP1)
3580 NSP2(1)=NSP(1)
3590 NSP2(2)=NSP(2)
3600 DO 260 IA2=1,NAA
3610 IF(NACOMP.NE.1)GO TO 200
3620 IF(LCOMP(IA2).GE.ACOMP(IA2))GO TO 260
3630 * INITIALIZE 9
3640 200 NA=NA1+2
3650 SEQ(NA)=IA2
3660 MWS2=MW2+MWA(IA2)+RTRMNL
3670 IF(MWS2.GT.MWP)GO TO 260
3680 IF(IA2.NE.NAA.OR.ITRML.NE.1)GO TO 210
3690 IP=2
3700 N=NA-1
3710 CALL SQPEAK(MWPR2,MW2,N,NSPPR2,IP,SUMPR2)
3720 CALL DOUBLE(SUMPR2,NSPPR2)
3730 NSP2(1)=NSP(1)
3740 NSP2(2)=NSP(2)
3750 SUM2=SUMPR2
3760 210 IF(MWS2.EQ.MWP)THEN
3770 CALL JUSTMW(MW2,NSP2,SUM2,SCR)
3780 GO TO 260
3790 ENDIF
3800 CALL CALSCR(MW2,NSP2,SUM2,SCR)

```

```

3810 * STORE SEQUENCES FOR PROLONGATION
3820 IF(NS2.GE.MAXNS2)THEN
3830   IF(SCR.LE.MINSC2)THEN
3840     GO TO 250
3850   ELSE
3860     I1=IS2
3870   ENDIF
3880 ELSE
3890   NS2=NS2+1
3900   I1=NS2
3910 ENDIF
3920 220 DO 230 I=1,NA
3930 230 SEQ2(I,I)=SEQ(I)
3940 SCR2(I1)=SCR
3950 MINSC2=SCR
3960 DO 240 I=1,NS2
3970   IF(MINSC2.GT.SCR2(I))THEN
3980     MINSC2=SCR2(I)
3990     IS2=I
4000   ENDIF
4010 240 CONTINUE
4020 250 CONTINUE
4030 260 CONTINUE
4040 270 CONTINUE
4050 280 CONTINUE
4060 * INITIALIZE 10
4070   IF(NA1.EQ.MAXNA-2)GO TO 300
4080   IF(NS2.GT.0)THEN
4090     NA1=NA1+2
4100     DO 290 I=1,NS2
4110       DO 290 J=1,NA1
4120 290   SEQ1(I,J)=SEQ2(I,J)
4130     NS1=NS2
4140     GO TO 90
4150   ENDIF
4160 300 CONTINUE
4170   RETURN
4180   END
4190 *
4200 *---- MASS AND NUMBER OF SEQUENCE IONS
4210 *
4220 SUBROUTINE SQPEAK(MW1,MW,N,NSP1,IP,SUM)
4230 IMPLICIT INTEGER*2 (I-S)
4240 INTEGER*4 SUM
4250 DIMENSION MR(2),NSP1(2)
4260 COMMON INTE(2000)
4270 COMMON/AMNW/MWA(20)
4280 COMMON/PARM/ITRML,NAA
4290 COMMON/PEPT/SEQ(20),NA
4300 COMMON/SPEC/MINMS,MAXMS,MWP

```

```

4310 COMMON/SQMS/MSP(100,2),NSP(2)
4320 COMMON/SQPK/MWSP(6,2,2),NOSP(2,2)
4330 *
4340   NSP(1)=NSP1(1)
4350   NSP(2)=NSP1(2)
4360   MW=MW1
4370   IF(N.NE.0)MW=MW+MWA(SEQ(N))
4380   IF(ITRML.EQ.1)THEN
4390     MR(1)=MW
4400   ELSE
4410     MR(1)=MWP-MW
4420   ENDIF
4430   MR(2)=MWP-MR(1)
4440   DO 10 I=1,2
4450     DO 10 J=1,NOSP(I,IP)
4460     M=MR(1)+MWSP(J,I,IP)
4470     IF(M.LT.MINMS.OR.M.GT.MAXMS.OR.INTE(M).LT.
0)GO TO 10
4480     NSP(I)=NSP(I)+1
4490     MSP(NSP(I),I)=M
4500     SUM=SUM+INTE(M)
4510 10 CONTINUE
4520   RETURN
4530   END
4540 *
4550 *---- SUBTRACT DOUBLY COUNTED PEAKS
4560 *
4570 SUBROUTINE DOUBLE(SUM,IN)
4580 IMPLICIT INTEGER*2 (I-N)
4590 INTEGER*4 SUM
4600 DIMENSION IN(2)
4610 COMMON INTE(2000)
4620 COMMON/SQMS/MSP(100,2),NSP(2)
4630 *
4640   DO 40 I=1,2
4650     DO 40 J=IN(I)+1,NSP(I)
4660     M=MSP(J,I)
4670     DO 10 K=1,IN(3-I)
4680 10     IF(MSP(K,3-I).EQ.M)GO TO 30
4690     IF(I.EQ.2)GO TO 40
4700     DO 20 K=IN(2)+1,NSP(2)
4710 20     IF(MSP(K,2).EQ.M)GO TO 30
4720     GO TO 40
4730 30     SUM=SUM-INTE(M)
4740 40 CONTINUE
4750   RETURN
4760   END
4770 *
4780 *---- CALCULATE SCORES
4790 *

```

```

4800 SUBROUTINE CALSCR(MWBASE,NSP1,SUM1,SCR)
4810 IMPLICIT INTEGER*2 (I-S)
4820 INTEGER*4 SUM,SUM1
4830 DIMENSION NSP1(2)
4840 COMMON/PARM/ITRML,NAA
4850 COMMON/PEPT/SEQ(20),NA
4860 COMMON/SQMS/MSP(100,2),NSP(2)
4870 *
4880   SUM=SUM1
4890   IF(ITRML.EQ.2.AND.SEQ(NA).EQ.NAA)THEN
4900     IP=2
4910   ELSE
4920     IP=1
4930   ENDIF
4940   CALL SQPEAK(MWBASE,N,NA,NSP1,IP,SUM)
4950   CALL DOUBLE(SUM,NSP1)
4960   M=NSP(1)+NSP(2)
4970   IF(M.EQ.0)THEN
4980     SCR=0
4990   ELSE
5000     SCR=SUM/M
5010   ENDIF
5020   RETURN
5030   END
5040 *
5050 *---- STORE CANDIDATE SEQUENCES
5060 *
5070 SUBROUTINE JUSTMW(MWBASE,NSP1,SUM,SCR)
5080 IMPLICIT INTEGER*2 (C-S)
5090 INTEGER*4 SUM
5100 CHARACTER ACH*1,SEQUNC*24,CSEQ*24
5110 DIMENSION NSP1(2)
5120 COMMON/AMIN/ACH(20)
5130 COMMON/CAND/SEQUNC(100)
5140 COMMON/PARM/ITRML,NAA
5150 COMMON/PEPT/SEQ(20),NA
5160 COMMON/SCOR/SCORE(100),NSEQ,MAXNS,MINSCR,MAXNA,MJ
UST
5170 COMMON/SQMS/MSP(100,2),NSP(2)
5180 *
5190   CALL CALSCR(MWBASE,NSP1,SUM,SCR)
5200   CSEQ=' '
5210   IF(NSEQ.EQ.MAXNS)THEN
5220     IF(SCR.LE.MINSCR)GO TO 110
5230     NN=NSEQ
5240     GO TO 10
5250   ENDIF
5260   NN=NSEQ+1
5270 10   IF(ITRML.EQ.2)THEN
5280     DO 20 I=1,NA

```

```

5290 20     CSEQ(I:1)=ACH(SEQ(NA+I-1))
5300   ELSE
5310     DO 30 I=1,NA
5320 30     CSEQ(I:1)=ACH(SEQ(I))
5330   ENDIF
5340   DO 60 I1=1,NSEQ
5350 40   IF(SCORE(I1)-SCR)80,50,60
5360 50   IF(MJUST.EQ.MAXNA+1)GO TO 60
5370   IF(SEQUNC(I1)(1:MAXNA).EQ.CSEQ)GO TO 70
5380 60   CONTINUE
5390   GO TO 100
5400 70   SEQUNC(I1)(MJUST:MJUST)='*'
5410   GO TO 110
5420 80   DO 90 J=NN-1,I1,-1
5430     SEQUNC(J+1)=SEQUNC(J)
5440 90     SCORE(J+1)=SCORE(J)
5450 100   SEQUNC(I1)=CSEQ
5460     SCORE(I1)=SCR
5470     MINSCR=SCORE(NN)
5480     NSEQ=NN
5490     GO TO 70
5500 110   RETURN
5510   END
5520 *
5530 *---- ONE CHARACTER SYMBOL AND RESIDUAL MW OF AMI
NO ACIDS
5540 BLOCK DATA CAPSDT
5550 CHARACTER*1 ACH
5560 INTEGER*2 MWA
5570 COMMON/AMNW/MWA(20)
5580 COMMON/AMIN/ACH(20)
5590 *
5600 DATA ACH/'G','A','S','W','V','T','C','L','N','D',
'K',-
5610 'E','M','H','F','R','Y','P','*','*'/
5620 DATA MWA/57,71,87,186,99,101,103,113,114,115,128,
129,-
5630 131,137,147,156,163,97,0,0/
5640 END

```

謝辞

本研究を行うに当たって、絶えずご指導を頂いた横浜国立大学
教授 土屋正彦博士に深く感謝致します。

本研究を行うに当たり、終始ご指導を頂いた横浜国立大学
教授（助教授）廣田 稔、中山 春夫、阿久津 秀雄、小林 憲正
各博士に深く感謝致します。

本研究を進めるに当たり、直接ご指導頂いた物質工学工業技術研
究所無機材料部長（当時） 丹羽吉夫博士に深く感謝致します。

平成9年3月1日

石川啓一郎

