The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

βストランドF,Gに添って，シクロヘキセン環がβバレル底部に挿入する形で結合していた．一方で，PGH_2結合モデルにおいて，PGH_2は親水的な領域を含むβバレル上部に結合していた．酵素反応を受けるPGH_2のペルオキシド基は，活性中心のCys65と約4 Åで近接しており，両者が接触して反応することが十分に可能であることが示された．レチノイン酸とPGH_2の結合モデルを重ね合わせたところ，両者とも互いに重大な立体障害を引き起こしておらず，両者同時にL-PGDSと結合できる可能性が示唆された．

そこで，レチノイン酸のL-PGDS酵素活性阻害様式を調べた．その結果，レチノイン酸はL-PGDSの酵素活性を非競合阻害し，図5のモデルを支持した．

次に，NMRを用いてL-PGDSと基質安定誘導体U-46619の複合体溶液構造を決定した．

図6に遊離型と複合体型の立体構造を示した．複合体型と遊離型ではβバレル中核の構造は，ほとんど変化していないが，βバレル上部のCD-ループ，EF-ループおよびH2-ヘリックスの領域で構造が大きく変化して複合体形成に伴いβバレル上部の入り口を閉じて蓋をするように構造変化を起こしていた．このことは，リガンド結合によりL-PGDSの慣性半径が減少するというX線小角散乱法の結果とも一致していた．以上のことから，L-PGDSは，さまざまな形状・大きさの疎水性リガンドに自らの構造を適応させるという，他のリポカリンファミリータンパク質に見られない特徴を持つことが明らかとなった．このようなリガンド捕捉機構により，L-PGDSは“広いリガンド選択性”と“リガンドとの強い結合”を成り立たせていると考えられる．

文　献

1) Takinowaki, H. *et al.*: *Protein Sci.*, **15**, 487 (2006).
2) Shimamoto, S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **282**, 31373 (2007).
3) Miyamoto, Y. *et al.*: *J. Struct. Biol.*, **169**, 209 (2009).

質量分析によるタンパク質複合体の相互作用解析

明石　知子

バイオマーカーの探索や分子間ネットワークの解析などの研究においてタンパク質を同定する際，中心的かつ必須な解析ツールは質量分析である．この場合，実際に分析するのは，タンパク質を酵素消化して得られるペプチド断片や比較的小さいタンパク質であり，高感度で分析できるようにするため酸性かつ有機溶媒の存在する変性条件下で分析する．これに対し，相互作用するタンパク質複合体を丸ごと観測し，機能に関する情報を獲得することを目指す場合には，非変性条件下で分析する必要がある．非変性条件で測定することにより，タンパク質複合体は解離せずに質量測定され，複合体がどのようなストイキオメトリー（化学量論）で結合しているのかを決定することができる．その質量測定の精度は非常に高いことから，非共有結合を保ったままイオン化することができれば，他の分析手法に比べきわめて確実にストイキオメトリーを決定できる．本稿では，タンパク質複合体のイオンを非変性条件下で観測する質量分析を用いた相互作用解析のための手法とその応用について解説する．

非変性条件での質量分析の要件

タンパク質複合体のイオンを非変性条件下で観測するには，一般に，エレクトロスプレーイオン化（electrospray ionization, ESI）法[1,2]を用いる．ESI法は大気圧イオン化法の一つで，溶液試料を質量分析装置イオン源のキャピラリーへ導入し，その先端部分に3～4000 Vの高電圧をかけるとともに，窒素ガスの補助によりきわめて細かい液滴として噴霧し，イオン化する方法である．ESIは現在実用化されているイオン化法の中で最もソフトなイオ

著者紹介　横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科生体超分子システム科学専攻（准教授）
E-mail: akashi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

ン化法の一つで，タンパク質のような高分子でもイオン化することができる．生成されるイオンは，$[M+nH]^{n+}$や$[M-nH]^{n-}$のような多価イオンである．ESIでは，たとえば18+, 19+, 20+のような連続した複数の多価イオンが観測され，観測された*m/z*とMおよびnとの関係を示す連立方程式を解くことでMとnを求めることができる．以下，相互作用している複合体を解離させずにESI-MSで観測するために注意する実験条件について，項目ごとに解説する．

nanoESI　ESIの場合，試料導入はシリンジポンプで3～5 μl/min程度で行うが，nanoESI（nano electrospray ionization）を用いることで，流速は数十nl/minまで落とすことができる．これによりきわめてマイルドに脱溶媒が可能となり，不安定な複合体でも解離させずにイオン化することができる．nanoESIでは，内径が0.6～0.8 mm程度のガラスキャピラリーの先端を内径5 μm程度と細く引き伸ばし，その先端部分の表面を金コーティングした使い捨てチップにサンプリングする．1回の測定に2～4 μlをnanoESIチップに入れることで30分程度連続して試料をイオン化し質量分析することができる．

溶液条件　高感度かつ高精度でタンパク質の質量分析を行う場合は，酸性かつ有機溶媒の存在する変性条件下で分析する．この分析では，共有結合のみからなる分子の質量を求めることができ，タンパク質は変性し多くのH^+が付加して幅広い電荷分布が観測される（図1）．

一方，タンパク質を変性させずにESI-MSで観測する場合，酢酸アンモニウムや炭酸アンモニウム水溶液など，不揮発性でない塩からなる水溶液で試料溶液を調製する．最も一般的な方法では，測定したい試料濃度が5～10 μMとなるように5 mM～数Mの酢酸アンモニウム水溶液として調製する．不揮発性の塩からなる緩衝液を用いたり，NaClやグリセリンを添加したりすることは，タンパク質のイオン化を妨げるので避けなければならない．そこで，タンパク質溶液は，酢酸アンモニウム水溶液などに微量透析，ゲルろ過カートリッジ，限外ろ過などの方法で溶媒交換をしてから用いる．この場合，酸性条件に比べて少ない数のH^+が付加して狭い電荷分布が観測される（図2）．以下，酢酸アンモニウム水溶液でタンパク質複合体を分析する場合を例に説明する．

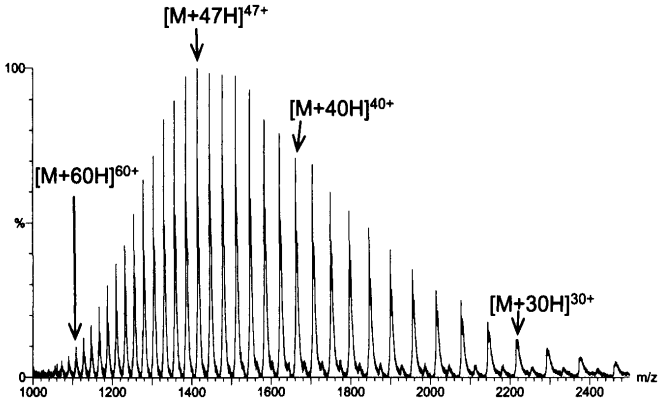

図1．1%酢酸/50% MeOHで調製したウシ血清アルブミン（BSA）のESIマススペクトル

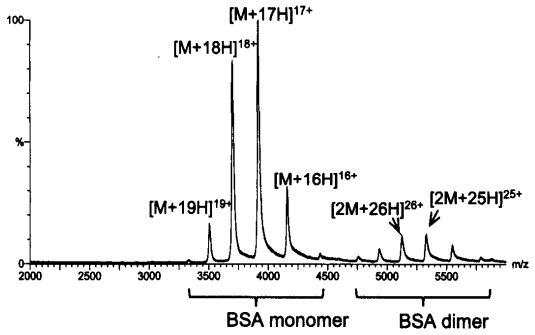

図2．10 mM酢酸アンモニウム水溶液で調製したBSAのESIマススペクトル

タンパク質複合体において，静電相互作用がおもに寄与して複合体が形成されている場合（例：タンパク質-核酸複合体の場合），高い酢酸アンモニウム濃度では相互作用が弱まるので，5～10 mMの酢酸アンモニウム溶液で試料を調製する．これに対し，疎水性相互作用がおもに寄与して複合体が形成されている場合，高い塩濃度の方が複合体の形成を維持しやすいため，500 mMあるいはそれ以上の酢酸アンモニウム水溶液で試料を調製する．

nanoESIの場合，1 Mを超える高い濃度の酢酸アンモニウム水溶液で試料溶液を調製しスプレーしても安定にイオン化することができる．一方，シリンジポンプで3～5 μl/min程度の流速で送液する場合はすぐにイオン源が汚れてしまうので，頻繁にクリーンアップする必要があり，シリンジポンプで導入するのは実際的ではない．

質量分析装置　先に述べたように，ESIでは多価イオンが生成されるので，分子量よりもはるかに低い*m/z*でピークが観測される．とはいえ，酢酸アンモニウム水溶液で試料を調製した場合は付加されるH^+の数はそれほど多くはない（図2）．そのため，タンパク質複合体の観測では高*m/z*まで測定可能な飛行時間型質量分析計（time-of-flight mass spectrometer，TOF-MS）や四重極（quadrupole，Q）とTOFとのハイブリッドタイプであるQ-TOF型質量分析計が用いられる．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

50 kDaを超えるような巨大なタンパク質複合体の場合，質量分析計のイオンの取り込み口付近の真空度を許容できる範囲で悪くすることにより，複合体の解離を抑制し複合体のイオンを観測しやすくなる．これはイオン源直後の領域の粗引き用のポンプを機能させないようにすることで達成できるが，装置によってはハードの改造を必要とする場合もある．

複合体を解離させずにそのイオンを観測する場合，できるだけマイルドな条件で質量分析装置に導き，脱溶媒する必要がある．マイルドな条件で測定する場合，溶媒だけはがして複合体は解離させないように条件をコントロールする必要がある．比較的小さなタンパク質-リガンド複合体（<30 kDa）の場合，タンパク質とリガンドの質量理論値の合計とほぼ一致する実測値が得られる．これに対し，巨大なタンパク質複合体の場合，先に述べたように真空をコントロールして複合体の解離を抑制するため，水や酢酸アンモニウム分子が複合体についたままイオン化されることが多い．そのため，実測の質量は理論値よりも～0.5%程度大きめになるのが一般的である．

タンパク質複合体の質量分析—ESI黎明期の研究—

ESIでタンパク質をイオン化した報告がFennらから1989年に報告[2]されて以来，さまざまな生体高分子の構造機能解析にESI法は利用されている．質量分析では気相で分析するため，液相の状態を必ずしも反映できる場合ばかりではないことは否めないが，多くの報告で液相の状態を保持していることを裏づけるデータが出されている．また，その質量の決定精度は，超遠心分析や光散乱などの方法に比べるとはるかによいという特長がある．また低分子リガンドの結合のように複合体形成に伴う質量変化が小さい場合も有効である．ここではESI法の黎明期に行われたタンパク質複合体の質量分析による研究例を紹介する．

タンパク質－リガンドの複合体　ESI法が実用化されて間もなく，FK506 binding protein（FKBP）と2種類の薬物との複合体がESI-MSで観測された[3]．試料は10 mM酢酸アンモニウム水溶液として調製され，FKBP-FK506複合体，およびFKBPに対してFK506とrapamycinを競合させた場合に形成される複合体について，ESI-MSでの解析が報告された．FKBPに対して1.6倍量のFK506を混合し複合体を形成させESIマススペクトルを測定すると複合体のイオンがわずかに観測され，FK506の約2倍アフィニティーのあるrapamycinを競合させた場合は，その結合の強さに比例した相対強度で複合体のイオンが観測できることが示されている．市販の装置が出されて間もないころに行われたこの研究は，質量分析法による複合体の解析の可能性を示す重要な位置づけにあるといえる．

表1．NAG_nの結合の強さと加水分解の相対的な速度[4]

基質	*Ka*	加水分解相対速度
NAG	0.03 M^{-1}	
NAG_2	3.2 × 10^3 M^{-1}	0.003
NAG_3	1.1 × 10^5 M^{-1}	1
NAG_4	1.8 × 10^5 M^{-1}	8
NAG_6	～NAG_4	30,000

酵素－基質の複合体　糖鎖のβ-1,4結合を切断する酵素リゾチームと，その基質である*N*-acetylglucosamineのオリゴマー（NAG_n）の複合体が観測されている[4]．リゾチームとNAG_nの結合の強さと加水分解の相対的な速度は表1に示すとおりである．

10 mM酢酸アンモニウム水溶液において，約35 μMのリゾチームと約10倍量のNAG_nを混合し，10分インキュベーションした後に測定されたESIマススペクトルでは，リゾチーム-NAG_n複合体のイオンがその*Ka*と矛盾しない強度で観測されている．さらに，NAG_6の場合は加水分解反応が進行し，リゾチーム-NAG_6に加えリゾチーム-NAG_3やリゾチーム-NAG_4複合体が観測されている．またNAG_nとの競合阻害剤tetra-*N*-acetylchitotetraose δ-lactone（TACL）を存在させるとリゾチーム-TACLの複合体のイオンが観測できることも報告されている．この研究は，酵素反応の追跡を質量分析でできること，結合の相対的な強さを質量分析で比較できることなどを示しており，質量分析で親和性を議論する基盤的研究といえる．

タンパク質－核酸複合体　ESI-MSでは二重鎖DNAも解離させずに観測することができる．そして転写因子のような二重鎖DNAを認識するタンパク質との複合体も観測できる．タンパク質-DNA複合体の観測例として，1996年にはGene V proteinの2量体（19.4 kDa）と16塩基の一重鎖DNA（ssDNA）（4.9 kDa）との複合体の観測が報告されている[5]．この場合，10 mM酢酸アンモニウム水溶液で試料を調製し，負イオンモードで測定している．Gene V protein（単量体）と16塩基のssDNAを4：1で混合した試料をESI-MSで測定したところ，Gene V protein 2量体：ssDNA = 1：1（24.2 kDa）および

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

Gene V protein 2量体：ssDNA＝2：1（43.7 kDa）のイオンが観測できることが報告されている．DNAのように正イオンよりもむしろ負イオンとしてイオン化されやすい試料でもESIで問題なく観測でき，かつタンパク質との複合体も負イオンで観測できることを示す研究である．

その後，2000年には21種類のタンパク質と2種類のRNAからなる巨大な複合体である大腸菌リボソームの30Sサブユニット（847 kDa）について，正イオンモードで丸ごとイオン化し観測できたことが報告されている[6]．800 kDaを超える巨大な分子を解離させずにイオン化し検出するには，市販の装置では困難を極める．この研究では，質量分析装置のイオン源に続く領域の真空を，窒素ガスで落とすことができるような改造を行うなど，巨大なタンパク質複合体の検出を可能にするハードの最適化も行っている．このような基盤的研究により，後年，ウィルスのように4 MDaを超える粒子までが質量分析できるようになっている[7]．

タンパク質複合体の質量分析―最近の研究から―

タンパク質－タンパク質複合体　タンパク質が変性しない条件で質量分析することにより，リボソームのように，X線結晶構造解析で解かれている構造を基に予想された質量を非常に正確に求めることができるだけでなく，X線結晶構造解析では得られない構造情報も得られることが明らかになっている．その例として，*Bacillus*属のTrp合成に関わる転写翻訳調節を行うタンパク質TRAP（8.4 kDa, 11量体として存在）とその制御因子anti-TRAP（AT, 5.7 kDa, pH 7.0では3量体×4＝12量体として存在）の複合体の例を解説する[8,9]．

TRAP-AT複合体の構造を明らかにする目的で，X線結晶構造解析とESI-MSの実験を並行して進めた．X線結晶構造解析では，12量体TRAPの周りを6つのAT 3量体が取り囲む結晶構造が出された．これは，TRAPはフリーでは11量体で存在することが既知であるため，ATにより認識される場合は，11量体から12量体への構造変換が必要であることを示唆するものであった．これに対しESI-MSでは，結晶構造と矛盾しないTRAP12量体とAT3量体×6からなる複合体のピークは存在するもののその相対強度は低く，TRAP11量体とAT3量体×5，TRAP11量体とAT3量体×4，TRAP11量体とAT3量体×3からなる3種類の複合体のピークが顕著に観測された（図3）．

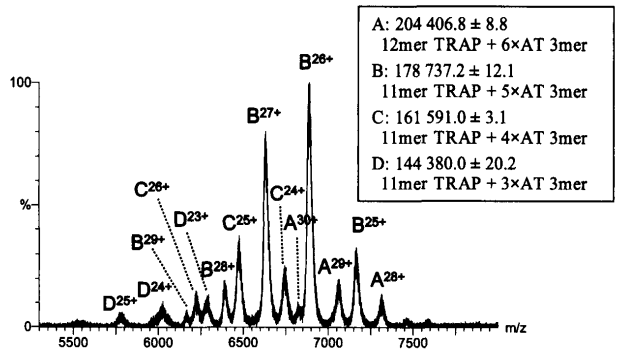

図3．500 mM酢酸アンモニウム水溶液で調製したTRAP-anti-TRAP複合体のESIマススペクトル（*m/z* 5300-8000）

フリーのTRAPのESIマススペクトルでは，11量体TRAPに加え，非常に弱い強度で12量体TRAPのピークも観測されていたことと合わせて考えると，ATによる認識において，TRAPは必ずしも11量体から12量体への構造変換を必要とするのではなく，X線結晶構造解析では結晶化しやすい対称性の高い12量体TRAPの周りを6つのAT 3量体が取り囲む複合体の構造が解かれたのであり，一方，ESI-MSでは溶液において存在するすべての複合体のピークが観測されたと考えられる．このことは，タンパク質複合体の相互作用のメカニズムを考える場合，結晶構造解析だけでは不十分で，MSの情報はきわめて有効であることを示している．

以上，質量分析だからできる構造解析のための実験手法と特徴についてまとめるとともに，トピックスを紹介した．本手法を広く理解していただき，さまざまな研究への展開につながれば幸いである．

文　献

1) Yamashita, M. and Fenn, J. B.: *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
2) Fenn, J. B. *et al.*: *Science*, **246**, 64 (1989).
3) Ganem, B. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6294 (1991).
4) Ganem, B. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7818 (1991).
5) Cheng, X. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7022 (1996).
6) Rostom, A. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5185 (2000).
7) Shoemaker, G. K. *et al.*: *Mol. Cell Proteomics*, **9**, 1742 (2010).
8) Watanabe, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2176 (2009).
9) Akashi, S. *et al.*: *Anal. Chem.*, **81**, 2218 (2009).

NII-Electronic Library Service