

# 気相タンパク質イオンの水和構造決定法の開発

神戸大学理学部

富宅喜代一

# 気相タンパク質イオンの水和構造決定法の開発

## 1. 研究の背景と目的

タンパク質の構造転移や機能発現に水が重要な役割を果たしていることはよく知られている。このような水分子の役割のミクロなレベルでの情報は、その機能を理解する上で、非常に重要である。しかし、従来の水溶液中での研究では、タンパク質分子の周りに多数の水分子が存在し、特異的なサイトに配位する水分子の特性が平均化されるために、分子レベルでの検討は非常に困難である。他方、最近、電気スプレー法を用いた気相タンパク質イオンの質量分析法が非常に進歩し、ソフトにタンパク質イオンを真空中に取り出すことができるようになってきている。この気相イオンを分光学的に研究することにより、タンパク質表面に結合した水の特性のミクロな情報を得ることが可能となる。しかし、上記の方法で生成したイオンの濃度は極端に低く、現在のところ解析手段は質量分析に留まっている。本研究では、電気スプレー法とドリフトセルを組み合わせ生成した水和タンパク質イオンについて、光解離分光法等を新たに導入することにより、配位水の結合エネルギーや配位構造を決定する新しい方法の開発を試みた。

## 2. 研究方法・研究内容

本研究では、気相中に取り出したタンパク質イオンについて、レーザーを用いた分光実験を実現するために、[1] 電気スプレー法とトリプル四重極質量分析器を組み合わせた光解離分光装置の開発を試みた。また分光実験への展開を計るために、ヘムタンパクの反応中心となっている鉄-ポルフィリン錯体とこの錯体を含むタンパク質について以下の研究を行った。

[2] 鉄-プロトポルフィリン錯体イオンであるヘミンイオンにジメチルスルフォキシド (DMSO) および電子供与性を持つ 1,4-ジアザビシクロ [2,2,2] オクタン (DABCO) を付加させたクラスターを気相中に取り出し、その光解離分光を行った。この研究により、鉄-ポルフィリン錯体の光励起ダイナミクスについて検討した。

[3] 気相中でのタンパク質多価イオンの光誘起反応を調べる目的で、ヘム(鉄-ポルフィリン)を含むタンパク質であるシトクロム c に注目し、ヘムの励起状態を介したシトクロム c 多価イオンの光解離過程について検討した。

## 3. 研究結果

### [1] 光解離分光装置の設計・製作

本研究において設計、製作を行った光解離分光装置の設計図を図 1 に示す。この装置は、電気スプレー (ESI) イオン源を備えたイオンソースチャンバー、真空導入したイオンを四重極質量フィルターにより質量分離する質量分析チャンバー、イオンの光解離分光を行う光解離分光チャンバーと光解離後の生成物の質量分析チャンバーにより構成されている。それぞれのチャンバーは独立に

差動排気されている。質量選別されたイオンについて光解離後の生成物を質量

解析して分光実験を行うには、質量分析計が 2 台必要になる。ここでは、2 台の八重極イオンビームガイド (OPIG)、2 台の四重極イオンペンダーと 2 台の四重極型質量フィルター (QPMS) を備えた実験装置を開発した。

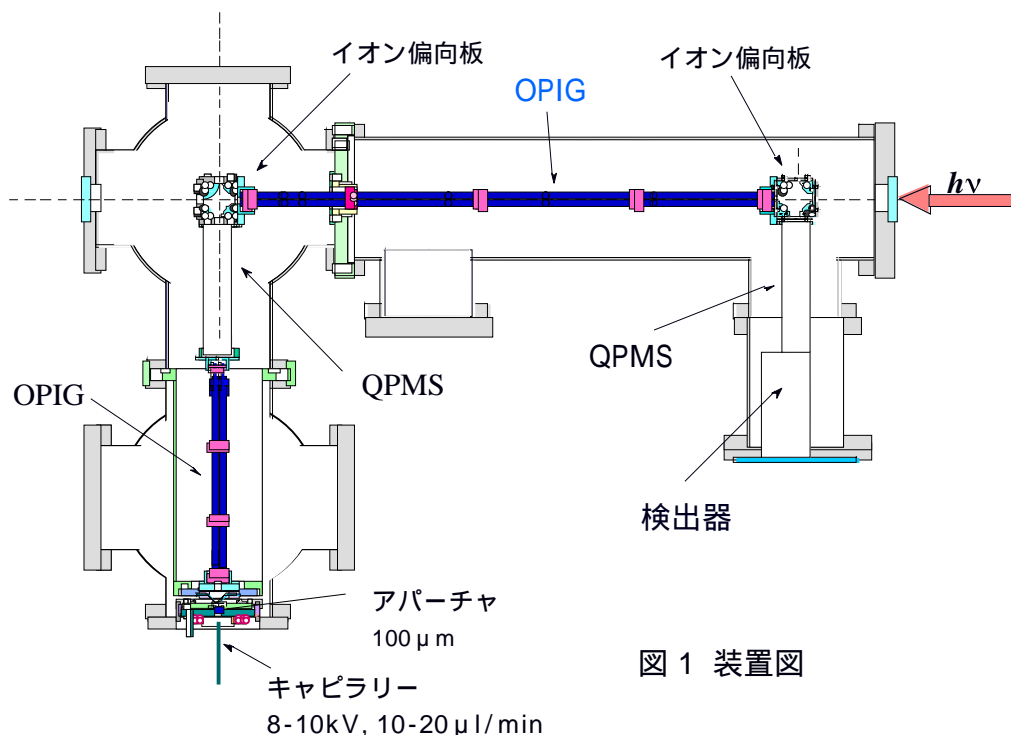


図 1 装置図

ESI イオン源で生成され、真空チャンバーに導入されたイオンは、OPIG でガイドされる。この一段目の OPIG はドリフトセルの機能を持ち、真空導入されたイオンと He 等の緩衝気体や反応気体と衝突させ、イオンの温度制御や新たに水分子等を付加させることができる。イオンは OPIG で QPMS へ導かれ、ここで質量選別されたイオンはイオンペンダーにより 90 度曲げられ、光解離分光用の OPIG に導かれる。このイオンガイドは約 1 m のセル長で、分光用レーザーと相互作用させ、解離反応を調べることができる。レーザー照射で生成したイオンは、イオンペンダーを経て、二番目の QPMS で質量選別されイオン検出器により検出される。

ESI イオン源は自作し、キャピラリーは、内径 0.1mm、の市販のステンレス管を使用した。送液は高速液体クロマトグラフ用ポンプを用いて行い、キャピラリーには約 4 kV の電圧を負荷した。また、イオン強度を増強するために、イオントラップを導入しパルス化すべく、装置の改良を進めている。

## [2] ヘミン-DMSO クラスターの光解離過程

ヘミン (鉄-プロトポルフィリン錯体) イオンは、シトクロム c 中に含まれるヘムと同様の構造を持つイオンで、ヘムの光吸収過程を知る上で基本となる分子である。(図 2 参照) ここでは、光吸収に引き続いて起こる錯体内での励起エネルギー緩和、電荷移動等の過程を調べるために、ヘミンイオンとジメチルスルフォキシドで溶媒和されたヘミン・(DMSO)<sub>n</sub> の光解離実験を行った。

図 2 にヘミン-DMSO クラスターの代表的なマスペクトルを示す。スペクトルではヘミンイオンに DMSO が 5 分子まで付加したクラスターが観測さ

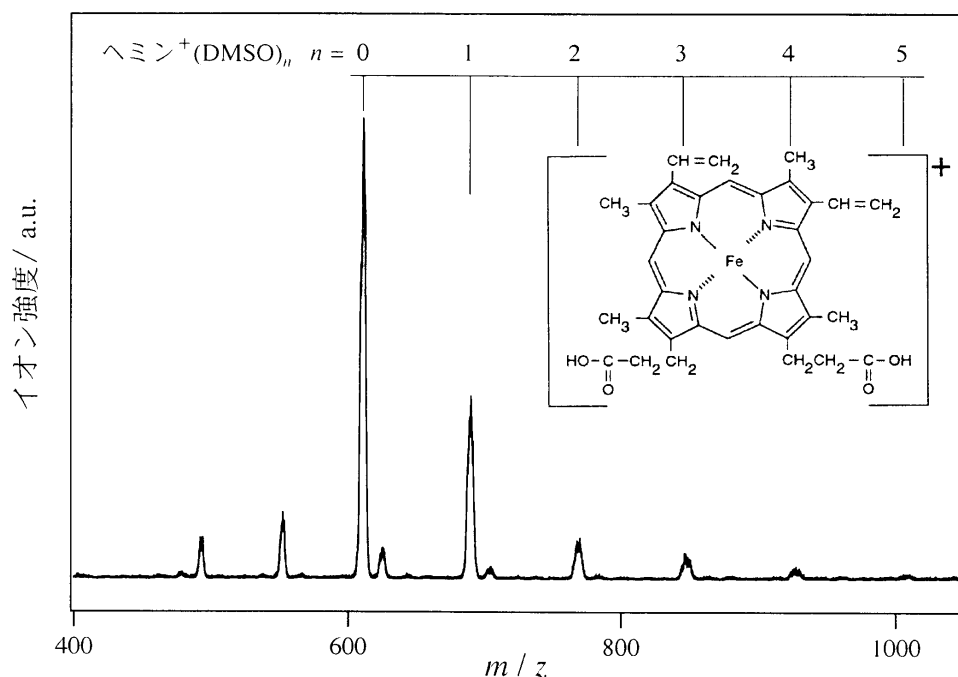


図 2 ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>n</sub> のマスペクトル

れた。これらのクラスターと共に 498 および 557 の質量数を持つピークも観測された。これらのピークは、ポルフィリン骨格に -CH<sub>2</sub> ラジカル基が付いたもので、ESI イオン源内での衝突解離反応でカルボキシメチル (CM; CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H) 基が 1 つまた 2 つ脱離した生成物に帰属され、ポルフィリン骨格の電子との共役により安定化すると考えられる。

#### (1) ヘミンイオンの光解離過程

ヘミンイオンは、400 nm 付近にポルフィリン骨格の  $\pi \rightarrow \pi^*$  遷移に起因する Soret 帯 (B 帯) と呼ばれるきわめて強い吸収帯を持つ。図 3a に親イオンとしてヘミンイオン (616 amu) を質量選別し、355 nm [ $2 \text{ mJ cm}^{-2} \text{ pulse}^{-1}$ ] の解離光を照射したときのイオン強度の時間変化を示す。横軸の時間 0 で解離光を照射した後、約 100  $\mu\text{sec}$  でイオン強度が減衰し始め、約 550  $\mu\text{sec}$  でイオン強度が解離光照射前とほぼ同じ値に戻る様子が観測された。同様に、図 3b は、第一の QPMS でヘミンイオン (616 amu) を質量選別し、二番目の QPMS でフラグメントイオンとして光照射による生成物イオン (498 amu) を質量選別したときのグラフである。ヘミンイオンは溶液中では蛍光収量は非常に小さく、非常に速い無輻射失活過程で基底状態に失活する。ポルフィリンと異なり鉄イオンを含むため、 $\pi \rightarrow \pi^*$  状態に近接した鉄イオンの d 電子に由来する状態や電荷移動状態が多数存在するため、無輻射過程が励起状態の失活の主過程となる。気相でも、このヘミンイオンの電子状態を考慮すると、最も可能な解離機構として、355 nm 光照射で生成する  $\pi \rightarrow \pi^*$  状態が無輻射過程で基底状態に失活し、生成する余剰エネルギーで -CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H (CM) 基の脱離を

起こすと考えられる。この解離過程を詳しく検討するために、レーザー光強度依存性を測定した。5 mJ cm<sup>-2</sup> pulse<sup>-1</sup> 以下では、解離光強度の増加に伴い

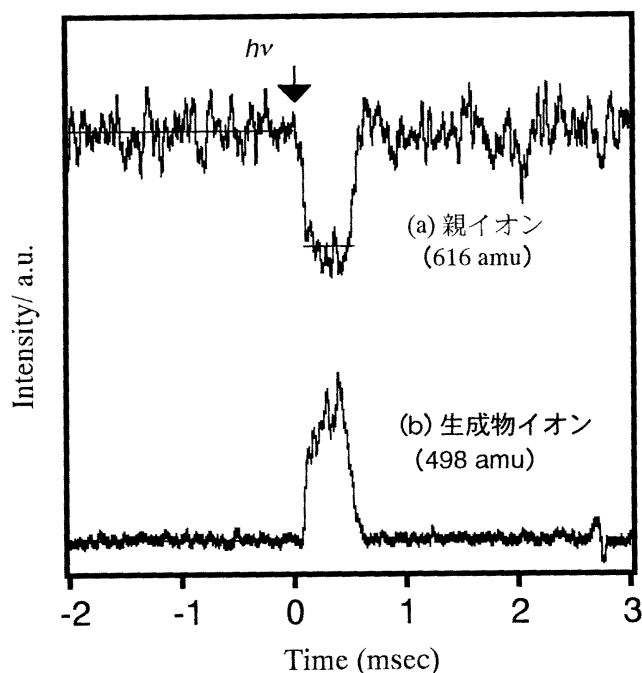


図 3 ヘミンイオンと解離生成物イオンの時間変化

相対解離断面積は直線的に増加し、良好な直線性が得られた。解離レーザー光強度が充分小さい範囲では、ヘミンイオンから CM 基が二つ解離する過程は、一光子過程であることが分かった。さらに解離光強度を増加させると、ヘミンイオンの強度の減衰に飽和が見られ、相対解離断面積はほぼ一定となった。この結果は、解離光強度を増加させると、ヘミンイオンの多光子吸収または解離生成物の光吸収により、CM 基が二つ解離したイオンだけでなく、より小さなフラグメントも生成することを示していると考えられる。

## (2) ヘミン-DMSO クラスターの光解離過程

図 2 に示すヘミンイオンに DMSO が 1~4 個付加したクラスターについて同様の光解離実験を行った。図 4 に 355 nm の光をヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>n</sub> (n=0~4) に照射したときのフラグメントイオンの生成分岐比をまとめて示した。ここでは、以下に示すようなスキームで反応が進んでいると考えられる。



ヘミンイオンの場合、CM 基が二つ解離する過程のみ観測された。ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>n</sub> (n=1~3)では、式 (1) に示すような DMSO の蒸発過程と前述の式

(2)、(3) に示すような置換基の解離過程が観測された。また、ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>4</sub> の場合には、式 (1) に示すような DMSO の蒸発過程のみ観測され置換基の解離過程は観測されなかった。これらの結果は、解離反応に下記のエネルギー障壁があることを示している。

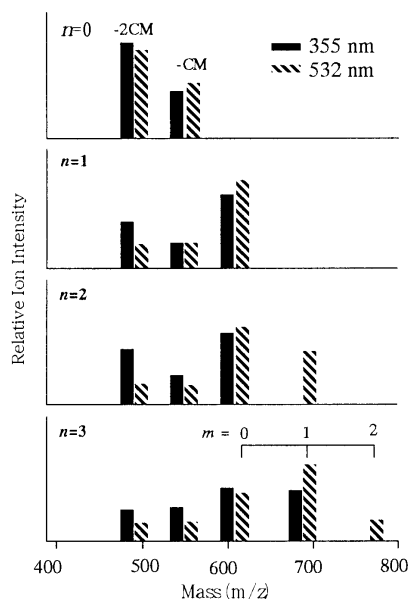


図 4 ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>n</sub> (n=0 4) の生成分岐比

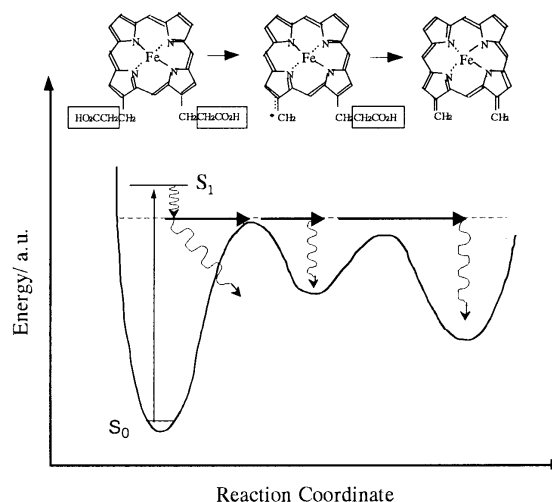


図 5 反応のポテンシャルの模式図

図 5 に、ヘミンイオンから CM 基が解離する反応のポテンシャルを模式的に示す。前述のように CM 基が二つ解離するとポルフィリン骨格に残った二つの  $-\text{CH}_2$  ラジカル基と骨格の電子と共役するため、CM 基が一つ解離したイオンより安定になると考えられる。また、図 4 に見られるように、ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>n</sub> (n=1 3) の光照射では、CM 基が一つ解離する分岐比より二つ解離する分岐比の方が大きくなった。この結果から、図 5 に示すように一つ目の  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  基が解離する反応のエネルギー障壁の方が二つ目のそれより高いことが示唆される。ヘミンイオンの場合、CM 基が二つとも解離したイオンの分岐比が、約 1 となった。この結果は、355 nm の光を照射すると高い <sup>\*</sup>状態に励起され、分子内エネルギー緩和過程を経て生じる余剰エネルギーにより一つ目の障壁を越えて置換基の解離反応が起こり、残りの余剰エネルギーにより二つ目の障壁も越えて置換基が二つとも解離することを示している。n が大きくなるにつれ、置換基の解離過程によるフラグメントイオンの生成分岐比は小さくなる傾向が、溶媒分子の蒸発により、余剰エネルギーが持ち去られ、一つ目のエネルギー障壁を越えたところで反応が止まる場合があるためと考えられる。また、ヘミン<sup>+</sup>(DMSO)<sub>4</sub> の場合には、置換基の解離過程は観測されなかった。これらの結果は、溶媒分子数を増加させると、反応で放出される余剰エネルギーの内、蒸発に分配されるエネルギーが増え、CM 基の解離が抑制されることを示している。

### (3) ヘミン-DABCO 錯体の光解離過程

ヘムタンパク質中で起こる電子移動過程を気相で研究する試みとして、ヘミンイオンに電子供与体である DABCO (1,4-ジアザビスクロ [2,2,2] オクタン) を付加させた錯体を生成し、その光誘起反応について検討した。図 6 に示すように、355 nm の光照射により、解離生成物として DABCO の蒸発で生成したヘミンイオンと  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  (CM) 基が脱離した生成物の他に、新たに  $\text{DABCO}^+$  イオンが観測された。この  $\text{DABCO}^+$  の生成機構は、以下のエネルギー的な考察から励起状態での電子移動による生成物と考えられる。DABCO のイオン化ポテンシャルは 7.52 eV と報告されており、355 nm 光では一光子でイオン化されない。しかし、 $^1\pi\pi^*$  励起状態の生成に伴って生じる  $\pi$  型の最高被占軌道の空孔に電子供与体である DABCO の非結合軌道の電子が入り、ヘミン  $\text{DABCO}^+$  を生じる。この電子移動過程は、非結合軌道が  $\pi$  と  $^1\pi\pi^*$  軌道の間のエネルギーを有するため、 $^1\pi\pi^*$  励起に比べ励起エネルギーが小さくなり、実測結果と矛盾しない。図 7 にこの議論に基づいて書いた、錯体の基底状態および低エネルギーの励起状態のポテンシャル曲線の模式図を示す。この図のように、錯体は  $^1\pi\pi^*$  の局在励起状態から DABCO からヘミンイオンへの電子移動で生じる電荷移動状態への緩和が起こり、続いてヘミン +  $\text{DABCO}^+$  への解離が起こると推察される。また、この過程と競争して基底状態への内部転換過程が起こり、CM 基の脱離を伴った反応が起こると考えられる。今後は、この錯体および溶媒分子の付加したクラスターについて、フェムト秒レーザーを用いたポンプ プロブ実験を行い、気相での電子移動過程のダイナミクスを検討する。また、電子移動の状態選択性について研究するよう計画している。

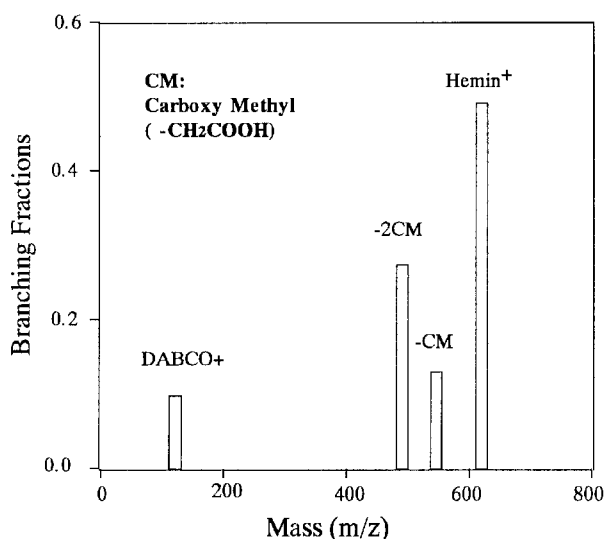


図 6 解離生成物の分岐比

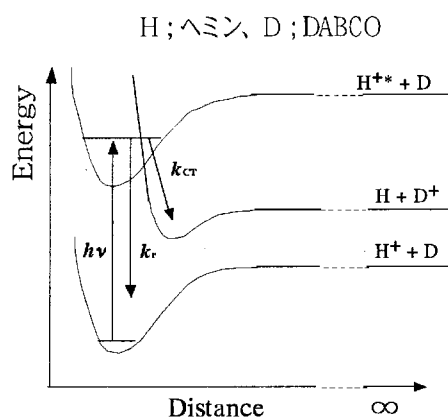


図 7 ヘミン-DABCO 錯体のポテンシャル曲線の模式図

### [3] シトクロム c の光解離過程

シトクロム c は中心に鉄-ポルフィリン錯体であるヘムを含み 104 残基から構成されるタンパク質で、分子量は約 12360 である。図 8 に本研究で得られた、シトクロム c イオンの代表的なマスペクトルを示す。QPMS では  $m/z$

で質量分離するため、分子量  $10^4$  以上のタンパク質でも多電荷イオンを形成すると、質量分析範囲が  $m/z$  で 2000 以下となり、QPMS でも十分に検出可

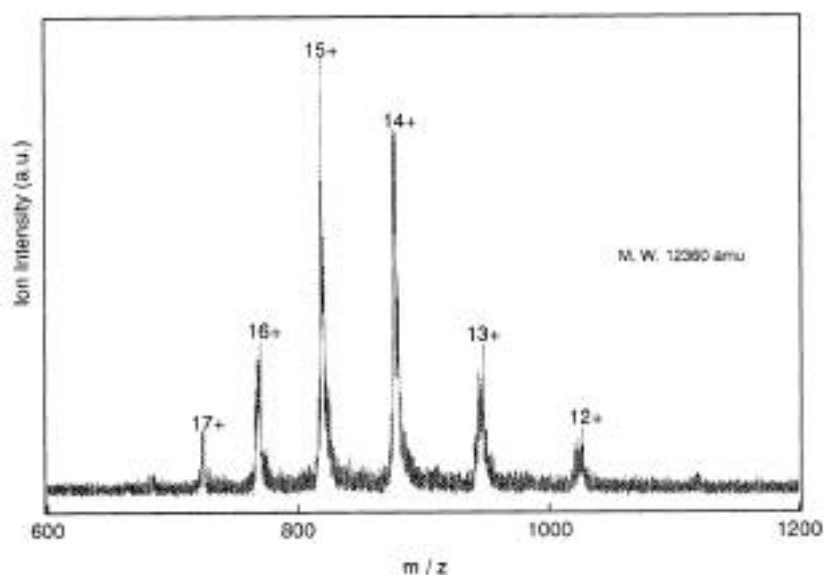


図 8 シトクロム c の質量スペクトル

能となる。また、電荷数の多いイオンほど  $m/z$  の値は小さく、電荷数が減るに従って  $m/z$  は大きくなり、ピーク間隔は広がっていく。スペクトルではシトクロム c にプロトンが、11～18 個付加した多電価イオンが観測された。通常、タンパク質イオンが真空中に取り出されるとき、イオン源で溶液中のプロトンを捕捉して、多電荷のイオンとなることが知られている。この場合、シトクロム c の三次構造の中で、開いたアミド結合部位にプロトンが付着しているものと考えられる。また、実験条件を変えて質量スペクトルを測定した結果、今回の条件ではイオンはシトクロム c のプロトン付加体として観測され、溶媒としての水分子の付着は少ないことがわかった。

図 9 に、電荷数 13+ のシトクロム c に  $355 \text{ nm}$  (約  $8 \text{ mJ cm}^{-2} \text{ pulse}^{-1}$ ) の光を照射した場合のイオン強度の時間変化を示す。図 9a は、親イオンとして電荷数 13+ のシトクロム c (950 amu) を質量選別し、光照射に伴うおやイオンの減少を示すグラフである。解離光照射後、約  $100 \text{ } \mu\text{sec}$  でイオン強度が減衰し始め、約  $500 \text{ } \mu\text{sec}$  で照射前とほぼ同じ値に戻る様子が観測された。同様に、図 9b は、電荷数 13+ のシトクロム c を光照射し、生成した電荷数 14+ のシトクロム c (880 amu) を質量選別したときのグラフである。この場合は解離光照射後、約  $100 \text{ } \mu\text{sec}$  でイオン強度が増加し始め、約  $500 \text{ } \mu\text{sec}$  で照射前とほぼ同じ値に戻る。これらの結果から、電荷数 13+ のシトクロム c に  $355 \text{ nm}$  の解離光を照射すると、シトクロム c イオン中のヘムが解離光を吸収して電子を 1 つ放出し、電荷数が 1 つ増えたイオンが生成したと考えられる。また、親イオンの相対解離断面積のレーザー光強度依存性を測定した結果、シトクロム c イオンの  $355 \text{ nm}$  光照射で誘起される解離過程は、二光子過程であることがわ



かった。

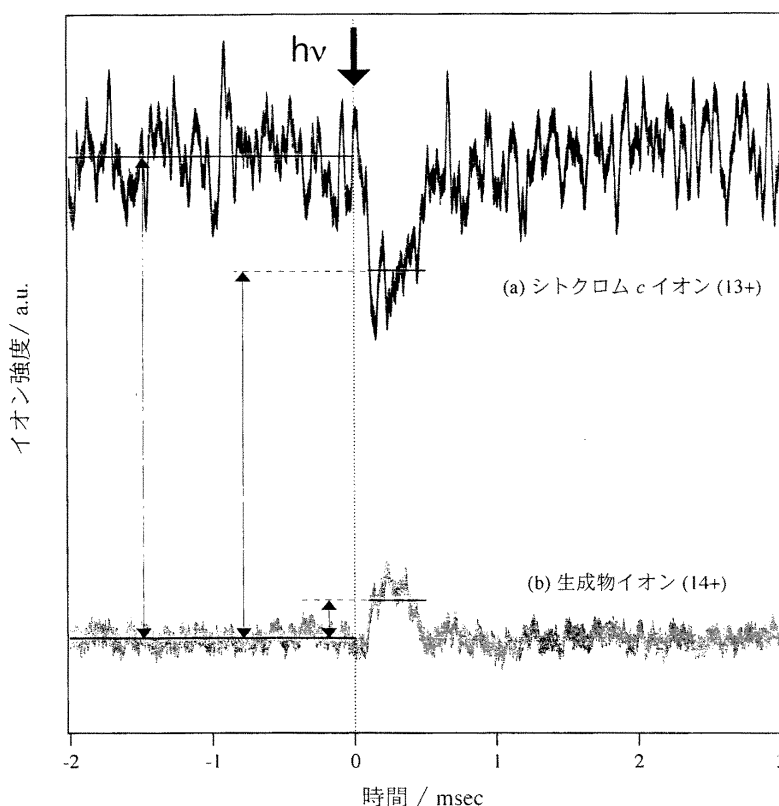
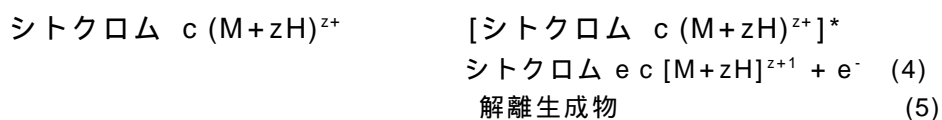


図 9 親イオンと生成物イオンの時間変化

さらにこの解離過程の電荷数依存性を調べるために、同様の光解離実験を他の電荷数のイオンについても行った。図 10 に、電荷数 10+ 17+ のシトクロム c イオンからそれぞれ電荷数が一多いイオンが生成するときの分岐比を示す。解離レーザー光強度は、約  $8 \text{ mJ cm}^{-2} \text{ pulse}^{-1}$  とした。分岐比は、電荷数の増加に伴って減少していることが分かる。これは、シトクロム c イオンが鉄-ポルフィリン錯体であるヘムに由来する多光子吸収により励起された後、次に示す二つの解離過程が競争的に起きていることが原因だと考えられる。



ここで、M はシトクロム c を、z は電荷数を表す。つまり、電荷数の増加に伴ってシトクロム c イオンが持つ正電荷が増大するため電子が飛び出しにくくなり、式 (4) に示すような電子の脱離過程よりも、式 (5) に示すようなシトクロム c イオンが解離して壊れる過程が起こりやすくなるためだと考えられる。シトクロム c については衝突誘起反応の報告があり、本研究の結果と

同様に、電荷数の小さいイオンでは電子の脱離過程が観測され、電荷数が

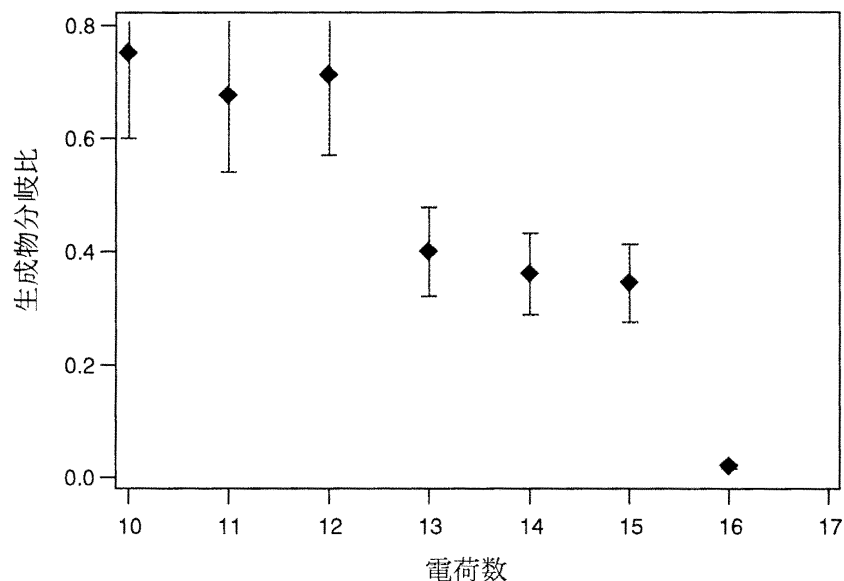


図 10 光解離生成物の分岐比

大きなイオンではシトクロム c のフラグメントが見出されている。この研究を、水分子を含むイオンに拡張するため、現在、ドリフトセルを用いた水分子の付着実験を試みており、同様の光解離過程の検討を行うことを計画している。

#### [4] まとめ

本研究では、気相中タンパク質イオンのレーザー分光実験を実現するために、電気スプレー法とトリプル四重極質量分析器を組み合わせた光解離分光装置の開発を行った。本装置はイオン源として電気スプレー法を用いているため、タンパク質イオンを含む広範な不揮発性イオンの分光解析に応用できることがわかってきた。分光実験への応用を計るために、ヘムタンパクの反応中心である鉄-ポルフィリン錯体（ヘミン）を含むクラスターについて検討した。ここではヘミンイオンにジメチルスルフォキシド（DMSO）および電子供与性を持つ 1,4-ジアザビシクロ [2,2,2] オクタン（DABCO）を付加させたクラスターを気相中に取り出し、光解離分光を行った。この研究により、鉄-ポルフィリン錯体の励起状態でのエネルギー移動と電子移動過程および競争的に進むポルフィリン骨格からの置換基の脱離の反応機構を明らかにした。気相中でのタンパク質多価イオンに応用するために、ヘム（鉄-ポルフィリン）を含むタンパク質であるシトクロム c に注目し、ヘムの励起状態を介した光解離過程について検討した。装置開発に時間を要したため、本研究期間中に水和水の問題まで立ち入っていないが、今後さらにタンパク質イオンの水和数、温度の制御および赤外レーザーを用いた光解離実験等を進めていく予定である。

#### [5] 研究がもたらす効果および波及効果

電気スプレー法を用いたタンパク質のイオン化と質量分析の研究は、米国で 7、8 年前より始まっている。しかし、本研究で進めている分光学的検討については、国内外を含め研究例は皆無である。むしろ、水溶液中でのタンパク質分子の構造や機能は、周囲を取りまく多数の水分子により支配されており、気

相でのタンパク質イオンの特性とは大きく異なるという場合もある。しかし、気相タンパク質イオンの研究では、水溶液中では得ることができない、水分子のミクロな役割の詳細な情報を得ることが期待される。また、最近、急速に集積されつつあるタンパク質イオンの質量分析の情報を理解する上でも、本研究で得られる分光学的知見は非常に重要となる。本装置はまた、溶液中での化学現象に重要な役割を果たしている広範な不揮発性イオンの分光にも適用でき、新しい分析手段として、他分野に応用されることが期待される。