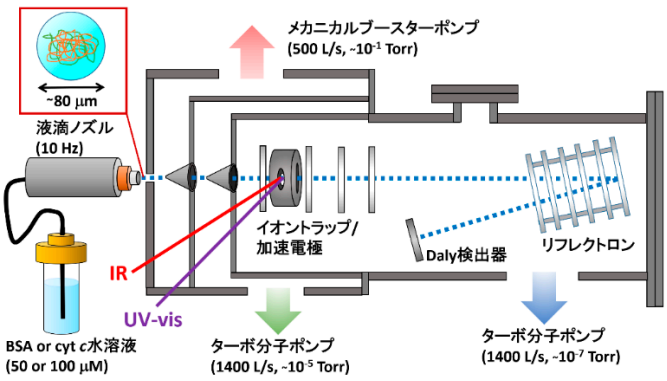
193　気相分光法による変性タンパク質の価数選択的構造解析	浅見　祐也

【目的】生体分子は一般的に生体環境に近い水溶液中で固有の構造と機能を持ち、適材適所でその役割を果たす。この性質はより高次の生体分子であるほど顕著であり、DNA／RNA やタンパク質レベルでは水和状態がその安定構造に強く影響を与える。このような生体分子の水和状態と安定構造の関係を解明する手段として、最近では孤立状態での気相分光法が脚光を集めている。我々も、孤立状態（1 分子レベル）のタンパク質でその水和状態と安定構造の関係を調べるため、液滴分子線赤外レーザー蒸発法と孤立気相分光法を組み合わせた独自の装置開発を行い、ウシ血清アルブミン（BSA）にみられる 3 次構造変化の観測に成功した。しかしこれは、天然状態から変性状態へ化学変性する際に生じる 3 次構造の変化を観測したもので、水和状態がこの 3 次構造変化にどの程度影響しているのかについては十分に考察できていなかった。また観測した BSA イオンの価数は 1 価～4 価が混在した条件となっており、タンパク質の構造変化における価数依存性については測定できていなかった。そこで本研究では新たにイオントラップ電極を作製し、価数選別を行ったタンパク質イオンを標的に脱溶媒和による構造変化を観測した。またタンパク質の変性において、脱溶媒和の効果が変性構造に与える影響をタンパク質イオンの価数ごとに分離して議論することを目指した。

【方法】BSA およびシトクロム *c*（cyt *c*）水溶液（50 および 100 μM）を液滴ノズルより直径～80 μm の液滴として 10 Hz で射出し、試料液滴をそれぞれ独自の気相分光装置（図）に導入した。加速電極部に到達した試料液滴に赤外レーザー光（3,590 cm^{-1}、5.5 mJ/pulse）を照射して液滴中の試料を気相単離した。生成したイオンはパルス電場で加速し、飛行時間型質量分析計を用いて観測した。また本研究では新たに作製したイオントラップ電極を用いて、加速電極部内で 70 ms のイオントラップも行い、価数選択的なイオン信号の観測を試みた。観測したタンパク質イオンの構造解析を行うため、紫外 - 可視レーザー光を照射して光電子脱離収量（PDY）分光法および光解離（PD）分光法を用いた気相スペクトルを測定し、脱溶媒和条件での価数選択的構造解析を行った。

【結果】タンパク質での価数選択的な構造解析を実現させるため、新たなイオントラップ電極を作製して BSA 負イオンのイオントラップ条件を模索した。しかし BSA レベルの巨大生体分子の負イオンでは、赤外レーザー光で加熱された後の冷却過程で多量の熱電子が放出されるため、イオントラップ中で分子内電荷を失い、中性化が進行しやすいことが明らかになった。そこで BSA の代替として正イオンでも観測可能な cyt *c* を用いてイオントラップを行った。その結果、1 価の cyt *c* 正イオンを選択的トラップすることに成功した。またトラップした cyt *c* から解離するヘムイオン（*m*/*z*=546）の信号を用いることで、1 価の cyt *c* 正イオンの PD スペクトルの測定に成功した。量子化学計算との比較を行ったところ、このスペクトルに観測された cyt *c* ヘム中の鉄原子の電子スピン状態はこれまで天然状態で報告されてきた低スピン状態とは異なり、中間状態が支配的であることが明らかになった。また cyt *c* では等電点が高いため、イオントラップ電極を用いずに負イオンを観測すると 1 価の cyt *c* 負イオンを選択的に観測できる。我々は、このイオンに対して PDY 分光法と量子化学計算を適用することで、観測された cyt *c* ヘム中の鉄原子の電子スピン状態は、低スピン状態、中間状態、高スピン状態が 0.3 : 1 : 1 の存在比で分布しており、正イオンとは異なることを明らかにした。

液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた独自の気相分光装置



193. 気相分光法による変性タンパク質の価数選択的構造解析

浅見　祐也

*学習院大学 理学部 化学科

Key words：気相分光，タンパク質，水和，変性，ヘム構造

緒　言

生体中で情報の伝達や機能の発現・調節を担うDNA／RNAやタンパク質は、その構成要素が極めて単純なヌクレオチドやアミノ酸であるにも関わらず、それらが直鎖状に連なることで多様な構造と機能を持つ。一般的に生体分子は水中で機能することから、DNA／RNAやタンパク質のような巨大生体分子は、溶媒和された条件下で正確に機能をできるよう、進化の過程で最適化された安定構造を有している。例えば、タンパク質では分子内に2次構造や3次構造といった特異な構造を持ち、これらの構造変化によって、機能を発現するフォールディング状態と失活しているアンフォールディング状態の2種に分布する［1］。通常、タンパク質が機能を失活するような構造変化（フォールディング状態からアンフォールディング状態への遷移）のことを変性と呼ぶが、この変性を生じる要因としては、1）pH、2）温度、3）圧力、4）溶媒分子との相互作用の有無（界面変性など）、5）変性剤の有無の主に5つが知られている。従来、これらの要素による変性に関して、溶液レベルでの研究が数多く報告されているが、溶液では常に溶媒和された条件であるため、要因4）による変性とその他の要因による変性を分離して観測することは困難である。そこで近年、我々は液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いて、タンパク質レベルの巨大生体分子の構造解析を可能にする気相分光装置を開発した［2〜6］。この方法では、標的のタンパク質は真空中での気相単離の過程を経て効率的に脱溶媒和される。また液滴分子線赤外レーザー蒸発法は、既存のエレクトロスプレーイオン化（ESI）法とは異なり、溶液中での電荷を保持した条件で非破壊的な気化が可能であるため、溶液中の安定構造を極力保持した条件で構造解析を行うことが可能である［6］。これまでの研究で我々は、1価〜4価のウシ血清アルブミン（BSA）負イオンにみられる3次構造変化の観測に成功した［3］。しかしこれは、天然状態から変性状態へ化学変性する際に生じる3次構造の変化を観測したもので、水和状態がこの3次構造変化にどの程度影響しているのかについては十分に考察できていなかった。また観測したBSAイオンは電荷状態が異なるイオン種が混在した条件となっており、タンパク質の構造変化における価数依存性については測定できていなかった。そこで本研究では新たにイオントラップ電極を作製し、価数選別を行ったタンパク質イオンを標的に脱溶媒和による構造変化を観測した。またタンパク質の変性において、脱溶媒和の効果が変性構造にどの程度影響を与えるのかをタンパク質イオンの価数ごとに分離して議論することを目指した。

方　法

要旨内の図に液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた気相分光装置を示した。BSAおよびシトクロム*c*（cyt *c*）水溶液（50および100 μM）を用い、液滴ノズルから10 Hzで試料液滴を射出した。生成された直径〜80 μmの液滴は、真空チャンバーに開けられた小さな穴と二つのスキマーを通過し、イオントラップ／加速電極部まで誘導した。この電極に設置されたリング電極部に液滴が到達した瞬間に赤外レーザー光（3,590 cm^{-1}、5.5 mJ/pulse）を照射し、液滴中の試料タンパク質イオンを気相単離した。生成したイオンは飛行時間型質量分析を経て検出した。またこの時、リング電極内で生成された気相イオンに高周波電圧（RF）を印加することで、標的タンパク質イオンを価数選択的にイオントラップした。これまでの研究により、正イオンであればタンパク質のイオントラップに既に成功しているが［2, 6］、等電点が低く水溶液中で負イオンが支配的なBSAではイオントラップが困難であった。そこで本研究では、リング電

*現在の所属：日産化学株式会社 物質科学研究所 解析研究部

極の内径を変化させて、BSA 負イオンを効率的にトラップできるリング電極を作製した。結果的に BSA 負イオンは作製したリング電極を用いてもイオントラップが困難であったため、代替として 1 価の cyt *c* 正イオンを 70 ms 間イオントラップした。その後、紫外 - 可視レーザー光（370～440 nm、1.3～6.8 mJ/pulse）を照射し、解離信号として観測されるヘムイオンを利用した光解離（PD）スペクトルを測定した。この時、cyt *c* は分子量が約 12,000 と極めて大きいため、質量が 546 のヘムイオンと同時に 1 台のオシロスコープ上でモニターすることは困難であった。そこで新たに高分解能で応答が早いオシロスコープ（ローデシュワルツ社製 RTA4004）を導入し、トラップした cyt *c* イオンと解離したヘムイオンの信号を同時観測しながら PD スペクトルの測定を行った。得られたスペクトルに観測された cyt *c* ヘム構造を決定するため、Gaussian09 を用いて量子化学計算を行い、ヘム構造の安定性および TD-DFT レベル（B3LYP/cc-pVDZ レベル）の垂直励起エネルギーとその振動子強度を見積もった。また観測された cyt *c* ヘム構造の価数依存性を調べるため、イオントラップ電極を取り外した条件で 1 価の cyt *c* 負イオンを選択的に観測した［4］。このイオンに紫外-可視レーザー光（370～440 nm、0.4～2.7 mJ/pulse）を照射し、脱離する光電子を利用した光電子脱離収量（PDY）スペクトルを測定した［4］。また正イオンと同様に、量子化学計算を用いて負イオンでのヘム構造の安定性および同レベルの TD-DFT 計算を行った。

結果および考察

1. タンパク質負イオンの価数選択的なイオントラップを実現するリング電極の作製

これまで用いていたリング電極は内径が 20 mm であったが、タンパク質レベルの巨大分子をイオントラップする場合には十分なピーク間電圧で RF を印加する必要がある。このとき印加する RF の電圧上限は用いる電源の性能で決まってしまうため、リング電極の内径を小さくすることで電場強度の可変領域を増やすことを試みた。図 1 に示すように、本研究で作製したリング電極の内径は 10 mm と従来の半分の大きさとした。また従来のイオントラップ条件を極力崩さないようにするために、リング電極の側面に開けたレーザー照射のための穴の内径も従来の半分の大きさ（2 mm）とした。作製したリング電極を用いて BSA 負イオンのイオントラップを試みたところ、価数選択的な BSA のイオン信号は観測できなかった。これはタンパク質レベルの巨大な負イオンでは、気相単離後の冷却過程で多量の熱電子を放出するため、急速に分子内電荷を失ってイオントラップ条件から外れてしまうことに由来すると結論した。

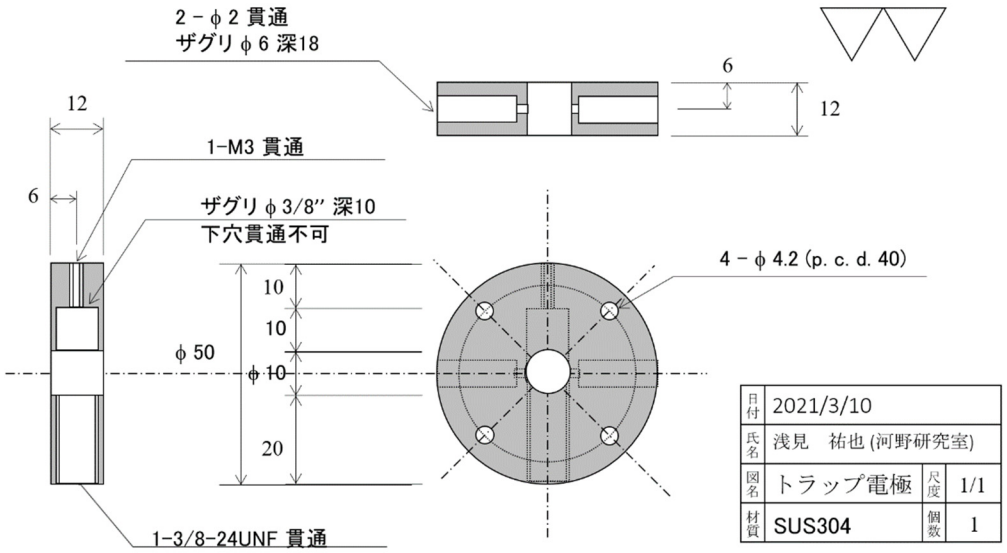


図 1. 新たに作製したイオントラップ用リング電極の図面
要旨に記載した図中のイオントラップ／加速電極部に設置した。

2. 気相 1 価 cyt *c* 正／負イオンの価数選択的なヘム構造解析

リング電極の改良で BSA 負イオンのイオントラップを実現することは困難であることが分かったため、標的とするタンパク質を cyt *c* に変更することにした。cyt *c* の等電点は 10.5 と塩基側に偏っているため、水溶液中で分布する cyt *c* の負イオンは主に 1 価が支配的となる［4］。従って、cyt *c* では 1 価の負イオンのみを観測する場合にはイオントラップ電極を外した条件で測定し、正イオンに対してはイオントラップ電極を用いて測定することで価数選択的な測定が実現できる。実際に測定を行ったところ、イオントラップ電極を外した条件では 1 価の cyt *c* 負イオンが顕著に観測された［4］。また正イオンでは、イオントラップ電極に最適な RF（116.1 kHz、940 V_{pp}）を印加して 70 ms のトラップを行ったところ 1 価の cyt *c* 正イオンを選択的に観測することに成功した。またこの正イオンに対して、紫外 - 可視レーザー光（370～440 nm、1.3～6.8 mJ/pulse）を照射することで cyt *c* から解離したヘムイオン（*m*/*z*=546）を観測した。またレーザー光強度依存性の測定から、このヘムイオンの解離は 2 光子吸収過程で生じていることが分かった。図 2a にこのヘムイオンを利用して測定した PD スペクトルを示した。またこのスペクトルに観測されている cyt *c* ヘム構造を決定するため、量子化学計算を行って、構造の安定性と TD-DFT レベルの垂直励起エネルギーの振動子強度パターンを見積もった。この時、cyt *c* ヘム内にある鉄原子の価数は天然状態では 3 価であることが分かっているため、本研究では鉄原子の価数は 3 価に固定して、電子スピン状態のみを変化させて計算を行った。従来より、ヘム中に存在する 3 価の鉄原子には低スピン状態（LS、*S*=1/2）、中間状態（IS、*S*=3/2）、高スピン状態（HS、*S*=5/2）が知られているため、これらの相対エネルギーを見積もって、構造の安定性を比較した。その結果、図 2a のカッコ内に示すように IS が最安定のスピン状態であることが分かった。また 402 nm よりも短波長側で測定される PD スペクトルの形状が、IS で計算される振動子強度パターンと非常によく一致している。従って、1 価の cyt *c* 正イオンで観測されるヘム内の鉄原子の電子スピン状態は IS に帰属できる。また 402 nm よりも長波長側の領域では実験的にはピークを観測できなかった。これはこの波長領域では励起レーザー光の光子エネルギーがヘムの解離ポテンシャルに到達していない可能性を示唆している。

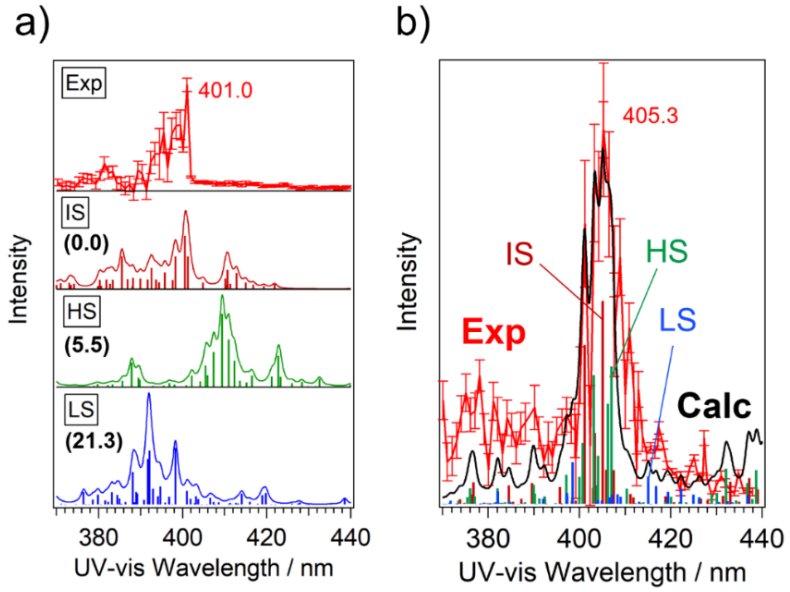


図 2. 気相 1 価 cyt *c* 正イオンの PD スペクトルおよび TD-DFT 計算による振動子強度パターン（a）、気相 1 価 cyt *c* 負イオンの PDY スペクトルおよび TD-DFT 計算による振動子強度パターン（b）

a） カッコ内に各電子スピン状態の安定性を相対エネルギー（kJ/mol）で示した。

b） 黒の実線は各電子スピン状態（LS : IS : HS=0.3 : 1 : 1）の振動子強度パターンをローレンツ関数で畳み込んだ計算値を示した。

一方、1 価の cyt *c* 負イオンからは紫外 - 可視レーザー光（370～440 nm、0.4～2.7 mJ/pulse）を照射することで cyt *c* から脱離した光電子を観測した。またレーザー光強度依存性の測定から、この光電子の脱離も 2 光子吸収過程で生じていることが分かった［4］。図 2b にこの光電子を利用して測定した PDY スペクトルを示した。得られたスペクトルに観測されている cyt *c* ヘム構造を決定するため、正イオンと同様の量子化学計算を行った。この計算ではヘム構造の末端にあるカルボン酸基を脱プロトン化させることで負イオンの計算条件とした。各電子スピン状態で得られた相対エネルギーを比較したところ、IS と HS が同レベルで安定なスピン状態であることが分かった。そこで、実験的に観測された各電子スピン状態の存在比を LS : IS : HS＝0.3 : 1 : 1 として TD-DFT 計算で得られた振動子強度パターンの畳み込みを行ったところ、図 2b に示すように実験値と計算値が極めて良く一致することが分かった。従って、1 価の cyt *c* 負イオンで観測されるヘム内の鉄原子の電子スピン状態は主に IS と HS であると帰属できる。

以上の結果は、1 価の cyt *c* 正／負イオンにおいてヘム内の鉄原子の電子スピン状態が両者で異なっており、電子スピン状態の安定性には cyt *c* の分子内電荷が深く関与していること意味している。量子化学計算の結果、この cyt *c* 分子内電荷依存性は気相および水溶液条件の両者で同様の傾向がみられていることから、cyt *c* の水和状態とは独立した性質である。従って、本研究成果は cyt *c* の分子内電荷がそのヘム構造の安定性に影響を与えることを初めて明らかにした一例として位置づけられる。また本研究で観測した cyt *c* イオンの気相構造は、水和状態が極めて希薄であるという意味で界面変性状態に類似する構造と考えられる。しかし量子化学計算の結果、ヘム構造の安定性としては気相と水溶液との間で顕著な差はみられなかった。このことは、天然状態から界面変性状態へとペプチド骨格構造が変化しても、ヘム構造には大きな影響を及ぼさないことを意味している。現在、気相中においてタンパク質のペプチド骨格の二次構造がどの程度変化しているのかを調べるため、気相円偏光二色性（CD）スペクトルの測定を行っている。この気相 CD スペクトルの測定には、照射する励起レーザー光の左／右円偏光を高速で切り替えて測定する必要があるため、新たに光弾性変調器（PEM）を導入して 5 Hz で CD 信号を取得する改良を進めている。この実験条件が整えば、変性タンパク質を標的に価数選択的な 2 次構造解析が実現できると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、学習院大学理学部化学科河野研究室の水村華子、鈴木千裕、北崎陽寛、河野淳也教授の 4 名である。ここに厚く御礼申し上げる。

文　献

1） Parker MJ, Sessions RB, Badcoe IG, Clarke AR, The development of tertiary interactions during the folding of a large protein, Folding Design 1996 Mar 11;1(2):145-56. Epub 1996 Mar 11. PMID: 9079374. DOI: 10.1016/S1359-0278(96)00023-5.

2） Asami H, Kitazaki A, Kawauchi N, Kohno J, Gas-phase resonance Raman spectroscopy combined with IR-laser ablation of a droplet beam: Local structural analysis of myoglobin, J Phys Chem A. 2020 Nov 12;124(45):9464-9469. Epub 2020 Oct 30. DOI: 10.1021/acs.jpca.0c08058

3） Kitazaki A, Hasegawa T, Asami H, Kohno J, Chemical denaturation of gas-phase albumin ions studied by photoelectron detachment yield spectroscopy and infrared laser ablation of droplet beams, Chem Phys Lett. 2021 May 16;771:138512. Epub 2021 May 16. PMID: not assigned. DOI: 10.1016/j.cplett.2021.138512

4） Asami H, Suzuki C, Kitazaki A, Kohno J, Gas-phase heme structure of the singly charged cytochrome c anion produced by IR-laser ablation of a droplet beam, Chem Phys Lett. 2021 Oct 16;781:138999. Epub 2021 Oct 16. PMID: not assigned. DOI: 10.1016/j.cplett.2021.138999

5） Asami H, Kawauchi N, Kohno J, Photodissociation spectroscopy of protonated guanosine monophosphate based on IR-laser ablation of droplet beam and quadrupole ion trap mass spectrometry, Chem Phys Lett. 2019 Feb 19;720: 119-123. Epub 2019 Feb 19. PMID: not assigned. DOI: 10.1016/j.cplett.2019.02.007

6) Asami H, Kawauchi N, Kohno J, Gas-phase hydration of the lysozyme ion produced by IR-laser ablation of a droplet beam studied by photodissociation and fluorescence spectroscopy, J Mass Spectrom. 2021 Apr;56(4):e4620. Epub 2020 Jul 28. DOI: 10.1002/jms.4620