

タンデム質量分析計と蛋白質の一次構造解析



下西 康 嗣*

はじめに

筆者らは、12-3年前、質量分析法と化学的あるいは酵素的分解法とを組合せて混合物のままペプチドのアミノ酸配列を決定する方法を考案した^{1),2)}。筆者はその概要を本誌 Vol.33 No.2 (1981年)の研究ノートに“蛋白質の新しい一次構造決定法”と題して寄稿した。当時、質量分析法によって、分子量が2,000ぐらいまでのペプチドの分子イオンシグナルを検出するのがやっとで、その小文では蛋白質のアミノ酸配列を決定するためには分子量が3,000あるいはそれ以上のペプチドの分子イオンを検出できるようになることが望ましいと指摘した。1980年代中頃になって数々の注目すべき質量分析技術が開発され、最近では、分子量数千のポリペプチドはおろか、分子量2-3万の蛋白質では±1-2uの精度で、また、分子量10万以上の蛋白質(スペクトル上には多価イオンのシグナルとして観測される)でも、その分子イオンが検出できるようになっている³⁾。もっとも、質量分析法によって蛋白質の一次構造すなわちアミノ酸の配列順序を決定するためには蛋白質の分子イオン(分子量)を検出するだけでは不十分で、蛋白質あるいはその断片であるペプチドを構成する成分のイオンシグナルを検出しなければならない。本小文では、ペプチドを開裂させて、生成されるフラグメントイオンを検出し、蛋白質のアミノ酸の配列順序を決定する方法として、最近多用されるようになりつつあるタンデム質量分析法について概略を紹介する。また、筆者らが最近提案した¹⁸O置換ペプチド

のB/E linked scan(磁場(B)と電場(E)の強さの比を一定にして操引する方法)によるペプチドのアミノ酸配列決定法⁴⁾についても若干つけ加えることにする。

タンデム質量分析計とは?

蛋白質の分子量の測定やアミノ酸配列の解析には、二重収束(double-focusing)、四重極(quadrupole)、飛行時間型(time-of-flight)、FT(fourier transform)などといった質量分析計が使われる。それぞれの装置には一長、一短があり、測定する物質の性質、測定する目的などに応じて使い分けられる。最近、二重収束質量分析計あるいは四重極質量分析計を二台あるいはそれ以上連結させた装置、いわゆるタンデム質量分析計が蛋白質やペプチドのアミノ酸配列の解析に多用されるようになってきている。図1に1例として二重収束質量分析

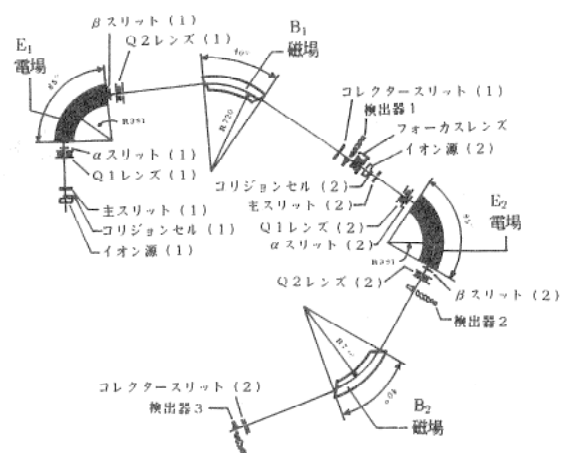


図1 4-sector 磁場型質量分析計(EBEB)の概略図

計を二台連結させた4-sector 磁場型質量分析計の概要を示す。4-sector 磁場型質量分析計としては、ここに示した電場(E) 磁場(B) 電場(E) 磁場(B)の配置をもつものの他に、そ

* 下西 康嗣 (Yasutsugu SHIMONISHI), 大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学部門, 教授, 理学博士, 蛋白質化学

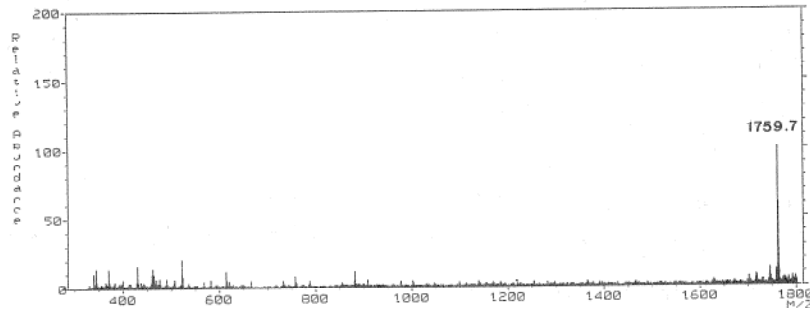


図2 レニン基質の fast atom bombardment 質量スペクトル

の逆配置型である BEBE あるいは正配置と逆配置を組合せた BEEB 分析計も使われている。それらには、イオン源、検出計などを装着するときの都合、不都合の差が若干あるものの、分析計本体の性能に大差はない。磁場型質量分析計では測定する質量は磁場の強さと半径とに依存するが、磁場の材質には制限があり、大きな質量を測定しようとするとき、磁場 (B) 半径を大きくする必要があり、図 1 に示した装置は磁場の半径が 72cm で市販の分析計としては最大級である。イオンの加速電圧 10kV のときに測定される最大質量は 14,000 で、加速電圧を 5 kV に下げると 28,000 まで到達できる。タンデム質量分析計は、第 1 質量分析計 (MS-1) と第 2 質量分析計 (MS-2) (図 1 では、それぞれ E_1B_1 と E_2B_2 に相当する) が独立した分析計として機能するが、MS-1 と MS-2 との間の自由空間に collision cell (図 1 ではコリジョンセル(2)) が設けられている。MS-1 を通過したペプチドの分子イオンを親イオンとして、この collision cell 内で He などのガスと衝突させ分解し (これを collision induced dissociation (CID) または collisionally activated dissociation (CAD) という)、生成したフラグメントイオン (娘イオン) を MS-2 に導き、それらのシグナルを検出する。すなわち、MS-1 にてペプチドの分子イオンを、MS-2 にてそのフラグメントイオンのシグナルを検出する。フラグメントイオンの質量数からペプチドのアミノ酸配列を決定する。また、質量分析計 (MS) を何台も連結させることが理論的に可能であり、最近、親イオンを開裂させ娘イオンを、さらに娘イオンから孫イオンを生成し、検

出する MS/MS/MS (MS^3 とも記す) スペクトルが測定されるようになってきている。

質量スペクトルとアミノ酸配列

蛋白質のアミノ酸配列順序を決定するためには、通常、先ず、蛋白質をトリプシンなどの酵素によって消化し、ペプチド断片とする。ついで、蛋白質の酵素消化物を測定する。タンデム質量分析計では、第 1 質量分析計 (図 1 においては E_1B_1) の検出計において、消化物中に存在するペプチドの分子量に相応するイオンのシグナルを観測する (図 2 は単一ペプチドの質量スペクトル)。もっとも、蛋白質の酵素消化物中に多種のペプチドが存在する場合、それらの全てのシグナルが検出できないこともある。第 1 質量分析計において 1 つのペプチドのイオンを選択し、それを親イオンとして、collision cell でフラグメントイオンを生成し、第 2 質量分析計にて観測する。図 3 に図 2 で検出される

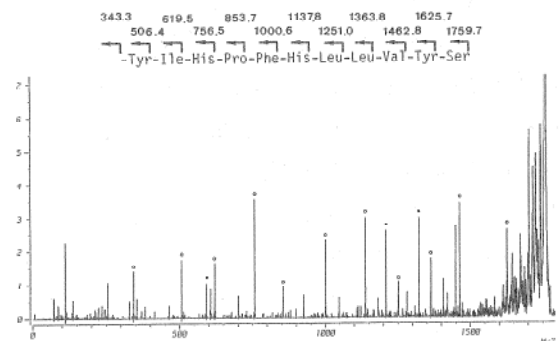


図3 図2に測定された $m/z=1759.7$ のタンデム質量スペクトル (○印はアミノ酸配列を決定するフラグメントイオンのシグナル、■印はアミノ酸側鎖の脱離に由来するシグナル)

$m/z=1759.7$ をもつイオンから生成したフラグメントイオンの質量スペクトルを示す。フラグメントイオンの質量数から、このペプチドのアミノ酸配列はN-末端部分に相当する幾つかのアミノ酸配列を除き、図3に示したように決定される。タンデム質量分析計では、第1質量分析計を通過したペプチドの分子イオンは、その同位体イオンとは完全に分離されて単一なイオンとしてCIDを行なうことができる、それから生成されるフラグメントイオンも同位体を含まない。従って、フラグメントイオンは容易に同定される。

一方、MS-1のみからなる質量分析装置(図1ではE₁B₁)においては、イオン源と分析計との間の自由空間(図1のコリジョンセル(1))にHeなどのガスを通じ、イオン源から出た親イオンと衝突させ、磁場の強さと電場の強さの比を一定に保ちながら、質量を掃引することによってフラグメントイオンを検出する方法(B/E linked scan)が使われる。この方法においても図3に示したような質量スペクトルを観測することはできるが、親イオンを単一イオンとしてとらえることは難しく、そのシグナルの前後数質量のイオン群から生成するフラグメントイオンを検出することになり、上述のタンデム質量スペクトルと比較して、より複雑なノイズの多い質量スペクトルを測定することになる。最近、筆者らは蛋白質をH¹⁸Oを含む緩衝液中で消化し、ペプチドのC-末端に¹⁸Oを部分的に導入して、フラグメントイオンを同定する方法を考案した⁴⁾。この方法によれば、ペプチドのC-末端カルボキシル基に約半量の¹⁸Oが導入されると、C-末端を含むフラグメントイオンのシグナルは¹⁶O由来と¹⁸O由来のイオンを約半量ずつ含む同位体分布を示す。一方、N-末端を含むフラグメントイオンのシグナルは¹⁸Oを含まない通常同位体分布を示す故に、C-末端由来フラグメントイオンのシグナルとは容易に区別できる。図4に、このようにして測定したペプチドのB/E linked scan スペクトルの1例を示す。この方法はペプチドのB/E linked scan スペクトルの解釈を容易にするとともに、タンデム質量スペクトルの測定にも

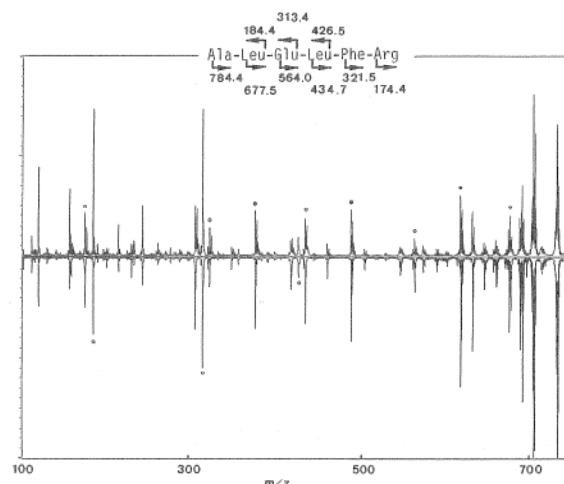


図4 マッコウクジラミオグロビントリプシン消化ペプチドのB/E linked scan スペクトル(上はH¹⁸Oを含む緩衝液中で、下はH¹⁸Oを含まない緩衝液中で消化後、得られたペプチド)。

利用できるので、ペプチドのアミノ酸配列を決める有効な手法になるものと思われる。

問題点と今後の展望

上述のように、タンデム質量分析法は、蛋白質の酵素消化物を分離することなく、直接アミノ酸配列を決定できる簡便な方法である。しかしながら、図3の例にも見られるように、ペプチドのアミノ酸配列を完全に決定できるに足るフラグメントイオンが観測されない場合もある。特に、Heガスと衝突させるCIDではフラグメントイオンが観測されるのはペプチドの分子量が1,500-2,000ぐらいまでのことが多い。最近、レーザーによるペプチドの開裂についての研究も進められているが、分子量の大きなペプチドのより有効な開裂法が必要である。

タンデム質量分析法では、親イオンのシグナルの約50%を目処として開裂させ、フラグメントイオンを測定するが、フラグメントイオンの生成、捕捉率が必ずしも充分でない。そのために、アレー検出器を装着させた方法もとられている。筆者らは、MS-1とMS-2で検出されるイオンをコンピュータにより自動的に捕捉するシステムを現在試作中であるが、生体成分の構造解析には、時代とともに微量分析法が要求され、MS-1、MS-2ともに効率的なイオ

ンを検出する方法を発展させることが今後の課題である。

文 献

- 1) Y. Shimonishi et al. : Chemistry Lett. (1979), 1369.
- 2) Y. Shimonishi et al. : Eur. J. Biochem., 112 (1980) 251.
- 3) J.B.Feng et al. : Mass Spectrom. Rev., 9 (1990) 37.
- 4) T.Takao et al. : Rapid Commun. Mass Spectrom., 5 (1991) 312.

