実験技術

FAB 質量分析の実際とペプチド・蛋白質 一次構造解析への応用

高尾 敏文
阪大・蛋白研・蛋白質有機化学
下西 康嗣

1. はじめに

近年、質量分析法の発展には目ざましいものがあり、質量分析計の光学系の改良はもとより、新しいイオン化法の開発により多種多様の構造を有する生体物質の構造解析が可能になってきている。その中で、高分解能質量分析計と組み合わせた Fast Atom Bombardment (FAB) 質量分析法¹⁾は生体試料の分子量決定はもとより、それらの構造解析に広く用いられている手法である。特に、蛋白質、ペプチドの一次構造解析においては、DNA 塩基配列から推定された蛋白質のアミノ酸配列の証明^{2),3)}、遺伝子組換え蛋白質の同定^{4),5)}、組換え蛋白質の品質管理、蛋白質翻訳後修飾の解明^{6),7)}に有効である。また、最近では、一台あるいは2台の質量分析計(タンデム質量分析計)を用いた衝突活性化開裂(collisionally activated dissociation (CAD)) / linked-scan 法によるペプチドのアミノ酸配列決定⁸⁾が盛んに行われるようになり、従来からの化学的手法とはことなる新規な一次構造解析法として注目を集めている。ここでは、FAB 質量分析法について概説するとともにその応用について筆者らの最近の研究を中心に述べる。

2. FAB 質量分析

図1にFABイオン源を装着した二重収束質量分析計の概略を示す。その構成は、イオン源、電場、磁場、検出器の4つの部分から成り、測定可能な質量範囲は主に質量分析部の加速電圧、磁場回転半径等に依存する。(現在日本電子(株)から市販されている大型二重収束質量分析計(JMS-HX110)では、磁場半径72cm、加速電圧10kVで到達質量は14,000である。)FABイオン化法では、イオン銃で、6keVほどで加速した中性原子(キセノン等)をターゲット上に塗布した試料

図1 FAB 質量分析計の概略図。

とグリセリン等のマトリックスの混合物に照射することによりイオンを発生させ、装置の極性により正イオン(NH^+)ないし負イオン(MH^-)として質量分析部に導かれる。試料は約 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で揮発性の溶媒に溶かし、1回の測定には、ペプチドでは、約 $10-100\text{pmol}$ の試料を必要とする。

また、精密質量分析では、測定試料と質量校正用標準物質(ポリエチレングリコール等)を一度に測定し、標準物質の計算値をもとに試料の精密質量を求める。この際、通常の測定における磁場挿引法より直線性の良い電場挿引法を用いることで精度の高い測定を行なう。測定誤差は、試料の分子量、ピークのS/N比、装置の性能などによって異なるが、質量2000以下でおおよそ $\pm 5-10\text{mu}$ である⁷⁾。

CAD/linked-scan 法による測定では、イオン源部で発生したイオンをフォーカスレンズ直後のコリジョンセル内でヘリウム等の中性ガスに衝突させることによって一部分解し、分析部の電場の強さ(E)と磁場の磁束密度(B)の比を一定に保ちながら両者を挿引する測定法(B/E linked-scan 法)により、特定の質量のペプチドから生成したフラグメントイオンのみを検出する。この測定では、一般に、通常の測定に比べ多くの試料(100pmol 程度)を必要とし、また、測定可能な質量範囲は、現在、おおよそ 2500u までに限られる。

3. 蛋白質、ペプチドの一次構造解析

蛋白質、ペプチドの質量分析による一次構造解析の流れを図2に示す。まず、蛋白質は基質特異性の高い酵素で消化し、さらに、混合物のままエドマン分解やカルボキシペプチダーゼ(CPase)による消化を行ったものも必要に応じて調整し、質量分析によりそれらの質量スペクトルを測定する。分子量が大きい(40kDa 程度)蛋白質の酵素消化物の測定では、構成ペ

Application of fast atom bombardment mass spectrometry to analysis of protein primary structures.

Toshifumi TAKAO, Yasutsugu SHIMONISHI

Institute for Protein Research, Osaka University

図2 質量分析によるペプチド・蛋白質の一次構造解析.

ブチドの数が多くなり複雑な質量スペクトルを与え、また、高分子量ペプチドも含まれていることもあるので、あらかじめ高速液体クロマトグラフィー等により各々のペプチドを単離した後に測定を行うのがよい。観測された全てのシグナルの数値を、アミノ酸組成、あるいは、DNA塩基配列から推定されたアミノ酸配列をもとに、コンピューターにより帰属、同定し、アミノ酸配列の決定を行う。分子内ジスルフィド結合を持つ蛋白質の酵素消化物の測定では、ジスルフィド結合を保持したペプチドと測定の際にジスルフィド結合が部分的に開裂して生じるフラグメントイオンが同時に観測されることがあり、その場合は、分子内ジスルフィド結合の位置も決定することができる。また、最近では、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析⁹⁾ により、高分子量蛋白質の分子量を直接求めることも可能であり、上の解析と併用すればより確実な結果を得ることができる。一方、単一ペプチド、あるいは、単純なペプチド混合物の場合、CAD/linked-scan

法によりフラグメントイオンを直接観測することでアミノ酸配列の決定が行える。

また、一連の質量スペクトルの解析において帰属できないシグナルが観測された場合は、高分解能 FAB 質量分析によりその精密質量を測定する。観測された精密質量から、すでにアミノ酸組成、あるいは、アミノ酸配列より同定されている部分を差し引くことで未知修飾基の精密残基質量を算出し、この値を使ってコンピューターにより可能な元素組成を割り出し、未知物質の化学構造の推定を行なう。

以下に幾つかの応用例を示す。

4. 遺伝子組換え蛋白質の一次構造の同定

遺伝子組換え技術により産生された蛋白質の多くは、DNA塩基配列を調べることによってそのアミノ酸配列の確認は行われているが、蛋白質の産生過程においては修飾を受けた蛋白質もしばしば生成することも知られており、最終的に分離される蛋白質の一次構造は同定する必要がある。FAB質量分析による蛋白質酵素消化物の質量分析は、簡便かつ確実で、一次構造の同定のみならず目的蛋白質の最終生産条件の検討に有効な手段になると考えられる。図3に、遺伝子組換え技術によって大腸菌で産生されたヒトインターフェロン- α Aのトリプシン消化物の FAB 質量スペクトル⁵⁾を示した。観測されたシグナルをコンピューターを用いて、cDNA塩基配列から推定されているヒトインターフェロン- α Aのアミノ酸配列に帰属することにより、一次構造の同定を行った。

5. CAD/linked-scan 法によるペプチドのアミノ酸配列決定

CAD/linked-scan 法では、FABイオン化において生成するイオンに、さらに中性ガスを衝突させ、特定

図3 大腸菌で産生されたヒトインターフェロン- α Aのトリプシン消化物の FAB 質量スペクトル⁵⁾.

の質量をもつペプチドの分子内の種々の化学結合を切断して生成するフラグメントイオンを選択的に測定することができる。従って、同じ様式で切断を受けたフラグメントイオンの質量を関連づけることにより、もとのペプチドのアミノ酸配列を決定できる。フラグメントイオンは、一般に、切断される位置により図4に示すように命名されているが¹⁰⁾、観測されるフラグメントイオンの種類、生成イオン量はペプチドの性質によってかなりの差がある。

図5に免疫グロブリンL鎖の *Achromobacter* プロテアーゼ消化物から単離したペプチドの CAD/linked-scan スペクトルを示した。主に、y, b シリーズのフラグメントイオンが観測され、それらの質量差（アミノ酸の残基質量に相当する）をもとに、観測されたシグナルをペプチドのN末端（Thr-Ser-Thr-Ser-）、及び、C末端（-Thr-Ser-Pro-Xle-Val-Lys）からのアミノ酸配列に帰属することができ、もとのペプチドのアミノ酸配列を Thr-Ser-Thr-Ser-Pro-Xle-Val-Lys と決定した¹¹⁾。（Xle は Leu または Ile を意味し、これら2つのアミノ酸残基質量は同じなのでこのスペクトルで

は区別できないが、測定条件等を変えることでアミノ酸側鎖で切断されたフラグメントイオンも観測される場合があり、その際は判別可能である。）

最近、フラグメントイオンをより明確に解析する目的で、2台の質量分析計を連結したタンデム質量分析法がしばしば用いられている。基本的に得られるデータは同様に解釈できるが、分解するもとのイオンを第一質量分析計でより厳密に選択できるという点で異なる。

6. 蛋白質翻訳後修飾基の構造決定

蛋白質翻訳後修飾基は多種多様の構造を有しており、従来の蛋白質化学的手法のみではそれらの構造を予想することは困難な場合が多い。近年、特に、糖蛋白質中の糖鎖の解析^{12), 13)} や遺伝子組換え蛋白質の生産過程で生じる副産物の修飾様式の解明⁵⁾ に FAB 質量分析が盛んに用いられているが、質量分析においては、修飾基の化学的性質にほとんど左右されることなく分子量の情報が確実に得られ、それをもとに修飾基の構造を推定することができる点で極めて有効な手段といえる。しかし、通常の質量分析では、小数点以下1桁目までの精度の質量しか得られないため、その数値から直接修飾構造を予想することは困難なことが多いが、高分解能質量分析では小数点以下3桁目までの測定が可能になり、修飾基を含むアミノ酸、あるいは、ペプチドの精密質量を求めることができる⁷⁾。従って、それをもとに修飾基の構造を直接反映する元素組成を得ることができるので修飾構造の推定がより容易に行える。以下、ウシ網膜 GTP 結合蛋白質（トランスデュシン） γ サブユニットにおける修飾構造の解析¹⁴⁾ について述べる。

図4 CAD/linked-scan 法におけるペプチドのフラグメンテーション¹⁰⁾。

Thr-Ser-Thr-Ser-Pro-Xle-Val-Lys (204 - 211)

図5 免疫グロブリンL鎖の *Achromobacter* プロテアーゼ消化物から単離したペプチド (204-211) の CAD/linked-scan スペクトル¹¹⁾。

を化学合成し、天然物から得られたペプチドと比較同定することによりこの修飾構造の決定を行った。

7. おわりに

FAB 質量分析によるペプチド、蛋白質の一次構造解析は、従来法とは異なり、質量という物理量をもとに行えるので、得られる結果が明確であり、また、高分解能質量測定では元素組成の情報が得られることから、化学的手法では困難であったペプチド、蛋白質中の翻訳後修飾の構造解明にも有効である。今後、さらに、天然から得られた超微量 (fmol) の蛋白質のアミノ酸配列決定を可能にするためには、測定試料の微量化が不可欠であり、イオン化効率や検出感度等の向上による質量分析装置の一層の発展が期待される。また、ここでは詳しく述べることができなかったが、質量分析計を2台連結して行なうタンデム質量分析法によるペプチドのアミノ酸配列決定、ESI 質量分析計による蛋白質の分子量測定、そして、高速液体クロマトグラフィーと直結した FAB あるいは ESI 質量分析計を用いた分離、測定の自動化による分析時間の短縮、測定試料の微量化など、今後、蛋白質一次構造解析において、これらの新しい質量分析技術の利用も増えてゆくものと思われる。

文 献

- 1) Barber, M., Bordoli, R. S., Sedgwick, R. D., Tyler, A. N. (1981) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 325-327.
- 2) Takao, T., Hitouji, T., Shimonishi, Y., Tanabe, T., Inouye, S., Inouye, M. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6105-6109.
- 3) Gibson, B. W., Biemann, K. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 1956-1960.
- 4) Fukuhara, K., Tsuji, T., Toi, K., Takao, T., Shimonishi, Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10487-10494.
- 5) Takao, T., Kobayashi, M., Nishimura, O., Shimonishi, Y. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 3541-3547.
- 6) Carr, S. A., Biemann, K. (1984) *Methods in Enzymology*, ed. by Wold, F., Moldave, K., Academic Press, London **106**, 29-58.
- 7) Takao, T., Yoshino, K., Suzuki, N., Shimonishi, Y. (1990) *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **19**, 705-712.
- 8) Biemann, K., Martin, S. A. (1987) *Mass Spectrom. Rev.* **6**, 1-76.
- 9) Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. *Science* **246**, 64-71.
- 10) Roepstorff, P., Fohlman, J. (1984) *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601.
- 11) Takao, T., Hori, H., Okamoto, K., Harada, A., Kamachi, M., Shimonishi, Y. (1991) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**, 312-315.
- 12) Carr, S. A., Roberts, G. D. (1986) *Anal. Biochem.* **157**, 396-406.
- 13) Nishimura, H., Kawabata, S., Kisiel, W., Hase, S., Ikenaka, T., Takao, T., Shimonishi, Y., Iwanaga, S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20320-20325.
- 14) Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Aki-no, T., Shimonishi, Y. (1990) *Nature* **346**, 658-660.
- 15) Fukada, Y., Ohguro, H., Saito, T., Yoshizawa, T., Aki-no, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 5937-5943.