COMMENTARY

重水素交換と MS を組み合わせたタンパク質
の高次構造解析Probing the Higher Order Structure of Proteins by Hydrogen/
Deuterium Exchange and Mass Spectrometry明石知子^{*a)}・瀧尾擴士^{a)}

Satoko AKASHI and Koji TAKIO

(Received September 24; Accepted October 14, 1999)

In order to understand the protein function in detail, it is important to have information on tertiary structure of the protein. Protein tertiary structure has generally been studied using X-ray crystallography and NMR. However, these techniques require a large scale sample preparation. On the other hand, mass spectrometry requires a smaller sample amount and is much faster than X-ray crystallography or NMR. These are great advantages of MS in the structural characterization of a protein. In the present commentary, it will be described how to study the tertiary structure of proteins using hydrogen-deuterium exchange in conjunction with mass spectrometry.

1. はじめに

生体において、タンパク質は、糖質や脂質に比べると量や種類が多いだけでなく、その機能が多様化しているという大きな特徴をもっている。生体の構造を形成する成分としての役割はもちろん、情報伝達、反応触媒、物質輸送、生体防御などの役割を担っている。タンパク質は、DNAの遺伝情報に基づいてアミノ酸が並べられた（一次構造の形成）後、シグナルペプチドの除去やアシル基、糖鎖、リン酸などの結合といった翻訳後修飾を受けるとともに一定の高次構造（コンフォメーション）をとることによって、初めて機能を発揮することができる。すなわち、機能の発現には高次構造の形成が密接に関係している。

ゲノムプロジェクトの進行に伴い、多くの生物種の全ゲノム解析が極めて速い速度で進められている。ゲノム情報からタンパク質の構造や機能に関する情報を得ようという研究は進められているものの、今のところ確実に得られる情報は一次構造までであり、ゲノムの情報からタンパク質の高次構造や機能を決定することは現在では不可能である。タンパク質の機能に密接に関係する高次構造を研究する方法として、現在用いられているのは、タンパク質の X 線結晶解析か NMR で解析する方法である。しかしながら、これらの方法で解析を行うためには、タンパク質の大

量発現系を確立して比較的多くの量のタンパク質を精製する必要がある。また、X 線結晶解析では結晶化することが第一条件であり、NMR では高濃度の試料溶液の調製や安定同位体標識を必要とすること、また測定可能な分子量の上限があるなどの制約も多い。これに対し、質量分析法 (MS) は、近年の装置の進歩により、必要とする試料量が X 線結晶解析や NMR 法に比べるとはるかに少なく、測定から構造情報が得られるまでの時間は極めて短い。質量分析の利点を活かして、タンパク質の高次構造を解析する方法としては、大きく二つに分けられる。一つは、高次構造を変化させないような条件で、タンパク質側鎖の特定の官能基について特異的な反応で化学修飾を行う方法であり、もう一つは、タンパク質の主鎖のアミド水素の重水素交換 (H/D 交換) を用いる方法である。ここでは後者について、最近の研究動向を中心に解説する。

2. タンパク質のアミド水素の H/D 交換反応
で得られる情報

タンパク質の表面に存在するアミノ酸側鎖のアミノ基、カルボキシル基、水酸基、アミドなどヘテロ原子に結合している水素は、重水に溶解すると直ちに重水素に置き換わる。これに対し、タンパク質の主鎖のアミド水素は、重水素による交換速度がその存在環境により大幅に異なる。高次構造が保持されている場合、分子の外側に存在するアミド水素や水素結合に関与しないアミド水素などフレキシブルな場所に存在するアミド水素は、pH 7 付近の重水に溶解すると比較的短時間で重水素に置き換わる。一方、疎水性の高い部分に存在するアミド水素や強固な水素結合に関

^{*a)} 理化学研究所生体分子解析室 (〒351-0198 和光市広沢 2-1)

Division of Biomolecular Characterization, RIKEN (The Institute of Physical and Chemical Research) (2-1 Hiro-sawa, Wako, 351-0198, Japan)

与するアミド水素は、重水に溶解しても、なかなか重水素に置き換わらない。この現象を観測し、構造解析を行う方法として、代表的なものはNMRであり¹¹⁻¹⁴⁾、数多くのタンパク質についての構造研究がなされている。一方、アミド水素が重水素に置き換わることにより、+1の質量変化を伴うことから、H/D交換前後のタンパク質を断片化して得られるペプチドの質量変化を解析することにより、タンパク質の高次構造情報が得られる。すなわち、タンパク質の高次構造についてMSの特徴を活かした解析ができるということである。

3. 液相での H/D 交換と MS による解析

この考え方に基づいた実験方法の概略は、Smith らによって確立された⁵⁾。それは以下のような手順である。タンパク質を中性付近の pH (pD) をもつ重水に溶解し、一定時間インキュベーションする。その後、反応溶液の pH を pH 2~3 程度に下げ、温度を 0°C に下げることにより、交換反応をクエンチする。重水素化されたタンパク質については、低い pH で加水分解できる酵素であるペプシンで氷上で消化する。もしくは質量分析計の中でフラグメンテーションさせる、といういずれかの方法で断片化する。そして得られる各々のペプチド断片についてそれぞれの質量の経時変化を解析する。その結果をタンパク質の一次構造にアミド水素の交換速度としてマッピングすることにより、構造上、どこがフレキシブルなのか、あるいは疎水性の高い部分にあるのか、もしくは水素結合に関与しているのか、を検討する (Fig. 1)。この方法を用いて種々のタンパク質について構造解析が行われている⁶⁻¹¹⁾。さらに、タンパク質-リガンド、タンパク質-タンパク質の相互作用部位についても、リガンドやターゲットタンパク質の有無の場合についてそれぞれ実験を行い、両者の結果を比較することにより解析できる¹²⁻¹⁶⁾。NMR でこのような構造の違いを見いだすには、観測されるすべてのシグナルを一次構造に帰属する必要があることから、分子量の大きなタンパク質について適用するのは難しい場合がほとんどである。大きな分子のわずかな構造の違いを浮き立たせることが、方法を工夫することにより MS では可能になる。このことは、MS を分析手段として用いる場合の大きな特徴である。実際の実験の進め方はいくつかあるが、以下、これらの実験の各ステップについて解説する。

3.1 H/D 交換反応

タンパク質の主鎖のアミド水素は、その存在環境により、交換速度が異なる。H/D 交換を行う場合、交換反応は、酸 (H^+) および塩基 (OH^-) が触媒となって進行する。しかし、塩基が触媒となって進行する交換反応の速度定数は、酸が触媒する場合に比べ、約 3×10^8 倍大きく、進行が速い。そのため、H/D 交換の速度が最も遅くなるのは、中性付近の水溶液ではなく pH 2~3 の酸性溶液であることが知られている^{11), 17), 18)}。したがって、タンパク質を変性させない条件下 (多くの場合は pH 7 付近) で H/D 交換を行った後、酸により溶液を pH 2.5 前後にすると、反応速度定数は 3 桁から 4 桁小さくなることにより、反応をクエンチすることができる。

また、反応速度は反応溶液の温度にも依存する。20°C から 0°C に低下させることにより、さらに反応速度を 1 桁遅くすることができる。しかしながら、pH を下げたり温度を低下させることだけでは、H/D 交換反応の進行を完全に停止することはできない。このことを念頭において実験を行う必要がある。

また、断片化の方法およびそれ以降の分析により、クエンチに用いる溶液は考慮する必要がある。これについては次項で詳しく述べる。

3.2 ペプシン消化による断片化とその結果の解析方法

交換反応をクエンチした状態で、タンパク質を断片化しなければならない。そのため、酵素消化で断片化を行う場合には、反応溶液の pH を 2.5 前後とする必要があるが、この pH で消化ができ入手が容易なプロテアーゼはペプシンに限られる。ペプシン消化は、通常は重水溶液でなく、軽水溶液中で行われる。したがって、消化時間が長いほど、消化の過程で D から H への逆交換反応が進行し、本来、D であった水素が H へ置き換わってしまう可能性が高くなる。これにより、タンパク質が本来もっていた構造情報が失われてしまうおそれがあるので、逆交換反応を極力抑える必要がある。そのため、ペプシンによる消化時間はできるだけ短くする (長くても 10 分程度にする) ことが望ましく、かつ、消化効率を下げないために、用いられる基質: 酵素濃度は 1:1 とされることが多い¹¹⁾。もちろん、消化を行う温度はできるだけ低くする必要がある。通常は 0°C (氷上) で行われる。また、ペプシンの自己消化由来のペプチドをなくすため、ビーズに固定したペプシンを用いる工夫もなされている¹⁹⁾。消化後は、反応液を液体窒素で

Fig. 1. Schematic diagram of H/D exchange of a protein in conjunction with MS analysis.

素早く凍らせ、次の分析を行うまで -40°C 以下で保存する。

ペプシンの基質特異性は低く、タンパク質をペプシン消化した場合に生じるペプチドを、タンパク質の一次構造から予測することはほとんどできない。また、生じるペプチドも数が多い。タンパク質をペプシン消化した後、混合物のまま MS の測定に供しても、配列のどの部分に対応するのかを決定するのが難しい場合が多い。そこで、ペプシン消化で得られたペプチドの分析には、短時間ですべてのペプチドを、ある程度分離・溶出できるような条件による LC/MS が用いられることが多い。LC/MS ではどんなに迅速に分析を行っても、10 分程度の分析時間を要してしまう。そこで、この間に起こる逆交換反応を極力抑えるために、以下のような方法がとられる。1) 溶媒はクーリングコイルを用いてカラムへ導入する前に十分冷却する。2) カラムやインジェクターは氷浴に浸し、低温下で分離を行う。3) 分離にはポリマーベースのパフュージョンカラムを用いて、分析時間を短縮できるようにする。

分析時間を短縮するために、LC/MS の代わりに MALDI-TOFMS を用いる試みもなされている¹⁹⁾。サンプリングの過程における逆交換反応を防ぐ工夫として、1) ターゲットをプラスチックケースに入れて氷で冷却しておく。2) マトリックス溶液も十分冷却しておき、使用直前に攪拌して用いる。3) マトリックス溶液との混合は迅速に行い、冷却されたターゲットに素早くサンプリングする。4) サンプリングしたターゲットをデシケータに入れて、真空ポンプを用いて 1~2 分で迅速に乾燥させる。などがなされている。また、TOFMS 測定には内部標準を用いたキャリブレーションを行うこと、および delayed extraction (遅延引き出し) 法を用いることにより質量精度をあげる。さらに PSD (post source decay) を用いて配列情報を得ることにより、かなりの数のペプチドの帰属が可能となっている。しかしながら、LC/MS を用いる場合に比べると迅速である反面、解析できるペプチドの数はどうしても少なくなってしまう。全一次構造をカバーすることは難しいという欠点がある。

ペプシン消化の場合、その前の H/D 交換反応のクエンチは、通常は 0°C で酸性軽水溶液 (例えばリン酸やトリフルオロ酢酸水溶液) を用いて行われる。クエンチ溶液に軽水溶液を用いる理由は、アミド水素以外のヘテロ原子に結合した交換可能な水素を軽水素に置き換えることにより、アミド水素との識別をするという目的もある。さらに、LC/MS を行う場合、LC で用いる溶媒は軽水溶媒であり、クエンチの段階で重水溶媒を用いる必要性がほとんどないということが大きな理由である。クエンチ溶液として何を用いるか、また、反応溶液とクエンチ溶液との量比は、実験の目的や消化して得られるペプチドの分析方法によって異なるので注意が必要である。例えば、LC/MS で分析する場合には脱塩も合わせて行えるので、リン酸バッファーを用いても問題ないが、LC による分離をせず MALDI やインフュージョンによるサンプル導入で ESI で分析する

場合には、揮発性の高い酸性溶液を用いる必要がある。さらに、後者の場合には、クエンチ後の溶液に存在する重水素の含量がそのままペプチドの同位体分布へ反映されるので、クエンチ溶液の割合を反応溶液に対し 9:1 程度以上と大きくすることにより、同位体分布巾を狭くし、ペプチドのピーク強度を高めることが期待できる。

以上述べたいずれのクエンチ方法をとっても、クエンチ後におけるある程度のアミド水素の逆交換反応 (D から H へ) は防ぐことができない。得られた結果を正しく解析するためには、LC/MS での解析の場合は、H/D 交換反応 0 分のサンプル (0%) と完全に重水素化したサンプル (100%) の二つを用いて補正する²⁾。

$$D = \frac{m_t - m_{0\%}}{m_{100\%} - m_{0\%}} \times N$$

D : 重水素化されたアミド水素の数

m_t : H/D 交換反応 t min で観測された質量 (同位体分布の重心点)

$m_{0\%}$: H/D 交換反応 0 min のサンプルで観測された質量 (同位体分布の重心点)

$m_{100\%}$: 完全に重水素化されたサンプルで観測された質量 (同位体分布の重心点)

N : 配列に存在するアミド水素の数

MALDI-TOFMS の場合には、サンプルを乾燥させる過程における逆交換反応を考慮して補正する¹⁹⁾。

3.3 MS での断片化とその結果の解析方法

タンパク質中の H/D 交換されたアミド水素を特定するためにペプシン消化を用いた場合には、2.2 で述べたようにアミド水素の逆交換反応を完全になくすることはできない。特に、ペプシン消化で新たに生じるアミノ基の水素や交換速度の極めて速いアミド水素の重水素の含量は、用いる溶媒の重水素の含量と同一となり、消化前にその水素が D に交換されていたのか H だったのかという情報は全く残らないという欠点がある。そこで、H/D 交換をしたタンパク質をそのままイオン化して、MS の手法を用いてフラグメンテーションさせて観測されるフラグメントイオンの質量変化から重水素化されたアミド水素の位置を決定する試みがなされている。

MS のフラグメンテーションを用いる方法として、1994 年に Anderegg らにより α -helical なペプチド 2 種 (melittin と growth hormone releasing factor analogue) について H/D 交換を行った後、三連四重極 MS (triple-QMS) を用いて MS/MS で解析した結果が報告されている²⁰⁾。方法は以下のようなものである。

1) 乾燥した試料を $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$ (80:20:2) に $20\ \mu\text{M}$ になるように溶解し H/D 交換を行う。この溶液では用いた 2 種類のペプチドは変性しないことがわかっている。

2) 一定時間インキュベーションした後、できるだけ迅速に質量分析計へ試料を導入し、MS/MS の測定を行う。

3) インキュベーション時間と観測された b および y シリーズのイオンの質量の関係を解析する。

連続した b および y シリーズのイオンが観測されれば、例えば b_{10} と b_{11} が観測されれば、その質量差から N 末端から 11 番目の残基において D に交換された H の数を把握できる。さらに、それぞれの残基の側鎖のヘテロ原子に結合した水素（交換速度の速い水素）を差し引くことにより、アミド水素当たりどれくらいの割合が D に置き換わっているかを推測できる。

triple-QMS による MS/MS を行ってペプチドのフラグメントイオンを観測する場合、測定の対象となるペプチドの大きさは、大きくても MW 3,000 程度である。これより大きなサイズのペプチドでは、low-energy collision でフラグメンテーションを起こすことはほとんど不可能である。磁場型の装置を用いた high-energy collision でもほぼ不可能である。そこでこの方法をそのままタンパク質に適用することは難しく、H/D 交換されたタンパク質を、CID 法で断片化して、重水素化されたアミド水素の位置を同定することは試みられていなかった。

一方、タンパク質を ESI でイオン化する場合、イオン源の capillary と skimmer 間の電位差を大きくすることにより、ribonuclease A のようなタンパク質でも部分的な配列情報を示すフラグメントイオンが観測されることは、1990 年に報告されている²¹⁾。また、分子量 11 kDa の cystatin A について、 ^{13}C , ^{15}N double-depleted protein (^{13}C および ^{15}N の含量を 0.1% 以下となるよう調製した単同位体化タンパク質)²²⁾を調製し capillary-skimmer CID を用いることにより、配列の 80% 以上のペプチド結合の切断を示すイオンが観測され、タンパク質によっては capillary-skimmer CID で配列解析が可能であることが示されている²³⁾。これらの研究を背景に、H/D 交換したタンパク質のアミド水素の位置について capillary-skimmer CID を用いて解析した結果を、最近、筆者らが報告している²⁴⁾。この研究は、76 アミノ酸残基からなる ubiquitin について H/D 交換反応を行い、ESI-FTICR MS を用いた capillary-skimmer CID で観測されるフラグメントイオンについて、重水素化中のインキュベーション時間に伴う同位体分布の変化を観測することにより、二次および高次構造について解析し、MS を用いた高次構造解析のための新たな方法論の確立を試みたものである。これについて以下、簡単に説明する。

3.3.1 重水素交換と capillary-skimmer CID を組み合わせた解析例

H/D 交換反応後の試料は、反応をクエンチした後、直ちに ESI-FTICR MS に導入するため、交換反応およびクエンチには揮発性緩衝液を用いて、続けてそのまま ESI の測定が行えるような濃度に調製しておく必要がある。したがって、我々は以下のような手順で実験を行った。ubiquitin を 100 μM の濃度になるように重水に溶解し、 t 分後に 9 倍容量の 50 mM AcOD/D₂O (pD 2.9) でクエンチする。冷却したシリッジに試料溶液をサンプリング後、直ちに ESI-FTICR MS へ導入する。この実験に用いた装置 (Bruker BioApex II) では、capillary-skimmer CID は、

ESI イオン源の capillary-skimmer 間の電位差を上げるとともに、skimmer 直後に位置する RF only hexapole ion guide にイオンを留める時間を 5 秒程度と長くすることにより、CID の効率を上げることができる。この方法でスペクトルに観測された各フラグメントイオンの帰属を行い、その同位体分布パターンを解析することにより、それぞれのフラグメントに存在するアミド水素の重水素化率 (%) を求める。得られた結果を X 線結晶回折像と比較して重水素化率と構造的特徴の関係について解析する。

ubiquitin について重水素交換の時間を 1, 10, 30, 60, 120, 240 分と変化させて、capillary-skimmer CID のスペクトルで観測されるフラグメントイオンの重水素化率の推移を求めた。重水素化していない、および重水素交換の時間を 1, 10, 30, 60, 120, 240 分と変化させた場合の ubiquitin の capillary-skimmer CID スペクトルのうち、 m/z 901~931 の部分を拡大して Fig. 2 に示す。経時的に重水素化率が増加しているが、重水素化のされ方はフラグメントにより異なることが読み取れる。Fig. 2 に示したように、スペクトルで観測されたすべてのフラグメントについて重水素化率を求め、その経時変化を ubiquitin の X 線結晶解析像 (Fig. 3)²⁵⁾ と照らし合わせて詳細に解析した結果、以下のことを明らかにすることができた。

(1) 観測された各フラグメントイオンのアミド水素の重水素化率を比較すると、 b_{15} および y_{15} より短いフラグメントイオンの場合には、末端の部分の構造的特徴を反映するような重水素化率が観測された。すなわち、 β -sheet

Fig. 2. Expanded capillary-skimmer CID spectra of non-deuterated, (a), and deuterated, (b)–(g), ubiquitin with different exchange times ($t = 1, 10, 30, 60, 120, 240$). Three fragments ions, b_{16}^{2+} , y_{24}^{3+} , and y_{40}^{5+} , were observed. The percentage of deuterium incorporation into the backbone amide of each fragment is also indicated.

Fig. 3. The X-ray structure of ubiquitin²⁵⁾ illustrated by a ribbon diagram. The diagram was generated using the program RasMol (v. 2.6) on the basis of the coordinates registered as "1ubq" at the Protein Data Bank (PDB). [Reproduced and modified with permission from "Observation of Hydrogen-Deuterium Exchange of Ubiquitin by Direct Analysis of Electrospray Capillary-Skimmer Dissociation with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry," by S. Akashi *et al.*, *Anal. Chem.* (1999). Copyright 1999, American Chemical Society]

を形成している N-末端部分 1~7 および 10~17 を含む b-シリーズの短いフラグメントイオンは重水素化の進行は遅く、尻尾のように分子から突き出している C-末端部分 73~76 を含む y-シリーズの短いフラグメントイオンは 1 分以内に 60% 以上のアミド水素が重水素化されていた。一方、15 残基を超える大きさのフラグメントイオンでは、その中にさまざまな二次構造モチーフ (α -helix, β -strand, loop など) が混在するために、それらの重水素化率の経時変化では顕著な差は観測されなかった。

(2) X 線結晶解析で決定されている二次構造モチーフに基づいて、いくつかのセグメントに区切り、それぞれに存在するアミド水素の重水素化率の経時変化を求めた (Fig. 4)。Fig. 4 では D_2O でのインキュベーション時間 (対数表示) に対して重水素化率をプロットしてあるが、それぞれのセグメントの H/D 交換速度の経時変化は、1 本ないし 2 本の一次式 ($D_t(\%) = k \ln(t) + D_{t=1}(\%)$) に近似して表現されることがわかった。すなわち、それぞれのプロットの傾きが H/D 交換反応の速度定数 k , y 切片が $t=1$ min での重水素化率ということになる。したがって、傾きが大きいものほど交換反応の速度が速く、y 切片が大きいほど 1 分以内に交換されるアミド水素の割合が多いということになる。

Fig. 4 および ubiquitin の X 線結晶回折像 (Fig. 3) から以下のような結果を読み取ることができた。

[1] loop 35~39 は、1 分以内にほとんどすべてのアミド水素が重水素に置き換わっている。このことから、loop

Fig. 4. Deuterium incorporation into each segment of ubiquitin. Error bars indicate the standard deviations for the deuterium contents at each time point. Straight lines were plotted on the basis of the calculation using the least squares method. Procedures for calculation are described in detail in the previous paper.²⁴⁾ [Reproduced and modified with permission from "Observation of Hydrogen-Deuterium Exchange of Ubiquitin by Direct Analysis of Electrospray Capillary-Skimmer Dissociation with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry," by S. Akashi *et al.*, *Anal. Chem.* (1999). Copyright 1999, American Chemical Society]

35~39 はフレキシブルな場所に存在すると考えられる。

[2] β -strand 1~7, 10~17, および 64~72 を含む三つのセグメントは、他の二つの β -strand 40~45 および 48~50 を含むセグメント 40~52 に比べると傾きが小さく、重水素化の速度が遅い。このことから、 β -strand 間の水素結合は、1~7, 10~17, 64~72 の間にあるものの方が他の 2 本の β -strand 間のものに比べて強いことが考えられる。

[3] α -helix 23~34 を含むセグメント 24~34 の H/D 交換は 2 本の直線で表されている。前半の部分は、すべてのプロットの中で最も大きい傾きを示しているが、後半はほぼ横這いとなっている。プロットからは約 60% のアミド水素が 30 分以内に H/D 交換される一方、残りの 40% は 4 時間後もほとんど交換されていないということがわかる。これは α -helix を形成する水素結合の約 4 割が極めて安定であるためと考えられる。

[4] β -strand 64~72 を含む C 末端セグメント 65~76 は、y 切片が大きい。これはこのセグメントに含まれる C 末端部分 73~76 が、極めてフレキシブルな構造であるためと考えられる。

これらの結果は NMR や X 線結晶解析の結果 (Fig. 3) と全く矛盾しないものであることがわかった。

この実験ではクエンチに重溶媒を用いている。したがって、側鎖のヘテロ原子に結合した交換速度の速い水素は、クエンチ後の溶媒における重水素の含量と同じ重水素の含量となる。炭素原子に結合した水素（交換不可能）は、天然の同位体存在比と同じ重水素の含量 (0.015%) となる。これに対し、主鎖のアミド水素は存在環境を反映した H/D 交換率を示すことになる。すなわち、クエンチに重溶媒を用いると、交換速度の速い水素ほど重水素化率が高いことになる。仮に、クエンチに軽水溶媒を用いるとすると、アミド水素の中でも、交換速度の極めて速いものは、側鎖のヘテロ原子に結合した交換の速い水素と同様の挙動をとる可能性があることを念頭におく必要がある。

MS でのフラグメンテーションを利用して断片化する場合、観測されるフラグメントイオンに含まれる水素はどのような水素なのかを、解析を行う上で明らかにしておく必要がある。triple-QMS による MS/MS を行う場合でも、capillary-skimmer CID を行う場合でも、観測されるイオンは b もしくは y であることがほとんどである。これら b および y タイプのイオンが生じるメカニズムは Fig. 5 のように考えられている²⁶⁾。

b シリーズのイオンが生じる際には、 α の経路でフラグメンテーションが進行し、水素の移動を伴わない。それに対し、y シリーズのイオンが生じる際には、 β の経路で進行するものと考えられており、新たに生じるアミノ末端には水素が移動する必要がある。移動してくる水素は、炭素原子に結合している水素ではなく、窒素原子に結合しているものであることは明らかになっているものの、どの窒素に結合している水素が動いてくるのかは明らかになっていない²⁷⁾。また、Asp の C 末端側でのペプチド結合の切断に関しては、側鎖のカルボキシル基の水素が関与することが示唆されている²⁸⁾。したがって、b シリーズのイオンが生じる場合には、水素の移動による影響はほとんどないと考えられるものの、y シリーズのイオンを用いてシーケンスイオンの質量を解析する場合には、注意する必要がある。

MS でのフラグメンテーションの過程において“水素の

スクランプリング”が生じ、重水素ラベルされた情報が失われてしまうということを報告している論文もある^{29), 30)}。その一方、H/D 交換後、ペプシン消化して得られたペプチドについて low-energy CID を行うと、b シリーズのイオンを用いて解析する場合には、NMR で得られたデータと矛盾するところは一つもなく、y シリーズのイオンの場合も大半が矛盾しないという報告もある³¹⁾。筆者らの実験では、観測されたフラグメントすべてが同じ重水素化率を示していないことから、仮に“水素のスクランプリング”が起こっていたとしても、解析には影響を与えない程度であると判断される。フラグメンテーションにおける水素の移動などそのスキームが完全に明らかになっていないので、判断は難しいところであるが、Anderregg ら²⁰⁾、Smith ら³¹⁾、および筆者らの研究²⁴⁾では、アミド水素の CID によるマッピング結果は、それぞれ構造と矛盾していない。これらのことから、液相における H/D 交換反応を解析する場合、タンパク質の capillary-skimmer CID やペプシン消化後のペプチドについての low-energy CID も十分有効であると考えられる。

4. 気相での H/D 交換と MS による解析

これまで述べてきたのは、液相での H/D 交換反応を用いたタンパク質の構造解析の方法についてであるが、気相でのタンパク質の folding-unfolding の解析も行われている^{32)~36)}。この目的で用いられるイオン化法と装置の組み合わせは、主に ESI-FTICR MS である。ESI で多価プロトン化分子を生じさせ、FTICR のセルに、タンパク質のある価数の多価プロトン化分子だけをトラップし、そこへ D₂O を導入し、気相で H/D 交換を行う。気相での H/D 交換の反応は、液相の場合に比べるとはるかに長い時間を要する（数十分から数時間）。トラップするタンパク質の多価イオンの価数を順次変えていき、それぞれの価数の多価プロトン化分子の重水素化率の違いを観測する。H/D 交換反応で異なる挙動が観測される場合はコンフォメーションが異なるものと考えられる。また、トラップしたイオンを H/D 交換後、赤外線照射をしたり、ブチルアミンを導入してチャージストリッピング（正イオンを観測する場合、タンパク質の多価プロトン化分子 (Mⁿ⁺) に比べ、プロトン親

Fig. 5. Proposed generation scheme of b_n^+ and y_m^+ ions by a peptide bond cleavage.²⁶⁾

和性のより高い塩基（この場合はブチルアミン）を衝突させることにより、タンパク質の多価プロトン化分子上のプラスチャージをはぎとり、もとのイオンより価数を小さくさせる (M^{n-x+} ; $x \geq 1$) 反応による挙動を観察すれば、各価数でのコンフォメーションの違いをさらに詳しく解析できる。ここで得られる結果は、あくまでも気相でのタンパク質のコンフォメーション変化に関するもので、溶液中の状態を反映するものでないことに気を付けなくてはならない。

5. ま と め

タンパク質の機能と密接に関係する高次構造の解析に、質量分析法を利用した研究がさまざまなグループにより精力的に進められている。方法論としてほぼ確立されたともいえる H/D 交換と MS の組み合わせによる研究法をここでは紹介したが、今後、装置の技術的な進歩と解析ソフトウェアの整備、さらに H/D 交換とは全く別の角度からの着眼点に基づいた新たな方法論の開発が期待される。

謝 辞 本解説は、第 47 回質量分析総合討論会 (1999) “バイオ MS シンポジウム” で発表した内容を中心に、現在のこの分野における研究の動向をまとめたものである。執筆の機会を与えていただいた担当編集委員の方々に感謝致します。

文 献

- 1) G. Wagner and K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.*, **160**, 343 (1982).
- 2) M. Delapierre, C. M. Dobson, M. Karplus, F. M. Poulsen, D. J. States, and R. E. Wedin, *J. Mol. Biol.*, **197**, 111 (1987).
- 3) H. Roder, G. A. Elöve, and S. W. Englander, *Nature*, **335**, 700 (1988).
- 4) S. W. Englander and L. Mayne, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **21**, 243 (1992).
- 5) Z.-Q. Zhang and D. L. Smith, *Protein Sci.*, **2**, 522 (1993).
- 6) R. S. Johnson and K. A. Walsh, *Protein Sci.*, **3**, 2411 (1994).
- 7) Z.-Q. Zhang and D. L. Smith, *Protein Sci.*, **5**, 1282 (1996).
- 8) K. Dharmasiri and D. L. Smith, *Anal. Chem.*, **68**, 2340 (1996).
- 9) R. S. Johnson, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **7**, 515 (1996).
- 10) Z.-Q. Zhang, C. B. Post, and D. L. Smith, *Biochemistry*, **35**, 779 (1996).
- 11) D. L. Smith, Y.-Z. Deng, and Z.-Q. Zhang, *J. Mass Spectrom.*, **32**, 135 (1997).
- 12) F. Wang, J. S. Blanchard, and X.-J. Tang, *Biochemistry*, **36**, 3755 (1997).

- 13) F. Wang, G. Scapin, J. S. Blanchard, and R. H. Angeletti, *Protein Sci.*, **7**, 293 (1998).
- 14) F. Wang, W. Li, M. R. Emmett, C. L. Hendrickson, A. G. Marshall, Y.-L. Zhang, L. Wu, and Z.-Y. Zhang, *Biochemistry*, **37**, 15289 (1998).
- 15) H. Ehring, *Anal. Biochem.*, **267**, 252 (1999).
- 16) Z.-Q. Zhang, W. Li, T. M. Logan, M. Li, and A. G. Marshall, *Protein Sci.*, **6**, 2203 (1997).
- 17) R. S. Molday, S. W. Englander, and R. G. Kallen, *Biochemistry*, **11**, 150 (1972).
- 18) Y. Bai, J. S. Milne, L. Mayne, and S. W. Englander, *Proteins*, **17**, 75 (1993).
- 19) J. Mandell, A. M. Falick, and E. A. Komives, *Anal. Chem.*, **70**, 3987 (1998).
- 20) R. J. Anderegg, D. S. Wagner, C. L. Stevenson, and R. T. Borchardt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 425 (1994).
- 21) J. A. Loo, C. G. Edmonds, and R. D. Smith, *Science*, **248**, 201 (1990).
- 22) A. G. Marshall, M. W. Senko, W. Li, M. Li, S. Dillon, S. Guan, and T. M. Logan, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 433 (1997).
- 23) S. Akashi, K. Takio, H. Matsui, S.-I. Tate, and M. Kainosh, *Anal. Chem.*, **70**, 3333 (1998).
- 24) S. Akashi, Y. Naito, and K. Takio, *Anal. Chem.*, **71**, 4974 (1999).
- 25) S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, and W. J. Cook, *J. Mol. Biol.*, **194**, 531 (1987).
- 26) K. Biemann, “Methods in Enzymology,” Vol. 193, ed. by J. A. McCloskey, Academic Press, San Diego (1990), Section II, Chap. 25, p. 455.
- 27) P. T. Kenny, K. Nomoto, and R. Orlando, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **6**, 95 (1992).
- 28) R. A. Jockusch, P. D. Schnier, W. D. Price, E. F. Strittmatter, P. A. Demirev, and E. R. Williams, *Anal. Chem.*, **69**, 1119 (1997).
- 29) D. R. Mueller, M. Eckersley, and W. J. Richter, *Org. Mass Spectrom.*, **23**, 217 (1988).
- 30) R. S. Johnson, D. Krylov, and K. A. Walsh, *J. Mass Spectrom.*, **30**, 386 (1995).
- 31) Y.-Z. Deng, Hai Pan, and D. L. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1966 (1999).
- 32) D. Suckau, Y. Shi, S. C. Beu, M. W. Senko, J. P. Quinn, F. M. Wampler, III, and F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 790 (1993).
- 33) T. D. Wood, R. A. Chorus, F. M. Wampler, III, D. P. Little, P. B. O'Connor, and F. W. McLafferty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2451 (1995).
- 34) P. B. O'Connor, J. P. Speir, T. D. Wood, R. A. Chorus, Z. Guan, and F. W. McLafferty, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 555 (1996).
- 35) C. J. Cassidy and S. R. Carr, *J. Mass Spectrom.*, **31**, 247 (1996).
- 36) F. W. McLafferty, Z. Guan, U. Haupts, T. D. Wood, and N. L. Kelleher, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4732 (1998).

Keywords: Protein structure, ESI, H/D exchange, FTICR MS