COMMENTARY

薬物とタンパク質との非共有結合・共有結合複合体の ESI/MS

Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Noncovalent or Covalent Binding Complexes of Drugs with Proteins

戸 塚 善三郎*

Zenzaburo TOZUKA

(Received December 24, 1999; Accepted March 16, 2000)

ESI/MS of the noncovalently and covalently bound complexes of drugs with protein is useful to study on pharmacological effect or toxicological symptom of drugs because of solving the problem with far greater easier by MS than any other method. ESI/MS shows that protein folding of FKBP generates a native three-dimensional structure with multiple charged ions (+6~+8) at pH 6.8 from a denature linear one-dimensional structure with multiple charged ions (+10~+20) at pH 3.0. The noncovalently bound complex of FKBP-FK506 (12.6 kd) is observed a little in mixed solution of FK506 (0.8 kd) and FKBP (11.8 kd) at pH 3 or pH 6.8 by ESI/MS and its deconvoluted MS. But much amount of FKBP-FK506 (12.6 kd) generate during folding of FKBP after the pH of the solution containing FKBP and FK506 changes from pH 3.0 to pH 6.8. Drug A is a large ring compound with amination bond and produced the covalent complex with human serum albumin (DA=HSA) that was measured easily by LC/ESI/MS and its deconvoluted mass. The stoichiometry of ratio (Drug:HSA) was shown by molecular ions at m/z 67,610 (1:1 DA=HSA complex), 68,792 (2:1 DA=HSA complex), 70,187 (3:1 DA=HSA complex). The main metabolites acyl glucuronides of Drug B and C produced the covalent binding complex with HSA (DB=HSA and DC=HSA) that were easily measured by post-averaging scan of LC/ESI/MS and its deconvoluted MS. These data are useful to improve the post candidate and decide stop and continue of development.

1. FK506 の免疫抑制の作用機序

ヒトの T-Cell の DNA には増殖因子 IL-2 および分化因子 IFN- γ がコードされていて、その上流に転写因子認識部位 NF-AT がある (Fig. 1). 抗原提示細胞が T-Cell のリセプターを刺激すると、ZAP70, PLC γ 1 にシグナルが伝達されイノシトール 3 リン酸 (IP3) が遊離され、小胞体表面の IP3 のリセプターを刺激すると小胞体はカルシウムを遊離する。細胞質のカルシウム濃度は 10^{-7} M から 10^{-5} M に上昇し、カルシニューリンがカルシウムを取り込みセリン・スレオニン脱リン酸化活性を発揮し NF-ATc3 リン酸を脱リン酸する。リン酸のとれた NF-ATc3 は核膜を通過でき、転写因子認識部位 NF-AT に結合することにより、増殖因子 IL-2 および分化因子 IFN- γ の mRNA の転写が始まる。FK506 は細胞質内にある FK506-Binding Protein (FKBP) と非共有結合複合体を形成し、活性化したカルシニューリンに結合し、NF-ATc3 リン酸の結合および脱リン酸化を阻害することにより、増殖因子 IL-2 および分化因子 IFN- γ の mRNA の転写を阻害する。これが FK506 の免疫抑制の作用機序である。

mRNA の転写を阻害する医薬品の開発に興味をもちだしたのは、大腸菌に感染したエプスタイン・バーウイルスの cro のオペレーター OR3 の 17mer DNA を 1982 年にまず液相法で合成し¹⁾、さらに立体選択性のある新縮合剤 1-(2,4,6-triisopropylbenzene sulphonyl-5-(pyridin-2-yl)tetrazolid を開発し²⁾、それを用いてポリスチレン樹脂の固相法で OR3 の 17mer を合成した³⁾ ときからである。アンチセンスの合成による阻害剤の開発は不成功であったが、1984 年筑波で発見された *Streptomyces tsukubaensis* が産生する FK506 はまさに mRNA の転写阻害剤であり、そのメカニズムの研究として FK506-FKBP 非共有結合複合体の ESI/MS について報告する。

2. FK506-FKBP 非共有結合複合体の ESI/MS

タンパク質の多価イオン測定や MS/MS によるペプチドのシーケンスに適していた TSQ700 LC/ESI/MS が市販されてすぐに、私はヒト血中 FK506 の高感度定量法を確立し、1992 年 BMS 国際学会で発表した^{4)~6)}。その間に依頼された研究の一つに FK506 の代謝物研究⁷⁾ や FKBP-FK506 非共有結合複合体の LC/ESI/MS によるメカニズム研究⁸⁾ があった。ESI/MS は酵素-基質、抗原-抗体、リセプター-リガンドなどの非共有結合複合体の多価イオン測定もできるので、生体機能や薬理活性のメカニズムを研究するのに 1990 年ごろから使い始められた^{9)~11)}。

タンパク質が高次構造をとる折りたたみは一次構造の配

* 藤沢薬品工業(株)薬物動態研究所 (☎532-8514 大阪市淀川区加島 2-1-6)

Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Biopharmaceutical and Pharmacokinetic Research Laboratories (1-6 Kashima 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8514, Japan)

Fig. 1. Immunosuppressive mechanism of FK506. Antigen-presenting cell stimulates T-cell receptor to activate ZAP70 and then PLC γ 1. Produced IP3 (inositol-1,3,5-triphosphate) binds to IP3 receptor to release Ca ions which stimulate the dephosphorylating activity of calcineurin from NF-ATcp triphosphate. Dephosphorylated NF-ATcp is possible to go through nucleus membrane. DNA sequences of T cell contains NF-AT (Nuclear Factor of Activated T cell) on which NF-ATcp attached to start transcription of mRNA of IL-2. FKBP-FK506 complex attaches to calcineurin and inhibits dephosphorylation of NF-ATcp triphosphate and transcription of IL-2.

列に依存しているという説¹²⁾とシャペロンを必要とするという説¹³⁾がある。膜透過には高次構造は不適当で適切な分布をするまではもつれないようにするためにシャペロンが付くようになっていくという説¹⁴⁾もある。FKBPはその分子量のkd数からFKBP12(通常にいうFKBP), FKBP51, FKBP52, FKBP66などがあるが, その中にはシャペロンとしての役割を果たしているとする説もあるが定かでない。 α -ヘリックス, β -シート, ループ(特にカルシウムイオンを取り込んだEFハンドなど)の二次構造は一次構造に依存する¹⁵⁾。

まずESI/MSにより各種pH緩衝液中でのFKBPの多価イオンを観測し, 高次構造の経時変化を観察した。FKBPは塩基性アミノ酸残基20個を含む107アミノ酸残基からなり12kdである¹⁶⁾。pH3でのFKBPのESI/MSは15価をbase ionとする10価から20価の多価イオンをとりFKBPは一次構造に近い状態で存在する(Fig. 2A)。その溶液をpH6.8に調整すると自然にゆっくり高次構造を形成し10価をbase ionとする6価から14価の多価イオン(Fig. 2B)になりやがて6価をbase ionとするようになる(Fig. 2C, D)。FKBPを直接pH6.8緩衝液に加えた場合, 10分後に測定したESI/MSはFig. 4Dの6価をbase ionとする多価イオンスペクトル(m/z 1,477.8 (+8価), 1,689.4 (+7価), 1,970.7 (+6価))が得られた。小胞体

のリボソームで合成された一次構造のFKBPは中性のpHの細胞質では高次構造を形成し機能を発揮すると考えられる。

次にFK506-FKBPの非共有結合複合体形成過程をいろいろなpH条件でLC/ESI-POS-MSを測定し検討した。FKBPはpH3.0では一次構造に近いシャープな多価イオンを示し, その溶液とFK506溶液を混合した場合, 最初はFK506とFKBPの多価イオンのみでありその状態が4時間まで続いた。5時間後にわずかにFKBP-FK506非共有結合複合体の多価イオンを観測した(Fig. 3A1)。その多価イオンをバイオマスソフトで処理したデコンボリューションスペクトルでわずかであるがFKBP-FK506非共有結合複合体の分子イオン m/z 12,623を確認した(Fig. 3A2)。pH3のFKBP溶液をpH6.8に調整しすぐにFK506溶液を混合すると高次構造のブロードな多価イオンを示し(Fig. 3B1), デコンボリューションスペクトルでFKBP-FK506非共有結合複合体の分子イオン m/z 12,622を確認し, 混合してすぐに多くの割合で複合体を形成することがわかった(Fig. 3B2)。

pH6.8の緩衝液中の6価をbase ionとする多価イオンスペクトル(m/z 1,477.8 (+8価), 1,689.4 (+7価), 1,970.7 (+6価))のFKBPに直接FK506溶液を混合した場合, すぐにわずかであるがFKBP-FK506非共有結合

Fig. 2. ESI/MS spectrum of FKBP folding at changing pH from acid to neutral. ESI/MS spectrum of FKBP showed multiple charged ions (+10~+20 charges) at pH 3.0 (Fig. 2A), because FKBP has a denatured linear one-dimensional structure at pH 3.0. When FKBP solution at pH 3 was adjusted at pH 6.8, FKBP folded gradually to a native three-dimensional structure and its ESI/MS spectrum decreased gradually multiple charge from +10~+20 to +6~+8 ions (Fig. 2B, C, D). When FKBP was added directly in pH 6.8 buffer, ESI/MS spectrum of FKBP showed soon multiple charge +6~+8 ions (Fig. 2D).

複合体の多価イオンを観測したが1週間後もFKBP-FK506 非共有結合複合体の生成比率は増えていなかった (Fig. 4A). デコンボリューションスペクトルでわずかであるがFKBP-FK506 非共有結合複合体の分子イオン m/z 12,624を確認した (Fig. 4B). FKBP の分子イオン m/z

11,820 のコンボリューションスペクトルでその多価イオン (m/z 1,478.7 (+8 価), 1,690.0 (+7 価), 1,970.9 (+6 価))を確認した (Fig. 4C). FKBP-FK506 非共有結合複合体の分子イオン m/z 12,624 のコンボリューションスペクトルでその多価イオン (m/z 1,579.1 (+8 価),

Fig. 3. ESI/MS of noncovalently bound complex of FKBP-FK506 at changing pH. When solution of FK506 was added to solution of FKBP in pH 3 buffer, ESI/MS and its deconvoluted spectrum detected a little noncovalently bound complex of FKBP-FK506 after 5 hours (Fig. 3A1, A2). When the solution of FK506 was added to FKBP solution that was changed from pH 3.0 to pH 6.8, much amount of noncovalently bound complex of FKBP-FK506 was soon detected by ESI/MS and its deconvoluted spectrum (Fig. 3B1, B2).

Fig. 4. ESI/MS of noncovalently bound complex of FKBP-FK506 at pH 6.8. When FK506 was added to the solution of FKBP in pH 6.8 buffer, ESI/MS and its deconvoluted spectrum showed soon noncovalently bound complex of FKBP-FK506 (Fig. 4A, B). The convoluted spectrum of HSA (m/z 11,820) showed multiple charge ions (m/z 1,478.7 (+8), 1,690.0 (+7), 1,970.9 (+6)) and noncovalently bound complex of FKBP-FK506 (m/z 12,624) showed multiple charge ions (m/z 1,579.1 (+8), 1,804.2 (+7)).

1,804.2 (+7 価))を確認した (Fig. 4D). 以上のことから小胞体のリボソームで合成された一次構造の FKBP が中性の pH の細胞質で高次構造を形成する過程で、存在する FK506 と複合体を形成すると考えられた。2 本鎖オリゴ DNA と薬物の非共有結合複合体¹¹⁾では多価イオンの強度の強い特定のイオンをプレカーサーイオンとして選びコリジョンで 1 本鎖 DNA および 1 本鎖 DNA・薬物付加体に分離している。FKBP-FK506 非共有結合複合体の強度の最も強い多価イオンをプレカーサーイオンとし、コリジョン電圧、アルゴンガス圧を変えてプロダクトイオンスキャンする MS/MS を測定し、FKBP-FK506 非共有結合複合体の分離を試みたが解離しなかった。Tube voltage-Skimmer lens voltage をあげ加速しコリジョンする in source collision は完璧に付加体のみになる系または完璧にコリジョンで解離する系では有効であるが、今回の FKBP-FK506 非共有結合複合体の場合は決定的な証明にはならない。FKBP はペプチドの 5 員環プロリンを認識して取り込み、アミド結合のシス・トランス変換するロータマーゼ活性があるので一種のシャペロンでもあるわけで、FKBP-FK506 非共有結合は K_d 0.4 nM¹²⁾で親和力は強いし、FKBP は FK506 の 6 員環ピペリジンを認識して取り込んだため FKBP-FK506 非共有結合は解離しにくく、一度生じた FKBP-FK506 非共有結合体は室温で 1 カ月放置してもほぼ同じ強度で存在した。

3. 薬物の毒性発現のメカニズム研究への LC/ESI/MS の応用

最近毒性研究の領域の雑誌に LC/ESI/MS による薬物の毒性発現のメカニズム研究の発表が目立つようになってきた。体液性免疫の B Cell は生体防御機能をもつタンパク質で最も重要な抗体の免疫グロブリン IgG を産生し、IgG の Fab 部分は生体に侵入した異物の抗原に強く結合し抗原を認識するようになり、補体・食細胞・マスト細胞などを活性化して抗原の分解・除去をするエフェクター作用を示すが、免疫グロブリン IgE による抗原-抗体反応でヒスタミンや喘息の主因の SRS-A などを遊離し、アナフィラキシーアレルギーから重篤な症状ではアナフィラキシーショック死を誘発する^{17)~19)}。薬物と DNA やタンパク質との共有結合複合体は高分子であり抗原として認識されやすく、LC/ESI/MS で多価イオンを測定できるので毒性発現のメカニズムの研究が報告されている。制癌剤^{20), 21)}の場合、共有結合複合体の生成は薬理活性でもあり毒性活性でもある。しかしながら一般の薬物でも代謝物が活性体で DNA やタンパク質と共有結合複合体を生成する場合がある。薬物は人体にとって異物であり、解毒するために P450 薬物代謝酵素が作用し水溶性を増す構造に代謝するが、代謝の中間体のアルデヒドやエポキシアミド、芳香環のノルカラジエン構造²²⁾、芳香族アミンの代謝物²³⁾、キノイド構造^{24), 25)}などの活性代謝物がそれぞれ生体内の重要因子と共有結合し毒性を発現することが知られている。抱合の代謝ではアシルグルクロナイド^{17)~19)}は活性エステルで

ありアミノ基、チオール基、ヒドロキシル基と共有結合する。これらのタンパク質との共有結合複合体の生成は毒性問題につながる場合がある。1992 年 Bennet は「アシルグルクロナイドは解毒と毒性に作用しているのではないか、つまり活性エステルとして Human Serum Albumin (HSA) の NH, SH, OH 基と反応して共有結合し抗原になりアナフィラキシーを誘発する」と報告している¹⁷⁾。

4. Drug-HSA の共有結合複合体の ESI/MS

Drug A (DA) は分子量 1,314 でアミナル結合を有する環状薬物で、HSA との共有結合複合体 DA=HSA を形成する²⁶⁾ (Fig. 5). HSA および DA=HSA の LC/ESI-POS-MS をトリプルステージ Q ポール型質量分析計 Finnigan-MAT TSQ7000 (Positive ion mode, Ionization high voltage; 4.5 kV, Heated capillary temperature; 230°C, Sheath gas pressure; 70 psi, Auxiliary gas pressure; one unit, Multiplier voltage; 1,200 V, average scan (各スキャンを加算・平均化したスペクトルが得られ、ノイズを除去するのに使われる。この場合通常のスキャンでは多価イオンはノイズに重なり見えない)), HPLC system (Waters Mode 1616 pump, Model 600S controller, WISP 717 auto sampler, Inertsil ODS-3 column (150 mm×2.1 mm i.d., GL Science), Mobile phase; 0.1% AcOH:アセトニトリル 20~80%/10 min gradient, 0.2 mL/min) で多価イオンを観測した (Fig. 6A1, B1). 多価イオンのデコンボリューションスペクトルから共有結合複

Fig. 5. The preparation of covalently bound complex of drugs with HSA. Drug A is a large ring compound having aminal bond, which opened and then bound covalently with HSA (antigen-antibody test (-)). Drug B acylglucuronide is active ester and bound covalently with HSA (antigen-antibody test (+)).

Fig. 6. LC/ESI/MS and its deconvoluted spectrum of HSA and covalently bound complex Drug A=HSA by averaging scan of Finnigan MAT TSQ7000.

Fig. 7A. LC/ESI/MS of HSA by Finnigan MAT ion trap LCQ.

合体 DA=HSA の分子イオン m/z 67,665 (1:1 DA=HSA complex) を確認した (Fig. 6B2).

イオントラップ型質量分析計 LCQ の LC/ESI-POS-MS

で HSA および DA=HSA の多価イオンを測定した。HSA の多価イオンを Fig. 7A に示す。そのデコンボリューションスペクトルを Fig. 7B に示す。DA=HSA の多価イオン

Fig. 7B. Deconvoluted spectrum of Fig. 7A showed HSA molecular ion m/z 66,550.

Fig. 7C. LC/ESI/MS of covalently bound complex Drug A=HSA by Finnigan MAT ion trap LCQ.

を Fig. 7C に示す。複数の混合物の多価イオンをそれぞれ分離してデコンボリューションし、複数の共有結合複合体 DA=HSA の分子イオン m/z 67,610 (1:1 DA=HSA complex), 68,792 (2:1 DA=HSA complex), 70,187 (3:1 DA=HSA complex) から薬物 DA と HSA の比率が容易に確認できた (Fig. 7D).

飛行時間型質量分析装置 Mariner の ESI-TOF-MS はパルス回数が多く (12,000 scan/1 spectrum) データの取り込み回数が多いため同位体ピークの分離がよくピーク強度が安定し精度が高いので、比較的容易に HSA および DA=HSA の多価イオンを測定できた (Fig. 8A1, B1). 多価

イオンのデコンボリューションスペクトルから共有結合複合体 DA=HSA の分子イオン m/z 67,780.30 (Drug A: HSA 1:1 の DA=HSA complex) を確認した (Fig. 8B2).

上記のように、いずれの機種でも共有結合複合体 DA=HSA の多価イオンおよびデコンボリューションスペクトルの分子イオンを測定できた。LCQ では薬物 DA と HSA の比率が容易に確認できた。HSA は 66.5 kd で共有結合複合体 DA=HSA は 67.8kd で高分子量であり多価イオンは複雑であり、精度はいずれの機種でも落ちるが、デコンボリューションスペクトルで HSA (TSQ7000; m/z 66,586, LCQ; m/z 66,550, Mariner; m/z 66,602) と共有結合複合

Fig. 7D. Deconvoluted spectrum of Fig. 7C showed covalently bound complex Drug A=HSAS molecular ion of which the stoichiometry was shown as m/z 67,610 (1 : 1), 68,792 (2 : 1), and 70,183 (3 : 1).

Fig. 8. LC/ESI/TOF/MS of Mariner and its deconvoluted spectrum of HSA and covalently bound complex Drug A=HAS.

体 DA=HSA (TSQ7000; m/z 67,665.0, LCQ; m/z 67,610, Mariner; m/z 67,780.3) との分離は比較的容易にできる。コンボルジョンスペクトルで調べた共有結合複合体 DA=HSA の多価イオンで最も強度の強いイオンについてコリジョンを検討したが解裂しなかった。In source colli-

sion も検討したが完全な解離は得られなかった。共有結合でもアミド、アミナール結合などは結合エネルギーが弱いのでコリジョンで解離してもよく、コリジョンによる共有結合・非共有結合複合体の区別はもっと多くのデータを集めて論じるべきであり今後の課題である。この論文では製

Deconvoluted MS

Fig. 9. LC/ESI/MS and its deconvoluted spectrum of HSA and covalently bound complex Drug B=HSA by post-averaging scan of Finnigan MAT TSQ700.

ESI/MS

Deconvoluted MS

Fig. 10. LC/ESI/MS and its deconvoluted spectrum of HSA and covalently bound complex Drug C=HSA by post-averaging scan of Finnigan MAT TSQ700.

薬メーカーでの開発研究で重要な非共有結合複合体の薬理活性のメカニズム研究、共有結合複合体の毒性メカニズム研究に ESI/MS が応用できるかのまず定性分析に焦点をあてていて、その程度を論ずる定量研究は今後の課題である。薬物 Drug A は開環して直鎖になりタンパク質と共有結合するので共有結合複合体の構造が Drug A と大きく異なる (Fig. 5)。それで Drug A の抗原抗体反応 (モルモット皮内反応) はネガティブであった。アミナル結合を還元してアミノ基にすることにより、HSA との共有結合複合体を形成せず毒性も軽減された開発候補品を創出できた。

Drug B (DB) は分子量 418.4 で、Drug B アシルグルクロナイド (分子量 595.3) の活性エステルと HSA との共有結合複合体 DB=HSA complex は Drug B の構造を有している (Fig. 5)。トリプルステージ Q ボール型質量分析計 TSQ700 の LC/ESI/MS で Drug B アシルグルクロナイドと HSA との共有結合複合体 DB=HSA complex の多価イオンを測定した。測定後アベレーシング処理 (共有結合複合体 DB=HSA complex のピークの溶出している間のスキャンによって取り込まれたデータを加算平均した多価イオンのスペクトルを得る) した多価イオンのデコンボリューションスペクトルから共有結合複合体 DB=HSA の分子イオン m/z 67189 (Drug B:HSA 1:1 の DB=HSA complex) を確認した (Fig. 9)。

Drug C (DC) は分子量 446.4 で、Drug B のカルボキシル基の α 位に立体障害になる官能基を導入したが、やはり生体内では Drug C アシルグルクロナイドの生成および HSA との共有結合複合体 DC=HSA complex の生成を確認した (Fig. 5)。トリプルステージ Q ボール型質量分析計 TSQ700 の LC/ESI/MS で Drug C のアシルグルクロナイドと HSA との共有結合複合体 DC=HSA complex の多価イオンを測定した。測定後アベレーシング処理した多価イオンのデコンボリューションスペクトルから共有結合複合体 DC=HSA の分子イオン m/z 67,030.4 (Drug C:HSA 1:1 の DC=HSA complex) を確認した (Fig. 10)。HSA との共有結合複合体 (DX=HSA complex, X=A, B, C) は今回 pH 3 の条件で多くの多価イオンを観測した。pH を中性にして測定したが m/z 4000 までのスキャン域には明確な多価イオンは認められず、多価イオンをプレカーサイオンとし、コリジョン電圧、アルゴンガス圧を変えてプロダクトイオンスキャンする MS/MS はできなかった。Drug C のアシルグルクロナイドと HSA との共有結合複合体 DC=HSA complex は抗原抗体反応 (モルモット皮内反応) がポジティブであった。Drug B とほぼ同じ構造および活性を有し、カルボン酸の α 位に立体障害の大きい官能基を導入した Drug C のアシルグルクロナイドも HSA と共有結合複合体 DC=HSA complex を形成し、抗原抗体反応 (モルモット皮内反応) がポジティブであり、Drug B および Drug C の開発を断念した。Drug-

HSA の共有結合複合体の ESI/MS は比較的簡単に測定できることから、今後も探索段階で実施し、医薬品開発研究に役立てたい。

文 献

- 1) E. Ohtsuka, Z. Tozuka, A. Ohta, K. Kitano, and M. Ikehara, *Nucl. Acid Symp. Ser.*, **11**, 193 (1982).
- 2) E. Ohtsuka, Z. Tozuka, and M. Ikehara, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4483 (1981).
- 3) E. Ohtsuka, Z. Tozuka, S. Iwai, and M. Ikehara, *Nucl. Acids Res.*, **10**, 6235 (1982).
- 4) Z. Tozuka, K. Iwasaki, M. Kobayashi, H. Matsuda, A. Suzuki, K. Noda, K. T. McManus, and D. A. Garleiz, *Proc. Int. Conf. on Biol. Mass Spectrom.*, San-ei Publishing (1992), p. 430.
- 5) Z. Tozuka, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 377 (1997).
- 6) 戸塚善三郎, バイオロジカルマスマススペクトロメトリー, 現代化学増刊 31, 東京化学同人 (1997), p. 289.
- 7) K. Iwasaki, T. Shiraga, K. Nagase, Z. Tozuka, K. Noda S. Sakuma, T. Fujitsu, K. Shimatani, A. Sato, and M. Fujioka, *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 971 (1993).
- 8) 戸塚善三郎, 田村康一, 白神義文, 藤原友一, 寺川雅人, 加賀山彰, 金井みち子, 福田正史, 第 47 回質量分析総合討論会講演要旨集, p. 262 (1999).
- 9) B. Ganem, Y. T. Li, and J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6294 (1991).
- 10) V. Katta and B. T. Chait, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8534 (1991).
- 11) D. C. Gale and R. D. Smith, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 1154 (1995).
- 12) C. B. Anfinsen, *Science*, **18**, 223 (1973).
- 13) R. P. Beckmann, L. A. Mizzen, and W. J. Welch, *Science*, **248**, 850 (1990).
- 14) 今本尚子, 生化学, **69**, 383 (1997).
- 15) C. Branden and J. Tooze, *Intro. Prot. Struc.*, Garland Publishing (1999), p. 13.
- 16) G. D. Van Duyne, R. F. Standaert, P. A. Karplus, S. L. Schreiber, and J. Clardy, *Science*, **252**, 839 (1973).
- 17) H. S. Longguth and L. Z. Benet, *Drug Metab. Rev.*, **24**, 5 (1992).
- 18) A. Ding, J. C. Ojingwa, A. F. McDonagh, A. L. Burlingame, and L. Z. Benet, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3797 (1993).
- 19) A. Ding, P. Z. Amirhosseini, A. F. McDonagh, A. L. Burlingame, and L. Z. Benet, *Drug Metab. Rev.*, **23**, 369 (1992).
- 20) Z. Tozuka, H. Takasugi, and T. Takaya, *J. Antibiot.*, **36**, 276 (1981).
- 21) S. K. Arora, *J. Antibiot.*, **34**, 462 (1981).
- 22) W. Tang, R. A. Stearns, S. M. Bandiera, Y. Zhang, C. Raab, M. P. Braun, D. C. Deen, J. Pang, K. H. Leung, G. A. Doss, J. S. Strauss, G. Y. Kwei, T. H. Rushmore, S. L. Chiu, and T. A. Baillie, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 365 (1999).
- 23) O. Pelkonen, J. Maenpaa, P. Taavitsainen, A. Rautio, and H. Raunio, *Xenobiotica*, **28**, 1203 (1998).
- 24) W. Tang, R. A. Stearns, R. W. Wang, S. L. Chiu, and T. A. Baillie, *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 192 (1999).
- 25) L. M. Bornheim and M. P. Grillo, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1209 (1998).

Keywords: Noncovalently bound complex, Covalently bound complex, ESI/MS, Protein, Drug, Deconvoluted MS