COMMENTARY

タンパク質の構造と機能を質量分析で解明する —イオンモビリティ質量分析による プリオンタンパク質の解析—

Probing the Structure and Function of Proteins by Mass Spectrometry —Structural Analysis of Prion Proteins by Ion Mobility Mass Spectrometry—

平山和雄
Kazuo HIRAYAMA

Science Education Co., Inc., Ota-ku, TOKYO, JAPAN

Applications of traveling-wave ion mobility (T-Wave-IM) and drift cell ion mobility (DCIM) mass spectrometry to studies of prion proteins are summarized. In ion mobility spectrometry, ions that are produced travel through a drift tube to which an electric field is applied and a carrier buffer gas that opposes the motion of the ions. Based on the mass, charge, size and shape, and the migration time of an ion through the tube is unique to each different ion. This permits the operator to distinguish between different analyte species. Compact ions with small collision cross-sections will drift more rapidly than extended ions. The measurement of this mobility yields information regarding the rotationally-averaged cross-section of each ion. Separation of α -helical and β -sheet-rich SHaPrP(90–231) isoforms of recombinant Syrian hamster prion proteins, with the same m/z but different structures, can be achieved *via* the use of ion mobility data.

(Received June 14, 2010; Accepted July 6, 2010)

1. はじめに

質量分析の最大の特徴は、イオン化した低分子化合物や高分子化合物を、質量の違いで分離できることです。しかし別の見方をすると、質量の同じものは分けられないということになります。この点が、質量が同じでも構造が違う化合物であれば、スペクトルが異なるNMR (nuclear magnetic resonance; 核磁気共鳴) や、回折像が異なるX線結晶構造解析と大きく違います。低分子化合物の場合には、LC-MSやGC-MSで同じ質量の化合物を分離後、質量分析をすることが可能です。しかしながら、高分子化合物の場合には全く様子が異なります。同じ質量で、構造は異なる高分子化合物を、HPLC (high performance liquid chromatography) で分離することは極めて困難です。タンパク質の分野では、アミノ酸配列は全く同じであるのに二次構造が異なるために違う機能を発揮するプリオンタン

パク質や、通常は特定の三次構造をとらずに機能を発揮するときだけに三次構造をとる天然変性タンパク質^{*1}の存在が注目されるようになってきました^{1)~5)}。最近、イオンモビリティスペクトロメトリー (ion mobility spectrometry; IMS) を質量分析計に組み込んだイオンモビリティ質量分析計が市販されるようになってきましたが、この装置を用いると、アミノ酸配列が同じでも構造が異なるタンパク質を分離し質量分析することが可能です⁶⁾。ここでは、イオンモビリティ質量分析について解説するとともに、プリオンタンパク質にどのように応用しているかを紹介します⁷⁾。

*1 天然変性タンパク質

コア部分のみが立体構造をとりその他の部分が立体構造をとらなったり、タンパク質そのものが立体構造をとらないで、機能を発するときのみ特定の立体構造をとるタンパク質。シグナル伝達系や遺伝子発現制御に関与する重要なタンパク質の中に特に多く見られる。転写因子、転写終結因子、コアクチベータ、細胞周期調節因子、RNA結合タンパク質などがその例である。

Correspondence to: Kazuo HIRAYAMA, Science Education Co., Inc., 2-13-16 Kamata, Ota-ku, Tokyo 144-0052, JAPAN, e-mail: kazuo_hirayama@science-education-jp.net
平山和雄, Science Education Co., Inc., 〒144-0052 東京都大田区蒲田 2-13-16

2. イオンモビリティ質量分析 (ion mobility mass spectrometry; IM-MS) の概略

イオンモビリティでは、Fig. 1 に示したように、不活性緩衝ガスを充満させたイオンドリフトセル中を周囲より電圧が高い電場が移動するとき、気体状のイオンの動きを観測します。イオンは緩衝ガスに向かって進むため、衝突断面積の小さなコンパクトなイオンはコンパクトでないイオンよりもより素早く動けます。この可動性を測定することにより、個々のイオンの平均回転断面積 (rotationally-averaged cross-section), すなわち、コンパクトかコンパクトでないかの情報を得ることができます。ここでは、IM-MS の二つの測定法について紹介いたします。direct-current ion mobility (DCIM) mass spectrometry と traveling-wave ion mobility (T-Wave-IM) mass spectrometry です。DCIM は、Bowers のグループが作ったホームメイドの装置です⁸⁾。Fig. 2 に装置を模式的に示しました。ESI で生成したイオンは、ion funnel を通過し

Fig. 1. Schematic representation of an ion mobility spectrometer.

てイオンドリフトセルに入り、移動度の違いで分離され、さらに四重極で質量分離された後、検出器へと導かれます。DCIM は物理的な原理が確立されており、得られるデータから、イオンの絶対的な衝突断面積 (absolute collision cross-section) を得ることができます。T-Wave-IM は、四重極飛行時間質量分析計 (quadrupole time-of-flight mass spectrometer) に組み込まれ、Synapt HDMS システムとして市販されています (Waters)。Fig. 3 に装置を模式的に示しました。ESI で生成したイオンは四重極で質量分離された後、T-Wave-IM へと導かれ移動度の違いで分離されます。ここで分離されたイオンはさらに TOF により質量分離され、検出器へと導かれます。T-Wave-IM は、高感度であることと、マスペクトルだけではなくイオンがドリフトセル内を移動するのにかかる時間、到達時間 (arrival time distribution) を容易に測定できる点で DCIM よりも優れています。T-Wave-IM で得られるイオンの移動度分離は、複雑なイオン軌道、緩衝ガスとの衝突、T-Wave-IM セルの不均一な電場を移動する時間などのいくつかの異なる変数によって決まってきます。T-wave-IM で絶対衝突断面積を出すことは、パラメーターが多いため極めて困難と思われます。DCIM と T-Wave-IM で得られた結果を比較することにより、T-Wave-IM のキャリブレーション法が開発されています^{6), 9)~11)}。断面積のわかっている標準物質を用いて DCIM と同一の実験条件で移動度を測定し、これをもとにキャリブレーションすることによって、T-Wave-IM で見積もり断面積を得ることができます。

3. プリオン病研究の歴史的背景

プリオン病として知られている、伝達性海綿状脳症 (transmissible spongiform encephalopathies; TSEs) は、ヒトにも動物にも感染する進行性致死性の伝染性神経変性

Fig. 2. Schematic representation of a drift-current ion mobility mass spectrometer.

Fig. 3. Schematic representation of a traveling wave ion mobility mass spectrometer.

Fig. 4. Schematic diagram showing details related to sample preparation.

The key event in prion diseases is the conversion of the α -helical normal cellular form of the prion protein (PrP^C) to a β -sheet pathogenic scrapie form (PrP^{Sc}). PrP^{Sc} has a high propensity for aggregation and subsequent formation of a fibrous form (left). Recombinant Syrian hamster prion protein SHaPrP(90-231) is refolded into an α -helical structure under oxidizing conditions. The conversion of α -SHaPrP(90-231) to β -sheet-rich SHaPrP(90-231) is achieved by incubation in a 5 mM ammonium formate buffer at pH 5.5, at 70°C, 24 h. The α -SHaPrP(90-231) and β -sheet-rich SHaPrP(90-231) are used for IM-MS experiments (right).

疾患です。Fig. 4 に模式的に示したように、プリオン病は正常型プリオンタンパク質 (PrP^C) が、 β -シートを多く含む異常型プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) へと構造変換し、脳内に蓄積することによって発症します。PrP^C は、細胞膜上に存在する正常なタンパク質で、一つのジスルフィド結合をもち、 α -ヘリックス構造を多く含んでいます。いくつかの異なる膜トポロジー型が存在し、糖脂質にアンカーされた1種類の膜表面型と、2種類の膜貫通型があります¹²⁾。しかし、その機能はまだまだ完全には解明されていません。PrP^{Sc} は、正常型の PrP^C のコンフォメーションを変化させて、感染性のアイソフォームに変換する能力をもちます。変換された感染性アイソフォームは、今度は別の PrP^C のコンフォメーションを変化させ、これが繰り返されていきます。PrP^{Sc} では、PrP^C に多く含まれていた α -ヘリックス構造の代わりに、 β -シート構造が高い割合を占めています¹³⁾。この異常なアイソフォーム同士が凝集すると、高度に構造化されたアミロイド線維が形成されます。

プリオン病の例としては、ウシの BSE (bovine transmissible spongiform encephalopathy)、シカのプリオン病である CWD (chronic wasting disease)、ヒツジのスクレイピー、ヒトの CJD (Creutzfeldt-Jakob disease) などがあります¹⁴⁾。前述の、何がプリオン病を媒介するかについては、1982 年に Prusiner らによって報告されています¹⁾。彼らは、*Prnp* 遺伝子から作られる糖タンパク質 PrP のミスフォールディング体を単離し、これがプリオン病の本体であると提唱しました。そして彼らは、前例のない伝染性の病原体が、今まで全く知られていないメカニズムでプリオン病を発症させると提唱しました¹⁵⁾。PrP^C が PrP^{Sc} に転換する分子レベルでの詳細なメカニズムは解明されて

いませんが、両者の生化学的な特性の違いは明らかになっています。PrP^C はモノマーで、簡単にプロテアーゼで分解されます。一方 PrP^{Sc} は、会合性が強く、プロテアーゼによる分解も受けにくいことがわかっています。このタンパク質が翻訳後修飾を受けている形跡が見られないことから¹⁶⁾、両者の物質的な特性の違いは化学的な修飾ではなくてコンフォメーションの違いによるものであると考えられています。マウス、ハムスターとヒトの PrP の C-末端側で残基番号が 91~231 の PrP^C の溶液中の構造は約 47% が α -ヘリックスで^{17)~19)}、PrP^{Sc} では β -シート構造の比率が約 45% と明らかに高くなっています²⁰⁾。1980 年代から 90 年代にかけて、イギリスで BSE の流行で数百頭のウシが死亡したことにより、TSEs はにわかに脚光を浴びるようになりました^{21)~23)}。新しいタイプの TSE は人類でも variant-CJD (v-CJD) として発見され、BSE に感染したウシの消費と関連することがわかってきました²⁴⁾。v-CJD は、汚染された医療器具の使用や輸血によって、医療現場でヒトからヒトへと感染することが知られています²⁵⁾。v-CJD の潜伏期間が 40 年以上であることから、イギリスでは多くの人が無症候性キャリアであると考えられています²⁶⁾。ごく最近まで、すべての v-CJD 患者のプリオンタンパク質遺伝子 *PRNP* の 129 番目のコドンがメチオニンのホモ接合体 (homozygous)*2 と考えられていました。

*2 ホモ接合型 (ホモせつごうがた) は、同型接合体とも呼ばれ、遺伝学において、2 倍体生物のある遺伝子座が AA, aa のように同じ対立遺伝子からなる状態のこと。このような遺伝子型をホモ接合型 (またはホモ接合体) といい、Aa のように異なった対立遺伝子をもつ遺伝子型をヘテロ接合型という。

v-CJD の前臨床で、以前に v-CJD のキャリアから輸血を受けた患者のことについて 2004 年に報告がなされています²⁷⁾。この患者の PRNP の 129 番目のコドンはヘテロ接合体 (heterozygous)*2 であったことから、v-CJD はホモ接合体の PRNP の遺伝子型とは限らないことが示唆されました。ヘテロ接合体の遺伝子型は人口に占める割合が最も大きい遺伝子のサブグループですから、このことは、イギリスでの将来の CJD 患者の数を推計するうえでの指針となりました²⁸⁾。そして、多くの人が無症候性キャリアであることを知らずに血液を提供している可能性があることから、輸血の安全対策への関心が高まりました。現在まで、プリオン病の正確な診断には、臨床のさまざまなステージを経た後での、脳組織の解剖学的検査が必要とされてきました。しかし今では、PrP^{Sc} の会合が見られたら明確にプリオン病と断言できます。プリオン病の拡大を防ぐという意味だけではなく、将来、臨床での良い成果を得るためにも、前臨床での高感度で非侵襲性試験の開発が望まれています。そしてこのような状況下、有意義で可能性の高いアプローチは、変性したプリオンタンパク質を非侵襲的に検出することと思われます。

生体から抽出されたプリオンタンパク質や、リコンビナント・プリオンタンパク質について、その構造を特定するさまざまな実験が繰り返されました。円二色性 (circular dichroism; CD)、フーリエ変換型赤外分光 (Fourier transform infrared spectroscopy; FTIR)、核磁気共鳴、電子常磁性共鳴 (electron paramagnetic resonance; EPR) が幅広くプリオンの探索に用いられてきました。質量分析では、PrP の一次構造解析と翻訳後修飾についての研究が報告されています^{29)~36)}。ESI のようなソフトイオン化では分子構造の詳細な情報が得られます。タンパク質の構造の違いの解析に質量分析が用いられ始めると、プリオンタンパク質についてのチャレンジもなされましたが、分析された質量には差は見られませんでした。質量分析分野での最近の進展は、イオンモビリティ・マスマススペクトロメトリを質量分析計に取り付けた装置が開発されたことです。この開発により、PrP の異なる構造を研究することができるようになり、将来プリオン病の診断へと展開できる可能性が出てきました。

4. IM-MS を用いたプリオンタンパク質の研究

ここでは、ESI-IM-MS (electrospray ionization ion mobility mass spectrometry) を用いた、シリアンハムスター (Syrian hamster) のリコンビナント・プリオンタンパク質 SHaPrP(90-231) の構造解析について、Hilton らの論文をもとに解説いたします⁷⁾。哺乳類の PrP のアミノ酸配列は極めて良く保存されており、ヒトとシリアンハムスターのプリオンタンパク質では、全アミノ酸配列の内 18 残基のみが異なるだけです。彼らは、SHaPrP(90-231) を、 α -ヘリックス構造と β -シートを多く含む構造にリフォールディングさせ実験に用いています。 m/z が同じで構造が異なる α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich

SHaPrP(90-231) をイオンモビリティでは分離が可能です。平均回転断面積は計算で出しています。そして、コンフォメーションの異なる異性体を形によって分離するイオンモビリティの能力と、IM-MS を存命中の診断に用いることの見通しの評価もしています。

4.1 実験

イオンモビリティ質量分析の実験をよりよく理解するために、プリオンタンパク質とリコンビナント・プリオンタンパク質の関係を、Fig. 4 で説明しておきます。プリオンタンパク質は、通常は α -ヘリックス含量が多く生体の中で正常に機能しています。この正常型プリオンタンパク質を一般的に PrP^C と表記します。PrP^C が生体の中で、 β -シート含量の高い異常型プリオンタンパク質に転換することがあります。異常型プリオンタンパク質を一般的に PrP^{Sc} と表記します。PrP^C が PrP^{Sc} に転換する原因となるのが、外部から生体に進入した PrP^{Sc} といわれています。PrP^{Sc} は会合することによりアミロイド線維となり、脳内に蓄積しプリオン病を引き起こします。

生体から得られるタンパク質を実験に用いるには、種々の規制やさまざまな障害がありますから、一般的にはリコンビナントタンパク質を実験に用います。ここでは、ヒトのプリオンタンパク質と相同性の高いシリアンハムスターのリコンビナント・プリオンタンパク質を用いて実験をしています。Fig. 4 の SHaPrP(90-231) がそうです。SHaPrP(90-231) を酸化的条件下でリフォールディングさせると、 α -ヘリックス含量の高い α -helical SHaPrP(90-231) が得られます。この α -helical SHaPrP(90-231) を生体内の PrP^C のモデルとして、IM-MS の実験を行っています。 α -helical SHaPrP(90-231) を、pH 5.5 の 5 mM ギ酸アンモニウム中で、70°C、24 時間インキュベーションすると、 β -シート含量の高い β -sheet-rich SHaPrP(90-231) が得られます。この β -sheet-rich SHaPrP(90-231) を生体内の PrP^{Sc} のモデルとして、IM-MS の実験を行っています。

4.1.1 SHaPrP(90-231) の発現・精製・リフォールディング

プロテアーゼ欠損株大腸菌にアルカリフォスファターゼプロモーターを組み込んで、シリアンハムスターのリコンビナント・プリオンタンパク質 SHaPrP(90-231) を発現しています³⁷⁾。封入体 (inclusion body)*3 としてプリオンタンパク質は得られますので、Fig. 4 に示したようにこれを精製後、酸化的条件下で α -ヘリックス構造にリフォールディングします³⁸⁾。

pH 5.5 の 5 mM ギ酸アンモニウム中で、100 μ M の α -helical SHaPrP(90-231) を 70°C、24 時間インキュベーションする Martins らの方法を用いて、 α -helical SHaPrP

*3 大腸菌などの宿主にとって、組換えタンパク質は本来発現されない「異物」です。この異物が細胞質内へ過剰発現されるときに、発現量、発現速度、タンパク質の性質によっては封入体と呼ばれる不溶性の凝集体を形成することがあります。

(90-231) を β -sheet-rich SHaPrP(90-231) に変換します³⁹⁾。

4.1.2 ドリフトセル・イオンモビリティ質量分析 (drift cell ion mobility mass spectrometry; DCIM-MS)

衝突断面積の測定に、ホームメイドの装置を用いて正イオンの測定を行っています⁸⁾。Fig. 2 で説明します。ESI で生成したイオンを、5 Torr (666.5 Pa) のヘリウムを充填させたイオンドリフトセルにパルス状に導入します。イオンドリフトセルを出たイオンは、四重極マスフィルターで質量を選ばれ、到達時間 (arrival time) として記録されます。イオンの到達時間頻度分布 (arrival time distributions; ATDs), イオンドリフトセルの長さ、ドリフト電圧、温度、ヘリウムの圧力などをもとに、衝突断面積の計算を行います⁴⁰⁾。

4.1.3 T-Wave イオンモビリティ質量分析 (T-Wave ion mobility mass spectrometry; T-Wave-IM-MS)

すべての T-Wave-IM の実験は、Waters から Synapt HDMS として市販されている、四重極-イオンモビリティ-直行加速飛行時間質量分析計 (quadrupole-ion mobility-orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer) を用いています。この装置に、ナノフローの ESI イオン源を付け、イオン源の温度を 90°C、コーン電圧を 40 V とし、ダイレクトインフュージョンで試料溶液をイオン源に導入します。Synapt HDMS に関する技術的な詳細はすでに報告されています⁴¹⁾。Fig. 3 で説明します。装置は、トラップと呼ばれるイオンガイド、イオンモビリティセル、それからトランスファーと呼ばれるレンズ部分の三つの traveling wave (T-Wave) で構成されています。トラップの役割は、イオンを溜め込んだ後まとめてイオンモビリティセルに送り込むことです。イオンモビリティセルではイオンを移動度の違いで分離します。トランスファーの役割は、移動度の違いで分離されたイオンを oa-TOF に運ぶことです。T-Wave-IM には、0.55 mbar (55 Pa) の窒素が緩衝ガスとして充填されています。電圧は 9 V、速度は 300 m/s です。

90 μ s の繰り返しの直交加速で 200 回 TOF に導入してスペクトルを得ます。その結果、イオンモビリティの実験は、18.0 ms の時間枠で行われることになります。TOF アナライザーは分解能を 7,000 (FWHM) にするために V-optic モードとし、1 秒間に 2 スペクトルを採取し、測定切り替え (interscan delay) は 100 ms です。データの採取と加工には MassLynx (ver.4.1) (Waters) を用いています。

4.1.4 T-Wave-IM で衝突断面積を求めるときのキャリブレーション (T-Wave cross-section calibration)

T-Wave-IM で衝突断面積を求めるためのキャリブレーション法の確立についてはすでに報告されています^{6), 10), 11), 41), 42)}。この実験でのキャリブレーションは、

Thalassions らが確立した方法で行っています⁹⁾。0.1%ギ酸を含む 50%アセトニトリル水溶液に、Sigma-Aldrich 社製のウマミオグロビンを溶解し 10 μ M の濃度にし、ドリフトタイム・イオンモビリティ質量分析計 (drift-time ion mobility mass spectrometry) で得られた値を対照として測定します⁴³⁾。得られた到達時間は、T-Wave-IM 外にイオンが存在した時間を除外して補正します。すなわち、質量に依存しないトランスファー領域にいた時間と、質量に依存するトランスファー領域と TOF アナライザーにいた時間は控除してあります。標準化された衝突断面積を、補正された到達時間に累乗近似 (power series fit)^{*4)} でプロットします。T-Wave-IM では、ペプチドのような低分子でキャリブレーションした場合には直線関係が得られるので、低分子化合物を測定する場合にはより精度が上がります⁹⁾。異なる pH で SHaPrP(90-231) の平均回転断面積を見積もっています。この方法を用いる際には、到達時間を補正^{*5)}された較正用標準試料を用いて、較正したい成分の補正された到達時間を補正^{*5)}しなければなりません。較正用標準物質の衝突断面積の分布を用いて、較正したい成分の衝突断面積の分布を補正することと混同しないようにしなければいけません⁴⁴⁾。ここでのプリオンタンパク質の研究では、補正された到達時間と、報告されている到達時間は、累乗近似曲線により非常に近い値を示しています。衝突断面積の較正を行い、それを使用するための、Excel の表計算ソフトは (<http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/bio/research/jscrivens/>) から供給されています。URL にアクセスし、Synapt Calibration → Excel spreadsheet でダウンロードできます。

4.1.5 ESI 質量分析計

すべての ESI 質量分析の実験には、四重極直行加速飛行時間質量分析計 (quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer) (Q-TOF I; Waters) を用いています。この装置に、ナノフローの ESI イオン源を付け、イオン源の温度を 80°C、コーン電圧を 40 V とし、ダイレクトインフュージョンで試料溶液をイオン源に導入します。

TOF アナライザーは分解能を 5,000 (FWHM) にするために V-optic モードとし、1 秒間に 2 スペクトルを採取し、測定切り替え (interscan delay) は 100 ms です。データの採取と加工には MassLynx (ver.4.0) (Waters) を用いています。

4.1.6 ESI 用の試料調製

SHaPrP(90-231) を pH 5.5 の 10 mM ギ酸アンモニウムに、10 μ M になるように溶かします。pH 5.5 と pH 7.0

*4 累乗近似曲線は、レーシングカーの加速を 1 秒間隔で計測した値など、特定の率で増加する計測値を比較するデータセットをグラフにする場合に最適な曲線です。データにゼロまたは負の値が含まれている場合は、累乗近似曲線は作成できません。

*5 IM T-Wave 外にイオンが存在した時間を除外して補正すること。

で試料の分析を行っています。0.1%アンモニア水を pH 5.5 の溶液に添加して、pH 7.0 の溶液を調製します。pH 5.5 と pH 7.0 の溶液を、インフュージョンで ESI-MS に導入して分析します。 β -シートの含有率の高い試料は、ESI-MS に導入する前に超音波照射し、素早くスプレーするようにします。

4.2 結果

4.2.1 α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の ESI-MS

3 時間から 6 時間の短い時間であれば、プリオンタンパク質は二つの異なる pH の環境で存在できます^{45)~48)}。一つは細胞内に存在する弱酸性の状態のときで、もう一つは GPI アンカーを介して細胞膜に結合している中性の状態です。このことを考慮して、コンフォメーションの異なるプリオンタンパク質である α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の解析は、pH 5.5 と pH 7.0 の二つの条件で行われています。この二つのタンパク質は、アミノ酸配列は全く同じですので質量も同じで、異なるのは二次構造のみです。MS 単独では、このように二次構造が異なっても同じ質量のものを分離することは不可能です。事実、pH 5.5 で測定された α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の ESI マススペクトルの多価イオンの分布状態は同じです。デコンボリューションで得られたピークは、SHaPrP(90-231) の酸化型の分子質量 (molecular mass) 16,240 Da に相当します^{15), 49)}。

4.2.2 α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の分光学的データ

α -ヘリックスが多い PrP^C が、 β -シートが多く会合をしやすい異性体に変化することが、プリオン病の分子レベルでの重要な出来事です。リコンビナント・プリオンタンパク質は α -helical SHaPrP(90-231) にも β -sheet-rich SHaPrP(90-231) にもリフォールディングできます。PrP を pH 5.5 で酸化的な非変性条件化でリフォールディングさせると、 α -helical SHaPrP(90-231) を得ることができます。 α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) が、それぞれ α -ヘリックスと β -シート含量が多いことは、分光学的に確認されています。Fig. 5 に、分光学で得られたデータをまとめてあります。質量以外のデータは α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP

(90-231) では異なることがわかります。以下個々に説明します。 α -helical SHaPrP(90-231) は、円二色性スペクトルで 208 nm と 222 nm に極小をもち、FTIR スペクトルでは対称のアミド I の吸収極大を $\sim 1,660\text{ cm}^{-1}$ にもっています。CD と FTIR の結果は、このタンパク質が α -ヘリックス構造をもっていることを示しています。 α -helical SHaPrP(90-231) を 70°C で 24 時間インキュベーションすると、 α -ヘリックス構造が崩れて、 β -シートが増加してきます³⁹⁾。一方、 β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の円二色性スペクトルは、 $\sim 217\text{ nm}$ に極小をもっており、 β -シート構造が多いことを示しています。FTIR のアミド I の吸収も、 α -helical SHaPrP(90-231) とは明瞭に異なる $1,627\text{ cm}^{-1}$ に吸収を示し、 β -シート構造の特徴をもっています。電子顕微鏡で β -sheet-rich SHaPrP(90-231) を観察すると、直径が 10 nm 程度の柔らかい繊維状の構造が見られます。この β -sheet-rich SHaPrP(90-231) を、直接 ESI-IM-MS で測定しようとしても、安定したスプレーを得ることができません。この問題を解決するために、超音波浴で 15 分間超音波を照射して会合を解いて得られた低分子の試料を ESI-IM-MS に導入しています。この試料を電子顕微鏡で観測したところ、タンパク質の大きな会合は見られず、小さな塊になっていることがわかりました。ただし、CD スペクトルでは、 β -シートをもつ二次構造は保持されていることが確認されています。

実際のプリオン病では、 α -helical PrP のコンフォメーションが変化して、数種類の β -sheet-rich PrP になるといういくつかの仮説があります^{50), 51)}。そして、この β -sheet-rich PrP が沈殿となってプリオン病を引き起こすと考えられています。この実験で調製された β -sheet-rich PrP のモノマーは、*in vitro* や *in vivo* で観測されているもののうちの一つに相当すると考えられます。CD と電子顕微鏡によると、 β -sheet-rich PrP の試料は会合しやすく、しかもかなり高分子状になりやすいと思われます。高分子状の試料は、ナノスプレー ESI のチップに詰まりやすいので、モノマーまたは低分子量のオリゴマーの試料を用いて実験を行う必要がありますので、ここでは 15 分間超音波を照射してできたモノマーを用いています。

Fig. 5. CD, FTIR, electron microscopy and ESI-MS data.

4.2.3 pH 7.0 での α -helical SHaPrP(90-231) の T-Wave-IM と DCIM の解析

α -helical SHaPrP(90-231) について、pH 7.0 で T-Wave-IM と DCIM の解析を行っています。T-Wave-IM の結果から見積もった α -helical SHaPrP(90-231) の衝突断面積と、DCIM で実際に測定した衝突断面積の比較です。ESI で得られる荷電状態の異なる α -helical SHaPrP(90-231) の多価イオン、 $[M+7H]^{7+}$ から $[M+15H]^{15+}$ について測定断面積と見積もり断面積を比較しています⁵²⁾。DCIM の測定では、緩衝ガスに 5 Torr (666.5 Pa) のヘリウムを用いており、T-Wave-IM の測定では 0.55 mbar (55 Pa) の窒素を用いています。このように異なる緩衝ガスを用いて、しかも異なる圧力での DCIM と T-Wave-IM の実験結果はよく一致していますし、このことは、2009 年の論文でも同じように報告されています⁹⁾。 β -sheet-rich SHaPrP(90-231) は会合しやすいですが、 α -helical SHaPrP(90-231) からの転移直後には分析することができません。超音波照射後の β -sheet-rich SHaPrP(90-231) は、スプレー開始後数分で会合し始めることが観測されています。そして、会合体がサンプルチップに詰まってしまう、それ以上のデータを得ることはできていません。マスペクトルと arrival time distribution (ATD) の情報を、比較的短時間で同時に得ることができるのが T-Wave-IM の利点です。サンプルチップが詰まるまでの 5 分間に得られるデータを合算して平均化することにより、質の良いデータを得ることができます。同質のデータを DCIM で得るにはより長時間を必要としますので、 β -sheet-rich SHaPrP(90-231) を解析するには T-Wave-IM は優れた方法といえます。タンパク質が溶液中の構造を保持するためには、MS の測定に要する時間は重要です。タンパク質が気相に存在するときには、30~60 ms で気相に適した構造に変わっていくといわれています⁵³⁾。T-Wave-IM の測定時間は、15~30 ms ですから、タンパク質が液相の構造を保つことができる範囲に入っています⁵⁴⁾。一方、DCIM と T-Wave-IM の結果が極めてよく一致しているということから、DCIM を測定しているときにもタンパク質は同じ構造を保っていることがわかります。

4.2.4 T-Wave-IM による pH 5.5 における α -helical SHaPrP (90-231) と β -sheet-rich SHaPrP (90-231) の見積もり断面積

コンフォメーションの異なる異性体 α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) を、それぞれ pH 5.5 で ESI でイオン化し T-Wave-IM の実験を行っています。Fig. 6 に、pH 5.5 で測定した T-Wave-IM から見積もった $[M+6H]^{6+}$ から $[M+17H]^{17+}$ の見積もり断面積と、 $[M+15H]^{15+}$ から $[M+17H]^{17+}$ の見積もり断面積の拡大図を示してあります。この実験では、二つの異性体を分離し、それぞれのマスペクトルも測定しています。 α -helical SHaPrP(90-231) (■) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) (◆) の差が~3%とわずかながら見られるのは、 $[M+13H]^{13+}$ から $[M+17H]^{17+}$ の間です。この間では、

Fig. 6. Comparison of estimated cross-sections for different charge states of α -helical SHaPrP(90-231) (■) and predominantly β -sheet SHaPrP(90-231) (◆), at pH 5.5. Inset: Enlarged image of charge states $[M+15H]^{15+}$ to $[M+17H]^{17+}$ showing the differences in the estimated cross-sections between the α -helical and predominantly β -sheet conformational isoforms. This article appeared in *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 845 (2010), Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, Copyright permission of Elsevier. This article was published in *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 845 (2010), G. R. Hilton, K. Thalassinou, M. Grabenauer, N. Sanghera, S. E. Slade, T. Wytttenbach, P. J. Robinson, T. J. T. Pinheiro, M. T. Bowers, and J. H. Scrivens, Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, Copyright permission of Elsevier.

α -helical SHaPrP(90-231) の平均回転断面積が β -sheet-rich SHaPrP(90-231) のそれよりも小さいことがわかります。またこの図で、6 価から 17 価とプロトン化が進むほど見積もり回転断面積がしだいに大きくなることから、価数が大きくなるに従い、静電的な反発によりタンパク質の形が緩んでくることもわかります。そして、9 価以下の荷電が低いエリアでは、 α -SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) が重なることから、二つの異性体の見積もり回転断面積に差がないこともわかります。

4.2.5 pH 5.5 と pH 7.0 における α -helical SHaPrP (90-231) と β -sheet-rich SHaPrP (90-231) の ATD

個々の荷電状態のイオンの ATD も、二つの異性体には明確な差があります。pH 5.5 における α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の、 $[M+9H]^{9+}$ と $[M+10H]^{10+}$ の ATD を Fig. 7 に示してあります。アスタリスクの付いているピークは、Fig. 6 の衝突断面積には含まれていません。Fig. 7(a) を見ると、 α -helical SHaPrP(90-231) の $[M+9H]^{9+}$ の ATD の半値幅は β -sheet-rich SHaPrP(90-231) のその 1.6 倍です。このときの半値幅は、Fig. 7(a) のふた山のピークをまとめた幅のことです。2 番目の α -helical SHaPrP(90-231) の ATD のピークの半値幅は β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の 1.4 倍

Fig. 7. Comparison of α -helical SHaPrP(90-231) (α) and predominantly β -sheet SHaPrP(90-231) (β) selected arrival time distributions (ATDs) for charge state $[M+9H]^{9+}$ and $[M+10H]^{10+}$. (a) Overlaid ATDs for charge state $[M+9H]^{9+}$ at pH 5.5. (b) Overlaid ATDs for charge state $[M+10H]^{10+}$ at pH 5.5. (c) Overlaid ATDs for charge state $[M+9H]^{9+}$ at pH 7.0. (d) Overlaid ATDs charge state $[M+10H]^{10+}$ at pH 7.0. Peaks labeled with an asterisk are not included in the estimated cross-section plot. This article appeared in *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 845 (2010), G. R. Hilton, K. Thalassinou, M. Grabenauer, N. Sanghera, S. E. Slade, T. Wyttenbach, P. J. Robinson, T. J. T. Pinheiro, M. T. Bowers, and J. H. Scrivens, Structural Analysis of Prion Proteins by Means of Drift Cell and Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry, Copyright permission of Elsevier.

です。同様のことが Fig. 7(b) の $[M+10H]^{10+}$ でも観測されます。ここで、Fig. 7(a) と (b) で、 α -helical SHaPrP(90-231) の幅が相対的に広いのは、この ATD のピークの中に、衝突断面積の違いが 3% 以下でコンフォメーションが異なるいくつかの α -helical SHaPrP(90-231) が含まれている可能性を示しています。3%以下というのは、このイオンモビリティ手法では、3%以上の断面積の違いは区別できるからです¹⁰。pH 7.0 の ATD の実験では、各ピークの形・サイズ・強度には違いが見られません。Fig. 7(c) と (d) の $[M+9H]^{9+}$ と $[M+10H]^{10+}$ の ATD から、pH 7.0 における α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) のコンフォメーションは、Fig. 7(a) と (b) の pH 5.5 の β -sheet-rich SHaPrP(90-231) のコンフォメーションと同じであることがわかります。

4.2.6 T-Wave-IM による pH 7.0 における α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の衝突断面積

0.1% のアンモニア水を用いて、pH 7.0 にした試料について T-Wave-IM の実験を行っています。pH 7.0 でも、6 価から 17 価とプロトン化が進むほど見積もり回転断面積がしだいに大きくなることは pH 5.5 と全く同じでした。したがって、静電的な反発によりタンパク質の形が緩んでくることは、pH 5.5 でも pH 7.0 でも同様ということがわかります。また pH 5.5 で見られた、 $[M+13H]^{13+}$ から $[M+17H]^{17+}$ の間での α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の見積もり回転断面積の差

は、pH 7.0 では見られないことから、pH 7.0 ではどの価数でも二つの異性体の見積もり回転断面積に差がないこともわかります。

4.2.7 バリデーション

一連の実験では、ウマミオグロビンと α -helical SHaPrP(90-231) を用いて、pH 7.0 で ATD と見積もり断面積の再現性と精度を求めることにより、装置自体のバリデーションを行っています。そして、T-Wave-IM-MS を用いたコンフォメーション異性体のどの実験でも事前にバリデーション実験を行っています。その結果、ATD のデータの再現性は ± 1 scan 以内でした。そして、バリデーション実験の結果から、pH 5.5 での α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) の差は、実験誤差ではなくてコンフォメーションの違いを反映しているといえます。そして、pH を上げていくとコンフォメーションの差はだんだん見られなくなっていくます。

4.2.8 pH 5.5 と pH 7.0 での ESI-TOF

α -helical SHaPrP(90-231) と β -sheet-rich SHaPrP(90-231) について、イオンモビリティの分離をせずに、直交加速飛行時間質量分析計 (orthogonal acceleration TOF mass spectrometer, oaTOF) のみで pH 5.5 と pH 7.0 で ESI-MS を測定しています。oaTOF と T-Wave-IM-MS を測定した MS のデータを比較すると、これら 2 組のデータはたいへんよく一致しています。このことは、イオンモビリティセルでは、コンフォメーションの異なる異性体を十分に分離でき、しかも質の高い MS データを得ることが

できることを示しています。

5. 最 後 に

同じ質量の化合物を分離できない質量分析最大の弱点を、イオンモビリティ質量分析は克服しています。プリオンタンパク質の研究のみならず、天然変性タンパク質のように他の分光学的手法では研究が困難なタンパク質への展開が期待されます。また、光学活性異性体に光学活性な修飾を施すことにより、質量が同じ低分子化合物の分離分析が可能となるかもしれません。今後の研究に期待がもてる装置であると思われます。

文 献

- 1) S. B. Prusiner, *Science*, **216**, 136 (1982).
- 2) P. B. Sigler, *Nature*, **333**, 210 (1988).
- 3) J. C. Wootton and S. Federhen, *Methods Enzymol.*, **266**, 554 (1996).
- 4) P. E. Wright and H. J. Dyson, *J. Mol. Biol.*, **293**, 321 (1999).
- 5) 西村善文, 中村春木, 蛋白質 核酸 酵素, **52**, 937 (2007).
- 6) B. T. Ruotolo, L. P. Benesch, A. M. Sandercock, S.-J. Hyung, and C. V. Robinson, *Nature Protocols*, **3**, 1139 (2008).
- 7) G. R. Hilton, K. Thalassinios, M. Grabenauer, N. Sanghera, S. E. Slade, T. Wytttenbach, P. J. Robinson, T. J. T. Pinheiro, M. T. Bowers, and J. H. Scrivens, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**, 845 (2010).
- 8) T. Wytttenbach, P. R. Kemper, and M. T. Bowers, *Int. J. Mass Spectrom.*, **212**, 13 (2001).
- 9) K. Thalassinios, M. Grabenauer, S. E. Slade, G. R. Hilton, M. T. Bowers, and J. H. Scrivens, *Anal. Chem.*, **81**, 248 (2009).
- 10) C. A. Scraff, K. Thalassinios, G. R. Hilton, and J. H. Scrivens, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 3297 (2008).
- 11) B. T. Ruotolo, K. Giles, I. Campuzano, A. M. Sandercock, R. H. Bateman, and C. V. Robinson, *Science*, **310**, 1658 (2005).
- 12) R. S. Hegde, J. A. Mastrianni, M. R. Scott, K. A. Defea, P. Tremblay, M. Torchia, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, and V. R. Lingappa, *Science*, **276**, 827 (1998).
- 13) K. M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, F. E. Cohen, and S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10962 (1993).
- 14) J. Collinge and M. S. Palmer, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 448 (1992).
- 15) S. B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 13363 (1998).
- 16) N. Stahl, M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlinane, and S. B. Prusiner, *Biochemistry*, **32**, 1991 (1993).
- 17) R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, and K. Wuthrich, *FEBS Lett.*, **413**, 282 (1997).
- 18) D. G. Donne, J. H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T. L. James, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, P. E. Wright, and H. J. Dyson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 13452 (1997).
- 19) R. Zahn, A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, F. L. Garcia, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, and K. Wuthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 145 (2000).
- 20) K. M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. Fletterick, and F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 10962 (1993).
- 21) R. H. Dabaghian, P. P. Mortimer, and J. P. Clewley, *Rev. Med. Virol.*, **14**, 345 (2004).
- 22) R. Khamisi, *Nature*, **439**, 134 (2006).
- 23) P. Brown, R. G. Will, R. Bradley, D. M. Asher, and L. Detwiler, *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 6 (2001).
- 24) J. Collinge, *Lancet*, **354**, 317 (1999).
- 25) C. A. Llewelyn, P. E. Hewitt, R. S. Knight, K. Amar, S. Cousins, J. Mackenzie, and R. G. Will, *Lancet*, **363**, 417 (2004).
- 26) J. W. Ironside, M. T. Bishop, K. Connolly, D. Hegazy, S. Lowrie, M. Le Grice, D. L. Ritchie, L. M. McCardle, and D. A. Hilton, *BMJ*, **332**, 1186 (2006).
- 27) A. H. Peden, M. W. Head, L. R. Diane, E. B. Jeanne, and W. I. James, *Lancet*, **364**, 527 (2004).
- 28) D. A. Hilton, A. C. Ghani, L. Conyers, P. Edwards, L. McCardle, D. Ritchie, M. Penney, D. Hegazy, and J. W. Ironside, *J. Pathol.*, **203**, 733 (2004).
- 29) K. Qin, Y. Yang, P. Mastrangelo, and D. Westaway, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1981 (2002).
- 30) J. R. Requena, D. Groth, G. Legname, E. R. Stadtman, S. B. Prusiner, and R. L. Levine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7170 (2001).
- 31) R. M. Whittal, H. L. Ball, F. E. Cohen, A. L. Burlingame, S. B. Prusiner, and M. A. Baldwin, *Protein Sci.*, **9**, 332 (2000).
- 32) B. Onisko, I. Dynin, J. R. Requena, C. J. Silva, M. Erickson, and J. M. Carter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1070 (2007).
- 33) J. W. Back, M. A. Sanz, L. De Jong, L. J. De Koning, L. G. Nijtmans, C. G. De Koster, L. A. Grivell, H. Van Der Spek, and A. O. Muijsers, *Protein Sci.*, **11**, 2471 (2002).
- 34) M. J. Pushie, A. R. Ross, and H. J. Vogel, *Anal. Chem.*, **79**, 5659 (2007).
- 35) B. Maras, D. Barra, M. E. Schinina, F. Cardone, and M. Pocchiari, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **10**, 371 (2004).
- 36) S. Principe, B. Maras, M. E. Schinina, M. Pocchiari, and F. Cardone, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **11**, 697 (2008).
- 37) I. Mehlhorn, D. Groth, J. Stockel, B. Moffat, D. Reilly, D. Yansura, W. S. Willett, M. Baldwin, R. Fletterick, F. E. Cohen, R. Vandlen, D. Henner, and S. B. Prusiner, *Biochemistry*, **35**, 5528 (1996).
- 38) N. Sanghera and T. J. T. Pinheiro, *J. Mol. Biol.*, **315**, 1241 (2002).
- 39) S. M. Martins, D. J. Frosoni, A. M. Martinez, F. G. De Felice, and S. T. Ferreira, *J. Biol. Chem.*, **281**, 26121 (2006).
- 40) J. Gidden, A. Ferzoco, E. S. Baker, and M. T. Bowers, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15132 (2004).
- 41) J. L. Wildgoose, K. Giles, S. D. Pringle, S. J. Koeniger, R. H. Valentine, R. H. Bateman, and D. E. Clemmer, *Proc. 54th ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Seattle (January, 2005).
- 42) J. H. Scrivens, K. Thalassinios, G. R. Hilton, S. E. Slade, T. J. T. Pinheiro, R. H. Bateman, and M. T. Bowers, *Proc. 55th ASMS Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Indianapolis (June, 2006).
- 43) D. E. Clemmer, <http://www.indiana.edu/clemmer/>
- 44) M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz, and M. F. Jarrold, *J. Phys. Chem.*, **100**, 16082 (1996).
- 45) B. Caughey, R. E. Race, D. Ernst, M. J. Buchmeier, and B. Chesebro, *J. Virol.*, **63**, 175 (1989).
- 46) D. R. Borchelt, M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl, and S. B. Prusiner, *J. Cell. Biol.*, **110**, 743 (1990).
- 47) B. Caughey and G. J. Raymond, *J. Biol. Chem.*, **266**, 18217 (1991).

- 48) Y. Yedidia, L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, and A. Taraboulos, *EMBO J.*, **20**, 5383 (2001).
- 49) L. L. Hosszu, C. R. Trevitt, S. Jones, M. Batchelor, D. J. Scott, G. S. Jackson, J. Collinge, J. P. Waltho, and A. R. Clarke, *J. Biol. Chem.*, **284**, 21981 (2009).
- 50) J. Li, S. Browning, S. P. Mahal, A. M. Oelschlegel, and C. Weissmann, *Science*, **327**, 869 (2010).
- 51) P. Gambetti, Z. Dong, J. Yuan, X. Xiao, M. Zheng, A. Alshekhlee, R. Castellani, M. Cohen, M. A. Barria, D. Gonzalez-Romero, E. D. Belay, L. B. Schonberger, K. Marder, C. Harris, J. R. Burke, T. Montine, T. Wisniewski, D. W. Dickson, C. Soto, C. M. Hulette, J. A. Mastrianni, Q. Kong, and W. Q. Zou, *Ann. Neurol.*, **63**, 697 (2008).
- 52) doi:10.1016/j.jasms.2010.01.017
- 53) E. R. Badman, S. Myung, and D. E. Clemmer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 1493 (2005).
- 54) T. Wyttenbach, M. Grabenauer, K. Thalassinou, J. H. Scrivens, and M. T. Bowers, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 437 (2010).

Keywords: Ion mobility mass spectrometry, Prion proteins