

Title	生体関連高分子量物質の質量分析による分子量測定
Author(s)	桜井, 達; 松尾, 武清
Citation	大阪大学低温センターだより. 1991, 73, p. 1-4
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/4195
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

生体関連高分子量物質の質量分析による分子量測定

教養部 桜井 達・松尾 武清 (豊中5231)

1. はじめに

近年のバイオテクノロジーの進歩にともない、タンパク質、核酸、酵素など、生体に関連する物質の構造や機能の研究が広く行なわれている。生体関連物質の分析や同定、構造の解析には、まず第一に、目的とする物質の分子量を決定しなければならない。分子量の測定には、浸透圧法、沈降分析法などいろいろな方法があるが、物質の分子量を小数点以下まで精密に決定できるのは質量分析法のみである。質量分析では、分析のために試料をイオンにするが、従来のイオン化法で作られるイオンは分子内の化学結合が切れたフラグメントイオンである。そして分子量が直接測定できる分子イオン(分子がそのままイオンになったもの)は、生体高分子量物質の試料では生成されなかった。しかし、高分子量物質のイオン化法として、数keVのエネルギーのイオンを衝突させて試料を分子イオンにする方法(SIMSイオン化法)が開発され、分子量数千までの有機化合物の分子イオンが得られるようになった。¹⁾我々は、大阪府立母子保健総合医療センターの和田芳直博士と共同で、構造変異性タンパク質の研究を行なっている。ここでは、まず目的のタンパク質を酵素で消化して、分子量3千までの小さなペプチドの混合物にする。そして、それぞれのペプチドの分子量を質量分析により測定する。この手法で、構造変異性ヘモグロビン数十例の一次構造を決定した。²⁾しかしここで、タンパク質がそのまま分子イオンになれば、酵素消化の必要なくその分子量が決定できることになる。我々は、高分子量物質の分子量測定を可能にするために、大型質量分析装置の開発を行なった。その結果、分子量が1万を越えるタンパク質の分子量を測定することができた。ここでは、高分子量物質の分子量決定法とその結果について述べる。

2. 実験および結果

電磁石を用いた質量分析装置では、発生できる磁束密度に上限があるので、高分子量物質の分析には大型の装置が必要になる。生体高分子量物質の分析を目的として、教養部物理学教室に全長9mの大型質量分析装置が建設された。³⁾(表紙の図参照)この装置で測定できる質量範囲は、イオン加速10 keVの場合25,000 uにおよぶ。この装置は3組の静電四重極レンズを用い、高い質量分解能と高いイオン透過率が得られるように設計されている。今回、高分子量物質を効率良くイオン化するために、試料に衝突させるイオンのエネルギーを20 keVに高めた。

生体関連物質は炭素を骨格とし、水素、窒素、酸素、リン、イオウおよび微量の金属元素から成る。主要な元素の原子量、天然に存在する同位体の原子質量およびその存在比を表1にあげる。(1985年IUPAC)⁴⁾ここでリン以外は2種以上の天然同位体が存在するが、いずれも、もっとも質量数の小さい同位体が元素全体の95%以上をしめている。その同位体原子(¹²C, ¹H, ¹⁴N, ¹⁶O, ³¹P, ³²S)から構成される分子をモノアイソトープという。質量分析では、分子量としてモノアイソトープ分子の分子量

ANGIOTENSIN III

(精密分子量)を用い、原子量より計算される値は化学分子量として区別している。

図1にホルモンペプチドの一種であるアンギオテンシンIII (C₄₆H₆₆N₁₂O₉, 精密分子量 930.508, 化学分子量 931.10) の高分解能マスペクトルを示す。(質量分解能, $M/\Delta M$ (10%谷) = 25,000) 有機化合物のSIMSイオン化では、分子イオンは分子 (M) にプロトン (H⁺) が付加した [M+H]⁺である。図1-(b)の分子イオン領域を拡大したマスペクトルを見ると、化学分子量にプロトンの質量を加えた932.11uのところには質量ピークは存在していない。強度がいちばん大きな931.52uの質量ピークがモノアイソトープの分子イオンピークである。この測定値より、アンギオテンシンIIIの精密分子量は930.51と決定できる。これが、化学分子量を用いずに精密分子量を使う理由である。化学分子量は、得られた同位体の分布より計算できるが、有機化合物の構造解析には精度の高い精密分子量の方が有用である。質量が

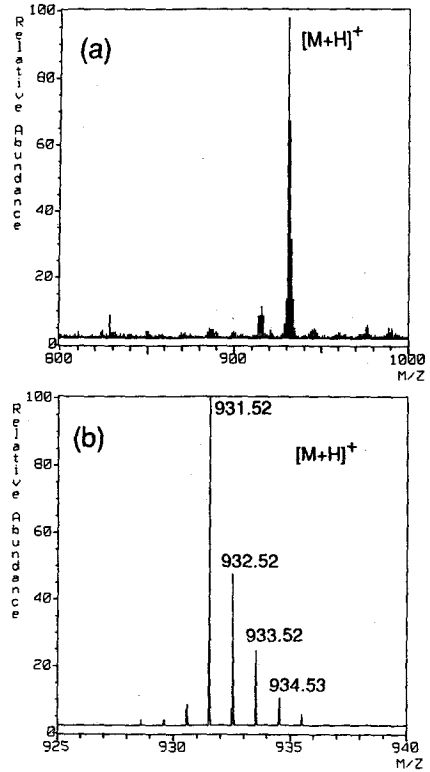


図1. (a) アンギオテンシンIII (C₄₆H₆₆N₁₂O₉, 精密分子量 930.508, 化学分子量931.10) の高分解能マスペクトル。(b) 分子イオン領域を拡大したマスペクトル。

表1 生体関連物質を構成する主要な元素の原子量と天然同位体の原子質量およびその存在比⁹⁾

元素	原子量	核種	原子質量 (u)	存在比 (%)
炭素	12.011(1)	¹² C	12 (定義)	98.90(3)
		¹³ C	13.003 354 839(17)	1.10(3)
水素	1.00784(7)	¹ H	1.007 825 037(10)	99.985(1)
		² H	2.014 101 787(21)	0.015(1)
窒素	14.0067(1)	¹⁴ N	14.003 074 008(23)	99.634(9)
		¹⁵ N	15.000 108 978(38)	0.366(9)
酸素	15.9994(3)	¹⁶ O	15.994 914 64(5)	99.762(15)
		¹⁷ O	16.999 130 6(8)	0.038(3)
		¹⁸ O	17.999 159 39(32)	0.200(12)
リン	30.97376(1)	³¹ P	30.973 763 4(7)	100.000
イオウ	32.066(6)	³² S	31.972 071 8(6)	95.02(9)
		³³ S	32.971 459 1(8)	0.75(1)
		³⁴ S	33.967 867 74(29)	4.21(8)
		³⁶ S	35.967 079 0(16)	0.02(1)

1 u ずつ大きな同位体分子は、ほとんどが炭素の同位体 ^{13}C の影響である。 ^{13}C は炭素全体の1.1%であるから、分子中に炭素原子を90個以上含む場合、質量が1 u 大きな同位体分子がモノアイソトープより多く存在することになる。

分子量数千の物質として、ホルモタンパク質であるインシュリン ($\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$, 精密分子量 5,729.601) の高分解能質量分析の例をあげる。⁹⁾ 表1の同位体の存在比に基づいて計算すると、モノアイソトープ分子は分子全体の3%であり、また ^{13}C を3個含む同位体がいちばん多く存在する。図2に示す分子イオン領域のマススペクトルでそのことが確認できる。この測定の質量分解能は15,000であり、質量が1 u ずつ異なる同位体を完全に分離している。モノアイソトープの分子イオンの質量(5,730.6 u)より、インシュリンの精密分子量として5,729.6と測定される。

分子量1万を越える試料の分析として、抗菌性のタンパク質であるリゾチーム ($\text{C}_{613}\text{H}_{950}\text{N}_{192}\text{O}_{186}\text{S}_{10}$, 精密分子量14,296.799) の例をあげる。得られたマススペクトルを図3に示す。ここまでの分析例では、モノアイソトープを単位質量まで分離して精密分子量を決めていた。リゾチームの場合、モノアイソトープ分子は分子全体の0.02%しか存在しない。また、分子イオンの生成量が少ないので、装置の質量分解能を2,000にさげて測定したため、質量ピークは単位質量まで分離されていない。当初の測定では、分子イオン領域の質量ピーク群の半値幅は350 uであった。この値は、同位体分子の分布(10 u)よりはるかに大きい。質量ピークのひろがり、分子のフラグメントイオンとマトリックスの付加したイオンに由来する。その影響を除くため、質量分析装置のエネルギー分解能を通常の5倍($\pm 0.1\%$)に高めて測定を行なった。その結果、質量ピーク群のひろがり150 uに改善された。(図3)そして、分子イオンピークがフラグメントイオンより分離でき、ピークの重心の質量は14,305.5 uと測定された。この値は化学分子量にプロトンの質量を加えた値(14,307.0 u)に良く一致する。

INSULIN (Bovine Pancreas)

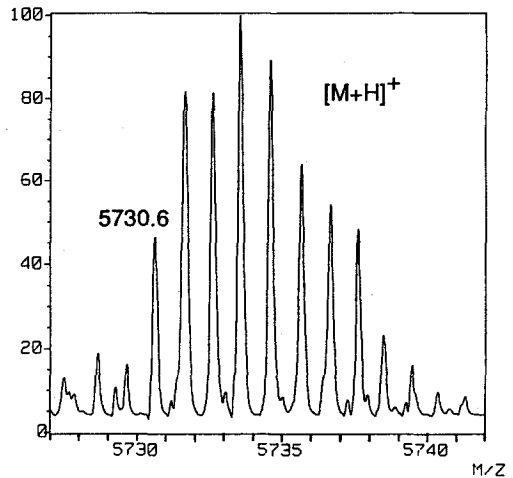


図2. インシュリン ($\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$, 精密分子量 5,729.601) の分子イオン領域の高分解能マススペクトル

LYSOZYME (Chicken Egg White)

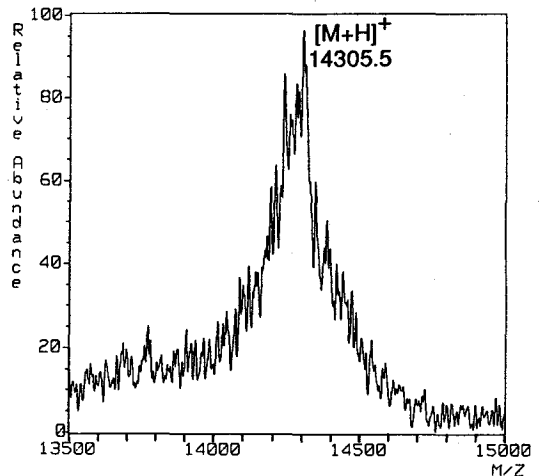


図3. リゾチーム ($\text{C}_{613}\text{H}_{950}\text{N}_{192}\text{O}_{186}\text{S}_{10}$, 精密分子量 14,296.799, 化学分子量14,306.0) のマススペクトル。

3. おわりに

教養部物理学教室に建設された高性能大型質量分析装置を用いた、生体関連高分子量物質の分子量の決定法について述べてきた。図1, 2に示すように、分子量1万未満の試料では、相対誤差0.001%の精度でその精密分子量を決定することができる。また高分子量物質では、分子量の6乗に反比例して減少すると言われるほど分子イオンの生成量が少ない。そのため、分子量が1万を越える試料の場合、精密分子量の測定は難しい。しかし図3に示すように、分子イオンピークの重心を測定することにより化学分子量は決定できる。この場合、測定値の相対誤差は0.01%程度であるが、他の手法による分子量の測定値よりはるかに精度が高い。このような精度の高い分子量の値は、物質の構造の解析に非常に有力な情報となる。

最近の質量分析は、1) 高速液体クロマトグラフィーと質量分析装置を組み合わせた分析、2) 2組の質量分析装置を連結したタンデム型質量分析装置による混合物分析、3) フォトダイオードアレーを用いたイオン同時検出器によるアトモル (10^{-18} mol) レベルでの極微量分析、など急速に進歩している。この場合いずれも、分子量測定がその基礎にあることは言うまでもない。物質の分子量を正確に決定したいという望みは、歴史は古いが、現在でも最新の課題である。

参考文献

- 1) M. Barber, R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick and A. N. Tyler, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1981) 325.
- 2) Y. Wada, T. Matsuo and T. Sakurai, *Mass Spectrom. Rev.* 8 (1989) 379.
- 3) H. Matsuda, T. Matsuo, Y. Fujita, T. Sakurai and I. Katakuse, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 91 (1989) 1.
- 4) IUPAC (H. S. Peiser Ed.), *Pure Appl. Chem.*, 56 (1984) 695.
- 5) T. Sakurai, T. Matsuo, M. Morris, Y. Fujita, H. Matsuda and I. Katakuse, *Advances in Mass Spectrometry* (P. Longevialle, Ed.), 11A (1989) 220.