OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | マススペクトロメトリーによる生体高分子の構造解析 |
| Author(s) | 松尾, 武清 |
| Citation | 大阪大学低温センターだより. 1986, 56, p. 8-11 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/8597 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# マススペクトロメトリーによる生体高分子の構造解析

教養部　松尾　武清（内線　5251）

## 1. はじめに

質量分析法は誕生以来８０年以上の長い歴史を有する分析手段である。一番最初の研究目的は同位体存在の実験的検証であり、トムソンのパラボラ型質量分析器によりネオン２０と２２の同位体が分離されたことは有名である。その後原子質量の精密測定が主要な研究課題となり、大型装置を製作し測定作業が行われた。大阪大学でも緒方、松田らにより積極的に測定された。それらの結果は原子核実験で得られる"Q値"と組合せて原子質量表（Mass Table）として完成された。

一方1940年代から石油成分の分析への応用を中心に有機化合物の分析が開始され、1960年代になってガスクロマトグラフィーと直結して混合物試料の分離と分析を同時に行う手法が開発された結果、ＧＣ／ＭＳ法は気体になる化合物の分析手段としての地位を確立した。1980年代になって難揮発性で熱不安定な高分子量化合物のイオン化を可能ならしめるイオン源が開発され、かつ、質量数の大きなイオンでも高感度で分離検出できる質量分析装置も開発された結果、質量数の大きな生体高分子の構造解析が可能となった。本稿では蛋白質及び核酸の分析例について説明する。

## 2. 蛋白質構造解析への応用

金属チップに１～２ $\mu\ell$ のグリセロールをぬり、測定しようとするペプチドを溶かし込む。その金属チップを真空にしたイオン源に入れた後、約10 kVに加速したXeイオンで照射すると、試料ペプチドの分子イオンが生成される。このイオンを加速して質量分離するのである。この原理に基くイオン源をFAB、あるいはＳＩＭＳイオン源と呼び、現在のところ生体高分子のイオン化に最も適したイオン源として広く利用されている。勿論分子イオン以外にもXeイオンの照射により解裂して生じたフラグメントイオンもたくさん生成され検出されるが、それに惑わされず分子イオンに注目して解析を進める。ブラジキニン（Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg M.W. 1059）のマススペクトルを一例として、図１に示す。このスペクトルからも予想されるように、天然物から抽出したり、合成したりした試料の分子量を正確に決定することができる。生体高分子の正確な分子量を決めることがマススペクトロメトリーの一番重要な働きであり、これを基礎にマススペクトロメトリーの応用が可能となるのである。

**Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) M.W. 1059**

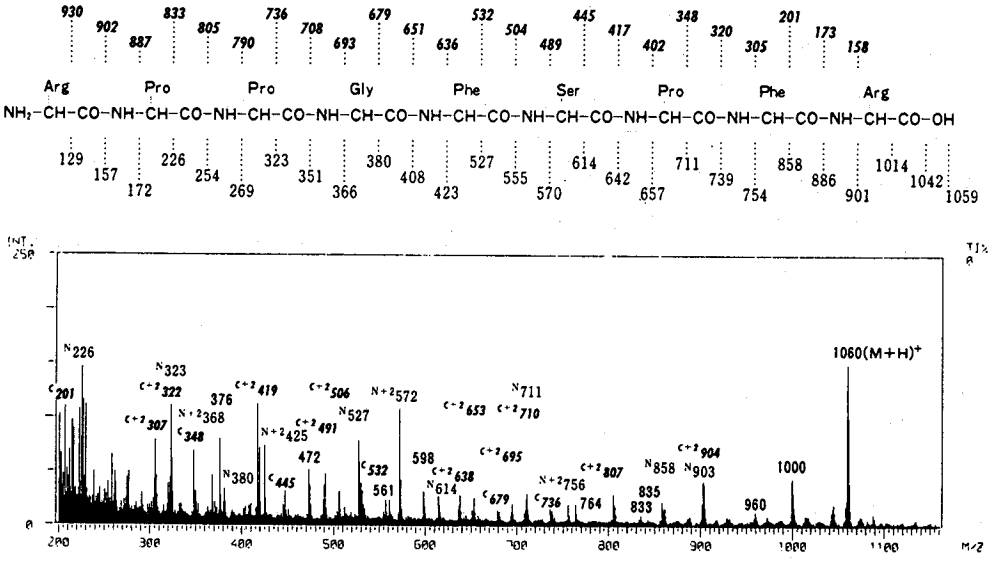



図 1. ブラジキニンのＦＡＢマススペクトル

## 3. 分子病診断への応用

病気の原因は色々あるが、その中で分子病は大きな割合いを占めている。分子病とは生体内の蛋白質中のアミノ酸が別種に置換するため起る病気である。生体内の種々の機能は酵素をなかだちとして作用しているが、この酵素中のアミノ酸置換による分子病は難病になるケースが多い。分子病の原因すなわち、どの部位のアミノ酸が置換したかを極微量のサンプルから迅速に決定するにはマススペクトロメトリーによる方法が最適である。

測定手順は次のとおりである。

(1) 正常試料のマススペクトルをとり分子量を決める。

(2) 異常試料のマススペクトルをとり分子量を決める。

(3) 両者の差は置換したアミノ酸の質量差に等しくなるはずであるから置換アミノ酸ペアーを推定できる。生体内に含まれるアミノ酸の種類は２０種に限られており、質量数が異なるから、そのような推定が可能なのである。

しかし、生体内で重要な働きをする蛋白質にはアミノ酸の個数にして数十個から数百個、分子量にして数千から数万のものが多い。従って一般には同一種のアミノ酸が複数個含まれている。従って部位まで決定するためには、もう一段操作が必要となる。

(4) 酵素もしくは化学薬品による消化により、蛋白質を小さなペプチドの混合物に分解する。

(5) ペプチド混合物のマススペクトルをとり、同一条件下でとった正常試料のマススペクトルとを比較検討することにより、置換アミノ酸ペアーを決めることができる。

(6) 酵素の種類をかえて(4)、(5)の操作をする事によりdouble checkすることができる。

具体的にアミノ酸置換をマススペクトルで検出している例として鎌形赤血球貧血症の場合を図2に示す。質量数952のT1ピークが消失して、質量数932に新しいピークが出現しており、その質量差20＝952−932はグルタミン酸（Glu）とバリン（Val）の質量差（=129−99）に相当している。このように置換アミノ酸の分析を質量数というDigit量により性格ずける手法を"Digit Printing法"と名付けた。臨床医学の分野で診断に利用されている。特に異常ヘモグロビン及びプレアルブミンの検出に威力を示している。

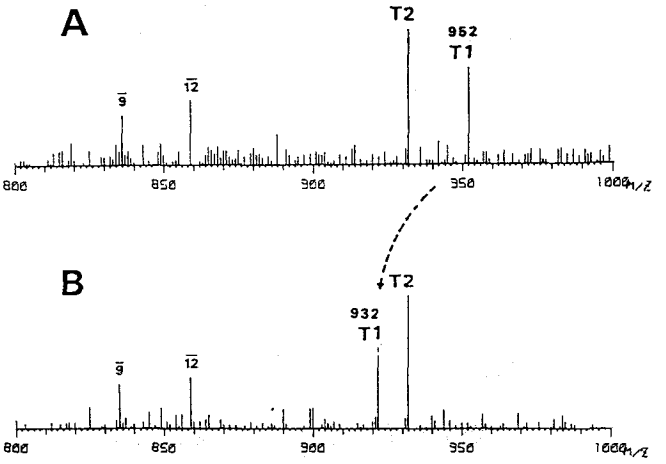



図2. 異常ヘモグロビンHb−Sのトリプシン、消化物中のT1フラグメントのマスシフト。(A)正常、(B)異常。

具体例の一つとして、異常ヘモグロビンγ鎖（Hb-F$^{Izumi}$）の場合のマススペクトルを図3に示す。スペクトルAは正常サンプルでありスペクトルBは異常サンプルである。$T_{1+2}$ピーク（M/z=1919）が新しいピーク（M/z=1847）へシフトしている事がわかる。これはグルタミン酸（Glu）からグリシン（Gly）の置換を示唆している。別種の酵素で処理したサンプルの測定結果とつき合せてHb−F$^{Izumi}$は6番目のアミノ酸Gluが Glyに置換した構造変異種であると決定できた。"Digit Printing法"を使って約10種の未知の構造変異蛋白質を解析することができた。

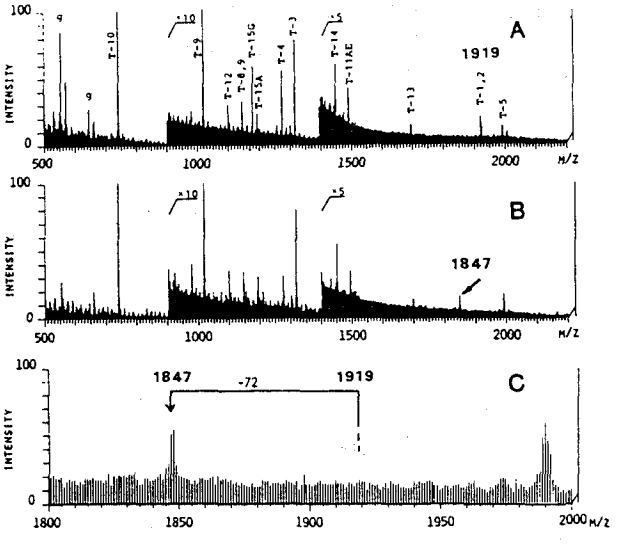
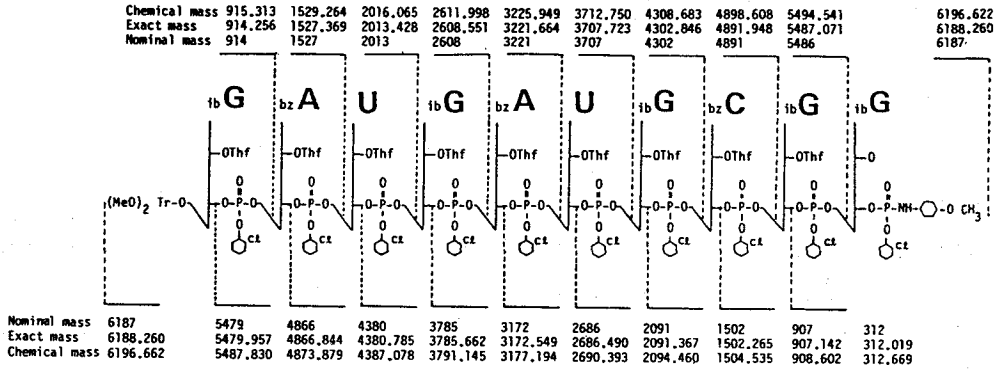



図3. 正常γグロビン(A)と異常γグロビン(B)のトリプシン消化物のマススペクトル。スペクトル(C)は(B)の質量域(M/z 1800-2000)を拡大したもの。

## 4. 核酸の塩基配列決定への応用

DNA, RNA の合成技術が急速に進歩している。特に合成した核酸を他種のものにうめ込んで新しい蛋白質をつくり出す方法も完成しつつある（遺伝子組換）。この際合成した核酸が目的とするものと一致しているのかどうか迅速に調べる必要があるが、このためにはマススペクトルの手法が適している。特に合成時には保護基で修飾された状態での中間

生成物の分析はマススペクトル法だけが可能である。E・Coli $RNA_2^{Gly}$ の10mer フラグメント（GAUGAUGCGG）のマススペクトルを図4に示す。



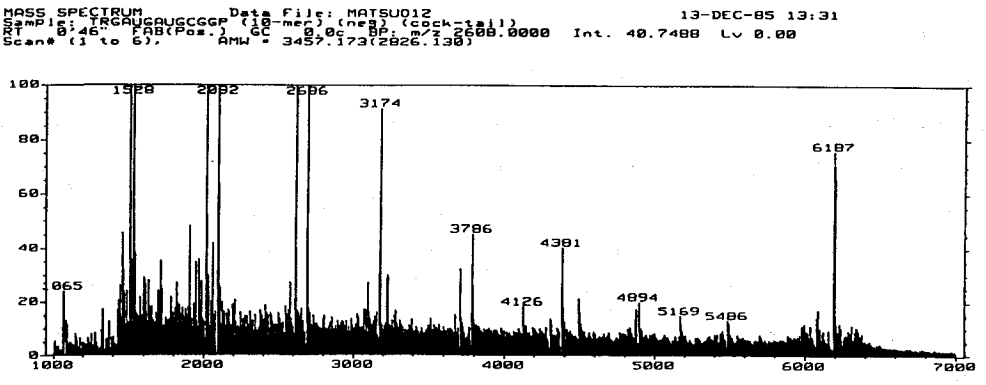




図4. 保護基のついた状態の合成リボ核酸（10mer RNA)の負イオンマススペクトル

## 5. おわりに

マススペクトロメトリーの生体高分子の構造解析への応用例について簡単に紹介してきた。ここ10年間のうちに高分子量化合物のマススペクトロメトリーは急速に進展した。 さらに新たな要求（より高質量化、より高感度化）も出されている。このためには新しい高性能イオン源の開発と大型高性能質量分析装置の製作が必要であると考えられる。私達は加速電圧30 kVのイオン源と大型電磁石（中心軌道半径1.25$m$，最大磁場強度 1.8 Tesla）を用いた大型質量分析装置を製作中である。分子量が2万程度までの生体高分子の分析を行うことを目的としている。

構造変異蛋白質の解析法（Digit Printing法）の研究は大阪府立母子医療センターの和田芳直先生、林昭先生との共同研究の成果であります。ここに深謝いたします。