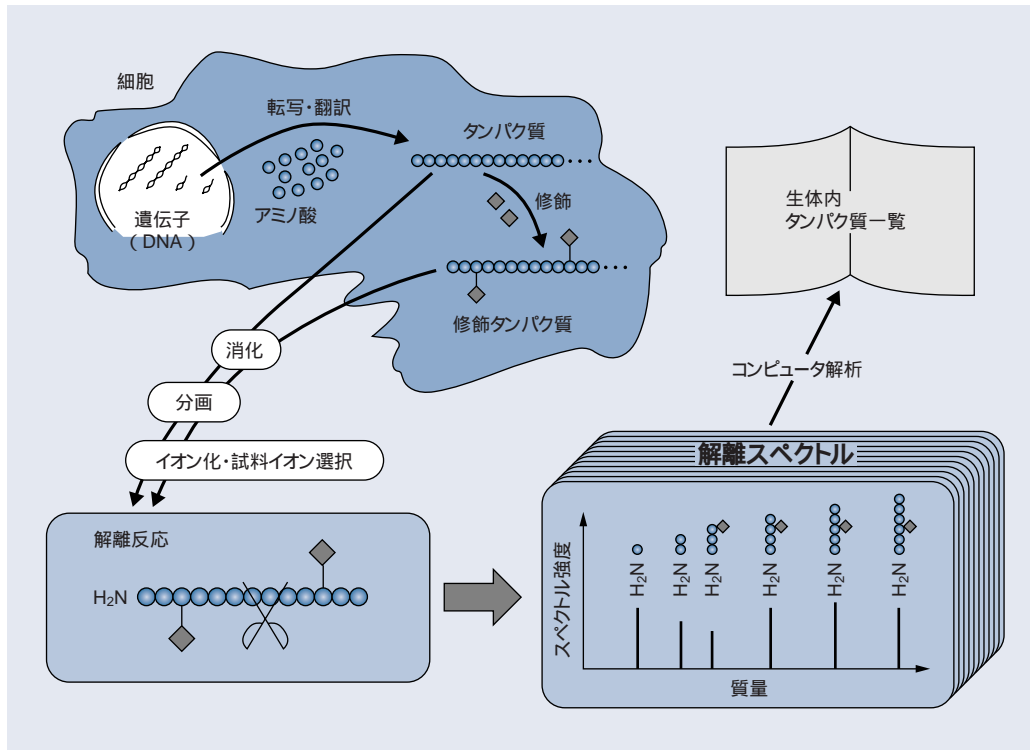


プロテオーム解析に向けた質量分析の新技术 高周波イオントラップを用いた電子捕獲解離

Electron Capture Dissociation in Radio-Frequency Ion Trap for Proteomics

馬場 崇 Takashi Baba 橋本雄一郎 Yūichirō Hashimoto 長谷川英樹 Hideki Hasegawa



注：略語説明
DNA(Deoxyribonucleic Acid ;
デオキシリボ核酸)

質量分析を用いたプロテオーム解析の流れ

生体内タンパク質の一覧を得るプロテオーム解析では、細胞などから抽出し分離したタンパク質を真空中に導入し、質量分析を用いて解離スペクトルデータを取得する。データをコンピュータ解析し、各タンパク質の配列構造を決定する。

プロテオーム解析とは、生体内で発生しているタンパク質の種類と量を網羅的に解析することを指す。多くの疾病はタンパク質の生体内機能の異常と関連していると考えられており、プロテオーム解析は、効率的な創薬や早期疾病診断を目的として、現在、世界中の研究機関や製薬メーカーで推進されている。さらに、タンパク質は、さまざまな化学的な構造変化、すなわち「修飾」を受けることによってその機能を獲得している

ため、修飾タンパク質解析のニーズも高まっている。

日立製作所は、世界に先駆けて、修飾タンパク質の解析に適した質量分析技術(電子捕獲解離)を、高周波イオントラップ内部において実現した。高周波イオントラップはプロテオーム解析に広範に用いられている質量分析計であり、その内部における電子捕獲解離の実現が期待されていた。

1 はじめに

タンパク質は生命活動を制御する分子であり、DNA(Deoxyribonucleic Acid)に記録されている遺伝情報が転写を経て翻訳され、生成される。さらに、リン酸や糖鎖の付加など、他の分子と化学結合することによって構造が変化した「修飾タンパク質」が生成される。タンパク質は数万種類以上、修飾

タンパク質は数十万種あると言われており、その生成量は細胞の構造を形成する多量なものから、生命としての機能を制御しているごく微量のものまで千差万別である。多くの疾病は、タンパク質の異常と関連していると考えられているので、「タンパク質や修飾タンパク質の機能異常」と「疾病」との関連性を明らかにするには、臓器の種類や細胞内外の環境、機能の正常・異常などの要因によるタンパク質の生成量の理解が必須となる。そのために体内の各部位に存在しているタン

バク質の種類と量を網羅的に解析する「プロテオーム解析」が有効となる。

プロテオーム解析において核となる技術が、質量分析である。多種の、特に少量のタンパク質を網羅的に分析するためには、高感度性、高速性、さらに分子種によらない汎用性が求められる。そのため、これらの特徴を兼ね備えている質量分析に注目が集まっている。質量分析を用いたプロテオーム解析の流れは、まず、必要に応じて消化酵素などの試料調製を行うことから始まる。これを液体クロマトグラフィー、または電気泳動によって分画し、多数の分子種を粗く分離する。続いて、分画から採取された分子を質量分析計に導入してイオン化し、試料イオンの質量を測定する。さらに、試料イオンを質量分析計内で断片化(解離)し、断片の質量を測定する。以上で得られる大量の質量スペクトルはコンピュータを用いて解析し、最終的に試料中のタンパク質の種類と量の一覧を得る。

なお、質量分析とは、原子・分子を同定する方法である。真空中に導入した電荷を持つ試料分子、すなわち試料イオンを電磁場中で動かし、その特徴から質量を測定する。しかし、プロテオーム解析で扱うタンパク質試料では、1回の質量測定によってその分子種が決定されることはほとんどない。それは、タンパク質を構成するアミノ酸の順序の入れ替えによって質量は変化しないため、異種のタンパク質が同じ質量を示すからである。この課題を解決するために、試料イオンを質量分析計内部で断片化し、その断片をさらに質量分析するという手続きを繰り返す。このような質量分析の技法をMS/MS(Multistage Mass Spectrometry: 多段質量分析)と呼んでいる。つまり、分子を構成している部分の情報を得て、

それをコンピュータで再構成することにより、試料イオンのアミノ酸配列が決定される。

日立製作所は、プロテオーム解析の新技术として、高周波イオントラップを用いたECD(Electron Capture Dissociation: 電子捕獲解離)を世界で初めて実現した。

ここでは、このECD技術について述べる。

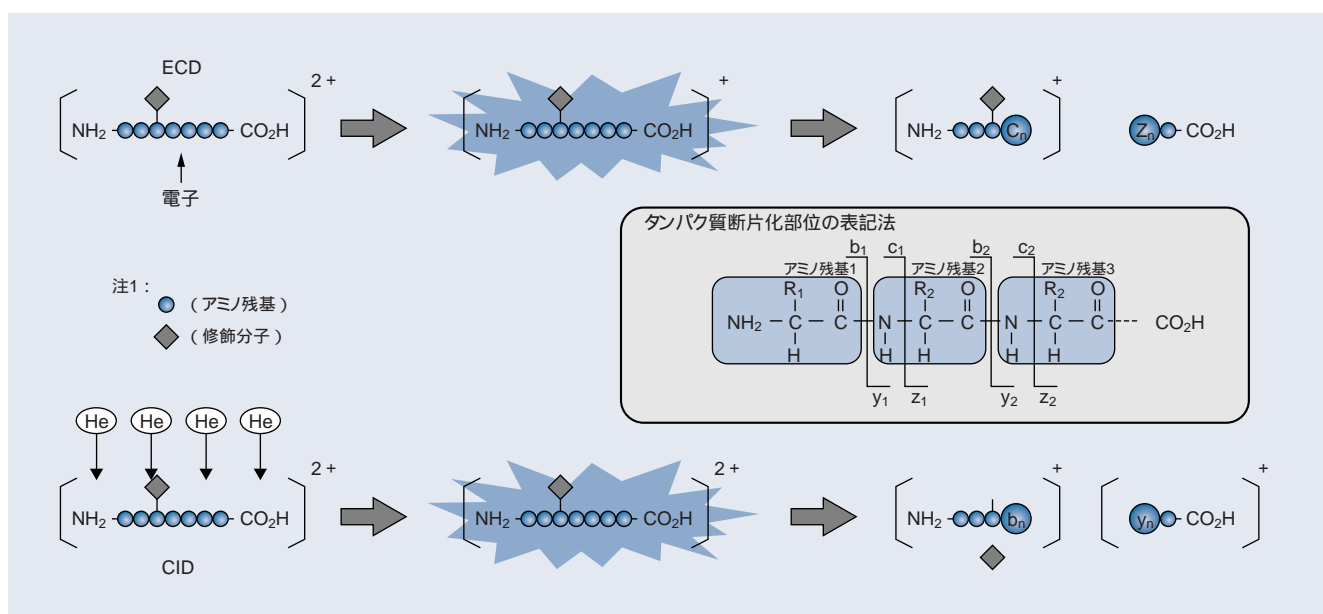
2 質量分析におけるイオン解離の課題と新技术

2.1 従来技術の課題

現在広く利用されている断片化の方法は、CID(Collision Induced Dissociation: 衝突励起解離)である。試料イオンを電場で加速し、質量分析計内に導入したヘリウムガスなどと多数回衝突させて、分子構造のぜい弱な場所で断片化する。しかし、その断片化される部位は試料分子を構成するアミノ酸の種類と配列に依存することから、構造情報を十分に得られるまで細かく断片化されない分子種が多数存在している。また、修飾タンパク質では修飾分子から優先的に断片化されるため、修飾分子とタンパク質の結合部位の情報を失いやすく、修飾部位の決定には煩雑な手続きを要していた。

2.2 ECD

今回実現したECDは、前述した課題を解決し、プロテオームの解析で有用性が期待されている修飾タンパク質の分析に適した断片化の方法である。プラスの電荷を持つ試料イオンに低速の電子(1 eV程度)を照射し、電子が捕獲されたときに、そのイオンが断片化される(図1参照)。



注2: 略語説明 ECD(Electron Capture Dissociation; 電子捕獲解離), CID(Collision Induced Dissociation; 衝突励起解離)

図1 ECDとCIDの仕組み

ECDでは、修飾部位を残したままタンパク質の主鎖のC_n-Z_n部位が断片化するので、修飾部位を特定しやすい。一方、CIDでは、ガスとの衝突により、主鎖のb_n-y_n部位が断片化するものの、修飾分子が外れやすいので、修飾部位の決定には不利である。

ECDは、CIDとは異なる以下のような三つの性質を持つ(図1参照)。

- (1) アミノ酸の一次元の鎖構造部分(以下、主鎖と言う。)を優先的に断片化し、修飾分子は主鎖に結合したままである。修飾分子が主鎖に残るために、修飾タンパク質の修飾部位の決定に威力を発揮する。
- (2) アミノ酸の配列によらず、ほぼすべてのアミノ酸を等確率に断片化する。この性質から、アミノ酸配列決定が容易である。
- (3) ECDとCIDでは、それぞれ断片化する部位が異なる。

以上のように、ECDとCIDは異なる断片化の特徴を持つので、二つの解離方法を組み合わせて用いることが有効であると言われている。

3 ECD装置と実証実験

日立製作所は、今までFT-ICR MS(フーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴質量分析計)だけで実施されていたECDを、高周波イオントラップの内部で実現することに成功した¹⁾。FT-ICR MSは、大型・高価かつ操作に専門性を要する質量分析計と言われている。そのため、安価・小型・操作容易であり、広くプロテオーム解析に用いられている「高周波イオントラップ」でECDを実現することが、競って研究されてきた。

3.1 ECD実現への技術課題と解決

ECD実現への技術課題は、高周波イオントラップ内部でイオン解離効率の高い、運動エネルギーが1 eVと小さい電子を実現することであった。高周波イオントラップ電極には試料イオンを保持するために数百ボルトから千数百ボルトの振幅を持つ高周波電圧を印加するため、この高周波電場によって電子が加速されてしまい、ECDが起きなかったからである。なお、FT-ICR MSだけでECDが実施されていた理由は、こ

の方式が高周波電場を用いない、静電磁場によるイオントラップを採用しているためである。

高周波イオントラップ内部に低速の電子を導入するという課題の解決のために、われわれは磁場を印加した線形イオントラップを用いるというアイデアを考案し、その実証を目指した。線形イオントラップは高周波電圧が印加された4本の棒状の電極から成り、その内部に形成される高周波四重極電場により、イオンを保持する装置である(図2参照)。保持した試料イオンに対し、線形イオントラップの中心軸に沿って低エネルギー電子を導入して、試料イオンに照射する。線形高周波電場の中心軸上には高周波成分は存在しないことを利用し、電子の高周波電場による加速を避けるというアイデアである。さらに、この中心軸上に平行に磁場を印加することにより、強く磁場に巻きつくらせん運動をする電子が中心軸上から大きくずれることはなく、高周波電場による加速を回避できると考えた。これにより、高周波電場が印加されない線形イオントラップの中心軸上を、低エネルギー電子が運動することを保証している。

3.2 実験と結果

図2(b)に示した装置を製作し、高周波イオントラップ内部でのECDを実証した。この装置は真空室内部に設置され、永久磁石を用いて発生させた磁場を備えた線形イオントラップと電子源から成る。

この装置によって生成される電子の運動エネルギーを検証したところ、高周波電場の印加によるエネルギーの上昇は0.2 eV程度であり、ECDを発生させるために必要な1 eVのエネルギーを持つ電子が導入できることを確認した。続いて、サブスタンスPというECDの標準サンプルであるペプチドを用いて、電子の照射時間80ミリ秒で解離スペクトルを得た(図3参照)。ECDに特徴的な断片化されたイオンが明りように観察されており、ECDの実現に成功したと考える。現状の感度はCID比1%であるが、近い将来、CIDと同等の感度に改良が

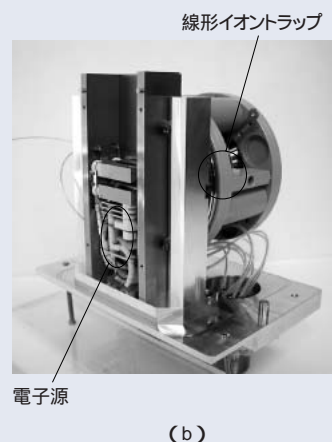
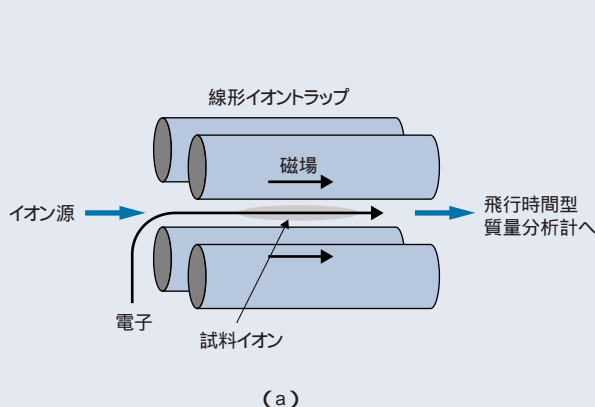


図2 ECD装置の概略構成(a)と外観(b)

線形イオントラップに保持した試料イオンに電子を照射して、ECDを発生させる(a)。今回、初のECDに成功したこの装置(b)をイオン源と飛行時間型質量分析計の間に挿入して反応を確認した。

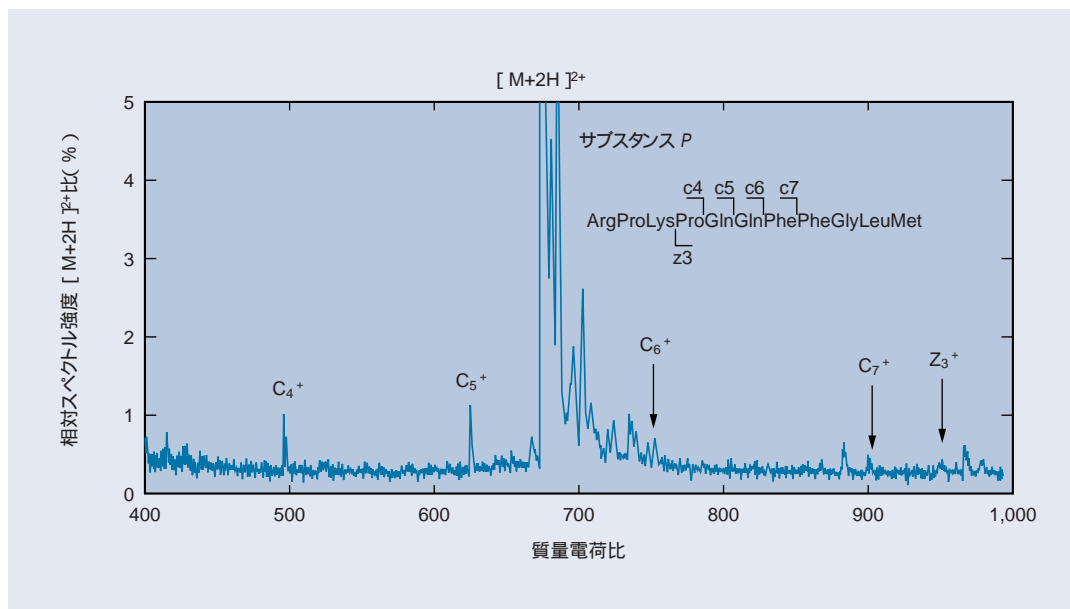


図3 高周波イオントラップ内部で初めて観察されたECDによるペプチド(サブスタンス P)の解離スペクトル

ECDの特徴である(C_n-Z_n)部位での断片化イオンの発生を確認することができた。

可能と考える。

4 おわりに

ここでは、日立製作所が世界に先駆けて実現した、高周波イオントラップ内部におけるECDについて述べた。

高周波イオントラップ内部におけるECDは、今回の原理実験の成功により、ついに実用化への緒に就くことができた。われわれは、この新しい芽を、プロテオーム解析や広く創薬に利用可能な技術として、早期に実用化へ結び付けていく考

えである。そのための課題は、高感度化・高速化とECD制御の最適化である。ECDによる効率的な修飾タンパク質の解析が、広範囲なバイオ技術用質量分析に利用され、さらに豊かで健康的な生活に貢献できることを目指している。

なお、この研究は、株式会社日立ハイテクノロジーズの協力と、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の実用化助成事業を受けて実施したものである。

参考文献

1) T. Baba, et al.: Analytical Chemistry, 76, 4263 (2004)

執筆者紹介



馬場 崇

1992年日立製作所入社，中央研究所 ライフサイエンス研究センター 所属
現在，質量分析の新規原理・方式の開発に従事
工学博士
日本物理学会会員
E-mail: baba @ harl. hitachi. co. jp



長谷川英樹

1990年日立製作所入社，中央研究所 ライフサイエンス研究センター 所属
現在，質量分析の新規方式の開発に従事
E-mail: h-hase @ crl. hitachi. co. jp



橋本雄一郎

1997年日立製作所入社，中央研究所 ライフサイエンス研究センター 所属
現在，質量分析製品応用技術および新規高感度計測技術の開発に従事
米国質量分析学会会員
E-mail: h-yuichi @ crl. hitachi. co. jp