

質量分析によるタンパク質の構造と機能の相関解析

—水溶液中における“機能構造”—

高尾 敏文^{*,**}

タンパク質の機能構造を理解する上で、結晶構造解析やクライオ電顕では捉えきれない「生理的条件下」での構造状態が重要である。本稿では、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を用いて、水溶液中におけるタンパク質-金属イオン-基質の可逆的な複合体形成や構造状態を解析した2例(SOD1およびRNase H)を紹介する。測定系の制約や複合体の安定性に起因する限界はあるが、ESI-MSはin-solutionの構造状態や結合様式を分子レベルで解析できる有効な手段であり、今後の構造生物学において重要な役割を担う可能性がある。

1. はじめに

私たちは、タンパク質の「構造」をどれだけ見ているだろうか？そして、何を見落としているのだろうか？

構造解析技術は近年目覚ましい進歩を遂げ、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡(cryo-EM)によって、多くの高分解能構造が明らかにされてきた。これらの知見は、タンパク質やその複合体の機能理解に大きく貢献している。しかし一方で、構造解析によって得られる像が、必ずしも“実際に機能している状態”を反映しているとは限らない。

生体内で働くタンパク質は、翻訳後修飾、金属イオンやリガンドの結合、周囲環境の変化などに応じて、構造を動的に変化させながら機能していると考えられる。すなわち、生理的条件下におけるタンパク質は、“溶液中”で“可逆的かつ一過的”に構造状態を変化させている。こうした構造の「揺らぎ」や「中間状態」は、結晶構造や電子顕微鏡では捉えにくく、まさに“構造解析の盲点”のひとつと言える。

溶液中の構造変化を捉える方法として、溶液NMR法は高い空間分解能を有し、動的な情報も得られる強力な手段である。ただし、巨大分子複合体や低濃度条件下での解析には技術的限界がある。また、蛍光顕微鏡などの手法は、生体内に近い環境で分子の挙動を可視化できるが、構造そのものの詳細を得るには適さない。

このような中、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)は、水溶液中に存在する分子を“ネイティブな状態”で検出可能な手法として注目されている。

*株式会社リガクプロダクト本部ライフサイエンス

**大阪大学蛋白質研究所

ESI-MSは分子量という物理量を通じて、構造状態や複合体形成を間接的に解析することができ、他の構造解析手法を補完しうるポテンシャルを有している。

本稿では、ESI-MSによって、タンパク質と金属イオンあるいは基質との間に形成される可逆的複合体を水溶液中で観察した2つの事例(SOD1およびリボヌクレアーゼH)を紹介し、構造解析の新たな可能性とその限界について議論する。

2. ESI-MS法

質量分析は、目的に応じて様々な方式の分析計を用いて行われている。タンパク質やリガンドなどの非共有結合性複合体を測定する場合、バッファーなどの水溶液中に溶解した試料を、ESIにより直接イオン源へ導入し測定を行う(図1)。ESIでは、試料溶液を数ナ

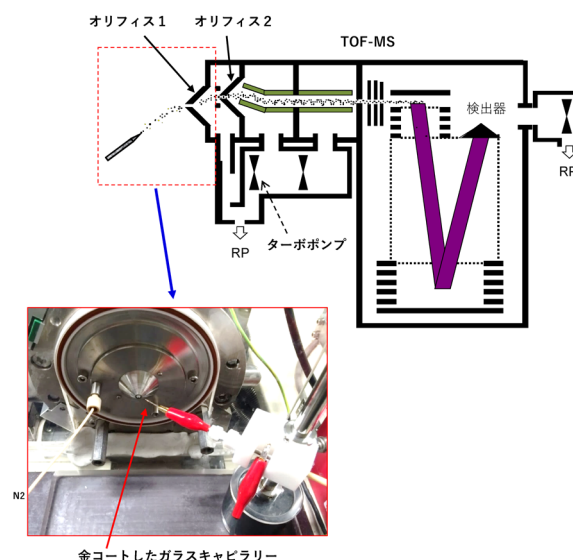


図1. エレクトロスプレーイオン源と飛行時間型質量分析計。

ノリットル以下の極微量の液滴としてスプレーする。

生成された液滴は、イオン源内での加熱および減圧条件下において脱溶媒が進行し、最終的に複合体粒子としてイオン化され、質量分析が行われる。この際、イオン源に導入される試料量は極めて微量に限られ、いわゆるナノスプレー法が一般的に用いられる。

一方、加熱や減圧条件下では、イオンは音速程度で飛行し、多数のガス分子との衝突を受ける。このため、複合体の安定性は測定可否を左右する重要なパラメーターとなる。すなわち、結合力の弱い複合体や、多数の水分子などの溶媒を包含した複合体は、測定過程で解離しやすく、解析が困難な場合が多い。

図1に示す分析計は飛行時間型質量分析計(time-of-flight, TOF)であり、連続的に導入されたイオンは、分析計上部でパルス電圧により直角方向に加速・偏向され、検出器に到達するまでの飛行時間を測定することで質量電荷比(m/z)が求められる。一般に、複合体のような高分子イオンの測定には高分解能の分析計が有利であるが、イオンの滞留時間が長い装置や、運動を複雑に制御して分析する方式では、測定中に複合体の解離が起こる可能性がある。

また、複合体の構造を維持するために緩衝液中で調製した試料を用いる必要があるが、ESI-MS測定では、基本的に揮発性のバッファーを使用することが求められる。

このような制約は存在するものの、ESI-MSは水溶液中に存在する複合体の構成成分を同定し、その化学量論を直接的に評価できる有効な手法である。

3. Cu,Zn-スーパーオキシディスムターゼ(SOD1)における金属イオン結合性と酵素活性

Cu,Zn-スーパーオキシディスムターゼ(SOD1)は、生体内で活性酸素を除去する重要な酵素であり、分子内に2種類の異種金属イオンを含む安定な非共有結合性ホモダイマーを形成している⁽¹⁾。多くの酵素は金属イオンを利用して活性を発現するが、SOD1ではZnイオンが構造の安定化に、Cuイオンが触媒活性の発現にそれぞれ重要な役割を果たしている。

本酵素をESI-MSにより測定することで、以下の点が明らかにできるのではないかと考え、研究を行った。すなわち、①結合している金属イオンの種類と数を識別できるか、②ホモダイマーとして観測されるか、③金属イオンの選択性はタンパク質自体に内在する性質なのか、という点である。

①および②については、いずれも肯定的な結果が得られた。金属イオンの種類は質量差から明確に判別でき、また、ダイマーかモノマーかは観測される多価イオンの電荷状態から識別可能である(図2)。

最も興味深い結果が得られたのは③に関する検討で

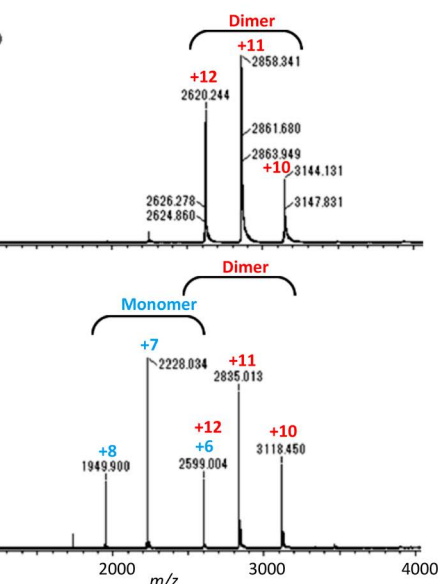
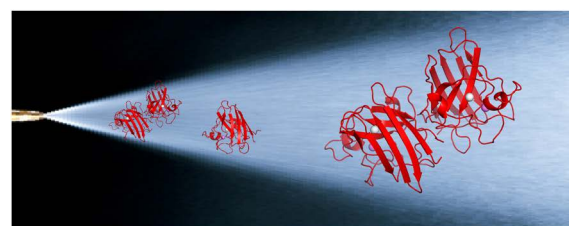


図2. Bovine SOD1のESI-MS.

SOD1水溶液(5 pmol/ μ L, 10 mM 酢酸アンモニウム)1 μ Lを図1に示したナノスプレーチップに導入して測定した。Cu₂²⁺Zn₂²⁺-SOD1ホモダイマーが主成分として観測されている(中段)。オリフィス1と2(図1)間の電位差を大きくすると、気体分子との衝突が促進され、ダイマーが部分的に解離してモノマーが観測される(下段)。上段はSOD1(PDB ID: 2SOD)のダイマーおよびモノマーがエレクトロスプレーにより噴霧される想像図を示す。

ある。まず、金属イオンを除去したアポ型SOD1に対し、さまざまな価金属イオンをモル比1:2~12で混合し、その結合特異性を調べた。さらに、Zn²⁺とCu²⁺を同時に添加した場合に、Cu,Zn-SOD1が正しく再構成されるかどうかを検証した(図3)。

その結果、Zn²⁺とCu²⁺を同時に添加して再構成したSOD1の酵素活性は、天然型の約80%にとどまることがわかった⁽²⁾。この試料をESI-MSで解析すると、Cu₂のみが結合したCu₂体と、Cu,Znが結合したCu,Zn体がほぼ1:1の比率で生成していることが明らかとなった(図3上段右)。

別の実験から、すべての部位がZn²⁺で占有された状態は、Zn²⁺を大過剰に添加しない限り生成しにくいことが分かっている。これは、SOD1のZn結合部位がCu²⁺によって容易に占有されるのに対し、Cu結合部位にはZn²⁺が配位しにくいためであると考えられる。さらに興味深いことに、両イオンを同時に添加した場合、混合直後にはCu₄-formとCu₂Zn₂-formが同程度生成するが、溶液をしばらく静置すると新たにCu₃Zn-

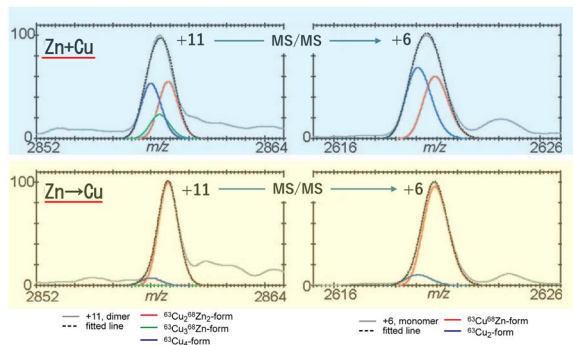


図3. SOD1の再構成実験⁽²⁾.

アポ型SOD1に対し、(上段) Zn^{2+} および Cu^{2+} を同時に添加、(下段) Zn^{2+} 添加後にインキュベーションし、その後 Cu^{2+} を添加した。Zn(平均質量65.4)とCu(63.5)を明確に区別するため、それぞれ安定同位体である ^{68}Zn および ^{63}Cu を用いた。青： $^{63}\text{Cu}_4$ -form, 緑： $^{63}\text{Cu}_3$ ^{68}Zn -form, 赤： $^{63}\text{Cu}_2$ $^{68}\text{Zn}_2$ -formの3成分について、観測ピークを「Isotopical」⁽³⁾, ⁽⁴⁾を用いてデコンボリューションした。なお、 Zn_4 -formは本条件下ではほとんど生成しないことが既に確認されているため、解析には含めていない。Adapted with permission from Ref. (2). Copyright 2008 American Chemical Society.

formが出現し、最終的におよそ $\text{Cu}_4 : \text{Cu}_3\text{Zn} : \text{Cu}_2\text{Zn}_2 \approx 2 : 1 : 2$ の分布比で存在することがわかった(図3上段左)。この結果は、金属結合状態の異なる2種類のサブユニット(Cu_2 -formおよび CuZn -form)は、初期段階では同種同士で優先的にダイマーを形成するものの、水溶液中においてダイマー間でサブユニットの交換(シャッフル)を起こしていることを示唆している。

一方、 Zn^{2+} を先に添加し、その後 Cu^{2+} を導入して再構成した場合には、ほぼ天然型の Cu_4 Zn -SOD1 が生成した。これらの結果から、SOD1 は生体内において金属イオンが段階的に導入されることで正しい金属配位を獲得している可能性が高いと考えられる。 Zn^{2+} と Cu^{2+} を同時に添加して調製したSOD1の酵素活性が約80%にとどまったのは、天然型に比べて活性の低い Cu_4 体や Cu_3 体が一部生成したためであると推定される。

ESI-MSは、非共有結合性のまま複数の金属イオン結合状態のダイマーを溶液中から直接検出することで、SOD1における金属選択性や構造再構成の過程を可視化した点において、他の構造解析法では得られない情報を提供した。

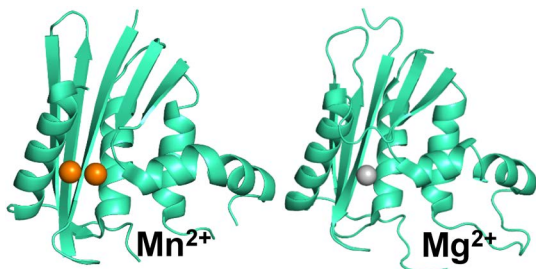


図4. 大腸菌RNase Hの二価金属イオンを含む結晶構造。左： Mn^{2+} を2個含む構造(PDB ID: 1G15)⁽⁵⁾、右： Mg^{2+} を1個含む構造(PDB ID: 1RDD)⁽⁶⁾。

4. リボヌクレアーゼH(RNase H)/金属イオン/基質の三者複合体の観察

酵素は生体反応の中心的分子であり、これまで数多くの構造研究が行われてきた。近年では、高輝度X線を用いた時間分割構造解析により、反応過程の一部を捉える試みも進んでいる。特に重要なのは触媒反応機構の理解であるが、多くの場合、基質との複合体構造は酵素を不活化した条件下で解析されており、ネイティブな酵素・基質複合体をそのまま観察することは困難であった。

我々は、RNAを切断する酵素であるリボヌクレアーゼH(RNase H)について、これまで議論が続いてきた「生理的条件下における金属イオンの種類と数は実際にはどうなっているのか」という問いに答えるため、ESI-MSを用いてその実態に迫った(図4)。

RNase Hは、相補的に結合したDNA/RNAハイブリッド中のRNA鎖を切断する酵素であり、微生物から高等生物まで広く保存されている。反応には Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} が必須であり、酵素、基質、金属イオンの三者複合体形成を経て反応が進行し、切断後は速やかに複合体が解離すると考えられている。しかし、この三者複合体をそのまま捉えることは、これまで困難とされてきた。

そこで我々は、水溶液中においてRNase Hがどの金属イオンを何個結合するのかをESI-MSで直接同定できるのではないかと考え、各種二価金属イオン存在下での三者複合体の検出を試みた。図5は、RNase Hと基質であるDNA(8-mer)/RNA(8-mer)ハイブリッドからなる二者複合体を、pH 6.0の緩衝液中でESI-MS測定した結果である。非常に安定な複合体が、 $+7 \sim +9$ 価の多価イオンとして観測された。

次に、この溶液に Mn^{2+} を酵素に対して4モル等量添加し測定を行った。しかし、試料混合後に通常の手順でナノスプレーチップへ導入して測定すると、主に酵素タンパク質のみが観測された。これは、試料混合から測定開始までに通常数分を要し、その間に酵素反応が進行・終了してしまったためであると考えられた。

そこで、反応開始後できるだけ速やかに測定を開始するため、ガラスキャピラリー製のナノスプレーチップ

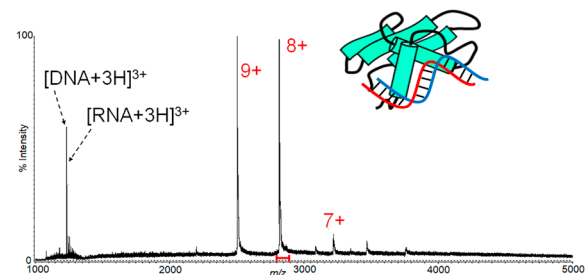


図5. ESI-MSによるRNase HとDNA/RNA 8-merからなる二者複合体の観測。

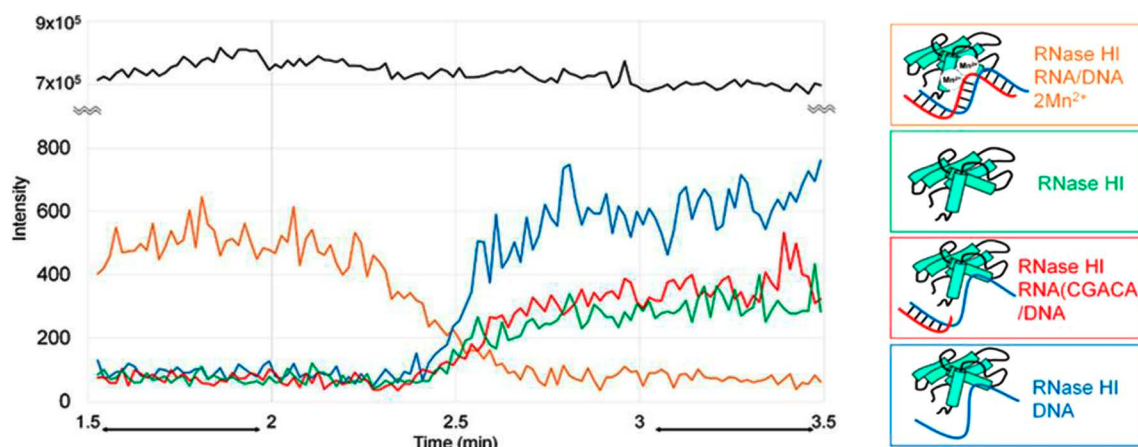


図6. Mn^{2+} 添加後のRNase H三者複合体のESI-MS観測⁽⁷⁾.

酵素、基質(DNA-8 mer/RNA-8 mer)、 Mn^{2+} を混合後1.5～3.5分の反応溶液を測定. 反応の進行に伴いRNAが切断され(RNA-8 mer → RNA-6 mer)、 Mn^{2+} が解離していく様子が観測される. 橙: 酵素・DNA/RNA・ Mn^{2+} 三者複合体; 緑: 酵素単体; 赤: DNA/RNA-6 mer複合体; 青: DNA複合体. 黒線は総イオン量

ブ(先端部は1–2 kV印加するため金コートしてある)を、イオン導入口(Orifice 1)に対して任意の角度と距離で素早く固定できる可動式架台を自作した(図1). これにより、試料混合後約1.5分で測定を開始することが可能となった.

図6は、反応開始後1.5～3.5分の反応溶液をESI-MSで連続測定し、総イオン量、及び、各複合体に相当するイオンをプロットした結果である. 黒のトレースは総イオン量を示しており、測定中のイオン化が安定していることを示している. 測定開始時には、酵素/基質/ Mn^{2+} からなる三者複合体が主成分として観測され(橙色トレース, 右上モデル図), その分子質量から、活性型複合体には一過的に Mn^{2+} が2個結合していることが明らかとなった⁽⁷⁾.

なお、大腸菌の細胞質には遊離の Mn^{2+} はほとんど存在せず、 Mg^{2+} がミリモル(mM)オーダーで豊富に存在することから、生理的な条件下(in vivo)における真の補酵素は Mg^{2+} であると考えられている. しかし、 Mg^{2+} は酵素との親和性が弱く、反応のターンオーバーが極めて速いため、X線結晶構造解析と同様に、ESI-MSにおいてもそのダイナミックな複合体形成を直接捉えることは困難であった. 本実験で用いた Mn^{2+} は、 Mg^{2+} と類似のイオン結合特性を持つことから、本来の Mg^{2+} が担う一過的な「2金属イオン触媒機構」の構造状態をin vitroで擬似的に安定化させ、可視化するための有効な代替プローブとして機能したものと解釈できる.

上記測定において経時変化をみると、興味深いことに反応の進行に伴って三者複合体のシグナルは減少し、それに代わって酵素単体(緑)、酵素/DNA-8 mer/RNA-6 mer複合体(赤)、酵素/DNA-8 mer複合体(青)に対応するイオンが増加する様子が観測された. すなわち、RNA鎖が切断されると三者複合体は

解離し、酵素や二者複合体へと移行していることが示された. また、これら生成物はいずれも Mn^{2+} を保持しておらず、二価金属イオンは反応過程において一過的に結合し、ターンオーバーしているものと考えられる.

ESI-MSは、このような酵素反応過程における一過的な三者複合体の形成と解離を、分子質量という“ものさし”を用いて水溶液中で直接捉えた点において、従来の構造解析法では得られない情報を提供した.

5. おわりに

本稿で紹介した2つの酵素は、いずれも生理的な条件下で機能する過程において、動的かつ可逆的な分子間相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆していた. こうした一過的な複合体や反応中間体は、結晶構造や電子顕微鏡などの静的な構造解析法では捉えにくく、生理的狀態に近い条件での構造を理解することの重要性があらためて感じられる.

ESI-MSは、溶液中で存在する複合体を分子質量という明確な指標で直接観測できるという点で、これらの補完的な情報を提供する手法といえる. 特に、金属イオンの選択的な結合状態や、反応が進行するにつれて変化していく複合体の姿を定量的に捉えられることは、ESI-MSならではの特徴である.

今後、測定系の改良やイオン化条件の工夫が進めば、より複雑な分子間相互作用や反応の経時的な変化を、より生理的な条件下で解析できる可能性が広がると期待される. タンパク質の機能を構造から理解するうえで、“時間軸”を取り入れた解析の視点は、今後ますます重要になると考えられる.

参考文献

- (1) J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, and D. C. Richardson: *J. Mol. Biol.*, **160** (1982), 181–217.
- (2) Y. Yamazaki and T. Takao: *Anal. Chem.*, **80** (2008), 8246–8252.
- (3) J. Fernández-de-Cossio, L. J. Gonzalez, Y. Satomi, L. Betancourt, Y. Ramos, V. Huerta, V. Besada, G. Padron, N. Minamino, and T. Takao: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18** (2004), 2465–2472.
- (4) J. Fernandez-de-Cossio, L. J. Gonzalez, Y. Satomi, L. Betancourt, Y. Ramos, V. Huerta, A. Amaro, V. Besada, G. Padron, N. Minamino, and T. Takao: *Nucleic Acids Res.*, **32** (2004), 674–678.
- (5) W. Yang, W. A. Hendrickson, R. J. Crouch, and Y. Satow: *Science*, **249** (1990), 1398–1405.
- (6) K. Katayanagi, M. Miyagawa, M. Matsushima, M. Ishikawa, S. Kanaya, M. Ikehara, T. Matsuzaki, and K. Morikawa: *Nature*, **347** (1990), 306–310.
- (7) T. Ando, N. Jongruja, N. Okumura, K. Morikawa, S. Kanaya, and T. Takao: *J. Biol. Chem.*, **296** (2021), doi: 10.1016/j.jbc.2021.100462.