

ネイティブ質量分析でできること

非共有結合を保ったまま、変性させずに観測することを可能とする質量分析をネイティブ質量分析という。ネイティブ質量分析では、例えばタンパク質-薬物複合体、複数のサブユニットから構成されるタンパク質複合体など、機能している状態をそのまま観測することが可能であるため、生体高分子の構造を解析することで機能に関して探求する構造生物学領域において、重要な分析手法として位置づけられている。本稿ではネイティブ質量分析の概要を、測定のための要件と研究例とともに紹介する。

明石 知子

1 はじめに

有機化合物の分子量を正確に求める際に用いられる質量分析は、原則として共有結合でつながれた分子の質量の情報を提供する。一方、試料の調製方法を工夫し、ソフトなイオン化法を用いることで、静電相互作用や疎水性相互作用等の非共有結合を保ったまま分子をイオン化し、その質量情報も得ることができる。この手法を利用すれば、タンパク質の場合には、非変性状態での質量分析が可能となり、薬物やタンパク質等との複合体のままでの質量を得ることができる。また、質量が同じでも観測される価数の違いからタンパク質のコンフォメーションの違いを議論することも可能となる。このような質量分析の手法をネイティブ質量分析という。この講義では「変性させずに質量分析し、機能にかかわる情報を引き出す」という観点から、ネイティブ質量分析でできることを解説する。

2 ネイティブ質量分析の要件

2.1 イオン化法

質量分析は、原子や分子を気体状のイオンにし、電場や磁場の中を運動させ、その様子を測定することにより電荷あたりのイオンの質量 (m/z) を求める分析法である。試料は、気体状のイオンとして分析されるため、質

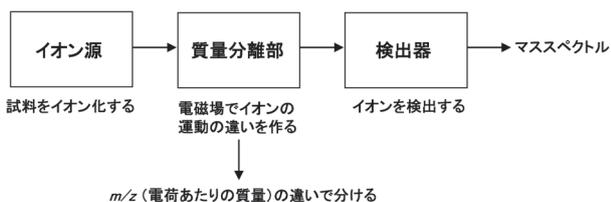


図1 質量分析装置の概要

量分析装置の試料導入部には「イオン化」するためのデバイスであるイオン源が配置される(図1)。現在、数多くのイオン化法が開発されている。用いられるイオン化法は、試料の揮発性や分子量等の特徴によって選定され、タンパク質やDNA/RNAなどの生体高分子のイオン化には、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法¹⁾またはマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法²⁾³⁾が汎用される。

1章で述べた、「変性させずに複合体を観測する」場合、タンパク質のような不揮発性の生体高分子でも極めてソフトにイオン化できるイオン化法が必要となる。上述のESI法とMALDI法を比較すると、ESI法は溶液試料をそのままイオン源に導入しスプレーして脱溶媒、イオン化、気化を行う一方、MALDI法は溶液試料をマトリックスと混合後、乾固させてイオン源に導入し、レーザー照射によりイオン化と気化を行う。そのため、MALDI法では基本的に試料は変性した状態で質量分析されることになる。したがって、ネイティブ質量分析のためのイオン化法として、MALDI法は一般的に用いられず、ESI法でイオン化する。また、観測する対象は正イオンの場合が多いが、アプタマー等の核酸試料では主に負イオンでの観測が行われる。

2.2 試料調製と導入方法

ESI法でタンパク質を正イオンとして高感度に観測するには、以下の方法が一般的に用いられる。(i) 試料を酸性の水溶液とし、プロトン化しやすくする。(ii) アセトニトリルのような有機溶媒を加え、スプレーの液滴をできるだけ小さくすることで脱溶媒の効率を高める。しかしながら、この試料調製法ではタンパク質は変性してしまうため、「ネイティブ」質量分析することはできない。ネイティブ質量分析では、試料は原則として中性水溶液を用いて調製する。一方、生化学的な実験で用いられる緩衝液に含まれるナトリウムやリン酸など不揮発

性の無機イオンは、ESI 試料のイオン化を妨害するため、汎用的な緩衝液は原則として用いることができない。そのため、揮発性があり試料のイオン化に有利に働く 5 mM~2 M 程度の酢酸アンモニウム水溶液が一般に用いられる。しかし、酸や有機溶媒を加えない溶液条件では、感度低下は避けられないことを理解しておかなければならない。また、脱溶媒しイオン化の際、試料にダメージを与えないよう最小限のエネルギーを印加するため、導入する試料の流速を数十 nL/min 程度にできるナノエレクトロスプレーイオン化 (nanoESI) 法⁴⁾で行う (図 2)。

生理的環境下では約 150 mM NaCl が存在することから、生化学実験でタンパク質試料を扱う場合は、一般にこの程度の濃度の塩を含む緩衝液を用いることが多い。しかし、上述の通り、150 mM NaCl の存在下では目的試料の ESI によるイオン化が妨げられるため、試料溶液は、原則として測定前に脱塩する必要がある。ネイティブ質量分析用に酢酸アンモニウム溶液に置換する場合、まず検討するのは、脱塩前の NaCl 濃度とほぼ同じかそれ以下の濃度の酢酸アンモニウム水溶液を使用することである。しかし、質量分析を行う気相では、静電相互作用は液相よりも強められる一方、疎水性相互作用は保ちにくい。そのため、疎水性相互作用によって形成されている複合体は、基本的に不安定になりやすい。疎水性相互作用によって安定化されているタンパク質-薬物およびタンパク質-タンパク質複合体の中には、150 mM 酢酸アンモニウム水溶液に置換して nanoESI でイオン化し質量分析すると、複合体が解離して観測される場合もある。このようなケースでは、酢酸アンモニウムの濃度を 0.5~2 M 程度まで高めて疎水的環境を安定化させて測定すると、複合体が解離せず観測できることが多い。

汎用的な緩衝液から酢酸アンモニウム溶液への溶媒交換は、透析もしくはゲルろ過のスピニングカラムを用いて行う。透析の場合、一般的な透析チューブでは容量が大きすぎるため、数十 μ L 程度でも透析可能な微量透析デバイスを用いる。ゲルろ過のスピニングカラムを用いる場合は、試料によって低塩濃度でゲルろ過の担体に吸着し、溶出されなくなることもある。その場合は、他のゲルろ過担体を試すか、透析に切り替える。そして溶媒交換前後で吸光度 (280 nm) を測定し、タンパク質の濃度を確認して実験を行うことが重要である。いずれの場合も、これらの脱塩操作により、試料は基本的に希釈される。1 回の測定に必要な試料は 1~5 μ M の溶液が 3 μ L 程度であるが、実験の再現性を確認することを考えると、脱塩前には 10 μ M 程度もしくはより高濃度の試料溶液を 20 μ L 程度は準備することが望ましい。

試料導入は、nanoESI 用のエミッター (ガラスキャピラリー) (図 2) を用いる。エミッターは、先端口径が極細で、かつ先端部分表面がプラチナや金等でコーティングされている。このエミッターにゲルローダーチップを用いて背面から試料溶液を導入する。エミッターは原則使い捨ての消耗品であるが、市販品は 1 本あたり 1000~1500 円とかなり高価である。エミッターはガラスプラーと金属蒸着装置を用いてガラス素管 (外径 1.0~1.2 mm) から自作することも可能である。金属蒸着はエミッター先端部でイオン化の電位を印加するために行われるが、代わりに、エミッター背面から細いプラチナ電極 (太さ 0.127 mm) を試料溶液に浸して電位を印加することもできる。nanoESI で用いるエミッター先端の口径は、3 μ m 程度がよく用いられるが、これを極細 (~0.5 μ m 程度) にすることで、エミッターから放出される液滴が小さくなり、その結果、汎用的な緩衝液を用いても、十分な S/N でネイティブ条件でのマススペクトルが得られることが報告されている⁵⁾。しかしながら、極細のエミッターはスプレー中に詰まりやすく、積算を重ねた S/N のよいマススペクトルを得ることが難しい場合も多い。そのため、試料の性質に合わせてエミッターを選択して使用することが望ましい。

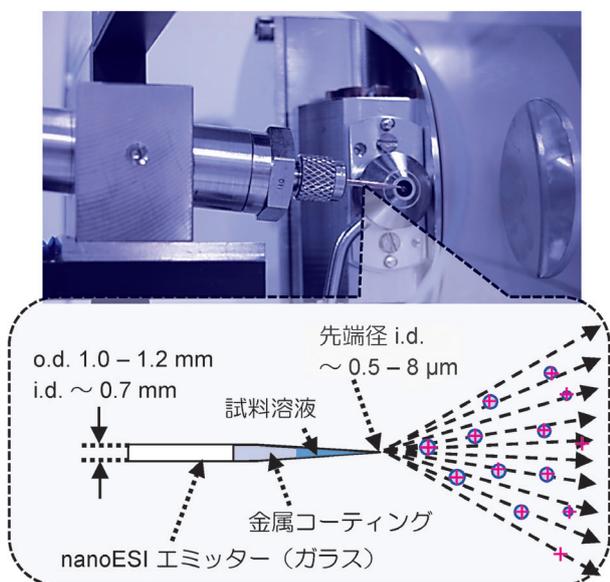


図 2 nanoESI のイオン源および nanoESI エミッター

2.3 質量分離部

質量分析装置はイオン源、質量分離部、検出部から構成される (図 1)。ネイティブ質量分析のためのイオン源については 2.1 で詳述したとおりであるが、ネイティブ質量分析のための質量分離部として市販装置で用いられているのは、大きく分けて飛行時間型 (time-of-flight, TOF) とオービトラップ型の 2 種類である。いずれも TOF やオービトラップの前に四重極 (quadrupole, Q-pole) 質量分離部等を組み合わせ、タンデム質量分析 (MS/MS) を行える装置として市販されていることが多い。検出器はそれぞれの質量分離部と相性の良い検出器

が採用されているため、ユーザーが選択することはない。しかし、実験に使用しているイオン検出の原理は理解しておく必要がある。

筆者らの研究室では、長年 Q-TOF 型（イオンモビリティ部付属）を使用しており、この装置を例に解説する。イオン源で生成した複合体のイオンにおける弱い非共有結合を保持するためには、できるだけマイルドに質量分析装置の中を移動させる必要がある。Q-TOF 型装置の場合、一般に差動排気で検出部までの高真空を保っているが、nanoESI は大気圧イオン化法であるため、イオンを取り込む領域における圧力勾配が最も急峻となる。そこで、筆者らの研究室の装置では、真空度をモニターしながらイオン源直後の領域の真空引きをしているスクロールポンプのバルブを徐々に閉め、この領域の真空度（Backing pressure）をあえて悪くさせる（通常時の約 2 mbarr（200 Pa）から約 5 mbarr（500 Pa）まで圧力を高くする）。これにより、イオン化直後の急激な圧力低下を防ぎ、複合体イオンが解離しないようにして質量分析計内に取り込む。その後、四重極部に続いて配置されている Trap 領域を通過し、Ion Mobility Cell、Transfer 領域を通過して TOF へと導かれる。Trap および Transfer 領域では、衝突誘起解離（collision induced dissociation, CID）を起こさないよう、必要以上にコリジョン電圧を高くしない。また測定対象とする試料が 50 kDa を超えるような大きなタンパク質複合体の場合、Trap 領域へ導入する Ar ガスの量を増やして（3.0 mL/min 以上）イオンをクーリングすることで感度向上を図る。なお、このガス流量は TOF 領域の真空度にも影響するので、必要以上高い値にはしないように注意する。

Q-TOF 型装置では、マススペクトルに観測されるイオンは、最終的に TOF の後ろに置かれた検出器で検出されるため、高い S/N のスペクトルを得るためには四重極部での質量フィルターとしての機能を利用するのがよい。筆者らの使用している Q-TOF 型質量分析装置では、四重極部に印加するラジオ周波数（RF 値）を時間分割で設定できる。すなわち、ある m/z 範囲のイオンが四重極を通過するタイムスケジュールをマニュアルで設定することができる。一方、測定する質量範囲に合わせて自動設定することも可能であり、一般的には自動設定で行う。ネイティブ質量分析で高 m/z のイオンをできるだけ高い S/N で測定したい場合は、四重極部を低 m/z のイオンがあまり通過しないようにして測定する。これにより、次項 3 章で述べるような巨大なタンパク質複合体の測定でも、質の高いマススペクトルを得ることが可能となる。

3 ネイティブ質量分析の測定例

3.1 金属が結合したタンパク質複合体：ヒト SOD1⁶⁾

ヒト Superoxide dismutase 1 (SOD1) は、銅・亜鉛

SOD1: dimer

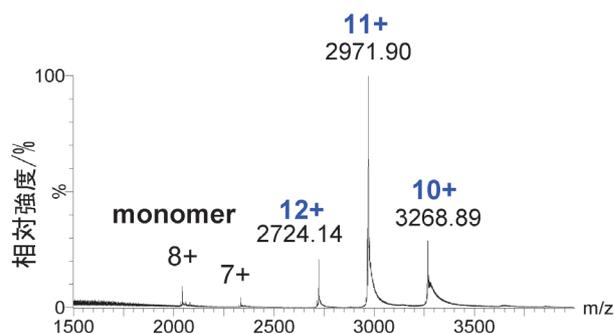


図3 ヒト SOD1 のマススペクトル

イオンを結合する金属タンパク質で、反応性の高い活性酸素種であるスーパーオキシドを分解し、酸素分子と過酸化水素に変換する酵素である。変異型の SOD1 は異常な構造をとることで凝集し、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因となる可能性が示唆されている。図3に、大腸菌発現系で調製した野生型ヒト SOD1 (16 kDa (単量体)) のネイティブマススペクトルを示す。

ESI マススペクトルでは、複数の多価イオンが観測される。図3で強く観測されたピークは 10+, 11+, 12+ のピークと帰属でき、観測された m/z の値と価数から分子量を求めると 32686.78 ± 0.93 となる。アミノ酸配列から計算される分子量（アポ型単量体：16215.00）と観測された質量を比較することで、SOD1 がホモ二量体であり、単量体あたり銅および亜鉛イオンを 1 個ずつ保持していることがわかる。

このように、金属結合タンパク質でも適切に試料調製を行い、できる限りソフトなパラメータを設定して質量分析することで、二量体構造や結合している金属イオンを保持したままでイオンを観測し、正確な質量決定を行うことができる。

3.2 タンパク質-核酸複合体：ヌクレオソームコア粒子⁷⁾

真核生物が核内にコンパクトに DNA を収納する際、その最小構造単位であるヌクレオソームコア粒子 (NCP) は、ヒストンタンパク質 H2A, H2B, H3, H4 二分子ずつからなるヒストン八量体に DNA が約 2 回転弱、左巻きで巻き付いたタンパク質-DNA 複合体である。遺伝子組み換えタンパク質として調製した 4 種類のヒストンタンパク質と 146 塩基対からなる DNA を用いて NCP を *in vitro* で再構成したところ、主生成物に加え、副生成物と思われる画分が得られたことがネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動（ネイティブ PAGE）で確認された。そこで、両画分を単離しネイティブ質量分析を行った結果、図4に示すように、主生成物は目的とした NCP の分子量と矛盾のない値（実験値 205003 ± 33 ）であったが、副生成物の画分では

28 kDa 小さい質量 (Mw 175449±9) と 146 塩基対の DNA に相当する質量 (実験値 93226±9) を示した. その質量から, 後者の 28 kDa 小さい成分はヒストン H2A, H2B 各 1 分子ずつ欠損したヒストン六量体と DNA との複合体であることがわかった. ヒストン六量体と DNA からなる複合体が再構成の過程で生じることは, *in vivo* の実験でも示唆されていたが, 本データは, *in vitro* でもヒストン六量体が NCP の中間体として生成することを示すものである.

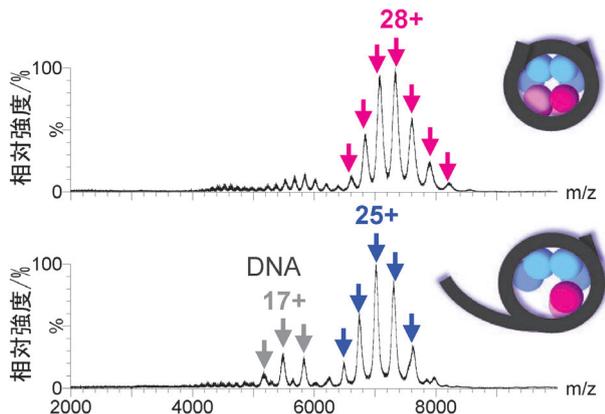


図4 再構成して得られたNCP(上)と副生成物(下)のマススペクトル

NCPのマススペクトルでは主に25+から31+まで, ヒストン六量体とDNAからなる副生成物では23+から28+までが観測されている. 副生成物の場合, その不安定性のため, はがれたDNAの16+から18+までのイオンも観測されている.

Reprinted with permission from Ref.7: *Biochemistry*, **52**, 5155 (2013). Copyright 2013 American Chemical Society.

本来, ESIでのイオン化と相性のよくないリン酸のポリマーである核酸と, ヒストンタンパク質とで形成するNCPでは, ネットチャージはマイナスとなり, ネイティブ質量分析で正イオンを観測することは不利であると考えられた. しかしながら, 上述のように, NCPがネイティブ質量分析で正イオンとして問題なく観測されることが示された. これは, クロマチンリモデリングなど核内イベントの解析にネイティブ質量分析が有用であることを示唆する結果である.

3.3 膜タンパク質: 大腸菌膜内切断亜鉛メタロプロテアーゼ RseP⁸⁾

膜タンパク質は細胞膜に存在し, 細胞内外の情報伝達を担う重要な存在である. その疎水性表面は膜内に埋もれることで安定化されているため, 膜から剥がして単離すると変性してしまう. そこで, 構造解析用等に膜タンパク質を調製する場合, 膜画分を単離後, 界面活性剤でミセル化して可溶化する. ネイティブ質量分析では, ミセル化された試料を用い, nanoESI質量分析の際に脱溶

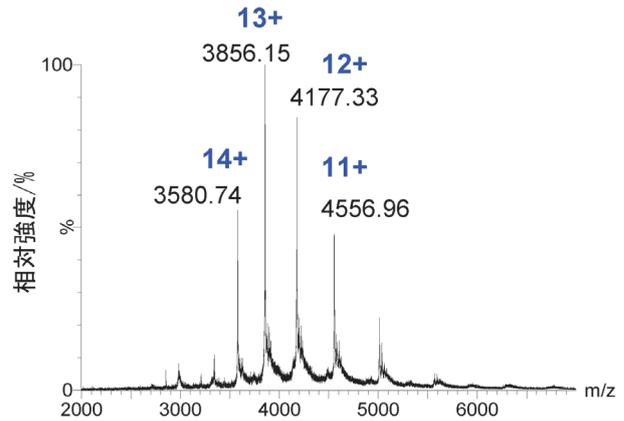


図5 大腸菌膜内切断亜鉛メタロプロテアーゼ RsePのマススペクトル

媒と脱ミセルを行い, 膜タンパク質そのものの質量を求める. 膜タンパク質が情報伝達物質や薬剤との複合体を形成し, 複合体としての質量やその安定性を調べたい場合には, 質量分析時のパラメータ(コリジョン電圧, イオン化電圧等)を最適化し, 複合体をそのまま保ち界面活性剤だけを剥離して質量分析する. そのため, 強固に膜タンパク質に結合して安定化する界面活性剤を測定時に用いることは避ける. すなわち, 試料精製時には安定化能の高い界面活性剤を用い, 質量分析時には, 測定直前に比較的剥がしやすい界面活性剤にゲルろ過スピニングカラムを用いて交換する(2.2節参照). 試料精製時および測定時に用いる界面活性剤は膜タンパク質ごとに検討する必要がある. 図5に, この方法で測定した大腸菌膜内切断亜鉛メタロプロテアーゼ RsePのマススペクトルを示す. 試料調製では, スクロースモノラウレート(SM)でミセル化し, 測定前にラウリルジメチルアミノオキシド(LDAO)に界面活性剤を交換して測定した. 観測されたピークから計算された分子量 50115.6 ± 0.8 は, RsePが亜鉛イオン一つを結合した状態に相当している. このように, 膜タンパク質の場合, 界面活性剤だけを選択的に剥離する条件が決まれば, 金属ヤリガンドが結合した状態でも, 質量分析による解析が可能となる.

3.4 一細胞ネイティブ質量分析⁹⁾

上述のネイティブ質量分析は, いずれも遺伝子組み換えタンパク質を用いた実験であった. 一方, 生体内で機能するタンパク質の様子を理解するには, 生細胞のままネイティブ質量分析することが求められる. その第1歩として, 細胞内の全タンパク質のうち, 約98%がヘモグロビンといわれている赤血球を丸ごと質量分析した例を紹介する. この実験では, 赤血球を壊さずに nanoESI用のエミッターにサンプリングすることでヘモグロビンの局所濃度を上げた. さらに, サンプリング時の水溶液の最適化(細胞膜を壊さず, かつ質量分析にできるだけ

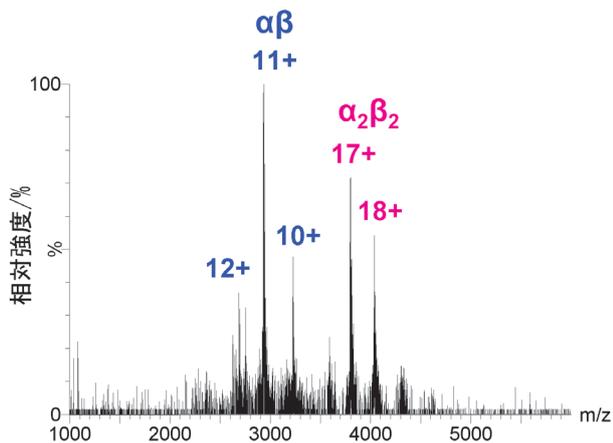


図6 赤血球1個から得られたマススペクトル
Hbの $\alpha_2\beta_2$ 四量体および $\alpha\beta$ 二量体のイオンが観測されている。

悪影響を与えない濃度の酢酸カリウム水溶液と酢酸アンモニウム溶液の使い分け), 極細プラチナ電極を用いた電圧印加等, 様々な工夫を行った結果, たった一つの赤血球からヘモグロビンのネイティブ質量分析することに世界で初めて成功した(図6)。ヘモグロビンは, 2分子ずつの α -および β -グロビン鎖からなるヘテロ四量体であり, それぞれのグロビン鎖にヘム分子が非共有結合している。図6では, α -および β -グロビン各1分子が形成するヘテロ二量体のイオンとともに, ヘテロ四量体のイオンが観測されている。これは, 試料中のヘモグロビンの濃度が十分に高くないため, ヘモグロビンのかなりの割合がヘテロ二量体に解離していることを示している。このようなネイティブMSの手法を用いることで, 細胞内での相互作用を細胞ごとに解析できるようになることも現実味を帯びてきている。

3 おわりに

生命科学領域で利用されているネイティブ質量分析の概要と研究例を紹介した。海外ではネイティブ質量分析を用いて生体高分子の構造機能解析を行う研究者は少なくない。一方, 国内では数えるほどしかないのが現状である。タンパク質の機能にかかわる重要な情報を引き

出すことができるネイティブ質量分析は, 「生命科学」の学際領域研究を加速する可能性を秘めている。本稿が, ネイティブ質量分析に一人でも多くの方が興味を持ち, 自身の研究に取り入れて, オリジナリティの高い研究を進展させるきっかけとなれば幸甚である。

謝辞 本稿で取り上げた研究に際し, ご協力いただいた学内外の共同研究者の皆様へ深く感謝いたします。

文 献

- 1) J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse : *Science*, **246**, 64 (1989).
- 2) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 3) M. Karas, F. Hillenkamp : *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 4) M. Wilm, M. Mann : *Anal. Chem.*, **68**, 1 (1996).
- 5) A.C. Susa, Z. Xia, E.R. Williams : *Anal. Chem.*, **89**, 3116 (2017).
- 6) M. Tajiri, H. Aoki, A. Shintani, K. Sue, S. Akashi, Y. Furukawa : *Free Radic Biol Med.*, **183**, 60 (2022).
- 7) N. Azegami, K. Saikusa, Y. Todokoro, A. Nagadoi, H. Kurumizaka, Y. Nishimura, S. Akashi : *Biochemistry*, **52**, 5155 (2013).
- 8) Y. Imaizumi, K. Takanuki, Y. Miyake, M. Takemoto, K. Hirata, M. Hirose, R. Oi, T. Kobayashi, K. Miyoshi, R. Aruga, T. Yokoyama, S. Katagiri, H. Matsuura, K. Iwasaki, T. Kato, M. K. Kaneko, Y. Kato, M. Tajiri, S. Akashi, O. Nureki, Y. Hizukuri, Y. Akiyama, T. Nogi : *Sci Adv.*, **8**, eabp9011 (2022).
- 9) W. Sakamoto, N. Azegami, T. Konuma, S. Akashi : *Anal. Chem.*, **93**, 6583 (2021).



明石 知子 (AKASHI Satoko)

横浜市立大学大学院生命医学研究科 (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29)。千葉大薬学部総合薬品科学科卒, 薬学博士。《現在の研究テーマ》質量分析を用いたタンパク質の構造機能解析。《主な著書》“生命金属ダイナミクス: 生体内における金属の挙動と制御”, 城直嗣, 津本浩平 監修, 分担執筆, 第7章 方法論 第9節 ネイティブ質量分析 (エヌ・ティー・エス出版), p.445-454 (2021)。《趣味》生け花, ランニング, スキー。
E-mail : akashi@yokohama-cu.ac.jp