

生体高分子の質量分析による構造機能研究

明石 知子

**Structural and Functional Characterization of Biological Macromolecules
by Mass Spectrometry**

Satoko AKASHI

*International Graduate School of Arts and Sciences, Yokohama City University,
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama City 230-0045, Japan*

(Received June 30, 2006)

Mass spectrometry has widely been used as a tool for identification of proteins in the research fields of biochemistry and clinical chemistry because it can provide accurate information on molecular masses of biological molecules with a small amount of sample in a short time. If mass spectrometry is properly used, it can also give information on the tertiary structure or on the molecular interactions of biological macromolecules. The present paper focuses on the role of mass spectrometry as a tool for the investigation on the tertiary structure of proteins and on the biological molecular interactions that play essential roles in various biological events.

Key words—mass spectrometry; biological macromolecule; noncovalent; molecular interaction

1. はじめに

2002年のノーベル化学賞は「生体高分子のソフトイオン化法の開発」で、John B. Fenn教授のエレクトロスプレーイオン化(ESI)法¹⁻³⁾の開発と、田中耕一氏のソフトレーザー脱離イオン化法⁴⁾(現在のマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)法⁵⁾の原型)の開発に授与された。その背景としては、次のようなことが挙げられる。1980年代まではタンパク質や核酸などの不揮発性の生体高分子をイオン化できる優れた方法がなかったが、これら2つのイオン化法の開発により、分子量が数万の生体高分子でもいとも簡単にイオン化できるようになり、また分子量数千のペプチドであればピコモル(10^{-12} mol)以下の試料を用いてイオン化して生じるイオンの質量をルーティンで分析できるようになった。そしてその後の装置及び応用面での様々な技術的革新により、今日のプロテオミクス研究には、質量分析(MS)は、フェムトモル(10^{-15} mol)レ

ベルの試料量でタンパク質を同定するためには欠くことのできないツールとなっている。この場合のMSの役割は、微量試料でペプチド及びタンパク質の質量を正確かつ迅速に測定し、タンパク質同定のために必要なペプチドの分子量情報や部分アミノ酸配列の情報を提供することである。そしてこれらの情報とデータベース検索を組み合わせることで、タンパク質を同定することができる。⁶⁻⁸⁾すなわち、MSはタンパク質の一次構造に関する情報を得るための手段である。このようにして、現在ではタンパク質を容易に同定できるようになったものの、タンパク質の高次構造や分子間相互作用など生命現象を司る重要な情報は、このような実験からは簡単に得ることはできない。

一方、生体高分子の高次構造を決定するための方法としては、X線結晶構造解析やNMRなど優れた分析手法があり、これらを用いることで原子レベルで生体高分子の高次構造を明らかにすることができる。しかしながら、X線結晶構造解析では単結晶が得られないと全く構造情報が得られず、NMRではルーティンで解析できるのは分子量が約2万程度までであるという制約があり、また、いずれの方法も結果が得られるまでには一般に数ヶ月以上の時間

横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子科学専攻(〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29)
e-mail: akashi@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
本総説は、平成18年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

を要する。このような背景から、筆者らを始めとするいくつかのグループでは、「微量・迅速・正確」という MS の特長を最大限利用して、タンパク質の機能に係わる高次構造や分子間相互作用に関する情報を MS で得るための方法確立し、様々な生体高分子複合体の構造機能解析に応用した研究を展開している。本総説では、タンパク質を始めとする生体高分子の機能に係わる構造情報を取得するための MS を用いる研究について、筆者らの研究を中心に概観する。

2. 重水素との交換反応と MS の組み合わせによるタンパク質の構造解析

MS で得られるのは分子量に関する情報であり、例えばきちんとフォールディングして機能できる状態のタンパク質と変性して機能できない状態のものとは、アミノ酸配列に違いがなければ、ただ質量を測定するだけでは両者を見分けることはできない。また、どの部分が分子内部に埋もれていて、どの部分が分子表面に存在しターゲット分子を認識しているかという情報は、質量測定だけから求めることはできない。コンフォメーションの違いや分子表面に露出している残基に関する情報を得るためには、このような状態の違いを質量差に変換して求めなければならない。状態の違いを質量差に変換する方法を組み合わせるタンパク質の高次構造を解析した研究例について、以下で述べる。

2-1. His 残基イミダゾール C-2 位水素の重水素交換

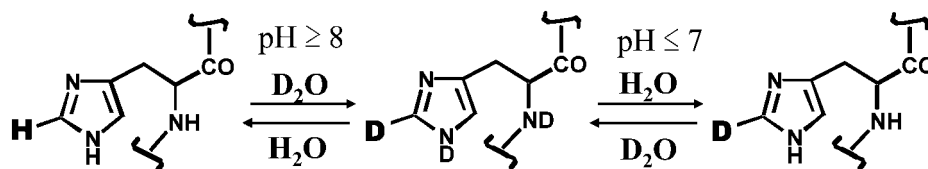
重水にタンパク質を溶解した場合、炭素原子に結合している水素は、原則として重水素に交換されないが、ヘテロ原子に結合した水素原子は重水素と交換される。水素原子が重水素に交換されると、質量が 1 増加する。特にタンパク質の主鎖アミド水素は、存在環境により交換速度が大きく異なることから、交換可能なアミド水素を重水素に交換後、質量分析し、置き換わったアミド水素を特定することでタンパク質の高次構造を解析することができる。このような方法論の原型が、Zhang and Smith によって確立されたのち、⁹⁾ 現在、様々なタンパク質の構造解析に用いられている。このような研究が始められる前の 1989 年に、筆者らのグループは、His のイミダゾール C-2 位の水素の重水素交換を利用して、NMR と MS を組み合わせることでタンパク質の高次構造解析を行えることを示

す萌芽的な研究を行っている。¹⁰⁾

多次元 NMR が使われ始める前の 1980 年代には、水素原子を重水素に交換しその挙動を解析する方法は、Trp や His など芳香族アミノ酸の側鎖の帰属に主に利用されていた。Miyano らは、免疫応答を調節するサイトカインの 1 つ Interleukin-2 (IL-2) の一次元 ¹H-NMR のシグナルを解析していて、IL-2 分子内に存在する 3 つの His 残基の重水中での挙動が大きく異なることを見出した。すなわち、1 つの His 残基の C-2 位の H は重水素との交換が速いのに対し、1 つはほとんど交換されず、もう 1 つはその中間であるという結果を得た。このことは、交換が速い H を有する His は分子の外側に位置し、交換が遅い His は分子内部に埋もれており、その中間の交換速度を示す His は、溶媒に対する露出がこれら 2 つの中間の状態にあることを示している。この 3 つの His 残基の帰属を行うことができれば、高次構造を解析する手掛かりとなると考え、筆者らはこれら 3 つの His 残基の同定を MS を用いて試みた。

His 残基のイミダゾールの C-2 位に結合した水素原子は、溶液の pH を pH > 8 にすると重水素と交換されるが、酸性条件下では交換されない (Scheme 1)。そこで、pH 8.45 の炭酸アンモニウム重水緩衝液中で交換可能な水素を重水素に置換したのち、pH 4.5 の酢酸アンモニウム軽水緩衝液中で *Staphyrococcus aureus* V8 プロテアーゼ (V8 プロテアーゼ) による酵素消化を行い、ペプチド断片とし、その質量を測定した。重水素交換を行わない試料についても、同様に V8 プロテアーゼによる消化ののち質量測定を行った。分子表面に露出した位置に存在する His を含むペプチドは、重水素交換を行った場合は、行わないものに比べて、1 つの His 当たり質量が 1 増加する。これに対し分子内部に埋もれている His を含むペプチドは、重水素交換を行ってもイミダゾールの C-2 位に結合した水素原子は重水素に置き換わらないので、行わなかった場合との質量変化がみられない。これは、先に述べた ¹H-NMR で観測される His 残基の C-2 位水素の挙動に対応すると考えられる。

実験の結果、Fig. 1 に示すような高速原子衝撃 (FAB)¹¹⁾ マススペクトルを得た。^{10,12)} 重水素交換反応の有無で FAB マススペクトルを比較すると、



Scheme 1. H/D Exchange of C-2 Proton of Imidazole in Histidine Residue

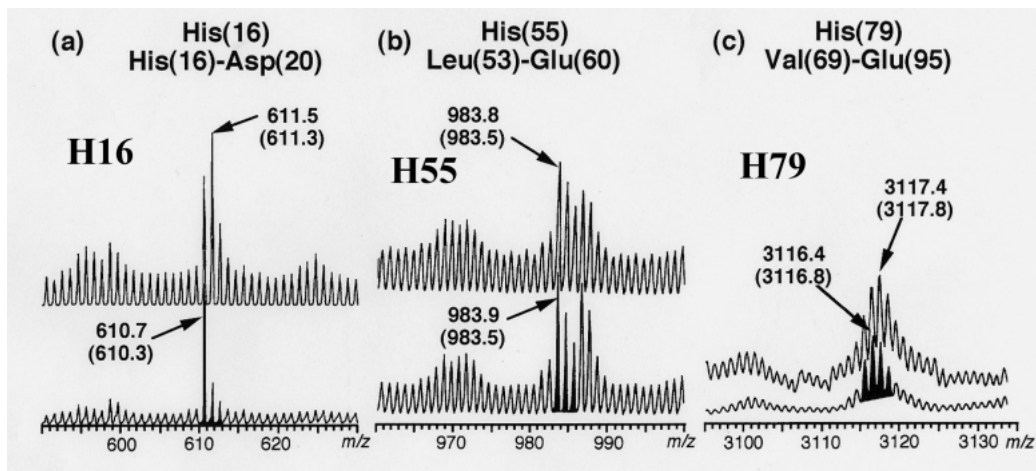
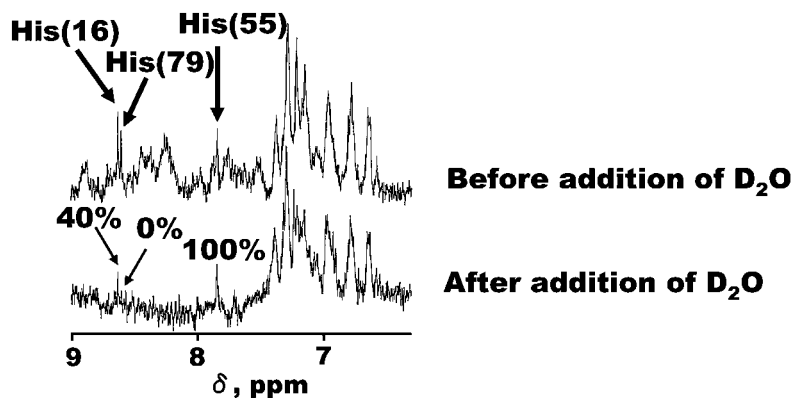


Fig. 1. FAB Mass Spectra of Peptides (a) His (16)-Asp (20), (b) Leu (53)-Glu (60), and (c) Val (69)-Glu (95) Generated by V8 Protease Digestion of IL-2

Upper panel: with deuteration at 37°C in D₂O (pH 8.45). Lower panel: without deuteration. Observed mass value for each protonated molecule is indicated in the spectra, associated with the theoretical value in a parenthesis. (Reprinted with permission from Ref. 10) by Miyano H. et al., *Anal. Sci.*, 1989. Copyright 1989, the Japan Society for Analytical Chemistry, and from Ref. 12) by Akashi S., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 1997. Copyright 1997, the Mass Spectrometry Society of Japan, and modified).

Fig. 2. Aromatic Region ¹H-NMR Spectra of IL-2

Upper panel: Before addition of D₂O. Lower panel: After deuteration at 37°C in D₂O (pH 8.45). (Reprinted with permission from Ref. 10) by Miyano H. et al., *Anal. Sci.*, 1989. Copyright 1989, the Japan Society for Analytical Chemistry, and modified).

His55を含むペプチドは質量変化がなく、His79を含むペプチドは重水素交換反応により質量が1増加し、His16を含むペプチドはその中間であることが分かった。この結果を元に¹H-NMRスペクトルの解析を行い、Fig. 2に示すように帰属を行うことができた。¹⁰⁾その後、1992年にProtein Data Bankに

登録されたIL-2の高次構造 (Fig. 3)^{12,13)}に当てはめるところ、この帰属が正しいことが確認された。この研究は、立体構造の原子座標が手元になくても特定のアミノ酸残基の存在環境をNMRとMSの組み合わせで解析できることを明らかにしたものであり、タンパク質の高次構造解析にMSが有効であ

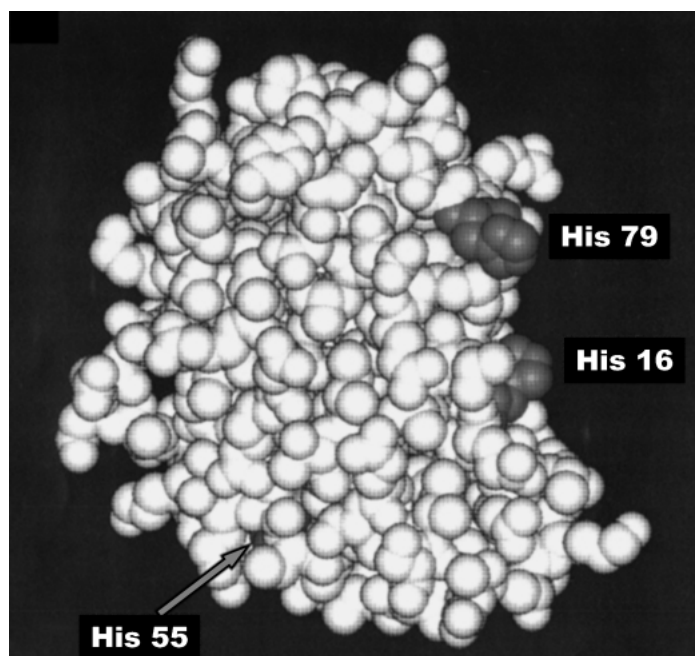


Fig. 3. Tertiary Structure of IL-2 (PDB: 3INK)¹³⁾

(Reprinted with permission from Ref. 12) by Akashi S., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 1997. Copyright 1997, the Mass Spectrometry Society of Japan, and modified).

ることを示したものである。

2-2. 主鎖アミド水素の重水素交換 一般に、ヘテロ原子に結合した水素原子は、主鎖アミド水素以外は、重水に溶解することですばやく重水素に置き換わる。これに対し、タンパク質の主鎖アミド水素は、His の C-2 位水素と同様に、溶液の pH や温度、そして分子における存在環境（分子表面に露出しているか内部に埋もれているか）により重水素との交換速度が変化する。¹⁴⁾したがって、アミド水素の重水素交換をタンパク質が変性しない中性付近の溶液条件で行い、その後溶液の pH を酸性にし、かつ溶液の温度を下げることで、交換反応をクエンチすることができる。そして、重水素交換反応に伴う質量変化を詳しく解析することでタンパク質の高次構造情報を引き出すことができる。この考え方に基づき、Miranker らは、lysozyme のフォールディング・リフォールディングの過程をパルスラベル法によるアミド水素の重水素交換反応に伴う質量変化を解析することで明らかにできることを示し、変性状態から完全にリフォールディングするまでの間に、リゾチームにはリフォールディングの中間状態が存在することを MS で証明している。¹⁵⁾また、Zhang and Smith はアミド水素の重水素交換を行ったのち、溶液の pH を最も交換速度の遅い pH 2.5 付近

まで下げてから、ペプシンで消化し得られるペプチドについて、低温下における液体クロマトグラフィー/MS (LC/MS) で質量測定することで、タンパク質の分子の外側に露出した部分と内側に埋もれている部分を見分けられることを示している。⁹⁾これら 1990 年代前半の先駆的研究ののち、後述するように、タンパク質の相互作用部位の解析など様々な応用研究が報告されるようになり、主鎖アミド水素の重水素交換と MS を組み合わせて高次構造解析が行えることが広く理解されることとなった。

筆者らは、Zhang and Smith の方法⁹⁾を一部修正し、クエンチ方法を変更するとともにペプシン消化を行わずに質量分析装置内で断片化する方法¹⁶⁾を用いて、papain 阻害タンパク質である cystatin が papain と相互作用する部位を解析している。¹⁷⁾

Cystatin は papain (23 kDa) と 1 : 1 の複合体を形成し、papain のプロテアーゼ活性を阻害する 13 kDa のタンパク質である。Cystatin と構造類似のプロテアーゼ阻害剤 stefin B (11 kDa) と papain の複合体の構造は X 線結晶構造解析により解かれていた¹⁸⁾が、cystatin と papain の複合体の構造は解かれていなかった。また、種々の変異体の実験から、cystatin の N 末端の数残基は、papain の阻害活性に重要であると考えられていた。この cystatin-

papain 複合体について、タンパク質主鎖のアミド水素の重水素交換を行ったのち、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FTICR-MS) 装置を用いてタンパク質丸ごとの質量と MS 装置内で断片化することにより得られるフラグメントの質量を同時に獲得するという方法で相互作用部位について解析を行った。¹⁷⁾ 方法の概略を Fig. 4 に示す。

最初に cystatin 単独で中性条件において重水素交換を行い、続いて冷却した重酢酸/重水溶液で溶液の pH を pH 2.6 まで低下させ、交換反応をクエンチする。その後、直ちに FTICR-MS で測定を行う。このとき、分子量関連イオンとともに、MS 装置内で断片化して得られるフラグメントイオンの質量も正確に測定する。一方、cystatin と papain を 1 : 1 のモル比で混合後、同様の実験を行い、cystatin 単独の場合の結果と比較し、重水素化率の違いから相互作用部位を特定する。

この実験スキームの特徴は以下の 2 点である。1 つ目の特徴は、重酢酸/重水溶液で交換反応をクエンチすることである。重水素交換の反応は、重水溶液ではなく軽水溶液の酸で pH を下げてクエンチするのが一般的である。アミノ酸側鎖のアミノ基、水酸基、カルボキシル基などのヘテロ原子に結合している交換可能な水素の交換速度は、主鎖アミド水素のそれと比較すると桁違いに速いため、軽水溶液でクエンチすればこれらはすべて軽水素に置き換わり、重水素化されているのは分子表面に露出し溶媒

と接触し易い位置にある主鎖アミド水素だけとなる。すなわち、側鎖の重水素化はすべてキャンセルされることになり解析が行い易くなる。しかしながら、軽水でクエンチすることで、交換速度の速いアミド水素の重水素ほど軽水素に再度置き換わり易いため、クエンチの過程における逆交換を完全に防ぐことはできない。すなわち、「分子表面に露出し溶媒と接触し易いアミド水素ほど重水素化率が高い」という基準が使えなくなる可能性がある。一方、重酢酸/重水溶液でクエンチする方法では、側鎖の交換可能な水素も重水素化されているため、アミド水素の重水素化率の解析は容易ではないが、「重水素化され易い=重水素化率が高い」という関係が成り立つ。正確に相互作用部位を解析するために、ここでは重酢酸/重水溶液でクエンチする方法を用いた。2 つ目の特徴は、質量分析装置内での断片化を行うことである。重水素化反応後、一次構造上、どの部分のアミド水素が重水素されたのかを特定するには、一般には、ペプシンで消化して得られるペプチドの質量を LC/MS で測定する。これにより分子量 4 万程度までのタンパク質であれば一次構造上のほとんどすべての領域をカバーして解析することができる。しかしながら、ペプシンで消化することにより、新たにペプチド断片の N 末端となるアミド水素の重水素化の情報はすべてキャンセルされてしまう。これに対し、重水素化されたタンパク質を FTICR-MS 装置内で分子全体及び断片の質量測定

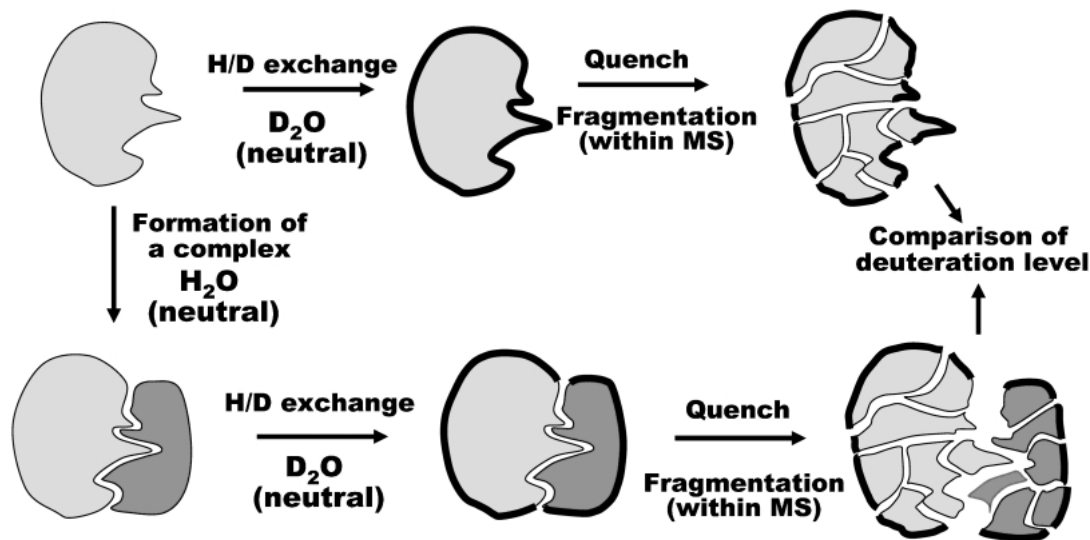


Fig. 4. A Schematic Illustration of the Strategy for Structural Analysis of Protein-Protein Complexes by Mass Spectrometry in Combination with H/D Exchange

までを行うことができれば、このような切断により生じる末端部位の問題は解決することができる。筆者らは、まず構造が既知の ubiquitin について実験を行い、手法の妥当性を示したのち、¹⁶ cystatin-papain の相互作用部位について解析を行った。¹⁷⁾

その結果、papain との複合体を形成することで、cystatin は分子全体が硬くなり全体的に重水素化率の低下がみられるが、中でも cystatin の N 末端の 10 残基を含む部分 (segment 1—10) は、複合体の形成に伴い著しく重水素化率が低下することが明らかとなった (Fig. 5).¹⁷⁾ このことは、それまでの生化学的実験結果¹⁹⁾とも一致するものであった。このように、複合体の相互作用部位に関する情報が X 線結晶構造解析や NMR による解析なしでも導き出せることが明らかとなった。

タンパク質の主鎖アミド水素の重水素交換とペプシン消化を組み合わせ、タンパク質—タンパク質若しくはタンパク質—リガンドの相互作用部位を解析した研究はこれまでに様々な報告がなされている。多くのレビューも出されている^{20–27)}ので、興味のある方は参照されたい。

3. 官能基に対して特異的な化学修飾反応と MS の組み合わせによるタンパク質の構造解析

アミド水素の重水素交換の反応を利用してタンパク質の高次構造や相互作用部位を解析できるように、非変性条件下で分子表面に存在するアミノ酸側鎖に対して特異的な化学修飾反応を施して質量変化を観測することでも、タンパク質が関与する相互作用部位を解析することができる。

3-1. タンパク質—阻害剤の相互作用部位の解析

筆者らは、1,4-*N*-acetylmuramidase である lysozyme とその阻害剤である tri-*N*-acetylglucosamine (NAG₃) の相互作用部位を化学修飾と MS で解析できることを 1993 年に示している。²⁸⁾ 阻害剤の存在下及び非存在下でアミノ酸側鎖の官能基に対して特異的な化学修飾反応を施し、それぞれにおいて修飾されたアミノ酸残基を MS を用いて特定する。阻害剤の存在下においてのみ、修飾反応が妨げられた官能基は、阻害剤との相互作用部位である可能性が高いと考えられる。この考え方は、Fig. 4 に示したアミド水素の重水素交換の場合と同様のものである。Lysozyme と阻害剤 NAG₃ との相互作用部位の

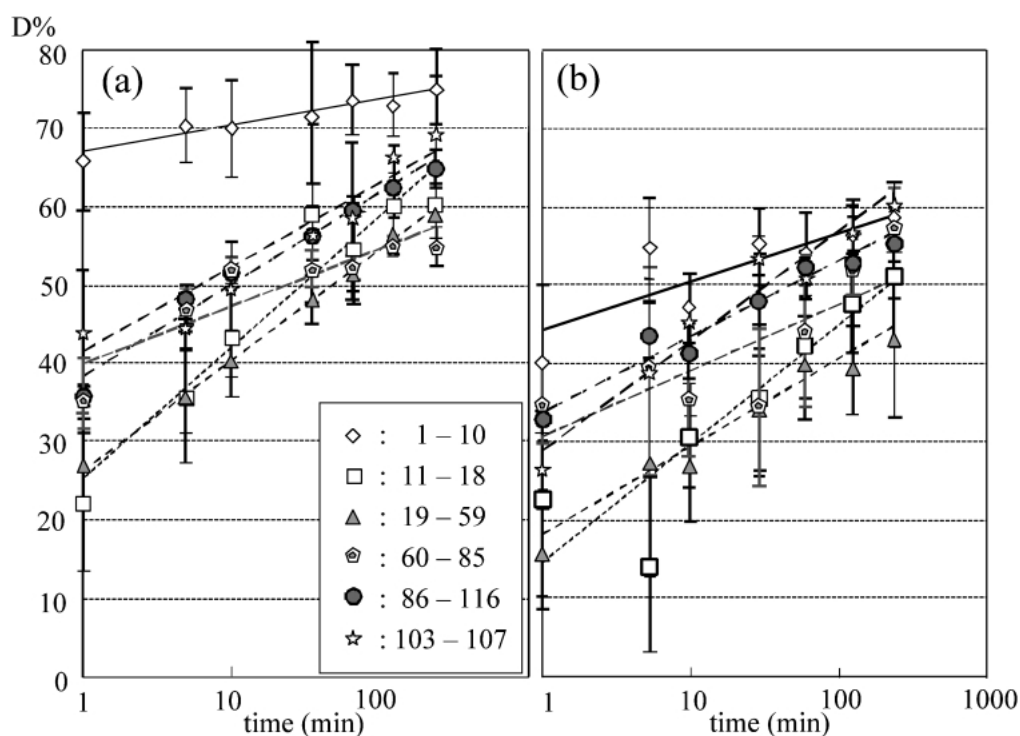


Fig. 5. Percentage Deuterium Incorporation into Amide Hydrogens in the Segments 1—10, 11—18, 19—59, 60—85, 86—116, and 103—107 of Cystatin in the Absence (a) and Presence (b) of Papain as a Function of Time (min) on a Log Scale

Each data-point represents the mean \pm standard deviation (S.D.) of deuterium content of amide hydrogens. Regression lines were plotted based on least-square regression analysis. (Reproduced with permission from Ref. 17) by Akashi S. and Takio K., *Protein Sci.*, Copyright 2000 by the Protein Society, and modified).

解析実験に用いた化学修飾の反応を Scheme 2 に示す。それぞれの反応を阻害剤の存在下及び非存在下で行い、得られる修飾タンパク質のジスルフィド結合を還元アルキル化ののち、トリプシン又は V8 protease で消化してペプチド断片とし、それぞれの質量を LC/MS で決定するという方法で詳細に解析した。その結果、Trp62 と Asp101 において、NAG₃ の存在下においてのみ修飾反応が抑えられることが示された。この結果を Protein Data Bank (PDB) に登録されている lysozyme-NAG₃ 複合体の構造と照らし合わせたところ、これらの残基はまさに NAG₃ との相互作用部位に存在していることが確認された。この結果から、IL-2 の His 残基の存在環境の解析の場合と同様、アミノ酸側鎖に質量変化を生じさせる化学的手法と MS を組み合わせることで、タンパク質の相互作用部位に関する情報を得られることが示された。

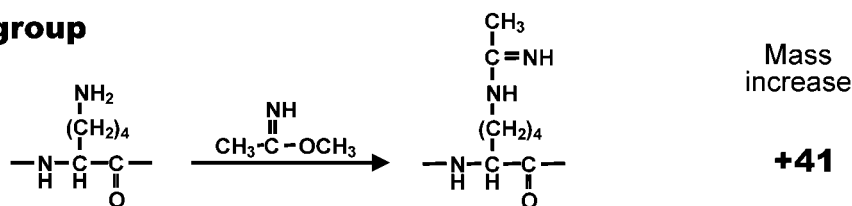
この研究が行われた 1990 年代の前半には、タンパク質の一次構造解析に MS が用いられるようになって間もない時期であり、タンパク質の高次構造や相互作用部位の解析に MS を用いる研究は、まだわずかしかが行われていなかった。²⁹⁻³¹⁾ このよう

な研究がベースとなり、のちに方法が洗練されたものとなって、様々なタンパク質の高次構造や相互作用部位について MS による構造解析が進められるようになった。

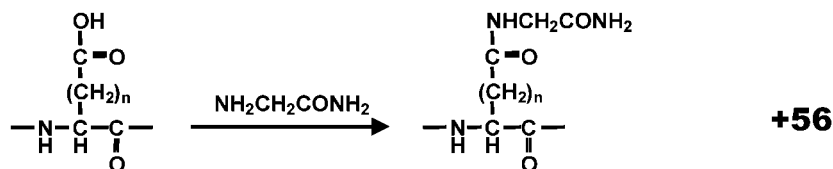
3-2. 架橋試薬を用いたタンパク質の構造解析

化学修飾反応の場合に用いる試薬は、Scheme 2 に示すように、1つの官能基に対して特異的に修飾反応を施すものである。これに対し、架橋試薬は官能基に対して反応できる部位を1分子内に複数有し、リンカーの届く距離に存在する複数の官能基を架橋することができる試薬である。このような架橋試薬を用いたタンパク質の構造解析は、1990年以前では、主にタンパク質化学の分野でアミノ酸分析やプロテインシークエンサーを用いて多くの量のタンパク質試料を用いて行われていた。そして ESI や MALDI などソフトイオン化法の開発や質量分析装置の進歩に伴い、架橋部位の同定には微量試料で迅速に解析ができる MS が主な手段として用いられるようになった。最近では、タンパク質の構造解析のための架橋反応と MS を組み合わせた方法で、数多くのタンパク質について構造研究が行われている。³²⁻³⁵⁾

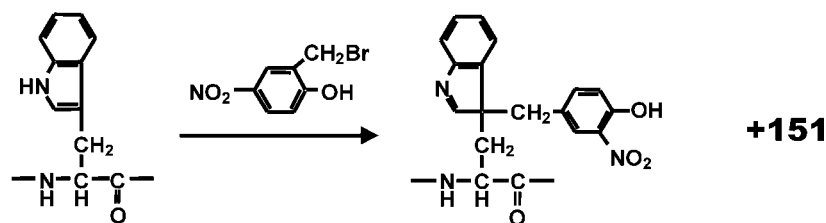
1. Amino group



2. Carboxyl group



3. indole



Scheme 2. Schemes of Chemical Modification for Amino Group (1), Carboxyl Group (2), and Indole (3)
Mass increase by each chemical modification is indicated on the right of the reaction scheme.

架橋試薬を用いて構造解析を行う場合、できるだけ低濃度で試料溶液を調製後、分子表面に存在する官能基を分子内で架橋し、プロテアーゼ消化したのち、MS から得られるペプチドの質量情報に基づいて架橋された官能基を同定し、タンパク質の高次構造に関する情報を得る。Young らは、これらの方法と threading 法を組み合わせることにより、ウシ fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の構造解析を行っている。³⁶⁾ 架橋試薬のリンカーの長さの距離制限に基づいて、正しい FGF-2 の構造の概略が導き出されることがこの研究で示された。また、分子間の相互作用領域についても、架橋反応と MS を用いることにより同定できることが、数多くの研究例で示され総説にもまとめられている。³²⁻³⁵⁾

このような解析を行う場合の実験方法は以下の通りである。分子内架橋されたタンパク質の架橋部位を決めタンパク質単量体の高次構造に関する構造情報を得たい場合は、単量体のサイズを有するタンパク質の画分について以降の実験を行う。複数のタンパク質間における架橋部位を決め相互作用部位の解析を行いたい場合は、形成される複合体の分子サイズを示すタンパク質の画分について以降の実験を行

う。いずれの場合も、変性条件下においてプロテアーゼ消化を行い、得られるペプチド断片の質量を測定し、架橋反応を施していない場合と比較することで架橋部位の同定を行うのが一般的である (Fig. 6)。しかしながら、この方法では、架橋反応で修飾されていない数多くのペプチドの中から、架橋された数少ないペプチドを見出すことが容易ではない。そのため、架橋試薬にアフィニティー分離に用いることができる“ハンドル”を付けたり、^{37,38)} 架橋試薬を同位体ラベルして“目印”を付けたり^{39,40)} などすることで、架橋されたペプチドをできるだけ容易に見出すための工夫がなされている。また、分子内架橋されたタンパク質の架橋部位を同定する目的で、FTICR-MS を用いてタンパク質の断片化と質量測定を合わせて行う方法も提案されている。^{41,42)} さらに、架橋部位の帰属を容易にするためのソフトウェアもいくつか開発されている。⁴³⁻⁴⁶⁾

4. 巨大生体分子の構造解析

溶液試料をそのまま導入しソフトにイオン化することができる ESI を、さらに微量試料でよりソフトにイオン化できるように改良したナノ ESI を利用することにより、リボソームのような巨大生体超

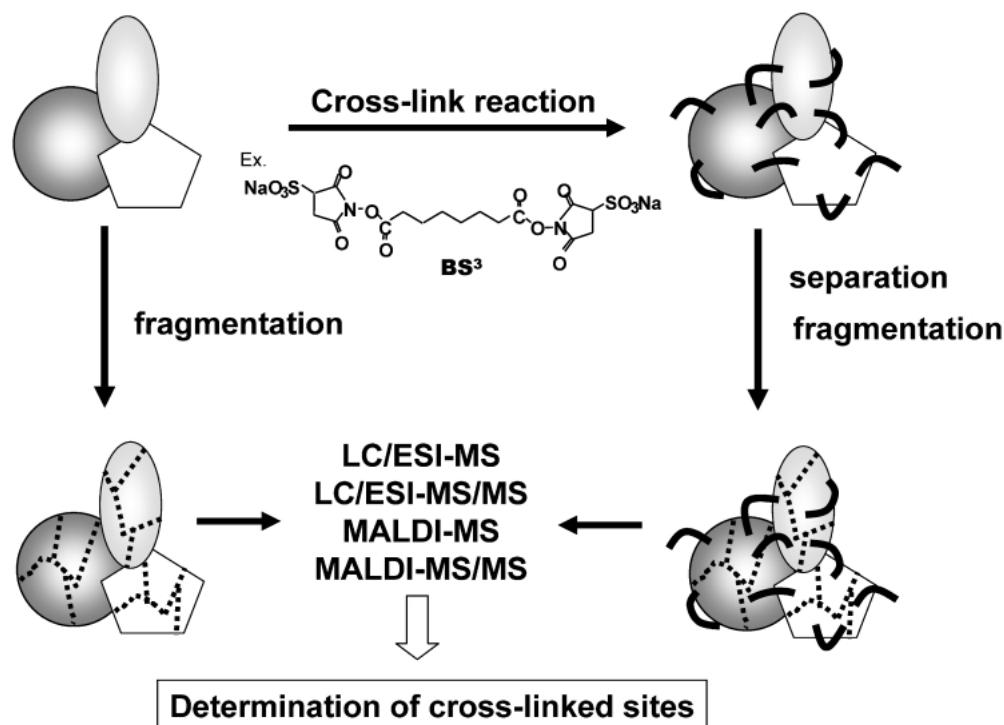


Fig. 6. A Schematic Illustration of the Strategy for Structural Analysis of Protein-Protein Complexes by MS in Combination with Chemical Cross-linking

分子でも丸のままイオン化してその質量を正確に決定できるようになった。^{47,48)} 現在市販されている装置を用い、かつ方法を工夫することで、10万を超えるサイズの複合体分子の質量を測定できることが多くの例で示されている。⁴⁹⁻⁵⁷⁾ このような背景の下、生命活動において非常に重要な役割を担っているにも係わらず、これまで結晶化に成功しておらず、また複合体のサイズが大きいため NMR で全体構造を解析するのは不可能なヒト基本転写因子 TFIIE の構造解析を、筆者らは ESI-MS を始めとするいくつかの分析手法を組み合わせで行った。⁵⁸⁾

ヒト TFIIE は基本転写因子の 1 つで、RNA ポリメラーゼ II (RNA Pol II) による転写の過程において、TFIIH の転写開始前複合体へのリクルートメントや、TFIIH の活性制御などの重要な役割を担うタンパク質である。これまでの研究において、ヒト TFIIE は α (50 kDa) と β (35 kDa) の 2 種のサブユニットからなり、 $\alpha\alpha\beta\beta$ のヘテロテトラマーであることがゲルろ過により示唆されていた。⁵⁹⁾ 構造に関して明らかになっているのは、TFIIE β コアドメインと TFIIE α Zn フィンガードメインの 2 つのドメインの溶液構造^{60,61)} だけであり、全体構造は明らかになっていなかった。そこで、筆者らは、まずヒト TFIIE の質量を正確に測定し、分子全体の構造について解析することに着手した。

ESI-MS は溶液試料をそのままスプレーして試料分子をソフトにイオン化する方法であるため、実験条件を工夫することで複合体でも解離させずに質量を測定することができる。しかしながら使用できる溶媒は、揮発性溶媒に限られ、native な状態を反映する分子量関連イオンを観測するには有機溶媒の使用を避ける必要がある。そこで大腸菌の大量発現系

を用いて TFIIE を調製したのち、ゲルろ過 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.9), 500 mM NaCl, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール) で約 170 kDa の分子サイズを示す画分について、10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 (pH 7.8) に透析後若しくはオンラインのゲルろ過クロマトグラフィーで溶媒交換を行ってから⁶²⁾ ESI-MS 若しくはナノ ESI-MS に供した。これらからはほぼ同様のスペクトルが得られた。透析で溶媒交換して得られた試料の ESI マススペクトルを Fig. 7 に示す。このスペクトルから計算される TFIIE の質量は 84152 ± 5 で、ゲルろ過で分析して得られるサイズの約半分であることから、TFIIE は $\alpha\beta$ のヘテロダイマーで存在することが示唆された。また、質量はアミノ酸配列から計算される質量理論値より 175 大きいものであるが、これは ribosome や trans-thyretin の分子量関連イオンの観測の場合^{47,48)} と同様に、2 つのサブユニット間に抱えられた水分子などの低分子やカウンターイオンによるものと考えられる。 $\alpha\alpha\beta\beta$ のヘテロテトラマーが、ESI-MS や溶媒交換の過程において $\alpha\beta$ のヘテロダイマーに解離して観測された可能性も考えられたので、ゲルろ過クロマトグラフィーに用いたのと同じ緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.9), 500 mM NaCl, 10 mM 2-メルカプトエタノール, 10% グリセロール) の条件で超遠心分析を行った。そうしたところ、ESI-MS と同様に $\alpha\beta$ ヘテロダイマーであることを示す結果が得られた。さらに、X 線小角散乱 (SAXS) で 20 Å 程度の分解能での TFIIE の分子形状を解析したところ、慣性半径約 60 Å、長軸の長さが約 210 Å の非常に細長い形状をしているという結果が、試料の濃度に依存せず得られた

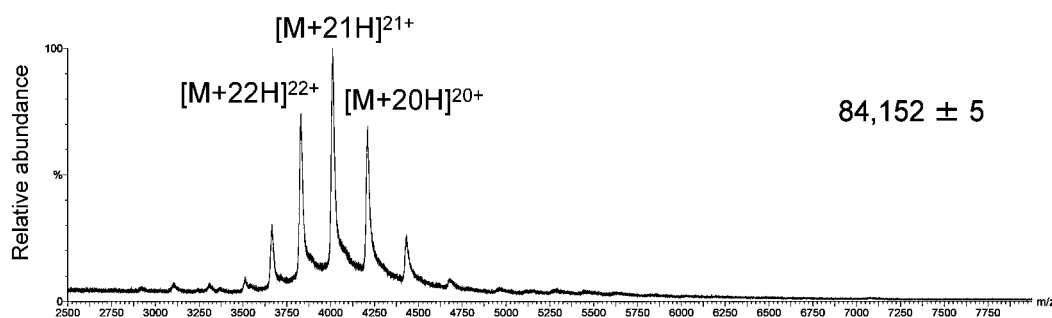


Fig. 7. ESI Mass Spectrum of TFIIE

(Reproduced with permission from Ref. 58), "Investigation of molecular size of transcription factor TFIIE in solution" by Itoh Y. et al., *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, Copyright 2005 by Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley and Sons, Inc., and modified).

(Fig. 8). これらのことから、分子形状が極端に細長い TFIIE は、分子サイズを見積もったゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、質量較正に用いられる球状タンパク質とは明らかに異なる挙動を示し、その結果、約 2 倍の分子サイズと見積もられたものと考えられる。また、極端に細長い分子であるため運動性に富み、結晶化することが難しく、全体構造の原子レベルでの解明に至っていないと考えられる。

複合体で機能する分子のサイズを見積もる際、分子形状に依存して溶出時間が大きく変わることがあるゲルろ過クロマトグラフィーに対し、正確に質量を求められる MS を用いることの意義を、本研究により示すことができた。また、分子がフレキシブルであるため X 線結晶構造解析で全体構造を明らかにできない場合にも、これらの方法で巨大分子の溶液構造に関する知見が得られることを明らかにした。さらに、これまで $\alpha\alpha\beta\beta$ のヘテロテトラマーと考えられていた TFIIE が、溶液中では $\alpha\beta$ ヘテロダイマーとして存在することが明らかになったことは、転写開始のプロセスにおける TFIIE の機能に対する考え方に大きく影響を与えるものであり、また、構造生物学における MS の有用性を示したものとと言える。

5. 結合親和性の解析

4 章で述べたように、現在では、タンパク質を構成要素とする複合体の分子量関連イオンを ESI-MS で検出しその質量を正確に測定できる。そして質量測定から結合のストイキオメトリーも容易に決定できるようになった。さらに、複合体の構成要素の結合親和性についても MS を用いて解析できることがいくつかの研究グループから示されている。^{63–66} これらは、試料調製の際に滴定したり構成要素の量比を変化させたりする方法と MS を組み合わせる場合以外は、主に、質量分析装置内すなわち気相での解離を利用して解析するものであった。

MS 以外の方法を用いて溶液における結合親和性を解析する場合には、主にフィルターバインディングアッセイやカロリメトリーなどが用いられ、これらの方法では溶液中の結合親和性に関する定量的な情報を得ることができる。しかしながら、分析には多くの試料量が必要であり、また分析に時間が掛かるという問題点もある。これに対し、MS を用いることで分析に必要な試料量は低減でき分析に要する時間も短縮できるという利点がある。MS による解析は溶液ではなく気相での実験ではあるが、複合体のイオンを質量分析装置内で衝突誘起解離 (col-

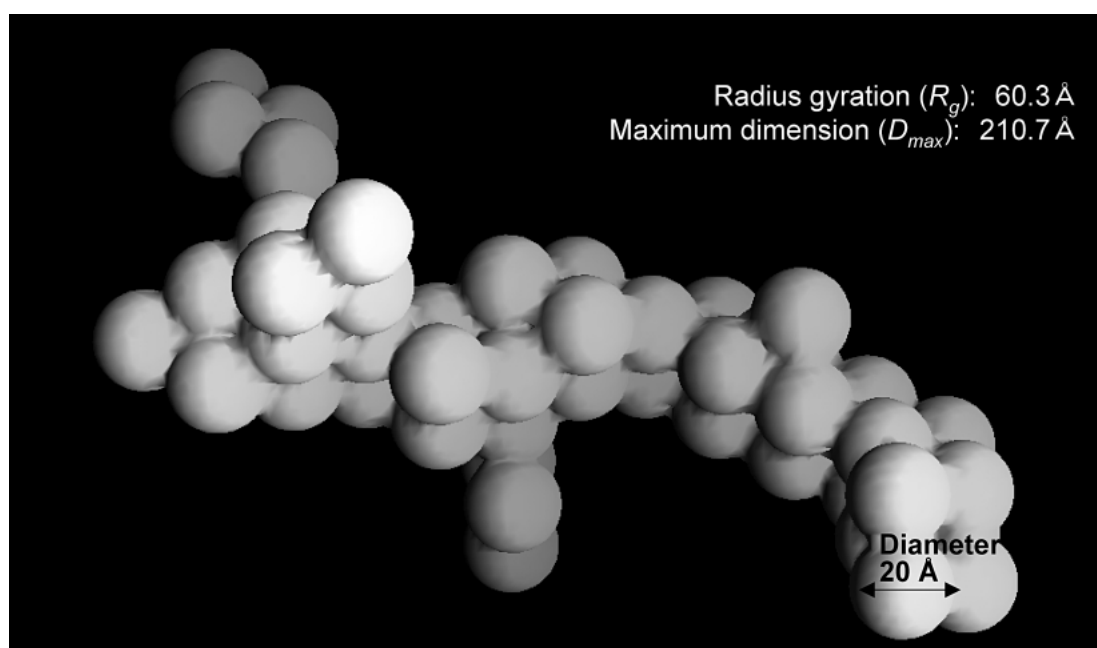


Fig. 8. A Typical Low Resolution Dummy Atom Model (DAM) Generated from the Distance Distribution Function of TFIIE

The DAM was obtained by *ab initio* fitting procedure. (Reproduced with permission from Ref. 58), "Investigation of molecular size of transcription factor TFIIE in solution" by Itoh Y. et al., *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, Copyright 2005 by Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley and Sons, Inc., and modified).

lision-induced dissociation, CID) させ結合親和性を議論できることを示す研究がこれまでにいくつか報告されている。^{63–66)}

筆者らは、タンパク質 c-Myb DNA 結合ドメイン (c-Myb DBD) と 7 種類の点変異二重鎖 DNA の複合体について、ESI でイオン化後、イオン源から質量分析計に通じるイオンの取り込み口に相当する sample cone 部分に印加する電圧を変化させ、複合体の解離の様子を観測することで、タンパク質と二重鎖 DNA の結合親和性について解析を行った。そして、フィルターバインディングアッセイにより既に求められている、タンパク質と各二重鎖 DNA の複合体形成に伴う自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$ [kcal/mol])⁶⁷⁾ と、全イオン強度に対して複合体のイオン強度の割合を 50% に低下させるために必要な sample cone に印加する電圧 ($V_{50\%}$ [V]) との間に、Fig. 9 に示すようによい相関がみられることを明らかにした。⁶⁴⁾ すなわち、安定な複合体ほど、解離させるのに高い電圧を sample cone に印加する必要があることが定量的に示され、結合親和性が既知の 2

つ以上の複合体を用いて $V_{50\%}$ と $\Delta\Delta G$ の間の関係式を導き、この式から結合親和性未知の複合体の $\Delta\Delta G$ を求められることが明らかとなった。しかしながら両者の相関係数 (r) は $r=0.86$ であり、結合親和性に関する正確な分析を行うには若干小さい相関係数であった。この理由として、以下のように考えられる。Sample cone に高い電圧を印加するほど、複合体の解離は進行する。しかしながら同時に、sample cone に印加したエネルギー (電圧) すべてが複合体の解離に消費されるのではなく、一部のエネルギーがタンパク質に比べてはるかに不安定な DNA にフラグメンテーションを引き起こすことに消費され、その結果、相関係数が若干小さな値 $r=0.86$ となったと考えられる。気相で不安定な化合物を構成要素に持つ複合体の CID では、このようなフラグメンテーションを防ぐことはできないために生じる問題と考えられる。

そこで、この試料について、レーザースプレー (laser spray) を用いて解析を行った。Laser Spray は Hiraoka らが開発した方法で、ESI のスプレー

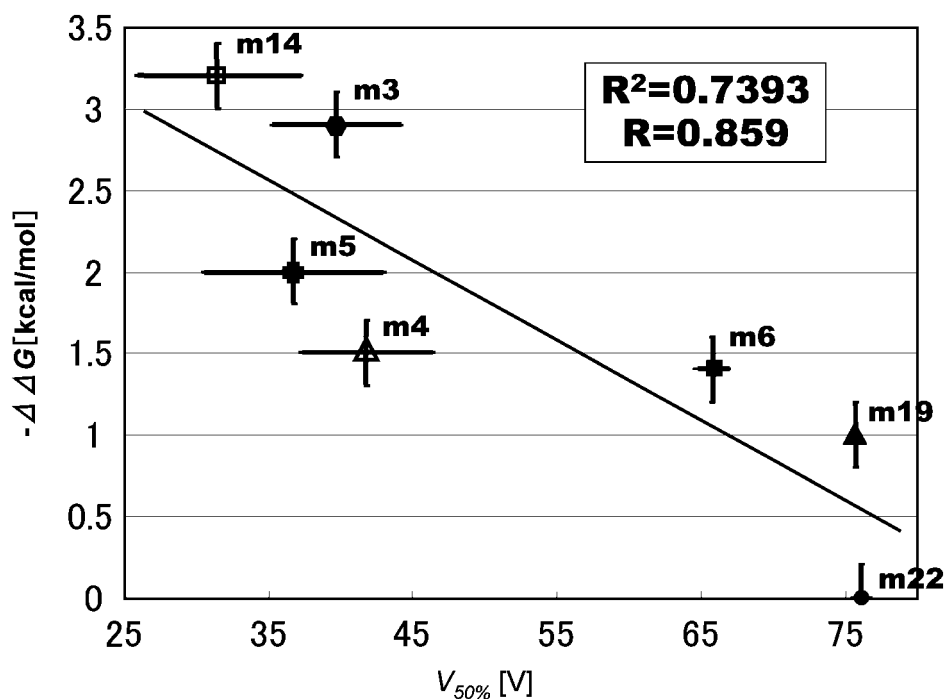


Fig. 9. A Plot of the Solution $-\Delta\Delta G$ of Complex as a Function of $V_{50\%}$ for the Complexes of the c-Myb DBD and Seven 22-mer Double-stranded DNA (dsDNA) Oligomers, m22, m3, m4, m5, m6, m14 and m19

Sequence of m22 is wild-type, and m3, m4, m5, m6, m14, and m19 are single point mutants of m22. For example, (+) strand of m22 has the sequence of (+) 5' CACCCTAACTGACACACAT 3' while that of m3, a point mutant of m22, has the sequence of (+) 5' CACCCTCACTGACACACAT 3', in which mutated position is underlined. The S.D. of each $V_{50\%}$ is indicated with bars on x-axis while that of each $\Delta\Delta G$ value (0.2 kcal/mol)⁶⁷⁾ is indicated with bars on y-axis. (Reproduced with permission from Ref.64), "Evaluation of protein-DNA binding affinity by electrospray ionization mass spectrometry" by Akashi S. et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16: 116–125, Copyright 2005, with permission from Elsevier).

ニードルの先端に形成される *tailor cone* に $10.6 \mu\text{m}$ の赤外レーザーを照射し、瞬間的に試料溶液を加熱してスプレー液滴を微細にするとともに、溶液に存在する試料の非共有結合を選択的に切断し複合体を解離させることができるイオン化法である。^{68–70)}

Figure 10 に示すように、タンパク質–二重鎖 DNA 複合体のマススペクトルでは、照射するレーザー強度の上昇に伴い複合体のイオンの強度が減少し、逆に解離したタンパク質のイオン強度が増加する。この *laser spray* を用いて、7 種類の点変異二重鎖 DNA とタンパク質 c-Myb DBD の複合体について、*sample cone* に印加する電圧を変化させた場合と同様に、レーザー強度を変化させた際にマススペクトルに観測される複合体のイオンと、解離して生じたタンパク質のイオンそれぞれの強度の変化を解析した。その結果、タンパク質と各二重鎖 DNA の複合体形成に伴う自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$ (kcal/mol)) と、全イオン強度に対して複合体のイオン強度を 50% に低下させるのに必要なレーザー強度 ($E_{50\%}$ (W)) との間に、Fig. 11 に示すようによい正の相関がみられることを明らかにした。⁷¹⁾ これより、レーザー噴霧は、タンパク質–DNA の結合親和性の定量的な解析に極めて有効な方法であることが明らかとなった。

また、*laser spray* は DNA と薬物の複合体の結合

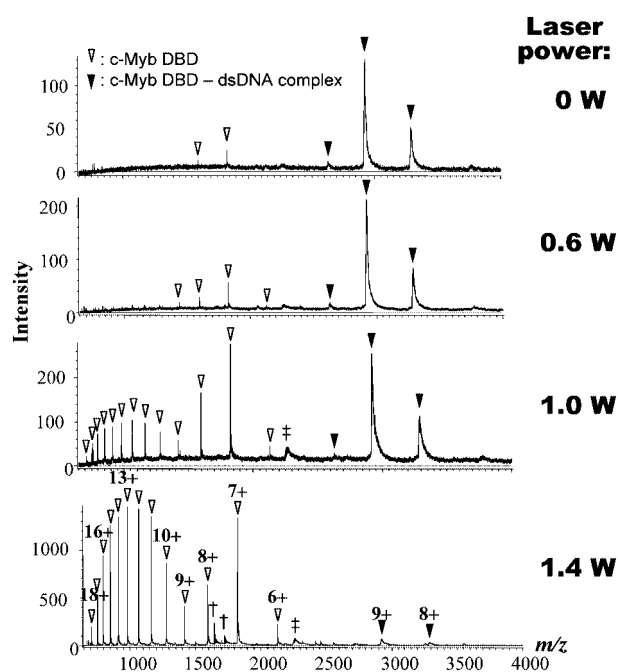


Fig. 10. ESI and Laser Spray Mass Spectra of Complexes of the c-Myb DBD with Wild Type dsDNA Obtained at Laser Power of 0, 0.6, 1.0, and 1.4 W

Multiply charged peaks of the c-Myb DBD and those of protein-dsDNA complex are marked with open inverted triangle and filled inverted triangle, respectively. The single and double dagger symbols represent $4+$ charged peaks of two single-stranded DNA (ssDNA) and $6+$ charged peaks of dsDNA, respectively. (Reproduced with permission from Ref. 71), “Evaluation of binding affinity of protein-mutant DNA complexes in solution by laser spray mass spectrometry” by Shi X. et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 116–125, Copyright 2005, with permission from Elsevier).

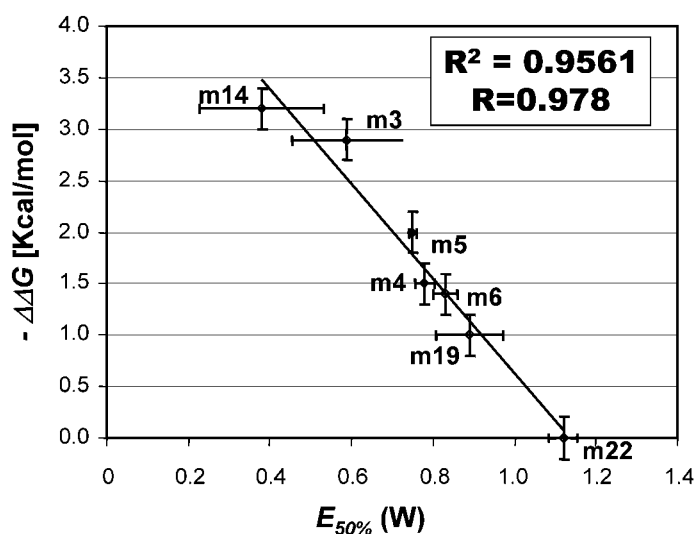


Fig. 11. A Plot of the Solution $-\Delta\Delta G$ of Complex as a Function of $E_{50\%}$ for the Complexes of the c-Myb DBD and Seven dsDNA Oligomers

(Reproduced with permission from Ref. 71), “Evaluation of binding affinity of protein-mutant DNA complexes in solution by laser spray mass spectrometry” by Shi X. et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 16, 116–125, Copyright 2005, with permission from Elsevier).

親和性について解析するのもよい方法であることをこれまで明らかにしている。⁷²⁾

6. 結 語

約 20 年前、筆者がタンパク質の構造研究に MS を研究に用いるようになった当時は、巨大なタンパク質を丸ごとイオン化し質量分析することは不可能で、分子量数千のペプチドを FAB 法¹¹⁾でイオン化し、磁場型質量分析装置で解析することがやっとなできるようになった時期である。この頃、筆者らの研究グループは、7.5 kDa の小さなタンパク質の質量を FABMS で正確に測定し、プロテアーゼ消化、エドマン法と MS を組み合わせることでタンパク質の全一次構造を解析できることを示した。⁷³⁾その後、「1. はじめに」でも述べたように、タンパク質をそのままイオン化できる ESI¹⁻³⁾ や MALDI^{4,5)} が 1980 年代後半に開発され、その後の質量分析装置の進歩にも加速された結果、MS はタンパク質の構造解析に必須のツールとなった。筆者は、MS を用いてタンパク質の構造解析を始めて間もない 1990 年前後からこれまで、生体高分子の機能に係わる高次構造情報を MS で獲得することを目指して、多くの共同研究者とともに様々な試料を対象に研究を進めてきた。そして最近では、構造生物学の領域において積極的に MS を用い、微量試料で迅速に分析できるという MS の特徴を利用して、生体高分子及びその複合体の構造機能解析の研究を進めている。今後、例えばヌクレオソームコアの構造変化と転写制御プロセスとの関係などのように、生命現象を高次に制御しているタンパク質複合体の構造と機能の関係を明らかにする研究へ展開していきたいと考えている。

謝辞 本研究は、筆者が所属しておりました味の素株式会社ライフサイエンス研究所の平山和雄博士（現 Science Education Co., Inc.）、理化学研究所生体分子解析室の瀧尾擴士博士（現理化学研究所播磨研究所）、そして現所属の横浜市立大学大学院国際総合科学研究科生体超分子機能科学研究室の西村善文教授を始めとする研究室の皆様、そして多くの共同研究者の方々のご協力により行われたものです。心より感謝申し上げます。そして、千葉大学薬学部時代の恩師である日野 亨先生、中川昌子先生に深く感謝申し上げます。本研究の一部は、科学研

究費補助金及び科学技術振興調整費により行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Yamashita M., Fenn J. B., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451-4459 (1984).
- 2) Yamashita M., Fenn J. B., *J. Phys. Chem.*, **88**, 4671-4675 (1984).
- 3) Fenn J. B., Mann M., Meng C. K., Wong S. F., Whitehouse C. M., *Science*, **246**, 64-71 (1989).
- 4) Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yohida T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151-153 (1988).
- 5) Karas M., Hillenkamp F., *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301 (1988).
- 6) Henzel W. J., Billeci T. M., Stults J. T., Wong S. C., Grimley C., Watanabe C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5011-5015 (1993).
- 7) Roepstorff P., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8**, 6-13 (1997).
- 8) Pandey A., Mann M., *Nature*, **405**, 837-846 (2000).
- 9) Zhang Z., Smith D. L., *Protein Sci.*, **2**, 522-531 (1993).
- 10) Miyano H., Suzuki E.-I., Akashi S., Furuya M., Tsuji T., Hirayama K., Nagashima N., *Anal. Sci.*, **5**, 759-761 (1989).
- 11) Barber M., Bordoli R. S., Sedgwick R. D., Tyler A. N., *Nature*, **293**, 270-275 (1981).
- 12) Akashi S., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **45**, 1-23 (1997).
- 13) Protein Data Bank ID: 3INK.
- 14) Bai Y., Milne J. S., Mayne L., Englander S. W., *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **17**, 75-86 (1993).
- 15) Miranker A., Robinson C. V., Radford S. E., Aplin R. T., Dobson C. M., *Science*, **262**, 896-900 (1993).
- 16) Akashi S., Naito Y., Takio K., *Anal. Chem.*, **71**, 4974-4980 (1999).
- 17) Akashi S., Takio K., *Protein Sci.*, **9**, 2497-2505 (2000).
- 18) Stubbs M. T., Laber B., Bode W., Huber R., Jerala R., Lenarcic B., Turk V., *EMBO J.*, **9**, 1939-1947 (1990).
- 19) Björk I., Pol E., Raub-Segall E., Abrahamson M., Rowan A. D., Mort J. S., *Biochem. J.*,

- 299, 219–225 (1994).
- 20) Smith D. L., Deng Y., Zhang Z., *J. Mass Spectrom.*, **32**, 135–146 (1997).
- 21) Engen J. R., Smith D. L., *Anal. Chem.*, **73**, 256A–265A (2001).
- 22) Hoofnagle A. N., Resing K. A., Ahn N. G., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 1–25 (2003).
- 23) Lanman J., Prevelige Jr. P. E., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 181–188 (2004).
- 24) Busenlehner L. S., Armstrong R. N., *Arch. Biochem. Biophys.*, **433**, 34–46 (2005).
- 25) Kaltashov I. A., Eyles S. J., *J. Mass Spectrom.*, **37**, 557–565 (2002).
- 26) Yan X., Watson J., Ho P. S., Deinzer M. L., *Mol. Cell. Proteomics*, **3**, 10–23 (2004).
- 27) Maier C. S., Deinzer M. L., *Methods Enzymol.*, **402**, 312–360 (2005).
- 28) Akashi S., Niitsu U., Yuji R., Ide H., Hirayama K., *Biol. Mass Spectrom.*, **22**, 124–132 (1993).
- 29) Steiner R. F., Albaugh S., Fenselau C., Murphy C., Vestling M., *Anal. Biochem.*, **196**, 120–125 (1991).
- 30) Suckau D., Mak M., Przybylski M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5630–5634 (1992).
- 31) Glocker M. O., Borchers C., Fiedler W., Suckau D., Przybylski M., *Bioconjug. Chem.*, **5**, 583–590 (1994).
- 32) Sinz A., *J. Mass Spectrom.*, **38**, 1225–1237 (2003).
- 33) Back J. W., de Jong L., Muijsers A. O., de Koster C. G., *J. Mol. Biol.*, **331**, 303–313 (2003).
- 34) Borch J., Jorgensen T. J., Roepstorff P., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 509–516 (2005).
- 35) Sinz A., *Mass Spectrom. Rev.*, **25**, 663–682 (2006).
- 36) Young M. M., Tang N., Hempel J. C., Oshiro C. M., Taylor E. W., Kuntz I. D., Gibson B. W., Dollinger G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5802–5806 (2000).
- 37) Trester-Zedlitz M., Kamada K., Burley S. K., Fenyo D., Chait B. T., Muir T. W., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2416–2425 (2003).
- 38) Tang X., Munske G. R., Siems W. F., Bruce J. E., *Anal. Chem.*, **77**, 311–318 (2005).
- 39) Muller D. R., Schindler P., Towbin H., Wirth U., Voshol H., Hoving S., Steinmetz M. O., *Anal. Chem.*, **73**, 1927–1934 (2001).
- 40) Petrotchenko E. V., Olkhovik V. K., Borchers C. H., *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1167–1179 (2005).
- 41) Kruppa G. H., Schoeniger J., Young M. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 155–162 (2003).
- 42) Kalkhof S., Ihling C., Mechtler K., Sinz A., *Anal. Chem.*, **77**, 495–503 (2005).
- 43) Schilling B., Row R. H., Gibson B. W., Guo X., Young M. M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 834–850 (2003).
- 44) Wefing S., Schnaible V., Hoffman D.: (<http://www.searchxlinks/de/>), SerachX-Links, 2001.
- 45) Back J. W., Sanz M. A., de Jong L., de Koning L. J., Nijtmans L. G., de Koster C. G., Grivell L. A., Van Der Spek H., Muijsers A. O., *Protein Sci.*, **11**, 2471–2478 (2002).
- 46) de Koning L. J., Kasper P. T., Back J. W., Nessen M. A., Vanrobaeys F., Van Beeumen J., Gherardi E., de Koster C. G., de Jong L., *FEBS J.*, **273**, 281–291 (2006).
- 47) Rostom A. A., Fucini P., Benjamin D. R., Juenemann R., Nierhaus K. H., Hartl F. U., Dobson C. M., Robinson C. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5185–5190 (2000).
- 48) Sobott F., Hernandez H., McCammon M. G., Tito M. A., Robinson C. V., *Anal. Chem.*, **74**, 1402–1407 (2002).
- 49) Loo J. A., *Mass Spectrom. Rev.*, **16**, 1–23 (1997).
- 50) Loo J. A., *Int. J. Mass Spectrom.*, **200**, 175–186 (2000).
- 51) Smith R. D., Bruce J. E., Wu Q., Lei Q. P., *Chem. Soc. Rev.*, **26**, 191–202 (1997).
- 52) Pramanik B. N., Bartner P. L., Mirza U. A., Liu Y. H., Ganguly A. K., *J. Mass Spectrom.*, **33**, 911–920 (1998).
- 53) Miranker A. D., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 601–606 (2000).
- 54) Kaltashov I. A., Eyles S. J., *Mass Spectrom. Rev.*, **21**, 37–71 (2002).
- 55) Heck A. J., van der Heuvel R. H. H., *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 368–389 (2004).
- 56) Sobott F., McCammon M. G., Hernandez H., Robinson C. V., *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **363**, 379–391 (2005).

- 57) Videler H., Ilag L. L., McKay A. R., Hanson C. L., Robinson C. V., *FEBS Lett.*, **579**, 943–947 (2005).
- 58) Itoh Y., Unzai S., Sato M., Nagadoi A., Okuda M., Nishimura Y., Akashi S., *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **61**, 633–641 (2005).
- 59) Ohkuma Y., Sumitomo H., Horikoshi M., Roeder R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9163–9167 (1990).
- 60) Okuda M., Watanabe Y., Okamura H., Hanaoka F., Ohkuma Y., Nishimura Y., *EMBO J.*, **19**, 1346–1356 (2000).
- 61) Okuda M., Tanaka A., Arai Y., Satoh M., Okamura H., Nagadoi A., Hanaoka F., Ohkuma Y., Nishimura Y., *J. Biol. Chem.*, **279**, 51395–51403 (2004).
- 62) Cavanagh J., Benson L. M., Thompson R., Naylor S., *Anal. Chem.*, **75**, 3281–3286 (2003).
- 63) Kapur A., Beck J. L., Brown S. E., Dixon N. E., Sheil M. M., *Protein Sci.*, **11**, 147–157 (2002).
- 64) Akashi S., Osawa R., Nishimura Y., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **16**, 116–125 (2005).
- 65) Daniel J. M., Friess S. D., Rajagopalan S., Wendt S., Zenobi R., *Int. J. Mass Spectrom.*, **216**, 1–27 (2002).
- 66) Rostom A. A., Tame J. R., Ladbury J. E., Robinson C. V., *J. Mol. Biol.*, **296**, 269–279 (2000).
- 67) Ogata K., Kanei-Ishii C., Sasaki M., Hatanaka H., Nagadoi A., Enari M., Nakamura H., Nishimura Y., Ishii S., Sarai A., *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 178–187 (1996).
- 68) Kojima T., Kudaka I., Sato T., Asakawa T., Akiyama R., Kawashima Y., Hiraoka K., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 2090–2097 (1999).
- 69) Hiraoka K., *J. Mass Spectrom.*, **39**, 341–350 (2004).
- 70) Takamizawa A., Itoh Y., Osawa R., Iwasaki N., Nishimura Y., Akashi S., Hiraoka K., *J. Mass Spectrom.*, **39**, 1053–1058 (2004).
- 71) Shi X., Takamizawa A., Nishimura Y., Hiraoka K., Akashi S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**, 611–620 (2006).
- 72) Shi X., Takamizawa A., Nishimura Y., Hiraoka K., Akashi S., *J. Mass Spectrom.*, **41**, 1086–1095 (2006).
- 73) Hirayama K., Takahashi R., Akashi S., Fukuhara K., Oouchi N., Murai A., Arai M., Murao S., Tanaka K., Nojima I., *Biochemistry*, **26**, 6483–6488 (1987).