

1G2b 化学修飾と質量分析法を組み合わせた Melittin の膜トポロジー解析

(広島大理¹⁾・広島大院理²⁾・広島大 QuLis³⁾)

七種和美¹⁾・水野 初²⁾・泉 俊輔^{2,3)}・平田敏文²⁾

Melittin はミツバチ (*Apis mellifera*) のハチ毒の基本的な成分であり、26 個のアミノ酸で構成される両親媒性のペプチドである。これまでに Melittin の構造は CD, FT-IR, NMR などにより広範囲に渡って研究されているが、Melittin が生体膜上でどのような構造 (トポロジー) をとっているかは明らかになっていない。本研究では、Melittin を人工膜である liposome に組み込み、その Melittin-liposome に対して化学修飾を起こした後、その化学修飾位置を MALDI-TOF-MS により決定することで Melittin の膜トポロジー解析を行なった。

Melittin-liposome はコール酸透析法により Melittin を phosphatidylcholine からなる liposome 中に組み込むことによって作製した。このようにして調製した Melittin-liposome に対して無水酢酸によりアセチル化修飾を行った。無水酢酸は Melittin-liposome 内の Melittin に対してモル比 100 倍 ~ 5000 倍で加えた。Melittin-liposome に対してモル比 100 倍の無水酢酸でアセチル化した場合には、1 箇所のアセチル化を受けている Melittin が最も多いことがわかった。このアセチル化修飾の位置を決定するために、MALDI-QIT-TOF-MS を用いて MS/MS 測定を行なった。その結果、図 1 に示すように、Melittin の N-末端側がアセチル化されていることがわかった。

一方、モル比 700 倍以上の無水酢酸を Melittin-liposome に加えた場合には、アセチル化修飾を 3 箇所を受けている Melittin が最も多いことがわかった。アセチル化修飾の位置を決定するために、MS/MS 測定を行なったところ、Lys 側鎖のアミノ基にもアセチル化されていることがわかった。

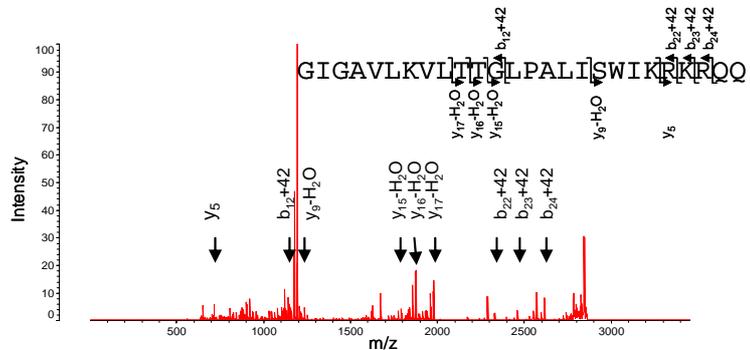


図1 1箇所アセチル化修飾を受けたMelittin-liposomeのピーク (m/z 2887)のMS/MSスペクトル

以上の結果より、無水酢酸の濃度が低く、Melittin-liposome の構造が保たれている場合には、選択的に N-末端にアセチル化が起こることが明らかになった。このことより、Melittin が liposome 膜の中に存在する場合は図 2 のように N-末端側を溶液方向に露出している構造をとると考えられる。一方、高濃度で無水酢酸が存在する場合には、Melittin-liposome の構造が破壊され、Melittin は溶液中に出てきたためにアセチル化がランダムに起こるということがわかった。

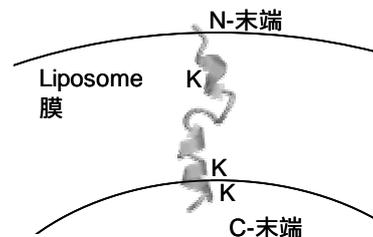


図2 Melittinの膜トポロジー