

Title	Strategy for Protein Sequence Analysis by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
Author(s)	高尾, 敏文
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/2257">http://hdl.handle.net/11094/2257</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【7】

氏名・(本籍)	高尾敏文
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 7491 号
学位授与の日付	昭和 61 年 12 月 15 日
学位授与の要件	理学研究科有機化学専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	F A B 質量分析による蛋白質の一次構造解析法に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 下西 康嗣 (副査) 教授 池中 徳治 教授 芝 哲夫

## 論文内容の要旨

〔I〕本研究では、ペプチド・蛋白質の限定分解物を分離せずに直接 F A B 質量分析によって測定を行い、個々のフラグメントの質量を同時に観測できることを見出した。そして、この質量分析による方法は次の 4 つの点で有効であることを実証した。1) ペプチド・蛋白質のペプチドマッピング、2) すでに従来法によって決定されたペプチド・蛋白質の一次構造の訂正・確認や、従来法との併用による蛋白質の一次構造決定、3) D N A 塩基配列から推定された蛋白質の一次構造の証明、或いは、遺伝子における読み取り枠の決定、4) D N A 組換え技術によって細菌で産出された蛋白質の一次構造の確認や同定。

1) では、ニワトリ卵白リゾチームのトリプシン消化物の測定を行い、種々の条件検討を行った。その結果、約 5  $\mu$ g のサンプル量で、90% 以上のアミノ酸配列に相当するフラグメントをマススペクトル上に観測することができた。2) では、cholera toxin B subunit と anti-lipopolysaccharide factor の測定を行い、それらの一次構造の訂正、確認、及び一次構造の決定を行った。3) では、*Myxococcus xanthus* の発生時に特異的に産出する蛋白質 (protein S) の遺伝子における読み取り枠の決定と D N A 塩基配列から推定されたアミノ酸配列の証明を、4) では、D N A 組換え技術によって大腸菌で産出されたヒト interleukin-2 が、D N A 塩基配列から推定されたアミノ酸配列通りに発現されていることの証明を行った。

以上の研究結果は、F A B 質量分析によってペプチド・蛋白質の限定分解物を直接測定する本方法が蛋白質の一次構造解析において有用な手段になり得ることを示している。

〔II〕腸管感染病原細菌由来の種々の耐熱性エンテロトキシンの一次構造の決定。  
種々の腸管感染病原細菌は、人や家畜に急性の下痢を引き起こす耐熱性エンテロトキシン (S T) を

産出していることが知られている。本研究では、毒素原性大腸菌（豚，人由来株），*Yersinia enterocolitica*，*Vibrio cholerae* non-01の3種の細菌が産出する4種類のSTを，最終的に逆相の高速液体クロマトグラフィーを用いて高純度に精製し，それらの一次構造を解明した。その結果，ジスルフィド結合を形成している6つのCys残基を含む13残基のアミノ酸配列において，これら4種類のSTは極めて類似し，かつ6個のCys残基が相対的に同じ位置に存在することがわかった。このことは，この共通部位が4種類のSTの活性発現に非常に重要であることを示唆しており，さらに，この部位は他の病原細菌が産生するST様毒素においても存在する可能性や，これらのSTは共通の祖先遺伝子から由来していることが推察された。

### 論文の審査結果の要旨

蛋白質の一次構造解析は，通常蛋白質中の特定のアミノ酸残基が関与するペプチド結合を酵素によって，あるいは化学反応によって切断し，生じたペプチドフラグメントを分離，精製し，そしてそれらのアミノ酸配列を決定することによって行われる。高尾君は蛋白質の酵素消化物を分離することなく，fast atom bombardment (FAB) 質量分析法によって直接測定し，質量スペクトル上に酵素消化物中に含まれるペプチドフラグメントの分子量を測定できることを見出した。その結果，蛋白質の一次構造が，その酵素消化物を分離することなく解析できる可能性が示唆された。

高尾君は上記の測定方法を詳細に検討し，この方法が1) 蛋白質のペプチドマッピングに，2) 既存の方法によって決定された蛋白質の一次構造の簡便な確認に，あるいは既存の方法と併用する蛋白質の一次構造解析法として，3) 遺伝子の塩基配列から推定される蛋白質の読み取り枠や一次構造の確認法として，さらに，4) 組換えDNA法によって産生された蛋白質の一次構造の証明法として有用であることを明らかにした。

高尾君は，また，FAB質量分析法と既存の蛋白質の一次構造解析法を組み合わせることによって，種々の腸管感染細菌が産生し，乳幼児や家畜の急性下痢の原因となる耐熱性エンテロトキシンについて4種の一次構造を解明した。その結果，耐熱性エンテロトキシンをコードする遺伝子は共通の祖先遺伝子から由来していることや耐熱性エンテロトキシンには共通の毒性発現構造が存在するという興味ある事実が明らかにされた。

以上のように，本論文は，蛋白質の一次構造の新しい解析法を考案することによって，蛋白質化学の研究に重要な貢献をなすにとどまらず，腸管感染病原細菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの構造について，新しい知見を見出したものであり，理学博士の学位論文として価値あるものと認められる。