The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腸管感染病原菌の産生する耐熱性エンテロトキシンのジスルフィド結合架橋位置と立体異性体に関する研究
Author(s)	日高, 雄二
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36373
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

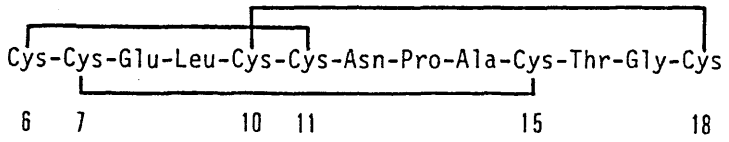
【22】

氏名・(本籍)	日高雄二（ひだかゆうじ）
学位の種類	理学博士
学位記番号	第 8565 号
学位授与の日付	平成元年3月24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	**腸管感染病原菌の産生する耐熱性エンテロトキシンのジスルフィド結合架橋位置と立体異性体に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 下西 康嗣 (副査) 教授 楠本 正一　教授 花房 昭静　教授 京極 好正

論文内容の要旨

腸管感染病原菌の産生する低分子量耐熱性エンテロトキシン（ＳＴ）はヒトや家畜に急性の下痢をもたらす。ＳＴの作用機作は未だ詳らかではないが，小腸上皮細胞上の受容体との結合が引きがねとなって，グアニレートサイクラーゼの活性化，ｃＧＭＰ濃度の上昇，つづいて細胞外への液体流出という構図が考えられている。ＳＴは分子の約１／３を分子内ジスルフィド結合を形成した６個のCys 残基で占められており，ジスルフィド結合を還元すると失活する。このことは，ジスルフィド結合によって形成されるＳＴの立体構造が，毒性発現すなわち受容体との結合に必須であることを示している。著者は，ＳＴの毒性発現構造を解明することを目的として，ＳＴの立体構造の構築に重要である分子内ジスルフィド結合の架橋位置の決定，ジスルフィド結合の新しい位置決定法，ＳＴ立体異性体の構造解析などの研究を行い，以下の成果を得た。

1）選択的ジスルフィド結合の形成方法によって，腸管感染病原菌の産生する５種のＳＴの分子内ジスルフィド結合の位置を決定した。ＳＴh で示すと６位と１１位，７位と１５位，１０位と１８位のCys 残基間に分子内ジスルフィド結合が架橋していることを明らかにした（下図）。また，全てのＳＴにおいて，ＳＴh と相対的に同じ位置に分子内ジスルフィド結合が存在することを明らかにした。



2）天然に存在する蛋白質，ペプチドの中にはジスルフィド結合を有したものが多く見られる。これらの分子構造を解明するためにジスルフィド結合の位置を知ることは不可欠である。本研究では，重水素標識システインとＦＡＢ質量分析を用いた新たなジスルフィド結合架橋位置決定法を考案した。本方法をＳＴp に応用し，そのジスルフィド結合の架橋位置を決定することができた。

3）ＳＴの分子内ジスルフィド結合の段階的形成の中間体である２個のジスルフィド結合をもつペプチドはＨＰＬＣ上で分離する２種のコンフォーマーから成っている。これらに第３番目のジスルフィド結合を形成させると，一方のコンフォーマーからは天然型ペプチドが，もう一方からは天然型ペプチドと同じ分子内ジスルフィド結合をもつが立体構造の異なるペプチド（立体異性ペプチド）が生成し，第３番目のジスルフィド結合の形成が前駆体ペプチドの立体構造によって制御されることを明かにした。またＮＭＲとディスタンスジオメトリー法による構造解析から，ＳＴの天然型ペプチドと立体異性ペプチドとの主鎖構造は，逆巻になっているという興味ある知見を得た。

論文の審査結果の要旨

日高雄二君の論文は，毒素原性大腸菌，エルシニア・エンテロコリチカ，ＮＡＧビブリオなどの腸管感染細菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの分子内ジスルフィド結合の架橋位置およびその架橋形成の過程の立体構造的研究に関するものである。腸管感染細菌の産生する耐熱性エンテロトキシンは，コアの部分が１３個のアミノ酸残基からなる。このうち，システィンが６個を占め，３個の分子内ジスルフィド結合を形成し，毒性発現に必須な立体構造の形成に重要な役割を荷なっている。これらの分子内ジスルフィド結合は複雑にからみあっていて，従来，その架橋位置を決定することは大変困難であったが，日高雄二君は，化学的にジスルフィド結合を選択形成させる方法を駆使して，見事に毒素原性大腸菌をはじめとして，５種の腸管感染細菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの分子内ジスルフィド結合の架橋位置を決定した。また，これまでにアミノ酸配列の明らかにされている耐熱性エンテロトキシンの分子内ジスルフィド結合の架橋位置は同じであることを明らかにした。この研究と平行して，複雑なジスルフィド結合の架橋様式を決定するための，従来法とは原理的に全く異なる新規な方法を開発し，その応用によっても，上記のエンテロトキシンの分子内ジスルフィド結合の架橋位置を確認した。さらに，耐熱性エンテロトキシンの分子内ジスルフィド結合の化学的な選択形成の過程で，ジスルフィド結合の架橋順序と生成するエンテロトキシンの立体構造との間に密接な関係の存在することを明らかにしたが，この研究は複数のジスルフィド結合を有するペプチドの立体構造形式に示唆を与えるものと評価される。

以上のように，日高雄二君の研究は，腸管感染病原菌の産生する耐熱性エンテロトキシンの毒性発現構造の解明への寄与が大きく，理学博士の学位論文に十分価値あるものと認める。