The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	質量分析法によるグラム陽性菌Nocardia rubra 細胞壁骨格（N-CWS） の構造に関する研究
Author(s)	藤岡, 守
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37640
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

【10】

氏　　名	藤（ふじ）　岡（おか）　守（まもる）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　9897　号
学位授与年月日	平成3年9月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**質量分析法によるグラム陽性菌 Nocardia rubra 細胞壁骨格（N－CWS）の構造に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教授　三村　務 （副査） 教授　西原　力　教授　今西　武　教授　岩田　宙造

論文内容の要旨

グラム陽性菌 *Nocardia rubra* の cell wall skeleton（N－CWS）は抗腫瘍活性とアジュバント活性を有し免疫学的に興味が持たれ，また，培養が容易で副作用が少なく癌免疫療法剤として注目されている。Nocardia をはじめその近縁菌である *Rhodococcus* や *Mycobacterium* の CWS は基本的にはミコール酸，アラビノガラクタン及びペプチドグリカンの三成分から構成されており，それら構成成分のアジュバント活性についてもいくつかの研究がなされている。しかしながら同じ菌属であっても，菌種や株の違いのみならず培養条件によっても各構成成分の詳細な構造が異なり，また，それらの結合様式についても未だ不明な部分も残されている。さらに，これら基本成分以外の成分の存在も知られているが構造についての研究はほとんど行われていない。CWSの機能や活性の発現機構を解明するには，詳細な構造を明らかにすることが必要であるが，CWSは極めて複雑な高重合体であるため，その構造解析は困難な課題である。

著者は，近年発展の著しいフトイオン化法を用いる質量分析法（MS）や，衝突活性化（collisionally induced dissociation：CID）を利用したタンデム質量分析法（MS／MS）が CWS などの複雑な生体高分子の構造解析に有効であると考え，これらの特性の把握や CID により得られるフラグメンテーションの研究を行うとともに，得られた成果をN－CWSの構造解析に応用し，N－CWS のアラビノガラクタンとペプチドグリカン間の結合様式，ミコール酸の構造及びCWSに結合したリポペプチドの部分構造に関して新しい知見を得た。

CWS の基本成分であるアラビノガラクタンとペプチドグリカンとの間の結合には，既に同定されているリン酸ジエステル結合の他にグリコシド結合も推定されていたがその存在は明らかではなかった。筆者は，アルカリ分解により N－CWS から，アラビノガラクタンにペプチドグリカンの一部が

結合した分画が大量に得られることを見出したことから，これらの間にアルカリ分解に抵抗性の結合，すなわち，グリコシド結合が存在することを予想し，その結合部位の構造をＧＣ／ＭＳとＦＤ／ＭＳを用いて決定した。これは，これら二つの成分間のグリコシド結合の存在を示した最初の例である。また，構造解析の過程において，かなり大きい分子量のオリゴ糖が誘導体化することなく混合物のままで，ＦＤ／ＭＳにより分子量の測定が可能であることも見出した。

もう一つの基本成分であるミコール酸はα位に長鎖炭化水素鎖を持つβ－ヒドロキシ高級脂肪酸である。ミコール酸は単一の分子種ではなく，αやβ鎖の長さや鎖内の不飽和度と置換基の異なる分子種の混合物としてＣＷＳに存在している。それらは菌属に特有であるため，ミコール酸の分子量分布の測定と構造解析は菌の同定を行う上で必須であり，従来からＧＣ／ＭＳにより行われていた。筆者は，ＦＤ／ＭＳやＦＡＢ／ＭＳは誘導体化が不要で，クロマト分離することなくミコール酸の分子量及びその分布が決定できることを見出した。これらの方法では質量により分離ができるため，ＧＣによる分離が困難な不飽和度の異なる分子種についてもその詳細な分布が決定できる。さらに，ＦＡＢ／ＭＳではフラグメントイオンからミコール酸のα鎖の長さの分布を決定できることが明らかとなった。菌によってはそのミコール酸の分子量が大きく場合や極性基が多く難揮発性のためＧＣ／ＭＳによる分析が困難なものもあるが，これらの方法にはその制約はなく有用な方法である。これらの方法により，Ｎ－ＣＷＳミコール酸の詳細な構造を決定した。また，炭化水素鎖中のオレフィン基のシス－トランス配置については不明であったが，^{1}Ｈ－ＮＭＲを用いＮ－ＣＷＳミコール酸のオレフィン基がシス配置を持つことを初めて明らかにした。

ＣＷＳには以上の基本成分の他に，単純脂質や複合脂質，さらには色素などの成分が存在する。これらのほとんどはＣＷＳに共有結合している成分ではなく，有機溶媒や界面活性剤で抽出でき，構造の明らかにされているものも多い。ＣＷＳに共有結合した成分としてはリポペプチドの一部のものが知られていたが，成分分析以外に構造に関する報告はない。これは，リポペプチドのＮ末端がブロックされているためエドマン法が適用できず，また，溶媒に溶けにくく，さらには同族体で性質のよく似た成分の混合物で単離が困難であるため有効な構造解析法がないことによると考えられる。著者は，Ｎ－ＣＷＳにもリポペプチド分画が存在することを見出した。この分画はアルカリけん化により遊離されたことから，エステル結合を介してＣＷＳに共有結合した成分であると推定した。構造解析法としては，Low - energy ＣＩＤ ＦＡＢ／ＭＳ／ＭＳの特性を明らかにし，本法がリポペプチド混合物の構造決定に有効な手段であることを見出した。細菌をはじめ生物に由来する物質の場合，同族体の複雑な混合物であることが多く，各々の成分に分離することは実際上困難で，このような場合にはＭＳ／ＭＳは特に有効である。一方，アミノ酸配列決定に必要なシークエンスイオンのすべてが常にＦＡＢやＣＩＤによって生成されるとは限らず一次構造の決定が困難な場合も多い。著者はペプチド及びＮ末端が保護されたペプチドを化学的にポリアミノアルコールに還元し，Low - energy ＣＩＤ ＭＳ／ＭＳにおけるフラグメンテーションの特徴を研究した。その結果，ポリアミノアルコール誘導体では構造決定に十分なフラグメントイオンが得られ，極めて容易に一次構造の決定が可能であることが明らかになった。最後にこれらの成果に基づき，Ｎ－ＣＷＳのリポペプチド分画の部分構造を決定し

た。

以上，本研究によりＣＷＳの構造についていくつかの新しい知見が得られたとともに，本研究で確立した質量分析法を用いた構造解析法は，ＣＷＳのみならず，生体由来の多糖，蛋白質，ペプチド，脂質及び，それらの複合体などの複雑な混合物の構造解析にも役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細菌の細胞壁骨格（ＣＷＳ）の機能や活性の解明には構造解析が不可欠であるが，その構造は極めて複雑であり，困難な問題である。本研究はソフトイオン化法を用いるＭＳやＣＩＤを利用したＭＳ／ＭＳを用いてＣＷＳの構造の解析を試み，その基礎と，応用としてNocardia rubraのＣＷＳ（Ｎ－ＣＷＳ）の構造解析を行い，次の通りの成果を得た。

(1) Ｎ－ＣＷＳのアラビノガラクタンとペプチドグリカンとはリン酸ジエステル結合に加えて，グリコシド結合により結合していることをＧＣ／ＥＩ／及びＣＩ／ＭＳとＦＤ／ＭＳにより明らかにした。

(2) 従来からミコール酸の構造解析はＧＣ／ＭＳにより行われているが，以下のように，ＦＤ／ＭＳやＦＡＢ／ＭＳはより優れた方法であることを見出した。

ｉ．誘導体化することなく，しかもクロマト分離することなく分子種の分布が測定できる。分子量が極めて大きくまた極性基を多く持つような分子種では，ＧＣ／ＭＳによる分析が困難となり，このような方法が唯一有効な分析手段と考えられる。

ii．ＧＣ分離のできない不飽和度のみの異なる分子種も質量分離ができるため分子種の詳細な分析が可能である。

iii．ＦＡＢ／ＭＳではミコール酸のα鎖の長さの分布も同定できる。また，^{1}Ｈ－ＮＭＲによりミコール酸のオレフィン基がシス配置であることを初めて明らかにした。

(3) Low-energyＣＩＤに基づくＦＡＢ／ＭＳ／ＭＳは同族体の複雑な混合物であるリポペプチドの構造解析に極めて有効な手段であることを見出した。さらに，これを応用し，Ｎ－ＣＷＳに見出したリポペプチド成分の部分構造を決定した。

以上の如く，本論文は糖，脂質，ペプチドなどからなる複雑な複合体の構造解析法を開発したものでＣＷＳの構造にとどまらず関連した分野に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。