



Title	Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry with a Magnetic Sector Instrument for the Characterization of Peptides and Proteins
Author(s)	村田, 博
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39372
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

氏名	村田 博
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 11943 号
学位授与年月日	平成7年3月23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	Capillary Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry with a Magnetic Sector Instrument for the Characterization of Peptides and Proteins (磁場型質量分析計を用いたペプチド及びタンパク質のキャピラリー液体クロマトグラフィー/質量分析)
論文審査委員	(主査) 教授 下西 康嗣
	(副査) 教授 楠本 正一 教授 長谷 純宏 教授 相本 三郎

論文内容の要旨

ペプチド及びタンパク質を微量かつ正確に分析できる磁場型質量分析キャピラリーHPLC/ESI-MSを確立した。

まず、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)によりペプチドを質量分析すると、検出されるイオンがESIイオン源のスキマー電圧値によって異なることを明らかにした。すなわち、測定試料に関わらず同じm/z値を持つイオンにおいて、検出するイオンの強度がスキマー電圧値に対して同様に変化することを見出し、種々の合成ペプチド及びタンパク質の多価イオンの最適スキマー電圧値(そのイオンのピーク強度が最も強く観測される電圧値)を求めた。その結果、最適スキマー電圧値は、試料の分子量や物性に関わらず検出するm/zの値に関係し、m/z値が大きくなるほどスキマー1の電圧値は高く、スキマー2の電圧値は低くしなければならなかった。しかも、スキマー1及びスキマー2の電圧値とm/zの値は直線関係になることが判明した。この関係から、HPLCの分析時間に合わせてスキマー電圧値を段階的に変えて測定することで、HPLCから溶出してくる分子量の異なるすべてのペプチドフラグメントイオンを検出することができた。また、この現象については、理論的考察に基づくイオン軌道のシミュレーションからも裏付けることができ、スキマー電圧とm/zの関係は物理学的にも正しいことが証明された。

上記イオン源のイオン検出に関する改善に加え、キャピラリーHPLC/ESI-MSの確立のための条件検討を行った。確立したHPLC/ESI-MSにより、ミオグロビン消化物(20pmol)を分析した結果、すべてのアミノ酸シーケンスを網羅するペプチドフラグメントを±0.1u以下の精度で測定することができた。また、既知タンパク質混合物(各試料2pmol)を本法で分析した結果±0.01%以下の測定精度で分子量を決定することができた。これらの結果より、磁場型質量分析計を用いた実用的なキャピラリーHPLC/ESI-MSの確立を確認できた。

次に、H₂¹⁸O中で消化したタンパク質の、正確なペプチドマッピングを本法を用いて行い、タンパク質のC末端以外に置換される¹⁸Oを分子量シフトから検出し、¹⁸O置換のないC末端フラグメントを簡便かつ微量で同定する方法を確立した。更に、そのC末端フラグメントをキャピラリーHPLC/ESI-MS/MSによりアミノ酸配列分析を行い、C末端構造解析に応用できることを確認した。

また、本キャピラリーHPLC/ESI-MSを用いて、遺伝子組換えタンパク質(α-インターフェロン及びstreptococcal mitogenic factor)や合成ペプチドの正確なキャラクタリゼーションを行い、本法が単に微量試料の分析に適用できるだけでなく、分子量の近い不純物を含む試料の正確な分子量測定や翻訳後修飾の有無、更に、精製

工程中に起こる構造変化の検出にも有力な手段となることを確認した。

論文審査の結果の要旨

生物科学の分野においては、蛋白質をはじめとする生体物質の微量構造解析の要求、従来にも増して少ない量の試料の構造解析法の必要性が強く望まれている。

村田君は、本研究において、磁場型質量分析計によるESIマススペクトルの測定では、ペプチド及びタンパク質試料の観測されるイオン強度がESIイオン源のスキマー電圧値によって著しく影響を受けること、試料イオンのシグナル強度が最も強くなるスキマーの電圧値は試料の分子量や物性によらず、 m/z の値に関係すること、さらに2個のスキマーのそれぞれの電圧値と m/z の値は直線関係になることを見いだし、これらのことより、磁場質量分析計によるペプチド・蛋白質のLC/ESI-MSを始めて実現化した。村田君は、これらの成果を踏まえて、キャピラリーLC/ESI-MSによる蛋白質の微量構造解析法と正確な分子量測定法、また、蛋白質のC末端フラグメントの簡便な同定法をも確立した。

以上のように、本論文は、磁場型質量分析計によるペプチド・蛋白質の構造解析の新しい手法を開拓し、蛋白質の微量構造解析への応用と今後の進展が期待できるものであり、博士（理学）の学位論文として充分価値あるものと認める。