OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	質量分析法による蛋白質一次構造解析 : アミノアシラーゼの一次構造決定および末端基の新同定法
Author(s)	宮城, 大
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40313
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	宮城 大（みやぎ まさる）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第 13258 号
学位授与年月日	平成9年3月25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	質量分析法による蛋白質一次構造解析 －アミノアシラーゼIの一次構造決定および末端基の新同定法－
論文審査委員	（主査） 教授 崎山 文夫 （副査） 教授 高木 俊夫　教授 谷澤 克行

論文内容の要旨

生体構成物質のなかで最も広範多岐な機能を発揮するのは，タンパク質である。個々のタンパク質の機能を理解するためには，目的タンパク質の構造（高次構造も含めて）を決定する必要がある。構造決定はまず，アミノ酸配列（一次構造）を決めることから始まる。このアミノ酸配列の決定は，過去40年にわたり，主としてエドマン法により行われてきたが，最近では，遺伝子解析技術の急速な進展により，全配列をエドマン法のみで決めるよりはむしろ，1）目的タンパク質の部分アミノ酸配列決定，2）その配列に基いてcDNAの単離，3）塩基配列の決定，4）全アミノ酸配列の推定，という方式が一般的となっている。しかし，遺伝子から得られる一次構造情報は，原則として未成熟なタンパク質に関する情報である。多くのタンパク質は翻訳後，種々の修飾を受け，真に機能をもったタンパク質へと成熟する。そのため，タンパク質の機能を理解するには，成熟したタンパク質の構造情報が不可欠である。

上述の観点から，本研究は，cDNA塩基配列よりアミノ酸配列が既に推定されているタンパク質について，その成熟体の構造解析の方法論を確立することを目的として行った。まず，ブタ腎臓アミノアシラーゼIのタンパク質側からの一次構造解析をイオンスプレータンデム質量分計を用いて行った。この解析は，1）タンパク質の分子量の決定，2）タンパク質をプロテアーゼ等で断片化し，LC／MS法による各断片化ペプチドの分子量の決定とcDNAの塩基配列より推定されるアミノ酸配列への帰属，3）MS／MS法による各断片化ペプチドのアミノ酸配列および修飾構造の決定，4）システイン残基の存在状態の決定，という手順で行った。その結果，本酵素は，406 残基のアミノ酸よりなり，開始メチオニンが切断を受けた後，第2番目のアラニンがアセチル化されている以外はcDNAの塩基配列より推定されるアミノ酸配列と完全に一致すること，5個の半シスチン残基はすべてシステイン残基として存在していることが明らかとなった。また，その過程でMS／MS法によるアミノ酸配列解析のための信頼性の高い新しい方法を開発した。この方法は，目的ペプチドのN-末端をN-スクシンイミジル 5- ブロモ-3- ピリジンカルボキシレートで標識し，臭素の天然同位体分布比を目印に，MS／MS法により生じるフラグメントイオン中より，N-末端由来のフラブメントイオンを容易に特定できるのが特徴である。さらに，C-末端にリジン残基を持つペプチドを $H_2{}^{18}O$ 中でAchromobacter プロテアーゼIで処理すると，C-末端カルボキシル基へ ^{18}Oを特異的に高収率で取り込ませることができることを見い出し，この同位体標識法を利用し，質量分析法によるC-末端ペプチドの新しい同定法について開発した。さらに，この酵素的 ^{18}O標識反応の機構についても解析した。

論文審査の結果の要旨

本研究は，質量分析法を主軸とする蛋白質の一次構造解析法の確立を目的として行なったものである。迅速かつ高感度で構造決定ができる質量分析法の特徴を生かすため，蛋白質のN，C両末端の新しい決定法を開発し，先端的構造解析法を記述した本論文は，博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。