



Title	Analysis of novel peptides from wasp venom utilizing combinations of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric technique
Author(s)	久田, 美貴
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43096">https://hdl.handle.net/11094/43096</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	ひさ だ み き 久 田 美 貴
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 6 5 9 8 号
学位授与年月日	平成13年12月27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	Analysis of novel peptides from wasp venom utilizing combinations of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric technique (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法によるハチ毒嚢由来新規ペプチドの構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 楠本 正一  (副査) 教授 村田 道雄 助教授 高尾 敏文 助教授 隅田 泰生

### 論 文 内 容 の 要 旨

ハチは多様な生活様式を持ち、種によって毒の成分も異なることが知られている。昆虫やクモなどを捕らえ、毒針で麻痺させた後これに卵を産み付ける習性を持った単独性カリウドバチ (solitary wasp、以下「カリウドバチ」と略す) は、その毒成分中に神経伝達経路に作用する物質があると予想されるが、従来の解析法に必要な量の試料入手が困難なことから、実際の毒成分の化学的研究例は少ない。このような微量天然物由来成分の構造決定には質量分析法 (MS) による高感度構造解析が不可欠と考えた。

MS は、生体物質の分子量測定だけでなく一次構造解析法としても広く利用されており、特に MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization)-MS は感度が高いこと、操作性の良いことなどから ESI (electrospray ionization)-MS と並んでよく用いられている。本研究では、MALDI-TOFMS を用いた未知ペプチドの微量構造解析法の確立をめざし、Ladder 法と、CID/PSD 法、あるいはエンドペプチダーゼ消化と CID/PSD 法を併用した nested CID/PSD の適用を検討した (第1章、第2章)。さらにそれらの手法により、従来法では得られなかったカリウドバチ類の毒嚢に含まれる数種類の新規ペプチドの構造を決定し、カリウドバチの種類によるハチ毒ペプチドの特徴を明らかにした。(第3章)。

ペプチドの CID/PSD スペクトル解析では、フラグメントイオンの種類の区別が付かないことから、未知配列解析には不向きとされてきた。そこで、Ladder 法で得られた断片ペプチドをプリカーサーとする CID/PSD スペクトルと元のペプチドの CID/PSD スペクトルを重ね、一致しないピーク群を C 末端を含むフラグメントイオン (y イオン) として抽出した。さらに、式  $m_b + m_y = m_{precursor} + 1$  ( $m_b$ : b イオンの分子量、 $m_y$ : y イオンの分子量、 $m_{precursor}$ : 親イオンの分子量) を利用して対となる N 末端側のフラグメントイオンを計算し、フラグメントイオン帰属の効率化を図った。またアミノ酸残基量の等しい Leu と Ile は側鎖の解裂した d, w イオンで区別し、Lys と Gln はアセチル化によって決定した。

次に N 末端が修飾を受けている場合など、Ladder 法が適用できない場合は、CID/PSD スペクトル中に見られるインモニウムイオンからペプチド中に含まれるアミノ酸残基を予測し、その部分で加水分解できる酵素を選んで MALDI プレート上で酵素消化を行った。そこで得られたペプチド断片を利用した nested CID/PSD 分析を行うことで確実な構造決定を行うことができた。

これらの手法を用いて、ベッコウバチ類およびトックリバチ類の毒嚢抽出物由来ペプチドの一次構造を決定した。

ベッコウバチ類では、亜科が共通で属の異なるオオモンクロベッコウとモンベッコウがポンピリドトキシン (PMTX) を中心とする類似したペプチド群を持っていたのに対して、亜科の異なるベッコウバチは PMTX を持たず、ハチ毒キニン様ペプチドを含んでいることがわかった。ハチ毒キニン様ペプチドがベッコウバチ類から見いだされたのは初めての例であった。また、ドロバチ類は主成分として塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸からなる14~15残基のペプチドを持つことがわかった。これらは先にスズメバチ、アシナガバチの多くに見いだされたマストパラン類と同じ特徴を持っており、ドロバチ類の特徴的な毒成分が系統的に近い社会性カリバチに引き継がれていることが明らかとなった。

本研究では、種々の酵素消化を併用した nested CID/PSD 法が、未知ペプチドに対する有効な全アミノ酸配列構造決定法である事を示し、この手法により従来法では分析できなかった天然物由来微量成分の構造決定を可能とした。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、感度や測定分子量範囲などに関して最近大きく発達している質量分析法を駆使して、微量ペプチドの構造を決定する優れた方法を考案し、多くのハチ毒の成分ペプチドの構造を明らかにした内容について、手法の確立に至る経過と、解明したペプチドの構造的特徴がハチの分類学上の関係によく対応していることを述べたものである。この成果は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。