

学 位 論 文 題 名

Adsorption Mechanism of Protein to Functionalized Porous Chitosan Beads

(高機能化キトサン多孔性ビーズへの蛋白質の吸着機構)

学位論文内容の要旨

キトサンは天然に広く存在するキチンを脱アセチル化する事によって生成される、塩基性のムコ多糖である。その化学構造はセルロースに類似しており、グルコサミンが β 1-4結合でつながった構造を持つ。キチンやキトサンは自然界でセルロースに次ぐ生産量を示すが、現在までほとんど利用されていないのが現状である。しかしながら、近年キチンやキトサンに種々の機能が見いだされ、様々な分野での応用が進められている。

このキチン及びキトサンの生医学分野での展開を考える上で、キトサンの低毒性、生体親和性、親水性、脱アセチル化度を調節することによる生体内消化性等の利点が考えられる。又、キトサンは分子内に反応性の高いアミノ基を有していることから、化学修飾が容易であり、様々な高機能化の可能性がある。そのうえ、キトサンは有機酸の希薄水溶液に容易に溶解するため、再生が容易でフィルム、紙、繊維、ビーズ等に成形することも可能であり、広範な分野での応用が進められている。

本研究では、キトサンを多孔質のビーズに成形し、様々な化学修飾を施すことによって、高機能化を試みた。キトサン成型物の中で、多孔質ビーズはその巨大な表面積及びハンドリングの容易さの点で、繊維等に比較して、タンパク質の吸着担体として有利であると考えられる。そこで、このキトサン多孔質ビーズを化学修飾によって高機能化し、糖鎖を認識するタンパク質との相互作用を検討した。近年、糖鎖の生体内での役割が注目されてきており、この糖鎖とタンパク質の認識が、生体内での種々の機能発現に大きく影響することが知られてきた。化学修飾キトサンを糖鎖のアナログと考え、糖鎖を認識するタンパク質との相互作用を検討することは、糖鎖機能の解明のために、非常に有効な手段であると考えられる。本研究では、糖鎖認識タンパク質として、リゾチームとラクトフェリンを選び、これらのタンパク質の糖鎖認識機構の

解明を目的とした。

キトサン多孔質ビーズは、細孔調節剤の様な添加物を添加することなく、低分子量キトサンを酢酸水溶液に溶解し、この溶液を塩基性の凝固液に細いノズルを通して噴霧するという簡単な方法で調製する事ができ、この際にキトサンの濃度、若しくは凝固液の濃度を調節することによって、ビーズの嵩密度が制御可能であった。この嵩密度はビーズの細孔径に大きく影響を与え、嵩密度が大きくなると細孔径が減少するが、コントロールする事が可能であった。

キトサン多孔質ビーズの化学修飾は反応の際に有機溶媒でビーズを平衡化した後に試薬を加え、攪拌することで容易に行えた。

キトサンのアミノ基への化学修飾では、アセチル化はエタノール中無水酢酸で反応を行い、加える無水酢酸の量を変えることでキトサンのアミノ基のアセチル化度をコントロールする事ができた。また、アミノ基を利用した化学修飾としてはこの他にエタノール中、無水コハク酸によるスクシニル化、及びジメチルホルムアミド中、ヘキサメチレンジイソシアネートによる架橋も容易であった。

キトサン水酸基の化学修飾はキトサンのアミノ基のアセチル化、及び架橋を行った後に可能であった。ビーズをNaOHでマーセル化後に、イソプロピルアルコール中でモノクロル酢酸を反応させることで、水酸基のカルボキシメチル化が可能であり、ジメチルホルムアミド中、ジメチルホルムアミド-三酸化イオウ複合体を反応させることでスルホン化を行った。カルボキシメチル化度はマーセル化の際のNaOHの濃度で、スルホン化ではジメチルホルムアミド-三酸化イオウ複合体の量でそれぞれ置換度の制御が可能であった。

カルボキシル基を導入したキトサンビーズへの卵白リゾチームの吸着挙動及びスルホン化キトサンビーズへの牛ラクトフェリンの吸着挙動を調べ、糖鎖認識の知見を得ると共に、両担体のそれぞれのタンパク質のアフィニティークロマトグラフィー用担体としての可能性の検討を行った。

カルボキシル基を導入したビーズではカルボキシル基の導入量が増加するにつれて、リゾチームの吸着量は増加したが、その導入位置がアミノ基か水酸基かで異なるリゾチーム吸着挙動を見せた。また、リゾチームとビーズとの吸着は、塩濃度にはほとんど影響を受けず、pH変化に影響を受け、カルボキシメチル化セルロースとは異なる

性質を示した。このカルボキシル化されたキトサンビーズへのリゾチームの吸着は、尿素、しょ糖、N-アセチルグルコサミンによって阻害されることから、この吸着には水素結合の関与が示唆された。この担体を用いて、卵白からのリゾチームのアフィニティークロマトグラフィーによる精製が可能であった。

一方スルホン化キトサンビーズへのラクトフェリンの吸着はO-スルホンの場合、その導入量が増加するにつれて吸着量が増加したが、約 $100\mu\text{eq}/\text{ml}$ 程度で最大となり、それ以上導入量が増加すると逆に吸着量は減少した。また、この吸着はビーズの物理的性状によっても影響を受け、見掛け密度が大きくなるにつれてその吸着量は減少した。スルホン基の導入位置についてはO-スルホンのみよりも、N、O-スルホンが共存する方が吸着量は増大した。ヘパリン認識タンパクであるラクトフェリンはやはり、N-、及びO-スルホンの両者を認識していることが示唆された。この担体を用いての脱脂乳からのラクトフェリンの精製は、溶出に 1M-NaCl を用いることで可能であったことから、ラクトフェリンのスルホン化ビーズへの吸着はイオンの相互作用が主であることが考えられた。

この様に化学修飾によって機能化されたキトサンビーズの応用として、カルボキシル基を有するキトサンビーズのカルボキシル基を活性エステル化することによって、タンパク質の固定化担体としての応用を試みた。このカルボキシル基を利用してジアミン-ジカルボン酸の段階的反應でスペーサー長の異なる担体を調製し、それぞれにリガンド及び酵素を固定化し、アフィニティークロマトグラフィー及び酵素固定化用の担体としての性質を検討した。

スペーサー長によってリガンド及び酵素の発現率が上昇したが、耐熱性、及びpH変化に対する耐性は減少する傾向を示した。また、アフィニティークロマトグラフィーを行った場合の非特異的相互作用も、スペーサー長が長くなるにつれて増加する傾向が見られた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 西 則 雄
副 査 助 教 授 吉 田 孝
副 査 助 教 授 林 寿 郎 (京都大学)

学 位 論 文 題 名

Adsorption Mechanism of Protein to Functionalized Porous Chitosan Beads

(高機能化キトサン多孔性ビーズへの蛋白質の吸着機構)

キトサンは天然に広く豊富に存在するキチンを脱アセチル化することによって生成される、塩基性のムコ多糖である。その化学構造はセルロースに類似しており、グルコサミンが β 1-4 結合でつながった構造を持つ。キトサンは低毒性、生体親和性、親水性、脱アセチル化度を調節することによる体内消化性等の利点が報告され、生医学分野での活用が考えられている。キトサンは分子内に反応性の高いアミノ基を有していることから、化学修飾が容易であり、様々な高機能化の可能性がある。そのうえ、キトサンは有機酸の希薄溶液に容易に溶解するため、再生が容易でフィルム、紙、繊維、ビーズ等に成形することも可能であり、広範な分野での研究が進められている

申請者は、キトサン多孔質ビーズが繊維等に比較してその巨大な表面積のため、タンパク質の吸着担体として有利であると考えた。さらに、このキトサン多孔質ビーズを化学修飾によって高機能化し、糖鎖を認識するタンパク質との相互作用を検討している。これは近年糖鎖の生体内での役割が注目されてきており、この糖鎖とタンパク質との認識が、生体内での種々の機能発現に大きく影響することが知られてきた。化学修飾キトサンを糖鎖構造の類似物と考え、糖鎖を認識するタンパク質との相互作用を検討することは、糖鎖機能の解明のために、非常に有効な手段であると考えたためである。本研究では、糖鎖認識タンパク質として、リゾチームと牛ラクトフェリン(LF)を選び、これらの蛋白質の糖鎖認識機構の解明を目的として研究を行なっている

まず、細孔調製剤のような添加物を使用することなく、低分子量キトサンを酢酸水溶液に溶解し、この溶液を塩基性の凝固液に細いノズルを通して噴霧するという簡単な調製方法を見出した。この際にキトサンの濃度、もしくは凝固液の濃度を調節することによって、ビーズの嵩密度が制御可能なことを見だし、様々な表面積をもったキトサンビーズの調製を行なった。さらに有機溶媒で

キトサン多孔質ビーズを平衡化した後に試薬を加え、攪拌することで容易に化学修飾できることを見いだしている。

キトサンのアミノ基への化学修飾は、エタノール中無水酢酸によるアセチル化、エタノール中、無水コハク酸によるスクシニル化、およびジメチルホルムアミド(DMF)中、ヘキサメチレンジイソシアネートによる架橋法が有効であることを見出した。ビーズをNaOHでマーセル化後にイソプロピルアルコール中でモノクロル酢酸を反応させることで水酸基のカルボキシメチル(CM)化、およびDMF中DMF・三酸化イオウ複合体を反応させることでスルホン化されることを見いだした。CM化度はマーセル化の際のNaOHの濃度で、スルホン化ではDMF・三酸化イオウ複合体の量でそれぞれ置換度の制御が可能であることを示している。

CM基を導入したキトサンビーズへの卵白リゾチームの吸着挙動及びスルホン化キトサンビーズへのLFの吸着挙動を調べ、糖鎖認識の知見を得ると共に、両担体のそれぞれのタンパク質のアフィニティークロマトグラフィー用担体としての可能性の検討を行なっている。CM基を導入したビーズではCM基の導入量が増加するにつれて、リゾチームの吸着量は増加したが、その導入位置がアミノ基か水酸基かで異なるリゾチーム吸着挙動のあることを見いだしている。CM化されたキトサンビーズへのリゾチームの吸着は、尿素、しよ糖、N-アセチルグルコサミンによって阻害され、この吸着には水素結合の関与が示唆された。この担体を用いて、卵白から直接リゾチームをアフィニティークロマトグラフィーで精製できることを見いだした。

スルホン化キトサンビーズへのLFの吸着は、O-スルホンの場合、その導入量が増加するにつれて吸着量が増大したが、約100 μ eq/ml程度で最大となり、それ以上導入量が増加すると逆に吸着量は減少した。また、この吸着は、ビーズの物理的形狀によっても影響を受け、見かけ密度が大きくなるにつれてその吸着量は減少した。スルホン基の導入位置についてはO-スルホンのみよりも、N,O-スルホンの共存するほうが吸着量は増大した。ヘパリン認識タンパクであるLFでも、N-及びO-スルホンの両者を認識していることが示唆された。この担体を用いての脱脂乳からのLFの精製は、溶出に1M・NaClを用いることで可能であったことから、LFのスルホン化ビーズへの吸着はイオンの相互作用が主であることを示唆した。

また化学修飾によって機能化されたキトサンビーズも、CM基を活性エステル化することによって、タンパク質の固定化担体としての応用を試みている。

このように化学修飾により全く新しい機能性を引き出せることを示した本研究は高く評価される。

参考論文はいずれも本論文と関連性があり、審査員一同は申請者が博士(理学)の学位を得る十分な資格があると認めた。