

学 位 論 文 題 名

Carbohydrate Resources as Biochemical and Functional Materials

(生化学的及び機能性材料としての糖資源)

学位論文内容の要旨

天然に豊富に存在する糖資源を用いた、糖鎖-タンパク質間相互作用における糖鎖リガンドとなるような材料の開発を目的とした。生体内における細胞活動、あるいは生理現象には糖鎖-タンパク質間相互作用が様々な形で関与している。そこで本研究ではまず、天然に豊富に存在する多糖を用い、このような生命現象に必要不可欠な糖鎖-タンパク質間相互作用を利用した医用材料となる材料の開発を行った。次いで、糖鎖-タンパク質間相互作用を分子レベルで解析することを目的として、重合性糖モノマーを用いたアフィニティー電気泳動法による糖鎖-タンパク質間相互作用の解析を行った。さらに、生体内において非常に重要な働きをしている白血球細胞などの細胞表面に発現されるセレクトインと相互作用する、新規重合性糖モノマーを合成し、セレクトインとの相互作用について述べる。

【第一章】この章では自然界における様々な複合糖質及び糖鎖結合タンパクの構造と機能、役割を概説している。

【第二章】多糖とタンパク質との相互作用を利用した医用材料の開発を行うにあたり、慢性関節リウマチ患者の血液中に含まれるクリオゲルを選択的に吸着する材料として硫酸化セルロースを用いた吸着材が非常に有用であることを示した。すなわち、クリオゲルを形成する物質のうち、病因と直接的に関連していると推察されヘパリンに対する親和性が非常に大きいEDA(+)フィブロネクチンを、低硫酸化度の硫酸化セルロースを吸着材としてその吸着性を評価した。その結果、硫酸化セルロースの硫酸化度がおよそ0.13でEDA(+)フィブロネクチンの吸着率が約60%、0.16で80%を越える吸着率を示し、硫酸化度の上昇に伴った吸着率の急激な上昇がみられた。一方、その他のクリオゲル成分、ならびに血漿成分の吸着率と硫酸化度の上昇との間には有意な関連性はみられなかった。

【第三章】糖鎖-タンパク質間相互作用を分子レベルで解明する手段として用いられてきたアフィニティー電気泳動法をより簡便にかつ効率よく行う方法を確立した。糖鎖-タンパク質間相互作用を解析するためにアフィニティー電気泳動法を利用する際、従来は糖モノマーを、その重

合性の低さから、糖モノマーのみで予め重合しておき、得られたポリマーをアクリルアミドなどの入った溶液に入れてゲル化させ、これによりゲル中に固定化するという方法が採られてきた。しかしながら、この様な方法では重合を繰り返し行わなければならないだけでなく、ゲル中に均一に糖鎖リガンドを固定化することが不可能であった。そこで本章では、以前に合成された、側鎖に *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を持つ非常に重合性の高い糖モノマーを用いることにより、アクリルアミド及びビスアクリルアミドと共重合させて糖鎖リガンドが均一に分布したゲルを調製することができた。さらに、この様にして得られたゲルを用い、GlcNAc と親和性のある小麦胚芽レクチン(WGA)との相互作用解析をアフィニティー電気泳動により行った。この際、泳動したタンパクは染色処理を行わず、蛍光度測定によりゲル中のタンパクをダイレクトに検出した。その結果、20℃での GlcNAc と WGA の親和定数は $1.24 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ となり、文献値とほぼ一致したことから、この様な糖モノマーを用いたアフィニティー電気泳動法は糖鎖-タンパク質間相互作用を解析する手段として非常に有用であることが明らかとなった。

【第四章】本章では、セレクトインリガンド機能を有する新規重合性糖モノマーの合成と、その糖モノマーをアクリルアミドと共重合することにより得られる、側鎖に機能性糖鎖リガンドを持つポリマーの生化学的評価について述べる。ホエー中に豊富に存在するラクトース [Lac ;ガラクトース β (1 $\rightarrow$ 4) グルコース] を原料に、還元末端に炭素数 3 のスパーサー構造を持つ重合性糖モノマーを合成した。次いで、3' 位に位置特異的に硫酸基を導入して得られる糖モノマーを、アクリルアミドと共重合することにより側鎖にセレクトインリガンドとなる糖鎖を持つ機能性ポリマーの合成を行い、さらに側鎖の糖鎖密度を変化させたポリマーを調製し、セレクトインとの相互作用の解析により均一溶液系での糖鎖-タンパク質間相互作用解析も可能とした。

【第五章】この章は、本論文の総括であり、各章において得られた有益な結果を簡潔にまとめている。

以上のように、この論文は糖鎖-タンパク質間相互作用を利用、あるいはそれを解析するための材料を天然に豊富に存在する糖鎖をモディファイし、機能を付加することにより調製し、付加価値の高い材料の合成、及びその評価方法に大きく貢献するものであると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄

副 査 教 授 戸 倉 清 一

副 査 教 授 西 村 紳一郎 (理学研究科)

副 査 助 教 授 覺 知 豊 次

副 査 助 教 授 坂 入 信 夫

学 位 論 文 題 名

Carbohydrate Resources as Biochemical and Functional Materials

(生化学的及び機能性材料としての糖資源)

本研究では、天然に豊富に存在する糖資源を用いた、糖鎖-タンパク質間相互作用における糖鎖リガンドとなるような材料の開発を目的としている。すなわち、生体内における細胞活動や生理現象には糖鎖-タンパク質間相互作用が様々な形で関与しているので本研究ではまず、天然に豊富に存在する多糖を用い、このような生命現象に必要な糖鎖-タンパク質間相互作用を利用した医用材料となる素材の開発を行った。次に、糖鎖-タンパク質間相互作用を分子レベルで解析することを目的として、重合性糖モノマーを用いたアフィニティー電気泳動法による糖鎖-タンパク質間相互作用の解析を行った。さらに、生体内で重要な働きをしている白血球細胞などの細胞表面に発現されるセレクチンと相互作用する、新規重合性糖モノマーを合成し、セレクチンとの相互作用について調べている。

論文は5章よりなっており、第一章では自然界における様々な複合糖質及び糖鎖結合タンパクの構造と機能、役割を概説している。

第二章では、多糖とタンパク質との相互作用を利用した医用材料の一例として、慢性関節リュウマチ患者の血液に含まれるクリオゲルを選択的に吸着する材料として硫酸化セルロースを用いた吸着材が非常に有用であることを示した。すなわち、クリオゲルを形成する物質のうち、病因と直接的に関連していると推察されヘパリンに対する親和性が非常に大きい EDA(+)フィブロネクチンを、低硫酸化度の硫酸化セルロースを吸着材としてその吸着性を評価した。その結果、硫酸化度の上昇に伴った吸着率の急激な上昇がみられた。一方、その他のクリオゲル成分、ならびに血漿成分の吸着率と硫酸化度の上昇との間には有意な関連性はみられなかった。

第三章では、糖鎖-タンパク質間相互作用を分子レベルで解明する手段として有用なアフィニティー電気泳動法をより簡便にかつ効率よく行う方法を確立した。すなわち、糖鎖-タンパク質間相互作用解析用にアフィニティー電気泳動法を利用する際、従来は糖モノマーを、その重合性の低さのため、糖モノマーのみで予め重合しておき、得られたポリマーをアクリルアミドなどの入った溶液中に入れてゲル化させる方法が採られてきた。しかし、この方法では重合を繰り返し行わなければならないだけでなく、ゲル中に均一に糖鎖リガンドを固定化することが不可能であった。そこで本章では、以前に合成された、側鎖に *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を持つ重合性の高い糖モノマーを用いることにより、アクリルアミド及びビスアクリルアミドと共重合させて糖鎖リガンドが均一に分布したゲルを調製することができた。さらに、このようにして得られたゲルを用い、GlcNAc と親和性のある小麦胚芽レクチン(WGA)との相互作用解析をアフィニティー電気泳動により行った。この際、泳動したタンパク質は染色処理を行わず、蛍光度測定によりゲル中のタンパクを直接検出した。その結果、GlcNAc と WGA の親和定数が文献値とほぼ一致し、このような糖モノマーを用いたアフィニティー電気泳動法は糖鎖-タンパク質間相互作用を解析する手段として有用であることが明らかとなった。

第四章では、セレクトインリガンド機能を有する新規重合性糖モノマーの合成と、その糖モノマーをアクリルアミドと共重合することにより得られる、側鎖に機能性糖鎖リガンドを持つポリマーの生化学的評価について述べている。牛乳のホエー中に豊富に存在するラクトースを原料に、還元末端にスパーサー構造を持つ重合性糖モノマーを合成した。次いで、3' 位に位置特異的に硫酸基を導入して得られる糖モノマーを、アクリルアミドと共重合することにより側鎖にセレクトインリガンドとなる糖鎖を持つ機能性ポリマーの合成を行い、さらに側鎖の糖鎖密度を変化させたポリマーを調製し、セレクトインとの相互作用の解析により均一溶液系での糖鎖-タンパク質相互作用解析も可能とした。

第五章では、本論文の総括であり、各章において得られた有益な結果を簡潔にまとめている。

このように、本論文は糖鎖-タンパク質間相互作用を利用、あるいはそれを解析するための材料を天然に豊富に存在する糖鎖を化学的に修飾することにより調製し、付加価値の高い材料の合成、及びその評価方法に大きく貢献するものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者は研究者として誠実かつ熱心であると考え、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。