The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	オリゴ糖鎖と生体分子の相互作用に関する研究 : チップへの糖鎖固定化と表面プラズモン共鳴法による解析
Author(s)	荒野, 明男
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45110
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

【61】

氏　　名	荒　野　明　男（あら の あき お）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　18400　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科化学専攻
学　位　論　文　名	**オリゴ糖鎖と生体分子の相互作用に関する研究** **ーチップへの糖鎖固定化と表面プラズモン共鳴法による解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　楠本　正一 （副査） 教　授　長谷　純宏　　鹿児島大学大学院理工学研究科教授　隅田　泰生 助教授　深瀬　浩一

論　文　内　容　の　要　旨

近年、生命現象において核酸・蛋白質に次ぐ第三の生命情報分子とされる糖鎖の多様な役割が明らかにされつつある。隅田らは、不均一な構造を有する硫酸化多糖ヘパリン中の特定の部分二糖構造 O-(2-deoxy-6-O-sulfo-2-sulfoamino-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-2-O-sulfo-α-L-idopyranosyluronic acid（1）が血小板やフォンビルブラント因子（vWF）とヘパリンとの相互作用に重要であることを見いだした。しかし、これらの実験には放射標識化したヘパリンや多量のオリゴ糖鎖を用いなければならなかった。本研究はオリゴ糖鎖をチップに簡便に固定化し、表面プラズモン共鳴（SPR）法を用いてオリゴ糖鎖と生体分子との相互作用を系統的に解析するための新たな方法を開発することを目的として行ったものである。

第一に上記の硫酸化二糖１を SPR のチップに固定化するために、疎水性膜を担持させたチップに疎水性部を結合させた二糖１を固定化する方法（方法-１）と、ジスルフィド部を結合させた二糖１を金膜上に直接固定化する方法（方法-２）の２つを検討し、これらの方法で硫酸化二糖１を固定化したチップと vWF 中のヘパリン結合ドメインを含む合成ペプチド（vWF ペプチドと略）の結合挙動を SPR で調べたところ、方法-２がオリゴ糖鎖をチップに固定化するための有効な方法であることがわかった。

第二に、チップ上の糖鎖密度が蛋白質との相互作用に与える影響を検討するために、１、３または４単位の芳香族アミノ基を持つリンカー化合物に硫酸化二糖１を結合した３種類の糖鎖・リンカー結合体（２、３および４）とグルシトール構造１単位のリンカー結合体（５）を合成し、二糖とグルシトールそれぞれの組成比を変えた溶液を用いてチップを作成したところ、溶液中の組成比によって糖鎖密度の異なるチップを調製できることが全反射 FT-IR-測定によって明らかになった。これらの糖鎖密度を変化させたチップを用いてヒト血漿由来の vWF（h-vWF）の結合挙動を観測したところ、糖鎖密度の変化は h-vWF の解離定数に影響を与えないことがわかった。

vWF 中の A1 ループをリコンビナントした vWF 部分構造の結合挙動を観測したところ、二糖１一単位を固定化したチップの場合にはチップ上の糖鎖密度を低くすると解離定数の増加が見られたが、二糖三および四単位を固定化したチップの場合には解離定数に殆ど変化がなかったことから、オリゴ糖鎖－蛋白質間の相互作用においてアフィニティを増大させるには、分子内でオリゴ糖鎖をクラスター化させる必要があることが明らかになった。

以上の研究から、3または4単位のオリゴ糖鎖を分子内でクラスター化した糖鎖・リンカー結合体を金チップにAu-S結合によって固定化し、これを用いてSPRで潮定することが糖鎖－生体分子間の相互作用を系統的に解析するために適した方法であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

糖鎖が生命現象において果たしている多様な役割が次第に明らかになっている。しかし糖鎖と蛋白質をはじめとする生体分子との相互作用は必ずしも強いものではなく、微量な糖鎖の機能解析は困難な場合が多い。荒野君はこの問題のひとつの解決法として表面プラズモン共鳴法の応用を目指して硫酸化多糖ヘパリンの部分構造二糖誘導体を題材に研究を行った。糖鎖を同共鳴法装置の金チップに固定化するためのリンカーの合成と糖鎖の結合に優れた方法を見出し、また3または4分子の糖鎖をまとめて固定化するリンカーも合成した。これらのリンカーを用いてヘパリン部分構造糖鎖と血中の蛋白質フォンビルブラント因子との特異的な相互作用が精密に解析できることを明確に示した。この研究は糖鎖の集合化と固定化の一般的な方法を提供するとともに、それによって微弱な糖鎖と蛋白質の相互作用が表面プラズモン共鳴法によって測定できることを示したもので、今後の糖鎖の機能研究に大きく貢献するものである。

よって、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。