

氏 名（本籍） さ 佐 とう 藤 かつ 勝 ひこ 彦

学 位 の 種 類 博 士（薬 学）

学 位 記 番 号 薬 第 5 1 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 19 年 9 月 7 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 平 成 15 年 3 月 25 日
東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科
博 士 課 程 前 期 2 年 の 課 程 修 了

学 位 論 文 題 目

コンカナバリンA / 糖ポリマー交互累積膜および複合体の糖応答性に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 安 齋 順 一
教 授 岩 田 鍊
准教授 三 浦 隆 史

論文内容要旨

本研究ではコンカナバリン A (Con A) と糖ポリマーとの累積膜および複合体を利用したグルコース (Glu) 検出方法を検討した。Con A はタチナタマメなどに含まれる分子量 104,000 の糖結合性タンパク質 (レクチン) であり、4 量体の各サブユニットに 1 箇所の糖結合部位を有し、 α -D- グルコース残基および α -D- マンノース残基と可逆的に結合する。

初めに、Con A とグリコーゲン (Gly: Glu のみから構成される天然糖鎖) の糖 - レクチン結合を駆動力として交互累積膜を作製し、糖応答性を検討した。交互累積膜法は薄膜作製方法のひとつで、適当な基板を相互に結合する 2 種の溶液に交互にひたすことによってナノメートルレベルの多層膜を作製することができる。著者は石英板上に Con A と Gly の累積膜を以下の方法で作製し分光学的手法から調査した。まず、石英板を Con A 溶液に 30 分間ひたして 1 層目の Con A を疎水的相互作用により吸着させた後、蒸留水に 5 分間ひたすことにより弱く結合している Con A を洗浄した。次に、Gly 溶液にひたして糖 - レクチン結合によって表面に吸着させ、同様に蒸留水に 5 分間ひたすことにより洗浄した。この操作をくり返し行うことにより Con A/Gly 累積膜を積層した。このとき、Con A 溶液に石英板をひたした後の 280 nm の吸収 (Con A 由来) が積層操作ごとに増加していることから Con A/Gly 累積膜の形成が確認できた。吸着した Con A の吸光度から累積膜中の固定化量を計算すると、1 層あたり平均 1.4×10^{11} mol cm⁻² であり、ほぼ単分子層を形成していた。

Con A/Gly 累積膜を形成している糖 - レクチン結合は可逆的な結合であるため、累積膜に Glu を添加すると Con A と結合している Gly が Glu と置換することによって Con A-Gly 結合が切断され、累積膜が分解することが期待できる。そこで、累積膜の糖応答性をグルコース (Glu)、マンノース (Man)、メチル α -D- グルコピラノシド (Me- α -Glu)、メチル α -D- マンノピラノシド (Me- α -Man)、ガラクトース (Gal) の 5 種類の糖について調査した。この結果、Con A/Gly 累積膜の分解応答は Gal を除いたすべての糖類で見られ、これらの分解速度は Con A と糖類との親和性の強さに依存していた。すなわち、Me- α -Man と Me- α -Glu は 1 位がメチル化されているために Con A と非常に高い親和性をもつことから、添加後の 10 分間で累積膜はほぼ完全に分解した。また、Man も Glu より高い親和性をもつため Gly とよく置換することが推測でき、Glu の場合よりも速く分解した。一方、Con A は Man 結合型レクチンであるため Gal とほとんど結合しないことから Con A/Gly 累積膜は Gal で分解しなかった。これらの結果は、明らかに Con A と糖の親和性の程度に依存して Con A/Gly 累積膜が分解しおり、Con A/Gly 累積膜形成の駆動力が疎水的吸着などの非特異的な吸着ではなく、Con A と Gly の間の糖 - レクチン結合によるものであることが示された。

さらに、糖ポリマーである PV-MA, PV-MEA, PV-G, デキストラン (Dext: Glu のみから構成される天然糖鎖) を用いて Con A と積層操作を行ったところ Glu が修飾されている PV-MA でのみ薄膜形成を確認した。一般的に、Con A が Man や Glu と結合する場合は 3 位と 4 位の水酸基の立体配置が重要であることが知られ、PV-MEA は修飾されている糖が Gal であることから、また、PV-G は Glu を有して

いるが3位に水酸基が存在しないためにCon Aと結合することができない。また、Glyと同様にグルコースユニットから構成されるDextでも主鎖や分岐位置の違いからCon Aと結合しにくい分子であることが推測できる（Glyは主鎖が α -1,4結合であり α -1,6結合で分岐している。Dextは主鎖が α -1,6結合であり α -1,3結合で分岐している）。このような理由からこれらの糖ポリマーは累積膜を形成しかつたと考えられる。

これまでの研究によって、Con AがGlyと累積膜を形成し糖によって分解することを明らかにした。そこで、Glyに電気化学的なマーカーであるフェロセン（Fc）を化学的に修飾することで電気化学的なGluの検出を試みた。Con AとFcGlyの積層操作ごとにサイクリックボルタンメトリー（CV）を測定すると、およそ0.34 V付近にFcの酸化還元ピークが見られ、積層数ごとに増加していることから電極上への累積膜形成が確認できた。また、積層数が1～3の累積膜では酸化および還元ピーク電位が一致しており電極上に固定化されたFcの特徴的なCV波形を示した。ここにGluを添加すると濃度依存的にFcのピーク電流値は減少した。これはCon A/FcGly累積膜がGluの作用により分解し、固定化されたFcGlyが電極上から脱離したためである。これらのことから、Con A/Fc Gly累積膜によってGluを電気化学的に検出できることが示唆された。

分光学的な糖類の検出は、光信号の取り扱いが容易であり高感度なため広く研究され、特に優れたアプローチのひとつとしてCon AとDextが複合体を形成することにより誘起される蛍光エネルギー転移（FRET）を利用したものがあげられる。しかし、糖の検出にFRETを用いる場合は必ず2種類以上の蛍光色素を使用し、さらに、ドナーとアクセプターである蛍光色素はそれぞれドナーの蛍光波長とアクセプターの吸光波長が重なっていることが必要であるため色素を自由に選択することができない。また、生体試料への化学修飾はタンパク質の変性などによる活性の低下の危険性があるためできるだけ避けるべきである。そこで、著者はFRETシステムのこれらの欠点を改善するべく環境応答性色素であるFITCを修飾したCon A（FITC-Con A）とGlyの形成する複合体を用いた糖類の蛍光検出を検討した。

初めに、FITC-Con Aの蛍光強度は複合体を形成することによってどのように影響を受けるかを調査した。FITC-Con AにGlyを添加した場合はFITCの515 nmの蛍光強度は大きく減少した。これはFITC-Con AとGlyが複合体を形成したためであると考えられる。しかし、Con Aとの結合力の弱いDextでは消光作用が小さく、FITCが消光するのに十分な複合体を形成出来ないことが示唆された。次に、TRITC-Con Aを使用して同様の実験をおこなったところ、TRITCの蛍光強度は複合体形成により影響を受けなかった。これらの結果から、FITC-Con AはGlyと複合体を形成したため消光されたことが強く示唆された。このFITC-Con A - Gly複合体の糖応答性を調査したところ、Glu添加後の複合体の蛍光スペクトルはGluの濃度に依存して増加した。これは、累積膜と同様の理由から複合体が分解した結果、FITC-Con Aの消光が解消されたために蛍光が回復したと考えられ、FITC-Con A - Gly複合体によってGluを検出できることを確認した。

近年、交互累積膜法を用いたマイクロカプセルの調製方法が開発された。この方法は、初めに、ナノ～マイクロメートルサイズの球状微粒子の表面にポリカチオンとポリアニオンの高分子電解質を静電的相

相互作用によって1層ずつ被覆してカプセル膜を形成し、その後微粒子を適当な方法で溶解除去することによりカプセルを調製するものである。そこで、FITC-ConA - Gly 複合体をカプセルに封入することで Glu 検出マイクロカプセルの調製を試みた。複合体をカプセル化することにより、くり返しの利用と基板への固定化が期待できる。

FITC-ConA - Gly 複合体を含有する CaCO_3 粒子を芯物質としてカプセルを調製し蛍光顕微鏡と走査電子顕微で確認した。カプセル膜はポリアニオンである PSS とポリカチオンである PAH および PEI の交互累積膜を静電的相互作用により調製した。PAH/PSS 累積膜、PEI/PSS 累積膜のどちらのカプセルも積層数が1～3層の場合ではカプセル膜が薄すぎるために力学的強度が足りず CaCO_3 粒子を溶解除去するための EDTA 処理中に壊れてしまうためにカプセルは形成しなかった。しかし、積層数が4以上の場合は、PAH/PSS 累積膜、PEI/PSS 累積膜のどちらのカプセル膜でも直径3～5 μm の球状カプセルの形成が確認できた。次に糖類に対する応答性を調査した。カプセルを分散した緩衝液に Glu を添加した後の蛍光スペクトルは FITC-Con A 由来の蛍光強度が濃度依存的に増加した。これは溶液中の Glu 分子がカプセル膜を透過して内部の複合体に作用したためと考えられ、FITC-ConA - Gly 複合体のカプセル封入と糖応答性が示唆された。また、FITC-Con A と Gly は可逆的結合により複合体を形成しているため、反応後にカプセル内部から Glu を除去することで再び複合体を形成すると考えられる。実際、カプセルの Glu 応答は4回のくり返し使用まで見られた。しかし、Glu による応答は Glu の添加と洗浄操作をくり返す度に蛍光強度が大きく減少していった。この理由として Glu と反応し複合体から解離した FITC-Con A がカプセルから漏れ出していることが示唆された。

本研究では、Con A を認識材料に用いて Glu の検出方法を検討してきたが、今回検討した方法の他にもいろいろな応用が考えられる。しかし、Glu の検出感度は認識材料と Glu との親和性に大きく依存するため Con A を使用する限り大きな感度上昇は期待できない。本研究では安価なレクチンであり比較的安定であるという理由から Con A を利用してきたが、今後は、より親和性の大きいレクチンを検討することでこれらを改善できると考える。

審査結果の要旨

本研究では初めに、Con A と Gly の糖 - レクチン結合を駆動力として交互累積膜を作製し、糖応答性を検討した。この累積膜は糖類によって Con A-Gly 結合が切断されるため分解し、糖応答性は加える糖の種類や濃度に依存していた。さらに、PV-MA, PV-MEA, PV-G, Dext などの糖ポリマーを用いて Con A と積層操作を行ったところ、PV-MA のみが Gly と同様の糖応答性を示した。また、Gly に Fc を修飾した FcGly と Con A 累積膜を電極上に調製することにより Glu の電気化学的検出に成功した。

次に、FITC-Con A - Gly 複合体を利用した Glu の蛍光検出方法を検討した。まず、FITC-Con A が Gly と複合体を形成すると消光されることを明らかにした。また、FITC-Con A - Gly 複合体は累積膜と同様に Glu によって分解し、このとき消光されていた FITC 蛍光は Glu の濃度依存的に回復するため、この性質を利用した Glu の蛍光検出が可能であることを確認した。この現象は単一の蛍光色素 (FITC) のみの蛍光変化にもとづいているため、2 種の蛍光色素の使用する FRET システムより優れている。

さらに、FITC-Con A - Gly 複合体を内包するマイクロカプセルの調製を検討した。カプセルの芯物質に CaCO_3 微粒子を用い、 $(\text{PEI/PSS})_4$ 累積膜を被覆することで FITC-Con A を変性することなく活性を維持したままカプセル化することを実現した。また、Glu の応答性も均一系の場合と同程度であった。しかし、 $(\text{PEI/PSS})_4$ カプセル膜では FITC-Con A の漏出が観察されて、Glu の繰り返し検出が出来なかった。PAH などの高分子を用いることや累積操作回数を増やすことで FITC-Con A を漏出させないことは可能であるが、この場合は Glu 応答性が著しく減少する。封入した FITC-Con A を漏出させることなく Glu の透過性が良いカプセル膜を検討し、くり返して利用できるカプセルを調製することが必要である。

Con A を認識材料に用いて Glu の検出方法を検討してきたが、今回検討した方法のほかにもいろいろな応用が期待できる。本研究では安価なレクチンであり比較的安定な生体試料であるという理由から Con A を利用してきたが、今後は、より親和性の大きいレクチンを検討することでこれらを改善できると考える。

以上、本論文は蛍光法および電気化学法による新しい糖検出システムを確立するものである。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。