

氏名	ば ば よう こ 馬 場 洋 子
授与学位	博士(工学)
学位授与年月日	平成12年9月13日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第2項
最終学歴	昭和62年3月 東北大学大学院理学研究科化学第二専攻前期課程 修了
学位論文題目	化学修飾による絹フィブロインタンパク質の機能改変 に関する研究
論文審査委員	主査 東北大学教授 宮下 徳治 東北大学教授 宮野 壮太郎 東北大学教授 野澤 庸則

## 論文内容要旨

### 第1章 序論

本章においては最初に本研究の背景として、研究対象の繊維性構造タンパク質である絹フィブロイン(SF)について一次構造と高次構造の関係から概説し、SFを用いたバイオマテリアルなどの非繊維分野でのこれまでの研究例について述べた。

SFは可溶性のSilk I型構造から不溶性のSilk II型の逆平行 $\beta$ シート構造に容易に構造転移することや、ゲル・膜・粉末などいろいろな形態で利用できる物理的利点を持つが、生化学的機能の多様性に欠けるため、SFそのものを利用してのバイオ分野への応用には限界がある。それゆえ本研究では、SFの機能や特性を多様化させる手段として構成アミノ酸残基への選択的化学修飾並びに機能性分子による化学修飾を選択し、得られた修飾SFの生物学的機能の評価を行うことで修飾SFのバイオマテリアルとしての応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

### 第2章 1,2-シクロヘキサンジオンを用いた絹フィブロインのアルギニン残基への選択的化学修飾

SFを細胞培養基質に用いた場合、コラーゲンに匹敵する線維芽細胞の付着・増殖性を示すことが知られている。一方、細胞の表面は糖鎖によって全体として負に荷電していることから、SFの正荷電を持つアルギニン残基が細胞との相互作用に寄与していると推定される。以上の理由からSF中の含有率が低いながらもアルギニン残基に注目し、SFの改質方法として本章では1,2-シクロヘキサンジオン(CHD)を用いたアルギニン残基への選択的化学修飾の検討を行った。そして得られた修飾SFの高次構造の変化や、フィルム状にした場合の修飾の安定性についても調べた。

原料としてSFの繊維を臭化リチウム水溶液に溶解して作製した可溶化状態の再生SFを用いた。最初にホウ酸緩衝液中CHDを用いた化学修飾の検討を行った(図1)。この修飾SFフィルムのPBSリン酸緩衝液(pH 7.4, 37°C)中での安定性を調べたところ、40時間後に64%の修飾の脱離が観測され修飾が不安定であることが示された。そこで別の修飾法として、スピロ化合物が形成されるアルカリ条件下CHDによるアルギニン残基の化学修飾を行った(図2)。このアルカリ条件下修飾SFフィルムではPBS緩衝液100時間の浸漬後も修飾の脱離はほとんど観測されず、修飾が安定であることが明らかになった。

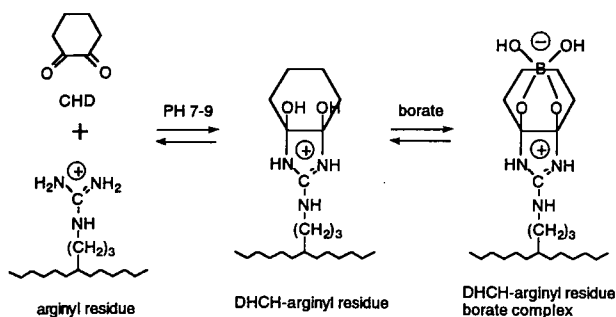


図1 ホウ酸緩衝液中 1,2-シクロヘキサジオン (CHD)とアルギニン残基の反応

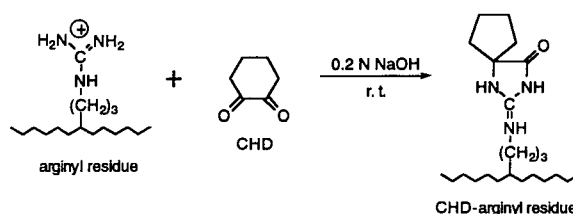


図2 アルカリ条件下 CHD とアルギニン残基の反応

### 第3章 両親媒性高分子ポリエチレングリコールによる絹フィブロインの化学修飾

両親媒性で生体不活性な高分子ポリエチレングリコール (PEG) で化学修飾すると、タンパク質では活性を保ったまま免疫原性が低下し、材料表面では親水化されて細胞非接着性に改変されることが知られている。こうした背景から、本章では SF の機能改変の方法として化学修飾による SF への PEG の導入を行い、得られた PEG 修飾 SF の化学構造と高次構造の解析を行った。

反応活性部として塩化シアヌルを持ち分子量 5,000 の PEG 鎖を 1 本持つ塩化シアヌル活性化 PEG (actPEG1) (図 3) を用いて、氷冷下ホウ酸緩衝液 (pH 9.4) 中で可溶化再生 SF の化学修飾を行って、PEG 修飾 SF (PEG1-SF) を得た。PEG1-SF の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルから PEG 鎖の導入を確認し、スペクトルのピーク積分値から PEG1-SF 中に約 70 wt % の PEG が含まれていることを明らかにした。また PEG1-SF の NMR スペクトルで SF 中に比較的含有量の多いチロシン残基 (5 mol %) の芳香族水素のピークが低磁場シフトしていることから、チロシン残基が actPEG1 の塩化シアヌル部分のトリアジン環に隣接し、actPEG1 との反応サイトであることを見出した。一方修飾前後の SF のアミノ酸分析の結果から、SF のリシン残基とヒスチジン残基も修飾剤との反応サイトと推定した (図 4)。

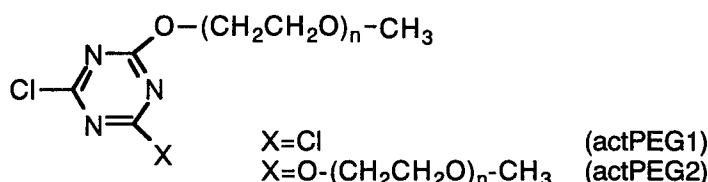


図3 塩化シアヌル活性化ポリエチレングリコールの構造式

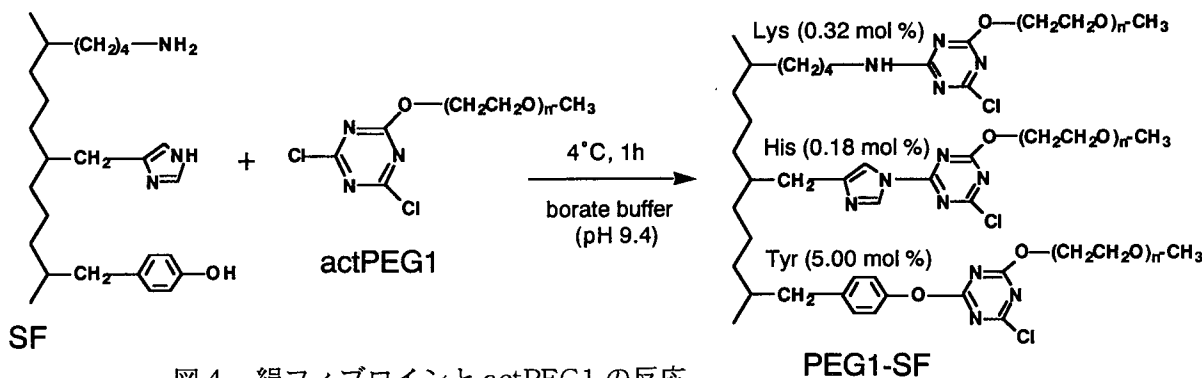


図4 絹フィブロインと actPEG1 の反応

PEG1-SF フィルムの CD 及び IR スペクトルから、PEG1-SF の SF 分子は逆平行βシート構造をとることが示されたが、X 線回折曲線からかさ高い PEG 分子の導入によってβシートを形成する SF の

近接分子鎖間のパッキングが乱れていることが判明した。PEG1-SF フィルムの DSC 測定と昇温下での偏光顕微鏡観察で求められた PEG1-SF の PEG 融解温度から、固相における PEG と SF の相溶性は低く相分離していると考えられ、PEG 分子が SF 層の上下に伸びて PEG 富化層を形成していると推定した。また引張試験で PEG1-SF は SF に比べて破断伸長率が増加し、逆に破断強度が低下した結果も、柔らかな PEG 富化層によって SF 層間の滑りが起こり易くなっていることで説明される。以上の結果から PEG1-SF フィルムの高次構造として、逆平行 $\beta$ シート構造をとる SF 層の上下に PEG 富化層が重なった積層構造を推定した (図5)。

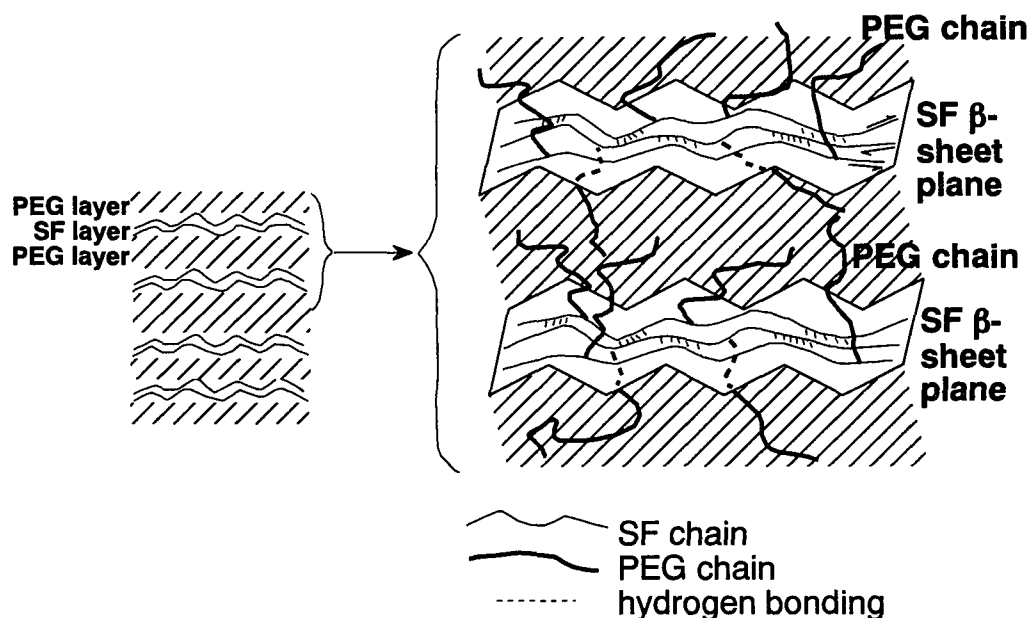


図5 PEG1-SF フィルムの高次構造

#### 第4章 塩化シアヌルをスペーサーに用いた機能性オリゴ糖による絹フィブロインの化学修飾

タンパク質を多糖で修飾すると、その溶解性・耐熱性・構造安定性が増加するなど物理化学特性が向上することが知られている。一方、近年の糖鎖生物学の進展により、細胞膜や細胞壁の表層にあるオリゴ糖や多糖が生物相互の認識機能や接着に深く関わっていることが明らかにされている。それゆえ、本章では生物的機能を持つオリゴ糖や分子認識の機能団となりうるオリゴ糖を用いて、SF の化学修飾を行った。なお、オリゴ糖と SF を結合させるためのスペーサーとして、前章で SF 中の含有量が比較的多いチロシン残基と反応することを見出した塩化シアヌル (CY) を用いた。

オリゴ糖として *N*-アセチル-D-グルコサミンのオリゴマーで抗感染症効果や抗腫瘍活性を示すキチンオリゴ糖 (NACOS)、D-グルコサミンのオリゴマーで抗菌性を示すキトサンオリゴ糖 (COS)、肝細胞表面のレセプターによって認識される $\beta$ -ガラクトース残基を有するラクトース (Lac) を選択した (図6)。氷冷下で pH 9 に調製しながらオリゴ糖と CY を反応させることで修飾剤となるオリゴ糖のトリアジニル誘導体を合成し、これに再生 SF を加えて 37°C, pH 9 で反応させると修飾剤のトリアジン部分と SF のアミノ酸残基が結合して、目的のオリゴ糖修飾 SF が合成される (図7)。一方、モデル化合物としてモノマーユニットの単糖を用い、モデル化合物と CY の反応生成物の NMR スペクトルから、修飾剤及びオリゴ糖修飾 SF の化学構造を推定した。またオリゴ糖修飾 SF の糖含有量を求め、その化学組成を明らかにした。複合体の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルとアミノ酸分析から、SF のチロシン残基とリシン残基が修飾剤との反応サイトであることも確認した。

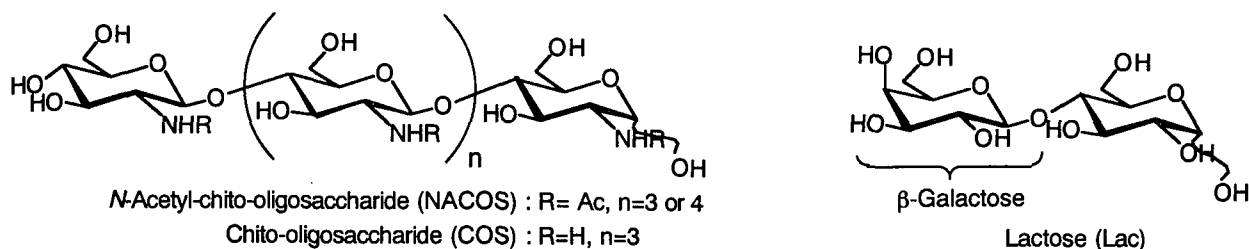


図6 機能性オリゴ糖の構造式

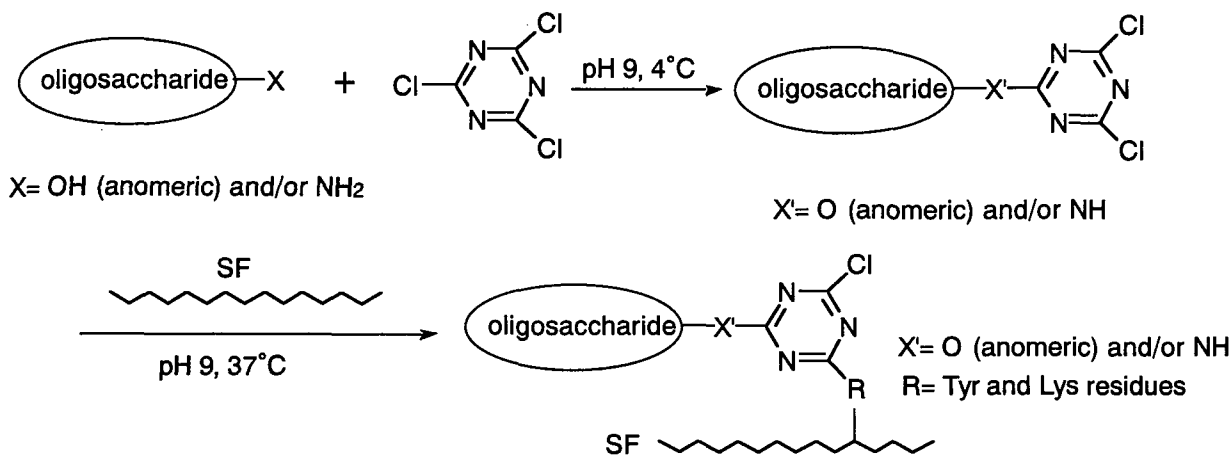


図7 塩化シアヌルをスペーサーに用いた機能性オリゴ糖修飾絹フィブロインの合成

## 第5章 バイオマテリアルへの応用をめざした修飾絹フィブロインの機能評価

本章においては第2～4章で得られた修飾 SF の生物学的機能評価を行い、修飾 SF の新しいバイオマテリアルとしての可能性について述べた。

第2章の研究からアルカリ条件下 CHD による修飾で SF のアルギニン残基が安定に修飾されることが明らかにされたので、この修飾法を用いて再生 SF と蚕の絹糸腺から抽出して得た絹糸腺 SF のアルギニン残基を 0, 50, 100%修飾し、得られた修飾 SF 試料から作製した培養基質上でマウス由来線維芽細胞の培養を行った。17 時間培養後の初期付着を調べたところ、100%アルギニン残基を修飾した再生 SF は他の試料と比較して低い付着量を示した。しかしながら、50 時間培養後の細胞増殖量では試料間に有意差が見られず、長時間の培養では修飾の影響は小さいと推定した。この結果から、CHD 修飾によるアルギニン残基の正荷電のマスクで SF を細胞非接着性に変えることは困難であり、SF の荷電状態以外の表面の親疎水性や表面形態などが細胞の付着・増殖性に影響していると推定される。

SF への PEG 鎖の導入による線維芽細胞の付着・増殖性の変化を調べた。ここでは分子量 5,000 の PEG 鎖を 2 本持つ塩化シアヌル活性化 PEG (actPEG2) (図3) で修飾された SF (PEG2-SF, PEG 含有量 67 wt %) を培養基質に用いた。PEG2-SF では SF とは対照的に細胞の初期付着・増殖はほとんど観測されず、またわずかに付着している細胞の形態も糸状足を伸ばさず塊状であった。修飾前後の SF フィルムの含水率と水に対する接触角の測定から、PEG 鎖の導入による親水性の増加が SF の細胞付着・増殖能を低下させた原因と推定した。PEG2-SF のような線維芽細胞非接着性の素材は抗血栓性材料や臓器の癒着防止膜への応用が期待される。

β-ガラクトース残基を持つラクトース修飾 SF (Lac-CY-SF) へのラット肝細胞の接着性について検討を行った。Lac-CY-SF や SF でコートされた培養ディッシュを培養基材とし、コントロールとしてコラーゲンコート培養ディッシュを用いた。SF はコラーゲンと比較してかなり低い接着量を示し、また未処理ディッシュと比較しても低い接着量を示すことから、SF そのものは肝細胞の接着を阻害すると考

えられる。一方、Lac-CY-SF ではコラーゲンへの接着量に近い値を示し、肝細胞によって認識される $\beta$ -ガラクトース残基を介して肝細胞が接着したと考えられる。このような Lac-CY-SF の肝細胞接着性は、Lac-CY-SF が肝細胞の培養基質になりうることを意味する。

抗菌性オリゴ糖であるキトサンオリゴ糖 (COS) との複合化による機能発現として、COS 修飾 SF (COS-CY-SF) の大腸菌に対する増殖抑制作用を調べた。0.7% (w/v)濃度の SF では試料無添加のコントロールと同様経過時間に比例して大腸菌は増加し、抗菌活性は見られなかった。一方、COS は 0.5% (w/v)以上の濃度で、COS-CY-SF は 0.6% (w/v)以上の濃度で培養開始 4 時間後から増殖抑制効果が現れ始め、ともに 24 時間後も増殖抑制効果が持続した。この結果から、導入した正荷電を持つ COS によって SF に大腸菌増殖抑制作用が付与されたことが明らかにされた。COS-CY-SF はフィルムに成形できることから、創傷被覆材などへの利用が期待される。

## 第 6 章 総括

本研究では SF の生化学的機能や特性を多様化させる手段として化学修飾を行い、得られた修飾 SF の機能評価を行った。その結果、アルギニン残基の修飾では機能改変効果は見られなかったが、ポリエチレングリコールによる修飾で SF は線維芽細胞非接着性に改変され、機能性オリゴ糖による修飾では肝細胞接着性や細菌増殖抑制作用が付与されたことを明らかにした。そして修飾 SF が新しいバイオマテリアルとして期待できることを示した。

## 審査結果の要旨

近年、構造タンパク質の一定のアミノ酸配列が特徴ある高次構造を導きその物性を制御していることが明らかにされるにつれ、構造タンパク質の重要性が認識され、構造タンパク質を利用したバイオマテリアルの設計が行われているが、これまでの研究事例は多くない。

本論文は、繊維性構造タンパク質である絹フィブロインの構造特性や物性を利用しながらも生化学的機能や特性を多様化させる手段としてアミノ酸残基への化学修飾を行い、得られた修飾絹フィブロインの生物学的機能評価を行うことで、修飾絹フィブロインの新しいバイオマテリアルとしての応用の可能性を明らかにしたもので、全編6章からなる。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的について述べている。

第2章では、絹フィブロインの特定アミノ酸残基への選択的修飾として、1, 2-シクロヘキサジオンによるアルギニン残基の修飾を検討し、スピロ化合物が形成されるアルカリ条件下の修飾で絹フィブロインのアルギニン残基が安定に修飾されることを明らかにしている。

第3章では、両親媒性高分子ポリエチレングリコールによる化学修飾として塩化シアヌル活性化ポリエチレングリコールによる絹フィブロインの修飾を行い、NMR 測定やアミノ酸分析の結果から絹フィブロインの反応サイトがチロシン・リシン・ヒスチジン残基であることを示している。これは広く使用されている市販の修飾剤塩化シアヌル活性化ポリエチレングリコールに対するタンパク質の反応サイトを明らかにしたものと重要な知見である。またポリエチレングリコール修飾絹フィブロインフィルムの分光学的・熱的測定及び物性測定から、高次構造として逆平行 $\beta$ シート構造をとる絹フィブロイン層の上下にポリエチレングリコール富化層が重なった積層構造をとることを考察している。

第4章では、第3章で得られた知見をもとに、絹フィブロイン中の含有量が比較的多いチロシン残基と反応することを見出した塩化シアヌルをスパーサーに用いて、キチンオリゴ糖・キトサンオリゴ糖・ラクトースの3種類の機能性オリゴ糖による絹フィブロインの化学修飾を行っている。これは絹フィブロインと機能性オリゴ糖の化学的複合化を行った点で重要な成果である。

第5章では、第2～4章で得られた修飾絹フィブロインのバイオマテリアルとしての応用の可能性を明らかにするため、その生物学的機能の評価を行っている。ポリエチレングリコールによる修飾で線維芽細胞非接着性に改変され、ラクトースによる修飾で肝細胞接着性が付与され、キトサンオリゴ糖による修飾で細菌増殖抑制作用が付与されたことを明らかにし、修飾絹フィブロインが新しいバイオマテリアルとして期待されることを示している。これらは化学修飾による機能改変効果を実証した点で重要な成果といえる。

第6章では、本研究で得られた成果を総括している。以上要するに本論文は、絹フィブロインをバイオマテリアルに用いるため生化学的機能や特性を多様化させる手段として化学修飾を行い、機能改変効果を実証したもので、高分子化学および材料化学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。