

氏 名	タ タイン バン Ta Thanh Van
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 196 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 材料科学専攻
学位論文題目	Studies on Binding of Heparin and Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase : Role of Sulfate Groups of Heparin (ヘパリンとフラクトース 1,6・ビスホスフェートアルドラーゼの結合様式に関する研究—ヘパリンの硫酸基の役割—)
審 査 委 員	(主査) 教 授 原 三 郎 教 授 梶 原 莞 爾 教 授 伊 倉 宏 司

論 文 内 容 の 要 旨

ヘパリンは血液凝固系タンパク質、細胞増殖因子、その他多種多様なタンパク質と相互作用し、様々な活性を示す。申請者はヘパリンと相互作用するウシ脳内タンパク質を検索し、フラクトース 1,6-ビスホスフェートアルドラーゼ (FPA) がヘパリン結合タンパク質として挙動することを見だし、両者の相互作用の機構、特にヘパリンの硫酸基の部位特異性を解明するとともに、酵素活性の阻害様式を明らかにした。

第 1 章、ヘパリンは硫酸化されたグリコサミノグリカンで、その構造は複雑かつ不均一である。しかし、その多くの部分は、1,4 位で結合する 2-O-硫酸化された α -イズロン酸残基と 1,4 位で結合する 6-O-硫酸化および 2-N-硫酸化された α -グルコサミン残基が交互に反復した比較的規則的な構造部分を形成している。ヘパリン上の 2,6 および N 位の硫酸基に着目し、これらの硫酸基を部位特異的に除去することにより、6-脱硫酸化、2-脱硫酸化、N-脱硫酸化 (N-アセチル化)、2,6-脱硫酸化、2N-脱硫酸化 (N-アセチル化)、6N-脱硫酸化 (N-アセチル化) した、すなわち部位特異的に脱硫酸化したヘパリンを調製した。また、これらの部位特異的脱硫酸化ヘパリンをリガンドとするアフィニティカラムを調製した。

第 2 章、ウシ脳抽出液をコンドロイチンポリ硫酸カラムに通し、非吸着画分をさらにヘパリンカラムにかけてヘパリン吸着性画分を得た。吸着画分の分析の結果、FPA が含まれ、本酵素がヘパリン結合タンパク質であることを明らかにした。ついで、6-O-脱硫酸化ヘパリンカラムに FPA を吸着させ、さらに Mono Q および Superdex カラムにより FPA の 4 量体イソフォームである A4、A3B1、A2B2、A1B3 および B4 の 5 種類の FPA テトラマーの精製に成功した。

第 3 章、種々のグリコサミノグリカンおよび部位特異的脱硫酸化ヘパリンをリガンドとするアフィニティカラムを調製して、生理的条件下における FPA の結合能を調べた。ヘパリン以外のグリコサミノグリカンに FPA は結合せず、FPA がヘパリンに特異的に結合することを明らかにした。また、ヘパリンの硫酸基のうち N 位の硫酸基が結合にもっとも重要で、6 および 2 位の硫酸基の寄与は N 位の硫酸基よりやや小さいがほぼ同程度に寄与していることを明らかにした。さらに、ヘパリンカラムへの FPA の結合のグリコサミノグリカンや修飾ヘパリンによる阻害実験により、このことを実証した。

第 4 章、ヘパリンと FPA との結合による酵素活性への影響を調べた。FPA の反応系にヘパリンを共存させると酵素活性は低下し、明らかに阻害された。酵素反応の動力学的測定により阻害機構が混合型であ

ることを示し、FPA へのヘパリンの結合は活性中心への結合にとどまらず、酵素タンパク質上の様々な部位への結合であることを明らかにした。FPA の阻害に必要なヘパリンの重合度を調べ、一番分子量の小さいテトラマーでも FPA を阻害し、重合度が大きいほど阻害力は大きく、ヘキサデカマーでも天然のヘパリンと同程度の阻害をすることはできなかった。すなわち、FPA の阻害にはかなり高分子量のヘパリンオリゴサッカライドを必要とし、ヘパリンが FPA と結合する範囲はかなり広いと推定した。

結論. FPA がヘパリン結合タンパク質であることを見だし、ヘパリンに特異的に結合することを明らかにした。また、両者の結合は単なる結合だけではなく、FPA の酵素活性を阻害し、ヘパリンは FPA のインヒビターであることを証明した。両者の結合には、ヘパリンの 2,6 および N 位の硫酸基の全てが関与しているが、とくに N 位の硫酸基が結合に重要であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

生体において重要な生理活性を示すヘパリン結合性タンパク質は多数見いだされており、両者の相互作用の解明に多くの研究者がしのぎを削っている。その中で、新たなヘパリン結合タンパク質として FPA を発見したことは、FPA の新たな生理的役割を明らかにする端緒となるものである。FPA が解糖系の重要酵素であるが故に、今後の展開に期待が持てる。申請者の研究成果はヘパリンと FPA の相互作用の生理学的意義の解明にはいたっていないが、両者の結合におけるヘパリンの 2,6 および N 位の硫酸基の関与、とくに N 位の硫酸基の重要性の解明、ヘパリンによる FPA の阻害特性の証明、FPA に結合するヘパリン糖鎖の鎖長の推定など、FPA の新たな生理的役割解明の基礎的知見を提示しており、生命現象の解明に貢献するものと判断される。

本論文の内容の一部は以下の学術雑誌に公表されている。

1. Structural Requirements of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) and Heparin for TFPI-Heparin Interaction
Zhiyi Ye, Ryo Takano, Kaeko Hayashi, Thanh-Van Ta, Hisao Kato, Yuichi Kamikubo, Yo Nakahara, Kosuke Kumeda, Saburo Hara
Thromb. Res. (1998) 89, 263-270
2. Heparin: Its Interaction with Proteins
Thanh-Van Tan
Journal of Medical Research (1998) 6(2), 69-72
3. Specific 6-O-Desulfation of Heparin
Ryo Takano, Zhiyi Ye, Thanh-Van Ta, Kaeko Hayashi, Yutaka Kariya, and Saburo Hara
Carbohydr. Letters (1998) 3, 71-77
4. Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase Is a Heparin-Binding Protein
Thanh-Van Ta, Ryo Takano, Kaeko Kamei, Xin-Yan Xu, Yutaka Kariya, Keiichi Yoshida, and Saburo Hara
J. Biochem. (1999) 125, 554-559
5. Affinity of Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase to Glycosaminoglycans
Thanh-Van Ta, Ryo Takano, Kaeko Kamei, Xin-Yan Xu, Xiaofeng Wu, Yutaka Kariya, Keiichi Yoshida, and Saburo Hara
Carbohydr. Letters (1999), (in press)