氏　　　　　名	徐　新顔
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学 位 記 番 号	博甲第２６６号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第３条第３項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科　機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	New approaches for the analysis of interaction of heparin and heparin binding proteins using the evanescent wave biosensor
審 査 委 員	(主査) 教 授 原　三郎 教 授 梶原 莞爾　　教 授 伊倉 宏司 講 師 高野　良

論文内容の要旨

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは細胞表面や基底膜などを含む細胞外マトリックスに存在し、その糖鎖部分であるヘパラン硫酸（ヘパリン）は非常に多くのタンパク質、例えば細胞増殖因子、細胞接着因子、血液凝固関連タンパク質などと結合する。その相互作用を介して、細胞の増殖、分化、接着、さらに発生における形態形成の制御、血液凝固、腫瘍細胞の悪性化など種々の生命現象に深く関わっている。ヘパラン硫酸およびヘパリンは硫酸化された多糖であり、基本構造はイズロン酸とグルコサミンの２糖繰り返し構造である。しかし、イズロン酸はグルクロン酸に置換されている部分があり、さらに糖の水酸基（グルコサミンの６位と３位、イズロン酸の２位）には不規則に硫酸基が結合しており、グルコサミンのアミノ基（N位）は硫酸化またはアセチル化されているなどヘパリンは無限とも言える異なった構造の分子種の集団である。

ヘパリンとタンパク質との相互作用には、不規則な配置中の特定の組み合わせで配置された硫酸基が、タンパク質の塩基性アミノ酸と静電的相互作用することが重要である。医療の現場ではヘパリンは抗血液凝固剤として心臓手術や腎臓透析の際に使用されている。しかし、ヘパリン中の硫酸基の配置は無限とも言える組み合わせのため、例えば、ヘパリンを抗血液凝固剤として使用した場合、血液凝固関連タンパク質以外のタンパク質と過剰に反応し、種々の副作用が発生すると考えられている。したがって、ヘパリンの医療への応用を考える上で、各々のタンパク質との相互作用に関与しているヘパリン中の硫酸基の配置を知ることは必要不可欠である。

本研究は、エバネッセント波バイオセンサーを用いてヘパリンとタンパク質の相互作用に関与している硫酸基を決定する方法を開発した。さらに、ヒト酸性繊維芽細胞増殖因子、ヒト外因系血液凝固阻害因子、ヒト血小板第４因子に本方法を適用し、ヘパリンとの相互作用に関与している硫酸基を解析した。

本論文は、序章、３つの章、総括から構成される。

第１章では、位置選択的脱硫酸化法を用いて、ヘパリン中の特定の位置の硫酸基（６位、２位、N位）を脱離させた。続いて、エバネッセント波バイオセンサーのセンサーチップに位置選択的脱硫酸化ヘパリンを固定化する方法を開発した。エバネッセント波バイオセンサーはセンサーチ

ップ（固相）上にリガンドを結合させた後、リガンドと相互作用する物質を添加する。添加物質がリガンドと結合した場合のセンサーチップ上の変化をエバネッセント波で検出し、リガンドと結合物質の間の相互作用をリアルタイムで解析する方法である。まず、バイオセンサーのリガンドとしてヘパリンをセンサーチップ上に固定化する方法を検討した。多糖であるヘパリンは一般的な方法ではセンサーチップへの固定化量が少なく、タンパク質との相互作用を解析できるほどの感度が得られない。固定化方法を検討した結果、①センサーチップ上のカルボキシメチルデキストランにグリコールキトサンを結合、②ヘパリンの還元末端にアミノ基を導入、③グリコールキトサンのアミノ基とヘパリンに導入したアミノ基をグルタルアルデヒド基で架橋する方法を開発した。本方法では、グリコールキトサンを多価のリンカーとして用いることで、センサーチップ上に多分子のヘパリン導入することに成功した。

続いて、本方法がヘパリンとタンパク質の相互作用の解析に適用できるかどうかを検証するために、ヘパリンとの相互作用が詳細に解析されているヒト塩基性繊維芽細胞増殖因子および酸性繊維芽細胞増殖因子を用いて、センサーチップ上に固定化した位置選択的脱硫酸化ヘパリンとの相互作用を解析した。その結果、本方法はヘパリンとタンパク質の相互作用の解析に適用できることを明らかにした。

第２章、第３章においては、ヒト外因系血液凝固阻害因子およびヒト血小板第４因子とヘパリンとの相互作用を解析した。その結果、ヒト外因系血液凝固阻害因子およびヒト血小板第４因子の場合は、いずれもヘパリン中のすべての硫酸基（６位、２位、N位）の硫酸基との相互作用が認められた。しかし、ヒト血小板第４因子の場合はわずかに２位の硫酸基の関与が小さいことが明らかとなった。

さらに、タンパク質との相互作用に必要なヘパリンの長さを決定するために、ヘパリンを部分Ｎ脱硫酸化後、亜硝酸ナトリウムにより分解し、いろいろな鎖長のヘパリンオリゴマーを得た。さらに、ゲル濾過を繰り返し、ヘパリンオリゴマーを精製した。ヘパリンオリゴマーを用いて、エバネッセント波バイオセンサーおよびアフィニティークロマトグラフィーによる解析を行い、ヒト外因系血液凝固阻害因子およびヒト血小板第４因子との相互作用に必要なヘパリン鎖長を決定した。

以上の研究結果より、ヘパリンとタンパク質の相互作用の解析方法を確立した。本方法により、特定のタンパク質を認識するヘパリンの調製を効率よく行うことが可能となることから、ヘパリンを医療に用いる際の副作用の軽減および効果的な使用に結びつくと考えられる。

論文審査の結果の要旨

動物組織に含まれるヘパリンおよびヘパラン硫酸は様々な生理活性に直接関与する重要な多糖体である．これらの２種類の多糖体は基本的に類似の糖鎖構造を持ち，糖の水酸基およびアミノ基が硫酸化されている．全体として両者は類似構造をしているが，部分的に見ると変化に富んだ複雑な構造を持つ．ヘパリンやヘパラン硫酸が実に多様な生理活性を示すのは，この分子内構造変化に起因している．本論文はヘパリンおよびヘパラン硫酸とこれに結合することにより生物活性を示すタンパク質との相互作用を解析し，硫酸基の位置特異性とその役割を解明する新しい方法の開発に関するものである．

ヘパリンおよびヘパラン硫酸は酵素のように活性を示したり，分光学的な変化を示さないため，

タンパク質との相互作用の解析ははなはだ困難である．申請者は，近年急速に発達した生体分子相互作用解析装置（エバネッセント波バイオセンサー）をその解析に応用した．しかし，解析に必要な情報を得ることができる十分量の多糖体をセンサーチップに結合させることが困難であったので，数段階の化学反応を行うことにより多量のヘパリンを結合させるに成功した．これにより，エバネッセント波バイオセンサーによる解析は容易になった．申請者が開発した方法はすでに国際的に使用され始めており，多糖体とタンパク質の相互作用の解析方法として標準的な地位を占めるものと考えられる．

以上の方法とヘパリンの硫酸基の部位特異的脱硫酸化法を組み合わせて，ヘパリン結合性タンパク質とヘパリンとの相互作用を解析した．まず，ヒト酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子とヘパリンの硫酸基の部位特異性を解析し，別の方法で明らかにされていた硫酸基の部位特異性と完全に一致する結果を得た．また，ヒト外因系血液凝固阻害因子およびヒト血小板第４因子について調べ，新たな知見を得ている．これらの研究により，申請者が開発したセンサーチップへの多糖体の新規結合方法の有効性を証明した．さらに申請者はヘパリンオリゴサッカライドをセンサーチップに同様の方法で結合し，ヒト外因系血液凝固阻害因子およびヒト血小板第４因子との結合に必要なヘパリンの糖鎖長を決定した．これらの生理活性タンパク質の活性発現に必要なヘパリンの糖鎖長が明らかにになったことにより，これらのタンパク質の活性制御法の開発への道を開いた．また，本論文で示された多糖体とタンパク質の相互作用機構解明の方法は，今後様々な分野で利用されると予想される．

以上の通り，本論文は新規性に富んでおり，博士論文としての価値を有すると判断できる．本論文の内容の一部は、以下に示す２つの国際的学術雑誌に公表されている。

1. Kaeko Kamei, Xiaofeng Wu, Xinyan Xu, Kazuhiro Minami, Nguyen Tien Huy, Ryo Takano, Hisao Kato, and Saburo Hara, The analysis of heparin-protein interactions using evanescent wave biosensor with regioselectively desulfated heparins as the ligands. Analytical Biochemistry, 295, pp. 203-213 (2001)

2. Xinyan Xu, Ryo Takano, Yoshihisa Nagai, Tadatoshi Yanagida, Kaeko Kamei, Hisao Kato, Yuichi Kamikubo, Yo Nakahara, Kosuke Kumeda, and Saburo Hara, Effect of heparin chain length on the interaction with tissue factor pathway inhibitor (TFPI). International Journal of Biological Macromolecule, in press