

氏 名	佐々木 善 浩
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 1848 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 23 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 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Controlled Association between Proteins and Hydrophobized Polysaccharide (疎水化多糖と蛋白質との会合制御に関する研究) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 砂 本 順 三 教 授 田 中 渥 夫 教 授 今 中 忠 行

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、疎水化多糖と蛋白質との会合制御について超分子化学の観点から検討した結果を序文と結言に加えて3章に亘って述べている。得られた成果は以下の通り要約される。

第1章では、 β -シクロデキストリン (β -CD) による疎水化多糖の会合制御について述べている。水溶性のプルランに疎水性のコレステロール基をグラフト状に導入したコレステロール基置換プルラン (CHP) は水中で自発的に会合し分子集合体を形成する。このCHP集合体に β -CDを添加すると、CHP集合体が未修飾のプルランとほぼ等しい形にまで解離させることを、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および動的光散乱測定より明らかにした。またこの解離は、 β -CDの分子認識によるコレステロール基の選択的な包接により、コレステロール基間の疎水的な会合によって形成されているCHP集合体の架橋ドメインが崩壊することによるものであることをNMR測定により示した。さらに、上記のCHP/ β -CD混合溶液に、 β -CDと選択的に非常に強く相互作用するアダマンタンガルボン酸 (ADC) を添加すると、CHPは再び自己会合し集合体を形成することも明らかになった。 β -CDに対する、ADCとコレステロール残基間の分子認識の差を利用して超分子の集合系を可逆的に制御することに成功した。

第2章では、熱変性した蛋白質とCHP集合体との会合挙動について検討を行っている。モデル蛋白質であるcarbonic anhydrase B (CAB) を55℃以上に加熱すると凝集体形成により溶液は白濁する。CHP集合体はこのような不可逆的な凝集体形成を効率的に抑制することを光散乱測定より明らかにした。このとき、CHP集合体は熱変性したCABのみと定量的に複合体を形成していることをSEC測定および円偏光二色性スペクトル測定からの結果より実証した。このCHP/CAB複合体に β -CDを添加することによりCHPを崩壊させると、複合化された状態では活性を有していないCABが100%バルクの溶液中に放出され、それに伴うCABのリフォールディングにより、その酵素活性をほぼ回復することをも見いだした。さらに、CHP/ β -CD/CABの三成分系により、CABの熱安定性を向上させる系を構築することにも成功した。 β -CD存在下、CHP集合体とCABを混合、溶液をCABの変性温度以上で加熱した後、室温まで冷却すると、CABはその酵素活性を約80%程度保持していた。この系の機構についてSECおよび円偏光二色性スペクトル測定により検討し、熱変性温度以上ではCHPとCABは複合体を形成して変性蛋白質の凝集を抑制していること、変性温度以下では、CABがCHPから自律応答的に解離し、その酵素活性が回復することを示した。疎水化多糖集合体と蛋白質との会合制御により、蛋白質の熱安定性を向上させることに成功した。この熱安定性機構は天然の熱ショック蛋白質による熱安定化の機構と類似している。

第3章では、生体内で合成された蛋白質が機能を有する立体構造へ折り畳まれる過程 (フォールディング過程) に関与している分子シャペロンの機能をCHP集合体により、シミュレートすることを目的として、CHP集合体とリフォールディング中間体との会合挙動を検討している。高濃度の変性剤 (塩酸グアニジンまたは尿素) による完全変性状態からのリフォールディング過程にあるCABとCHP集合体との複合化挙動を、SECにより評価した。CABのみではこのリフォールディング反応は完全には進行せず不活性な凝集体を生じるのに対し、CHP集合体存在下では完全にこの沈澱を防いだ。またこのと

きCHP集合体にCABがほぼ定量的に複合化されていることをSEC測定より明らかにした。また β -CD添加により、複合化されたCABをCHPから解離させることも見いだした。さらにCHP集合体が、蛋白質のフォールディングにおける中間体構造のモデルの一つと考えられているMolten Globule構造のapo α -Lactalbuminと選択的に複合体を形成することも発見した。以上の結果から、CHP集合体により蛋白質のフォールディング過程を人工的に再現できることを示した。また、この機能を利用したCHP集合体の薬物運搬体としての応用展開についても検討し、乳癌の抗原蛋白質（Herb 2）とCHP集合体との複合体が乳癌に対する人工ワクチンとして有用であることを動物実験によって示した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、疎水化多糖と蛋白質との会合制御について超分子化学の観点から研究した結果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下のとおりである。

- (1) 疎水化多糖の一種であるコレステロール基置換プルラン（CHP）は水中で自発的に会合しヒドロゲル微粒子（CHP集合体）を形成する。このCHP分子間の会合は β -シクロデキストリン（ β -CD）の添加により解離することを見出した。しかしこの系に更に、アダマンタンカルボン酸（ADC）を添加するとCHPは再び自己会合しヒドロゲル微粒子を形成することをも明らかにした。 β -CDに対する、ADCとコレステロール残基間の分子認識の差を利用して超分子の集合系を可逆的に制御することに成功した。
- (2) 熱変性したCarbonic anhydrase B(CAB) を、CHP集合体が選択的に複合化することを見出した。このとき、 β -CDを添加してCHP集合体構造を破壊することで、CABをCHP集合体から完全に解離させることを明らかにした。また、解離したCABはその酵素活性を完全に回復していることを実証した。さらにCHP/ β -CD/CABの三成分系により、CABの熱安定性を向上させる系を構築することにも成功した。これは天然の熱ショック蛋白質の機能のシミュレーションである。
- (3) CHP集合体が、塩酸グアニジンまたは尿素によってほぼ完全に変性した状態からの巻き戻り過程にある中間体を選択的に複合化すること、さらに複合化された蛋白質を活性を有する形に巻き戻しうることを実証した。この結果は、CHPにより蛋白質のフォールディング過程を人工的に再現できたことを意味する。また、この機能を利用したCHP集合体の薬物運搬体としての応用展開についても検討し、乳癌の抗原蛋白質とCHP集合体との複合体が乳癌に対する人工ワクチンとして有用であることを動物実験によって示した。

以上、本論文では、比較的単純な構造を有する疎水化多糖自己集合体と可溶性蛋白質との会合制御によって、天然の分子シャペロンの機能をシミュレーションしうることを示した。またその結果を、医療や蛋白質工学に応用できることも実証した。これらの研究成果は学術的にも実際のにも極めて有意義である。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成11年2月19日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。