

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

Development of novel glycopolymers which can be immobilized on the cellulose materials  
as multivalent ligands for medical use

(新規な多価リガンドとしての糖鎖高分子の開発と

セルロース材料への固定化による医療分野への応用)

氏名 宮川 淳

### 1. 概要

細胞表面の糖鎖は、様々な生理的、病理的な過程において、重要な役割を果たしている。生理活性糖鎖を有する糖鎖高分子は、新しい生体模倣やバイオメディカル材料であり、細胞培養や癌診断、ウイルスや毒素の捕捉など、多くの新規な手法を生み出している。この幅広い利用方法は、細胞や細菌、ウイルス表面で起こる糖鎖とタンパク質の相互作用によるものである。しかし、糖鎖リガンドとタンパク質の間の相互作用は、通常、mM 程度の解離定数の弱い結合親和性である。一方、多価の相互作用は、 $\mu\text{M}$  ~  $\text{nM}$  の解離定数を有する高い親和性を持ち、細胞表面で起こっている糖鎖リガンドの認識などで見られる。この効果は、“糖鎖クラスター効果”と呼ばれており、天然を模倣するためには、非常に重要である。本論文では、糖鎖高分子を利用した2種類の応用を報告する (Fig. 1)。

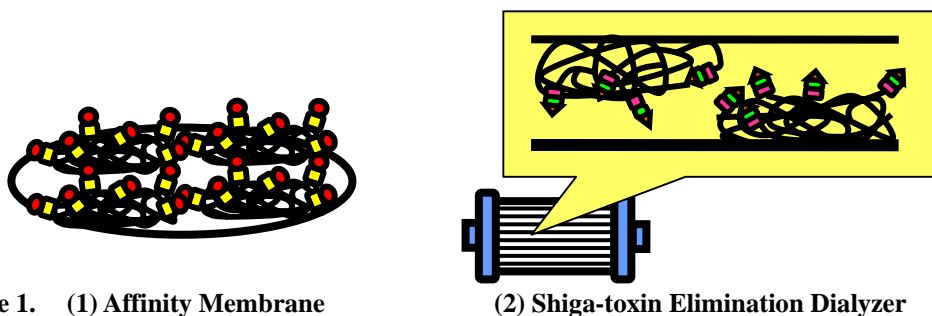


Figure 1. (1) Affinity Membrane

(2) Shiga-toxin Elimination Dialyzer

(1)ラクトース、またはマンノースを有する2種類の糖鎖高分子を合成し、固定化して、アフィニティーメンブランを作製した。高分子の構成要素は、新しい機能性モノマーを加えて、共重合する事で容易に変えることができ、新しい機能を高分子に導入できる。本研究では、この方法を用いて、アミノ基と蛍光ラベルを導入した糖鎖高分子を合成した。この固定化点と蛍光標識を有する糖鎖高分子は、セルロースメンブランに固定化し、糖鎖高分子の固定化を確認した。最後に、作製したアフィニティーメンブランのレクチン吸着能を評価した。

(2)病原性大腸菌 O157: E7 (STEC)に感染すると、出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群、さらに神

経障害まで引き起こす。STEC によって産生される志賀毒素(Stxs: Stx1, Stx2)は、腎臓の内皮細胞や赤血球細胞の細胞表面にあるグロボトリオシルセラミド(Gb3)に結合する。STEC に感染した患者は、抗菌剤または、透析によって治療されている。しかし、患者に対する抗菌剤の投与は、毒素を放出する可能性がある細菌には、必ずしも有効ではない。

そこで、本研究では、糖鎖高分子に基づく治療装置を開発した。最初にグロボ3糖構造を構築し、続いてアクリルアミド基を導入した。グロボ3糖、アミノ基を有する糖鎖高分子を合成し、ダイアライザー中のセルロース中空系に固定化された。この糖鎖高分子を固定化したダイアライザーは、様々な条件において、志賀毒素の吸着能を評価された。

## 2. 糖鎖高分子の合成

ガラクトースとラクトースを原料とし、1 段階のグリコシデーションにより、グロボ3糖構造を構築した。ラクトースを6段階の反応によりグリコシルアクセプターとし、ガラクトースを4段階の反応によりグリコシルドナーとした。得られたアクセプターとドナーを用いて、グリコシル化し、 $\alpha$ -グリコシド結合を形成した。その後、7段階の反応を経て、Gb3モノマーを得た (Fig. 2)。この Gb3 モノマーとアクリルアミドを異なった比率で共重合することにより、糖鎖高分子を合成した。

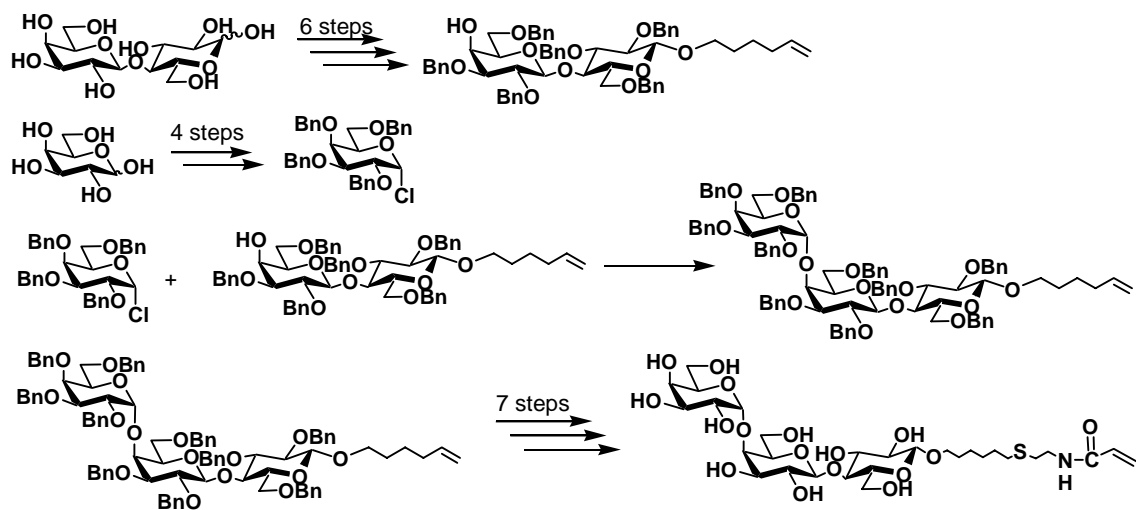


Figure 2. Synthesis of Gb3 Monomer

さらに糖鎖高分子をセルロース材料へ固定化を行うために、アミノ基を有するモノマーとダンシル基を有する蛍光モノマーを合成した (Fig. 3)。これらのモノマー3種とアクリルアミドを種々の比率で共重合することで、固定化でき、さらに蛍光を持つ糖鎖高分子を得た。

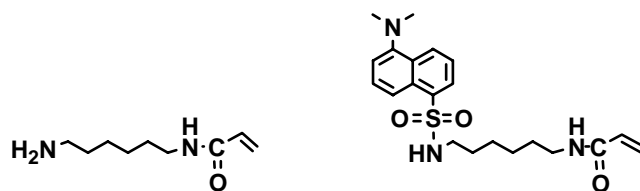


Figure 3. Amine Monomer

Fluorescence Monomer

### 3. アフィニティーメンブラン

糖鎖高分子を固定化するために、セルロースメンブランにカルボキシル基を導入することとした。セルロースを修飾する方法は、これまで多く開発されており、特にカルボキシルメチル化は、工業的にも利用されている方法である。セルロースメンブランをNaOH水溶液中、プロモ酢酸を用いて、カルボキシメチル化を行った。滴定により定量を行った結果、1枚当たり25  $\mu\text{mol}$  (1.32  $\text{nmol}/\text{mm}^2$ , 反応効率 3.5%) のカルボキシル基が導入されていることが分かった。このカルボキシメチル化されたメンブランを用いて、糖鎖高分子の固定化を行った。Gb3モノマーと同様の方法により、ラクトースモノマーとマンノースモノマーを合成した。続いて、アミンモノマーと蛍光モノマーを用いて共重合を行った。ラクトースとアミノ基、ダンシル基を持った糖鎖高分子を用いて、固定化の確認を行った。カルボキシメチル化メンブラン中のカルボキシル基と糖鎖高分子中のアミノ基を縮合剤を用いて、反応し、固定化を行った。反応後、そのメンブランにUVを照射すると、蛍光ラベル由来の発光を確認することができ、糖鎖高分子が固定化されていることが分かった (Fig. 4)。

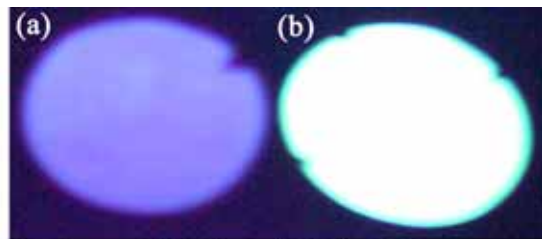


Figure 4. Luminescence of Membranes During Irradiation with a UV Lamp After Immobilization. (a) Glycopolymer Not Having Amino Group (b) Glycopolymer Having Amino Group

この反応条件を用いて、ラクトースとアミノ基を有する糖鎖高分子とマンノースとアミノ基を有する糖鎖高分子をそれぞれセルロースメンブランに固定化を行った。その結果、ラクトース、またはマンノースを有する糖鎖高分子は、それぞれメンブラン1枚当たり2.5  $\text{mg}$  (130  $\text{ng}/\text{mm}^2$ , 収率 100%), 1.9  $\text{mg}$  (100  $\text{ng}/\text{mm}^2$ , 収率 76%) 固定化された。この糖鎖高分子が固定化されたセルロースメンブランのレクチン吸着能評価を行った。レクチンは、ラクトースを認識するRCA<sub>120</sub>、マンノースを認識するConAを用いて行った。5枚のメンブランをフィルターホルダーにセットし、そこへレクチンを含む溶液 (200  $\mu\text{g}/\text{ml} \times 2 \text{ ml}$ ) を流して吸着させた。その後、PBS(-)で洗浄して、溶出液 (0.2 M sugar solution) を流し、吸着したレクチンを溶出した。それぞれの溶液中のレクチン量を定量することで、アフィニティーメンブランとしての吸着能を評価した。その結果、ラクトースを有する糖鎖高分子を固定化したメンブランは、使用したレクチン中、約 80%吸着し、また、マンノースを有する糖鎖高分子を固定化したメンブランは、使用したレクチン中、約 50%吸着したことが分かった (Fig. 5)。

ラクトースを有する糖鎖高分子を固定化したメンブラン、マンノースを有する糖鎖高分子を固定化したメンブラン、未修飾のメンブランを重ねて、レクチン吸着の選択性を評価した結果、認識される糖鎖が固定化されたメンブランにのみ、レクチンは吸着していることが分かった。故に、固定化しても特異性は維持され、選択的に吸着できることが分かった。

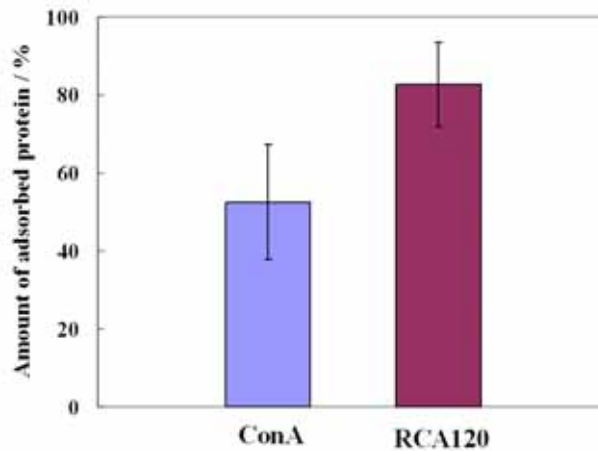


Figure 5. Amount of Adsorbed Lectins on the Membranes with Immobilized Glycopolymers. (Mannose for ConA and Lactose for RCA120).

#### 4. 糖鎖高分子固定化ダイアライザー

アフィニティーメンブラン同様、ダイアライザー中の中空系もセルロースからできている。そのため、中空系に対しても、セルロースメンブランで用いたカルボキシメチル化を行い、カルボキシル基の導入を行った。また、ダイアライザーは、プラスチック覆われているため、有機溶媒は用いることができず、このカルボキシメチル化は最適な方法であると考えられる。1 M NaOH 水溶液と飽和食塩水の1:1混合用液を透析器に流し、循環して、そこにプロモ酢酸を加えた。その後、十分に水で洗浄を行った。Gb3モノマー、アミンモノマー、アクリルアミドを種々の比率で共重合を行い、得られた糖鎖高分子をダイアライザーのセルロース中空系に固定化を試みると、20~30 mg (収率 50~75%)の糖鎖高分子が固定化された。これら糖鎖高分子が固定化されたダイアライザーの志賀毒素除去能を評価した。初めに、

1% BSA-PBS (-)溶液中での除去能を評価した。毒素濃度は、4 µg/ml、循環速度は、10 ml/minで行い、循環して10分、30分、1時間、2時間、4時間ごとにサンプリングを行った。これらサンプリングした溶液を希釈し、前培養したベロ細胞に加え、3日間インキュベートした後、細胞の生存率を求めた。コントロールとして、未修飾のダイアライザーを用いた。その結果、Gb3モノマーとアミンモノマーだけで共重合を行った糖鎖高分子を固定化しているダイアライザーは、10分循環させるだけで、ほぼ100%の毒素を吸着した。そこで、循環速度を人工透析の初期患者

に用いられている速度である120 ml/minにして行った結果、4時間循環することで100万分の1程度まで毒素を除去できた。また、毒素の濃度を薄めた40 ng/mlにおいても、同様の結果が得られ、毒素を特異的に糖鎖高分子が吸着し、除去していることがわかった。さらに、仔ウシ血清中においても、同様に毒素濃度を4 µg/ml及び40 ng/mlで行ったが、効果的に毒素を吸着し、除去していることが分かった。ゆえに、多くのタンパク質が存在している中でも、毒素を効果的に吸着し、除去できることが分かった。以上の結果から、この糖鎖高分子を中空系の内側に固定化したダイアライザーは、効果的に毒素を吸着し、除去する能力を有することが示された。

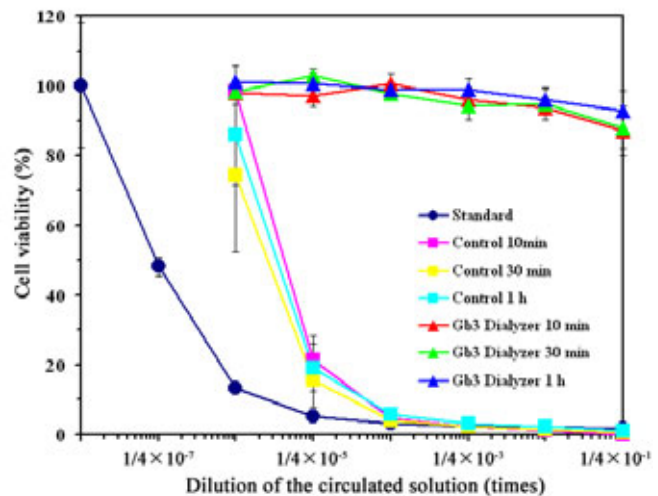


Figure 6. The evaluation of the Stx1 adsorption ability by dialyzers. (condition; Stx1 concentration 4 µg/ml, solvent 1% BSA-PBS(-), circulation rate 10 ml/min, mean ± SE, n=3)

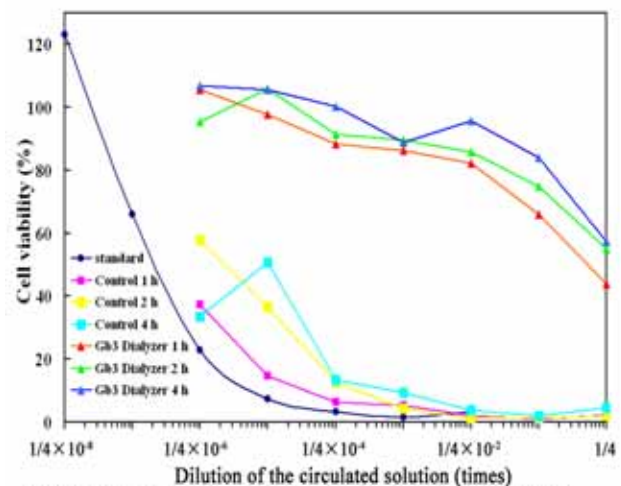


Figure 7. The evaluation of the Stx1 adsorption ability by dialyzers. (condition; Stx1 concentration 4 µg/ml, solvent FCS, circulation rate 120 ml/min, mean ± SE, n=3)

#### 4. 結論

本研究において、生理活性糖鎖を有する糖鎖高分子の合成及び、その利用を検討した。レクチンが認識する糖鎖として、ラクトース、またはマンノースを有する糖鎖高分子を合成した。セルロースメンブランへの固定化方法として、水溶液中で行える反応のみを用いて行い、簡便に固定化した。その結果、容易に短時間で吸着・分離することができるアフィニティーメンブランを開発した。

志賀毒素除去ダイアライザーは、グロボ3糖を有する糖鎖高分子をさらに機能化することで、ダイアライザー中のセルロース中空糸に固定化した。このダイアライザーは、これまでに有効な治療法がない病原性大腸菌 O157 感染の新しい治療方法として提案できる非常に高い志賀毒素除去能を示した。今回の評価では、*in vitro* での試験ではあるが、血清中でもその効果は十分なものであった。また糖鎖高分子を固定化して利用する際にも、高い選択性を維持している事が分かった。