氏　　名	岡　博之
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記号番号	博理工甲第 862 号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	蛍光性アミラーゼ基質の化学合成とその機能評価
論文審査委員	委員長　教　授　松岡　浩司
	委　員　教　授　西垣　功一
	委　員　准教授　石丸　雄大
	委　員　准教授　根本　直人

論文の内容の要旨

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく分析法は生化学分野、分子生物学分野をはじめとし、広く用いられている。FRET は化合物における、蛍光ドナーと蛍光アクセプター間の距離の同定のためにしばしば利用されている。糖質科学分野においても、タンパク質と糖との関係を解明するために、いくつかの FRET プローブが合成され、利用されてきた。

α- アミラーゼは､自然界に広く分布する酵素のひとつである。古くから工業的な用途で利用されてきたが、近年では医学的な観点からも注目されてきている。例えば、黒色皮膚ガンでは高シアリル化アミラーゼの高発現が認められる。他にも糖尿病をはじめとした各種疾患とアミラーゼアイソザイムとの関係も近年報告されている。一方、法医学、犯罪科学分野においては、アミラーゼは唾液、便及び膣分泌液証明のための指標として利用されている。

これまでに、いくつかのアミラーゼ基質がアミラーゼの機能を明らかにするために開発されているが、上記疾患のさらなる研究のためには様々なアミラーゼ基質の開発が望まれている。また、法医学、犯罪科学分野では、劣化した生体資料からのアミラーゼ検査となるため、従来法よりも高感度で特異性の高い検査薬の開発が望まれている。そこで、各種アミラーゼ関連疾患研究及び法医学、犯罪科学分野への展開を目標として、新規な蛍光性マルトオリゴ糖の合成法の確立及びその機能評価を本研究の目的とした。

第１章においては、上記の研究背景をイントロダクションとして紹介している。

第２章においては、α- アミラーゼの基質となる蛍光性マルトオリゴ糖の合成法について述べている。アミラーゼ基質の分子設計にあたり、FRET を引き起こす基質を選択した。蛍光性基質は非常に高感度に検出することが可能であるが、生体試料等に適用する際、生体試料由来成分によって、励起光が吸収され、蛍光強度の減衰等が起こる可能性がある。特にそのような問題は、陳旧資料や混合資料等を主として扱う、法医学分野では顕著である。それに対し、FRET に基づく蛍光性基質はターゲットとなる物質が存在してい

るとFRETが変化し、一方の蛍光強度が増大し、それと同時にもう一方の蛍光強度が減衰する。そのため、測定が非特異な反応が起こっていないかどうかのダブルチェックを兼ねており、より信頼性の高い検出が可能である。

蛍光性アミラーゼ基質として非還元末端にナフチルメチル基、還元末端にダンシル基を持つ、蛍光性マルトオリゴ糖を分子設計した。分子軌道計算を行った結果、２～７糖の糖鎖長の蛍光性マルトオリゴ糖の蛍光官能基間の距離はいずれもFRETを引き起こすには十分に接近した距離であった。まず、マルトースを出発物とし、はじめに非還元末端にナフチルメチル基を導入し、最後に還元末端にダンシル基を導入することによって効率的な合成ルートの確立に成功した。その手法を他の糖鎖長のマルトオリゴ糖に適用することによって、２～７糖の糖鎖長を持った蛍光性マルトオリゴ糖ライブラリの構築に成功した。

第３章においては、合成した蛍光性マルトオリゴ糖を用いたα-アミラーゼ活性の定性法及び定量法について述べている。合成した蛍光性マルトオリゴ糖によってアミラーゼ活性の定性が可能であった。実際の測定では、FRET解消に基づくダンシル基由来の蛍光強度が減衰し、ナフチルメチル基由来の蛍光強度が増大することを確認出来た。また、合成した蛍光性マルトオリゴ糖によって、アミラーゼ活性の定量も可能であった。麹菌アミラーゼは３糖以上の蛍光性マルトオリゴ糖を酵素分解し、ヒト唾液アミラーゼは４糖以上を酵素分解したことから、最適な糖鎖長の蛍光性マルトオリゴ糖を利用することによってアイソザイムの識別も可能であった。また、合成した蛍光性マルトオリゴ糖類はその糖鎖長により酵素分解速度が異なり、糖鎖長の長い基質ほど分解速度が速いことが確認された。以上の結果より、アミラーゼ活性の定性法及び定量法さらには、アミラーゼアイソザイムの識別法を確立することに成功した。

第４章においては、合成した蛍光性マルトオリゴ糖ライブラリとα-アミラーゼアイソザイムとの構造活性相関について述べている。具体的には、アラミーゼアイソザイムと酵素分解産物の関係を明らかにした。まず、HPLCを用いた酵素分解産物の分析法を確立した。その結果、逆相系C4カラムを用いて水／アセトニトリル系で展開することによって、高分解能で各分解産物を同定することが出来た。さらに、確立した分析法を用いて糖鎖長と各種アミラーゼアイソザイムとの構造活性相関について検討を行った結果、アイソザイム特異的な酵素分解産物プロファイルを示した。また、比較的糖鎖長の長い酵素分解産物はさらにアミラーゼによる２回目の分解を受けることが明らかになった。

最後に、FRETに基づく新規なアミラーゼ基質の合成法及びライブラリ構築を確立した。さらには合成した基質を用いたアミラーゼ活性の定性法、定量法及びアイソザイムの識別法を確立した。本論文で述べてきた手法を用いることで、大量かつ比較的安価にアミラーゼ検査薬を合成することが可能である。また、本法は様々な類似糖に適用可能であり、容易にライブラリ構築が可能である。アミラーゼは古くから研究されている酵素ではあるが、近年でも黒色皮膚ガンや糖尿病をはじめとした各種疾患との関係が報告されるなど、まだまだ未解明な部分も多い。法医学分野や犯罪科学分野においても、高感度で特異性の高い検査薬の開発ニーズが多い。そのような中で、本論文にある新規なアミラーゼ検査薬は、黒色皮膚がん等の医学研究及び犯罪科学分野の一躍を担えるものと確信している

論文の審査結果の要旨

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく分析法は、生化学分野、分子生物学分野等において広く用いられている。FRET は化合物における、蛍光ドナーと蛍光アクセプター間の距離の同定のためにしばしば利用されてきた。糖質科学分野においても、タンパク質と糖との関係を解明するために、いくつかの FRET プローブが合成され、利用されている。一方、α- アミラーゼは、自然界に広く分布する酵素のひとつであり、古くから工業的な用途に利用されてきたが、近年では医学的な観点からも注目されている。例えば、黒色皮膚ガンでは高シアリル化アミラーゼの高発現が認められる。他にも糖尿病をはじめとした各種疾患とアミラーゼアイソザイムとの関係も近年報告されている。さらに、法医学、犯罪科学分野においては、アミラーゼは唾液、便及び膣分泌液証明のための指標として利用されている。

これまでに、いくつかのアミラーゼ基質がアミラーゼの機能を明らかにするために開発されているが、上記疾患のさらなる研究のためには様々なアミラーゼ基質の開発が望まれている。また、法医学、犯罪科学分野では、劣化した生体資料からのアミラーゼ検査となるため、従来法よりも高感度且つ特異性の高い検査薬の開発が望まれている。そこで、各種アミラーゼ関連疾患研究及び法医学、犯罪科学分野への展開を目標として、新規な蛍光性マルトオリゴ糖の合成法の確立及びその機能評価について研究を行った。本学位論文はその研究の過程で得られた成果を 5 章にまとめたものとなっている。

【第一章】この章では、序論が述べられている。まず、FRET に関する説明と糖質科学への展開を紹介し、その後、アミラーゼについて説明と現状の問題提起を行っている。

【第二章】この章では、α- アミラーゼの基質となる蛍光性マルトオリゴ糖の合成法について述べている。蛍光性基質は非常に高感度に検出することが可能であるため、アミラーゼ基質の分子設計にあたり、FRET を引き起こす蛍光プローブを巧みに選択している。基質の分子設計において、非還元末端にナフチルメチル基、還元末端にダンシル基を選定し、分子軌道計算を行っている。その結果、糖鎖長が２～７糖の場合、蛍光プローブ間の距離はいずれも FRET を引き起こすには十分に接近した距離であることを確認している。その後、マルトースを出発物とし、はじめに非還元末端にナフチルメチル基を導入し、最後に還元末端にダンシル基を導入することによって効率的な合成ルートの確立に成功している。その手法を他の糖鎖長のマルトオリゴ糖に適用することにより、２～７糖の糖鎖長を持った蛍光性マルトオリゴ糖ライブラリーの構築に成功している。

【第三章】この章では、合成した蛍光性マルトオリゴ糖を用いたα - アミラーゼ活性の定性法及び定量法について述べている。測定では、FRET 解消に基づくダンシル基由来の蛍光強度が減衰し、ナフチルメチル基由来の蛍光強度の増大を確認している。また、合成した蛍光性マルトオリゴ糖によって、アミラーゼ活性の定量についても検討し、可能であることを見出している。麹菌アミラーゼは、３糖以上の蛍光性マルトオリゴ糖を酵素分解し、ヒト唾液アミラーゼは４糖以上を酵素分解したことから、最適な糖鎖長の蛍光性マルトオリゴ糖を利用することによってアイソザイムの識別も可能であることを見出している。さらに、合成した蛍光性マルトオリゴ糖類はその糖鎖長により酵素分解速度が異なり、糖鎖長の長い基質ほど分解速度が速いことを確認している。以上の結果より、アミラーゼ活性の定性法及び定量法さらには、アミラーゼアイソザイムの識別法を確立している。

【第四章】この章では、合成した蛍光性マルトオリゴ糖ライブラリーとα-アミラーゼアイソザイムとの構造活性相関について述べている。特に、アラミーゼアイソザイムと酵素分解産物の関係を明らかにするため、HPLC を用いた酵素分解産物の分析法を確立している。糖鎖長と各種アミラーゼアイソザイムとの構造活性相関について検討し、アイソザイム特異的な酵素分解産物プロファイルを示すことを確認している。また、比較的糖鎖長の長い酵素分解産物はさらにアミラーゼによる２回目の分解を受けることを見出している。

【第五章】この章では、本論文における全体の総括がなされている。特に、各章において得られた重要な知見および結果を簡潔にまとめている。また、本法は様々な類似糖に適用可能であり、容易にライブラリーが構築可能である。アミラーゼは古くから研究されているが、近年では黒色皮膚ガンや糖尿病をはじめとした各種疾患との関係が報告されるなど、まだまだ未解明な部分も多い。法医学分野や犯罪科学分野においても、高感度で特異性の高い検査薬の開発ニーズが多い。そのような中で、本論文にある新規なアミラーゼ検査薬は、黒色皮膚がん等の医学研究及び犯罪科学分野の一躍を担えるものとしてまとめられている。