

氏名	TUNGALAG BATTULGA		
授与学位	博士(工学)		
学位記番号	博甲第182号		
学位授与年月日	令和元年9月9日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項		
学位論文題目	Interaction mechanism between sulfated polysaccharides and HIV oligopeptides analyzed by SPR (SPRによる硫酸化糖鎖と HIV オリゴペプチド間の相互作用メカニズムの解析)		
論文審査委員	主査 教授	吉田 孝	
	准教授	菅野 亨	
	准教授	服部 和幸	
	准教授	佐藤 利次	
	教授	新井 博文	

## 学位論文内容の要旨

硫酸化糖鎖の抗ウイルス作用や抗凝血作用などの特異な生理活性は、ウイルスなどの表皮タンパク質中の塩基性アミノ酸に由来する (+) 電荷と硫酸基の (-) 電荷との静電的相互作用によると推定されている。本研究では HIV gp120 表皮タンパク質やインフルエンザウイルス表皮タンパク質 (HA) 配列を参考にオリゴペプチドを合成し、硫酸化糖鎖との相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置および動的光散乱 (DLS) 装置により定量的に調べ、硫酸化糖鎖の生理活性メカニズムについて考察した。

ペプチド固相合成機により 6 種類のオリゴペプチド (各 19-23 残基) を合成し、ペプチドの N-末端または C-末端にビオチン基を導入した。HIV オリゴペプチドは V3 loop、C-末端、CD4 領域の 3 ヶ所から作成し、V3 loop と C-末端にはリジン (K) アルギニン (R) など (+) 電荷を持つアミノ酸が多く含まれるが、CD4 領域にはリジン (K) が 1 つしか含まれない。また A 型および B 型インフルエンザウイルスの hemagglutinin タンパク質からも 3 種類のオリゴペプチドを合成した。ビオチン化ペプチドを HPLC (TSK gel ODS-80TM column, 7.8×300mm) で精製した。MALDI TOF MS、LC/MS/MS 装置により合成したオリゴペプチドを同定した。硫酸化糖鎖は、高い抗 HIV 性を持つカードラン硫酸およびデキストラン硫酸を用いた。センサーチップ (Sensorchip SA) 上にビオチン化ペプチドを固定化し、HBS-EP+バッファ溶液に溶解させた硫酸化糖鎖との相互作用を SPR 装置 (Biacore X100) によって測定し、結合速度定数 ( $k_a$ )、解離速度定数 ( $k_d$ )、解離定数 ( $K_D$ ) を求めた。

合成したオリゴペプチドをセンサーチップ SA 上に固定化し、硫酸化糖鎖との相互作用を SPR で測定し、結合/解離速度定数マップを作製した。カードラン硫酸 ( $\overline{M}_n=6.8 \times 10^4$ 、DS=1.29) は塩基性アミノ酸が多く含まれオリゴペプチドと強い相互作用を示し、塩基性アミノ酸を含まないペプチド C とインフルエンザウイルス B/Hong Kong/ とは相互作用しなかった。また、デキストラン硫酸 ( $\overline{M}_n=2.3 \times 10^4$ 、DS=0.69) もカードラン硫酸と同様な相互作用を示すことが分かった。

分子量、硫酸化度が小さいと相互作用も小さくなり、硫酸化糖鎖の抗ウイルス性の結果と一致した。DLS 分析では粒子径が大きくなり、またゼータ ( $\zeta$ ) 電位の変化も観測され、硫酸化糖鎖と塩基性アミノ酸を多く含むオリゴペプチドと相互作用することが分かった。

以上のことから、HIV やインフルエンザウイルスなどと硫酸化糖鎖は静電的に相互作用して抗ウイルス性が発現することが分かった。

## 論文審査結果の要旨

硫酸化糖鎖の抗ウイルス性は硫酸基に由来する(-)電荷とウイルス表皮タンパク質中に存在する塩基性アミノ酸の(+)電荷との静電的相互作用と言われているが、定量的に明らかにした研究はこれまでに報告されていなかった。そこで、申請者はペプチド固相合成装置により6種類のオリゴペプチド(各19-23残基)を合成しN-末端にビオチン基を導入後、センサーチップに固定化して硫酸化糖鎖との相互作用を表面プラズモン共鳴(SPR)を用いて測定した。その結果、HIV gp120表皮タンパク質との相互作用では、C末端やV3loop領域など塩基性アミノ酸が多く含まれる領域から作成したオリゴペプチドとは強い相互作用を示したが、塩基性アミノ酸が少ないCD4領域のオリゴペプチドとは相互作用を示さないことが分かった。また、A型インフルエンザウイルス表皮タンパクHAから作成したオリゴペプチドとは相互作用を示したが、B型インフルエンザウイルスHAから作成したオリゴペプチドとは相互作用しなかった。硫酸化糖鎖のインフルエンザウイルスに対する抗ウイルス性は、当研究室のこれまでの研究成果からA型に対しては効果が高いがB型では効果を示さないことを発表しており、それは表皮タンパク質中の塩基性アミノ酸含有量の違いであることを明らかにした。さらにデング熱ウイルスに対しても抗ウイルス性を明らかにした。すなわち硫酸化糖鎖の抗ウイルス性は静電的相互作用によることを初めて定量的に明らかにすることが出来た。

これらの成果はインパクトファクターの高い国際学術誌に総合論文として掲載され、国際会議でBest Poster Awardを受賞するなど日本国内外の学会で一定の評価を得た。本研究の成果は博士論文として必要事項をすべて満たし研究の発展性も期待できる。よって申請者は北見工業大学博士(工学)の学位を授与される資格があると審査委員会は認めた。