

ヒアルロナンが形成する網目環境場が酵素反応に与える影響

中村 真由美^{*1}, 足立優花^{*1}, 戸谷 希一郎^{*2}

Effects of Hyaluronan Constructing Mesh-like Environment on Enzymatic Reaction

Mayumi NAKAMURA^{*1}, Yuka ADACHI^{*1}, Kiichiro TOTANI^{*2}

(Received September 24, 2011)

1. はじめに

生体内反応は試験管内とは異なる特殊な環境場で進行している。例えば細胞内は微小かつ分子クラウディングな環境である。最近、微小空間が化学反応を効率的に進行させる事例¹⁾や、分子クラウディング環境が酵素反応を調節する因子となる例²⁾が報告され、生体内を模した特殊環境場への注目が集まっている。我々も分子クラウディング環境下において糖鎖プロセッシング酵素がコンフォメーションや活性を変化させることを報告している³⁾。一方、細胞間には特殊な反応場として細胞外マトリクスが形成する網目環境が存在する。細胞外マトリクスはコラーゲン、ヒアルロナン (HA)、グリコサミノグリカンなどによって形成され、複雑な網目構造を与えることが知られている⁴⁾。HAはグルクロン酸とグルコサミンが繰り返し連結した鎖状の多糖であり、単独でも水溶液中で蜂の巣状の網目構造を形成し、網目の大きさはHAの濃度に依存し、分子量には依存しないことが報告されている⁵⁾。

分子がこうした網目に捕捉された場合、その拡散は制限され、網目内での分子衝突が促進されるとともに十分なエネルギーを得た場合のみ隣の網目に移動することができるようになるものと予測される。実際、HA存在下では分子が複数の拡散係数を有する異常拡散現象が報告されている⁶⁾。生化学反応を担う酵素の反応効率を左右するひとつの要因として基質との衝突確率が挙げられる。基質濃度が向上すれば酵素との衝突頻度は増し、酵素反応生成物は増産される。一方、粘度の向上により分子の拡散係数が低下すると基質と酵素の衝突頻度は低下し、生成物量は減少する。では細胞外マトリクスの形成する

網目環境場は生化学反応にどのような影響を与えるのであろうか？細胞外マトリクスによる系内粘度の向上は酵素反応効率の低下をもたらすことは想像できるが、形成される網目環境場に酵素や基質が捕捉され、微小な制限された空間内で互いの衝突頻度が向上した場合、酵素反応効率が向上する可能性がある。これまで生体内の網目環境場が生化学反応に与える影響を評価した例はなく、網目環境の効果を検討することは細胞外マトリクス中での生体分子変換や細胞間での分子の受け渡しを正しく理解する上で重要である。また細胞内の微小空間を模したマイクロリアクターが化学反応の効率化に寄与している事例⁷⁾に鑑み、網目環境場の分子変換制御法としての可能性も興味深い。

本研究では、糖加水分解酵素反応をモデルとして反応液中にHAを様々な濃度で添加した網目環境場中において、反応効率と系内の粘度の関係を検討した。その結果、これらの反応においてHA添加による反応系内の粘度上昇に依存せずに酵素反応効率が向上する添加濃度領域が存在することを明らかにした。

2. 本研究における評価系

本研究の概要は図1に示す通り、マイクロチューブ内にHAを用いて網目環境場を形成し、この特殊環境場中に酵素として Jack bean 由来 α -mannosidase、基質として *p*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside (pNP-Man) を添加してその反応性を評価するものである。HAとしてナトリウムイオンをカウンターカチオンに有し、平均分子量を300,000 (HA-300K) ないし1,000,000 (HA-1000K) に調節した合成品 (電気化学工業株式会社)⁸⁾を用いた。また本 α -mannosidase はヘテロ4量体として220 kDaの分子量を示す比較的大きなタンパク質である⁹⁾。酵素反応の検出には、当該加水分解反応によって生ずる *p*-nitrophenol の

*1: 理工学研究科理工学専攻修士学生

*2: 物質生命理工学科准教授 (ktotani@st.seikei.ac.jp)

吸光度 (400 nm) 変化を利用した。HAの添加濃度は実際の生体内濃度¹⁰⁾に鑑み、0.05–0.2% の範囲で検討した。酵素添加濃度はHA-300Kの0.1%水溶液が平均33 nmの網目を形成すること¹¹⁾を基に、同じくnmオーダーの酵素1分子ずつが確実に一つの格子に捕捉されるように、酵素が約200格子に1分子存在する濃度に調整した。一方、基質は酵素よりもサイズが圧倒的に小さいため、網目間を比較的自由に移動することが可能であると考えられる。そこで基質の拡散の影響を排除すべく基質濃度を過剰量(1格子に基質約100分子)に設定した。反応温度は測定に適した反応進行度となるよう4°Cに設定した。

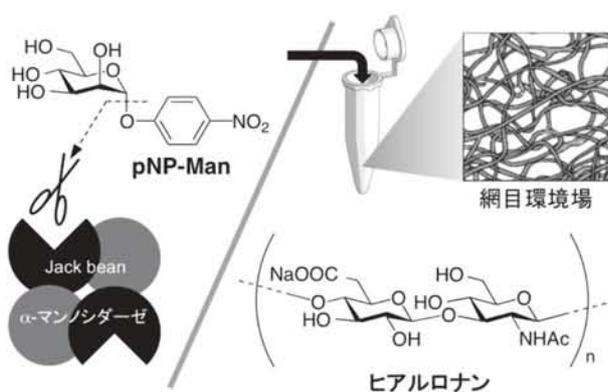


図1 本研究の概要

3. 結果と考察

我々はまず前述した反応条件下における Jack bean α -mannosidase の相対活性に対する、HA-300K の添加効果について検討を行った(図2a)。HA非存在下の活性を基準とした場合、0.05%のHA-300Kの添加によって相対活性は有意に向上することが分かった。HAの添加濃度を0.2%まで順次向上させた場合、相対活性は濃度依存的に低下したが、いずれもHAを添加しない場合の活性を超えていた。これらの反応に用いたHA添加濃度における系内の粘度を測定したところ、粘度はHA添加濃度依存的に向上し、0.2%添加時には非添加時の3倍以上の粘度を示した(図2b)。粘度の向上が分子の拡散を低下させることを考慮すると、酵素反応活性もHA濃度依存的に低下するはずである。しかしながら図2aの結果は系内粘度に依存しない酵素反応の活性化を示している。この結果は酵素が作業仮説に示した網目内への捕捉による基質との衝突頻度の向上に伴う反応性の向上と、系内の粘性の向上に伴う反応性の低下の双方の影響を受けたことを示唆しているものと思われる。同様の検討を

HA-1000K存在下で行った結果(図2cおよび図2d)、同じようにHA0.05%存在下で活性の向上を示し、HA添加濃度の向上に伴って、その活性は低下する傾向が認められた。全体的にHA添加時の活性が低下しているのは、HA-1000Kを添加した場合の方がHA-300Kを添加した場合に比べて粘性が高くなっているためと推測される(図2d)。HAは分子量の大きさに関わらず、添加濃度に依存して網目の大きさが変化するため⁵⁾、同じ添加濃度ではHA-300KおよびHA-1000Kの形成する網目の大きさは同等と考えることができる。本酵素に対しては0.05%のHA添加で形成される網目が酵素を有効に捕捉し、拡散低下の影響を凌駕して反応性を向上させたものと推測される。

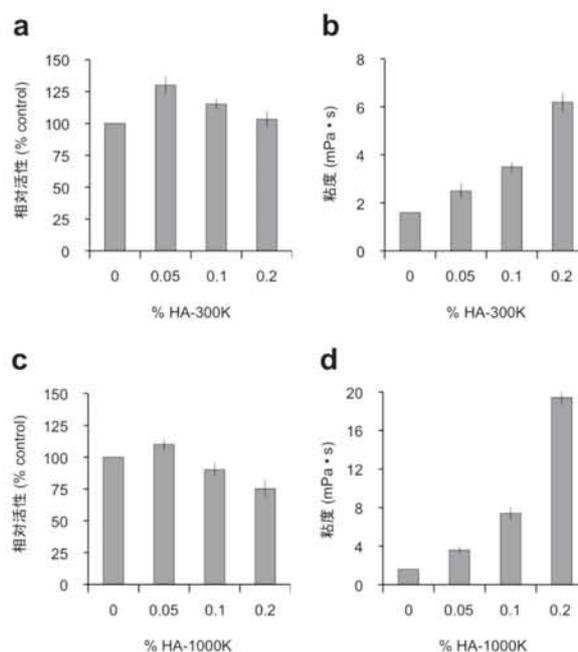


図2 Jack bean α -mannosidaseに対する網目環境場の効果。(a) HA-300K存在下におけるpNP-Manの加水分解。(b) HA-300K水溶液[50 mM Tris·HCl (pH 5.8)]の粘度。(c) HA-1000K存在下におけるpNP-Manの加水分解。(d) HA-1000K水溶液[50 mM Tris·HCl (pH 5.8)]の粘度。酵素アッセイ条件(70 μ L中): 4.6 mM pNP-Man, 75.6 ng Jack bean α -mannosidase, 0-0.14 mg HA-300K [パネル(a)]もしくはHA-1000K [パネル(c)] (0-0.2 wt%), 50 mM Tris·HCl (pH 5.8), 4°C, 10分間インキュベーション後, 2 M Tris (140 μ L)を添加して反応を停止し, 400 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定。

もっとも酵素反応効率が向上した0.05% HA-300K存

在下においてJack bean α -mannosidase の K_m と V_{max} を算出したところ、HA 非存在下と比較して K_m の低下と V_{max} の向上が認められ、酵素反応効率を示す V_{max}/K_m の値は HA を添加することで 1.31 倍に向上していた (表 1)。HA は直接的には酵素を活性化しないと考えられるため、これらの結果は HA が作る特殊な環境場が副次的に酵素反応に影響を与えたことを示唆している。すなわち作業仮説に示した通り網目に捕捉されて拡散範囲を制限された酵素が、無限に広い空間と比べて基質と強制的に衝突する頻度が増したと考えると、表 1 の結果を矛盾無く説明することができる。これらの結果からも網目環境への酵素の捕捉は、生化学反応を加速する要因になり得ることが示唆される。

表 1 網目環境場におけるJack bean α -mannosidase の酵素速度論解析^{a)}

HA-300K	K_m (mM)	V_{max} (μ M/min)	Relative V_{max}/K_m
0%	0.73	23.1	1.00
0.05%	0.67	27.7	1.31

^{a)}酵素アッセイ条件 (70 μ L 中): 0, 1, 2.5, 5 mM pNP-Man, 75.6 ng enzyme, 35 μ g HA-300K (0.05 wt %), 50 mM Tris-HCl (pH 5.8), 4 °C. 10 分間インキュベーション後、2 M Tris (140 μ L) を添加して反応を停止し、400 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定。

我々はHA の添加によって酵素反応が加速される現象を、HA に特有の網目環境場に由来するものと考えている。この現象が網目環境場特異的なものであることを証明するために、我々は次に網目構造を形成しない高分子モデルとして架橋していないポリアクリルアミドを、酵素反応系内に添加した場合の影響を調べることとした。図 2 の検討と同様の反応条件で添加剤を HA から分子量 200,000 のポリアクリルアミド (PAA-200K, CAS62649-23-4) に変更して加水分解活性を比較したところ、PAA 添加濃度依存的に反応効率は低下し、HA のように添加による反応効率の向上は認められなかった (図 3a)。またPAA を添加した反応液の粘度は、PAA濃度依存的に向上したが、HA-300K を添加した場合と比較して同濃度での粘性は低いことが分かった (図 2b および図 3b)。粘度の値のみに注目するならば、HA-300K 添加系はPAA-200K添加系に比べて分子の拡散が低下しており、酵素反応効率もPAA-200K添加系と比較して低下するはずである。しかしながら、HA 添

加系はPAA添加系と異なり、粘度の向上に伴う拡散の低下に相関しない酵素反応活性化領域が存在する。これらの結果はHA に特有の構造が酵素活性効率の向上に寄与していることを示しており、我々の作業仮説を支持するものである。

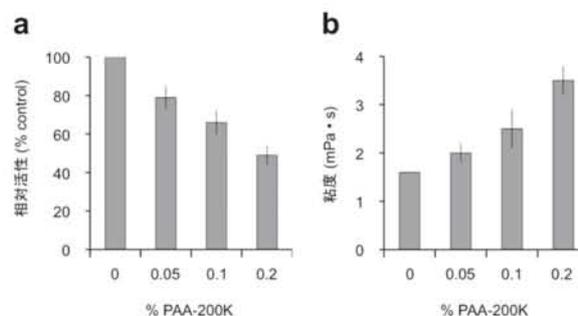


図 3 Jack bean α -mannosidaseに対する高分子添加の効果. (a) PAA-200K 存在下におけるpNP-Manの加水分解. (b) PAA-200K 水溶液[50 mM Tris-HCl (pH 5.8)] の粘度. 酵素アッセイ条件 (70 μ L中): 4.6 mM pNP-Man, 75.6 ng Jack bean α -mannosidase, 0-0.14 mg PAA-200K (0-0.2 wt %), 50 mM Tris-HCl (pH 5.8), 4 °C. 10 分間インキュベーション後、2 M Tris (140 μ L) を添加して反応を停止し、400 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定。

4. むすび

本研究では、HA が形成する網目環境場が Jack bean α -mannosidase による pNP-Man の加水分解反応活性に及ぼす影響を検討した。その結果、HA-300K を 0.05% 添加した場合に、酵素反応効率は約 1.3 倍に向上することが分かった。同濃度における系内の粘度はHA-300K 非添加時の約 1.5 倍に向上しており、通常、拡散低下に基づく酵素反応効率の低下を引き起こすはずである。本研究の結果は通常の高分子添加剤を加えた場合に予測される結果と著しく異なる結果を与えた。

今回の実験結果は、HA が形成する網目環境が酵素を捕捉し、分子の拡散が制限された微小空間内で酵素と基質の衝突頻度が向上した可能性を示唆するものである。この結果は細胞外マトリクス中の生化学反応を理解する上で重要な知見となるばかりでなく、酵素反応や化学反応の新しい制御因子としての網目環境の可能性を示すものである。今後、本環境場の応用を理学・工学の両側面からさらに検討していきたい。

参考文献

- 1) H. Song, D.L. Chen, R.F. Ismagilov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7336.
- 2) H.X. Zhou, G. Rivas, A.P. Minton, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 375.
- 3) K. Totani, Y. Ihara, I. Matsuo, Y. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2101.
- 4) J. Heino, J. Käpplä, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 1309.
- 5) J. E. Scott, C. Cummings, A. Brass, Y. Chen, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 699.
- 6) A. Masuda, K. Ushida, T. Okamoto, *Phys. Rev. E.* **2005**, *72*, 060101.
- 7) J.P. McMullen, K.F. Jensen, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3*, 19.
- 8) T. Kluge, A. Masuda, K. Yamashita, K. Ushida, *Macromolecules* **2000**, *33*, 375.
- 9) Y. Kimura, D. Hess, A. Sturm, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 168.
- 10) J.R.E. Fraser, T.C. Laurent, U.B.G. Laurent, *J. Intern. Med.* **1997**, *242*, 27.
- 11) P.J. Coleman, D. Scott, R.M. Mason, J.R. Levick, *J. Physiol.* **2000**, *526*, 425.