

硫酸イオンによる pH 非依存的リゾチーム活性の阻害

宮部 真美[†], 國府田 宏輔^{†*}

[†]茨城県立水戸第一高等学校 生物同好会部 〒310-0011 茨城県水戸市三の丸3-1 0-1
(2019年3月1日 受付; 2019年3月22日 受理)

Abstract

リゾチームは、生物に広く分布する溶菌酵素の一種である。鳥類の持つC型リゾチーム(ニワトリ卵白リゾチーム)と無脊椎動物の持つI型リゾチーム(ヤマトシジミリゾチーム)は、一次構造には相同性は見られず、進化系統的に異なる起源をもつと考えられている。しかし、反応部位周辺の二次構造の類似性が高く、反応中間体を形成する維持型機構の反応を触媒する点で共通である。ワカメ、コンブ、ヒジキなどに含まれる酸性多糖類のフコイタンはリゾチームの活性を阻害すること明らかになっている。この阻害はフコイタンに含まれる硫酸基密度に依存する。しかし、この阻害の詳細な作用機序や生物学的意義は知られていない。

そこで、フコイタンによるリゾチームの活性阻害の生化学的知見について、溶菌法を用い検証した。その結果、硫酸イオンがC型リゾチームを阻害することが示された。この阻害は、塩化物イオンでは見られず、硫酸基の構造が阻害に関与していることが示唆された。また、硫酸イオンはヤマトシジミやマガキのI型リゾチームも阻害した。これらの生物は、ワカメなどの海藻の捕食者であることから、海藻は、硫酸基を有するフコイタンを体表に発現し、捕食者の腸内環境を攪乱することで、捕食者の自然免疫を阻害する可能性が考えられる。

Introduction

リゾチーム(EC 3.2.1.17)は、生物に広く分布する溶菌酵素の一種である。リゾチームは、細菌の細胞壁の主要構成成分であるN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸のβ-1,4結合を加水分解によって破壊することで溶菌する。リゾチームの分子量は約14,000、至適pHは5付近、至適温度は50℃付近の極めて安定な塩基性タンパク質である。鳥類の持つC型リゾチーム(ニワトリ卵白リゾチーム)はかつて風邪薬としても活用されていた(現在は有効性がないとされ用いられなくなったもの、市販の目薬では含有するものがロート製薬から販売されている)。このC型リゾチームと、無脊椎動物の持つI型リゾチーム(ヤマトシジミリゾチーム)は、一次構造には相同性は見られず、進化系統的な類縁関係は見いだすことができない。しかし、反応部位周辺の二次構造の類似性が極めて高い。さらに、反応機構はいずれも反応中間体を形成する維持型機構であり、溶菌活性という点で収斂進化したと言える例が報告されている⁽³⁾。

これまで網羅的解析によって、ワカメ、コンブ、ヒジキなどに含まれる酸性多糖類のフコイタンは、リゾチームの活性を阻害することが報告されている⁽¹⁾。フコイタンは、いわゆる海藻のネバネバ成分のことである。フコイタンは、リゾチームの他に、トリプシンやキモトリプシン等の数種類の消化系プロテアーゼも阻害する。この阻害活性は、興味深いことに、フコイタンに含まれる硫酸基の密度に依存する⁽²⁾。現在、フコイタンは、様々な健康効果が報告されてきており、研究が活発に進められている^(7,8)。

阻害剤による酵素活性の可逆的阻害には理論的には4種類の阻害様式が知られている。競合阻害は、酵素([E])の活性部位に結合することで基質の結合を妨げるものである。基質に対する活性部位とは異なる部位に結合し活性を阻害する様式は3種類知られている。不競合阻害は、ES複合体([ES])の、活性部位とは異なる部位に結合し阻害する。混合型阻害は、[ES]および酵素単体([E])のどちらかに結合し活性を阻害する。非競合阻害は、[E]

のみに結合する阻害様式である。しかし、非競合阻害は、実際の生体内にはほとんど見られていない特殊な様式である。フコイタンによるリゾチーム活性の阻害様式は非競合阻害・不競合阻害の混合型である⁽¹⁾。しかし、この生化学的解析は行われておらず、生物学的意義についての知見も得られていなかった。本研究では、硫酸イオンがC型リゾチームを阻害し、フコイタンのポリアニオン性に非依存的であることを明らかにした。また、硫酸イオンは、ヤマトシジミやマガキなどの海藻捕食者の体表に見られるI型リゾチームも阻害した。これらのことから、海藻は、硫酸基を含むフコイタンを体表に発現し、捕食者の消化系に含まれるリゾチーム活性を阻害し、捕食者の自然免疫を攪乱している可能性が考えられる。これにより、フコイタンは、捕食の頻度等を低下させ海藻の生体防御に関わっているのではないかという可能性が考えられる。

Results

硫酸イオンはリゾチーム活性を阻害する

フコイタンによるプロテアーゼ阻害活性は、フコイタンの硫酸基含有量に依存する。そこで、フコイタンの糖鎖の立体構造が重要であるのか、それともフコイタン中の硫酸基が、酵素阻害に重要であることを検証するために、硫酸イオンがリゾチームを阻害するかどうかを調べた。リゾチームの反応速度を測定するために、生菌の菌体を基質とする溶菌法を用い、硫酸イオンを阻害剤として添加した反応系と添加しない反応系の反応速度を比較した。溶菌法では、基質として市販されている *Micrococcus luteus* の粉末を用いる方法が一般的である。しかし高校における研究活動ではあまりに高価(¥15,800/5g)である。今回は基質としてグラム陽性菌の *B. subtilis* またはグラム陰性菌の *E. coli* を用い、菌体の濁度 OD₆₀₀ を分光光度計で測定し、その減少速度(min⁻¹)を定量することで反応速度と定義した。

グラム陽性菌の *B. subtilis* を基質として用いて反応速度を調べた(Fig. 1(A))。リゾチーム添加時のOD₆₀₀の減少速度は0.0037 min⁻¹であった。ここに50 μMの硫酸イオンを添加したところ、反応速度はコントロールに比べて0.62倍になった。100 μMの硫酸イオンを添加した場合、反応速度は0.30倍になった。一方、

Corresponding author. e-mail address: kouda.kousuke.research@*****
***** = gmail.com

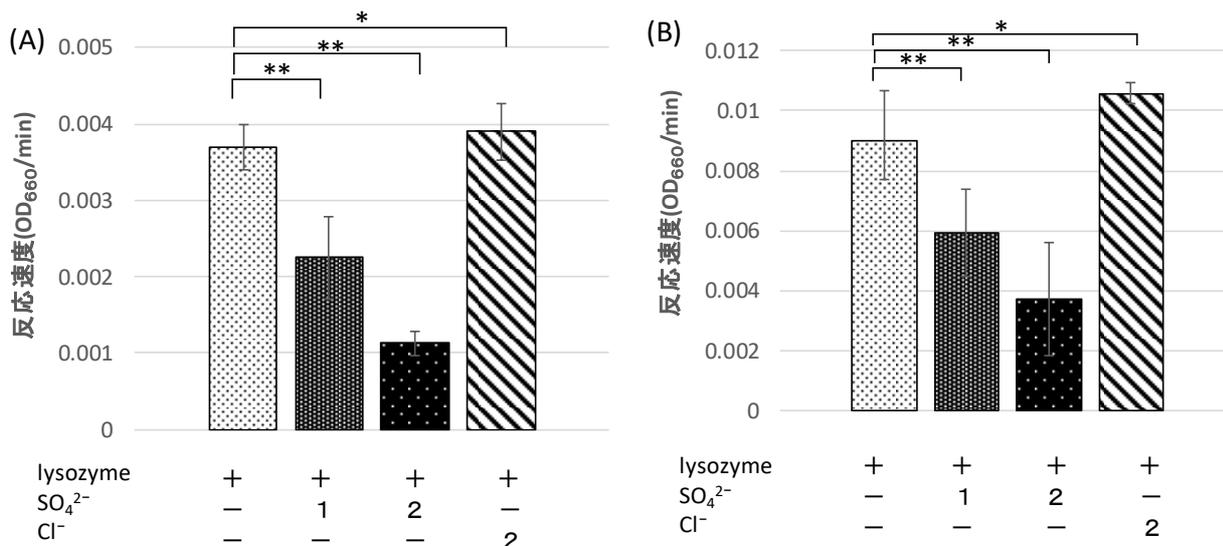


Fig. 1 硫酸イオンはリゾチームを阻害する
(A)基質: *B. subtilis*, (B)基質: *E. coli*, **: p<0.05 *: p>0.05

100 μM の塩化物イオンを添加した場合には、反応速度はコントロールに比べて1.01倍であり、反応速度に有意な変化は見られなかった。この結果から、硫酸イオンがリゾチーム活性を阻害することが示された。また、硫酸イオンによるリゾチーム阻害の特異性が示唆される。同様の実験を、グラム陰性菌の *E. coli* を用いて検証した (Fig. 1(B))。その結果、グラム陰性菌である *E. coli* でも同様の結果が得られた。

これらのことから、フコイダンによるC型リゾチームの阻害は、フコイダンの糖鎖の立体構造には依存せず、フコイダン中の硫酸基に依存していることが示唆された。すなわち、硫酸さらにこの阻害は、硫酸基が負の電荷を帯びていることではなく、硫酸基の構造など電荷とは別な要因に起因すること可能性が示された。

フコイダンは低分子化されてもリゾチーム活性を阻害する

フコイダンは、そのポリアニオン性とは非依存的にリゾチームを阻害することが示唆された。このことをさらに検証するために、高分子状態のフコイダンと、これを加熱処理によって低分子化した低分子化フコイダンを用いて、溶菌法による阻害活性の比

較を行った。
本実験では、市販のモズク由来のフコイダンであるシンプルフコイダン (シンプルサプリ研究所, モズク抽出物, フコイダン85%以上含有) を用い、これを30分間の煮沸処理により低分子化を行った。フコイダンの低分子化を確認するために、Fig. 2の検証装置を自作した。分解前のフコイダン溶液と、煮沸処理後のフコイダン溶液を半透膜 (セルロース膜) で挟んだ。分解が起きることでモル濃度の上昇が生じ、煮沸前後の溶液を半透膜で挟み1日後の、水の移動を測定した。その結果、フコイダン側のチューブから低分子化フコイダン側のチューブへ、10mlの水の移動が確認された。このことから、煮沸によりフコイダンの水溶液が36nMから46nMに変化し、フコイダンが分解されていることが確認された。

Fig. 3に、フコイダンと低分子化フコイダンの阻害活性を比べた実験の結果を示した。フコイダンを低分子化しても反応速度の変化に有意差は認められなかった。この結果からも、フコイダンのポリアニオン性は、リゾチームの活性阻害に関与しない可能性が支持される。

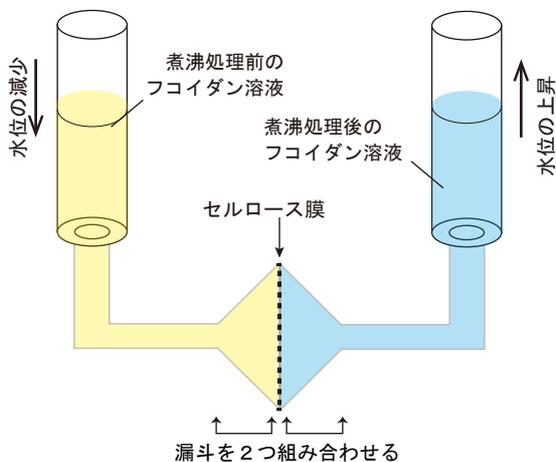


Fig. 2 浸透圧の変化を利用した自作装置

Lineweaver-Burk plot による阻害様式の判定

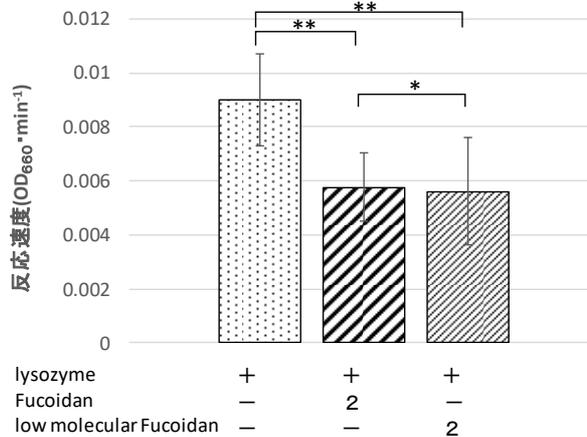


Fig. 3 フコイダンの分子量はリゾチーム阻害に関与しない
基質: *E. coli* **: p<0.10 *: p>0.10

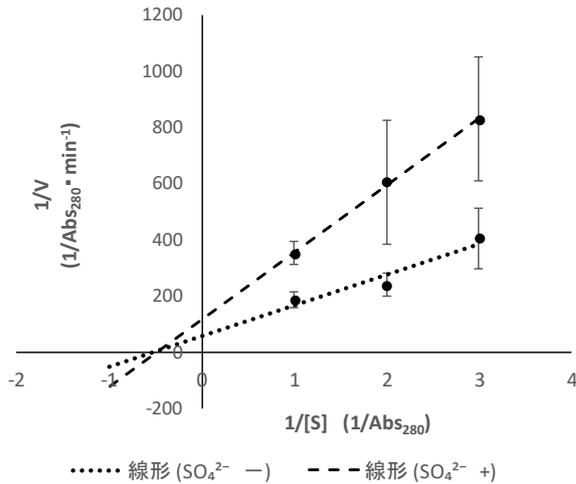


Fig. 4 Lineweaver-Burk plot による阻害様式判定

基質: *B. subtilis* 乾燥菌体

すべての基質濃度において SO₄²⁻+ と SO₄²⁻- が p < 0.05

硫酸イオンによるリゾチーム阻害と、フコイダンによるリゾチーム阻害が、同じ阻害要因によるものであることを検証するために、これらの阻害様式が一致していることを Lineweaver-Burk plot により検証した。生化学的な分析では、これまでの溶菌法と同様の菌体濁度の測定では測定値の不安定性が大きいため、基質として *B. subtilis* 乾燥菌体を用いた。基質濃度を 1/Abs₂₈₀ とし、その減少速度 (min⁻¹) を定量することで反応速度と定義した (Fig. 4)。阻害剤あり (---) および阻害剤なしのコントロール (.....) のグラフを比較した。2 つのグラフの傾きが一致しないことは、競合阻害および混合型阻害であることを示している。1/V 軸上に交点がないことは、不競合阻害または混合型阻害であることを示している。これらのことは、硫酸イオンによるリゾチーム阻害の阻害様式は混合型阻害であることを示しており、フコイダンによるリゾチーム阻害と、硫酸イオンによるリゾチーム阻害の阻害型が一致していることが示された。

マガキとヤマトシジミの溶菌酵素活性は硫酸イオンにより阻害される

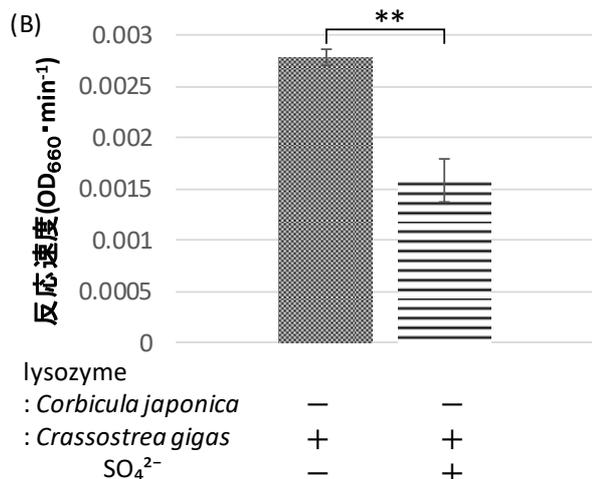
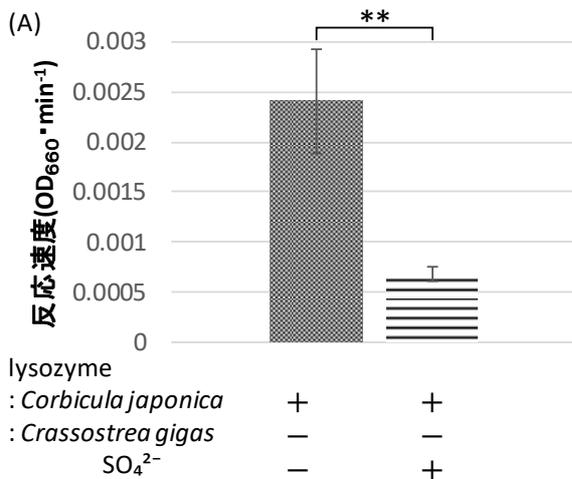


Fig. 5 ヤマトシジミ、マガキの溶菌酵素は硫酸イオンに阻害される

ヤマトシジミ (*Corbicula japonica*) 粗酵素液の反応系(A),

マガキ (*Crassostrea gigas*) 粗酵素液の反応系(B). **: p < 0.05

フコイダンが、C型リゾチーム(ニワトリ卵白リゾチーム)の活性を阻害することが示された。しかし、モズクやコンブなどの海に生息する生物と、C型リゾチームの生物学的な関連性は考えにくい。そこで、海洋生態系で見られる溶菌酵素である貝類のリゾチーム(I型リゾチーム)が、C型リゾチームと同様に硫酸イオンによって阻害されることを検証した。リゾチームは、海藻の捕食者であるマガキと、貝類の中でも特にI型リゾチームの含有量が多く活性を確認しやすいヤマトシジミ⁽⁴⁾から、むき身抽出物を粗酵素液として溶菌法に用いた。その結果、マガキの粗酵素液でも、ヤマトシジミの粗酵素液でも、硫酸イオンを添加することで反応速度に有意な低下が見られた (Fig. 5)。この結果は、貝類に存在する溶菌酵素の活性が硫酸イオンにより阻害されることを示している。硫酸イオンは、貝類の持つI型リゾチームの活性も阻害することが示唆された。すなわち、海洋生態系においても、フコイダンの有する硫酸基がリゾチーム活性を阻害する可能性を示している。

Discussion

本研究により、フコイダンに含まれる硫酸基が、C型リゾチームの活性を阻害していることが明らかとなった。この阻害は、塩化物イオン存在下では見られなかった。これらのことから、負の電荷を帯びているということや、フコイダンの糖鎖構造とは非依存的に、硫酸イオン特有の構造に起因する阻害活性があることが示唆された。また、マガキやヤマトシジミなどのむき身抽出物による溶菌活性も、硫酸イオンによって阻害された。これは、I型リゾチームの活性も硫酸イオンによって阻害されていることを示唆している。

硫酸イオンの立体構造が阻害に重要であるのかどうかをさらに詳細に検証するために、立体構造や価数の異なる硝酸イオンなどに同様の阻害効果があるかなどを検証する必要があると考えられる。

グラム陰性菌である *E. coli* を用いて、硫酸イオンの阻害効果を検証した実験では、グラム陽性菌である *B. subtilis* と同様に溶菌活性が硫酸イオンによって阻害された (Fig. 1(B))。一般に、グラム陰性菌は、細胞壁の外側にリポ多糖による外膜が形成されており、リゾチームが作用しても細胞壁成分は完全に分解されない。今回の結果は、しかし、ペプチドグリカン層が分解されたこ

とにより、菌体の形状が維持できず、濁度減少としてはグラム陽性菌と同様に観察したことに起因すると考えられる。

マガキなどの海洋生態系に生息する生物の腰部酵素活性が、硫酸イオンによって阻害される生物学的意義として次のようなことが考えられる。フコイダンは、ワカメ、コンブ、ヒジキなどの一部の海藻の体表に存在する。これらの海藻はウニや草食性の貝などに捕食される。一方、多くの海産草食性の貝類は、消化器官に最も高いリゾチーム活性を持つ⁽⁴⁾。これらの生物において、リゾチームは、腸内細菌叢の制御や生体防御に関わるとされ、その活性はニワトリ卵白リゾチームに匹敵するほど高いものもある^(5,6)。フコイダンによってI型リゾチームの活性が阻害されることは、捕食者の消化系における自然免疫を阻害することになる。海藻は一定量を捕食者に被食されるもの、その結果として捕食者の消化系の自然免疫を低下させ、過度な捕食を抑制している可能性が考えられる。つまり、フコイダンを体表に持つことは、海藻の生体防御の一つであると考えられる。

海藻の生体防御機構を明らかにするためには、制御実験生態系(マイクロコスム)を構築し、硫酸イオン存在下と非存在下の貝の腸内細菌を比べることで、貝の腸内細菌叢に対する硫酸イオンの

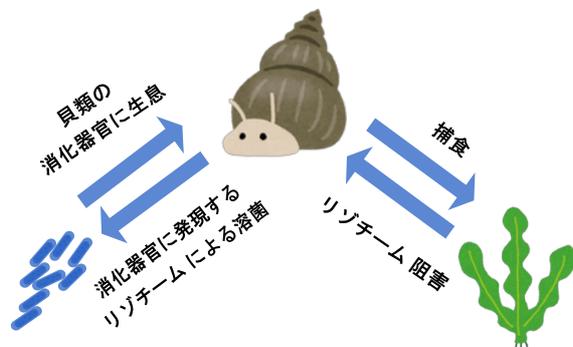


Fig. 6 フコイダンを体表に発現する生体防御

海藻はウニや草食性の貝などに捕食される。多くの海産草食性の貝類は、消化器官に最も高いリゾチーム活性を持つ。これらの生物において、リゾチームは、腸内細菌叢の制御や生体防御に関わるとされる。フコイダンによってリゾチームの活性が阻害されることは、捕食者の消化系における自然免疫を阻害し、過度な捕食を抑制している可能性が考えられる。

影響検証する必要があるだろう。

Materials & Methods

大腸菌と枯草菌の培養

本実験では、*Escherichia coli* K-12株、*Bacillus subtilis*を用いた。いずれも、LB液体培地(1% Trypton, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl)で25℃, 180 rpmで振盪培養した。

フコイダンとその低分子化

実験に用いたフコイダンは、シンプルサブ研究所のシンプルフコイダン(モズク抽出物、フコイダン85%以上含有)のカプセル内容物を回収し使用した。フコイダンの低分子化は、30分間の煮沸により行った。低分子化されたかどうかの確認には、浸透圧の変化を利用した自作の装置を用いた。2つの漏斗(サンブラテックのポリプロピレンハイスピードロット(150mmΦ))を向かい合わせに組み合わせ、漏斗間は溶液が漏れないようパッキン(大阪魂 天然ゴム フランジ用中パッキン 5K 125A) 2個の間にセルロース膜(VISKING セルロースチューブ 分画分子量約12000~14000)を挟んだ。漏斗の足にそれぞれφ5mmのシリコンチューブを繋げた(Fig. 2)。片方のチューブに、80 mlの36 mM

フコイダン水溶液(フコイダンの平均分子量14,000としてモル濃度を推定)を入れ、もう一方のチューブに同量の煮沸したフコイダン水溶液を入れて、1日静置した。その後、浸透によって移動した水の体積を測定し、濃度を測定し分解されたかどうかを検証した。

溶菌法による反応速度の測定

反応速度の測定には、溶菌酵素活性の測定法として簡便で広く用いられる溶菌法を採用した。200 mM リン酸緩衝液、 $OD_{600}=1.1$ に合わせた100 μl 菌体懸濁液(*Escherichia coli* K-12株または*Bacillus subtilis*)、阻害剤を混合し、5分間40℃でプリンキュベートした。リゾチームの阻害剤として、硫酸、塩酸、フコイダン、低分子化フコイダンを用いた。その後、*E. coli*の反応系では、C型リゾチームとしてリゾチームを含むロートスマイルメディクリア(リゾチームの終濃度0.36 nM)、*B. subtilis*の反応系では精製リゾチーム(和光純薬工業株式会社、終濃度50 μM)を添加し、1 mlの反応系を作製した。10分間40℃で反応させ、 OD_{600} の減少値を測定し、反応速度を算出した。リゾチームと阻害剤の濃度比を[E]:[I]と表した。[E]:[I]=1:0, 1:1, 1:2に変化させて実験を行った。分光光度計はSHIMADZU UVmini-1240を用いた。

Lineweaver-Burk plot による阻害様式の判定

阻害様式の判定には、基質に*B. subtilis*乾燥菌体を用いたLineweaver-Burk plotにより行った。乾燥菌体は、*B. subtilis*の菌体懸濁液を遠心分離機(KOKUSAN H-18)により3000 rpmで5分間遠心分離した後、上清を捨て、沈殿した菌体を精製水で洗浄した。その後、再び3000 rpmで5分間遠心分離し、上清を捨て、沈殿した菌体を回収し、10倍量の体積の99.5%エタノールを加え攪拌した。懸濁液を乾燥させ、菌体が完全に乾燥した事を確認したのち、実験に用いた。基質には乾燥菌体懸濁液(0.017%, 0.025%, 0.05%)を用い、溶菌法と同様の反応系で Abs_{280} の減少値の測定により反応速度を計測した。

貝類のリゾチームを用いた反応速度の測定

貝類のリゾチーム(I型リゾチーム)の活性測定には、*Corbicula japonica*(ヤマトシジミ)と*Crassostrea gigas*(マガキ)のむき身抽出液を粗酵素液として用いた。ヤマトシジミ、マガキのむき身に5倍量の体積の200 mM リン酸緩衝液を加え、乳鉢ですり潰した後、遠心分離機を用いて3000 rpmで5分間遠心分離し、上清を回収し、粗酵素液とした。これらのヤマトシジミ、マガキの粗酵素液100 μlと、基質(*B. subtilis*の菌体)を用い、溶菌法と同様の反応系で OD_{600} の減少値の測定により反応速度を計測した。

統計解析

反応速度の有意差の判定には、t検定を用いた。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

References

- 1) 古川真一, “酸性多糖類による溶菌酵素阻害” 比治山女子短期大学紀要第30号, (1995), 49-53.
- 2) 古川真一, “褐藻フコイダンの消化系プロテアーゼ阻害” 比治山女子短期大学紀要第35号, (2000), 52-53
- 3) 阿部義人, “リゾチームの触媒機構: 無脊椎動物型とニワトリ型の比較から” 生物物理 57, (2017) 140-143.

- 4) 宮内浩二, 松宮正弘, 望月篤, “貝類リゾチームの体内分布” *日本水産学会誌* **69**, (2003), . 211-212.
- 5) 宮内浩二, 松宮正弘, 望月篤, “貝類のリゾチーム分布Ⅱ” *日本水産学会誌* **68**, (2001), 392-393.
- 6) 宮内浩二, 松宮正弘, 望月篤, “ヤマトシジミ・リゾチームの精製と性質” *日本水産学会誌* **66**, (1999), 275-276.
- 7) NPO フコイダン研究所, 九州大, (株) ヴェントゥーノ, (医法) 若宮病院, 宮崎義之, 中溝公次, 桐野智美, 立川大介, 立花宏文, 山田耕路, “フコイダン-アガリクスミックス経口摂取による抗がん剤投与に伴う免疫抑制の緩和 ～マウスモデル試験による検証～” 日本食品化学工学会第 61 回要旨 (2016)
- 8) NPO フコイダン研究所, 九州大, (株) ヴェントゥーノ, (株) 海藻サイエンスの会, Kamerycah Inc., (医法) 若宮病院, 宮崎義之, 中溝公次, 柴崎哲也, 桐野智美, 斎藤ゆず, 川原和弘, 大塚佳之介, 立花宏文, 山田耕路, 立川大介, “抗癌剤治療の副作用に対するフコイダン Mix の緩和効果” 日本食品化学工学会第 61 回要旨 (2016)

Acknowledgement

ご助言と試料提供を頂いた筑波大学の髙谷直樹教授には感謝する。