

天然由来硫酸多糖によるタンパク質加熱不溶化抑制

石丸隆行*1・松富直利*1

(宇部フロンティア大学短期大学部食物栄養学科)

Suppression of heat-induced insolubilization of protein by sulfate polysaccharides derived from nature

Takayuki Ishimaru *1 and Naotoshi Matsudomi*1

(Department of Food and Nutrition, Ube Frontier College)

本研究はデキストラン硫酸 (DS) をコントロールとし、天然由来の硫酸多糖であるヘパリン、カラギーナン、フコイダン及びコンドロイチン硫酸のタンパク質加熱不溶化抑制能を検討した。その結果、ヘパリン、カラギーナン及びフコイダンに高い加熱不溶化抑制能が確認された。加熱後の分子形態は、DS、ヘパリン、フコイダン、カラギーナン、コンドロイチン硫酸の順にモノマー残存率が高かった。添加濃度は DS 及びヘパリンでは 0.01%以上、カラギーナン及びフコイダンは 0.025%以上の添加で完全にタンパク質の加熱不溶化を抑制した。硫酸多糖に含まれる硫酸基の数が多いほど不溶化抑制能、モノマー残存率が高く、添加濃度は少量であった。

今回用いた硫酸多糖は現在幅広い分野利用されている。今回の結果から、これらの硫酸多糖は現在用いられている用途以外でも、タンパク質の加熱不溶化防止剤として医薬、食品産業等幅広い分野で利用できると考えられる。

キーワード：不溶化，硫酸多糖，硫酸基，静電気相互作用

Keyword: Insolubilization, Sulfate Polysaccharides, Sulfate Group, Electrostatic interaction

1. 序論

タンパク質は、食品業界をはじめ、工業、医薬など幅広い分野で利用されている。しかし、タンパク質は熱、pH 等の要因により、不活性化、変性、凝集、不溶化などを引き起こす。特に医薬産業においては抗体などの生理活性を持つタンパク質が加熱殺菌時に変性、凝集することにより、不活化し、利用できないなど問題が生じる。よって現在、タンパク質の加熱凝集をコントロールすることが課題となっている。現在までに様々な化合物が凝集抑制能を示すことが明らかになっている¹⁻¹¹⁾。その多くは低分子化合物であり、高分子化合物による凝集抑制の研究は低分子化合物と比較して少ない⁶⁻¹¹⁾。低分子化合物ではアミノ酸の一種であるアルギニンがタンパク質加熱不溶化抑制に幅広く用いられている。

以前の研究で、デキストラン硫酸 (DS) 及び高度リン酸化タンパク質であるホスピチン (PV) にタンパク質加

熱不溶化抑制能があることを報告した¹²⁾。そのメカニズムとして、DS の硫酸基、PV のリン酸基とタンパク質間での静電気相互作用により、凝集体のサイズを小さくすることで加熱による不溶化を防ぐことを明らかにしている。

低分子化合物でなく、高分子化合物を使う利点は低濃度で作用することである。アルギニンは不溶化凝集を抑制する際、数百 mM 必要とするのに対し、DS 及び PV では 0.5 μ M 以上で不溶化を抑制する¹²⁾。特に DS は高い不溶化抑制能を示すため、硫酸多糖に注目をした。

天然には数多くの硫酸多糖が存在している。図 1 に様々な硫酸多糖の構造を示す。(A) デキストラン硫酸はグルコースに硫酸基が結合しており、2 分子当たり硫酸基が 4 個結合している。(B) ヘパリンは基本骨格として、D-グルコサミン残基と L-イズロン酸残基の反復構

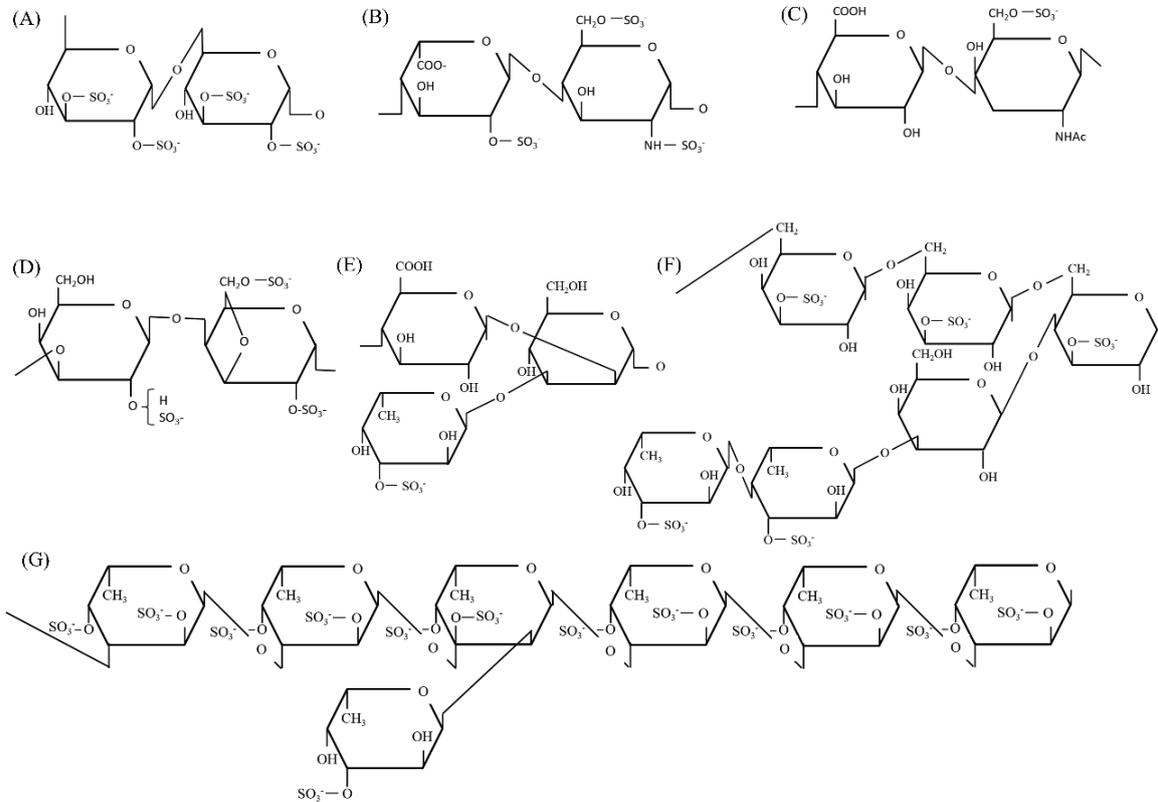


図1 硫酸多糖の構造

A: デキストラン硫酸, B: ヘパリン, C: コンドロイチン硫酸, D: λ -カラギーナン, E-G: フコイダン

造である。2分子あたり硫酸基が3個結合している。生体内に存在しており、医薬品として血液凝固防止剤として利用されている。(C)コンドロイチン硫酸はD-グルクロン酸とN-アセチルガラクトサミンの反復構造である。2分子あたり硫酸基が1個結合している。天然には動物の軟骨等に存在している。(D) λ -カラギーナンはガラクトースを基本骨格とし、硫酸基が3個結合している。天然には紅藻の細胞壁に存在しており、ゲル化剤として利用されている。(E-G)フコイダンは様々な構造をとったものが混在している。モズクなどの海藻に含まれている。構造はフコース、キシロース、ガラクトース、ウロン酸などから構成されている。そのため、2分子当たり硫酸基が1-4個結合している。

現在までに硫酸多糖を用いた研究は免疫、病気、発がん性など生体機能に関する研究がほとんどである。そのため、タンパク質の加熱不溶化抑制に関する研究はほとんどされていない。よって本研究ではDS以外の硫酸多糖にもタンパク質不溶化抑制能があるか、また、

どの硫酸多糖が高い加熱不溶化抑制能を持つか調べることを目的とした。

どのようなタンパク質に対し、硫酸多糖が不溶化抑制能を発揮するか調べるため、酸性タンパク質としてオボアルブミン(OVA)、 β -ラクトグロブリン(β -Lg)を、中性タンパク質としてオボトランスフェリン(OT)を、塩基性タンパク質としてリゾチーム(Lyz)及びソーマチン(TAU)の計5種類のタンパク質を用いた。

今回用いる硫酸多糖はDSを除き天然中に存在するものであり、高い不溶化抑制能を持つものは食品産業でも有用タンパク質の加熱不溶化を抑制し、食品中でのその機能を発揮させることができると考えられる。

2. 材料と方法

2.1.材料

OT, β -Lg, Lyz, DS (分子量: 500 KDa), λ -カラギーナンはSigma-Aldrich Japanより購入した。TAU, コンドロイチン硫酸は富士フィルム和光純薬株式会社

より購入した。ヘパリンはナカライテスク株式会社より購入した。フコイダンはタンゲルウッド株式会社より譲り受けた。OVA は新鮮な卵白から硫酸アンモニウムで結晶化させ、5 回再結晶を行い精製した。その純度は SDS-PAGE で確認した。今回の実験で使用したその他の化学物質は、すべて分析グレードのものを使用した。

2.2.濁度の測定

タンパク質及び硫酸多糖は、pH の異なる緩衝液にそれぞれ溶解した。緩衝液は McIlvaine 緩衝液(0.02 Mリン酸二水素ナトリウム/0.01 Mクエン酸)(pH 5.0)及び 10 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)を用いた。タンパク質単独溶液または混合溶液はウォーターバスを用いて 80°Cで 10 分間加熱した。加熱処理後、室温まで冷却した。濁度は、分光光度計を用いて測定した(O.D.500nm)。

2.3.電気泳動

SDS-PAGE は、Laemmli¹³⁾ が記載した標準的な方法に従って、10% (OVA, OT)または 15% (β -Lg, Lyz, TAU)ポリアクリルアミドゲルを用いて非還元条件下で行った。中性および塩基性 Native-PAGE は、Davis¹⁴⁾および Reisfeld¹⁵⁾が記載した方法に従って、12%ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。バンドは Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 で染色した。サンプルは、5,595 \times g で 10 分間遠心分離した後、フィルターろ過し、使用した。

3. 結果及び考察

3.1.タンパク質に対する加熱不溶化抑制能

各タンパク質に対する硫酸多糖の加熱不溶化抑制能をタンパク質単独の溶液または硫酸多糖を添加した混合溶液の濁度を測定することで調べた。使用した各タンパク質の分子量及び等電点は以前の論文に記載している¹²⁾。OVA 及び β -Lg は pH5.0, OT, Tau 及び Lyz は pH7.0 の緩衝液に溶解した。各種タンパク質及び硫酸多糖の濃度は終濃度 0.05%になるよう調整した。

図 2 に加熱前後の濁度の結果を示す。初めに酸性タンパク質の結果を示す。OVA 単独では加熱後、濁度の大幅な上昇がみられた。しかし、各種硫酸多糖の添加により、濁度の上昇が抑制された(図 2-A)。 β -Lg はコンドロイチン硫酸を除き、各種硫酸多糖添加により加熱後の濁度の上昇が抑制された(図 2-B)。

次に中性タンパク質 OT の加熱後の結果を示す。

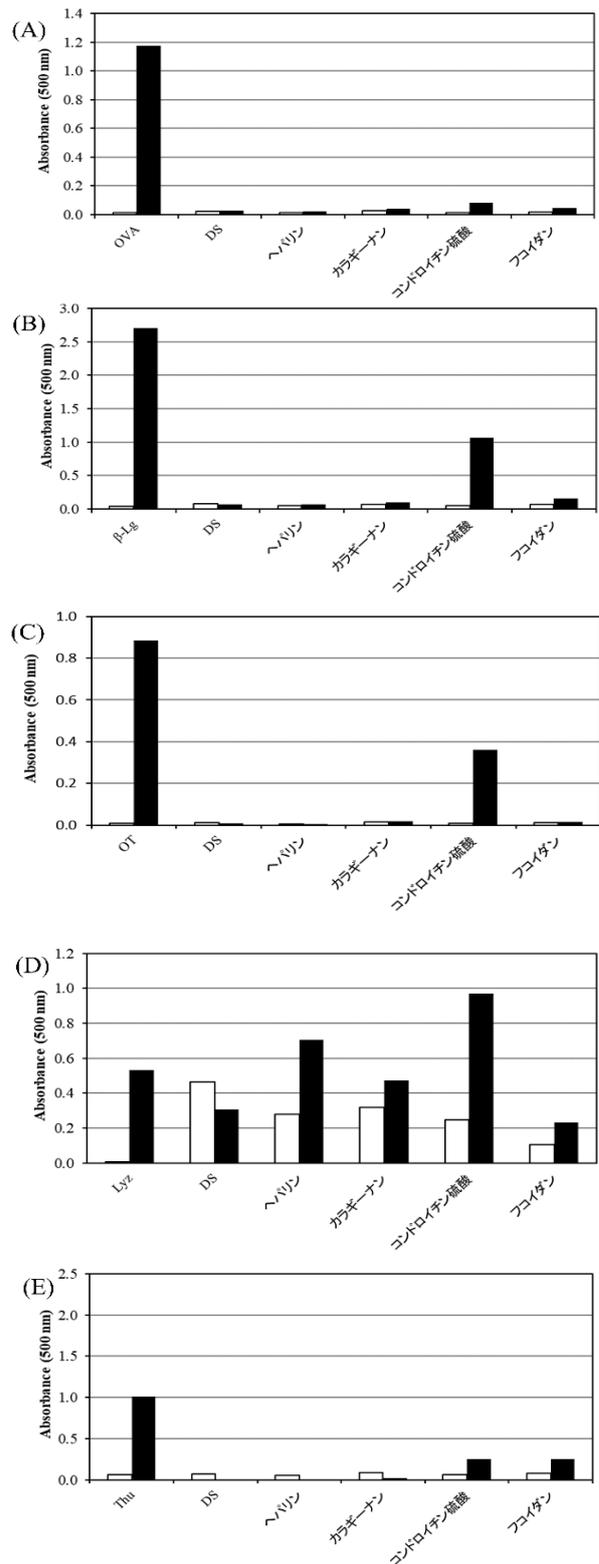


図 2 各種硫酸多糖のタンパク質加熱不溶化抑制能
各種硫酸多糖を添加、添加しないタンパク質溶液(0.5 mg/mL)を、80°Cで 10 分間での加熱前後、濁度を測定した。(A)OVA, (B) β -Lg, (C)OT, (D)Lyz, (E)TAU 白色は加熱前、黒色は加熱後を表している。

コンドロイチン硫酸を除いた硫酸多糖の添加により、加熱後、濁度の上昇が抑制された(図 2-C). 最後に塩基性たんぱく質の結果を示す. Lyz は硫酸多糖を添加した段階で加熱前でも不溶化がみられた(図 2-D). さらにその溶液を加熱すると, DS を除き, 大幅な濁度の上昇がみられた.

TAU においては各種硫酸多糖を添加すると加熱後濁度の上昇が抑制された. しかし, コンドロイチン硫酸及びフコイダンにおいては加熱後, わずかながら濁度の上昇がみられた.

以上の結果から, コンドロイチン硫酸を除き, 硫酸多糖を添加し, 加熱すると加熱不溶化が抑制された. この理由として, 硫酸多糖に含まれる硫酸基の数が関係していると考えられる. コンドロイチン硫酸は2分子当たり硫酸基の数が1つであるが, 他の硫酸多糖は2つ以上存在している. よって硫酸多糖による不溶化抑制能は分子内に含まれる硫酸基の個数が関与していることが示唆された.

Lyz の結果においては, Lyz は溶菌活性を持っており, その際, 細菌の細胞壁に含まれる β -N-グルコサミンと結合する. そのため, 糖と Lyz が結合し, リゾチームの持つ+チャージと硫酸多糖の-チャージが相互作用することで不溶化凝集が導かれたと示唆された¹⁶⁾.

3.2.加熱後の分子形態

加熱後の分子形態を調べるため, 非還元状態で SDS-PAGE を行った. SDS-PAGE の結果を図3に示す. Lyz (図3-D)及びTAU(図3-E)を除き, タンパク質単独の溶液では加熱後, 不溶化し, バンドが検出されなかった. 硫酸多糖の添加により, Lyz を除き, すべてのタンパク質溶液で加熱後, バンドが検出された. OVA では加熱後, 可溶性高分子のバンドがラダー状に検出された(図3-A). β -Lg 及び OTは加熱しても単一なバンドであった(図3-B, C). さらに詳細な分子形態を調べるため, Native-PAGE を行った. 図4に Native-PAGE の結果を示す.

Native-PAGE の結果, OVA はコンドロイチン硫酸及びフコイダンの添加ではバンドを検出することができなかったが, それ以外の硫酸多糖ではOVAは可溶性凝集体として存在していた(図4-A). β -Lg では, 硫酸多糖の添加により加熱後, 可溶性凝集体を形成するが, 多くがモノマー, ダイマーで存在していた. 特にDS及びカラギーナンにおいては可溶性凝集体形成が抑制されていた(図4-B).

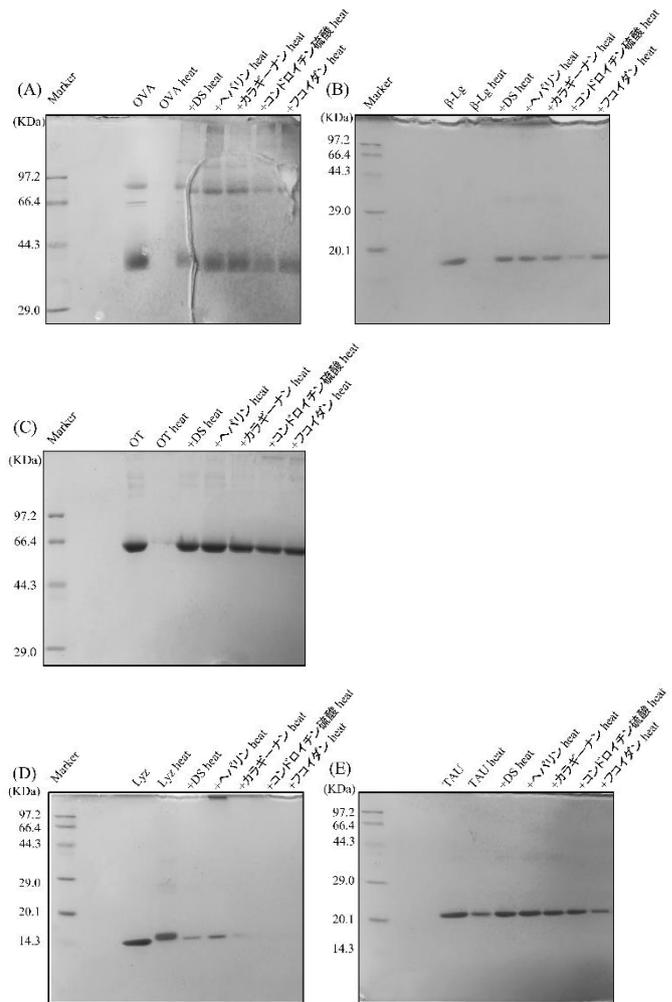


図3 SDS-PAGE による加熱後の分子形態解析
各種硫酸多糖を添加, 添加しないタンパク質溶液(0.5 mg/mL)を, 80°Cで10分間加熱した後, SDS-PAGE を行った. 分離ゲルの濃度は OVA 及び OT が 10%, その他は 15%ゲルを用いた. (A)OVA, (B) β -Lg, (C)OT, (D) Lyz, (E)TAU

OT においては DS, \heparin , カラギーナン添加では加熱後, 可溶性凝集体の形成が抑制され, モノマーとして存在していた(図4-C). コンドロイチン硫酸及びフコイダンではモノマーも存在していたが, 多くは可溶性凝集体を形成していた. 塩基性タンパク質の Lyz 及び TAU では硫酸多糖を添加し, 加熱すると SDS-PAGE ではバンドが検出されていたが, Native-PAGE ではバンドが検出されなかった(図4-D, E). これは pH が 7.0 の条件では等電点より緩衝液の pH が低い為, タンパク質は+の電荷を持っており, 硫酸多糖は-の電荷を持っているため, 静電気相互作用により電荷が打ち消され, バンドが検出されなかったと示唆された.

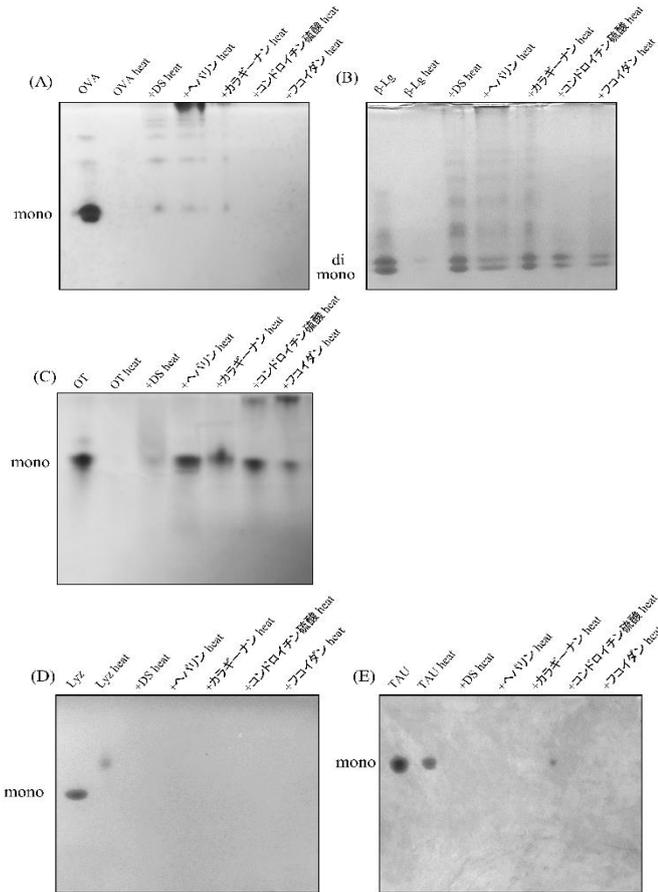


図4 Native-PAGEによる加熱後の分子形態解析
各種硫酸多糖を添加，添加しないタンパク質溶液(0.5 mg/mL)を，80℃で10分間加熱した後，Native-PAGEを行った。OVA, β-Lg, OT は中酸性用ゲルを，Lyz 及びTAU は塩基性ゲルを用いた。(A)OVA, (B)β-Lg, (C)OT, (D)Lyz, (E)TAU

以上の結果より，加熱不溶化抑制能及び分子形態保持能力はDSが一番高く，次にヘパリン，その後，フコイダン，カラギーナン，コンドロイチン硫酸の順であった。また，タンパク質の等電点により，分子形態保持能力が変わり，中性タンパク質においては硫酸多糖を添加するとモノマーで保持されていた。酸性タンパク質においては等電点が低いものは加熱後，可溶性高分子として存在するが，酸性タンパク質でも等電点が中性に近くなるほど加熱後もモノマーで残る割合が多くなり，可溶性高分子形成が抑制された。

3.3.最低濃度の検討

加熱不溶化抑制に対する各種硫酸多糖の最低濃度の検討を行った。その際，抑制能の低いコンドロイチン硫酸は除外した。また，硫酸多糖と反応し，不溶化を引き起

こす Lyz も除外し，4種類のタンパク質及び硫酸多糖で実験を行った。結果を図5に示す。

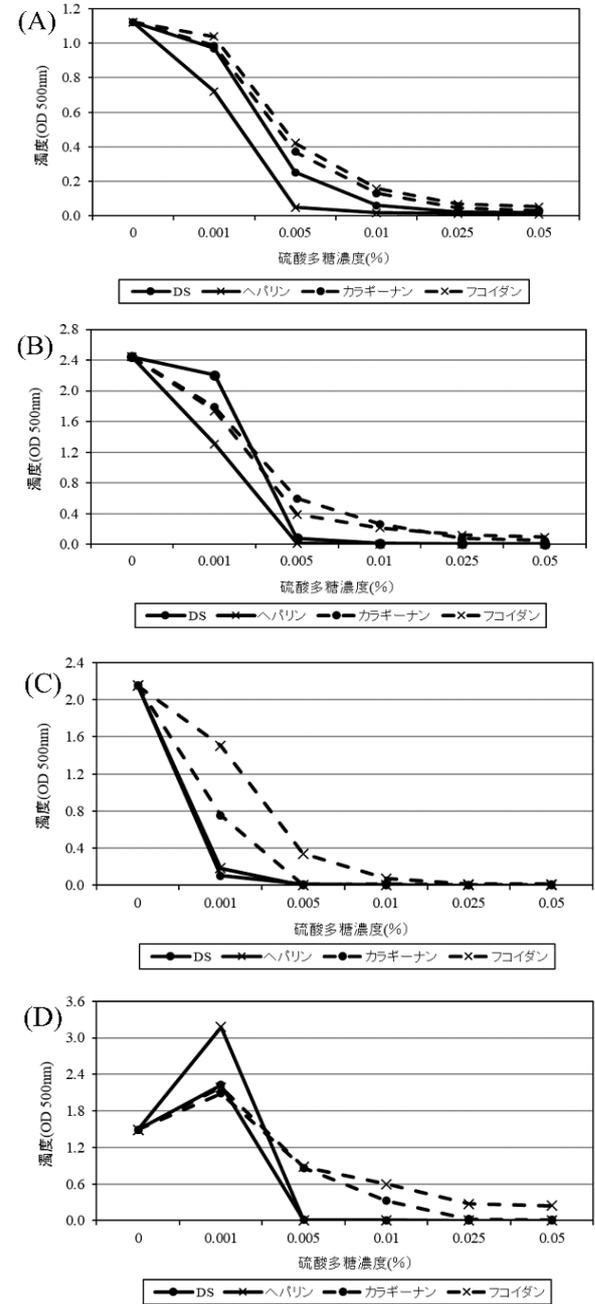


図5 硫酸多糖の最低濃度の検討

各種濃度(0-0.05%)の硫酸多糖を添加後，各種 pH に調整したタンパク質溶液(0.5 mg/mL) (OVA, β-Lg: pH5, OT, Tau: pH7.0)を，80℃で10分間加熱した後，濁度を測定した。(A)OVA, (B)β-Lg, (C)OT, (D)TAU

図5-A, Bに示す通り，OVA及びβ-Lgに対してはどの硫酸多糖も0.025%以上の添加により，完全に加熱不溶化を抑制した。

特にヘパリンでは 0.005%以上で完全に加熱不溶化を抑制した。OT に関しては DS 及びヘパリンでは 0.005%以上の添加で完全に不溶化を抑制した(図 5-C)。また、カラギーナン及びフコイダンにおいても 0.01%以上の添加で不溶化が抑制された。

最後に TAU においてはすべての硫酸多糖において 0.001%の添加で加熱不溶化が促進された(図 5-D)。特にヘパリン添加で不溶化が著しかった。しかし、0.005%以上の添加により、DS 及びヘパリンにおいては完全に不溶化が抑制された。カラギーナンにおいては 0.025%以上で完全に不溶化抑制能を示したが、フコイダンにおいては 0.05%添加しても完全な不溶化抑制能を示さなかった。

以上の結果より、DS 及びヘパリンはすべてのタンパク質において 0.01%以上添加することで、完全に加熱不溶化を抑制した。一方、カラギーナン及びフコイダンは 0.025%以上の濃度が必要であった。最低濃度も硫酸多糖に存在する硫酸基の数に比例していた。よって硫酸基が多いものはより低濃度でタンパク質の加熱不溶化抑制を示すことが示唆された。

3.4 静電気相互作用

以前の報告で、DS は他のタンパク質と静電気相互作用により、不溶化を抑制していることが明らかになっている¹³⁾。そこで、塩を添加し、静電気相互作用を打ち消すことで硫酸多糖とタンパク質間の静電的相互作用の力を調べた。結果を図 6 に示す。

タンパク質単独の場合、 β -Lg 及び Tau においては塩濃度依存的に濁度が減少する塩溶効果がみられた(図 6-B, D)。静電気相互作用はすべてのタンパク質において DS が最も強く、 β -Lg を除き、50 mM NaCl を添加しても加熱不溶化がみられなかった。ヘパリンは OT を除き 20 mM 以上の NaCl 存在下では不溶化抑制能が低下し、Tau では 100mM 以上の NaCl 存在下では凝集促進がみられた。カラギーナン及びフコイダンは 10 mM 以上の NaCl 存在下では不溶化抑制能が低下した。

この結果と図 1 に示した硫酸多糖に存在する硫酸基の数と静電気相互作用比較すると、DS が最も多く、2 分子当たり 4 個存在している。次にヘパリンが 2 分子当たり 3 個、カラギーナンが 3 個、フコイダンが 1-4 個存在している。図 6 の結果と照らし合わせると、硫酸基の数と静電気相互作用の力は比例していた。よって、硫酸基の数が多いほど、高塩濃度でもタンパク質の不溶化抑制能が高いことが示唆された。

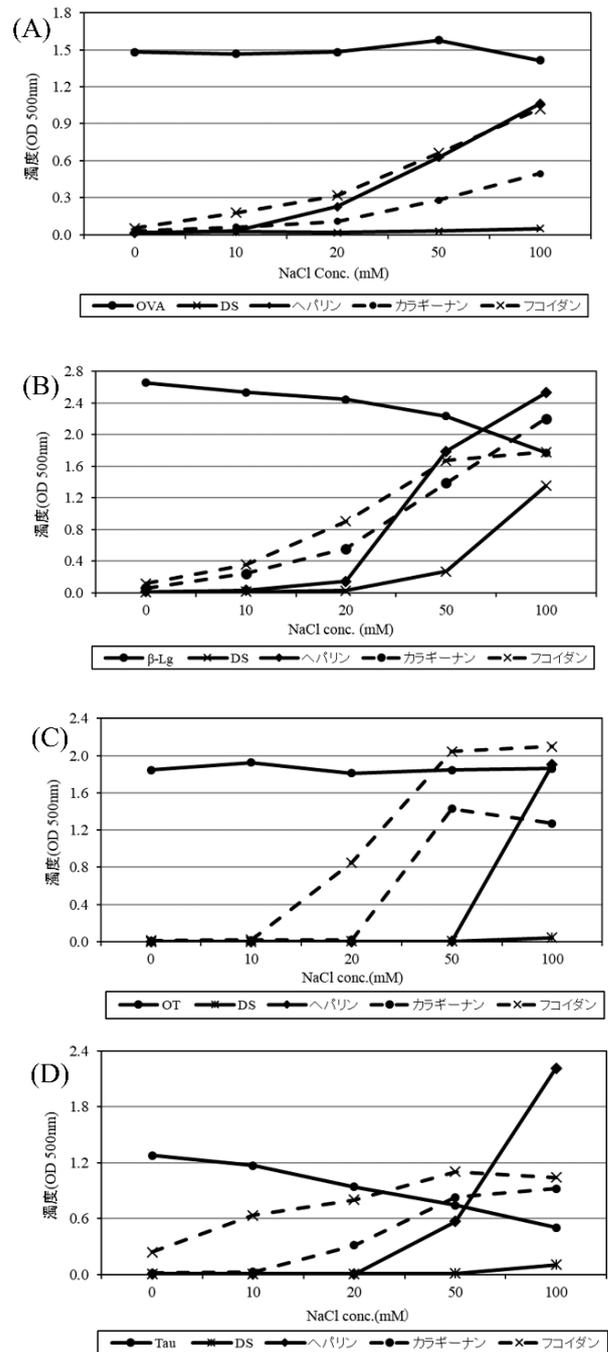


図 6 硫酸多糖と各タンパク質の静電気相互作用の力
各タンパク質及び硫酸多糖(0.5mg/mL)を各種 pH に調整し、(OVA, β -Lg: pH5, OT, Tau: pH7.0)溶液を調整後、NaCl を終濃度 0-100 mM になるよう添加し、80°Cで 10 分間加熱した後、濁度を測定した。(A) OVA, (B) β -Lg, (C) OT, (D) TAU

4. まとめ

今回の研究では DS, ヘパリン, カラギーナン, フコイダン及びコンドロイチン硫酸の 5 種類の硫酸多糖を用

いてタンパク質加熱不溶化抑制能を調べた。その結果、DS、ヘパリン、カラギーナン及びフコイダンに高い加熱不溶化抑制能がみられた。また加熱後の分子形態を調べた結果、モノマー残存率はDSが一番高く、次にヘパリンが、その後、フコイダン、カラギーナン、コンドロイチン硫酸の順であった。しかし、タンパク質の種類により高分子化を抑制できないものがあった。

添加濃度はDS及びヘパリンは0.01%以上、カラギーナン及びフコイダンは0.025%以上添加することにより、完全にタンパク質の加熱不溶化が抑制された。不溶化抑制能、分子形態及び添加量はタンパク質と硫酸多糖の静電気相互作用の力と比例しており、硫酸多糖に含まれる硫酸基の数が多いほど抑制能が高くなり、低濃度の添加で不溶化を抑制ができることが明らかになった。

今回用いた硫酸多糖はほとんどが天然に存在しているものであり、現在医薬、食品添加物等で幅広く利用されている。今回の結果から、これらの硫酸多糖は現在用いられている用途以外にもタンパク質の不溶化抑制能を持つことが明らかになることで、医薬、食品産業等幅広い分野で利用できると考えられる。

5. Reference

- 1) Shiraki, K., Kudou, M., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M. :Biophysical effect of amino acid on the prevention of protein aggregation. *J. Biochem.*, 132, pp591-595, 2002.
- 2) Kudou, M., Shiraki, K., Fujiwara, S., Imanaka, T., and Takagi, M. :Prevention of thermal inactivation and aggregation of lysozyme by polyamines. *Eur. J. Biochem.*, 270, pp4547-4554, 2003.
- 3) Shiraki, K., Kudou, M., Nishikori, S., Kitagawa, H., Imanaka, T., and Takagi, M. :Arginine ethylester prevent thermal inactivation and aggregation of lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, 271, pp3242-3247, 2004.
- 4) Matsuoka, T., Hamada, H., Matsumoto, K., and Shiraki, K. :Indispensable structure of solution additives to prevent inactivation of lysozyme for heating and refolding. *Biotechnol. Prog.*, 5, pp1515-1524, 2009.
- 5) Iwashita, K., Inoue, N., Handa, A., and Shiraki, K. :Thermal aggregation of hen egg white proteins in the presence of salts. *Protein J.*, 34, pp212-219, 2015.
- 6) Arakawa, T., and Timasheff, S.N. :Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins. *Biochemistry*, 24, pp6756-6762, 1985.
- 7) Matsudomi, N., Kazuichi, T., Moriyoshi, E., and Hasegawa, C. :Characteristics of heat-induced transparent gels from egg white by the addition of dextran sulfate. *J. Agric. Food Chem.*, 45, pp546-550, 1997.
- 8) Bhattacharyya, J., and Das, K.P. :Molecular chaperone-like properties of an unfolded protein, α s-casein. *J. Biol. Chem.*, 274, pp15505-15509, 1999.
- 9) Matudomi, N., Kanda, Y., Yoshika, Y., and Moriwaki, H. :Ability of α S-casein to suppress the heat aggregation of ovotransferrin. *J. Agric. Food Chem.*, 52, pp4882-4886, 2004.
- 10) Matsudomi, N., Ito, K., and Yoshika, Y. : Preventive effect of egg yolk phosvitin on heat-insolubilization of egg white protein and its application to heat-induced egg white gel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, pp836-842, 2006.
- 11) Chung, K.; Kim, J., Cho, B.K., Ko, B.J., Hwang, B.Y., and Kim, B.G. :How does dextran sulfate prevent heat-induced aggregation of protein? The mechanism and its limitation as aggregation inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1774, pp249-257, 2007.
- 12) 石丸隆行, 松富直利 : ホスビチン及びデキストラン硫酸を用いたタンパク質の不溶化抑制メカニズムの解明, 宇部フロンティア大学紀要・年報, 1, pp11-15, 2021.
- 13) Laemmli, U.K. :Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, pp680-685, 1970.
- 14) Davis, B.J. :Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 121, pp404-427, 1964.
- 15) Reisfeld, R.A., Lewis, U.J., and Williams, D.E. :Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, pp281-283, 1962.
- 16) Chiancone, E.; Bruzzesi, M.R.; and Antonini E.

[食物栄養学]

[原著論文]

Studies on dextran and dextran derivatives. X.
The interaction of dextran sulfate with lysozyme.
Biochemistry, 9, pp2823-2828, 1966.