報 文

養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構

山元裕太^{1,4*}, 佐田宏子², 森 健二², 大島賢治³, 高橋芳弘¹,
満生慎二¹, 柿原秀己⁴, 迎 勝也¹

¹九州産業大学工学研究科

²城西国際大学薬学部

³熊本高等専門学校八代キャンパス生物化学システム工学科

⁴(株)ゼンシン

The Mechanism of Hyaluronidase Inhibition by Rhamnan Sulfate Derived from Cultivated *Monostroma nitidum* (Hitoegusa)

Yuta Yamamoto^{1,4*}, Hiroko Sata², Kenji Mori², Kenji Oshima³, Yoshihiro Takahashi¹,
Shinji Mitsui¹, Hidemi Kakiyama⁴ and Katsuya Mukae¹

¹ Kyushu Sangyo University, Graduate School of Engineering, 2-3-1 Matsukadai,
Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 813-8503

² Josai International University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, 1 Gumyo, Togane-shi, Chiba 283-8555

³ National Institute of Technology Kumamoto College Department of Biological and Chemical
Systems Engineering, 2627 Hirayamashinmachi, Yatsushiro, Kumamoto 866-8501

⁴ Zenshin Co., Ltd., 2-17-1 Harisurichuo, Chikushino-shi, Fukuoka 818-0083

We examined the hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate derived from *Monostroma nitidum*, cultivated in Kumamoto Prefecture. Rhamnan sulfate containing 20 % (w/w) sulfate groups was used in this study, and Lineweaver-Burk analysis indicated a competitive inhibition mechanism. Rhamnan sulfate was desulfated or hyper-sulfated to obtain rhamnan sulfate preparations with different sulfate group contents (0.5, 7, and 41 % (w/w)). Subsequently, we examined the hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate with different sulfate content. Consequently, the rate of hyaluronidase inhibition by rhamnan sulfate increased in a sulfate group content dependent manner. The mixture of rhamnan sulfate and hyaluronidase produced a whitish, opaque material. IR and ¹H-NMR analyses identified the material as a rhamnan sulfate-hyaluronidase complex; the material is thought to have resulted from ionic interactions between the negative electric charge of the sulfate group and the positive electric charge of the lysine residues of hyaluronidase. In rhamnan sulfates with higher sulfate content, the formation yields of the complex increased and the degradation rates of hyaluronic acid in the complex-removed filtrate decreased. Thus, we presume that rhamnan sulfate and hyaluronidase form a water-insoluble complex through ionic interactions and that rhamnan sulfate inactivates hyaluronidase. (Received Jan. 11, 2017; Accepted Mar. 28, 2017)

Keywords : *Monostroma nitidum*, rhamnan sulfate, hyaluronidase, inhibition, complex

キーワード : ヒトエグサ, ラムナン硫酸, ヒアルロニダーゼ, 阻害, 複合体

褐藻, 紅藻, 緑藻類を含む海藻の細胞間マトリクスに存在する硫酸化多糖は, さまざまな生理活性を有することが報告されている. これらの物質が有する生理活性としては, 例えば, 抗酸化活性, 抗炎症活性 (ヒアルロニダーゼ阻害活性), 抗アレルギー活性, 抗腫瘍活性, 抗肥満活性, 抗糖尿病活性, 抗血液凝固活性および抗ウイルス活性¹⁾ 等がある. 褐藻類のメカブやコンブに含まれるフコイダンや紅藻類チノリモ由来の硫酸化多糖についてはヒアルロニ

ダーゼ阻害活性が *in vitro* 試験において報告されている²⁾³⁾.

ヒトの場合, 皮膚のシワやたるみの形成は皮膚の弾力低下や水分保持能力の低下が原因と考えられているが, これらは真皮中のコラーゲン, エラスチン, ヒアルロン酸等の細胞間マトリクス成分の減少が関わっている. 特にヒアルロン酸は結合組織に広く分布する高分子多糖体として知られており, 皮膚中の水分を保持する役割を担っている.

¹ 〒813-8503 福岡県福岡市東区松香台 2-3-1, ² 〒283-8555 千葉県東金市求名 1, ³ 〒866-8501 熊本県八代市平山新町 2627

⁴ 〒818-0083 福岡県筑紫野市針摺中央 2-17-1

*連絡先 (Corresponding author), yamamoto@zen-shin.jp

従って、ヒアルロン酸の減少を抑制することは皮膚の健康維持において重要である。このヒアルロン酸の減少を抑制するためにはヒアルロン酸の分解を防ぐ必要があり、ヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼの活性を阻害する物質が注目されている。

ヒアルロニダーゼはヒアルロン酸をD-グルクロン酸とN-アセチル-D-グルコサミンに加水分解する酵素であり、ヒアルロニダーゼの活性を阻害することは、ヒアルロン酸の過剰な分解を防ぎ、皮膚の老化を予防する方法の一つと考えられている。さらに、この酵素の阻害はアレルギー症状I型に関与する肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制と正の相関にある。すなわち、ヒアルロニダーゼ阻害物質は抗アレルギー、抗炎症作用を示す⁴⁾⁵⁾。このことからヒアルロニダーゼ阻害物質の探索は有用である。既報⁶⁾の*in vitro*試験において、ラムナン硫酸がヒアルロニダーゼ阻害活性を示すことを明らかにし、さらに他の硫酸化多糖であるフコイダン、カラギーナン、ポルフィランとの比較により硫酸化多糖のヒアルロニダーゼ阻害には硫酸基が関与していることを示した。

今回、既報⁶⁾で報告した熊本県産養殖ヒトエグサから分離した硫酸基含有率20% (w/w) のラムナン硫酸を用い、ヒアルロニダーゼ阻害様式をラインウィーバー＝バーク式により決定した。次に、このラムナン硫酸から、硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸を調製し、ヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす硫酸基の影響およびラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構について考察し、新しい知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料

既報⁶⁾の方法により熊本県産養殖ヒトエグサを酵素処理し、得られた多糖をエタノール沈殿および透析により精製し、凍結乾燥して得た硫酸基含有率20% (w/w) のラムナン硫酸（以後RS (20) とする）を実験の試料とした。

2. ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式の決定方法

ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式を調べるため、RS (20) を0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に0.25, 0.50 および0.75 mg/mL の濃度となるように溶解し、試料溶液とした。ヒアルロニダーゼ（ヒアルロニダーゼ Type IV-S from Bovine Testes (3000 U/mg), シグマ社製）は0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に1 mg/mL となるように溶解し酵素溶液とした。ヒアルロン酸ナトリウム（和光純薬製）は0.1 mol/mL 酢酸緩衝液に0.100, 0.125, 0.250, 0.500 および1.00 mg/mL の濃度となるように溶解し基質溶液とした。酵素溶液100 μ L にCompound 48/80 溶液（Compound 48/80（シグマ社製）2 mg と塩化カルシウム二水和物15 mg を0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) 4 mL に溶解）を100

μ L 加え37℃で20分間加温した。次に、試料溶液100 μ L と基質溶液（0.10, 0.125, 0.250, 0.500 および1.00 mg/mL）250 μ L をそれぞれ試験管に加え、10分間酵素反応させた。酵素反応後、0.4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液と0.4 mol/L 水酸化カリウム-0.8 mol/L ホウ酸溶液を各100 μ L ずつ加え、沸騰水中で3分間煮沸した。その後、室温まで冷却しp-ジメチルベンズアルデヒド試薬（p-ジメチルベンズアルデヒド5 g を氷酢酸44 mL, 10 mol/L 塩酸6 mL に溶解し、使用時に氷酢酸で10倍希釈した溶液）を3 mL 加え、37℃で20分間加温し、その後更に、室温まで冷却後、585 nm で吸光度を測定した。測定した吸光度と基質濃度の逆数の関係をLineweaver-Burk式に従ってプロットし、阻害様式を求めた。

3. ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構

(1) ラムナン硫酸の脱硫酸処理

RS (20) の脱硫酸処理はソルボリシス法⁷⁾により行った。RS (20) 100 mg を50 mL の蒸留水に溶解後、陽イオン交換樹脂（Dowex 50 W $\times$ 4, H形, Dow Chemical Co.）に供し、溶出液をピリジンで中和し、流水中で24時間透析を行った。その後、内液を凍結乾燥し、RS (20) とのピリジニウム塩を調製した。これを90% ジメチルスルホキシド-10% メタノール50 mL に溶解し、窒素雰囲気下80℃、4時間又は70℃、20分間加熱した。これらを流水中で24時間透析後、透析膜内液を凍結乾燥して2種類のRS (20) の脱硫酸化物を得た。脱硫酸化物の硫酸基含有率はロジゾン酸法⁸⁾により求めた。それぞれの硫酸基含有率は0.5% (w/w) [反応条件80℃、4時間]、7% (w/w) [反応条件70℃、20分間]であった。以後、硫酸基含有率0.5% (w/w) の脱硫酸化ラムナン硫酸をRS (0.5)、7% (w/w) のものをRS (7) とする。

(2) ラムナン硫酸の過硫酸化処理

RS (20) の過硫酸化処理はSoeda ら⁹⁾の方法で行った。RS (20) 200 mg を超純水50 mL に溶解させ、水酸化テトラブチルアンモニウムで中和し、凍結乾燥後、得られた粉末は五酸化二リンを入れたデシケータ中で無水状態にした。これを10 mL のジメチルホルムアミドに分散させ、その後、三酸化硫黄-トリメチルアミン複合体667 mg を加え、50℃で24時間静置反応させた。冷却後、飽和酢酸ナトリウムエタノール溶液を2-3 mL 加えた。さらに冷エタノールを添加し、沈殿物を回収した。回収物を蒸留水で溶解し、アンバーライト (IR120B NA) で脱塩後、凍結乾燥を行い、RS (20) の過硫酸化物を得た。過硫酸化物の硫酸基含有率をロジゾン酸法により求めた結果、硫酸基含有率は41% (w/w) であった。以後、本過硫酸化ラムナン硫酸をRS (41) とする。

4. ヒアルロニダーゼ阻害試験

硫酸基含有率の異なるそれぞれのラムナン硫酸RS (0.5)、RS (7)、RS (20) およびRS (41) を用い、ヒアル

ロニダーゼ阻害試験を既報の方法⁶⁾に従って行った。基質酢酸緩衝溶液を加えた時のそれぞれのラムナン硫酸の終濃度が、それぞれ 0.10, 0.12, 0.16, 0.18 および 0.20 mg/mL になるよう 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解したものを試料溶液とし、それぞれのラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害率 (%) を求めた。

5. 白濁物質の精製および IR 分析

ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼを混合すると白濁物質が生成するが、それを次の操作により精製し、IR 分析を行った。0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に RS (20) の濃度が 1 mg/mL となるように溶解した溶液 1.0 mL と同じく 0.1 mol/L 酢酸緩衝液にヒアルロニダーゼの濃度が 4 mg/mL となるよう溶解した溶液 0.5 mL を混合し、白濁物質の懸濁液を調製後、遠心分離を行い、上澄みを捨て白濁物質の沈殿物を得た。さらに酢酸緩衝液を取り除くため、70% エタノール水溶液で 3 回洗浄し、乾燥させたものを IR 分析に供した。

IR 測定は RS (20)、ヒアルロニダーゼおよび白濁物質をそれぞれ KBr 法にフーリエ変換赤外分光光度計 (日本分光 FT/IR-470Plus 型) で測定した。

6. 白濁物質の ¹H-NMR 分析

瓜生ら¹⁰⁾の方法を参考に、RS (20) 100 mg を重水 1 mL に溶解させ、RS (20) 溶液を調製し、母液として所定量を計り取って重水で希釈し使用した。ヒアルロニダーゼ 100 mg を重水 4 mL に溶解させ、ヒアルロニダーゼ溶液を調製した。NMR 用測定試料は、所定濃度に希釈した RS (20) 溶液 200 μL とヒアルロニダーゼ溶液 250 μL を濃度比 [RS (20)/ヒアルロニダーゼ]=0.1, 0.2 および 0.25 となるように NMR 管中で混合し、調製した。この NMR 管を 35℃ の恒温器中で一晩静置し、複合体を生成させたものを測定に用いた。調製した複合体の ¹H-NMR (BRUKER 社製 600 MHz スペクトロメーター) を測定した。

7. 白濁物質生成率の求め方

白濁物質の生成率は白濁物質生成後に溶液中に残存するヒアルロニダーゼ (蛋白質) の濃度を測定することにより求めた。硫酸基含有率の異なる RS (0.5), RS (7), RS (20) および RS (41) のラムナン硫酸を用い、0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に、それぞれ 0.20 mg/mL になるように溶解したものを試料溶液とした。この試料溶液 0.5 mL および 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 0.5 mL (コントロール溶液) に 4 mg/mL 酵素酢酸緩衝溶液 (ヒアルロニダーゼ Type IV-S from Bovine Testes (3000 U/mg), シグマ社製) 0.25 mL を加え、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの白濁物質の懸濁液を得た。この懸濁液を 0.2 μm メンブレンフィルター過により、白濁物質を除去して得たろ液の一部を実験に供した。それぞれのろ液中の酵素 (蛋白質) 残存率を Bradford 法¹¹⁾により調べた。それぞれのろ液 120 μL にブ

ラッドフォード試薬 3 mL を加え、10 分後に 595 nm の吸光度を測定したものを試料溶液吸光度 (Sp) とした。0.1 mol/L 酢酸緩衝液に酵素のみを溶解したものをコントロール溶液として上記と同様の操作を行ったものをコントロール溶液吸光度 (Cp) とした。酵素残存率は (1) 式、複合体生成率は (2) 式により求めた。

$$\text{酵素残存率 (\%)} = \frac{\text{試料溶液吸光度 (Sp)}}{\text{コントロール溶液吸光度 (Cp)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{複合体生成率 (\%)} = 100 - \text{酵素残存率 (\%)} \quad (2)$$

8. ヒアルロン酸分解率の求め方

実験方法 7. 項の操作により得たそれぞれのろ液の一部を試料溶液として用い、ろ液にヒアルロン酸ナトリウムを加え、それぞれのろ液のヒアルロン酸分解率を求めた。それぞれのろ液 150 μL に対し、Compound 48/80 溶液 100 μL を加え 37℃ で 20 分加温した。次いで、0.8 mg/mL 基質酢酸緩衝溶液 (ヒアルロン酸ナトリウム, 和光純薬製) 250 μL を加え 37℃ で 40 分間加温し、酵素反応後、0.4 mol/L 水酸化ナトリウム溶液 100 μL と 0.4 mol/L 水酸化カリウム-0.8 mol/L ホウ酸溶液 100 μL を加え、酵素反応を停止させた。沸騰水浴中で 3 分間加熱し、冷却後、p-ジメチルベンズアルデヒド試薬 3.0 mL を加え、37℃ で 20 分間加温後、紫外可視分光光度計 (U-2000 Spectrophotometer, HITACHI) で 585 nm の吸光度を測定し、これを試料溶液吸光度 (S_d) とした。さらに、試料溶液の代わりに 0.1 mol/L 酢酸緩衝液に酵素のみを溶解したコントロール溶液を、上記と同様の操作を行い、コントロール溶液吸光度 (C_d) とした。ヒアルロン酸分解率 (%) を (3) 式により算出した。

$$\text{ヒアルロン酸分解率 (\%)} = \frac{\text{試料溶液吸光度 (S}_d\text{)}}{\text{コントロール溶液吸光度 (C}_d\text{)}} \times 100 \quad (3)$$

実験結果および考察

1. ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式

まず、硫酸基含有率 20% (w/w) のラムナン硫酸を用い、ヒアルロニダーゼに対する阻害様式の検討を行った。阻害様式は基質濃度の逆数 (1/S) に対して反応速度の逆数 (1/V) をプロットする Lineweaver-Burk plot を用いて決定した。結果を Fig. 1 に示す。RS (20) の濃度を 0.00, 0.25, 0.50 および 0.75 mg/mL とした各直線が縦軸上で交差しており、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式は酵素の活性部位に直接作用する拮抗阻害であることが示された。

2. ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害機構

(1) ヒアルロニダーゼ阻害活性

既報⁶⁾では RS (20) を試料とし、RS (20) の濃度上昇と共にヒアルロニダーゼ阻害率が増加したことから、ラムナ

Fig. 1 Lineweaver-Burk plot for the hyaluronidase reaction inhibited by rhamnan sulfate
Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean $\pm$ SD.

Fig. 2 Hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate with different content rates of the sulfate group
Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean $\pm$ SD.

ン硫酸はヒアルロニダーゼ阻害活性を有することを報告した。ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式は1.項の結果より、酵素の活性部位に作用する拮抗阻害であることから、次に、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼの活性部位に及ぼす影響を検討した。RS (20) を脱硫酸処理又は過硫酸化処理することで得られた硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸 RS (0.5), RS (7) および RS (41) と RS (20) を試料とし、試料濃度を変えてヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。それぞれのラムナン硫酸の試料濃度において、横軸を硫酸基含有率、縦軸を阻害率とした時のヒアル

ロニダーゼ阻害試験の結果を Fig. 2 に示す。いずれの試料濃度でも、硫酸基含有率の増加とともに阻害率は高くなった。すなわち、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害は、ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼの活性部位に作用することにより発現すると考えられた。

(2) 水溶液中におけるラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体の生成

ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼを 0.1 mol/L 酢酸緩衝液 (pH 4.0) に溶解すると、Photo. 1 に示すように白濁物質の生成が観察され、白濁物質の生成の程度は硫酸基含有率

の高いラムナン硫酸ほど多かった。

Tomita¹²⁾, Kurinomaru¹³⁾ らは負電荷を持つ高分子と正電荷を持つ酵素（蛋白質）が静電的相互作用により複合体を生成し、酵素活性を減少させることを報告している。また、硫酸化多糖のヘパリンは抗血液凝固作用を示し、この作用機構はヘパリンの硫酸基および硫酸アミド基の持つ負電荷が抗凝血タンパク質であるアンチトロンビンⅢのリジン側鎖のアミノ基の正電荷とイオン相互作用により結合す

Photo. 1 Appearances of the 0.1 mol/L acetate buffer solutions (pH: 4.0) containing hyaluronidase alone or RS with different content rates of the sulfate group plus hyaluronidase

(a), Hyaluronidase; (b), RS (0.5) + hyaluronidase; (c), RS (7) + hyaluronidase; (d), RS (20) + hyaluronidase; (e), RS (41) + hyaluronidase.

The figure in the parenthesis denotes the content rate (% (w/w)) of the sulfate group.

ることで抗血液凝固作用を示すことが報告されている¹⁴⁾。我々はラムナン硫酸とヒアルロニダーゼも同様のイオン相互作用により複合体を生成していると考え、この白濁物質のより詳細な検討を行った。

(3) 白濁物質の IR 分析

RS (20)、ヒアルロニダーゼおよび白濁物質のそれぞれの IR 分析の結果を Fig. 3 に示す。白濁物質の IR スペクトルでは 1540cm^{-1} および 1260cm^{-1} に特異的な吸収を示し、ラムナン硫酸およびヒアルロニダーゼの IR スペクトルと比較すると 1540cm^{-1} の吸収はヒアルロニダーゼのアミドⅡバンドに由来し、 1260cm^{-1} の吸収はラムナン硫酸の硫酸基¹⁵⁾に由来していることがわかる。すなわち、この白濁物質はラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体であることが確認できた。

(4) 複合体の ^1H -NMR 分析

ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体生成機構を調べるため、複合体の ^1H -NMR 分析を行った。RS (20) とヒアルロニダーゼの複合体の ^1H -NMR の結果を Fig. 4 に示す。ヒアルロニダーゼの ^1H -NMR から 3.05 ppm にリジン残基の $\epsilon\text{-CH}_2$ のピークが確認でき、ラムナン硫酸の濃度が増加すると共に 3.05 ppm のシグナルが減少し、2.78 ppm に新たなシグナルが確認された。これは瓜生らが報告しているカードラン硫酸の硫酸基の負電荷とポリリジンのリジン残基の正電荷のイオン相互作用による複合体生成時のピークシフトと同じ現象であると考えられる¹⁰⁾。さらに、実験に供したヒアルロニダーゼの等電点はアミノ酸配列¹⁶⁾から等電点 7.94 であり、pH 4.0 の条件下でのヒアルロニダーゼのリジン残基は正電荷の状態となる。すなわち、ラ

Fig. 3 Infrared spectra of the RS (20)-hyaluronidase complex, RS (20), and hyaluronidase

The figure in the parenthesis denotes the content rate (% (w/w)) of the sulfate group.

Fig. 4 ^1H -NMR spectra of the RS (20)-hyaluronidase complexes formed between RS (20) and hyaluronidase at the RS (20)-to-hyaluronidase combination ratios of (a) 0.1, (b) 0.2, and (c) 0.25
The figure in the parenthesis denotes the content rate (% (w/w)) of the sulfate group.

Fig. 5 Effects of the content rates of the sulfate group in rhamnan sulfate on the formation yield of the RS-hyaluronidase complex and on the degradation rate of hyaluronic acid in the complex-removed filtrate
Each point represents the average of 3 measurements, and each bar indicates the mean $\pm$ SD.

ムナン硫酸とヒアルロニダーゼは水溶液中 (pH 4.0) でラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼのリジン残基の正電荷とイオン相互作用することにより複合体が生成したと考えられる。

(5) 複合体生成率とヒアルロン酸分解率およびラムナン硫酸の硫酸基含有率の関係

複合体はラムナン硫酸とヒアルロニダーゼから生成しており、不溶性の複合体をろ過によって除去し、ろ液から

複合体生成率を求めた。さらに、複合体を除去したろ液は遊離のヒアルロニダーゼが減少するので、このろ液を用いて、実験方法 8. 項に示す操作によりヒアルロン酸分解率を求めた。ろ液中に残存する遊離のヒアルロニダーゼのヒアルロン酸分解率と複合体生成率およびラムナン硫酸の硫酸基含有率の三者の関係を Fig. 5 に示した。横軸はラムナン硫酸の硫酸基含有率、縦軸 (左) は複合体生成率、縦軸 (右) はヒアルロン酸分解率を表す。ラムナン硫酸の硫酸基含有

率の増加に従い、ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体生成率は上昇し、それに伴い、ヒアルロン酸分解率は減少した。すなわち、硫酸基含有率の高いラムナン硫酸ほど、ヒアルロニダーゼと複合体を多く生成し、ろ液中のヒアルロニダーゼ含有量が減少したためヒアルロン酸の分解は抑制された。

ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害様式はラインウィーバー＝バークの式から、ラムナン硫酸が酵素の活性部位に作用する拮抗阻害であることが確認できた。硫酸基含有率の異なるラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害試験結果から、ヒアルロニダーゼの活性部位にラムナン硫酸の硫酸基が作用していることが考えられた。水溶液中 (pH 4.0) でラムナン硫酸とヒアルロニダーゼは複合体を生成することが観察された。ラムナン硫酸はその硫酸基含有量に応じて、ヒアルロニダーゼと複合体を生成することで遊離のヒアルロニダーゼを不活性化したことが確認できた。以上の結果および¹H-NMR 分析の結果から考察すると、ヒアルロニダーゼの活性中心の一つはリジン残基と考えられ、ラムナン硫酸の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼの活性部位であるリジン残基の正電荷がイオン相互作用を通して複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化することで、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害が発現していると考えられる。

本研究の結果は、海藻資源の利用促進に役立つと考えられるが、今後、広義的に工業製品としての利用および実用化のためには、体内で吸収できるオリゴ糖まで低分子化したラムナン硫酸の *in vivo* 試験での更なる検討が必要であると考えられる。

要 約

熊本県産養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸の硫酸基がヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす影響およびその阻害機構を検討した。硫酸基含有率 20% (w/w) のラムナン硫酸を用い、ラインウィーバー＝バーク式からヒアルロニダーゼ阻害様式は酵素の活性部位に直接作用する拮抗阻害であることが確認された。ラムナン硫酸の硫酸基含有率がヒアルロニダーゼ阻害活性に及ぼす影響を調べるために、硫酸基含有率 20% (w/w) のラムナン硫酸の脱硫酸処理、過硫酸化処理により、硫酸基含有率が 0.5, 7, 41% (w/w) のラムナン硫酸を調製し、硫酸基含有率 20% (w/w) のラムナン硫酸を含め、各ラムナン硫酸の濃度を変えて、ヒアルロニダーゼ阻害試験を行った。その結果、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害率は硫酸基含有率の増加と共に高くなった。ラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの混合により生成した白濁物質について、その IR 分析および¹H-NMR 分析結果から、この白濁物質はラムナン硫酸とヒアルロニダーゼの複合体であり、ラムナン硫酸中の硫酸基の負電荷とヒアルロニダーゼのリジン残基の正電荷のイオン相互作用

により複合体が生成していることが示唆された。硫酸基含有率の高いラムナン硫酸ほど複合体生成率は上昇し、複合体を除去したろ液のヒアルロン酸分解率は低下した。すなわち、ラムナン硫酸はヒアルロニダーゼとイオン相互作用により水に不溶な複合体を生成し、ヒアルロニダーゼを不活性化することで、ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害が発現していることが推察された。

文 献

- 1) Vo, T.S., Ngo, D.H., Kang, K.H., Jung, W.K., and Kim, S.K. (2015). The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**, 129-138.
- 2) 室田明彦 (2011). 食品への応用を目的としたフコイダンによる酵素阻害性と分子量相関に関する研究. 明治大学科学技術研究所年報, **53**, 59-60.
- 3) Mase, T., Yamauchi, M., Kato, Y., Esaki, H., and Isshiki, S. (2013). Hyaluronidase-inhibiting acidic polysaccharide isolated from *porphyridium purpureum*. 岡山女学園大学研究論集, **44**, 105-113.
- 4) 野村篤志, 渡邊雄二, 安武俊一, 野々垣常正 (2007). 多糖体含有抽出成分の抗アレルギー効果について, 金城学院大学論集自然科学編, **4**, 20-24.
- 5) 増田勝己, 石原良子, 今川ゆかり, 谷 政八 (2005). 食用野草のヒアルロニダーゼ阻害活性と抗補体活性. 仁愛女子短期大学研究紀要, **37**, 47-51.
- 6) Yamamoto, Y., Ozono, M., Oishi, T., Oshima, K., Mitsuki, S., Kakihara, H., and Mukae, K. (2016). Hyaluronidase-inhibitory activity of rhamnan sulfate obtained from cultivated *Monostroma nitidum* (Hitoegusa). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi)*, **63**, 545-549 (山元裕太, 大園紅葉, 大石智博, 大島賢治, 満生慎二, 柿原秀己, 迎 勝也, 養殖ヒトエグサ由来ラムナン硫酸のヒアルロニダーゼ阻害活性, 日本食品科学工学会誌).
- 7) Nagasawa, k., Inoue, Y., and Tokuyasu, T. (1979). An improved method for the preparation of chondroitin by solvolytic desulfation of chondroitin sulfates. *J. Biochem.*, **86**, 1323-1329.
- 8) Kakegawa, H., Matsumoto, H., and Sato, T. (1985). Activation of hyaluronidase by metallic salts and compound 48/80 and inhibitory effect of antiallergic agents on hyaluronidase. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 642-646.
- 9) Soeda, S., Sakaguchi, S., Shimeno, H., and Nagamatsu, A. (1992). Fibrinolytic and anticoagulant activities of highly sulfated fucoidan. *Biochem. Pharmacol.*, **8**, 1853-1858.
- 10) 瓜生敏之, 鬘谷 要, 全 寛俊, 奥山光作, Huricha Baigude, 松井崇博, 小俣 拓 (2007). エイズ薬カードラン硫酸とタンパク質の相互作用の NMR による解析. 帝京科学大学紀要, **3**, 45-53.
- 11) Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 12) Tomita, M., and Shiraki, K. (2011). Poly (acrylic acid) is a common noncompetitive inhibitor for cationic enzymes with high affinity and reversibility. *J. Polymer Sci.*, **49**, 3835-3841.
- 13) Kurinamaru, T., Tomita, S., Kudo, S., Ganguli, S., Nagasaki, Y., and Shiraki, K. (2012). Improved complementary polymer

- pair system : switching for enzyme activity by pegylated polymers. *Langmuir*, **28**, 4334-4338.
- 14) Lindahl, U., Backstrom, G., and Thunberg, L. (1983). The antithrombin-binding sequence in heparin. *J. Biol. Chem.*, **258**, 9826-9830.
- 15) Nakamura, M., Yamashiro, Y., Konishi, T., Hanasiro, I., and Tako, M. (2011). Structural characterization of rhamnan sulfate isolated from commercially cultured *Monostroma nitidum* (Hitoegusa). *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* (*Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*), **58**, 245-251 (中村昌宏, 山城陽一, 小西照子, 花城勲, 田幸正邦. 養殖ヒトエグサから分離したラムナン硫酸の構造特性, 日本食品科学工学会誌).
- 引用 URL
- i) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=515397> (2016. 11. 23)
(平成 29 年 1 月 11 日受付, 平成 29 年 3 月 28 日受理)
-