

## 活性酸素によるヒアルロン酸の解重合反応に及ぼす 二、三の蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸の影響<sup>#</sup>

佐藤 郁夫<sup>\*</sup>・柏村 直樹

三重大学生物資源学部

### The Effect of Some Proteins, A Peptide, and Amino Acids in the Depolymerization of Hyaluronic Acid by Active Oxygen Species

Ikuko SATO and Naoki KASHIMURA

Faculty of Bioresources, Mie University

#### Abstract

The effect of proteins, a polypeptide, and amino acids such as albumin,  $\epsilon$ -polylysine and histidine in the depolymerization of hyaluronic acid was examined. All of the proteins, a polypeptide, and amino acids examined suppressed the depolymerization with different inhibition ratios. In addition, the inhibition ratio in the depolymerization of hyaluronic acid by D-fructose 6-phosphate -  $\text{Cu}^{2+}$  differed from that in the depolymerization of hyaluronic acid by hydrogen peroxide. These results suggested that the mode of depolymerization of hyaluronic acid and active oxygen species involved in the reaction were different between the two systems. Incomplete inhibition of  $\epsilon$ -polylysine and lysine in the depolymerization of hyaluronic acid by hydrogen peroxide implied the involvement of some active oxygen species in the reaction.

Key words : hyaluronic acid • depolymerization • active oxygen species •  
proteins •  $\epsilon$ -polylysine

#### 緒 言

これまでに生体内多糖の一つであるヒアルロン酸が糖質由来の活性酸素により解重合を受けることを見いだしている<sup>1, 2)</sup>。これらの反応は、タバコモザイクウイルスやバクテリオファージ  $\phi$  X174 の不活化作用<sup>3)</sup>と同じ

ように2価の銅イオンの存在で促進されたが、ヒアルロン酸の起源の相違により解重合の程度が異なる現象がみられた。現在、動物と微生物由来のヒアルロン酸間で構造等に差がないと言われていることから、この原因としてそれらの分子量か含有の不純物の違いが考えられた。分子量の異なる微生物由来のヒアルロン酸でその解重合に差がみられなかったこと<sup>1)</sup>より、我々は後者の可能性が高いと考えた。

活性酸素の生成を促進あるいは阻害する化合物については多くの研究が行われている<sup>4)</sup>。それらの中で、ヒア

<sup>#</sup> 本研究は佐藤郁夫の学位論文研究の一部として行われた。

<sup>\*</sup> 本学部生物資源学研究科，生物機能応用科学専攻  
現在，テッソ(株)水俣製造所勤務

ルロン酸の起源に影響を受ける不純物として含まれる蛋白質が考えられる。蛋白質は活性酸素により変性等の影響を受けることは良く知られており、蛋白質の主鎖又はその残基と多糖の活性酸素種に対する反応性の相違がヒアルロン酸解重合の程度差の原因であると考えられた。そこで、本研究では活性酸素によるヒアルロン酸解重合反応に対する蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸の添加効果について検討した。

### 実験材料および方法

#### 1. 材料

乳酸菌 *Streptococcus zooepidemicus* 由来のヒアルロン酸ナトリウム塩（平均分子量約 100 万）と *Streptomyces albulus* 由来の  $\epsilon$ -ポリリジン塩酸塩（平均分子量約 4000）はチッソ（株）より恵与されたものを用いた。D-フラクトース 6-リン酸は Sigma 製を、過酸化水素は三徳化学製を使用した。アミノ酸類は和光純薬製を用いた。また、蛋白質のうちアルブミン（Bovine）、チトクローム c（Horse Heart Type 3）およびインスリン（Bovine Pancreas Crystalline）は Sigma 製を、 $\alpha$ -グロブリン（Bovine FR 4-1）とヘモグロビン（Human 2x crystallized）は INC Pharmaceuticals 製を使用した。

#### 2. D-フラクトース 6-リン酸と過酸化水素によるヒアルロン酸解重合反応

ヒアルロン酸の反応液中での終濃度が 1.0% になるように、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解後、同じ緩衝液に溶解した硫酸銅、D-フラクトース 6-リン酸、過酸化水素および蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸溶液のそれぞれを適宜添加し、1 分間手で振とう攪拌後、37°C で静置した。その後経時的にサンプリングし、E 型回転粘度計（東京計器製）を用いて回転数 1-100 rpm、25°C で粘度を測定した。なお、粘度の単位には mPa・s を用いた。

#### 3. 阻害率の計算

D-フラクトース 6-リン酸、過酸化水素によるヒアルロン酸解重合反応に対する蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸の阻害率を次式で計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (V_p - V_a) / (V_c - V_a)] \times 100$$

Vc: ヒアルロン酸のみを 24 時間処理した時の粘度

Va: 蛋白質、ポリペプチドあるいはアミノ酸無添加での 24 時間後の反応液の粘度

Vp: 蛋白質、ポリペプチドあるいはアミノ酸添加による 24 時間後の反応液の粘度

### 結果および考察

これまでに活性酸素の蛋白質への影響については数多く報告されている。特に川岸らによって蛋白質中のヒスチジンとトリプトファンが活性酸素により酸化を受けやすく<sup>5, 6)</sup>、ヒスチジンと同様にイミダゾール環を有する化合物に活性酸素捕捉作用があることが報告されている<sup>7)</sup>。また加藤らは、牛血清アルブミンやグリケート化された牛血清アルブミンに活性酸素捕捉作用があると報告している<sup>8)</sup>。

そこで我々は活性酸素によるヒアルロン酸解重合反応に対する市販の種々の蛋白質の添加効果について検討した。使用したヒアルロン酸中の蛋白質含量が 0.1% 以下であるので、その添加量をヒアルロン酸重量の 1 および 0.1%（反応液中の蛋白質濃度としてはそれぞれ 0.01 および 0.001%）とした。

検討した蛋白質間でその程度に差はあるものの、全ての蛋白質が活性酸素によるヒアルロン酸の解重合反応をそれらの添加濃度に応じて阻害した。ヘモグロビンは 0.001% で 28.3% の高い解重合阻害率を示した (Table 1)。調製されたヒアルロン酸中に残存する動物組織や微生物細胞由来の蛋白質含量によっては、活性酸素によるヒアルロン酸の解重合反応に大きな影響を与えるものと考えられる。これまでに種々の活性酸素生成系を用いてヒアルロン酸解重合反応が検討されているが<sup>9)</sup>、これらの研究を進める上で、調製したヒアルロン酸中の蛋白質にも十分注意してその結果を比較する必要があると思われる。

活性酸素生成系として 2 価の銅イオン存在下での D-フラクトース 6-リン酸および過酸化水素系を用いて解重合に及ぼすリジンのホモペプチドである  $\epsilon$ -ポリリジン（塩酸塩）の影響をみた (Fig. 1)。これらの活性酸素生成系でリジンあるいは  $\epsilon$ -ポリリジンが存在しない場

Table 1. Inhibition effect of proteins in the depolymerization of hyaluronic acid by D-fructose 6-phosphate

	Protein concentration (%)	Inhibition ratio (%)
Albumin	0.001	3.5
	0.01	47.5
Cytochrome c	0.001	15.7
	0.01	63.9
$\alpha$ -Globulin	0.001	2.4
	0.01	24.4
Hemoglobin	0.001	28.3
	0.01	94.2
Insulin	0.001	11.8
	0.01	60.5

Hyaluronic acid (1%) solution containing D-fructose 6-phosphate (1 mM) and  $\text{Cu}^{2+}$  (10  $\mu\text{M}$ ) was incubated with protein (0.001 and 0.01%) at 37°C for 24 h.

For inhibition ratio, see Materials and Methods.

合には同程度のヒアルロン酸の解重合が起こるように条件を設定してある。ε-ポリリジン（塩酸塩）およびそのモノマーであるリジン（塩酸塩）の場合も蛋白質同様に活性酸素捕捉作用が認められた。さらに過酸化水素による活性酸素生成系の方がより大きな阻害が見られ、活性酸素生成系でその阻害率に差が生じた。これは、D-フラクトース 6-リン酸-2 価銅イオン系および過酸化水素系では解重合に関与する活性酸素種が異なるか、その生成経路が異なることによると考えられる。また、D-フラクトース 6-リン酸と ε-ポリリジンあるいはリジン間でアミノカルボニル反応が起こり、この反応が若干解重合反応を促進している可能性も考えられる。ε-ポリリジンが、残基数の同じ濃度でリジンに比べ約 2 倍程度高い阻害率を与えた。現在のところ理由は明らかではないが、高分子のポリリジンがヒアルロン酸と会合し、活性酸素の攻撃からヒアルロン酸を保護する効果が增大するのかもしれない。Fig. 2 において ε-ポリリジン、リジンともに 0.01 % 以上の添加でその阻害効果が頭打ちになるのは、過酸化水素系によるヒアルロン酸の解重合反応が単一の活性酸素種のみによっておこっていないことを物語るものである。このような現象はヒアルロン酸解重合反応の SOD による阻害実験でもみられた<sup>1)</sup>。

Table 2 に種々のアミノ酸添加によるヒアルロン酸解重合反応の阻害効果を示した。アミノ酸のヒアルロン

酸の解重合への影響は、川岸らの研究結果から予測されるように、1 mM ヒスチジンの添加によって 94.6 % の高い解重合阻害効果がみられた。これはヒアルロン酸の解重合に関与する活性酸素がヒスチジンを優先して酸化したためと言える。

このように蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸はヒアルロン酸量の 1 および 0.1 % 程度のわずかな量でヒアルロン酸解重合反応を強く阻害した。これはヒアルロン酸の解重合を引き起こす活性酸素がヒアルロン酸よりはむしろ蛋白質、ポリペプチドやアミノ酸をより選択的に攻撃するためであると言える。

以上のように活性酸素によるヒアルロン酸解重合反応は蛋白質、ポリペプチドおよびアミノ酸により効果的に阻害された。このことから動物や微生物由来のヒアルロン酸の解重合反応を検討する際には、用いるヒアルロン酸の精製を十分に行う必要があり、実験結果を相互に比較する場合は蛋白含量が同じか、よく似たヒアルロン酸を使用することが望ましい。さらに、生体内で発生した活性酸素はヒアルロン酸よりその周辺に存在するコラーゲンなどの蛋白質を選択的に攻撃するのではないかと推察される。

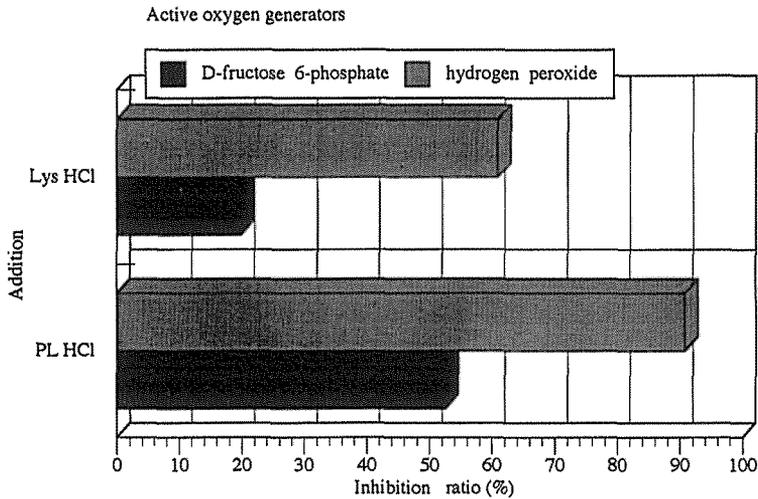


Fig. 1. Inhibition effect of  $\epsilon$ -polylysine HCl (PL HCl) and lysine HCl (Lys HCl) in the depolymerization of hyaluronic acid by D-fructose 6-phosphate (F-6-P) and by hydrogen peroxide. Hyaluronic acid (1%) solution containing F-6-P (1 mM) and  $\text{Cu}^{2+}$  ( $10 \mu\text{M}$ ) or hydrogen peroxide (1%) was incubated with PL HCl (0.01%) or Lys HCl (0.01%) at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h.

For inhibition ratio, see Materials and Methods.

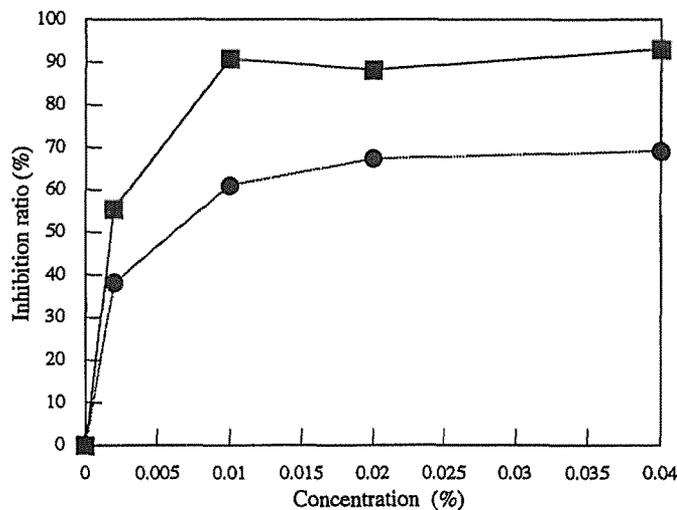


Fig. 2. Effect of concentration of  $\epsilon$ -polylysine HCl (PL HCl) and lysine HCl (Lys HCl) in the depolymerization of hyaluronic acid by hydrogen peroxide. Hyaluronic acid (1%) solution containing hydrogen peroxide (1%) was incubated with PL HCl (■) or Lys HCl (●) at  $37^\circ\text{C}$  for 24 h.

For inhibition ratio, see Materials and Methods.

Table 2. Inhibition effect of amino acids in the depolymerization of hyaluronic acid by hydrogen peroxide

Addition	Inhibition ratio (%)
Lys	55.4
Arg	49.2
Glu	70.7
Asp	76.0
His	94.6
Gly	43.2
Ala	34.8

Hyaluronic acid (1%) solution containing hydrogen peroxide (1%) was incubated with amino acids (1 mM) at 37 °C for 24 h.

For inhibition ratio, see Materials and Methods.

結 論

活性酸素によるヒアルロン酸の解重合反応が蛋白質, ポリペプチドやアミノ酸によりそれらの添加量に応じて阻害された。ヒアルロン酸の起源の相違により解重合の程度が異なる原因としてサンプル中に微量に存在している蛋白質あるいはその分解物の作用によるためではないかと考えられる。

要 約

2価銅イオン存在下でのD-フラクトース 6-リン酸および過酸化水素系によるヒアルロン酸解重合反応に及ぼす蛋白質, ポリペプチドおよびアミノ酸の影響を研究した。使用した蛋白質, ポリペプチド, アミノ酸全てに, 程度に差はあるものの, 解重合反応阻害効果が認められた。これらの異なる活性酸素生成系でその阻害率が異なったが, これは発生している活性酸素種が異なるためと考えられる。さらに, ε-ポリリジンとリジンの添加効果が0.01%以上で頭打ちになることより, 過酸化水素系によるヒアルロン酸解重合反応には複数(2つ以上の意味)の活性酸素種が関与しているものと推察された。

謝 辞

本研究を行うに当たり多大な御助言を頂いた当研究室の西川司朗助教授に心から感謝致します。

引用文献

- 1) SATO, I., J. ZU, S. NISHIKAWA and N. KASHIMURA. Depolymerization of hyaluronic acid by D- fructose 6-phosphohate, *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 2005 - 2009 (1993).
- 2) SATO, I., Y. YOSHIDA, S. NISHIKAWA, M. INAGAKI and N. KASHIMURA. *In vitro* depolymerization of hyaluronic acid by oligosaccharide-derived oxygen radical species. In *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine* (ed. by K. Asada and T. Yoshida, Excerpta Medica, Amsterdam), p 167 - 168 (1994).
- 3) KASHIMURA, N., I. SATO, Z. KUMAZAWA, H. KUNO, S. KOYAMA and M. KITAGAWA. Generation of superoxide and *in vitro* inactivation of viruses by aldopentoses, *Agric. Biol. Chem.*, 46:2407-2409, (1982).
- 4) HALLIWELL, B. and J. M. C. GUTTERIDGE : フリーラジカルと生体 (松尾光芳, 嵯峨井勝, 吉川敏一訳, 学会出版センター), p 71-149 (1988).
- 5) UCHIDA, K. and S. KAWAKISHI. Selective oxidation of imidazole ring in histidine residues by the ascorbic acid-copper ion system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138 : 659-665 (1986).

- 6) UCHIDA, K. and S. KAWAKISHI. Selective oxidation of tryptophan and histidine residues in protein through the copper-catalyzed autoxidation of L-ascorbic acid, *Agric. Biol. Chem.*, 52: 1529-1535 (1988).
- 7) 内田浩二, 三井美香, 川岸舜朗. 活性酸素に対するイミダゾール関連化合物の反応とその酸化抑制作用. 日本農芸化学会昭和 63 年度大会講演要旨, 名古屋, p 215 (1988).
- 8) OKAMOTO, G., F. HAYASE and H. KATO. Scavenging of active oxygen species by glycosylated proteins, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 928-931 (1992).
- 9) 柏村直樹. 糖質と活性酸素. 蛋白質核酸酵素, 33: 3116-3126 (1988).