

報 文

粘液糖蛋白質の溶液物性評価

渡邊 康[§], 猪子 洋二*

Structural Characterization of a Mucous Glycoprotein in Solution

Yasushi Watanabe[§] and Yoji Inoko*[§]National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

*Graduate School of Engineering Science, Osaka University, 1-3 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

Abstract

Molecular assembly and the chain conformation of intact porcine stomach mucin in dilute solution were characterized by using low-angle laser light scattering and small-angle X-ray scattering methods. The specific refractive index increment of the mucin was estimated to be 0.16 ml/g to determine the molecular weight by the low-angle laser light scattering photometry combined with high performance gel chromatography. Weight-averaged molecular weight of the mucin was 8.9 million and the molecular weight of the two main fractionated components was about 4 million and several hundred thousand. Fractal analysis of small-angle X-ray scattering data revealed that the intact mucin molecule is a chain with excluded volume (fractal dimension is 1.67). Moreover, the Kratky plots of the SAXS data showed that the chain conformation of the mucin molecules is an unfolded structure in solution.

蛋白質は食品構成成分として重要な素材であるため、食品科学および食品産業における蛋白質の特性解析は重要な課題の一つである。ムチンは消化管上皮などで蛋白質に複数のオリゴ糖が結合した粘液層の粘液主成分である複合生体高分子である¹⁾。その生理機能に関しては、潤滑液のおよび粘膜防御の役割が示唆されている²⁾。また、腫瘍免疫関連の糖鎖生物学的研究も展開されている³⁾。また、食品添加物としても利用可能とされているのでその溶液物性の知見を得ることは素材の有効利用を考える上で重要である。しかし、ムチンは、分子量の巨大さ²⁾⁻⁶⁾、高密度(60-90wt%)に大量の糖鎖が結合している複雑さから取扱および解析が難しいことから、結晶化も未だ成功していない。そのため蛋白質の解析手法として有効とされているゲル電気泳動法や NMR 測定の適用がきわめて困難である

ためか、溶液構造の基礎的知見は十分に得られていない。

本研究では、胃粘液の主要成分のムチンの溶液構造特性の一端を解明するために、レーザー光散乱測定による分子量およびその分布の評価と放射光溶液 X 線散乱測定による分子鎖構造解析を行った。その結果、ブタ胃粘液ムチンの重量平均分子量は 890 万で、主要成分の分子量は約 400 万と数十万であることがレーザー光散乱測定で明らかとなった。さらに、放射光溶液 X 線散乱測定から溶液中の胃粘液ムチンは、排除体積をもつ高分子鎖の特徴をそなえたフレキシブルな構造体であることがわかった。また、これら溶液散乱法による複合蛋白質の構造解析を通して、広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資する研究手法の提示も目的とした。

2007 年 10 月 31 日受付, 2007 年 12 月 6 日受理

[§]連絡先 (Corresponding author)

実験方法

ブタ胃粘液ムチンおよびウシ血清アルブミンは、シグマ (株) とナカライテスク (株) から購入した。測定に使用した試料濃度は 2mg/ml とし、溶媒は 50mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.8, を使用した。

分子量は低角レーザー光散乱法により評価した^{6)~8)}。低角レーザー光散乱法のシステムは、100 μ l のサンプルループを備えた高性能ゲルクロマトグラフィープンプシステム, HPLC カラムと 2 つの検出器, 低角レーザー光散乱光度計 (TSKLS-8000, 東ソー (株)) と示差屈折計 (日本分光 (株), RI-2031) で構成されている。HPLC カラムは、重量平均分子量を評価するため TSK-GCSWXL カラム (40mm \times 内径 6mm, 東ソー (株)) を使用した。一方、分子量分布の評価には GF-1G7B プレカラム (50mm \times 内径 7.5mm, 昭和電工 (株)) と GF-7MHQHPLC 主カラム (300mm \times 内径 7.5mm, 昭和電工 (株)) を使用した。溶出液は 50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) を使用し、流速は 0.5ml/min とした。

蛋白質の分子量は、光散乱計および屈折計のピーク出力の値 (順に LS , RI と表現する) から評価できる^{6)~8)}。分子量 M_w は、 $\partial n/\partial c$ を比屈折率増分, k_1 を装置定数とすると以下の関係式が与えられる。

$$M_w = k_1 \cdot (\partial n/\partial c)^{-1} \cdot LS \cdot RI^{-1} \quad (1)$$

装置定数 k_1 は、比屈折率増分と分子量の既知試料を測定条件においてカラムに供することにより決定できる。本研究ではウシ血清アルブミン (M_w : 66,700/ $\partial n/\partial c$: 0.187ml/g)⁹⁾ を標準試料とした。ウシ血清アルブミンの濃度は 280 nm の吸光係数値 6.78 (1cm, 1%) と吸光度測定により決定し、ブタ胃粘液ムチンの濃度は乾燥重量法により決定した⁶⁾。

分子鎖構造は小角 X 線散乱測定により評価した。放射光溶液 X 線散乱測定は、高エネルギー加速器研究機構放射光施設ビームライン 10C に設置された小角溶液 X 線散乱測定装置 (酵素回折計) を使用した^{6), 10)~13)}。検出器は一次元位置敏感比例係数装置を用い、X 線の波長は 0.1488 nm, 試料検出器間距離は 900 mm に設定した。試料セルはステンレス製で、厚み 1 mm, 縦 3 mm, 横 15 mm の穴の両面に石英板 (厚み 20 μ m, 縦 6 mm, 横 20 mm) を窓材として貼ったものを使用した。得られた散乱データは、試料直前のイオンチェンバーの出力により入射 X 線強度の減衰

補正をした。鶏の腱から取り出したコラーゲン繊維束を標準物質として、検出器のチャンネルを散乱ベクトル q ($= (4\pi/\lambda) \sin \theta$, λ は X 線波長, 2θ は散乱角) に変換した。

実験結果と考察

本研究においては粘液蛋白質試料として、試薬として市販されているブタの胃粘液のムチンを用いた。まず、本蛋白質の分子量を評価するために必要な比屈折率増分の値を決定した (式 1 参照)。屈折計の出力 (RI) は、装置定数を k_2 , 試料濃度を c とすると次の様に表現できる⁶⁾。

$$RI = k_2(\partial n/\partial c) \times c \quad (2)$$

装置定数 k_2 は比屈折率増分 $\partial n/\partial c$ の値の既知なウシ血清アルブミン ($\partial n/\partial c$: 0.187ml/g)⁹⁾ を利用して決定した。図 1 にブタ胃粘液ムチンとウシ血清アルブミンについて試料濃度と屈折計の出力の関係をプロットした。原点を通る直線の傾きからブタ胃粘液ムチンの比屈折率増分は 0.16 ± 0.02 ml/g ($n = 5$) と決定され、続く光散乱測定による分子量評価に利用した。図 2 に重量平均分子量の逆数の濃度依存性を示した。ゼロ濃度外挿値から希薄溶液系における本ムチンの重量平均分子量は 890 万 \pm 30 万 ($n = 6$) と計算できる。また、図 2 の直線の傾きがわずかにマイナスを示すことから、本ムチンは顕著な会合性の挙動を本濃度域で示さないことがわかる。この結果は、ヒト子宮経管ムチンは自己会合性がないと報告されている点と一致する²⁾。

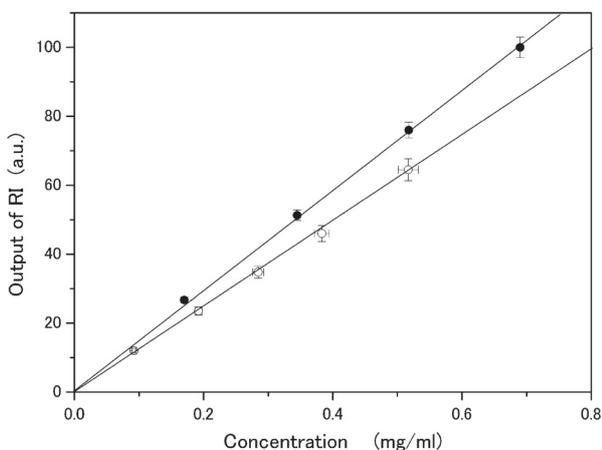


図 1 濃度と示差屈折計出力の関係
ウシ血清アルブミン (●) とブタ胃粘液ムチン (○) のデータをプロットし、直線は最小自乗法により得た。

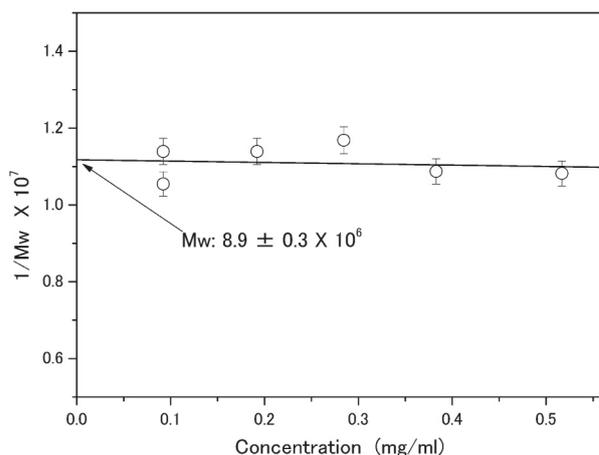


図2 分子量の濃度依存性
縦軸は分子量の逆数であることに注意。

次に、分子量分布を調べるために高分子量領域で比較的高分解能であるカラムにより分画と同時に溶出時の散乱測定を行った。図3に示す様に、約10-12分に分子量数百万以上の成分が溶出し、13分前に分子量約400万の成分がみられ、約15分に分子量約数十万の成分が溶出している。分子量分布のデータを図4の様に整理すると、分子量約400万と数十万の成分が比較的多量に含まれることが示唆される。

すでに報告されているムチンの比屈折率増分の値は、0.152 ml/g (ウシ顎下腺, 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.9)⁶⁾, 0.105 ml/g (ウシ顎下腺, 0.175 M トリス塩酸緩衝液, pH7.4)⁵⁾, 0.16 ml/g (ヒト子宮頸管, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH6.5)²⁾ および 0.135 ml/g (ブタ顎下腺, 6 M グアニジン塩酸塩)³⁾ である。これらの値のばらつきは、ムチンの糖含量や溶媒条件に依存すると考えられるので、本研究の様に、分子量測定する実験条件での比屈折率増分の決定が重要である。一方、ブタ胃粘液ムチンの分子量は分析超遠心法で930万と報告されており、本研究の光散乱測定で得られた値と同程度の値であった。また、ウシ顎下腺ムチンについて数十万の集合体として溶存していることが示唆されている⁴⁾。ブタ胃粘液ムチンの溶液中の分子集合状態については、分子量の溶媒条件や試料調製ロットなどの依存性をさらに精査して解明する必要がある。

本研究では、生理的条件下で生のままの分子鎖構造を調べるために放射光溶液 X 線散乱測定を行った。溶液 X 線散乱法は低分解能ではあるが溶液中の蛋白質の構造情報を得られる手法である^{10)~13)}。近年の放射

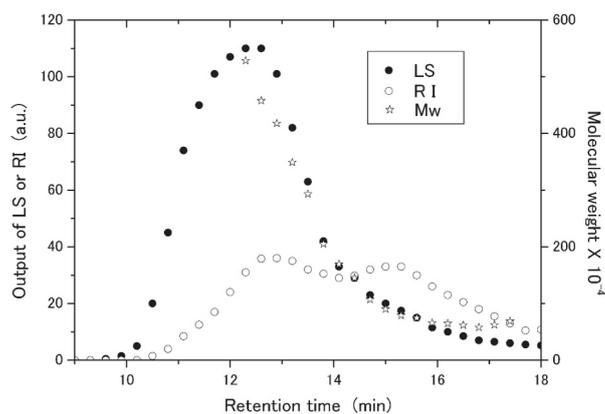


図3 クロマトグラムの一例
光散乱 (●) と屈折率 (○) のクロマトグラムに分子量値 (☆) をプロットした。

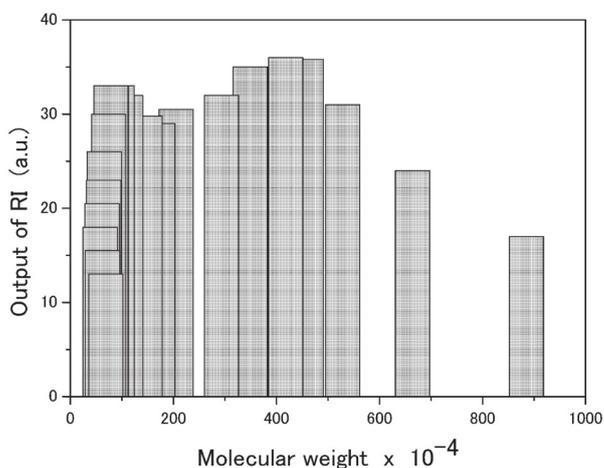


図4 溶液中の分子量分布
縦軸の屈折計の出力は存在量に比例する。

光の発展により¹⁴⁾、比較的低濃度の試料での溶液散乱実験が可能となった^{10)~13)}。図5に散乱パターン(散乱ベクトル q に対する散乱強度のプロット)の一例を示す。次の(3)式の様に散乱強度が散乱ベクトル q のべき乗に比例する領域が散乱測定から得られる¹⁵⁾。

$$I(q) \sim q^{-D} \quad (3)$$

ここで D はフラクタル次元である。すなわち、図5の様な散乱ベクトル q と散乱強度 I の両対数プロットで得られる直線の傾きから、溶質構造体のフラクタル次元が得られる。図5中の直線の傾きは1.67を表しているため、散乱データからブタ胃粘液ムチン分子のフラクタル次元がほぼ1.67に近似できる。一般に、ガウス鎖のフラクタル次元は2であり、棒状体では1である¹⁵⁾。その間の値の1.67(=5/3)は、排除体

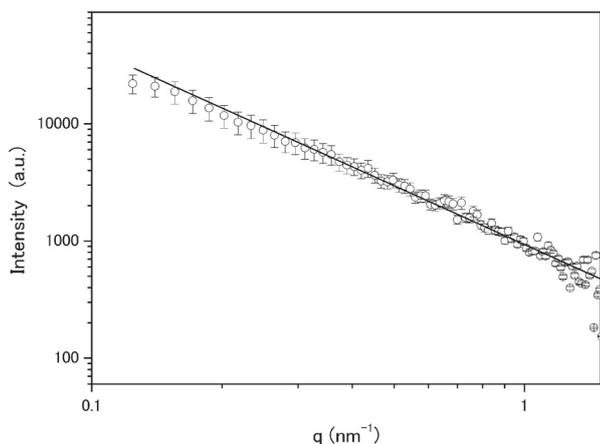


図5 X線溶液散乱パターンの一例

試料濃度は約 2 mg/ml, 5 分間の測定. 参考のため, 傾き 1.67 の直線を記した.

積を持った高分子鎖構造を表している¹⁵⁾. その構造体のイメージは, ガウス鎖よりわずかに広がったフレキシブルな細長い分子鎖である. ムチンの高密度に結合した糖鎖はマイナス荷電をもつ. その糖鎖が密集する部分は互いに静電的に反発し合い, 分子鎖が適度に広がった構造を持つと考えられる.

さらに, 図6に示す様に, 散乱ベクトル q と q^2I の関係のクラツキープロット¹⁶⁾から, そのデータポイントは小角領域 (散乱ベクトル q が 0.5nm^{-1} 以下) では右上がりでありそれより高角領域ではほぼ一定値を示した. この形状は, 変性タンパク質で観察された様に, 溶液中のブタ胃粘液ムチン分子はほどけたランダムコイル状の構造体であることを示唆している. 一方, 細長い構造体が示唆される場合は, 円柱体構造を仮定した断面ギニエプロット (q^2 対 $\ln(I \times q)$) の中角領域の直線の傾きより次の (4) 式から円柱体の断面の回転半径 R が計算できる.

$$I \times q \sim \exp(-R_{gc}^2 q^2 / 2) \quad (4)$$

図7の直線の傾きよりブタ胃粘液ムチンの断面の回転半径は, 1.15nm と計算でき, 円柱の半径は 1.64nm となる. ムチンの回転半径は $20 \sim 170\text{nm}$ と報告されている²⁾ので, 分子の長さは約 $70 \sim 590\text{nm}$ と計算できる. これらの結果は電子顕微鏡によりムチン分子の細長い構造体が観察されていることと矛盾しない¹⁷⁾.

NMR は蛋白質の溶液構造を原子レベルで解析できる手法である¹⁸⁾. しかし, 蛋白質の分子量が大きくても数万, 通常は2万以下のものが主な対象となる. 分子量数十万以上の蛋白質の溶液構造解析は, 蛋白質の有効利用のためには不可欠な課題である. 溶液散乱

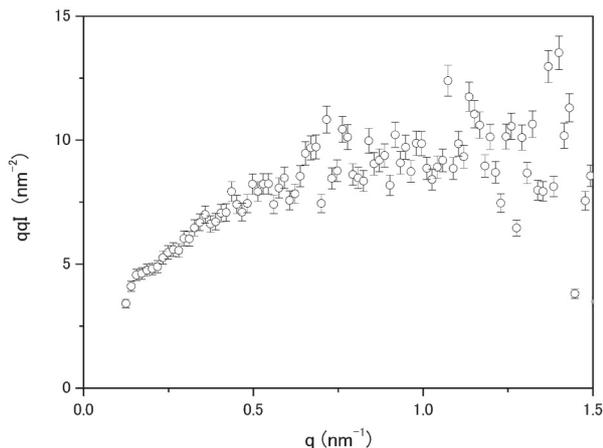


図6 クラツキープロットの一例

測定条件は図5と同じ.

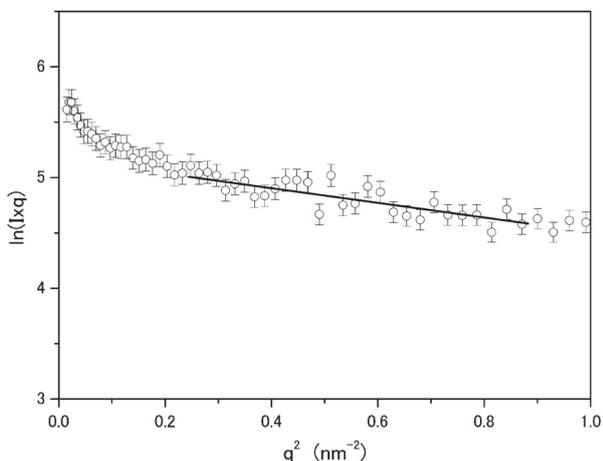


図7 断面ギニエプロットの一例

直線は計算に使用した領域を示す. 測定条件は図5と同じ.

の長所は, 生理的な条件ばかりでなく種々の溶媒条件での測定が可能である点である^{10)~13)}. 従って, 溶液散乱法は, 蛋白質会合状態やゲル化初期過程あるいは分子間相互作用による超分子構造の解明に効果的に利用されることが期待される. さらに, 蛋白質ばかりでなく多糖などの生体高分子についても本手法を適用することにより食品分野での生体分子素材の特性解明への貢献が期待できる. 今後, さらに適応例を増やすとともに, 生体高分子の物性評価に適した手法の改良も重要な課題と考えられる.

謝 辞

溶液 X 線散乱測定は, 高エネルギー加速器研究機

構放射光共同利用実験課題(番号 07G129)として行った。

要 約

食品分野における蛋白質の特性解析は、蛋白質の素材としての有効利用に資することが期待される。本研究では、ブタの胃粘液の主要成分のムチンの溶液構造特性の一端を解明するために、レーザー光散乱測定による分子量と分子量分布評価および放射光溶液 X 線散乱測定による分子鎖構造解析を行った。その結果、ブタ胃粘液ムチンの重量平均分子量は約 890 万であった。さらに、分子量約 400 万と数十万の主要分子と比較的少量の分子量数百万以上の分子が構成要素であることが光散乱測定で明らかとなった。一方、放射光溶液 X 線散乱測定から溶液中のブタ胃粘液ムチンは、ほどけた細長いフレキシブルな構造体であることがわかった。これら溶液散乱法による複合蛋白質の構造解析を通して、広く食品関連生体高分子素材の溶液構造の解析に資する研究手法の提示も本研究の目的とした。

参考文献

- 1) 手塚統一, 糖タンパク質, 「ハーパー・生化学」, 上代淑人(監訳), 第 26 版(丸善, 東京), pp 528-548 (2005).
- 2) J. K. Sheehan and I. Carlstedt, The effect of guanidium chloride on the behaviour of human cervical-mucus glycoproteins, *Biochem. J.*, **221**, 499-504 (1984).
- 3) R. L. Shogren, A. M. Jamieson, J. Blackwell, and N. Jentoft, Conformation of mucous glycoproteins in aqueous solvents, *Biopolymers*, **25**, 1505-1517 (1986).
- 4) I. Fiebrig, S. E. Harding, A. J. Rowe, S. C. Hyman and S. S. Davis, Transmission electron microscopy studies on pig gastric mucin and its interactions with chitosan, *Carbohydr. Polym.*, **28**, 239-244 (1995).
- 5) L. Shi and K. D. Caldwell, Mucin adsorption to hydrophobic surfaces, *J. Colloid Interface Sci.*, **224**, 372-381 (2000).
- 6) Y. Watanabe and Y. Inoko, Small-angle light and X-ray scattering measurements of a protein-oligosaccharides complex mucin in solution, *Journal of Applied Crystallography*, **40**, s209-s212 (2007).
- 7) Y. Watanabe, Characterization of the refolding and reassembly of an integral membrane protein OmpF porin by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography, *J. Chromatogr. A*, **961**, 137-146 (2002).
- 8) Y. Watanabe and Y. Inoko, Physicochemical characterization of the reassembled dimer of an integral membrane protein OmpF porin, *The Protein Journal*, **24**, 167-174 (2005).
- 9) G. D. Fasman, *Handbook of biochemistry and molecular biology*, Vol. 2, CRC Press, Cleveland, OH, (1976).
- 10) 渡邊康, 猪子洋二, 小林克巳, タンパク質の放射光溶液 X 線散乱測定における X 線透過率の同時評価, 食品総合研究所研究報告, **69**, pp 19-22 (2005).
- 11) 渡邊康, 猪子洋二, タンパク質のクロマトグラフィー検出手段としての溶液 X 線散乱測定, 食品総合研究所研究報告, **70**, pp 1-5 (2006).
- 12) 渡邊康, 猪子洋二, 両親媒性環境下の疎水性蛋白質の分子集合状態の特性評価, 食品総合研究所研究報告, **71**, pp 33-37 (2007).
- 13) I. Pilz, Proteins. In "Small angle X-ray scattering", eds. O. Glatter and O. Kratky, Academic Press, pp 239-293 (1982).
- 14) 菊田惺志, 放射光光源, 「X 線回折・散乱技術(上)」, 初版(東京大学出版会, 東京), pp 176-200 (1997).
- 15) T. G. Dewey, *Fractals in Molecular Biophysics*, Oxford Univ. Press (1997).
- 16) O. Kratky, Natural high polymers in the dissolved and solid state. In "Small angle X-ray scattering", eds. O. Glatter and O. Kratky, Academic Press, pp 361-386 (1982).
- 17) J. K. Sheehan, K. Oates and I. Carlstedt, Electron microscopy of cervical, gastric and bronchial mucin glycoproteins, *Biochem. J.*, **239**, 147-153 (1986).
- 18) K. Wuthrich, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons (1986).

