

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750160

研究課題名（和文） 代謝産物の生体高分子の安定化、活性化に関する作用機構の解明

研究課題名（英文） Understanding of stabilization and activation mechanism for biomolecules induced by the addition of cellular metabolite analogs

研究代表者

甲元 一也（KOUmoto KAZUYA）

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授

研究者番号：60388759

研究成果の概要（和文）：

申請者らは、代謝産物が生体高分子の安定化、活性化に及ぼす作用機構を解明するために、代謝産物の特徴的な構造であるベタイン構造を有するアナログを合成し、それらが溶解した溶液の物性を調べた。その結果、ベタイン誘導体を水に溶解させると、両親媒性で電荷を有するにも関わらず、これらの化合物はモノマー状態として溶液に分散していることが明らかとなった。また、溶液に溶解すると構造に依存して、蒸気圧、誘電率、密度などを変化させ、その変化の割合は生体高分子の安定化や活性化の序列と一致することが明らかとなった。一方で、生体高分子との直接的な相互作用は確認されず、このような溶媒の物性変化が安定化や活性化に影響を及ぼしていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the mechanism of stabilization and activation for biomolecules induced by cellular metabolites, the analog possessing betaine structure characteristic of cellular metabolites were synthesized. These betaine derivatives dissolved in water as the monomer at high concentration range even though they possess amphiphilic property. Furthermore, when they are dissolved in water, they strongly change the solvent property such as vapor pressure, dielectric constant, solvent density and so on. The order on changing solvent property is in good agreement with that of the stabilization and activation for biomolecules. On the other hand, these molecules scarcely interact with biomolecules. The present results strongly suggested that stabilization and activation for biomolecules induced by the addition of metabolite analogs are ascribed to the change in the solvent property by dissolving the analogs in water.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：代謝産物、ベタイン、アナログ、対イオン化合物、水和

1. 研究開始当初の背景

細胞内には、タンパク質や核酸のような生体高分子や栄養素の他に、酵素が代謝活動によって作りだした糖、有機酸、アミノ酸など数千種類に及ぶ代謝物質が存在する。これら代謝産物を網羅的に解析するメタボローム解析は、その上流の細胞機能である酵素活性や遺伝子発現を知る重要な手がかりとして今、注目を集めている。数ある代謝物質の中には、単に糖質、アミノ酸、脂質、核酸などの酵素代謝過程で産生した老廃物ではなく、産生されることで積極的に細胞内の機能制御を行っている物質群がある。この物質群は、時に数 mol/L という高濃度で細胞内に蓄積されるにも関わらず、細胞機能を阻害せず、浸透圧調節、細胞膜の安定化、尿素変性緩和、レドックス調整、活性酸素の除去等の細胞保護に使われる。細胞機能に適合性を示すことから、これらの物質群は特別に“適合溶質”と呼ばれる。

この適合溶質が急激に細胞内に産生されるのは、細胞が高温、高圧、高塩、乾燥などの水ストレスを受けた場合であり、遺伝子レベルで、その生成、蓄積が制御されている。また、特定の代謝物質だけが産生されるわけではなく、生育環境や外部環境によって産生される代謝物質は使い分けられ、組み合わせられている。例えば、Yancey らが行った適合溶質産生に関する調査では、深度が 0.5 km に生息する二枚貝では α -アミノ酸が 35%、タウリンが 28%、グリシンベタインが 26% という割合で細胞内に蓄積されるが、深度が 4km の生息する同種の二枚貝では、セリンホスホエタノールアミンが 37%、グリシンベタインが 26%、 α -アミノ酸が 20% と、同じ二枚貝でも生息する環境によって使われる代謝物質の種類やその産生される割合は異なることが報告されている (*J. Exp. Biol.*, 208, 2819, 2008)。同様のことは軟骨魚類や哺乳類の臓器などでも確認、報告されており、未だその理由は明らかではないが、生物はこれら適合溶質を使い分けしていることを窺い知ることができる。

適合溶質は細胞機能を制御できる新しい“バイオマテリアル”として注目されているが、これまでの研究は、個々の適合溶質に焦点をあてるのみで、数千にも及ぶ代謝物質群全体の機能は比較検討されてこなかった。申請者は、細胞がなぜそれらの代謝物質を使い分ける必要があったのか、なぜ組み合わせる必要があったのかを解明できるよう、適合溶質の化学構造と機能の総合的理解に関する研究を展開してきた。

構造的類似性に乏しい代謝産物群であるが、多くの分子は構造中にカチオンとアニオ

ンを併せ持つ。さらに、対イオン化合物といっても、グリシンとタウリンのようにカチオンとアニオンの距離の離れたものや、プロリンベタインとグリシンベタインのようにアンモニウム基の嵩高さが違うもの、タウリンとグリシンベタインのようにアニオン基がカルボン酸とスルホン酸とで違うもの、などがあり、その化学構造は多様性に富んでいる。申請者はこの構造の類似点と相違点に着目し、グリシンベタイン (*N,N,N*-トリメチルグリシネート) を基体とした人工適合溶質ライブラリーを合成した。合成した適合溶質の存在下、DNA 二重鎖の安定性を検討したところ、適合溶質の化学構造によって不安定化の度合いに差異が確認された (*Tetrahedron*, 64, 168, 2008)。また、酵素活性に関しても類似した構造相関があることも明らかとなっている。グリシンベタインのメチル基をブチル基に置換した *N,N,N*-トリブチルグリシネートは 50 mM の濃度で、酵素活性を 3 倍~10 倍向上させることも明らかとしている。酵素反応における速度パラメータ解析より、適合溶質が生体分子へ及ぼす作用機構は基質と酵素との結合促進にあることが示された。また、円二色性スペクトルに変化がなかったことから、適合溶質の働きは間接的な作用であり、水分子の関与が示唆されている。本研究では、この適合溶質の生体分子に対する作用機構を明らかにすることを目的として研究を遂行する。得られた知見は、細胞内で産生される未知の代謝物質の機能予測や、天然物よりも高機能の適合溶質の設計に還元されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、適合溶質が核酸や酵素のような生体高分子へ作用するメカニズムを明らかとする。これまでの研究から、適合溶質の存在下、生体高分子の円二色性スペクトルに変化がないことから、3 mol/L を超える溶解度を持つ適合溶質が媒体中の水和環境を変化させることで安定性や活性に影響を及ぼすことを推察している。本研究では、適合溶質の水和や会合、それに伴う生体高分子の水和環境の変化を定量的に解析し、なぜ生体高分子の安定性や活性に適合溶質が影響を及ぼすかを解明することに注力する。他の研究者が行ってきたこれまでの研究では、天然の代謝物質をそのまま使っていたため、適合溶質の化学構造が与える影響についての総合的な知見は得られなかった。申請者は有機合成的手法によって化学構造とそれがもたらす機能の相関を初めて明らかとした。本申請に関する研究によってその作用機構が明らかとなれば、細胞内で産生される適合溶質が

それぞれどのような役割を担っているか、また、産生された物質の組み合わせがどのような効果をもたらすのかを、適合溶質の化学構造から予見することも可能となるだけでなく、人為的に酵素活性や細胞機能を外的に制御できる新規バイオマテリアルの創製へもつながることが期待される。

3. 研究の方法

適合溶質を溶液中に添加することによって、核酸二重鎖は不安定化を起し、酵素は反応速度が上昇する。また、酵素反応の速度パラメータ解析によって、適合溶質の添加によって K_m 値が低下することが活性上昇の因子であることが解明されている。 K_m 値の低下に関しては、適合溶質添加に伴う排除体積効果によって説明することもできるが、一方で、分子会合が促進されるにも関わらず核酸二重鎖は不安定化されており、一概に排除体積効果だけではすべての現象を説明することはできない。これまでの研究から核酸の熱力学的安定性は、水和に強く影響されることもわかっており、適合溶質、もしくは核酸、酵素の水和状態の変化をもたらしている現象と推測することもできる。実際、適合溶質の溶解度は 3 mol/L を超え、有機化合物の溶解度よりは無機塩の溶解度に近い。つまり、強く水分子と結びつき、媒体の水和環境を積極的に変化させている可能性は高い。本研究では、適合溶質と核酸、酵素の“水和状態”を明らかにすべく実験を行い、適合溶質が生体高分子の安定性や活性に及ぼす作用機構に迫る。

① 適合溶質の水和、会合挙動の解析

適合溶質の水和は、媒体の密度や蒸気圧に強く影響を及ぼす。また、分子内にカチオンとアニオンを併せ持つため、適合溶質の化学構造によっては適合溶質同士での会合が起こる可能性もあり、会合が生体高分子への効果の一因となっている可能性も否めない。そこで、適合溶質の水和、会合挙動に関する一連の測定を行い、適合溶質の溶液中での挙動を調べる。対象とするのは、カルボキシペプチン、新たに合成するスルホペプチンの誘導体を予定している。

適合溶質の水和に関しては、溶液の密度、蒸気圧測定や、 D_2O に溶解させた適合溶質の核磁気共鳴スペクトルにおける HDO のケミカルシフト変化などから総合的に評価する。また、分子会合についてはアニリノナフタレンスルホン酸 (ANS) を使った蛍光プローブ法と動的光散乱測定 (DLS) から解析する。最終的に、適合溶質の化学構造 (カチオン近傍の嵩高さやカチオン、アニオン間のスペーサー長など) が水和挙動や会合特性にどのような影響を与えるか評価する。

② 適合溶質と生体高分子との直接相互作用の解析

酵素や核酸は表面電荷を有している。また、適合溶質もカチオンとアニオンを併せ持つ分子であり、電荷を有している。円二色性スペクトルでは直接的な相互作用を確認することはできなかったが、仮に適合溶質が生体高分子の表面に吸着している場合には、表面電荷の変化が生じると考えられる。本解析では、適合溶質の濃度と酵素や核酸の表面電荷の変化についてゼータサイザーを利用して解析する。

③ 適合溶質添加に伴う生体高分子の水和状態の定量的解析

共存溶質の添加に伴う水の活量変化は DNA の安定性に強く影響を及ぼす。申請者の所属する機関では、これまでに濃厚溶液中における水の活量変化が核酸の構造安定性に及ぼす影響を評価してきた (JACS, **126**, 14330 (2004), JACS, **128**, 7957 (2006), Bull Chem. Soc., Jpn, **80**, 1987 (2007), Chem. Lett., **37**, 864 (2008) など)。その際に算出される水和、脱水とパラメータ Δn_w 値は熱力学的パラメータ ΔG 値と水の活量から算出することができ、DNA の高次構造形成時における溶液中での水和環境を知る手がかりとなる。合成した人工適合溶質ライブラリーを用いて DNA 二重鎖を含む種々の DNA 構造や酵素などを用いた定量的な解析を予定している。また、図 4 に示す数多くの適合溶質を用いて一連のデータを比較検討するためには、多くの測定が必要となる。従って、分光光度計 (島津製作所社製、UV-1800) を申請し、測定を効率的、且つ、円滑に進める予定である。

4. 研究成果

本研究の成果として以下の点が得られている。

(I) スルホペプチンライブラリーの合成

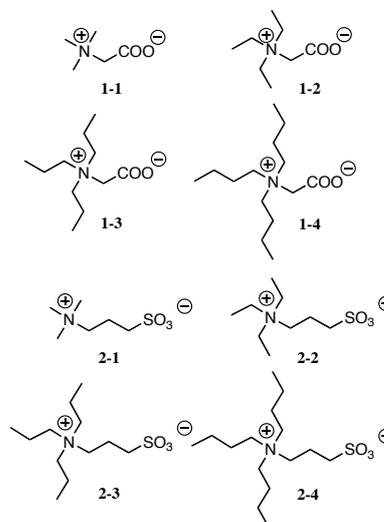


図1 カルボキシベタインに対して新たに合成したスルホベタインライブラリー (2-1~2-4)

天然の代謝産物には、グリシンベタインやプロリンベタイン、エクトインに代表されるようなカルボキシベタインに加えて、タウリンのようなスルホン酸をアニオンとするスルホベタインが存在する。そのような置換基の影響を考察するために、新たにスルホベタインのライブラリー (図1) を合成し、その挙動を検討した。 α -グルコシダーゼに対してその添加効果を評価したところ、図のように、構造が類似したカルボキシベタインとほぼ同じ濃度範囲に活性化濃度が現れた (図2)。一方で、他の酵素に対する添加効果を確認する中では、酵素が変性、沈殿するケースも見られ、カルボキシベタインと比較してアニオン性が強く、いくらか酵素変性効果を誘起することも示唆された。

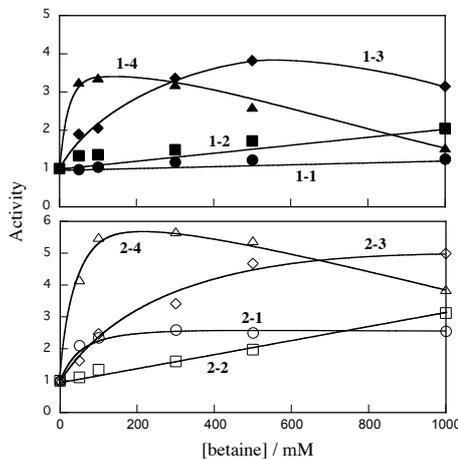


図2 スルホベタインとカルボキシベタインの活性化濃度の比較

(II) ベタイン誘導体の溶液中での挙動

これまでの研究より、ベタイン誘導体を酵素反応溶液に添加すると、酵素と基質の解離定数 (K_m) が $1/5$ 程度まで低下することが明らかとなっている。また、 V_{max} は、濃度依存的に上昇した後、ベタイン濃度が高くなるとその値は低下する。このベタイン添加濃度に対する V_{max} の極大値は、酵素活性の極大値と一致していた。また、本研究によってその活性化は活性化エネルギーの大幅な低下によることが明らかとなった (図3)。ベタイン誘導体は、直接的、もしくは、間接的に酵素に作用し、結果として酵素の速度論パラメータに影響を及ぼしていると推察される。

本研究では、ベタイン誘導体溶液の蒸気圧測定、誘電率測定、動的光散乱測定、密度測定などを行い、ベタイン誘導体の溶液物性に与える影響、分散挙動などを解析した。蒸気圧変化を調べてみると、図4のような強度を

示す。ヘンリーの法則に従えば、プロットは直線関係を示すが、図より濃度が高くなると直線性は乱れ、プロットは湾曲していった。変化から推察すると、ベタイン誘導体の分子サイズにはそれほど違いはないものと考えられるが、ベタイン誘導体によって水分子との水和挙動に違いがあり、酵素活性を顕著に上昇させるものほど、強く水和される傾向があることが示唆された。

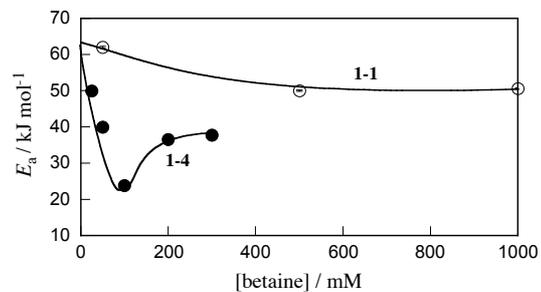


図3 α -グルコシダーゼの活性化エネルギーに及ぼすベタイン誘導体の添加効果

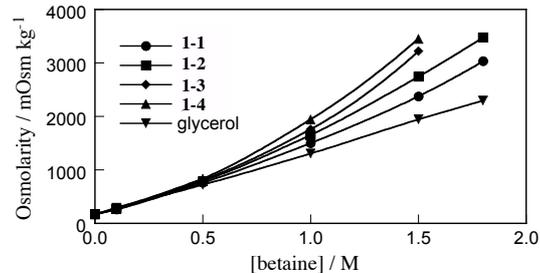


図4 ベタイン誘導体添加に伴う蒸気圧変化

一方で、溶液中でのベタイン誘導体の会合挙動を動的光散乱によって解析したところ、図4と同じ濃度範囲では、 $1\sim 2$ nm の分子しか確認されず、イオン性官能基をもっているが、これらの分子は溶液中ではモノマーとして分散していることが明らかとなった。また、水の密度はほとんど変わらず、水和されているが、電解質のように水が高密度で水和しているのではなく、やはり疎水性界面での粗い水和をしていることも示唆された。

これらを総合して考えると、ベタイン誘導体は、水に溶解することで水の物性を大きく変化させ、結果として、それが間接的に生体分子に働きかけていることを示唆するものと考えられる。

(III) ベタイン誘導体と生体分子との直接相互作用の解析

生体分子の円二色性スペクトル、ゼータ電位、ゲル電気泳動によるゲルシフトアッセイなどを利用して直接的な相互作用を解析したが、円二色性スペクトルは、核酸の場合もタンパク質の場合もスペクトル変化は見ら

れなかった。また、ゼータ電位測定やゲルシフトアッセイからも直接的な相互作用を示唆するデータは得られなかった。ベタイン誘導体によって引き起こされる効果は、ベタイン誘導体が水に溶解することによって変化する水溶液の物性変化による間接的な相互作用による効果であることが強く示唆された。

以上を纏めると、ベタインの誘導体の添加に伴って、生体分子の安定性や活性は大きく変化することが示されてきた。本研究からその影響は直接的なものではなく、水に溶解することによる間接的な効果であることが強く示唆されている。水に溶解させることで水の物性を大きく変化させるが、ベタイン誘導体によっては僅か数 μM でも効果を発現する。水和環境の変化が、メカニズムに影響していると考えられるものの、断定するには、もう少し間接的な証拠を積み重ねていく必要があるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①E. Deguchi, K. Koumoto
Cellular zwitterionic metabolite analogs simultaneously enhance reaction rate, thermostability, salt tolerance, and substrate specificity of α -glucosidase, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、19 巻、2011、3128-3134 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.003>)

[学会発表] (計 9 件)

①甲元一也、添加するだけで種々の酵素活性を同時に向上する酵素活性化剤、ポスター発表、イノベーションジャパン 2011、2011 年 9 月 21 日、東京

②甲元一也、鹿島康浩、代謝産物アナログを利用するペルオキシダーゼ発色反応の効率化、口頭発表、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12 日、筑波

③勢籙志郎、甲元一也、代謝産物アナログ存在下における酵素-阻害剤相互作用の解析、ポスター発表、第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12 日、筑波

④中川雄市、甲元一也、 α -グルコシダーゼの活性を低濃度で効率よく向上させる代謝産物アナログ構造の探索、ポスター発表、第

5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 12 日、筑波

⑤甲元一也、出口瑛介、鹿島康浩、反応速度、反応収率、基質選択性を上昇させる酵素活性化剤の開発、ポスター発表、第 62 回日本生物工学会大会、2010 年 10 月 27 日、宮崎

⑥甲元一也、反応速度、熱安定性、基質選択性を上昇させる酵素活性化剤の開発、口頭発表、ポスター発表、イノベーションジャパン 2010、2010 年 9 月 29 日、東京

⑦甲元一也、出口瑛介、代謝産物による酵素機能の活性化、口頭発表、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、2010 年 9 月 24 日、大阪

⑧甲元一也、出口瑛介、細胞内代謝産物の機能 (1) ~合成代謝産物による DNA 二重鎖の不安定化~、口頭発表、第 59 回高分子学会年次大会、2011 年 5 月 26 日、横浜

⑨出口瑛介、甲元一也、細胞内代謝産物の機能 (1) ~合成代謝産物による DNA 二重鎖の不安定化~、口頭発表、第 59 回高分子学会年次大会、2011 年 5 月 26 日、横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

①名称：発光効率又は発色効率を高める酵素反応方法

発明者：甲元一也、鹿島康浩

権利者：学校法人甲南学園、株式会社耐熱性酵素研究所

種類：特許

番号：特願 2010-230748

出願年月日：2010 年 10 月 13 日

国内外の別：国内

②名称：酸化酵素の活性向上方法

発明者：甲元一也、鹿島康浩

権利者：学校法人甲南学園、株式会社耐熱性酵素研究所

種類：特許

番号：特願 2011-43365

出願年月日：2011 年 2 月 28 日

国内外の別：国内

③名称：加水分解酵素の反応効率を高める酵素反応方法

発明者：甲元一也

権利者：学校法人甲南学園、株式会社ケミクレア

種類：特許

番号：特願 2011-197432

出願年月日：2011 年 9 月 9 日

国内外の別：国内

④名称：発光効率又は発色効率を高める酵素
反応方法

発明者：甲元一也、鹿島康浩

権利者：学校法人甲南学園、株式会社耐熱性
酵素研究所

種類：特許

番号：特願 2011-225756

出願年月日：2011 年 10 月 13 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

①名称：核酸合成を促進する化合物を含む組
成物およびその利用、並びに当該化合物の製
造方法

発明者：甲元一也、杉本直己

権利者：学校法人甲南学園

種類：特許

番号：特許第 4761265 号

取得年月日：2011 年 6 月 17 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲元 一也 (KOUMOTO KAZUYA)

甲南大学フロンティアサイエンス学部生
命化学科・准教授

研究者番号：60388759