

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550030

研究課題名（和文） 粘液の物理化学メカニズム

研究課題名（英文） Physical Chemistry in Mucus

研究代表者

丑田 公規 (USHIDA KIMINORI)

独立行政法人理化学研究所・東原子分子物理研究室・客員研究員

研究者番号：60183018

研究成果の概要（和文）：

近年発見したクラゲ由来ムチンは、構造が判明したシンプルなムチンの稀少例で、これを用いて構成したモデル粘液系の中で起きる物理化学作用をいくつか取り上げ、構造と動的挙動の関係を調べた。金属イオンとの相互作用を重点的に調査し、モルフォロジー変化、化学反応による吸着現象のダイナミクスを明らかにした。特にサンゴ粘液による珊瑚柱形成時のバイオミネラル化をクラゲ粘液成分によって人工的に再現することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated several topics of physical chemistry occurring in mucus especially for the relationship between structures and dynamics using a novel mucin (qniiumucin) extracted from jellyfish whose aqueous solution is a model system of mucus in animals. Since its structure was formerly solved, qniiumucin is a rare material as a well-defined mucin. We focused on its interaction with mineral cations and studied the adsorbing reaction dynamics and the changes in its morphology. We succeeded to reproduce the biomineralization taking place in the formation of coral trees artificially by use of qniiumucin, the main component of jellyfish mucus, instead of coral mucin

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：ムチン、クラゲ、粘液、界面活性剤、バイオミネラル化、糖タンパク質、金属イオン、真空紫外円二色性分散

1. 研究開始当初の背景

動物は粘膜を覆うために粘液を有しているが、粘液は粘膜の保護、保湿、潤滑の役割を果たしているばかりでなく、主成分である

ムチンの分子認識能を用いて、ウイルスや病原体菌を特異的に捕捉し、それらを不活性化したり、洗浄したりする役割も持っている。しかしながら、たとえば洗剤（界面活性剤）

などのような他の物質に比べて物理化学的な解析はほとんどなされていなかった。それはムチンが複雑で、不均一で、多様性を持った物質であることが一因である。

我々が 2005 年に発見し、構造解析の結果を発表した、クラゲ由来ムチン（クニウムチン）は、構造が単純で、多様性も小さく、化学物質としてある程度議論できるクオリティを持っている。構造や分子量をある程度特定できるこの物質を使うことによって、粘液の持つ基本作用を解明する物質化学が、新たに可能になったと考えた。

2. 研究の目的

粘液の主成分であるムチンの水溶液に関する物理化学的現象が、粘液の作用の根幹をなすという仮定をもとに、粘液に見られる様々な物理化学的現象を取り上げ、解析する。すなわち、洗浄、保護、保湿、潤滑といった作用を、分子レベルで解析する基本データを得る。そのために、クラゲ由来ムチンをモデル分子として使う。またこの分子が、海水からカルシウムイオンなどミネラル成分を集める作用を新たに見出したので、その反応の物理化学を追跡する。

3. 研究の方法

真空紫外円二色性分散 (VUV-CD)

水溶液における、ムチン高分子の大域的な構造変化を高感度に測定する方法として、円二色性分散 (CD) を用いることが適当であることが分かった。しかしムチンは 220nm より長波長に目立った吸収を持たず、より情報量の多い真空紫外 (VUV) 領域の測定を行うために、広島大学放射光科学センターにおいて、VUV-CD 測定を行った。

ミネラルイオンとの相互作用解析

クラゲ由来ムチンは側鎖の糖鎖に、ホスホン酸、リン酸、硫酸のエステルを持っていると考えられている。これらは、2 価以上の陽イオンとの結合定数が高く、クラゲ体内では海水から Mg^{2+} や Ca^{2+} を集めるバイオミネラリゼーションの一角を担っていると考えられる。 Ca^{2+} などが多数結合すると、高分子は電荷を失い、かつネットワーク構造を作るので、溶液内で不溶化して沈殿を生じる。また、各官能基が解離状態になると、水溶性が著しく増大する。

ムチンとミネラルイオンの相互作用（結合定数）を正しく評価するために、平衡透析法を用い、高分子のない側の試料室での遊離イオンを正しく定量することが必要であった。このためにカルシウムイオンの蛍光プローブ分子 (Quin 2) を用いて、定量を行った。

人工バイオミネラリゼーションの試み

クラゲ由来ムチンが、著しくミネラルイオンと反応すること、および、クラゲと同じ刺

胞動物であるサンゴ虫が、ムチンを含んだ粘液を分泌してそれを用いてサンゴ柱を形成することが分かっているため、クラゲ由来ムチンを使って同じ反応を模倣して分子レベルのメカニズムを明らかにする実験を行った。すなわち、ムチンと Ca^{2+} が良く反応した沈殿物を蒸留水中に分散し、外部から炭酸ガスを緩やかに供給することによって、自然環境に近い条件を作り、生成する炭酸カルシウム結晶を X 線結晶解析で同定した。この反応は自然界には存在しないことから人工的なバイオミネラリゼーション素反応となる。

マイカ基板上の AFM 観察

クニウムチン分子を、 Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Gd^{2+} の塩化物水溶液で処理したのち、マイカ基板上で乾燥して、AFM 測定を行った。

4. 研究成果

ミズクラゲ (*Aurelia aurita*) から抽出した、クラゲ由来ムチン（クニウムチン）は、そのままでは、海水中のミネラル成分をランダムに含有していることが予想された。

すなわち、粗クニウムチンの糖鎖には、2 アミノエチルホスホン酸 (AEP) エステル とリン酸エステルがすでに同定されているが、元素分析および X 線光電子分光 (XPS) の測定から、リン原子と同程度の硫黄原子の存在が示唆された。アミノ酸分析でシステイン、シスチンが存在していないことがわかるので、これらは糖鎖に存在する硫酸エステルであると考えられる。イオン原子が NMR で検出できず、硫酸エステルが容易に加水分解されることから、従来より、糖鎖の硫酸エステルの同定と定量は困難で、今のところ効果的な方法はない。しかし、クラゲの平衡石の主成分が硫酸カルシウムであることがわかっているので、その可能性は高いと考えられる。

硫酸エステル、AEP エステル、リン酸エステルのどれもが、 Mg^{2+} や Ca^{2+} といった 2 価以上のミネラルイオンとの結合性が強く、大きな結合定数を持っていると考えられる。したがって、まず、粗精製直後のムチンに付着する余分なイオンを除去する処理法を開発した。しかし、元素分析によると Mg^{2+} や Ca^{2+} を完全に除去することは困難であった。

そのに、様々な無機金属イオンと、クニウムチンの相互作用を調べたが、 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Y^{3+} , Pd^{2+} , Ag^{+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{2+} , Ce^{3+} , Ce^{4+} , Nd^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Ho^{3+} , Yb^{3+} で、ムチンとの強い相互作用によりプラスチック状の沈殿生成物をつくることを見いだした。

ムチン水溶液における、粘液の動的作用を明らかにするために、上記金属イオンを使ってムチン高分子のモルフォロジーを変化させることを試みた。ムチンの HEPES 水溶液中の VUV-CD スペクトルでは、ムチンに由来す

ると思われる CD 信号が、Ca²⁺イオンの存在下で大きく変化した。変化が大きな領域は 1 μM 程度で、結合定数が 10⁶ オーダーであることと、CD 信号に大きく寄与するような大域的なペプチド鎖の構造変化が生じていることがわかった。

この構造変化は AFM 観察でも示唆され、用いたカウンターイオンの種類、濃度によって、ムチンがひも状に観察されたり、球状になったりすることが見いだされた。

以上から水溶液中ムチンは、カウンターに存在する無機イオンや pH によって大きくそのモルフォロジーを変化させ、これが粘液の物理化学作用に大きく寄与していることが明らかになった。

そこで生体として最も重要と思われるカルシウムイオンについて、平衡透析法と蛍光プローブを用いて、その見かけ上の結合定数を求めた。クニウムチンの 1 繰り返し構造は、平均 2 つの陰イオンサイトをもつので、これを 1 モノマー分子として結合定数を求めたところ、 $2.7 \times 10^{-7}(\text{M})$ という、さきの VUV-CD 測定と矛盾しない数値を得た。

カルシウムイオンと結合し、水に溶解しなくなったクニウムチン(Ca-QM)の固体を、分離し、蒸留水中に分散したものをシャーレに入れた。系をできるだけシンプルにするために、緩衝溶液は用いていない。これは QM 自体に緩衝能があると考えられるからである。外部に炭酸アンモニウム(NH₄)₂CO₃ 固体を置いた密閉容器中で上記溶液を置いて観察した。初期(1日目)には、多量の NH₄HCO₃ 結晶が生成し、妨害を与えたが、7日目にはそれらが消失し、炭酸カルシウム結晶(カルサイト)が生成したことが粉末 X 線結晶回折で確認された。先に求めた見かけの結合定数 $2.7 \times 10^{-7}(\text{M})$ による液相内のカルシウムイオンの均一濃度から予想される生成速度から 2 桁多い結晶が生成しているの、このカルサイト結晶が、ムチン固体外のバルク液体層で溶け出したカルシウムイオンと反応して生成したとは考えにくく、ムチンの存在によって、バイミネラリゼーション反応が加速されていることが示唆される結果となった。

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 4 件)

1) Makoto Urai, Takemichi Nakamura, Jun Uzawa, Takayuki Baba, Kayoko Taniguchi, Hiroko Seki, and **Kiminori Ushida**, "Structural analysis of O-glycans of mucin from jellyfish (*Aurelia aurita*) containing 2-aminoethylphosphonate" *Carbohydr. Res.* **344**(16), 2182-2187 (2009) (査読有り)

2) Naoshi Ohta, Masato Sato, **Kiminori Ushida**, Mami Kokubo, Takayuki Baba, Kayoko Taniguchi, Makoto Urai, Koji Kihira and Joji Mochida "Jellyfish mucin may have potential disease modifying effects of osteoarthritis" *BMC Biotechnology* 2009, 9:98doi:10.1186/1472-6750-9-98 (2009) (査読有り)

3) **丑田公規** 「クラゲから抽出した新しいムチンの応用の可能性—より高機能なムチン生産を実現する出発物質として期待—」 *化学と生物* 48(1), 6-7 (2010) (査読なし)

4) Jeong Ik Lee, Masato Sato, **Kiminori Ushida**, Joji Mochida, "Measurement of diffusion in articular cartilage using fluorescence correlation spectroscopy." *BMC biotechnology.* 03/2011; 11(1):19. (査読有り)

[学会発表] (計 42 件)

1) K. Ushida, Y. Shitara, M. Shirahata, Y. Sugawara "Possible Molecular Mechanism Of Biomineralization in Jellyfish" The 12nd International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), 名古屋, 2012 年 1 月 27 日.

2) **丑田公規** 「クラゲから取り出した新しいムチン: ムチンのマテリアルサイエンスの始まり」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

3) 白幡昌也, **丑田公規**, 伊藤裕美, 原正彦 「AFM を用いたクラゲ由来ムチンの 1 分子イメージング」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

4) 設楽有里, **丑田公規**, 菅原洋子 「クラゲ由来ムチンを用いた人工バイオミネラリゼーションの研究」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

5) 寺田洋平, **丑田公規** 「平衡透析を用いたクラゲ由来ムチンのカルシウムイオン結合定数の測定」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

6) 松田智裕, 大石茂郎, **丑田公規**, 倉持悠輔, 石田斉 「ヒスチジン残基を導入したルテニウムトリスピリジン型ペプチド錯体の研究」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

7) 安田明飛, 大石茂郎, **丑田公規**, 倉持悠輔, 石田斉 「ピレニル基を導入したルテニウム(ターピリジン)(ビピリジン)型ペプチド錯体の合成」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

8) 森川美希, 犬井洋, 大石茂郎, 井上浄, **丑田公規** 「10-ニトロ-9-アントラセンカルボン酸類の光 NO 放出と細胞内導入」第 7 回北里化学シンポジウム, 東京, 2011 年 12 月 22 日.

9) 黒坂真悟, 犬井洋, **丑田公規** 「ビス(アジドフェニル)ジスルフィド類の光分解機構と

重合開始能」第7回北里化学シンポジウム, 東京, 2011年12月22日.

10) 田代有加、犬井洋、井上浄、丑田公規「フッ化ピリミジン系抗癌剤テガフルの光化学的放出」第7回北里化学シンポジウム, 東京, 2011年12月22日.

11) 犬井洋、森川美希、井上浄、丑田公規「ニトロアントラセン誘導体の光化学的NO放出と細胞内導入」第8回バイオオプティクス研究会・理研シンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達(8)」合同シンポジウム 相模原, 2011年12月17日.

12) 丑田公規「細胞外物質ムチンについて: A Review」第8回バイオオプティクス研究会・理研シンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達(8)」合同シンポジウム 相模原, 2011年12月16日.

13) 丑田公規、鶴澤洵、関宏子「クラゲ由来ムチンの糖鎖に存在するAEPとその³¹P-NMRによる同定」第3回リン化合物討論会、岡山、2011年11月26日.

14) 丑田公規「NMRを用いたクラゲ由来ムチンの構造解析とその意義: 糖たんぱく質解析の一般的解析法へ」H23年度日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム、横浜、2011年11月25日.

15) 鶴澤洵、丑田公規、関宏子「糖鎖解析に有益なNMR測定法」日本農芸化学会2011年度大会、京都、2011年3月26日.

16) K. Ushida, A. Nakao “Adsorption of metal ions onto qniumucin (jellyfish mucin) and a possible mechanism of biomimetic mineralization in jellyfish” 11th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-11), 名古屋, 2011年1月28日.

17) 丑田公規「細胞間隙領域における拡散モード: 異常拡散現象の基礎」第7回バイオオプティクス研究会理研シンポジウム「蛍光相関分光と情報伝達(7)」合同シンポジウム、小金井、2010年12月4日.

18) 丑田公規「ムチンのゲル化とバイオミネラルイゼーション」田中豊一記念シンポジウム2010、京都、2010年11月20日.

19) 鶴澤洵、久保田由美子、堀浩、関宏子、丑田公規「新しいNMR差スペクトル法」第49回NMR討論会、東京、2010年11月17日.

20) K. Ushida “Probing anomalous diffusion in meshwork structure of aqueous solution of hyaluronan”, 11th IUMRS International Conference in Asia, Qingdao, China, 2010年9月27日.

21) K. Ushida “Possible use of biomass of jellyfish as a resource of novel glycoprotein (qniumucin)” 11th IUMRS International Conference in Asia, Qingdao,

China, 2010年9月26日.

22) K. Ushida, A. Nakao “Jellyfish Mucin as a Messenger Molecule in Biomineralization, IUMRS-ICA 2011, Taipei, Taiwan, 2011年9月21日.

23) 丑田公規「細胞外物質の物理的性質と機能—ヒアルロン酸とムチン—」第59回高分子討論会、札幌、2010年9月15日.

24) 森川美希、犬井洋、丑田公規「10-ニトロ-9-アントラセンカルボン酸とその誘導体の光NO放出」2011年光化学討論会、宮崎 2011年9月7日.

25) J. Uzawa, H. Seki, K. Ushida, “Structural analysis of Q-mucin and related phosphonate saccharides based on NMR difference spectroscopy with 31P decoupling technique.” 25th International Carbohydrate Symposium (ICS 2010), 千葉, 2010年8月5日.

26) 丑田公規「細胞外マトリックス構成分子の動的挙動—ムチンとヒアルロン酸—」理研シンポジウム「統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開」和光、2010年8月7日.

27) K. Ushida, K. Taniguchi, Y. Yokota, T. Hayashi, M. Urai, T. Baba, M. Hara “Observation of single ribbon-like structure of a novel mucin extracted from jellyfish (Qniumucin) on atomic force microscope (AFM): An evidence of separation depending on molecular mass by size exclusion chromatography.” 25th International Carbohydrate Symposium (ICS 2010), 千葉, 2010年8月2日.

28) K. Ushida “Nanowire of a novel mucin (qniumucin) extracted from jellyfish” 11th IUMRS International Conference in Asia, Qingdao, 2010年9月26日.

29) 鶴澤洵、関宏子、丑田公規 ³¹P-¹H HOESY法によるQ-mucinとリン酸化糖に関する立体構造の研究、日本農芸化学会2010年度大会、東京、2010年3月28日.

30) K. Ushida, M. Urai, T. Nakamura, J. Uzawa, H. Seki, K. Taniguchi, T. Baba “Glycoform analysis of a novel mucin (qniumucin) extracted from jellyfish, *Aurelia aurita*” 10th International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-10), 名古屋, 2010年1月28日.

31) K. Ushida, K. Taniguchi, Y. Yokota, T. Hayashi, J. Uzawa, M. Urai, T. Baba, H. Seki, M. Hara “Structural analysis of a novel mucin (qniumucin) extracted from jellyfish and its single molecular imaging” JSPS-DST Asia Academic Seminar 2009, 横浜 2009年12月9日.

32) K. Ushida, J. Uzawa, M. Urai, K. Taniguchi,

T. Baba, T. Nakamura, H. Seki, Y. Yokota T. Hayashi, M. Hara "A mucin extracted from jellyfish as a novel and well-defined ecomaterial" 9th International Conference on Ecomaterials (ICEM9), 精華町. 2009 年 11 月 25 日.

33) 丑田 公規 「大型クラゲから抽出した新規ムチンとその構造化学」 山口大学応用分子生命科学常盤台コロキウム, 宇部, 2009 年 10 月 30 日.

34) K. Taniguchi Y. Yokota, T. Hayashi, J. Uzawa, M. Urai, T. Baba, M. Hara, H. Seki, K. Ushida "Structural analysis of a novel mucin extracted from jellyfish and its single molecular imaging" 1st FAPS Polymer Congress, 名古屋, 2009 年 10 月 22 日.

35) 谷口 佳代子, 横田 泰之, 林 智広, 馬場 崇行, 浦井 誠, 原 正彦, 丑田 公規 「クラゲから抽出した糖タンパク高分子の 1 分子観察」 日本物理学会 2009 年秋季大会 熊本, 2009 年 9 月 27 日.

36) 丑田 公規 「大型クラゲから見つけた新物質クニウムチンの可能性: 高齢者医療からナノテクノロジーまで」 第 52 回放射線化学討論会, 福井, 2009 年 9 月 25 日

37) 浦井 誠, 谷口 佳代子, 鶴澤 洵, 中村 健道, 横田 泰之, 馬場 崇行, 林 智広, 原 正彦, 関 宏子, 丑田 公規 「クラゲから抽出したムチンの糖鎖構造解析と均一性」 日本応用糖質科学会平成 21 年度大会 (第 58 回)・第 17 回糖質関連酵素化学シンポジウム, 弘前, 2009 年 9 月 16 日.

38) 丑田 公規, 馬場 崇行, 鶴澤 洵, 浦井 誠, 谷口 佳代子, 横田 泰之, 中村 健道, 林 智広, 原 正彦, 関 宏子 「クラゲから抽出したムチンの構造解析と応用可能性について」 第 29 回日本糖質学会年会, 高山, 2009 年 9 月 9 日.

39) 浦井 誠, 鶴澤 洵, 中村 健道, 馬場 崇行, 谷口 佳代子, 関 宏子, 丑田 公規 「クラゲから採取した新規ムチンの糖鎖構造解析」 日本化学会第 3 回関東支部大会, 東京, 2009 年 9 月 4 日.

40) 丑田 公規 「クラゲからの新規有用物質の発見と医療への応用」 平成 21 年度「第 1 回次世代バイオナノ研究会」 高松, 2009 年 8 月 11 日.

41) 丑田 公規 「生体系に存在する不均一マトリックスと輸送現象の役割」 田中豊一記念シンポジウム 2009, 福岡, 2009 年 8 月 7 日.

42) 太田 直司, 小久保 舞美, 佐藤 正人, 丑田 公規, 持田 穰治 「クラゲ由来ムチンの関節軟骨に対する影響の検討」 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会 東京, 2009 年 4 月 25 日.

〔図書〕 (計 3 件)

1) (分担執筆) 日本分光学会 分光測定入門シリーズ 7 「X 線・放射光の分光」 日本分光学会編 2009 年 4 月 講談社サイエンティフィック 第 1 章 X 線と物質の相互作用 丑田公規 pp. 1-16 第 8 章 X 線測定と関係の深い測定 丑田公規 pp.155-172

2) Kiminori Ushida, Masataka Kinjo, "Fluorescence Correlation Spectroscopy on Molecular Diffusion inside and outside of Single Living Cell" Vol. 2 pp.645-667 (Chapt 33), in H. Fukumura, M. Irie, Y. Iwasawa, H. Masuhara, K. Uosaki (Eds) "Molecular Nano Dynamics" Wiley-VCH (2009)

3) K.Ushida, T. Murata "MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING OF MUCIN. A NEW ASPECT OF MUCIN CHEMISTRY" Studies in Natural Products Chemistry Vol. 32(in print) (Atta-ur Rahman 編)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 鉛蓄電池用極板の製造方法

発明者: 上村智信、丑田公規

権利者: 古河電池株式会社、独立行政法人理化学研究所

種類: 特願

番号: 2011-022090

出願年月日: H23. 2. 3

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: 金属試料の特性を光学的に測定する方法及び装置

発明者: 丑田公規、北島正弘、長谷宗明、石岡邦江

権利者: 独立行政法人理化学研究所、独立行政法人物質・材料研究機構

種類: 特許

番号: 4 5 5 8 2 1 7

取得年月日: H22. 7. 30

国内外の別: 国内

名称: 時間分解電子スピン共鳴測定方法及び装置

発明者: 丑田公規

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 4 6 7 1 5 1 4

取得年月日: H23. 1. 28

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丑田 公規 (USHIDA KIMINORI)

独立行政法人理化学研究所・東原子分子物理研究室・客員研究員

研究者番号：60183018

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし