Fe²⁺によるポリ-y-グルタミン酸の解重合機構

金松澄雄^{1,2*},小西章尋¹

南九州大学大学院園芸学・食品科学研究科細胞防御研究室;
 2南九州大学健康栄養学部食品開発科学科食品生化学研究室

2013年10月11日受付;2014年1月27日受理

Depolymerization of poly- γ -glutamic acid by Fe²⁺ and its mechanism

Sumio Kanematsu^{1, 2*} and Akihiro Konishi¹

¹Graduate School of Horticulture and Food Science, Minami-Kyushu University, Miyazaki 880-0032, Japan; ²Department of Food Science, Minami-Kyushu University, Miyazaki 880-0032, Japan

Received October 11, 2013; Accepted January 27, 2014

To study the depolymerization of poly- γ -glutamic acid (PGA) by reactive oxygen species, we developed an easy and sensitive method that uses agarose electrophoresis. By this method we found that PGA was depolymerized not only by the Fenton system, in which H_2O_2 and Fe^{2+} generate highly reactive hydoxyl radicals (HO·), but also by Fe²⁺ alone. We therefore examined the reaction mechanism by which PGA was depolymerized by Fe^{2+} . When Fe^{2+} was added to PGA solution, oxygen was absorbed but no H_2O_2 was accumulated. Catalase completely inhibited the depolymerization. These findings suggested that HO radicals derived from the Fenton reaction were also involved in the Fe²⁺-only system. The stoichiometric composition in a complex of Fe^{2+} and γ -glutamic acid in PGA was 1:4. The rate constants for oxidation of the Fe²⁺-complex and PGA depolymerization were both 0.003 min⁻¹, suggesting that autoxidation of Fe^{2+} is the rate-limiting step in PGA depolymerization by Fe^{2+} . Ascorbic acid affected PGA depolymerization by the Fenton system but not by the Fe^{2+} -only system, indicating that Fe^{2+} was oxidized to Fe^{3+} in the former, but that most of the Fe^{2+} remained in the latter. By combining the kinetic results and the effects of ascorbic acid, we proposed a mechanism by which autoxidation and locally produced HO[•] radical-mediated depolymerization of PGA occurred in the presence of Fe²⁺. In this mechanism, Fe^{2+} ligated to PGA produces H_2O_2 through the dismutation of O_2^- after autoxidation. The H₂O₂ then reacts with nearby $\overline{F}e^{2+}$ ligated to the PGA to generate HO[•] radicals locally, resulting in scission of the PGA chain. This mechanism suggests a novel physiological function for PGA in detoxifying the harmful effects of free Fe²⁺.

Key words: depolymerization, poly-γ-glutamic acid, Fenton reaction, hydroxyl radical, hydrogen peroxide.

緒言

活性酸素 (ROS) は生物の基本的な代謝である呼吸や 光合成において生成され,細胞障害を引き起こす反応 性の高い分子種である^{1,2)}.一方,免疫など生体防御に とって,ROS は必要な分子種であり^{3,4)},近年ではシ グナル伝達に関与することが明らかにされ,多くの興 味を引いている⁵⁻⁷⁾.ROS は酸素と水の間の酸化還元 中間体であるスーパーオキシド (O₂·-),過酸化水素, ヒドロキシルラジカル (HO・) と酸素の励起分子であ る一重項酸素 ($^{1}O_{2}$)の4種の分子種を含む⁸⁾. これら の中で HO・ラジカルは最も酸化力が強く、細胞成分を 非特異的に酸化することから、ROS による細胞障害の 作用分子種と考えられている. HO・ラジカルは放射線 照射による H₂O の電離によって直接生じるが、細胞内 では酸素からの直接の3電子還元や H₂O からの1電子 酸化による生成は知られておらず、HO・ラジカルを直 接生成する生体反応はない、細胞内では Fe²⁺ と H₂O₂ によるフェントン反応⁹⁾ (式 1)

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO \cdot + OH^-$$
(1)

^{*}連絡著者: E-mail, kanemats@nankyudai.ac.jp; Fax, +81-985-83-3521.

によって生成されると考えられているが, HO・ラジカ ルが遊離されるのか, またはオキシフェリル型の酸化 剤が生じるのかは長年論争になっている¹⁰⁻¹²⁾.

ポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) は納豆の粘質物の主成 分で, Bacillus subtilis var. nattoにより作られるポリペプ チドである. 通常のポリ-α-グルタミン酸がα-ヘリック ス構造を取るのに対して、PGAはグルタミン酸のv-カ ルボキシル基とα-アミノ基がγ-アミド結合を形成した 鎖状分子であり、D体とL体の混在によりランダムコイ ル構造をとっている¹³⁾.また、中性pHではα-カルボキ シル基 (α-COO⁻) の解離により, ポリアニオンとし て存在する.このような構造的特性から、PGAは、保 水性, 増粘性, 親水性, 凝集性, 生分解性などの特性 を持ち、多くの産業分野で利用されている14-16)、生体 高分子はその重合度が物性に大きく影響するため,重 合の逆の過程である解重合 (分解) の研究も重要であ る. 例えば、関節の潤滑剤として機能する多糖類のヒ アルロン酸はROSによって鎖長が減少すると潤滑特性 が低下し, 関節の機能不全が生ずることから, 多くの 研究がなされている17-19).一方, PGAは種々の分野でそ の応用が図られているにも拘わらず, ROSによる解重 合についての研究は見あたらない.

本研究では PGA が Fe²⁺ を結合できることに着目し, 生体系での HO・ラジカルの生成モデルとして,フェン トン系と共に Fe²⁺ のみによる PGA 解重合について検 討した.その結果, Fe²⁺ の自動酸化による PGA の解重 合を見出し,その機構を提唱した.また,この機構か ら,PGA が Fe²⁺ と配位することによって Fe²⁺ を安全に 酸化し,Fe²⁺ の害作用から細胞を防御しているという, PGA の新たな生理的機能の可能性が示唆された.

材料と方法

試薬および材料

PGA150(メーカー表示: 平均分子量150-250万), PGA20(平均分子量20万-50万) およびFeSO4·7H₂Oは 和光純薬, SeaKem MEアガロースはタカラより購入 した. タンパク質分子量マーカーはGE ヘルスケア, DNAサイズマーカー λ /*Hin* dIIIおよび ϕ X174/*Hae* IIIは ニッポン・ジーン製を用いた. FeSO4は使用直前に超純 水(18 MΩ·cm) に溶解して用いた. PGAの解重合反応 に用いた他の試薬の調製にも超純水を使用した.

PGA の解重合反応とアガロース電気泳動

PGAの解重合反応には和光製PGA150を用いた.な お平均分子量はアガロース電気泳動の結果から約150 万であった.解重合反応はPAG 40µg を含む50µℓの反応 混液中で,37℃,10分間おこなった.反応後,反応混 液10µℓを2%アガロースゲルに供し,40mMトリス-酢 酸-EDTA緩衝液で,定電圧(100 V)で電気泳動した.タ ンパク染色には酸性タンパク質の染色剤であるメチレ ンブルーを用いた.ゲル上でのバンドのピーク位置は ImageJ 1.47V (NIH)を用いて検出した.

PGA の分子量測定

解重合した PGA の平均分子量をアガロース電気泳動 で求めるために、検量線を作成した. PGA の分子量マ ーカーは市販されていないため、まず、PGA150 から 超音波処理(2秒から5分間)によって種々の大きさ を持つ PGA を作成し,12.5% SDS-ポリアクリルアミド 電気泳動(SDS-PAGE)で平均分子量を推定した. 用い た SDS-PAGE 用のタンパク質分子量マーカーは以下の とおりである. α -ラクトアルブミン(14,400),トリプ シンインヒビター(20,100),カルボニックアンヒドラ ーゼ(30,000),オボアルブミン(43,000),牛血清アル ブミン(67,000),ホスホリラーゼb(94,000).PGA と タンパク質マーカーは SDS とメルカプトエタノールで 100℃,5分間熱処理をおこなった.

次に, SDS-PAGE に用いた PGA を 2% のアガロー ス電気泳動に供し,同様に平均分子量を推定した. λ-DNA/*Hin* dIII (2,027 kbp のバンド)およびφX174/*Hae* III (1,353, 1,078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp のバンド) DNA マーカーに平均ヌクレオチド分子 量 (616)を掛けて分子量マーカーとして用いた. SDS-PAGE で測定した平均分子量 30,000 の PGA はアガロー ス電気泳動でもほぼ同じであった. 作成した検量線か ら PGA150 の平均分子量は 150 万, PGA20 は 20 万と推 定した.

酸素吸収の測定

酸素吸収は Hansatech 社製の Clark 型酸素電極 DW1 と電極制御器 CB1-D を用いて測定した.反応溶液は 1ml とし,測定は 25℃でおこなった.

結果と考察

アガロース電気泳動による PGA 解重合の測定法

Yamaguchi らは重合度の異なる PAG を SDS-PAGE 法 で分離し,塩基性色素のアルシアンブルーで染色・検 出している²⁰⁾.また,Bhilocha らはアガロース電気泳 動法でヒアルロン酸の分子量を測定しいてる²¹⁾.SDS-PAGE 法は分子量にしたがって高分子を精度良く分離で きる簡便な方法であるが,SDS ゲルの作成および分析 試料の調製に時間を要する.そこで,より簡便にPAG の解重合度の度合いを測定するために,我々はDNA の 電気泳動装置(ミューピッド)を用いたアガロースゲ ル電気泳動法を検討した.

まず,解重合の程度を調べるのに適した重合度を 持つPGAとして,二種のPGA(Wako PGA150,Wako PGA20)を検討した結果,PGA150は十分な分子量を 持つことから,その解重合産物はアガロースゲルでの 分離に適していることが分かった.PGA20は分子量が 小さく,大きな移動度を示し,解重合の測定には不向 きであった(データ未掲載).次に,PGA150を用いて PGAの分離に適したアガロースゲルの濃度を1,1.5, 2%で検討した結果,1%ゲルではPGAは長いスメア ーなバンドになったが,2%では比較的コンパクトにな り,移動度も小さいことから,2%ゲルを採用した(デ ータ未掲載). PGA の前処理の必要性を SDS-PAG とアガロース電 気泳動で検討した. SDS の存在および非存在下, 100℃ で 5 分間熱処理したサンプルの SDS-PAG の泳動パター ンには差が認められなかった. また, 熱処理, 非熱処 理した PGA のアガロースゲルでの泳動パターンも同様 であった. 以上のことから, PGA の変性処理は不要で あることが分かった(データ未掲載). このことは PGA の解重合を測定する際に,反応終了後,反応混液を速 やかにアガロース電気泳動に供することにより,反応 を止めることができるので,速度論的な手法を用いる ことができることを示す.

Fe²⁺の PGA 解重合活性

 Fe^{2+} と H₂O₂の混合液は酸化力の強い HO· ラジカルを 生じるフェントン試薬(フェントン系)として知られて いる⁹⁾. このフェントン系を用いて PGA の解重合を検 討した(図1). 予測したとおり, 1mM Fe^{2+} +1mM H₂O₂ で PGA の速やかな低分子化が生じたが, 1mM の H₂O₂ のみでは低分子化は認められず, Fe^{2+} がこの反応に必 須であることが示された. 一方, 驚いたことに 1mM Fe^{2+} のみでも PGA の解重合が検出された. 解重合の程 度はフェントン系よりは小さかった. ところで, 高分 子ポリマーの解重合の測定に粘度法が多用されるが, 以上の結果から, アガロース電気泳動法は PGA の解重 合を微量で,感度良く, 簡便に測定できる方法である ことが示された.

次に、 Fe^{2+} に PGA 解重合活性が見られたので、種々 の金属イオンの活性を検討した(図2). Fe^{2+} とは対照 的に、 Fe^{3+} には活性が無かった. フェントン系では最 初に H_2O_2 による Fe^{2+} の速い酸化反応があり(式1), 生じた Fe^{3+} は H_2O_2 でゆっくりと還元され(式2),

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HO_2 + H^+$$
 (2)

HO· ラジカル生成が持続することが報告されている²²⁾. 一方, PGA 存在下では, Fe³⁺の還元(式 2)は無いこと が示された.また, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺にも PGA 解重合活性は認められなかった.

PGA 解重合に対するカタラーゼと SOD の影響

 Fe^{2+} 単独でのPGAの解重合にフェントン反応が関与 していることが示唆されたのでカタラーゼの影響を調べ た.図3に示すようにカタラーゼ添加は Fe^{2+} のみとフ ェントン系での解重合を完全に阻害した.一方,O₂.-の 不均化反応を触媒するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)の影響は認められなかった.これらのことから, Fe^{2+} のみの系においては,まず Fe^{2+} が酸素を1電子還 元し,O₂.-が生じる.次にO₂.-が非酵素的に不均化し て H_2O_2 が生じ,これと Fe^{2+} のフェントン反応による HO·ラジカル生成によりPGAの鎖切断が起きると考え られる.

Fe²⁺-PGA 複合体の自動酸化

 Fe^{2+} による PGA 解重合でのカタラーゼの阻害効果 から自動酸化による H_2O_2 生成が示された。そこで、 Fe^{2+} の自動酸化に対する PGA の影響を検討するため、



図 1. Fe²⁺ および Fe²⁺ + H₂O₂ による PGA の解重合 50µℓ の反応混液中の PAG 40µg をそれぞれ 1mM H₂O₂, 1mM Fe²⁺ また は 1mM Fe²⁺ + 1mM H₂O₂ と 37℃で 10 分間反応させた後,反応混液 10µℓ を電気泳動した. BPB, プロムフェノールブルー.メチレンブルーで染 色した.



図 2. 金属イオンの PGA 解重合活性 50µℓの反応混液中の PAG 40µg を 1mM の各種金属イオンと 37℃で 10 分間反応させた.反応混液 10µℓ を電気泳動した.



図 3. PGA 解重合に対するカタラーゼと SOD の影響 50µℓの反応混液中の PAG 40µg をカタラーゼまたはスーパーオキシドジ スムターゼ存在下で, ImM Fe²⁺ または ImM Fe²⁺ + 1mM H₂O₂ と 37℃ で10 分間反応させた. カタラーゼ (Cat), 100 units; スーパーオキシドジ スムターゼ (SOD), 20 units. 反応混液 10µℓ を電気泳動した.

酸素電極を用いて酸素吸収速度を測定した(図4). Fe²⁺ は酸性および中性の pH では6 個の水が配位した Fe²⁺(H₂O)₆として存在し、その自動酸化速度は比較 的遅く, PGAの解重合反応をおこなった 10 分間では 無視できた.一方, PGA が存在すると Fe²⁺の自動酸 化は促進された.比較のため、鉄に配位することが知 られているリン酸や DTPA, EDTA などのキレーター の影響も調べた. Fe²⁺の自動酸化は PGA に比べて著 しく促進され、その速度は Fe²⁺-EDTA > Fe²⁺-リン酸 > Fe^{2+} -DTPA≫ Fe^{2+} -PGA≫ Fe^{2+} (aqo) の順であった. Welch らも Fe²⁺の自動酸化に対する緩衝液, リガンド, キレーターの影響を報告している²³⁾. EDTA は Fe²⁺ と 1:1の6配位キレート化合物を作り、Fe²⁺には4つの 酸素原子と2つの窒素原子が配位する. このような配 位子場は Fe²⁺ より Fe³⁺ の方が安定であり, その結果, 自動酸化が促進される. PGA はα-COO⁻を持つポリア ニオンであることから、 Fe^{2+} はPGAの多数の α -COO⁻ に配位することによって自動酸化が促進されると考え られる.しかしながら、Fe²⁺-PGAの自動酸化の速度 は Fe²⁺-EDTA に比較すると比較的遅いことから、Fe²⁺-PGA の配位子場構造は比較的自動酸化に抵抗性があ ることになり、その配位子構造の解明は大変興味深い. Ca²⁺-PGA の場合は Ca²⁺ が 2 個の α-COO⁻ に配位して いることが報告されている 24).

次に,自動酸化における H_2O_2 の生成について検討した(図 4). Fe²⁺の自動酸化では酸素分子が1電子還元 され O_2 --が生成する(式 3).次に2分子の O_2 --の不均 化反応によって1分子ずつの H_2O_2 と酸素分子が生じる (式 4). H_2O_2 の消費系がなければ,式3と式4を合計 すると,1分子の酸素吸収で1分子の H_2O_2 が蓄積する ことになる(式 5).

 $2[Fe^{2+}-PGA] + 2O_2 \rightarrow 2[Fe^{3}-PGA] + 2O_2^{-}$ (3)

 $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ (4)

$$2[Fe^{2+}-PGA] + O_2 + 2H^+ \rightarrow 2[Fe^{3+}-EDTA] + H_2O_2$$
 (5)

PGA の自動酸化の途中でカタラーゼを添加しても酸素 発生は見られないことから, $H_{2}O_{2}$ の蓄積は無いことが 示された(図4). 同様に,リン酸, DTPA, EDTA の場 合もカタラーゼによる酸素発生は認められなかった. カタラーゼは PGA の解重合を完全に阻害した(図3) ことから,これらの系で生成した $H_{2}O_{2}$ は速やかに消費 されることが示された.

Fe²⁺-PGA 複合体の化学量論的組成比

 Fe^{2+} (aqo)の自動酸化速度は Fe^{2+} -PGA 複合体のそれ と比較すると無視できる.したがって実験に要した時 間内では PGA と結合した Fe^{2+} のみが自動酸化し,酸素 吸収量は形成された Fe^{2+} -PGA 複合体量に比例すると考 えられる.そこで,この酸素吸収を指標に Fe^{2+} -PGA 複 合体の化学量論的組成比を検討した(図 5).1 mM Fe^{2+} (1,000 nmol) に種々の量の PGA (y-グルタミン酸残基換



図 4. Fe²⁺-PGA 複合体の形成と酸素吸収 酸素電極の 1ml の反応漕へ PGA 400 μg/ml を入れ,酸素吸収を測定 した.縦の太い矢印の箇所で終濃度 1mM になるように Fe²⁺ を加えた. また, 2mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), DTPA, または EDTA を含む溶液でも同様に酸素吸収を測定した.蒸留水のみに Fe²⁺ を加え たときの結果も示した. Cat, 100 units.縦と横の細い矢印はそれぞれ, 酸素吸収量と時間を示す.

算)を加え,酸素吸収量を測定し,酸素吸収量が一定に なる PGA の量を求めた (図 5A). その結果, [PGA]/[Fe²⁺] = 3.5 の値が得られた. 一方, 200 μ g PGA (1,500 nmol の γ -Glu に相当)に種々の量の Fe²⁺を加え,酸素吸収量を 測定し,酸素吸収量が一定になる Fe²⁺量を求めたところ, [PGA]/[Fe²⁺] = 3.8 の値が得られた (図 5B). このことか ら Fe²⁺には少なくとも4個のグルタミン酸残基が配位し ていると考えられる. この場合, α -COO⁻のみが配位し ているのか,または α -イミノ基や γ -カルボニル基など も関与しているのかはこれからの課題である. なお,対 照として求めた Fe²⁺-EDTA のモル比は 1:1 であり,理論 値と一致した (図 5C). このことは酸素吸収量から Fe²⁺ PGA の化学量論的組成比を求める方法が有効であるこ とを示している.

 Ca^{2+} は PGA の 2 個の α -COO⁻に配位することから²⁴, Fe²⁺ と Ca²⁺の配位子についての拮抗を検討するために, Fe²⁺-PGA の解重合に対する Ca²⁺の影響を調べた. その 結果, 1mM Ca²⁺の添加は 1mM Fe²⁺のみ,およびフェン トン系 (1mM Fe²⁺ + 1mM H₂O₂)による解重合に全く影響 しなかった (データ未掲載). このことは Fe²⁺ と Ca²⁺ の PGA に対する安定度定数の違い,もしく配位状態の差 を反映しているものと考えられる.

PGA 解重合で酸化された Fe²⁺-PGA 量と吸収された酸素 量の比

次に、反応機構を検討するために、一定量の Fe²⁺ を PGA で滴定した場合(図 5A) および一定量の PGA を Fe²⁺ で滴定した場合(図 5B) から、Fe²⁺ 当たりの酸素吸 収量のモル比 $[O_2]/[Fe^{2+}]$ を求めた.その結果、それぞれ、 $1/12 \ge 1/15$ であった.一方、Fe²⁺-EDTA 複合体の場合、 モル比は 1/3であった(図 5C).Fe²⁺ からの電子が全て 酸素に渡って水に戻されるとモル比 $[O_2]/[Fe^{2+}]$ は理論的 に 1/4になる(式 6).この比の値が 1/4 より小さい



図 5. Fe²⁺-PGA 複合体の化学量論的組成比

(A) Fe²⁺の濃度を一定 (1mM) にして, PGA 量を変化させた時の酸素吸収量. (B) PGA 量を一定 (200μg, γ-Glu 1,500 nmol に相当) にして, Fe²⁺の濃度を変化させた時の酸素吸収量. (C) 0.15 mM の EDTA に対して Fe²⁺ を変化させた時の酸素吸収量.

場合は,水に戻されない Fe²⁺ からの電子があることを 意味する.

Fe²⁺-PGA 複合体や Fe²⁺-EDTA 複合体では,自動酸化 (式3),H₂O₂ 生成(式4),および,フェントン反応に よる HO・ラジカル生成(式7)が連続して生じると考 えられる.それらの式を合計すると式8になる.Fe²⁺-EDTA 複合体の場合,HO・ラジカルによる EDTA から の水素引き抜き反応の後,ラジカル消滅反応が生じる とすると,図5C で得られたモル比 1/3 を説明できる.

$$Fe^{2+}-PGA + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}-PGA + HO + OH^-$$
 (7)

$$3 [Fe^{2+}-PGA] + O_2 \rightarrow$$

$$3 [Fe^{3+}-PGA] + HO \cdot + OH^{-} \quad (8)$$

$$PGA-H + HO \rightarrow PGA + H_2O \qquad (9)$$

Fe²⁺-EDTA の酸素酸化の詳細な機構として、ストップドフロー法をもちいた速度論的研究が報告されている²⁵⁾. 一方、Fe²⁺-PGA 複合体では生成した HO· ラジカルが PGA から水素引き抜き反応をおこなって鎖を切断する 反応 (式 9) の他に、モル比 $[O_2]/[Fe^{2+}]$ が 1/12 から 1/15 であることから、自動酸化以外の酸素吸収を伴わない Fe²⁺の酸化が生じていることが示唆される.反応の詳細については不明であるが、HO· ラジカルによる Fe²⁺ の酸化 (式 10)²²⁾も関与していると考えられる.

$$Fe^{2+}-PGA + HO \rightarrow Fe^{3+}-PGA + H_2O$$
 (10)

Fe²⁺-PGA 複合体の自動酸化の速度定数

 Fe^{2+} -PGA 複合体の自動酸化の速度を酸素電極を用い て測定した.反応は Fe^{2+} の濃度を一定にして PGA の濃 度を変えた場合と、逆に PGA の濃度を一定にして Fe^{2+} の濃度を変えた場合の二通りでおこなった.一般に、 キレーターが存在しない水溶液中での Fe²⁺ の自動酸化 の速度式は次のように書くことができ (式 11),酸性, 中性の pH ではその速度は遅い ²⁶.

速度 =
$$k$$
 [Fe²⁺][O₂][OH⁻]² (11)

ここで*k* は速度定数である. 図4 に示したように Fe²⁺ が PGA と複合体を形成すると自動酸化は促進される. Fe²⁺-PGA の自動酸化速度を酸素吸収速度で求めると, 速度式は式 12 で表せる.

$$-d[O_2]/dt = k [Fe^{2+}-PGA][O_2][OH^-]^2$$
(12)

[O₂]>>[Fe²⁺-PGA] および pH 変化が無いとすると,酸素 吸収は擬一次反応になり,式 13 で表せる.

$$-d[O_2]/dt = k_{obs}[Fe^{2+}-PGA], k_{obs} = k[O_2][OH^-]^2$$
 (13)

ここで k_{obs} は見かけの一次速度定数である.酸素吸収 速度から Fe^{2+} の自動酸化速度を求めるために、PGA 解 重合で酸化された Fe^{2+} -PGA 量と吸収された酸素量の比 (図 5A, B)を互いの速度の割合とした.したがって Fe^{2+} の自動酸化速度式は式 14 になる.

$$-d[Fe^{2+}-PGA]/dt = n (-d[O_2]/dt)$$
(14)

ここでnは12から15である.式14を用いて,Fe²⁺-PGAの自動酸化の見かけの一次速度定数0.003-0.004 min⁻¹が得られた(図6).

Fe²⁺-PGA 複合体の解重合の速度定数

PGAの解重合では y-Glu 残基に配位した Fe^{2+} の自動 酸化で生ずる H_2O_2 が近傍の配位した Fe^{2+} とフェントン 反応により HO· ラジカルを生成し,これが PGA の鎖 切断を引き起こすと考えられる.フェントン反応は自 動酸化に比べて速い反応であるので,PGAの解重合反 応では,配位している Fe^{2+} の自動酸化が全体を律速し



図 6. Fe²⁺-PGA 複合体の自動酸化の速度定数 図 5 の (A) と (B) に用いた酸素吸収曲線から Log ([O₂],- [O₂]_∞) vs. 時間のプロットをおこない,酸素吸収の擬一次反応速度定数を求めた. (A) Fe²⁺の濃度を一定(1mM)にして,PGA 量を変化させた時の酸素吸収. (B) PGA 量を一定 (200 µg, 1.5 mM γ-Glu 相当) にして, Fe²⁺の濃度を 変化させた時の酸素吸収.

ていることになる.酸素過剰の条件では自動酸化はラ ンダムな自発的反応であるので、PGAの切断反応もラ ンダムな反応になり、一次反応の速度則に従うと考え られる.また、Fe²⁺はPGA中の α -COO⁻と1:4の錯体 を形成することから、配位したFe²⁺の部位で生成した 短寿命のHO⁻ラジカルは極近傍のPGAから水素引き 抜き反応をおこない, 鎖切断を引き起こすと推定でき る. すなわち, 鎖切断は Fe²⁺ の配位している近傍で生 じる事になる. したがって, PGA と配位する Fe²⁺ の量 を減らすと配位した Fe²⁺ 間の距離が長くなることから, 切断で生ずる PGA 分子の鎖長は Fe²⁺ の量に依存し,下 限があると考えられる. このような反応を表すことの できる速度式として. 以下の考察より式 21 を用いた.

高分子ポリマーのランダム切断による重合度(結合数)の減少は一次反応になり,式15の速度式で表すことができ,これから式16が得られる^{27,28)}.

$$\mathbf{P}_{\mathrm{t}} = \mathbf{P}_{\mathrm{0}} \exp \left(-k_{\mathrm{d}} \mathbf{t}\right) \tag{15}$$

$$1/Mn_{t} = (k_{d}/W) t + 1/Mn_{0}$$
(16)

ここで、 P_0 はポリマーの初期重合度、 P_t は時間 t での 重合度、 k_a は鎖のランダム切断反応の速度定数、Mnは ポリマーの数平均分子量、wはモノマーの分子量であ る.一方、後藤と藤原は機械的切断反応において切断 を受ける分子鎖長(重合度)に限界がある場合、式 17 が実験値とよく一致することを報告している²⁹.

$$1/(\mathbf{P}_{t} - \mathbf{P}_{\infty}) = k_{d}t + 1/(\mathbf{P}_{0} - \mathbf{P}_{\infty})$$
(17)

ここで、 P_{∞} は最終重合度である.ところで、式 17 で $P_{\infty} = 0$ とすると式 18 が得られ、これに式 19 を代入す ればとすれば式 16 と一致する.

$$1/P_{\rm t} = k_{\rm d}t + 1/P_0 \tag{18}$$

$$P_t w = M n_t \tag{19}$$

ここで, Mnt は時間 t での数平均分子量である. したが って, 式 18 は式 17 に含まれることから, 式 17 に式 19 を代入して得られる式 20 を Fe²⁺-PGA 複合体の解重合 の速度定数の算出に用いることができる.

$$1/(Mn_t - Mn_{\infty}) = (k_d/W) t + 1/(Mn_0 - Mn_{\infty})$$
 (20)

ここで、Mn_∞は最終数平均分子量、wはγ-Glu残基の 分子量 129 である.式 20 の使用には数平均分子量を用 いる必要があるが、使用した PGA の多分散度が不明で あり、また解重合した PGA の分子量をアガロース電気 泳動の検量線から求めることから、便宜的な分子量(M) を用いた式 21 を速度定数の算出に用いた.

$$1/(M_{t} - M_{\infty}) = (k_{d}/W) t + 1/(M_{0} - M_{\infty})$$
(21)

Fe²⁺存在下でのPGA 解重合のタイムコースをアガロ ース電気泳動法で解析し、その分子量の減少から速度 定数を求めた(図7).PGAとFe²⁺を所定の時間反応さ せた後,反応液をアガロース電気泳動に供して反応を 止め,泳動後,移動距離から分子量を求めた.分子量 の推定にはDNAマーカーで作成した検量線を使用し た.その結果,PGAの解重合の速度定数として 0.003 min⁻¹が得られ,自動酸化の速度定数(図6)とほぼ等し

Fe²⁺-PGA 複合体の解重合に対するアスコルビン酸の影響

Fe²⁺ 単独の系では Fe²⁺-PGA 複合体の自動酸化の一次 速度定数と解重合の速度定数が等しいことから、自動 酸化が解重合反応全体の律速段階であると考えられる. そこで, Fe²⁺ 単独およびフェントン系での PGA 解重合 に対する還元剤の影響をアスコルビン酸を用いて検討 した (図 8). フェントン系ではアスコルビン酸により 1µMの微量の Fe²⁺ でも解重合が認められた.フェント ン系ではH₂O₂がFe²⁺より過剰の場合,Fe²⁺はH₂O₂に より酸化されて全て Fe³⁺ になるため、フェントン反応 は終了する、したがって、フェントン系でのアスコル ビン酸の効果は Fe³⁺ を再還元して Fe²⁺の存在量を増や し、フェントン反応を継続させることにあると考えら れる. 一方, Fe²⁺のみの場合は, 自動酸化で生ずる Fe³⁺ をアスコルビン酸で Fe²⁺ に還元しても, PGA 解重合反 応は影響されなかった.したがって、Fe²⁺が自動酸化 されてH2O2が生成する時のみ解重合が生じることが示 唆された.

Fe²⁺による PGA 解重合の反応機構

反応速度論的結果とアスコルビン酸の影響の結果より、 Fe^{2+} およびフェントン系でのPGA 解重合の反応機構を考察する(図9). Fe^{2+} によるPGA の解重合反応では Fe^{2+} がPGA の α -COO⁻に配位するため、PGA の近傍で Fe^{2+} の局所濃度が高くなり、さらに配位することによって Fe^{2+} の自動酸化による $O_{2^{*-}}$ 生成が促進される.

その結果, O_2 -の不均化反応で生ずる H_2O_2 も PGA 近 傍での局所濃度が高くなる. この生じた H_2O_2 は PGA に配位している近傍の Fe^{2+} と速やかにフェントン反応 を起こして HO· ラジカルを生成し, HO· ラジカルはほ とんど拡散せずに近傍の PGA から水素引き抜きをお こない鎖切断を引き起こすと考えられる. この系では Fe^{2+} -PGA の自動酸化と解重合の速度が同じであること から, PGA に配位した Fe^{2+} の自動酸化が全反応の律速 段階であることが示される.

フェントン系での PGA 解重合の反応機構は, Fe²⁺が PGA に配位することを除けば,フェントン反応を利用 して有機化合物を分解する場合の反応機構と類似して いると考えられる.通常のフェントン系では,バルク 溶液中の Fe²⁺ と H₂O₂ を混合して HO· ラジカルを発生 させると短0寿命の HO· ラジカルは溶液中に生じるこ とから,拡散して有機化合物と反応することになる. そのため,効率の良い反応のためには Fe²⁺ と H₂O₂ の 濃度を高くする必要がある.一方, PGA 存在下では, Fe²⁺ は PGA に配位するので PGA 近傍で HO· ラジカル が生じ, PGA 鎖切断の確率が高くなる.

以上のことから、PGAの Fe²⁺ による解重合機構として,局所的 HO・ラジカル生成モデル,すなわち局所的 に高濃度で存在する Fe²⁺ と H₂O₂ によるフェントン反応 が関与していることが示された。

最後に

本研究で PGA は Fe²⁺ と H₂O₂ よりなるフェントン系 のみならず, Fe²⁺ のみによっても容易に解重合される ことが明らかになった. 生体系では不均一系であるこ





図 7. Fe²⁺ による PGA 解重合の速度定数

反応混液中の PGA 800µg/ml に 1mM Fe²⁺を加え,所定の時間反応させた後,反応混液 10µℓをアガロース電気泳動に供した(図中のゲル).解 重合した PGA の移動度から,検量線を用いて分子量を算出し,本文中の 解重合の式 21を用いて解析した.

図 8. PGA 解重合に対するアスコルビン酸の影響

50µℓの反応混液中の PAG 40µgを, 1mM アスコルビン酸の非存在, または存在下で Fe²⁺ (0mM から 1mM まで)のみ, および Fe²⁺ (0-1mM) + 1mM H₂O₂と 37℃で 10 分間反応させた.反応混液 10µℓ を電気泳動した.

(A) Fe²⁺のみ

(B) $H_2O_2 + Fe^{2+}$



図 9. PGA 解重合の反応機構のモデル (A) Fe²⁺ による PGA 解重合モデル. (B) フェントン系 (Fe²⁺ + H₂O₂) による PGA 解重合モデル.

とから、今回の PGA の解重合反応で観察された様に、 Fe²⁺ が生体分子に結合することにより、生体分子の近 傍で HO・ ラジカルが発生することを示している.した がって、この Fe²⁺-PGA の系は HO・ ラジカル生成の生体 系の場のモデル系として大変興味深いと考えられる.

ごく最近,界面で生じるフェントン反応の中間体と してオキソフェリル中間体 Fe (IV) =O が同定され,遊 離の HO・ラジカルは生成されないことが報告された¹²⁾. 今回の我々の結果はこの報告とは矛盾せず,むしろ, PGA の鎖分解が遊離の HO・ラジカルでは無く,Fe²⁺ PGA 上で生じた Fe (IV) によるとすると,Fe²⁺の酸化 速度と鎖切断速度が同じであることから,このような 中間体の存在は非常に魅力的である.

Fe²⁺は適当なキレーターに配位されていないと細胞に対し て害作用をもたらす³⁰. さらに発ガンの原因になることも報 告されている^{31,32}. 今回,我々が明らかにした納豆の粘質 成分である PGA の Fe²⁺ による解重合機構は,PGA が Fe²⁺ に配位して穏やかに,かつ安全に Fe²⁺ を空気酸化し,そ の結果生じる反応性の高い HO·ラジカルは PGA 自身の鎖 切断反応によって消去されることを示唆している. すなわち PGA の持つ生理機能として、Fe²⁺ の害作用から細胞を防御 していることが考えられる. しかしながら,この点に関して は実験的に証明していく必要がある.

要約

活性酸素によるポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) の解重合 反応を研究するために,アガロース電気泳動を用いる 簡便な方法を開発した.この方法を用いて PGA は HO- ラジカルを発生するフェントン系 (Fe²⁺ + H₂O₂) だけで なく, Fe²⁺単独でも解重合されることを見いだしたので, その機構について検討した.

PGA に Fe²⁺ を加えると,自動酸化による速やかな酸 素吸収が生じたが,H₂O₂ の蓄積は認められなかった. 一方,カタラーゼが Fe²⁺ による解重合を完全に阻害 したことから,H₂O₂ の関与が示され,Fe²⁺ のみによる PGA の解重合でもフェントン反応で生じる HO· ラジカ ルが作用分子種であることが示唆された.

 Fe^{2+} (aqo) に比べて Fe^{2+} -PGA 複合体は速やかに自動酸 化することから酸素吸収を指標にして Fe^{2+} -PGA 複合体 の化学量論的組成比を測定した結果, Fe^{2+} と PGA 中の γ -グルタミン酸残基との比は 1:4 であった.また, Fe^{2+} -PGA 複合体の自動酸化の速度定数と Fe^{2+} 存在下での PGA の解重合の速度定数はそれぞれ 0.003 min⁻¹ であり, 両者は等しかった.このことは Fe^{2+} の自動酸化が PGA の解重合反応の律速段階であることを示している.

アスコルビン酸をフェントン系に添加すると微量の Fe²⁺でも解重合が生じたが,Fe²⁺のみによる解重合には 影響しなかった.このことから,フェントン系ではバ ルクのH₂O₂によってFe²⁺はFe³⁺に酸化されてしまう為, 還元剤の効果が生じるが,Fe²⁺のみの場合はPGA に配 位したFe²⁺部位で自動酸化によるH₂O₂が生成し,さら に,近傍に存在するFe²⁺とのフェントン反応でHO·ラ ジカルが生じ,これがPGAの鎖切断をおこなう為,還 元剤の効果は無いと推測した.

以上のことから, 我々は PGA の Fe²⁺ による解重合機 構として, PGA に配位した Fe²⁺ の自動酸化による局所 的 HO· ラジカル生成モデル, すなわち局所的に高濃度 で存在する Fe²⁺ と H₂O₂ によるフェントン反応を提唱す る. また PGA は Fe²⁺ に配位することによって Fe²⁺ を安 全に酸化し, Fe²⁺ の害作用から細胞を防御する生理作 用を有することが示唆された.

キーワード:解重合,ポリ-γ-グルタミン酸,フェント ン反応,ヒドロキシルラジカル,過酸化水素,二価鉄

参考文献

- 1) 浅田浩二 (1976) 酸素毒性 生化学 48: 226-257.
- 2) Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 97-112.
- Robinson, J.M. (2008) Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem. Cell Biol.* 130: 281-297.
- 4) Spoel, S.H. and Dong, X. (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12: 89-100.
- 5) Finkel, T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell. Biol.* **194**: 7-15.
- 6) Le Bras, M., Clément, M.-V., Pervaiz, S. and Brenner, C. (2005) Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histo. Histopathol.* 20: 205-220.
- 7) Yoshizumi, M., Tsuchiya, K. and Tamaki, T. (2001) Signal transduction of reactive oxygen species and mitogenactivated protein kinases in cardiovascular disease. *J. Med. Invest.* 48: 11-24.
- Kanematsu, S. and Asada, K. (1994) Superoxide dismutase. *In* Molecular Aspects of Enzyme Catalysis. Edited by Fukui, T. and Soda, K. pp. 191-210. Kodansha/ VHC, Tokyo.
- 9) Fenton, H.J.H. (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc. Trans. 65: 899-910.
- 10) Prousek, J. (2007) Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* **79**: 2325-2338.
- Barbusiński, K. (2009) Fenton reaction controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng. S* 16: 347-358.
- 12) Enami, S., Sakamoto, Y. and Colussi, A.J. (2013) Fenton chemistry at aqueous interfaces. www.pnas.org/cgi/ doi/10.1073/pnas.1314885111.
- 13) Ho, G.-H., Ho, T.-I., Hsieh, K.-H., Su, Y.-C., Lin, P.-Y., Yang, J., Yang, K.-H. and Yang S.-C. (2006) γ-Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. *J. Chinese Chem. Soc.* **53**: 1363-1384.
- 14) Bajaj, I. and Singhai, R. (2011) Poly (glutamic acid)
 An emerging biopolymer of commercial interest.

Bioresource Technol. 102: 5551-5561.

- 15) Shih, I.L., Van, Y.T. and Shen, M.H. (2004) Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly (glutamic acid) and poly (lysine). *Mini Rev. Med. Chem.* 4:179-188.
- 16) Melancon, M.P., Wang, W., Wang, Y., Shao, R., Ji, X., Gelovani, J.G. and Li, C. (2007) A novel method for imaging *in vivo* degradation of poly (L-glutamic acid), a biodegradable drug carrier. *Pharm. Res.* 24: 1217-1224.
- 17) Swann, D.A. (1967) The degradation of hyaluronic acid by ascorbic acid. *Biochme. J.* **102**: 42c-44c.
- 18) Grishko, V., Xu, M., Ho, R., Mates, A., Watson, S., Kim, J.T., Wilson, G.L. and Pearsall IV, A.W. (2009) Effects of hyaluronic acid on mitochondrial function and mitochondria-driven apoptosis following oxidative stress in human chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 284: 9132-9139.
- Duan, J. and Kasper, D.L. (2011) Oxidative depolmerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiol.* 21: 401-409.
- 20) Yamaguchi, F., Ogawa, Y., Kikuchi, M., Yuasa, K. and Motai, H. (1996) Detection of γ-polyglutamic acid (γ-PGA) by SDS-PAGE. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 255-258.
- 21) Bhilocha, S., Amin, R., Pandya, M., Yuan, H., Tank, M., LoBello, J., Shytuhina, A., Wang, W., Wisniewski, H.-G., de la Motte, C. and Cowman, M.K. (2011) Agarose and polyacrylamide gel electrophoresis methods for molecular mass analysis of 5-500 kDa hyaluronan. *Anal. Biochem.* 417: 41-49.
- 22) 田熊保彦,加藤茂,小島紀徳 (2008) フェントン反応による揮発性有機化合物の分解速度 東京都立産業技術研究センター研究報告 3: 86-87.
- 23) Welch, K.D., Davis, T.Z. and Aust, S.D. (2002) Iron autoxidation and free radical generation: Effects of buffers, ligands, and chelators. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 360-369.
- 24) Tsujimoto, T., Kimura, J., Takeuchi, Y., Uyama, H., Park, C. and Sung, M.-H. (2010) Chelation of calcium ions by poly (γ-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* (*Chungkookjang*). J. Microbiol. Biotechnol. 20: 1436-1439.
- 25) Seibig, S. and van Eldik, R. (1997) Kinetics of [Fe^{II} (edta)] oxidation by molecular oxygen revisited. New evidence of a multistep mechanism. *Inorg. Chem.* 36: 4115-4120.
- 26) Harris, D.C. and Aisen, P. (1973) Facilitation of Fe(II) autoxidation by Fe(III) complexing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **329**: 156-158.
- 27) Davis, A. and Golden, J.H. (1964) Degradation of polycarbonates. III. Viscometric study of thermally-induced chain scission. *Makromolekulare Chem.* 78: 16-23.

- 28) Morris, G.A., Castile, J., Smith, A., Adams, G.G. and Harding, S.E. (2009) The kinetics of chitosan depolymerisation at different temperatures. *Polym. Deg. Stab.* 94: 1344-1348.
- 29) 後藤邦夫,藤原秀樹 (1966) 機械的分裂反応の速度 式について 高分子化学 23: 827-835.
- 30) 村田晃, 日髙敏勝, 神田康三, 加藤冨民雄 (2008)

2価鉄の殺菌作用と作用機構 *佐賀大農彙* 93: 141-155.

- 31) Weinberg, E.D. (1996) The role of iron in cancer. *Eur. J. Cancer Prev.* **5**: 19-36.
- 32) Torti, S.V. and Torti, F.M. (2013) Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat. Rev. Cancer* 13: 342-355.