

酵素反応によるグルカンデンドリマーの形成過程の追跡 Structural Formation of Enzymatically Synthesized Glucan Dendrimer

湯口 宜明^a, 蔭山 茜^a, 柳瀬 美千代^b, 鷹羽 武史^b
Yoshiaki Yuguchi^a, Akane Kageyama^a, Michiyo Yanase^b, Takeshi Takaha^b

^a大阪電気通信大学, ^b江崎グリコ株式会社 健康科学研究所

^aOsaka Electro-Communication University, ^bInstitute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd.

近年、高度分岐構造をもつグリコーゲン様多糖(グルカンデンドリマー)の酵素合成が可能となつてきている。酵素合成によるグルカンデンドリマーはサイズを制御して合成することができる。これまでサイズの異なるグルカンデンドリマー水溶液中からの小角 X 線散乱及び超小角 X 線散乱測定を行い、慣性半径を評価することができた。そこで本研究ではグルカンデンドリマーの形成過程を追跡するために時分割小角 X 線散乱法を行った。散乱曲線の反応による経時変化を観測することができた。ブランチングエンザイムを作用させることで、分岐構造形成によるサイズの減少をとらえることができた。

キーワード： グリコーゲン、グルカンデンドリマー、酵素反応、小角 X 線散乱

背景と研究目的：

澱粉は植物内で各種酵素によって生産されている。澱粉は直鎖のアミロース、分岐構造のアミロペクチンの混合物である。アミロースは α -1,4 結合したグルコースがつながった構造で、アミロペクチンはそれに α -1,6 結合で分岐した構造をとる。グリコーゲンはそれよりも高度に分岐した多糖類であり、数十 nm 程度の径の天然のデンドリマー様粒子である。これは動物の肝臓や筋肉に含まれており、エネルギー貯蔵物質として機能している。食品には牡蠣やレバーなどに含まれ、免疫賦活などの効果が期待されている。これらの機能はグリコーゲンが高度に分岐した構造に由来していることが予想されるが、その相関は未解明である。これまで粒子の形態などは電子顕微鏡や光散乱法[1]などによって検討され、球状の形状をしており、その径も 10–60 nm 程度の定量的な結果が報告されている。江崎グリコ株式会社の多糖酵素合成技術により粒子径を制御して製造したグリコーゲン様多糖(グルカンデンドリマー)に対し、小角 X 線散乱法を用いて、粒子全体を観察することに成功した。本実験では、酵素反応させながらグルカンデンドリマーの形成過程を時分割小角 X 線散乱法により追跡した結果を報告する。

実験：

小角 X 線散乱測定はビームライン BL19B2 で行った。X 線ビームのエネルギーは 24 keV で、カメラ距離は約 3 m とし、検出器には PILATUS を用いた。露光時間はそれぞれ 300 s、インターバルを 300 s とし、時分割測定を行った。カメラ長の較正はベヘン酸銀の周期構造からの回折を利用した。セルホルダーは真鍮製の温度制御可能なものを用いた。セルは光路長 3 mm の平面型のものを使用し、窓剤には石英ガラスを使用した。

サイズが約 8 nm の小さなグルカンデンドリマーの α -1,4 単位鎖を伸長させた星形ポリマーを酵素反応の基質として用いた。溶媒は 10%DMSO 水溶液とした。酵素反応にはブランチングエンザイム(BE)を作用させて反応を開始させ、溶液をセルに注入し時分割小角 X 線散乱測定により反応を追跡した。図 1 のようなスキームを想定した。

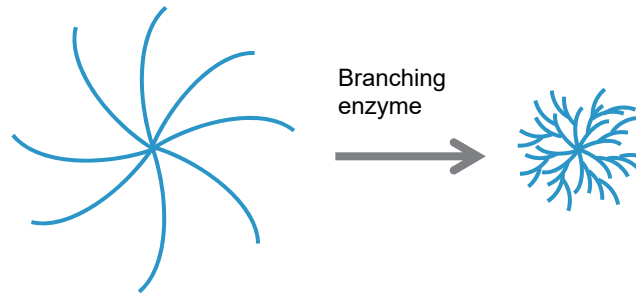


図 1. 酵素反応による星型ポリマーからのグルカンデンドリマーの形成スキーム.

結果および考察：

図 2 は酵素反応の(伸長した α -1,4 単位鎖をもつ星形グルカンポリマー)に BE を作用させて測定した小角 X 線散乱($I(q)$ vs q)の時間的経過である。ここで $I(q)$ は散乱強度、 q は散乱ベクトルの大きさで、散乱角を 2θ 、入射 X 線の波長を λ とすると、 $(4\pi/\lambda)\sin\theta$ で定義される。ここで基質濃度は 4.6 mg/mL で、酵素濃度は 5 U/mL とした。反応が進むにつれて q の小さな領域で散乱強度が徐々に増加していることが確認できた。図 3 は図 2 に対する Kratky プロット($q^2 I(q)$ vs q)に変換したものである。酵素を入れる前あるいは反応初期の溶液の散乱をみると、 q の小さなところで若干立ち上がりが見られるが、 q の大きなところで鎖状構造に起因するプロファイルが得られている。これは α -1,4 単位鎖が長いサイズの大きな星形ポリマーとしての散乱を示している。立ち上がりは小角 X 線散乱の観測領域よりも大きなサイズであることを示す。反応が進むにつれて、 q の小さな領域における立ち上がりの挙動がピークを示し始める。これは BE による糖転移反応が起こり、長い α -1,4 単位鎖の部分が α -1,6 分岐構造を形成し、分子全体のサイズが小角 X 線散乱の領域に入り、グルカンデンドリマー粒子全体を観測されていることを示している。

次に分子鎖全体のサイズを見積もるためにギニエプロットすることにより、慣性半径 R_g を見積もった。反応初期 R_g は約 22 nm で、反応が進むにつれてサイズは減少し、 15 nm 程度まで小さくなった。分岐構造の形成によりサイズが減少している様子がリアルタイムで観測できた。

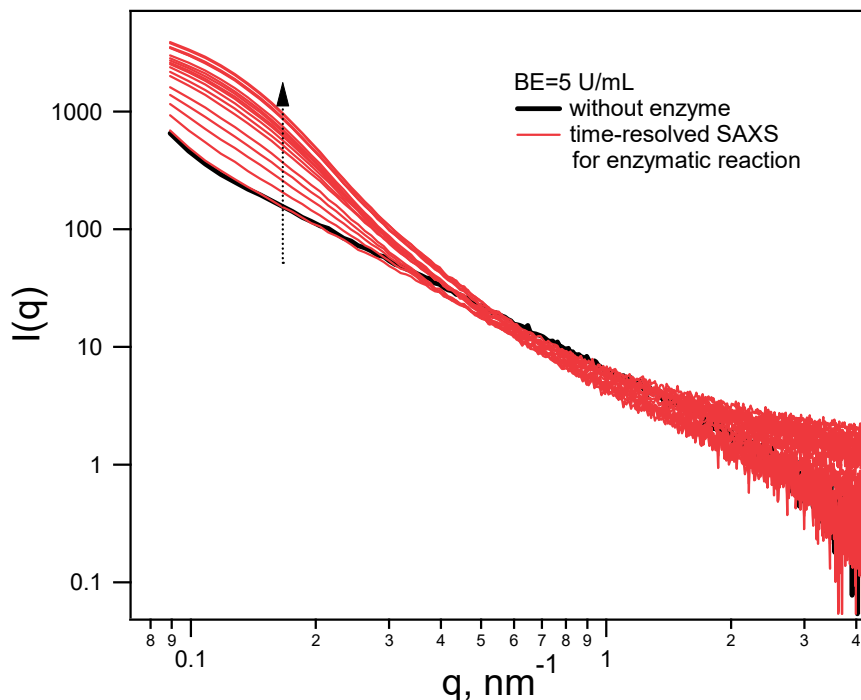


図 2. 枝鎖を伸長し星形グルカンポリマーに BE を作用させて得られるグルカンデンドリマーの形成過程における小角 X 線散乱の経時変化.

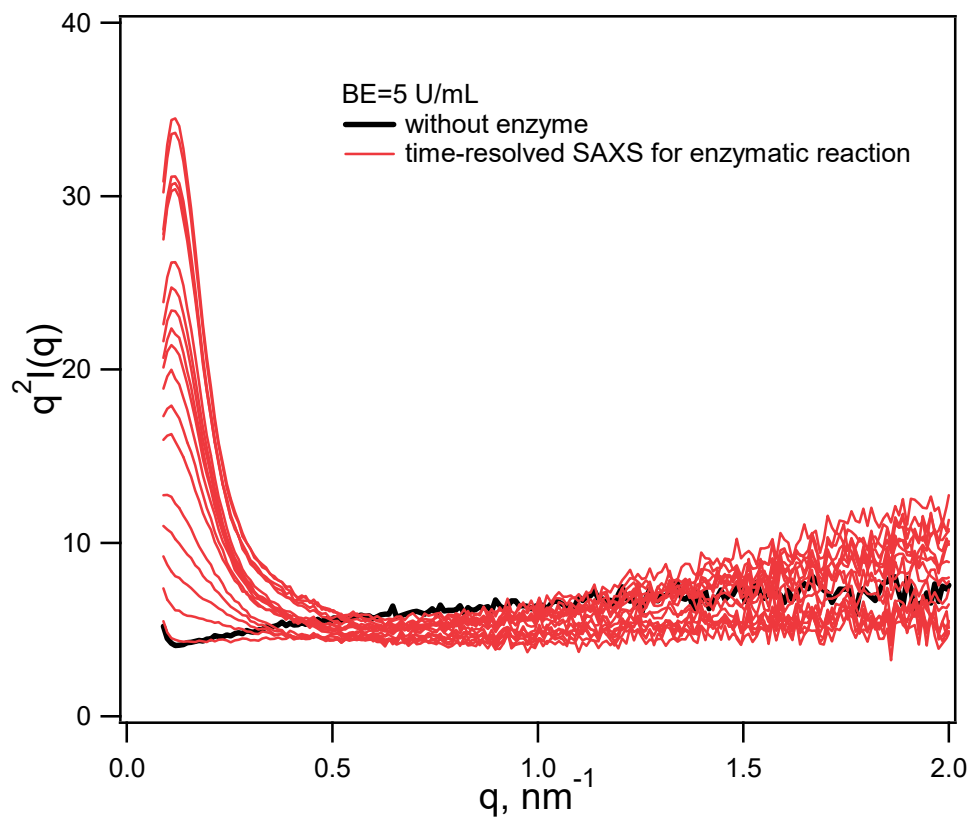


図3. 図2に対する Kratky プロット.

今後の課題：

グルカンデンドリマーの形成過程をより詳細に検討するために分子モデリングや分岐鎖の理論式を適用した解析を進めていく必要がある。

参考文献：

[1] C. E. Ioan, T. Aberle, W. Burchard, *Macromolecules*, **32**, 7444 (1999).