

# オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究

東京工業大学 生命理工学部

井 上 義 夫

The molecular mechanisms of protective effects of oligosaccharides, such as trehalose, maltose, and sucrose, on the cells under highly dehydrated conditions, have been studied by using model phospholipid membrane as well as yeast cells. From the thermal and NMR analysis, and molecular dynamics simulation, anomalously high hydration ability of trehalose was elucidated.

## 1 緒 言

生体内で糖質は、グリコーゲン／ブドウ糖などとして糖質のみで存在するものから、核酸や糖蛋白質などでの糖単位の場合のように分子の構成成分として存在するものまで様々な形態で存在し、エネルギー源、構造構築要素、分子認識相互作用要素などとして幅広い機能を担っている。

一般に、生物が生命活動を維持するためには水は不可欠と考えられるが、一方で高度脱水の状態でも長期間経過後、加水すると生命活動を再開する微生物が存在する。また凍結しても細胞が破壊されず生命を保持する微生物が存在する。このような極度乾燥あるいは凍結という物理化学的ストレスの存在する環境下で生命活動を維持するためには何らかの防御機構が必要である。パン酵母、原始的甲殻類 *Artemia* をはじめとする種々の微生物は、乾燥あるいは凍結という極限環境下に置かれると2分子のぶどう糖 (D-グルコース) が結合したオリゴ糖トレハロース (Glu  $\alpha$  1- $\alpha$  1Glu; 図1参照) を多量に産出することが最近わかった。細胞に耐乾燥性・耐凍結性を付与するトレハロースの機能を

を解明することは、皮膚の乾燥保護・保湿剤などの化粧品素材、生体材料を長期安定保存する際の保存剤などとしてオリゴ糖を今後幅広く応用して

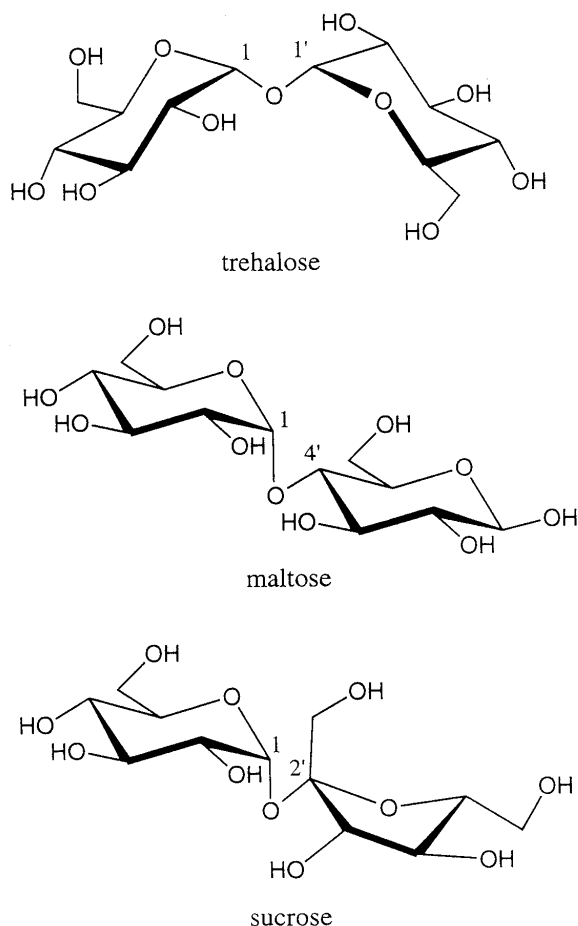


図1 トレハロース、マルトース、スクロース (上から)



Studies on Molecular Mechanisms of Protective Effects of Oligosaccharides on Skins and Cells in the Dry State

Yoshio INOUE

Faculty of Bioscience and Biotechnology  
Tokyo Institute of Technology

いくため、さらにはより優れた乾燥保護機能を持つ新規オリゴ糖誘導体を開発するために極めて重要なことと考えられる。しかし、トレハロースが細胞を保護する分子機構はまだほとんどわかっていない。

本研究の目的は、トレハロースおよび関連する種々のオリゴ糖と生体膜との相互作用を調べ、オリゴ糖、特にトレハロースが乾燥および凍結の際の細胞の破壊を防止する機構を分子レベルで解明するとともに、皮膚や細胞の耐乾燥保護能力がより優れた新たな糖誘導体を開発するための基礎的研究を行うことである。トレハロースの特異な耐乾燥細胞保護活性の機構を解明するためにはトレハロース、細胞および水の3者間の分子レベルでの相互作用を検討し、さらに結果を他のオリゴ糖について得られる結果と比較する必要がある。そこで本研究では、「オリゴ糖と水の相互作用の研究」と「モデル生体膜の耐乾燥安定性に対するオリゴ糖の効果の研究」の二つを重要研究項目とし、おもに示差走査熱量計と超伝導核磁気共鳴法(NMR)を使用した実験および分子動力学計算による理論的方法により研究を行った。

## 2 実験

市販のトレハロースとジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を水分散状態で混合後、凍結乾燥することにより種々の含水率のトレハロース含有リボソームを調製した。

トレハロースを菌体内に含有する、および含有しない酵母菌体は旭化成工業(株)より提供された。示差走査熱計(DSC)測定はSEIKO/DSC20高感度装置を使用し、昇温速度5℃/分、温度範囲0~100℃にて行った。

核磁気共鳴(NMR)スペクトルと磁気緩和時間は日本電子 製 JEOL/GSX270 装置を使用して測定した。

トレハロースとマルトースの水溶液の分子動力学シミュレーションはAmder4.0プログラムを使用し、分子科学研究所(岡崎)のTITAN3000V計

算機上で行った。トレハロースとマルトースの初期構造として結晶構造を使用した。糖水溶液として1糖分子と414~419水分子とから成る系を使用した。

## 3 結果と考察

### 3.1 オリゴ糖の水和特性

トレハロースが、細胞の乾燥による破壊を防ぎ、保護剤として働く作用機構については、モデル生体膜を使用した実験に基づいて現在二つの仮説が提案されている<sup>1, 2)</sup>。一つは水置換仮説であり、完全脱水状態においてトレハロースが細胞膜に直接結合し、含水状態での結合水の代役を果たすという説である。もう一つはガラス状態仮説である。これは、糖-水混合系が脱水、濃縮、乾燥に進む過程でガラス化し、その結果細胞膜はマイクロカプセルともいうべき状況の中に閉じ込められ、その時点での状態が固定・凍結されてしまうという説である。

乾燥状態でトレハロースが細胞膜モデルであるリン脂質二分子膜の表面に直接結合することを示す多くの実験事実がすでにあるが、すべての結果が水置換仮説を必ずしも支持しているわけではない。例えば、リン脂質二分子膜のゲル-液晶転移温度 $T_m$ の乾燥に伴う上昇を抑える添加糖の効果を糖-膜間相互作用の強さの一つの指標として使用し、凍結乾燥後のDPPCリボソームの $T_m$ を比べてみると、DPPC単独時の112℃は単糖グルコース、ガラクトースを添加するとそれぞれ44.9、44.1℃に、二糖トレハロース、マルトース、スクロース(図1参照)を添加するとそれぞれ25.4、26.0、28.7℃になる<sup>3)</sup>。すなわち、二糖は単糖に比べると優れた $T_m$ 抑制効果を持つが、トレハロースが二糖の中で際立った抑制効果を示しているとは言えない。

二糖の水溶液系のガラス転移温度 $T_g$ はスクロース<マルトース<トレハロースの順に高くなり、濃縮が進むとトレハロースの場合 $T_g$ 値は室温付近まで上昇する<sup>4)</sup>。 $T_g$ が高いことはガラス化がよ

り容易に起こることを示し、乾燥保護剤として有利であることを示す。

水置換仮説とガラス状態仮説のいずれが正しいにせよ、糖の生体膜保護作用は糖と膜、糖と水および膜と水の間の相互作用が密接に関与する現象である。生体膜の乾燥保護でのトレハロースの特異性に注目するならば、これら3相互作用の中でも特に糖-水間相互作用を重視することは妥当であろう。本研究では水和という観点からトレハロースを含む数種のオリゴ糖の性質を調べた。

DSCにより決定した1分子当たりの不凍水量はトレハロース、マルトース、スクロースでそれぞれ7.95、6.50、6.33であり3糖のなかでトレハロースが一番大きかった<sup>5)</sup>。不凍水は、糖と相互作用するためにバルク水が作る水素結合網に参加できない水分子のことを示す。

さらに、糖水溶液中の水分子の<sup>17</sup>O核スピン-格子NMR緩和時間を測定し、糖水和殻の水の動的水和数を評価した<sup>5)</sup>。動的水和数は糖分子のまわりで運動を制限されている水分子の数を示す。動的水和数はトレハロース、マルトース、スクロースでそれぞれ48.3、27.2、36.8となり、トレハロ

ースが最も大きな値を示している。すなわち、3種の二糖の中でトレハロースは水和殻の水分子の動的状态を安定化する能力が最も高い。熱分析と磁気緩和の実験から、トレハロースは静的にも動的にも水を強く束縛し、構造形成させる能力の高い糖であると言える。

トレハロースの特異的な水和特性を分子レベルで理解するために、マルトースとトレハロースの水溶液について分子動力学シミュレーションを行った<sup>6)</sup>。モデル水溶液を平衡化後40psにわたり分子動力学シミュレーションを行い、この間10fs間隔でトラジェクトリを追跡し、糖分子の構造揺らぎと糖極性基周囲の水の動径分布関数を調べた。結果の一例として、グルコース単位の各O原子と近接水分子の酸素原子の間の動径分布関数において2.8オングストローム付近に現れる第一水和ピークの強度を表1に示した。O<sup>6</sup>の第一水和ピークの強度はマルトースよりもトレハロースの方が明らかに大きい。糖分子の全酸素原子の動径分布関数の第一ピーク強度の平均を計算した結果、トレハロースでは4.22であり、これはマルトースの4.17よりも大きい。図2はシミュレーション開始

表1 グルコース単位の各酸素原子の周りの水の動径分布関数における第一水和ピークの強度

| Atom                         | Trehalose <sup>a)</sup> | Maltose A   |          |
|------------------------------|-------------------------|-------------|----------|
|                              |                         | Nonreducing | Reducing |
| O <sup>1</sup>               | —                       | —           | 4.54     |
| O <sup>2</sup>               | 4.26                    | 3.99        | 4.17     |
| O <sup>3</sup>               | 4.77                    | 4.77        | 4.40     |
| O <sup>4</sup>               | 3.59                    | 4.39        | —        |
| O <sup>6</sup>               | 4.24                    | 3.93        | 3.18     |
| Average                      | 4.22                    | 4.17        |          |
| Observed $n_f$ <sup>b)</sup> | 3.98                    | 3.25        |          |
| $n_h$ <sup>c)</sup>          | 15.3                    | 14.5        |          |

a) Average values for the two glucose rings. b) Number of unfrozen water per residue. c) Number of hydration water.

20ps 経過後について、糖グリコシド結合酸素原子から5 オングストローム以内の距離に存在する水分子をスケッチしたスナップショットである。トレハロースではグリコシド結合領域にはマルトースに比べてより多くの水分子が存在することが分かる。

分子動力学シミュレーションから糖 OH 基酸素原子の第一水和殻に存在する水分子の自己拡散係数  $D$  を計算した。温度 298 K での  $D$  値 ( $10^{-9} \times \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) の平均はトレハロースで 1.85、マルトースで 1.90 であり、いずれも純水の  $D$  値よりも小さい。

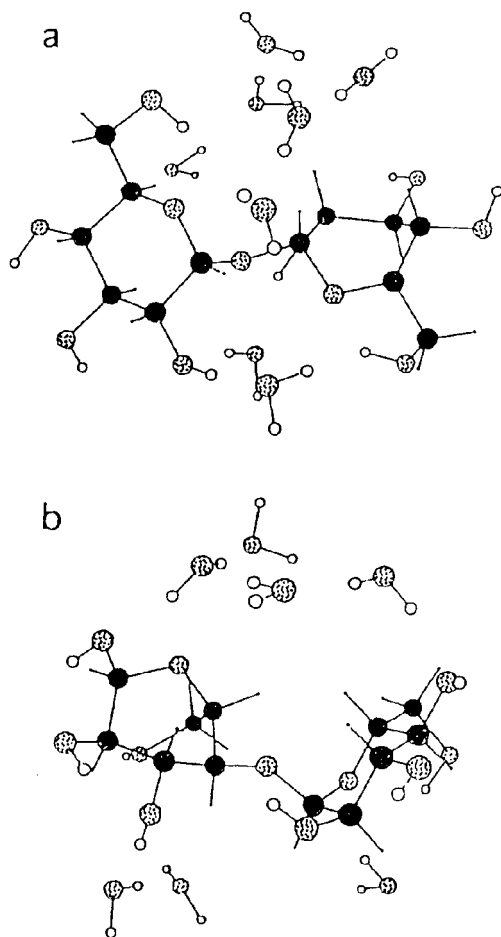


図2 MD シミュレーション開始 20ps 経過後における、糖グリコシド結合酸素原子から5 オングストローム以内の距離に存在する水分子をスケッチしたスナップショット。a. トレハロース、b. マルトース

この結果は第一水和殻に存在する水分子の運動が純水中に比べて束縛されていることを示す。水和水分子の束縛は存在位置に大きく依存するが、平均するとマルトースよりもトレハロースの方が強いことも分かった。

分子動力学シミュレーションから、マルトースよりもトレハロースの方が周囲の水構造に及ぼす摂動が少し大きく、また水和能力が高いことが分かった。マルトースに比べてトレハロースでは分子内水素結合を作る確率が低く、トレハロースの水酸基は水との間の分子間水素結合を作ることにより安定化しようとする傾向が強く、そのため周囲の水構造により大きな影響を与える。

### 3.2 オリゴ糖と生体膜の相互作用

前節で示した様に、幾つかの関連オリゴ糖の中でトレハロースの水和特性は特異的である。そこで、この特異的水和を示すトレハロースが水和系での生体膜の構造安定性に及ぼす効果を調べた。種々の濃度のトレハロースを含む水溶液中の卵黄レシチン単一層ベシクルでの二分子膜の状態を、 $^{31}\text{P}$ -NMR での磷脂質  $^{31}\text{P}$ -コリンメチル  $^1\text{H}$  間核 Overhauser 効果 (NOE) を測定した<sup>7)</sup>。NOE は観測核の運動性と核間距離に依存する。NOE のトレハロース濃度依存性から、トレハロース濃度の増加に伴いベシクル内隣接磷脂質分子間の距離が接近すること、言い換えれば脂質膜のパッキング密度が大きくなることが示唆された。この結果は、トレハロースの添加により脂質膜のゲル-液晶転移温度が上昇するという実験結果<sup>8)</sup>と矛盾しない。ここで観測された脂質膜の構造安定性に対する効果が膜近傍に存在するトレハロースの特異的水和挙動により膜の水和が摂動を受けた結果であるとするならば、十分な量の水が存在する系でのトレハロース-生体膜間相互作用は水を介した間接的相互作用であると考えられる。

トレハロースの高い水構造形成能力が実際の細胞の中で発現されているかどうかを検証するために、トレハロース高産生性酵母について、細胞内

の水の  $^1\text{H}$ -NMR スピン-スピン緩和時間  $T_2$  を測定した<sup>9)</sup>。緩和時間の長さから、細胞内の水を運動性の極めて高い自由水 (成分C)、運動が高度に抑制された結合水 (成分A)、およびこれらの中間の状態にある水 (中間水: 成分B) の3種類に分けることが可能であった。培養条件を調整することによりトレハロースを全く含まぬ菌体と、乾燥菌体重量の8.1%のトレハロースを含む菌体が得られる。これらを凍結乾燥後、調湿し、乾燥菌体重量の1.91%~3.53%の水を含む細胞試料とした。NMR 緩和時間の解析から、成分A、B、Cの存在割合 (population) を決定した。トレハロース欠乏および含有酵母細胞について得られた結果をそれぞれ表2と3に示した。また、成分Bの存在割合の含水率依存性を調べた結果を図3に示した。検討した範囲の含水量では、自由水 (成分C) は全く存在しないこと、結合水 (成分A) の割合はトレハロースを含まぬ菌体では約50%であるがトレハロースを含む菌体では約80%にもなることがわかった。

菌体は種々の物質を含むので、ここで観測され

た水の存在状態がトレハロースのみの効果であるとは断言できない。そこで、DPPC モデル生体膜についても同様のNMR 緩和実験を行った結果、結合水の割合はトレハロース無しでは僅か20%であったがトレハロースの添加により80%まで増加することがわかった。

#### 4 総括

本研究ではオリゴ糖、特にトレハロースについて水和特性および生体膜との相互作用を調べた。トレハロースは、関連するオリゴ糖に比べて、静的ばかりでなく動的にも水と強く結合する能力の高い糖質であり、このトレハロースの特性は、水溶液中のみならず生体膜あるいは生体細胞系においても発現されていることが分かった。

蛋白質や生体膜などに強く結合した結合水は生体系の高次構造/複合構造を保つために必須な水である。トレハロースはこの必須の水分子を生体から逃さないということにより乾燥保護剤、あるいは保湿剤としての働きを示すのかもしれない。トレハロースを含有する生体中の結合水の存在部

表2 トレハロース欠乏酵母細胞のプロトンNMR 横緩和時間  $T_2$  と細胞水構造の含水率依存性

| Water content <sup>a)</sup> | Component <sup>b)</sup> | Population <sup>c)</sup> | $T_2$ <sup>d)</sup> |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| %                           |                         |                          | ms                  |
| 3.89                        | A                       | 0.49                     | 5.5                 |
|                             | B                       | 0.51                     | 54.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |
| 6.16                        | A                       | 0.46                     | 5.0                 |
|                             | B                       | 0.54                     | 56.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |
| 6.25                        | A                       | 0.51                     | 5.5                 |
|                             | B                       | 0.49                     | 55.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |

a) Weight fraction of the residual water to the dry cells.

b) Components A and B correspond to the bound and intermediate waters, respectively. c) Maximal errors, accompanied by the curve fitting analysis, are  $\pm 0.01$ .

d) Relative experimental errors are  $\pm 10\%$ .

表3 トレハロース含有酵母細胞のプロトンNMR横緩和時間 $T_2$ と細胞水構造の含水率依存性

| Water content <sup>a)</sup> | Component <sup>b)</sup> | Population <sup>c)</sup> | $T_2$ <sup>d)</sup> |
|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|
| %                           |                         |                          | ms                  |
| 1.91                        | A                       | 0.77                     | 3.3                 |
|                             | B                       | 0.24                     | 38.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |
| 2.15                        | A                       | 0.76                     | 3.3                 |
|                             | B                       | 0.24                     | 33.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |
| 2.67                        | A                       | 0.77                     | 3.3                 |
|                             | B                       | 0.23                     | 33.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |
| 3.53                        | A                       | 0.77                     | 3.5                 |
|                             | B                       | 0.23                     | 37.                 |
|                             | C                       | 0.0                      |                     |

a) Weight fraction of the residual water to the dry cells.

b) Components A and B correspond to the bound and intermediate waters, respectively. c) Maximal errors, accompanied by the curve fitting analysis, are  $\pm 0.02$ .

d) Relative experiental errors are  $\pm 10\%$ .

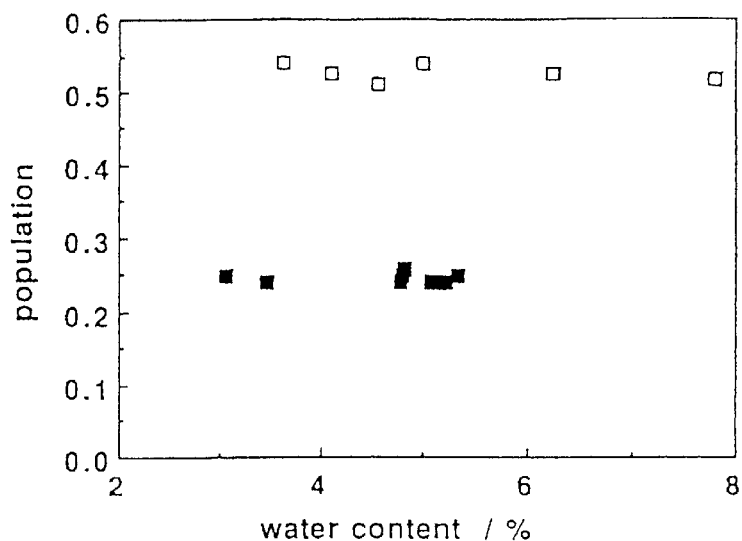


図3 酵母細胞中の中間水(表2、3の成分B)の組成の含水率依存性



位、あるいはこの結合水が乾燥あるいは凍結条件下の生体の生理に及ぼす効果などの解明は今後の研究課題である。

#### 引用文献

- 1) 櫻井実、井上義夫：細胞のストレス耐性と糖の役割、表面、34(4),213-219(1996)
- 2) 櫻井実、井上義夫：糖の水和とトレハロースの生理機能、生物物理、37(1), 326-330(1997)
- 3) Tanaka K.,Takeda T.,Fujii K.,Miyajima K.: Cryoprotective Mechanism of Saccharides on Freeze-drying of Liposome:Chem. Pharm. Bull.,40, 1-5(1992)
- 4) Green J. L. and Angell C. A.: Phase Relations and Vitrification in Saccharides-Water Solutions and the Trehalose Anomaly: J. Phys. Chem., 93, 2880-2882(1989)
- 5) Kawai H., Sakurai M., Inoue, Y., Chujo R.,and Kobayashi S.: Hydration of Oligosaccharides. Anomalous Hydration Ability of Trehalose: Cryobiology, 29, 599-606(1992)
- 6) Sakurai M., Murata M., Inoue Y., Hino A., and Kobayashi S.: Molecular Dynamics Study of Aqueous Solution of Trehalose and Maltose. Implication for the Biological Function of Trehalose: Bull. Chem. Soc. Jpn., 70, 847-858(1997)
- 7) Nishiwaki T., Sakurai M., Inoue Y.,and Chujo R.:Increasing Packing Density of Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Unilamellar Vesicles Induced by Trehalose: Chem. Lett., 1841-1844(1990)
- 8) Crowe L. M. and Crowe J. H.: Solution Effects on the Thermotropic Phase Transition of Unilamellar Liposomes: Biochim. Biophys. Acta, 1064,267-274(1991)
- 9) Sakurai M., Kawai H., Inoue Y., Hino A.,and Kobayashi S.: Effects of Trehalose on the Water Structure in Yeast Cells as Studied by in vivo  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy: Bull. Chem. Soc. Jpn., 68, 3621-3627(1995)