

## ヒアルロン酸及びヒアルロニダーゼの生化学的研究

## 第 VI 報

## —ヒアルロニダーゼ作用によるヒアルロン酸性状の変化—

東京女子医科大学生化学教室 (主任 松村義寛教授)

松 村 剛  
マツ ムラ ゴウ

(受 付 昭 和 34 年 1 月 16 日)

## い と く ち

ヒアルロン酸にヒアルロニダーゼが作用して生ずる反応生成物の、主として有機化学的性状については、既に強力な研究が進められており、われわれに数多くの知見を与えてくれた<sup>1)</sup>。

この種の結果はまた、ヒアルロニダーゼの作用様式に対しても重要な知識を齎している。しかし乍らヒアルロニダーゼが、哺乳動物における正常なヒアルロン酸代謝に与るといふ事は、この酵素の分布や、生体について観察されたヒアルロン酸の代謝速度等より考えて、可能性が少い<sup>2)</sup>。寧ろヒアルロニダーゼは感染・炎症<sup>4) 5)</sup>・受精等の際における、いわば拡散因子<sup>3)</sup>として生理的乃至病理学的に重要なものではあるまいか。

この様な立場から考えるならば、ヒアルロン酸がヒアルロニダーゼの作用を受けて、その高分子的性状がどの様に変化するかを追及する事は極めて興味深い。これは又生体内に存在する粘多糖類の性状を知る上にも重要な知見を与えるものであろう。哺乳動物の関節液中に存在する粘性物質はヒアルロン酸(あるいはその蛋白質複合体)であるといわれるが、種々の疾患に際して関節液の粘度は著るしく変化する<sup>5) 6)</sup>。この様な粘性の変化がヒアルロニダーゼの作用に依るものであるという積極的な証拠は未だ存在しないけれども、ヒアルロン酸の分子量に関して変化のあることは広く認められている所である。ヒアルロン酸の分解(解重合)に伴う種々の高分子性状の変化はこの

様な生体内粘性物質の性状<sup>8)</sup>を理解する上に有用な指示を得られよう。

本報告においては、ヒアルロン酸と酸性血清による濁濁及びヒアルロン酸溶液の粘性について検討を行った。両者共にヒアルロン酸の高分子性に基くものであり、ヒアルロニダーゼ作用の結果減弱する。何れもヒアルロニダーゼ作用の定量に応用せられ、特に濁濁度の測定は広く一般の測定法とされている<sup>9) 10)</sup>。しかしこれ等の方法は基質の性質其の他によつて影響を受ける所が大きく、異つた条件下での測定を比較する際に甚だしい困難を感ずる。この意味においても種々細い条件の検討が望まれる所であろう。

## 実 験 方 法

ヒアルロン酸：人臍帯より抽出精製せるもの。概ね K. Meyer 法に準拠した<sup>11)</sup>。0.9% 食塩水に溶解して使用する。

ヒアルロニダーゼ：豚精巢より抽出せるもの<sup>10)</sup>。氷冷下に磨細した組織を等量の 0.1 N 酢酸とよく混じ、氷室中にて一夜抽出する。遠心分離によつて得られた上清液に 4 倍量の冷アセトンを添加、氷冷して一時間放置。沈澱を速心して集め、冷アセトン、次いで冷エーテルにて洗滌後、直ちに減圧下に乾燥する。使用時乾燥粉末の所要量を緩衝液にて抽出し、遠心上清液を使用する。

反応条件：pH 6.0 酢酸緩衝液 (0.1M) 0.9% 食塩含有。37°C 水槽。

粘度測定：毛細管粘度計による<sup>5)</sup>。

濁濁度測定<sup>10)</sup>：健康馬血清を pH 4.1 酢酸緩衝液

Go MATSUMURA (Department of Biochemistry, Tokyo Women's Medical College) : Biochemical studies on hyaluronic acid and hyaluronidase. VI. Effects of hyaluronidase upon the characteristics of hyaluronic acid.

(0.5 M) にて30倍に稀釈し、これを 4 N HCl にて pH 3.7 に規整する。沸騰する迄加熱し、冷却後必要ならば濾過する。反応液に対し5倍量の上記酸性血清を加え、混和後20分の後比色計により透過度を求める。プルフリッヒの比色計により、フィルターは S47 (458 m $\mu$ ) を使用した。光路長 1 cm。

実験結果及び考察

I) 酸性血清による濁濁

ヒアルロニダーゼ作用を受ける以前においては、ヒアルロン酸量と濁濁度の間には略満足すべき定量的関係が認められる。

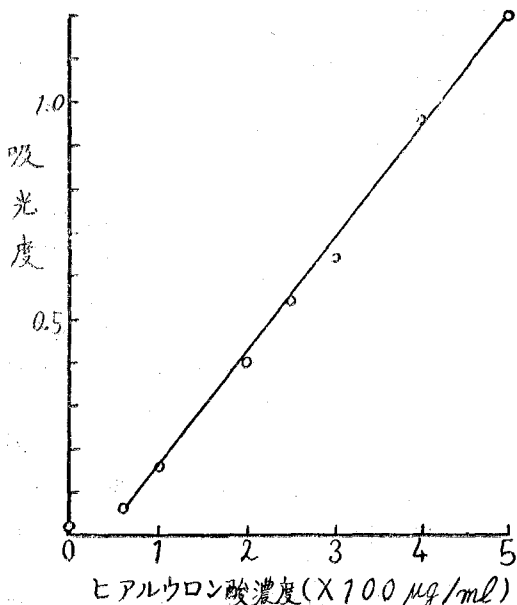


図1 酸性血清によるヒアルロン酸の濁濁度と濃度

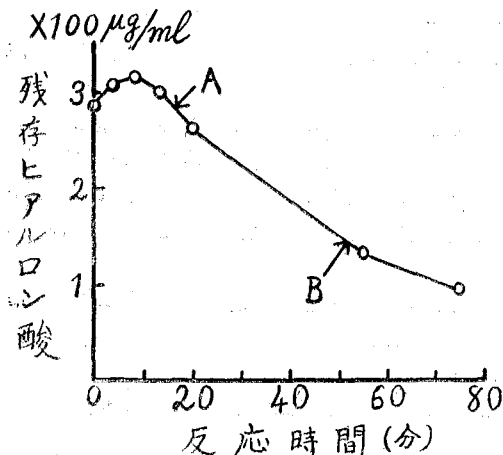


図2 ヒアルロニダーゼ作用による濁濁度の変化 (I)  
縦軸は濁濁度より求めた相当ヒアルロン酸量にて示す。

ヒアルロン酸・ヒアルロニダーゼ反応溶液を反応時間にしたがって、その一部分宛をとり出して酸性血清反応を求めると、やがては濁濁度の減少は著明となるが、反応の初期においては寧ろ濁濁度の増加が認められる。これはヒアルロニダーゼ作用の弱い時に殊に明瞭である。粘度法又は還元力測定法等<sup>12)</sup>によつても明かなごとく、ヒアルロニダーゼの反応は専ら分解的であり、反応初期にヒアルロン酸量の増加があるとは考えられない。先に還元力測定に基く結果<sup>12)</sup>より推論した様にヒアルロニダーゼは endoglycosidase であつて、グリコシド結合の開裂は末端より順次起るものではなく、任意の結合部位において、したがつて比較的内部の結合より分解を受ける。この結果生ずる分解産物は、反応初期においては、当初のヒアルロン酸よりは勿論低分子量ではあるがなおかなりの高分子化合物であろう事が期待される。この様な初期分解産物が酸性血清に対して濁濁を与えるに充分な程高分子であるならば、濁濁の原因となる因子が数において増加したために濁濁度は寧ろ増加する事があつてもよいのではなからうか。

反応時間を一定にし酵素量を種々に変じて行つた測定結果についても同様の事象が観察された。

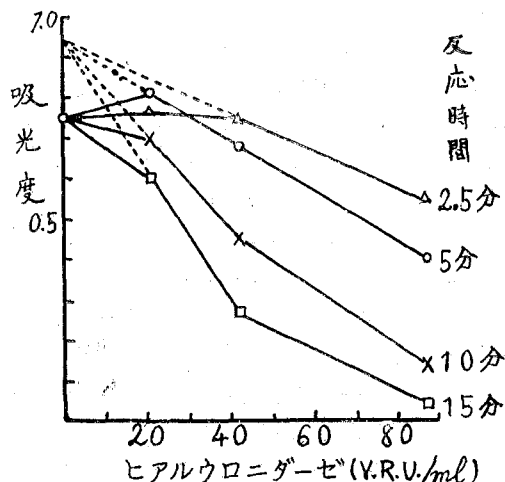


図3 ヒアルロニダーゼ作用による濁濁度の変化 (II)  
V. R. U. : 粘度法により測定した酵素力価<sup>5)</sup>

反応時間が短い間は、酵素の極めて少ない反応系では寧ろ濁濁度が分解前より増加しており、酵素量と濁濁度の間には単純な関係は見出し難い。しかし反応進行度の極めて僅かであると思われる部分

を除けば、酵素量と濁度の間には直線的関係が存在することであるので、この様な直線を酵素量0に迄外挿した。図3に見られる様に種々の反応時間毎に得られた直線の酵素量0の軸に交わる点は殆んど一致している。これは反応に用いたヒアルロン酸の呈し得る最大濁度を示すものであつて、いわばヒアルロン酸の濁度当量とも呼び得るものであろう。ヒアルロン酸と酸性血清との間に見られる濁度反応はある重合度以上のヒアルロン酸の分子数によつて支配されるものであり、ヒアルロン酸の重量にはよらないのであろうと考えられる。極めて高重合のヒアルロン酸では分解の結果生ずる産物が夫々なお酸性血清と反応し得るに充分な程高分子であることも予期され、この場合ヒアルロニダーゼの作用は濁度の上昇を来す場合もあり得よう。

酸性血清による濁度の測定はヒアルロン酸の定量にも応用し得るものであるが、この様にヒアルロン酸重合度によつて大きく影響されるので均一な試料についてのみ可能である<sup>13)</sup> 不均一性の予想される場合には何等かの手段によつて重合度を揃えるか、または実験のごとく最大濁度を酵素的に求めねばならない。

濁度によつて酵素活性を求める場合、基質分解量は過大であつてはならないのは勿論であるが過少であつてもならない。少くとも図2におけるA点よりも分解は進行している必要がある。基質の分解量より直接酵素量を計算することは、基質性状の変化によつて値の変動する恐れがあるので力価既知の酵素による反応量と比較して求めるのが望ましい<sup>9)</sup>。比較する場合にも種々濃度の酵素を用いて標準曲線を作製して力価を求めるべきであらう。

種々濃度の基質を含む反応系につき反応速度を求めた。反応速度は当初存在する基質量に対する一定割合を分解するに要する時間によつて表した。すなわち図2におけるA(最初と同一の濁度を再び示す点)及びB(最初の半分の濁度を示す点)に達するに要する時間を測定した。

図のごとく反応の初期(A点)においては基質濃度の変化は反応速度に対して直線的に影響を与えている。反応は略零次反応にしたがうがごとくに観察され、基質濃度が変化しても単位時間に分解される基質量は変化せず、したがつて一定割合

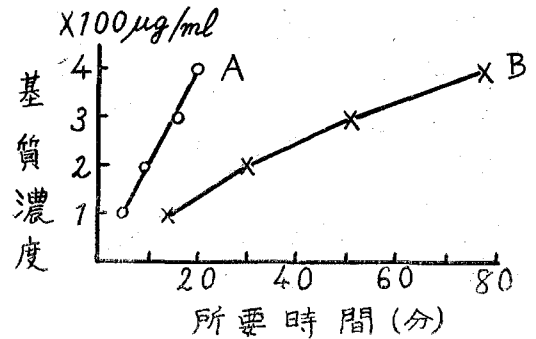


図4 基質濃度と反応速度(濁濁法)  
A及Bについては図2参照

を分解するに要する時間は基質濃度に比例する。より反応の進行せる時期(B点)についてみれば、前記の結果と類似しているが、やや直線関係より外れ、基質濃度の増加は比例により予期される以上に反応に要する時間を延長させている。

先に還元力の増加測定に基く実験結果より、実験範囲内においてヒアルロニダーゼ作用は基質濃度に比例する事を見出した<sup>12)</sup>。すなわち単位時間に開裂されるグリコシド結合の数は基質濃度に比例し、一次反応にしたがつて反応を行うごとくである。ここに示す結果とは全く相反しているのであるが、これは還元力増加の測定には分解産物の分子量は殆んど関係していないと思われるのに対し、濁濁度測定ではある分子量以上の残存ヒアルロン酸分子数を求めているためであらう。酸性血清によつてはすでに濁濁を与えない程低分子のヒアルロン酸分解物でも、なおヒアルロニダーゼによつて開裂され得るグリコシド結合を有することは、後に述べるごとく考えられる所である。ヒアルロニダーゼ作用によるグリコシド結合の開裂が全て濁濁度減少に結びつくとは限らない。酵素作用の一部分は濁濁度減少には与らないグリコシド結合の開裂に使用されるため、恰も分解生成物が拮抗的な阻害を示すことになる。事実、恰度濁濁を呈さなくなる迄分解を受けたヒアルロン酸を反応系に添加した場合は、濁濁度測定によるヒアルロニダーゼ作用を阻害することが観察された。図5には基質の30%に相当する酵素分解産物を添加した際の阻害効果を示す。

この様に低分子の分解物が高分子の基質と拮抗するために、全ての反応を求めた還元力増加測定と、高分子減少を求めた濁濁法の間不一致が存在するのであろう。分解率を大きくしたB点につ

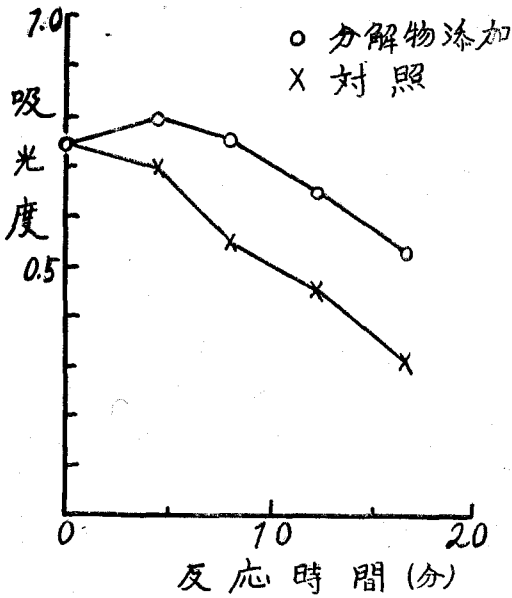


図5 ヒアルロニダーゼ作用に対する生成物の影響 (濁濁法)

いての値がより大きなずれを示すのは酵素の不活性化もあるかもしれないが、一部には分解産物がより大量になつてきていることにもよると思われる。

酵素活性を測定するに際しては基質濃度は出来る限り一定に行うべきであり、分解量は最初の基質量に対する割合よりも絶対量(基質量又は吸光度の減少)にて示す方がよい。

II) 粘度

ヒアルロン酸濃度と粘度の関係には幾つか考察

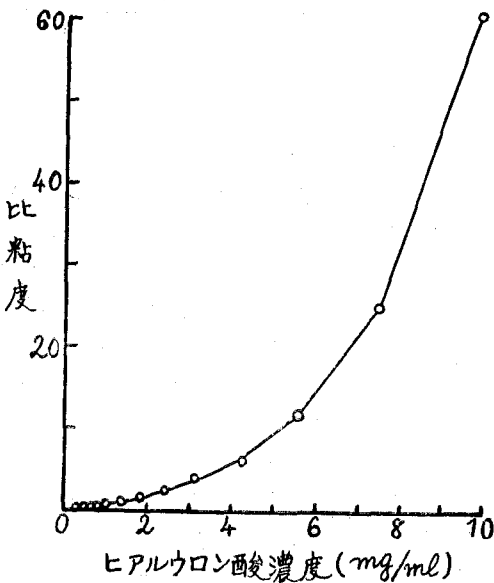


図6-1 粘度とヒアルロン酸濃度 (I)

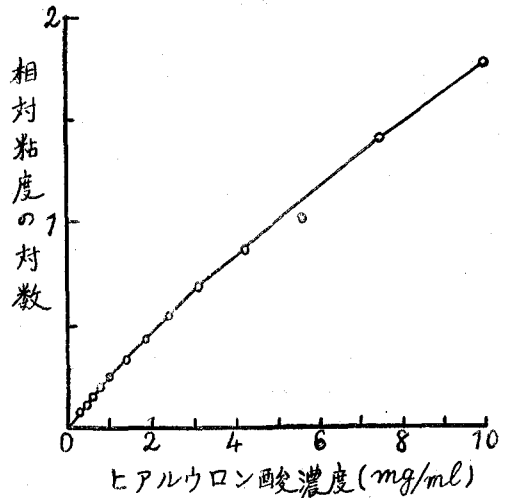


図6-2 粘度とヒアルロン酸濃度 (II)

がなされている。濃度と比粘度の間に、殊に高濃度の部分では比例関係は認められず、濃度と相対粘度の対数の間にも完全な直線関係は存在しないごとくである<sup>6)</sup>。ヒアルロン酸は極めて高分子(分子量は数十万程度と考えられる)の直鎖化合物であるといわれ、更にイオン性基をも有しているので溶液状態では分子間の相互作用は極めて大きいと思われる。高濃度のヒアルロン酸溶液を凍結状態にて乾燥した際の所見からは、高濃度ヒアルロン酸溶液はゾルよりもゲルと見做すべきとも考えられる。この様な分子間の作用は当然濃度によつて大きく影響を受けるであろうから、濃度と粘度の間には、殊に高濃度領域においては簡単な直線的関係を見出し難いのであろう。ヒアルロン酸の粘性に分子間の作用が大きく働いている可能性は種々圧力の下に粘度を測定する事によつても示された。

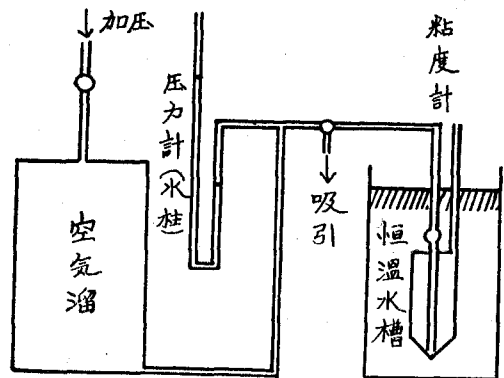


図7 種々圧力下における粘度測定装置  
粘度計については文献(5)参照

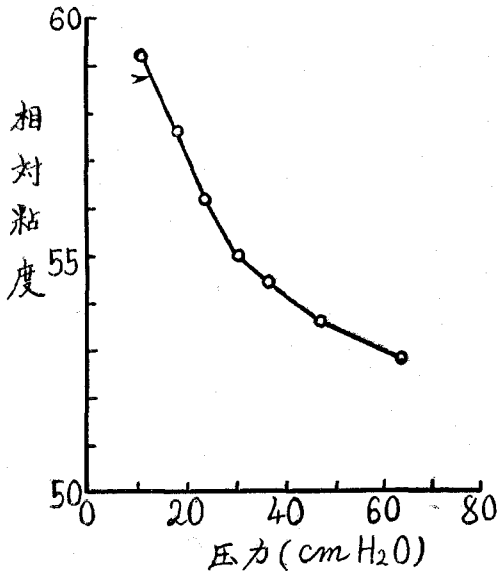


図8 加圧測定による粘度の変化

図7のごとき装置によつて毛細管粘度計の上液面に大気圧以上の圧を加え、液の流下のための力を液柱自体の重さ以上に種々に調節する。0.9%食塩水について測定を行うと、測定範囲内では液の流下時間と圧との積は一定であつた。ヒアルロン酸溶液についての結果を相対粘度によつて示すと図8のごとくなり、いわゆる非ニュートン粘性の存在することが確かめられた。

ヒアルロン酸溶液にヒアルロニダーゼが作用する時は極めて速かに粘度が低下する事は周知の事象であるその状況を図9に示す。

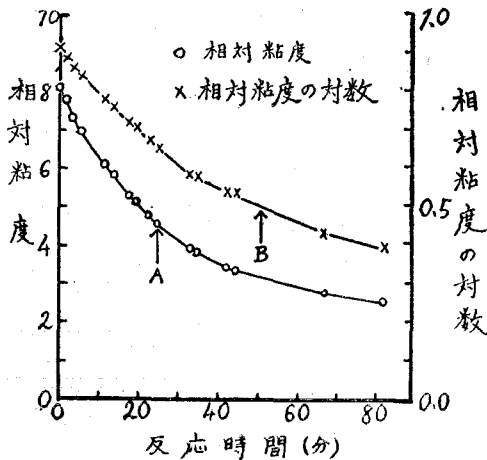


図9 ヒアルロニダーゼ作用による粘度の変化

A: 比粘度の半減した点  
B: 粘度が半分の基質量に相当した点

相対粘度の低下は初期に殊に激しい。後に述べる様に他測定法と比較した場合、粘度低下の現象は極めて初期にのみ認められるものであり、粘度では殆んど変化の認められなくなつた後でも濁濁法・還元力増加法では反応の進行しつつある事が確かであるので、粘度を支配するものは極めて高分子のヒアルロン酸のみに限られると考えられる。粘度より全く未変化のヒアルロン酸量を推察しても大過はないであろう。相対粘度の対数は近似的にはヒアルロン酸濃度に比例すると見做し得るので、粘度の変化を相対粘度の対数によつて図示した。反応の初期においては分解は略直線的に進行している事が窺われるが、後期には分解速度のやはり低下する事が認められる。

基質濃度の変化による反応速度の変化を求めた。粘度法により酵素活性を求める際は通常初相粘度の半ばに達するまでに要する時間の逆数をもつてするので、これに相当する時間を各基質濃度

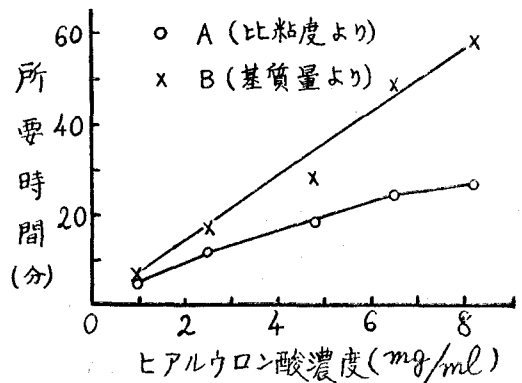


図10 基質濃度と反応速度(粘度法)

A及Bについては図9参照

につき測定した。基質濃度の異なる程、比粘度を半減させるに要する時間は長くなるが、基質濃度には比例せず高濃度のもの程比較的早く粘度の低下する事が示された。しかし先に述べた様に比粘度と濃度とは比例しないので高濃度のもの程、分解される割合が少なくて比粘度の半減が観察される筈である。この点を考慮して図6によつて基質濃度を半減した時の粘度に迄低下する時間で図を画いた。この場合は先の濁濁法のA点についてと同様に基質濃度と半減に要する時間とは比例し、零次反応に相当する関係が得られる。これは先の相対粘度の対数によつて画いた反応曲線からも期待される所である。

粘度法によつても先の濁濁法と同じく寧ろ零次反応に近い結果が得られ、還元力増加の場合と異なる。この場合も亦粘度には影響のない様な部分分解物が阻害を行う事が確められた。更に高濃度基質より反応を始めた際の或粘度以下における低濃

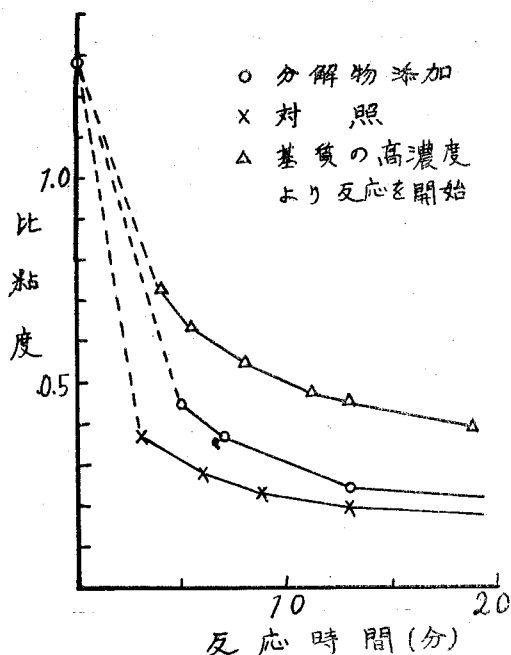


図 11 ヒアルロニダーゼ作用に対する生成物の影響 (粘度法)

度基質についての分解様式を同じ比粘度範囲で比較すると既に分解産物の存在している高濃度基質についての反応は著るしく遅い。粘度で測定される反応速度が後期に低下するのは酵素の失活よりも分解物による阻害のためであろうことを示している。

粘度法にて酵素作用を測定するには前述のごとく比粘度を半減するに要する時間を測定するのであるが、この場合基質濃度にしたがつて初期粘度は出来る限り一定であることが望ましい。われわれは従来比粘度 1.0 を基準としてなるべくこれに近い粘度を与えるよう基質濃度を調整してきたが、これはこの程度の低い粘度では比粘度と濃度の直線的関係からのずれも小さいので基質粘度の違いによる測定結果の差も充分小さいであろう。しかし基質濃度を大きく変更する際は充分の注意が必要である。

### III) 粘度・濁濁・還元力の変化の比較

先に報告した還元力増加<sup>12)</sup>について成績をか

りて、上記三性状のヒアルロニダーゼ作用に伴う変化を次表に示す。粘度の低下は最も早く、粘度

表 1 種々測定法よりみたヒアルロン酸の分解速度

基質濃度 (mg/ml)	1	0.5	0.3
測定法	反応に必要な時間 *		
粘度	4	2	
濁濁度		105	50
還元力	165	165	

\* 粘度及び濁濁度については最初の半分の基質濃度に達する迄の時間、還元力については最大値の半分に達する迄の時間の相対値を示す。酵素力価は全て同一。

法による測定が甚だ鋭敏である事を表している。粘度の変化は相対粘度の対数で示すなら初期には直線的すなわち零次反応にしたがつて低下するがやがて反応速度は低下する。濁濁法は原理的には粘度法と同様高分子性基質の減少を測るのであるが、濁濁を与える物質は粘度を支配する物質に比して著るしく低分子なのであるうために、反応途中に寧ろ濁濁の増加する様な異常を呈する事があり、又反応終了にはより長く作用する事が必要である。反応の初期においては粘度によつて見られたと同様に略零次反応にしたがつたが、後期では反応次数は更に低下する。濁濁度によるヒアルロニダーゼ定量は種々の難点は存在するけれども、基質の少量ですむ事、多数を扱うに便な事のために勝れている<sup>10)</sup>。

還元力の増加は最も長く進行を続けている。これは前記二法では測定され得ない様な低分子分解物でもなおヒアルロニダーゼ作用を受けて開裂し得るためであろう。この様にならかなり低分子の化合物でもヒアルロニダーゼの基質であり得るために、前二法で見られた零次反応も、還元力測定による際は一次反応として観察される。粘度又は濁濁度には影響を与えない程度に分解された分解産物がそれぞれの測定法に対しては阻害的に働くこともこの理由によるものであろう。還元力測定による酵素活性の測定は、この法の非特異性のために粗酵素には適用し難い。又大量の基質を要求する事も欠点となる。起源を異にするヒアルロニダーゼの作用機作の異なる事が明かにされている事からも、還元力増加によつて示される結果について

は注意を払って解釈すべき点があるようである。

### 総 括

ヒアルロン酸溶液の示す高分子的性状を、酸性血清による濁濁及び粘度について検討した。ヒアルロン酸濃度による粘度変化の不整性につき調べ、更にこれ等二性質がヒアルロニダーゼ作用によつて如何に変化して行くかを調べた。

基質濃度の変化が酵素作用に及ぼす影響を調べ、還元力増加法との比較考察によつて変化の状況を論じた。

以上の観察に基づいて各ヒアルロニダーゼ定量法についての批判を試みた。

稿を終えるに当り指導下さつた本学生化学松村義寛教授に厚く感謝する。本報の一部は東大理学部生化学教室にて行つたものであり、左右田徳郎教授の御指導及び先輩諸氏の御忠告に深謝する。

本報告の要旨は夫々一部づつ日本化学会第5年会(昭和27年4月)及び第30回日本生化学会総会(昭和32年7月)に報告した。

### 文 献

- 1) Meyer, K., Linker, A., Hoffman, P. & Korn, E.D. : Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry, p 132 (1957) Kyoto
- 2) Schiller, S. & Dorfman, A. : J. Biol. Chem., **227**, 625 (1957)
- 3) Meyer, K. & Rapport, M.M. : Adv. in Enzymol., **XIII** 199 (1952)
- 4) Nojima, T. Ishimoto, M. Sasaki, M. & Matsumura, G. : J. Biochem., **39**, 77 (1952)
- 5) 松村 剛 : 東京女医大誌, **28**, 304 (昭33)
- 6) Ragan, C. & Meyer, K. : J. Clin. Invest., **28**, 56 (1949)
- 7) 五百木雅孝 : 日本整形外科学会誌, **28**, 664 (昭30)
- 8) 森崎直木・他 : 第30回日本整形外科学会総会(昭32)及び第31回同総会(昭33)口演
- 9) Dorfman, A. : Methods in Enzymology (Eds. S.P. Colowick & N.O. Kaplan) Vol. **1**, p 166 (1955) Academic Press, New York.
- 10) 佐々木真 : 酵素研究法(赤堀編)2巻, 146 (昭31) 朝倉書店, 東京
- 11) Meyer, K. : J. Biol. Chem., **176**, 993 (1948)
- 12) 野島徳吉・石井 真・佐々木真・松村 剛 : 生化学, **25**, 79 (1952)
- 13) Levine, M.G. & Kling, D.H. : J. Clin. Invest., **35**, 1419 (1956)