

各種 AFM を用いたヒアルロニダーゼのヒアルロン酸配向化膜への結合挙動の 1 分子測定

(東工大生命理工) ○今井 康太・廣瀬 敦・森 俊明

Surface immobilization method of long-chain hyaluronan and single molecule observation of hyaluronidase activity on immobilized sugar chains (Dept. Biomol. Engineering, Tokyo Inst. of Tech) ○IMAI, Kouta; HIROSE, Atushi; MORI, Toshiaki

In order to elucidate the functional expression of protein molecules on the cell membrane, it is important to directly observe the reaction process of each molecule. We reported that the process of sugar chain synthesis by the action of bacterial sugar chain synthase pmHAS on a single hyaluronan on a bilayer membrane immobilized on a mica substrate can be observed by high-speed AFM¹⁾. In this study, we investigated the hyaluronan decomposition reaction in order to apply it to the observation of the single molecule reaction of enzymes that act on sugar chains in a wider range. After immobilizing a hyaluronan polymer with one molecule on a mica substrate, hyaluronidase was added and the decomposition rate was measured. However, the image measured next did not show hyaluronic acid, which should have been immobilized.

Keywords : Hyaluronan, hyaluronidase, Atomic Force Microscope, Unimolecular biology, Divalent metal ion

タンパク質分子の細胞膜上での機能発現等を解明する上で、個々の分子の反応過程を直接観察することは重要である。当研究室では細菌由来の糖鎖合成酵素 pmHAS がマイカ基板上に固定化した二分子膜上の一本のヒアルロン酸に作用して糖鎖合成する過程を高速 AFM により観察できることを報告した¹⁾。本研究ではより広範囲に糖鎖に作用する酵素の 1 分子反応の観察に適用するため、ヒアルロン酸分解反応について検討した。マイカ基板上にヒアルロン酸ポリマーを 1 分子で固定化した後 (図 1)、ヒアルロニダーゼ添加を行い分解速度の測定を行った。しかしながら、次に測定した画像では固定化されたはずのヒアルロン酸が認められなくなっていた。この消失はヒアルロニダーゼによる加水分解の結果ではなく、固定化の強度が弱いため酵素滴下時による液内部の乱流によって糖鎖が基盤から解離してしまったと考えられる。現在固定化条件を変えて分解反応のイメージングを行っている。

1) T. Mori et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 20254-20257

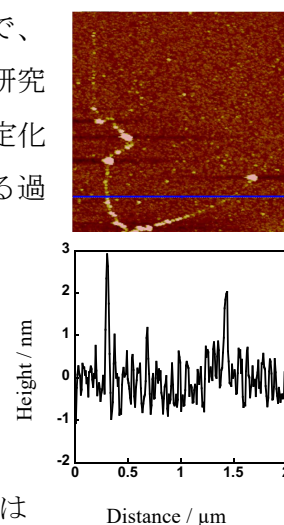


図 3 固定化ヒアルロン酸の AFM 画像