

9349 蛋白質の自己集合組織化と生理機能発現に果たす塩類の役割に関する研究

助成研究者:甲斐原 梢(九州大学 理学部)

動脈壁、肺胞、項靭帯等、我々の体内で持続的に強い力を受けている組織では、弾性線維の主要構成成分であるエラスチンにより驚異的な弾性機能が発現している。加齢、老化、あるいは病的原因によるエラスチンの質的、量的変化は、動脈硬化から致命的な循環器をもたらす。エラスチン生合成過程のキーステップは、前駆蛋白質トロポエラスチンが細胞外空間で自己集合組織化により特定の配列を有する集合体を作り上げる過程であると考えられている。弾性や細胞遊走性等の細胞外マトリックスとしてのエラスチンの多様な機能は、自己集合組織化過程で形成される蛋白質集合体の構造と物性に基づいている。本研究は、この生体内分子集合過程が温度依存性コアセルベーションとして基本的に再現可能である事に基づき、エラスチンコアセルベートの構造、物性の研究から、エラスチンの機能発現の分子機序の解明を目的としており、特に各種金属塩化物の関与について検討した。

エラスチンは極度に溶解性に乏しいので、エラスチンの熱変性処理によるトロポエラスチン分子量に相当する可溶化断片である α -エラスチンと、エラスチンを構成する部品としての特徴的な繰り返しペプチド配列の中で、弾性機能を分担している可能性が高い-Val-Pro-Gly-Val-Gly-配列に基づくブロック共重合体をエラスチンモデルポリペプチドとして用いた。これらの水溶性エラスチン関連ポリペプチドは、室温以下では均一な水溶液であるが、温度上昇と共に、液滴形成を経てコアセルベート下層と平衡液上層に分離する。

先ず、エラスチンペプチド水溶液の温度を上昇させながら、準弾性光散乱測定と微量用コーン・プレート型回転粘度計による測定を行い、相分離過程の基礎的挙動を追跡した。光散乱測定により2相共存線、スピノーダル線が決定され、ウシ項靭帯由来 α -エラスチンでは濃度0.11mg/ml、温度21.5°C付近に臨界点が存在する事が示された。粘度測定では臨界濃度付近で、温度上昇と共に分子の拮りが増大する傾向が示され、光散乱測定による散乱粒子の大きさの変化に対応する結果であった。各種金属塩化物水溶液中での測定から、一般にアルカリ及びアルカリ土類金属イオンは相分離、即ち、コアセルベート形成を促進し、遷移金属イオンは抑制する効果を示した。Caイオンの効果は他のアルカリ土類金属に対して選択特異的であり、エラスチンコアセルベート中での動きは遅く、コアセルベート内に蓄積が進む傾向が示唆され、エラスチンへのCa沈着を素因とする動脈硬化との対応を示す結果であった。Cuイオンの特異な効果も見い出され、生体内で架橋を触媒する酵素の補因子としての役割と共に、前駆蛋白質集合体の構造形成の制御にも関与している可能性もあると考えている。

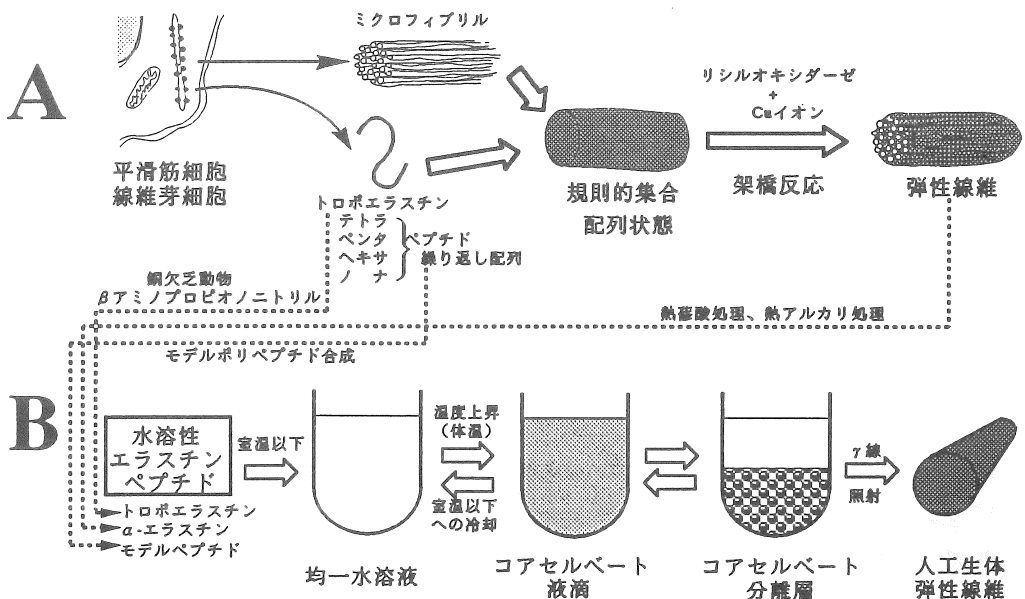
9349 蛋白質の自己集合組織化と生理機能発現に果たす塩類の役割に関する研究

助成研究者: 甲斐原 梢 (九州大学 理学部)

1. 研究目的

動脈壁、肺胞、項靱帯等、我々の体内で持続的に強い力を受けている組織では、弾性線維の主要構成成分であるエラスチンにより驚異的な弾性機能が発現している。エラスチンはコラーゲンに次いで生体内に多量に存在する蛋白質であり、両者共に細胞外マトリックスとして重要な機能を果たしているにも拘わらず、エラスチン研究の現状は、最も重要な弾性発現の分子機序を始めとして、多様な機能の詳細が解明されていない状態に止まっている。その原因の第一は、エラスチンが生体弾性組織試料の熱アルカリ処理残渣として単離される事からも分かる様に、あらゆる溶媒に対して極度に溶解性に乏しい事にある。

弾性線維蛋白質エラスチンは、血管平滑筋細胞や線維芽細胞内で合成された直鎖前駆蛋白質トロポエラスチンが、エクソサイトーシスにより細胞外空間へ分泌され集合体を形成し、Cuイオンを補因子とするリシロキシダーゼによる架橋形成を経て生合成され、マイクロフィブリルと共に弾性線維を構成する。弾性機能を始めとする細胞外マトリックスとしてのエラスチンの多様な機能の基礎となる構造は、前駆蛋白質の集合様式に依存しており、細胞間隙での自己組織化過程はエラスチン生合成に於けるキーステップとなっている。この生体内分子集合過程は、水溶性エラスチン関連ポリペプチドの温度依存性コア



セルベーションとして試験管内で再現可能である。前ページの図では、エラスチン生合成過程(A)と温度依存性コアセルベーション(B)の対応を模式的に表わしている¹⁾。

銅欠乏動物あるいはリシルオキシダーゼ阻害剤である β アミノプロピオニトリル投与動物より抽出したトロポエラスチン、エラスチンの熱蓚酸処理可溶化断片である α -エラスチン、更に、エラスチンを構成する特徴的な繰り返しアミノ酸配列に基づくモデルポリペプチド等の水溶性ポリペプチドで温度依存性コアセルベーションが観測される。模式図(B)に示した様に、低温で均一なエラスチンペプチド水溶液は温度上昇に伴い液-液2相分離が誘起され、液滴形成を経て平衡液上層とコアセルベート下層に分離する。エラスチンペプチドのコアセルベート形成は、コラーゲンのゲル形成とは異なる際立った特徴となっている。本研究では、エラスチンペプチドの液-液2相分離を伴う分子集合体形成過程の詳細を調べ、集合体の構造、物性と多様な機能との関連について検討する。特に各種金属塩化物が相分離過程に及ぼす影響を検討し、細胞外間隙の金属塩化物水溶液中で進行する自己集合組織化過程について考察する。

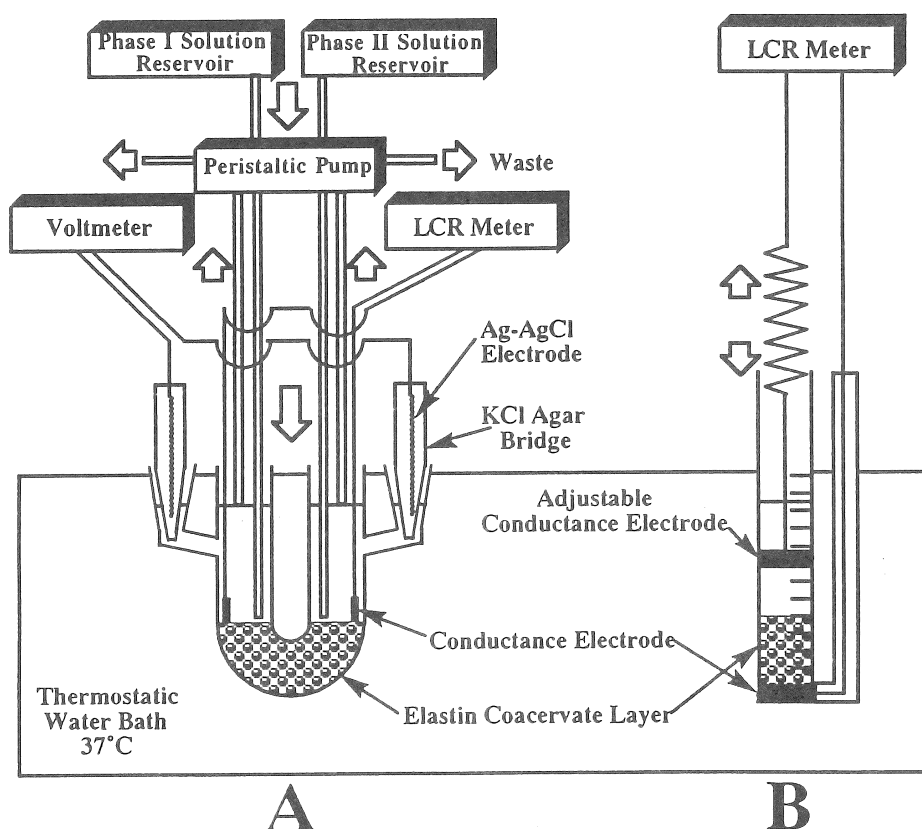


Fig. 1. Schematic representation of membrane cells. A: U-shaped membrane potential and conductance measurement cell. B: Membrane conductance measurement cell equipped with position adjustable electrode to fit variable coacervate membrane thickness.

2. 研究方法

2.1 水溶性エラスチン関連ポリペプチド

特殊な条件下で飼育した動物から抽出されるトロポエラスチンは、体系的な物性研究に必要な量を確保するのは困難であり、本研究ではウシ項靱帯、ブタ大動脈由来の α -エラスチンを用いた。ところでエラスチンは、細胞外マトリックスとしての弾性、細胞遊走性等の多様な機能を分担する部品としての繰り返しペプチド配列要素から構成されていると見なすことが出来る¹⁾。本研究では、エラスチンの機能の中で最も重要な弾性機能を分担している可能性が高く、同時に最も特徴的なコアセルベート特性を示す-Val-Pro-Gly-Val-Gly-配列に基づくポリペプチドについても各種の測定を行った。

2.2 液-液2相分離過程の詳細：臨界現象の観測

水溶液中でのエラスチンペプチドの分子集合過程は、温度上昇に伴う濁度変化を追跡する事により測定される。一方、従来より相分離現象、特に臨界挙動を追跡する有力な手段として準弾性光散乱測定法を適用し、エラスチンコアセルベート形成過程の詳細な検討を行ってきた²⁾。今回、更に粘度測定を行ない、相分離に伴うエラスチンペプチド分子の水溶液中での挙動と溶存状態について光散乱測定結果との対応について検討した。粘度測定は微量測定が可能なコーン・プレート型回転粘度計(DVM-EII型、Tokimec Inc.製)を用いた。

2.3 エラスチンコアセルベート中のイオン輸送の測定

各種金属塩化物共存下での相分離挙動、臨界挙動についても、上に記した種々の測定法により検討した。NaイオンやKイオンがエラスチンペプチドの自己集合過程に及ぼしている効果を特定する事は、生合成過程の詳細を明らかにする上で重要である。一方、動脈硬化、即ち、動脈壁エラスチンの量的、質的变化に基づく弾性機能低下には、エラスチンへのCa沈着が素因になっている事が知られている。この様に各種金属イオンのエラスチンコアセルベート形成への関与の解明は重要な研究課題となっている。一般にエラスチンコアセルベート形成が液滴形成を経て粘稠な分離層形成に至る事を利用し、蛋白質コアセルベート型液体膜としてのイオン選択透過特性を測定し、エラスチンコアセルベートと各種イオン間の相互作用を調べる事が出来る³⁾。用いた装置の概略をFig. 1に示す。

3. 研究結果と考察

3.1 ウシ項靱帯由来 α -エラスチン水溶液粘度の温度変化

Fig. 2に準弾性光散乱測定より決定したウシ項靱帯由来 α -エラスチン-水系の相図を示す。測定は氷温下で調製した所定濃度の試料溶液について、散乱角 $30-120^\circ$ で温度を 10°C から 1°C ずつ段階的に注意深く上昇させながら行った。2相共存温度は濁度の値より求めた。一方、スピノーダル温度は、散乱光強度の角度依存性から浸透圧縮率に関係付けられる前方散乱強度を求め、その逆数を温度に対してプロットし、0への extrapolation を与える温

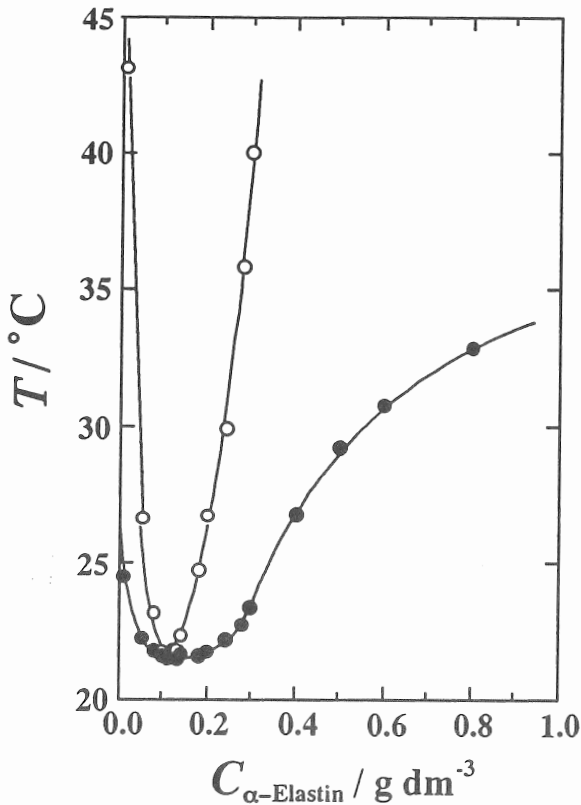


Fig. 2. Phase diagram of bovine neck ligamental α -elastin-water system. Solid circles and open circles indicate binodal and spinodal temperatures, respectively.

度より求めた²⁾。2相共存線とスピノーダル線の交点から、臨界点は α -エラスチン濃度 0.11mg/ml、温度 21.5°C付近であると決定された。 α -エラスチン-水系の臨界挙動については、前方散乱強度の逆数や濃度揺らぎの相関距離が臨界点近傍で発散傾向を示す事からも確認している。

この結果を参考にして、ウシ項靱帯由来 α -エラスチン水溶液の粘度の温度変化を測定した。光散乱測定と同様に氷温下で調製した試料溶液の温度を段階的に上昇させ、コーン回転数一定の条件下で各濃度での粘度を測定した。 α -エラスチン濃度、測定温度によって、コーンの回転を開始してから定常値を得るまでの時間に差異が見られたが、臨界点近傍の濃度を含め、各濃度での定常粘度値を求め

た。得られた粘度値を測定温度の関数としてFig. 3に示した。 α -エラスチン濃度の低下と測定温度の上昇と共に、試料溶液の粘度は単調に低下しているが、各々の濃度の測定値の温度に対するプロットは特定の温度で屈曲点を持つ。Fig. 3に示した例では、臨界濃度に近い α -エラスチン濃度 0.1mg/mlで 25.3°C、0.4 mg/mlでは 37.3°Cとなっている。

この屈曲点は還元粘度と温度の関係を示す図で更に顕著に現れる。Fig. 4に各 α -エラスチン濃度に於ける還元粘度 ($\eta_{red} = (\eta - \eta_0) / \eta C_{\alpha\text{-Elastin}}$ 、ここで η_0 は水の粘度)と測定温度の関係を示す。図から明らかな様に各濃度での粘度測定値は、屈曲点の温度で各々相分離温度に達した後、急激な粘度の減少を示している。相分離後のコアセルベート液滴と平衡液混合系の粘度の定量的解釈は困難であるが、温度上昇に伴う粘度低下の程度は α -エラスチン濃度が低い程大きい結果が示されている。各濃度での屈曲点は、粘度計コーンの回転に基づく剪断応力存在下での相分離温度に対応し、Fig. 2の光散乱測定より

求めた相分離温度に比較して、何れの濃度に於いても明らかに高温側へ移動しているが、臨界濃度の変化は少ない事が示唆される。加えた剪断応力により α -エラスチン-水系の相分離挙動、特に臨界挙動が、どのような影響を受けるかを特定する為には更に詳細な実験が必要であるが、細胞外間隙中の生体内過程を明らかにする上でも重要な研究課題であり、現在、測定を継続中である。

ところで、Fig. 4 に示した結果の中で、相分離温度以下での粘度変化の温度依存性にも注目すべきである。臨界点付近(0.1 mg/ml)では、温度上昇と共に最も急激に粘度が増加し相分離に至っている。臨界濃度から離れるに従って、

温度上昇に伴う粘度増加は緩やかとなり、0.25 mg/ml 以上の α -エラスチン濃度では還元粘度の温度変化が消失している。臨界濃度に近づく程、温度上昇に伴う α -エラスチン分子自身や集合体の溶液内での拡がり急激に進行し、相分離が起こることを示している。

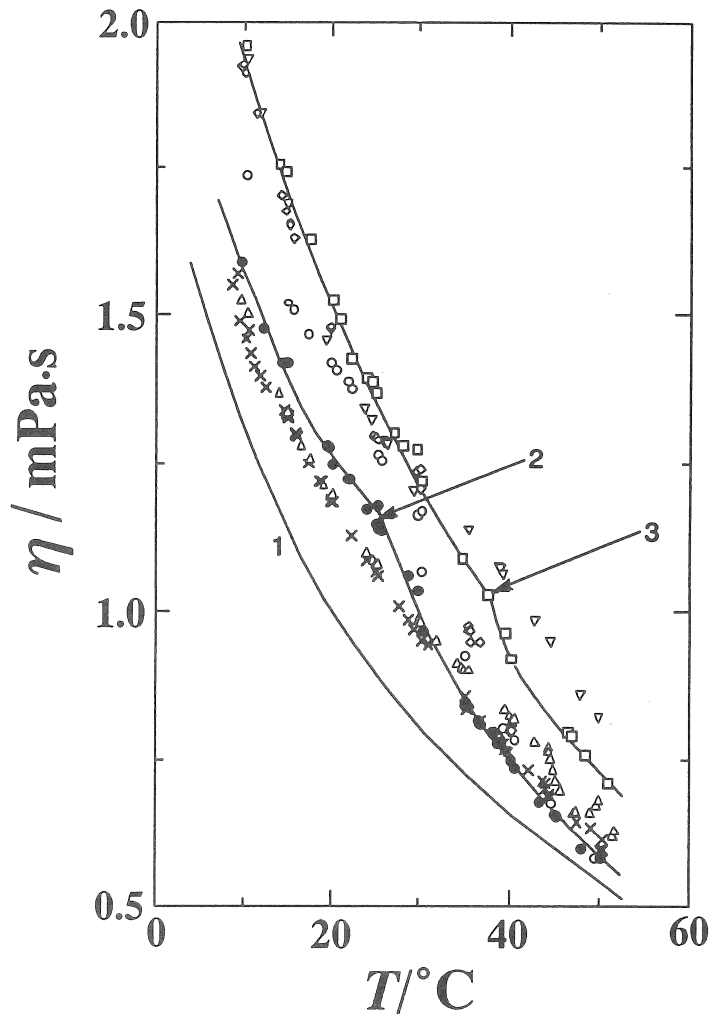


Fig. 3. Viscosity vs. temperature relationships. Bovine neck ligamental α -elastin concentrations(mg/ml) : 0.8 (∇), 0.4 (\square), 0.25 (\diamond), 0.2 (\circ), 0.1 (\bullet), 0.05 (\triangle), 0.01 (\times). Solid curve 1 indicates the temperature dependent changes in pure water viscosity. Break points denoted by arrows refer to points to start the temperature dependent coagulation process under share stress: 2 (0.1 mg/ml, 25.3°C), 3 (0.4 mg/ml, 37.3°C).

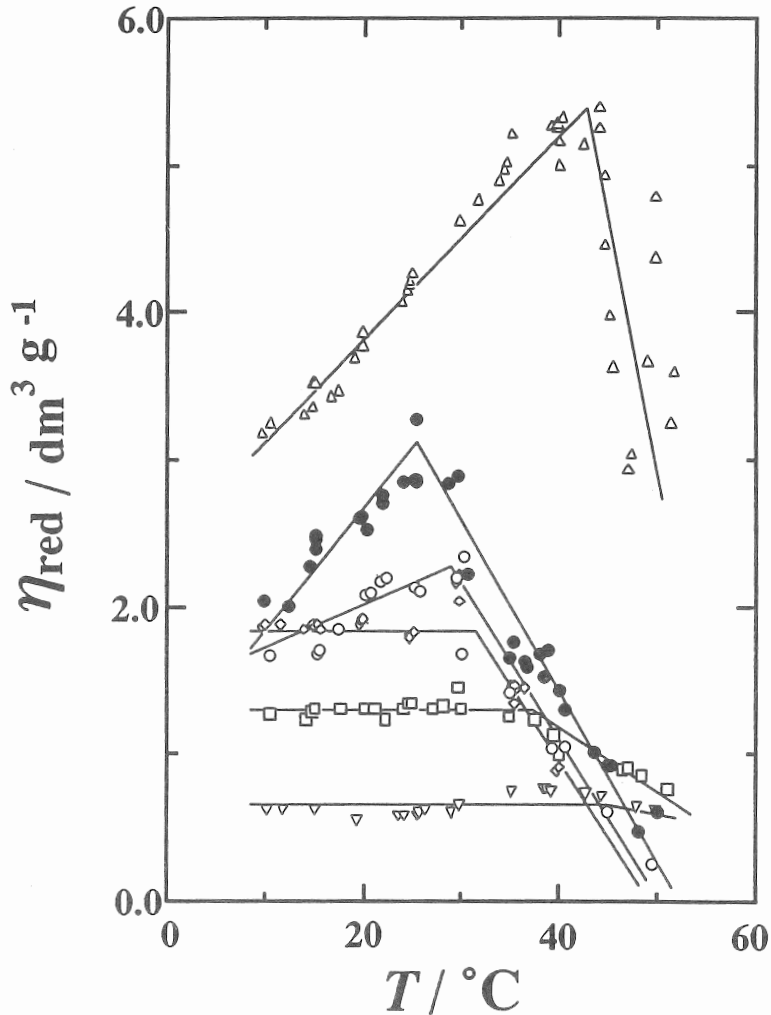


Fig. 4. Reduced viscosity vs. temperature relationships. Bovine neck ligamental α -elastin concentrations(mg/ml) : 0.8 (∇), 0.4 (\square), 0.25 (\diamond), 0.2 (\circ), 0.1 (\bullet), 0.05 (\triangle).

一方、臨界濃度から離れた領域では、 α -エラスチン分子の溶液内での拡がりは温度上昇の影響を殆ど受けず、ほぼ一定の状態を保ちつつ相分離に至る。0.25 mg/ml 以上の α -エラスチン高濃度で得られた結果と同様の温度依存性が抑えられる現象が、低濃度側でも起こっている事が示唆される。

これ等の結果は、準弾性光散乱測定で観測された α -エラスチン-水系の挙動とよく対応している²⁾。臨界点付近で、濃度揺らぎの相関距離が急激な発散的増加を示す結果は、温度上昇に伴う粘度増加に対応し、系全体への α -エラスチン分子の拡がりが系全体での濃度揺らぎを支配して相分離を誘起する事になる。濃度揺らぎの相関距離は臨界濃度から

離れ、粘度の温度変化が消失する濃度に対応する α -エラスチン濃度で、温度依存性がほぼ消失する結果が得られる。準弾性光散乱測定により求まる拡散係数より、Stokes-Einsteinの関係式を用いて得られる散乱粒子の流体力学的半径を見積もった結果は、臨界点付近では急激な粒径増加を経て一定の値が保たれるが、臨界点から離れると粒径増加の程度は小さくなり、更に臨界点から離れると粒径は寧ろ緩やかに減少する事を示している。粘度測定と準弾性光散乱測定の結果は、概ね良い対応が得られているが、更に詳細な測定を継続し、 α -エラスチン-水系の臨界現象の明確な記述を目指している。

3. 2 エラスチンコアセルベート形成に及ぼす各種金属塩化物の効果

液-液2相分離を伴うエラスチンペプチドの自己集合組織化過程は温度以外にも、荷電の釣り合い、pH、分子量等、一般的なコアセルベーションと同様の様々な因子の影響を受ける。前駆体トロポエラスチンの自己集合組織化が進行する細胞外空間は金属塩化物混合水溶液としての細胞外液に満たされており、金属塩化物共存下での相分離過程の詳細を明らかにする事は、エラスチン生合成過程や機能発現機構を検討する目的にも重要である。

Fig. 5は波長400nmでの濁度の温度依存性から、 α -エラスチン濃度0.4 mg/mlに於ける各種金属塩化物(10^{-2} mol/l)の効果を検討した結果の一例である。氷温下での試料調製と温度を上昇させながら測定する手法は他の測定と同様である。アルカリ及びアルカリ

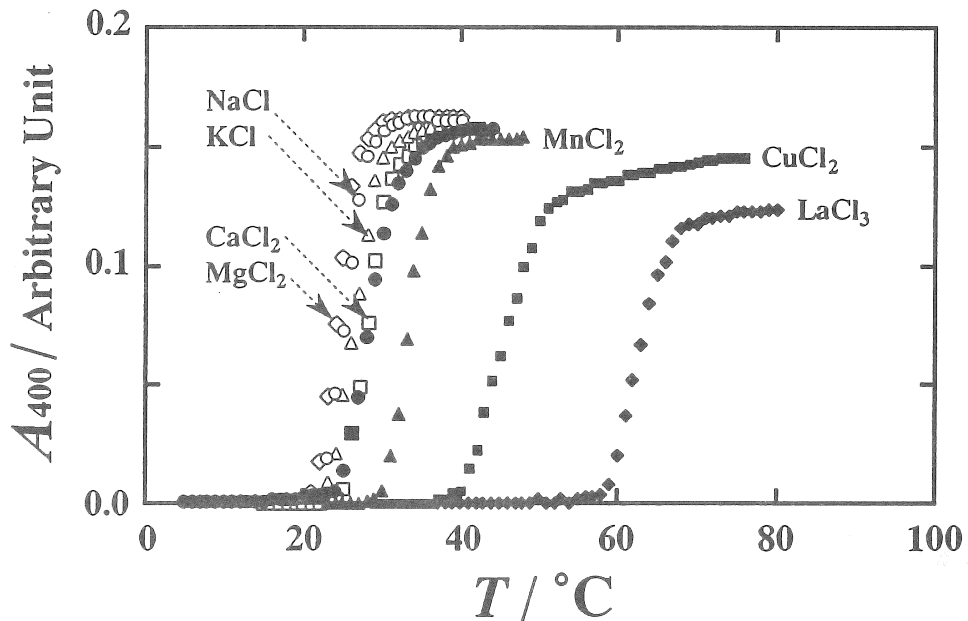


Fig. 5. Effects of metal cations on the temperature profiles of bovine neck ligamental α -elastic coacervation traced by means of measuring the turbidity changes at 400 nm. α -Elastin concentration: 0.4 mg/ml; Metal chloride concentration: 10^{-2} mol/l. Closed circles indicate the turbidity in metal free system.

土類金属は相分離を促進し濁度増加の開始温度を低温側へ移行させるが、遷移金属は相分離を抑制し濁度増加開始温度を高温側へ移行させた。アルカリ金属イオンの効果は $\text{Li} > \text{K} > \text{Na} > \text{Cs}$ の順で一般的な塩析効果に帰されるが、 Mg 、 Sr 、 Ba が等しく濁度増加開始温度を低温側へ移行させるのに対して、アルカリ土類金属の中での Ca の効果は選択的で、 α -エラスチン無塩系での濁度増加開始温度に殆ど影響を与えないか寧ろ高温側へ移行させた。遷移金属の効果は通常の配位子との相互作用の序列に従ったが、 Cu の効果は例外的に強く、又、コアセルベート液滴を安定化させ、分離層形成を阻止する程であった。同様の効果は La でも観察された。

Cu 共存下では他の金属に比して特異的な現象が多数観測された。準弾性光散乱測定や濁度変化の Cu イオン濃度依存性から、臨界挙動に得意な影響を与える濃度が存在する事が示された。さらに、NMR、ESR測定を行うと Cu イオンのみがエラスチンペプチドと高分子錯体を形成するのに対して、 Mn では錯体形成が行われない事を示す結果を得た。前述の様に、 Cu イオンは架橋形成を触媒するリシルオキシダーゼの捕因子であるが、生化学反応への関与だけではなく、前駆蛋白質集合体の構造の制御へ関与している可能性がある。

3.3 エラスチンコアセルベート型蛋白質液体中のイオン輸送過程

エラスチンコアセルベートとイオンとの相互作用を研究する手法の一つとして、コアセルベート分離層を液体膜として取り扱い、電気化学的測定を行う方法が有効である。ウシ項韌帯 α -エラスチン粉末に所定量の水を加え、一連の水含量の異なる試料を調製し、示差走査熱量測定を行った結果をFig. 6に示す。水添加量の増加とともに現われる吸熱変化が63-65重量%の含水率で飽和する結果が得られているが、この値は α -エラスチンコアセルベート型液体膜の組成に対応している。高濃度 α -エラスチン溶液(75mg/ml)をFig. 1に示したセルに充填し、通常の膜透過実験に相当する測定を行なう。エラスチンコアセルベート膜は、体温付近の温度を保てば十分に安定な測定結果を

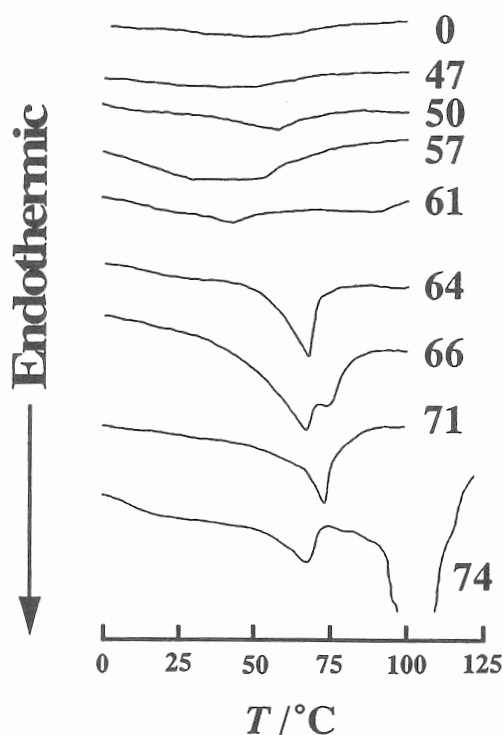


Fig. 6. DSC thermograms for bovine neck ligament α -elastin with varying water content, 0-74 wt%.

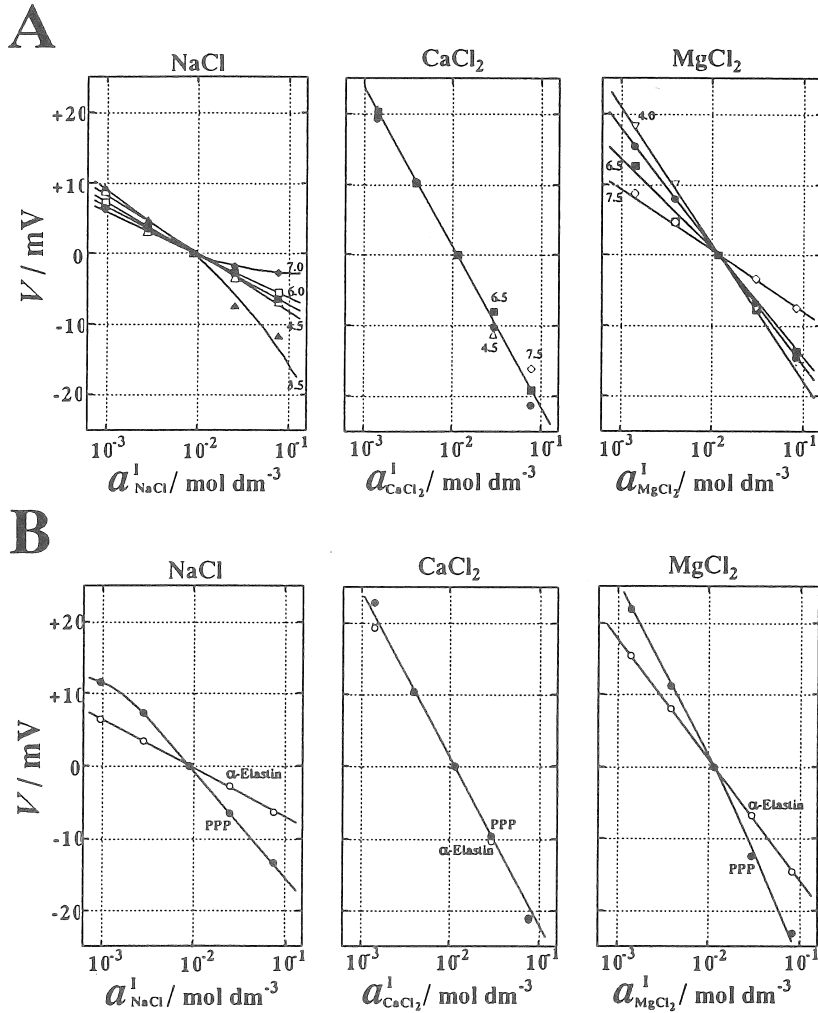


Fig. 7. A. Effect of pH, 3.5-7.5, on transmembrane potential responses across bovine neck ligamental α -elatin in NaCl, CaCl₂, and MgCl₂ concentration cell systems. B. Comparisons of transmembrane potentials between bovine neck ligamental α -elatin in isoelectric pH, around 5.3, and polypentapeptide, (Val-Pro-Gly-Val-Gly)_n (n \geq 40), in NaCl, CaCl₂, and MgCl₂ concentration cell systems.

与えた。 Fig. 7に、エラスチンとCaイオンとの選択特異的相互作用について検討する目的で、ウシ項靱帯由来 α -エラスチンとポリペンタモデルペプチドを用いて行なったコアセルベート型液体膜に関する実験結果を示す。 先ず、 α -エラスチンの等電点前後のpHでNaCl、CaCl₂、MgCl₂の濃淡系について膜電位測定を行なう。 pH変化に応じてカルボキシル基とアミノ基の解離度が変し、陽、陰イオン選択性が変化する事で膜電位応答がpHに依存する結果が得られるはずである。ところがCaCl₂系だけはpH依存性が見られず、Caイオン輸送の大部分はエラスチンの電気的中性部位との相互作用に基づいている事になる

(Fig. 7 A)。中性部位の一つの可能性としてペントペプチド(-Val-Pro-Gly-Val-Gly-)部位がある。そこでポリペントペプチドコアセルベート膜について同様の測定を行なうと、荷電部を介した通常の輸送機構と思われるNaCl、MgCl₂系では、荷電を有する α -エラスチン膜と無荷電のポリペントペプチド膜の電位応答は異なる。他方、CaCl₂系では両者の応答は一致しており、Caイオンの圧倒的多数は電気的中性部位であるペントペプチド部位を介して選択特異的に輸送されている事になる。別途行ったコアセルベート膜中の各金属イオン濃度測定と膜透過過程の解析から、Caイオンは他の金属イオンに比べて膜透過係数が小さく膜内濃度は高いとの結果が得られ、Caイオンはエラスチンコアセルベート中に選択的に蓄積されていく事が示唆される。ペントペプチド部位は、エラスチンの弾性機能発現の中心的役割を果たしているとの指摘がなされている一方、加齢、老化、あるいは病的要因による動脈硬化の進行にはCa沈着が素因となっており、弾性線維蛋白質エラスチンの弾性発現の基礎となっている分子機構は、同時に、Caやコレステロール沈着等に起因する弾性機能の低下の元凶となっている可能性が高い。

4. 今後の課題

弾性線維蛋白質エラスチンは、多様な側面を有する重要な研究対象であるにも拘わらず、多くの未解明の研究課題が残されている。エラスチンの構造、物性、機能に関する全ての研究の基礎として、相分離挙動を明確に記述する事が必要であり、光散乱測定、粘度測定に加え、ビデオ顕微鏡を用いた画像解析による検討を試みている。各種金属塩化物が、エラスチンコアセルベート形成に特異な役割を果たしている事も明らかになりつつあるが、更に次の様な観点から研究を進める必要がある。生体内自己集合組織化との対応を検討するには、細胞外液組成の媒質中での相分離挙動の観察が必要である。特に、Caイオンとエラスチンコアセルベートの選択特異的相互作用は、動脈硬化との関連を始め社会的背景も有する重要な研究課題であり、弾性発現機構解明の手掛かりを与える可能性もある。研究の過程で見出したCuイオンの特異な効果についても、エラスチンの構造、物性、機能解明の為の有用なツールとなると考えている。

5. 参考文献

- (1) K. Kaibara, K. Okamoto, and K. Miyakawa, in : "New Functionality Materials, Volume B : Synthesis and Function Control of Biofunctionality Materials", (T. Tsuruta, M. Doyama, M. Seno, Y. Imanishi (editors)), Elsevier Science Publisher B. V., 281 (1993).
- (2) K. Miyakawa and K. Kaibara, J. Phys. Soc. Jpn., **60**,1468, (1991); K. Miyakawa, Y. Ito, and K. Kaibara, J. Phys. Soc. Jpn., **62**, 2511 (1993).
- (3) K. Kaibara, K. Sakai, K. Okamoto, Y. Uemura, K. Miyakawa, and M. Kondo, Biopolymers, **32**, 1173 (1992).

Role of Metal Chlorides on Self-Assembly and Function Control of Proteins

Kozue Kaibara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University

Summary

Elastin is an important and major proteinic constituent of the biological elastic fiber in tissues under sustaining strong tension, such as aortal wall, lung, and ligament. Qualitative and quantitative degradation of elastin by aging and/or physical illness is responsible to arteriosclerosis and further fatal circulatory diseases. The most important process of elastin biosynthesis is thought to be a self-assembly of precursor tropoelastin delivered from aortal smooth muscle cell and fibroblast cell by exocytosis mechanisms. The self-assembly process in extracellular space as a key step of the elastogenesis can be mimicked by the temperature-dependent coacervation of aqueous solutions containing elastin-related polypeptides. Characterizations of the phase separation process are required to visualize extracellular events in which essential molecular arrangements are established to reveal multiple function as an extracellular matrix.

Dynamic light scattering and rotary viscometric experiments were carried out to observe critical behaviors in the temperature-dependent coacervation of elastin. Binodal and spinodal lines were estimated for bovine neck ligament α -elastin-water system. Critical concentration and temperature were estimated around 0.11 mg/ml and 21.5°C, respectively. In the light scattering experiments near the critical concentration, correlation length of fluctuations of concentration showed a divergent increment as a function of temperature. In these situations, estimated hydrodynamic sizes of scattering particles were abruptly increased. On the other hand, far from the critical concentration, temperature dependencies of these quantities were significantly depressed. These results were well correlated with viscometric measurement results. Viscosity values increased with temperature near the critical concentration, while the almost constant values were obtained in concentrations far from the critical point. The elastin coacervation was accelerated by alkali and alkali earth metals and decelerated by transition metals. Selective interactions of elastin coacervate with Ca ions were observed in many cases. Electrochemical measurements on the elastin coacervate as a protein liquid ion-exchange membrane suggested that Ca ions tend to accumulate in coacervate phase mainly due to the interactions with electrically neutral sites of elastin. These Ca specificities seem to related to the fact that Ca depositions on elastin is one of the predispositional factor to arteriosclerosis. Novel interactions of elastin coacervate with Cu ions were observed in a variety of measurements. Coacervate droplets were stabilized specifically by Cu ions and further separated layer formation was inhibited. These results suggest the possible involvement of Cu ions, enzymatic co-factor of cross-linking in elastogenesis, to the self-assembly process in extracellular space.