

9828 遷移金属に富む原始海洋中で生命組織体が如何に形成されたかを探る
 - 遷移金属塩化物による蛋白質の自己集合組織化のメカニズム -

助成研究者：甲斐原 梢 (九州大学 理学部)

地球上の生命の端緒が核酸を主役としてRNAワールドで生み出されたか否かの議論とは別に、遷移金属に富む太古の原始海洋を揺籃として生体機能を備えた組織体が創り出された事は衆目の一致する処である。遷移金属に富む原始海洋を模した媒質中で化学進化実験を行うと、架橋ポリペプチド鎖から成る粒状構造体を得られる事が知られているが、この架橋ポリペプチドは、我々の体内で大動脈壁等の組織の弾性機能を掌る弾性線維蛋白質エラスチンと類似の構造をとる。弾性線維蛋白質エラスチンは、アラニン、バリン、グリシンを多量に含み胎生初期に合成される言わば原始的な蛋白質であるが、加齢・老化に伴う動脈硬化で機能を消失するまで、生体に重要な正常血圧の発生・維持機能を長期に渡り発揮する。新しい生命の誕生に関わり、その寿命を決める役割がエラスチンに与えられているのは、原始生命組織体につながる蛋白質として象徴的である。

我々の弾性線維蛋白質に関する一連の研究の基礎は、エラスチン生合成で最も重要な細胞外間隙で進行する前駆蛋白質トロポエラスチンの自己集合過程が、原始生命組織体形成と等価であり、弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーション、則ち、温度上昇に伴う液-液2相分離を伴う蛋白質の自己組織化過程として再現可能な事にある。相分離過程に影響を与える様々な因子の中で、共存金属イオン、特に遷移金属イオンの効果に注目して様々な実験を行い、原始生命組織体から動脈硬化に至る多様な側面を有する研究対象としてのエラスチンコアセルベートの特性を明らかにする事を目的としている。

ウシ項韌帯由来 α -エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションを規定する下部臨界共溶温度型の相図を、静的及び動的光散乱測定と位相差顕微鏡観察によって特定した。更に、臨界点近傍と臨界外領域での液-2液相分離を伴う弾性線維蛋白質の自己集合組織化過程について、集合体の流体力学的特性の解析やマイクロコアセルベート液滴の顕微鏡観察画像の粒子解析を行い、基本的な疎水性相互作用とアミノ酸残基の側鎖荷電間の静電的相互作用の関与を明らかにした。又、共存金属イオン、特に遷移金属イオンが弾性線維蛋白質の自己集合組織化に及ぼす影響について、エラスチンモデルポリペプチドを用いたCDスペクトル及びNMRスペクトル測定を行い、ペプチド骨格カルボニル酸素への選択特異的な金属イオンの結合による、弾性線維蛋白質の規則的構造の変化と自己集合組織化への影響について検討した。

9828 遷移金属に富む原始海洋中で生命組織体が如何に形成されたかを探る - 遷移金属塩化物による蛋白質の自己集合組織化のメカニズム -

助成研究者：甲斐原 梢 (九州大学 理学部)

1. 研究目的

太古の地球上での最初の生命は、何時、どのような環境の下で生れたかとの疑問は、我々に尽きることのない興味を抱かせており、化石の探索や生物種の系統樹を遡って答えを見い出そうとの試みが行われ、又、彗星や隕石等の宇宙から飛来した物体に生命の起源を求める考え方もあり、明確な描画を得るには至っていない。¹⁾ 生物種の共通の未知の祖先に近く、系統樹の根元に近いと思われる微生物群には、過酷な条件下、特に高温下で生息する種が多いことから、海底熱水噴出孔に代表される高温環境下での生命の誕生を主張する考えがある一方で、低温条件下の方が、微妙な構造や機能が要求される生命組織体の形成には好都合であるとの主張もある。何れにしても、微小な原始生命の化石の探索や生物種の系統樹を遠く遡って約40億年前に至るには、方法的にも多くの困難が伴う事になり、ミラーの先駆的な研究から50年を経た現在でも、様々な研究成果を基にして太古の地球の環境を再現して、いわゆる化学進化実験を行う方法は、生命の起源を探る有力な研究手段となっている。

昨今の、地球上の生命の端緒が核酸を主役としてRNAワールドで生み出されたか否かの議論とは別に、生命組織体としての機能を有する最小単位、即ち、原始細胞とも呼ぶべき分子集合体が如何なるものであって、どのような環境で形成されたかも、解き明かさねばならない重要な研究課題である。例えば、オパーリンにより提唱されたコアセルベートは、様々な化学反応や酵素反応の場としても機能し、依然として有力な原始細胞モデルの一つであり、他にも多くの原始細胞モデルが提案されて来た。原始的生命の反応を掌る生体高分子にせよ、生命組織体としての原始細胞にせよ、太古の原始海洋を揺籃として様々な生体機能を備えた分子や分子集合体組織体が創り出された事は衆目の一致する処であって、原始のスープとしての太古の海洋組成は、現在の海洋に比べて、遷移金属に富んでいたと考えられている。遷移金属に富む原始海洋を模した媒質中で化学進化実験を行うと、単純な有機化合物からアミノ酸、更に架橋ポリペプチド鎖が生成して、最終的にマリグラヌールと呼ばれる粒状構造体が得られる実験結果が、江上等によって報告されている。²⁾ ところで、不思議な事に我々の体内には、この化学進化実験で得られる架橋ポリペプチド鎖に類似したアミノ酸組成と架橋構造を有する蛋白質が存在している。大動脈壁

を始めとする生体弾性組織の機能を掌っている弾性線維蛋白質エラスチンであり、細胞外マトリックスを構成し、蛋白質としては、同じく細胞外マトリックスであるコラーゲンに次いで2番目に大量に存在している。

この様な事を基礎に、我々が生命組織体モデルとして取り上げたのは、弾性線維蛋白質エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションの過程で形成されるマイクロコアセルベート液滴である。弾性線維蛋白質エラスチンは、アラニン、バリン、グリシンを多量に含む単純なアミノ酸組成をもち、胎生初期に合成される言わば原始的な蛋白質であり、動脈壁、項靱帯、皮膚、肺胞等の弾性組織で生体弾性機能を支配している。ところで、血管内圧は脈動流によって規定されているが、内圧変化に依存した動脈壁弾性機能の変化が起こっている。大動脈壁を構成する血管平滑筋細胞、コラーゲン、エラスチンの中で、エラスチンが唯一、正常な血管内圧の発生・維持機能を発揮しているのに対して、異常低内圧では平滑筋細胞が選択的に機能し、一方、異常高内圧ではコラーゲンが選択的に機能する事で血管壁の剛性が増して、いわゆる動脈硬化が進行する。従って、動脈硬化は、血管壁弾性機能を支配するエラスチンの質的・量的変化として捉える事が可能である。弾性線維蛋白質エラスチンは50年以上に渡り生命活動を支え、最終的に加齢・老化に伴う動脈壁弾性機能の低下が寿命を決める大きな要因として働いており、我々の誕生から死に至る迄の関わりは、原始生命体類似の構造を有する蛋白質として象徴的である。

本研究は、原始生命組織体モデルとしてのエラスチンマイクロコアセルベート液滴に関する、化学進化実験そのものを行おうとするものではない。一連の研究の基礎は、エラスチン生合成で最も重要な細胞外間隙で進行する前駆蛋白質トロポエラスチンの自己集合過程が、原始生命組織体形成と等価であり、弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーション、則ち、温度上昇に伴う液-液2相分離を伴う蛋白質の自己組織化過程として再現可能な事にある。³⁾ 相分離過程に影響を与える様々な因子の中で、共存金属イオン、特に遷移金属イオンの効果に注目して様々な実験を行い、原始生命組織体から動脈硬化に至る多様な側面を有する研究課題としてのエラスチンコアセルベートの特性を明らかにする事を目的としている。例えば、本報告書で述べている様に弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションに特異な影響を与える銅イオンは、マリグラヌール形成を始め、種々の化学進化実験でも重要な働きをする因子である事が明らかになっているが、エラスチン生合成でも必須な因子であって、実際に銅イオン欠乏は正常なエラスチン生成を阻害し、致命的な結果をもたらす事が知られている。大動脈壁エラスチンの代謝回転は50~60年と非常に遅く、動脈弾性機能低下の治癒は困難であり、外科的な病変部位の除去と新しい血管との代替処理が行われる必要がある。しかし、正常血圧の発生・維持に有効な特異な弾性機能を発揮する生体弾性材料は未だ実現されていない。本研究の結果は、生体弾性機能材料や動脈血管壁代替材料の開発についても有用な知見を与えるものと思われる。

2. 研究方法

2.1 .弾性線維蛋白質：生体由来ポリペプチドとモデルポリペプチド

弾性マトリックスとして細胞外間隙を埋めているエラスチンは、弾性組織の熱アルカリ処理残渣として抽出される程に、溶解性に乏しい蛋白質である。各種測定に供する試料として、エラスチンを更に熱蓚酸処理によって、前駆蛋白質トロポエラスチンの分子量（7万から7万5千）に相当する断片とした水溶性 α -エラスチンを用いた。ウシ項韃帯由来 α -エラスチンを米国Elastin Products社から購入し、各種測定に主として用いた。

弾性線維蛋白質エラスチンは、細胞外マトリックスとしての多様な機能を分担する部品としての特有な繰返しペプチド配列部位から構成されている。⁴⁾ 例えば、ラミニンにも見られるヘキサペプチド配列、Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val、は細胞遊走特性を示す。本研究で重要なコアセルベート特性はペンタペプチド配列、Val-Pro-Gly-Val-Gly、に主として由来し、同時に弾性機能発現の分子構造的基礎ともなっている。九州工業大学情報工學部の岡元研究室よりブロック共重合ポリペンタペプチド、H-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)_n-Val-OMe (n 40)、を提供して頂き、生体由来試料 α -エラスチンとの荷電性アミノ酸残基の有無等、種々の比較検討を行った。 α -エラスチン、ポリペンタペプチド共に、測定試料溶液を氷温下で調製後、冷蔵庫内に静置して完全に溶解させ、0～10℃の低温で測定を開始し、0.5～1.0℃の段階的或いは連続的な温度上昇を行う事で、全ての測定で良好な再現性を示す結果が得られた。

2.2 .温度依存性コアセルベーションの観察と解析：光散乱測定と位相差顕微鏡観察

エラスチンコアセルベートの形成は、下部臨界共溶温度型の液-液2相分離によって規定される。相分離の前駆過程から初期過程に対しては、福岡大学理学部宮川研究室の御協力を得て、アルゴンレーザーを光源とする静的及び動的な光散乱測定を適用した。⁵⁾ 温度上昇により、平衡液相から分離生成したマイクロコアセルベート液滴による濁度が増加して光散乱測定が不可能となる相分離後期過程や、試料溶液の粘性増加等で光散乱測定が困難となる高濃度領域については、位相差顕微鏡に拠るマイクロコアセルベート液滴の直接観察と画像粒子解析を行った。厚さ0.2mmのシリコンゴムガスケットを挟んだ2枚のカバーガラス間にエラスチンペプチド試料溶液を注入し、顕微鏡(Olympus IMT-2)の温度制御ステージ(東海ヒットMATS-555T、3-80℃)を用いて、CCDビデオカメラ(浜松フォトニクスC3077-C3754)と画像処理装置(浜松フォトニクスArgus-10)を介してCRTモニタ上で画像を観察する。モニター上での観察倍率は、1050～4200倍である。ビデオテープに記録した画像は、コンピュータに取り込み、最終的に画像解析プログラムNIH Image (PDS by W. Rasband)を用いて粒子解析を行った。

2.3 .金属イオン共存下での自己組織化：遷移金属イオンの特異的な作用の観測

各種共存金属イオン存在下での弾性線維蛋白質-水系のコアセルベーションについて、光散乱測定と位相差顕微鏡観察による検討を行った。更に、遷移金属イオンを含めた各種金

属イオンの効果について、ポリペプチドを用いたCDスペクトル測定、特定のアミノ酸残基にC-13ラベルを施したポリペプチドによるNMR測定、更に、遷移金属イオンについてはESRスペクトル測定を行い検討した。結果に基づき、特定の金属イオンに対する選択特異的結合部位や弾性線維蛋白質の自己集合組織化への影響を詳細に検討した。尚、CDスペクトル及びNMRスペクトル測定については、佐賀大学工学部近藤研究室に御協力頂いた。

3. 研究結果と考察

3.1 弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーション

ウシ項韌帯由来 α -エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションを規定する相図をFig. 1に示す。試料溶液の温度上昇によりマイクロコアセルベート液滴の分離生成が開始される温度、バイノーダル温度を光散乱測定及び液滴出現の顕微鏡観察により求め、又、スピノーダル温度は光散乱強度の角度依存性の測定から求めた。両者が一致する点、 α -エラスチン濃度0.11 mg/ml、温度21.5℃付近に臨界点が存在する事は、濃度揺らぎの相関距離が発散傾向を示す事で確認した。1 mg/ml以上の α -エラスチン濃度では、相分離開始温度の上昇は抑えられ、35℃付近の一定値を示した。別の実験から、コアセルベート相中の蛋白質濃度は最終的に約40重量%になる結果が得られている。この値は、生体弾性組織中のエラスチン濃度に一致する。

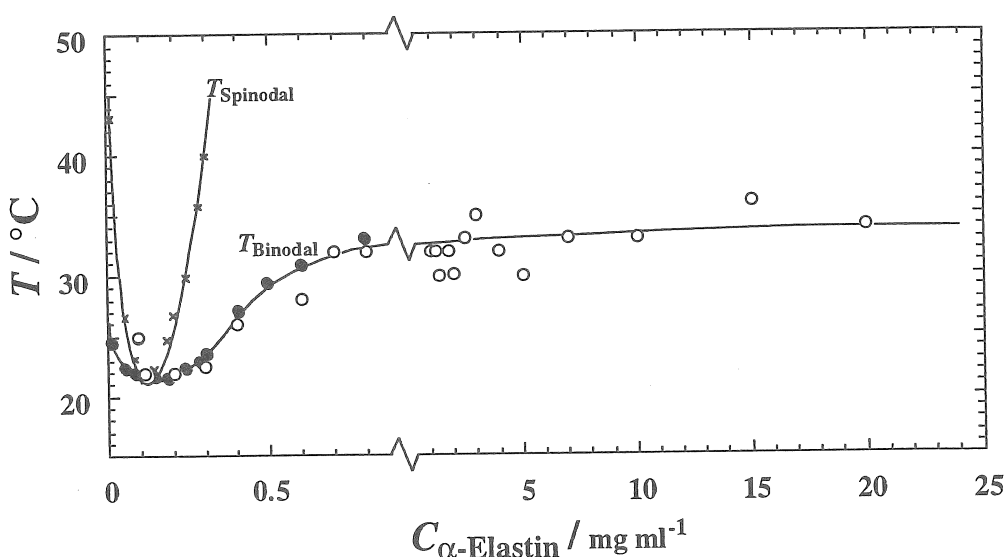


Fig. 1. Phase diagram of the bovine neck ligamental α -elastin-water system showing the binodal temperatures estimated by phase contrast microscopic observations (O) and light scattering measurements (●), respectively, and spinodal temperatures (×) evaluated from the forward light scattering intensity values.

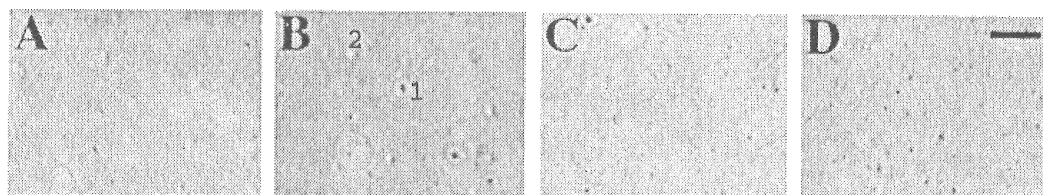


Fig. 2. Examples of phase contrast microscopic images of the bovine neck ligamental α -elastin-water system. α -Elastin concentration and temperature: A (0.09 mg/mL, 26.0°C), B (0.11 mg/mL, 23.0°C), C (0.4 mg/mL, 32.5°C), D (0.8 mg/mL, 34.5°C). Scale bar: 20 μ m. Black dot 1 and white dot 2 indicate microcoacervate droplets positioned on and off the focal plane, respectively.

ポリペプチド-水系についても同様の相図が得られるが、 α -エラスチンに比して分子量が小さいために、臨界濃度、臨界温度共に、かなり大きな値となる。

Fig. 2にマイクロアセルベート液滴の位相差顕微鏡画像の例を示す。反転ビデオ画像を用いた方がコアセルベート液滴の確認が容易なので、焦点面上の液滴はブラウン運動で振動する黒い点として観察され、焦点面から外れた液滴は白い点として観察される。5～10画面の画像について粒子解析を行い、Fig. 3に示すような液滴粒径サイズの分布を

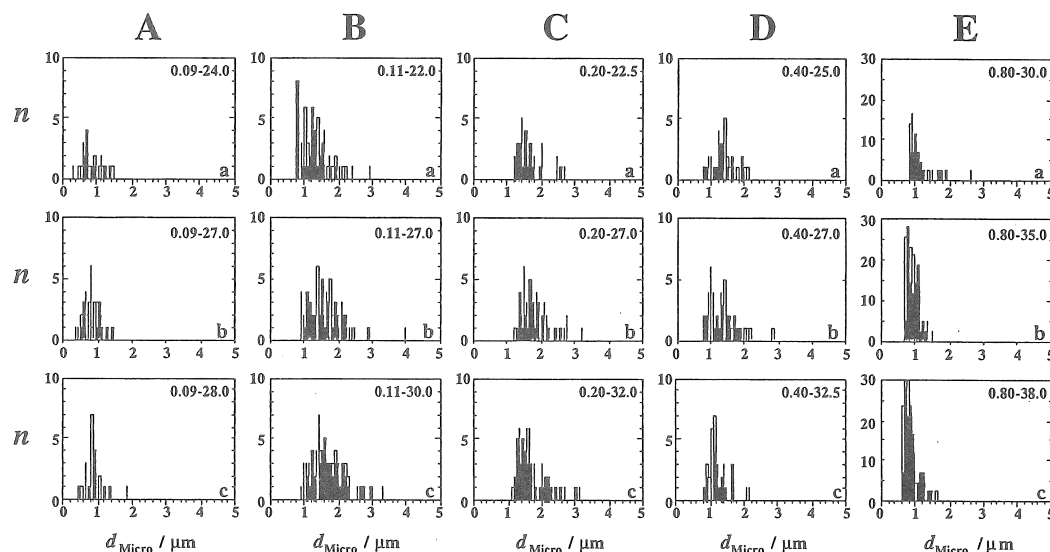


Fig. 3. Histograms for the microcoacervate droplet diameter, d_{Micro} , distribution for the bovine neck ligamental α -elastin-water system. Droplet number data, n , in each histogram was counted for image planes with total area of $1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$. α -Elastin concentration and temperature: A (0.09 mg/mL)-a (24.0°C), b (27.0°C), c (28°C); B (0.11 mg/mL)-a (22.0°C), b (27.0°C), c (30.0°C); C (0.20 mg/mL)-a (22.5°C), b (27.0°C), c (32.0°C); D (0.40 mg/mL)-a (25.0°C), b (27.0°C), c (32.5°C); E (0.80 mg/mL)-a (30.0°C), b (35.0°C), c (38.0°C).

示すヒストグラムを求める。本実験に於ては、楕円体として粒子解析を行って得られた長軸と短軸の値の平均値をマイクロコアセルベート液滴の粒径とし、粒子数は解析画像面積を $1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 当たりで換算して用いている。

3.2. 臨界点近傍及び臨界点から十分に離れた領域での分子集合特性

Fig. 3のヒストグラムに明らかな様に、臨界点近傍 (Fig. 3B) と臨界点から離れた領域では、マイクロコアセルベート液滴の粒径分布に顕著な違いが認められる。臨界点では粒径が大きく粒径分布の広い液滴が分離生成するのに対して、臨界領域外では、粒径が小さく粒径分布の狭い特性が見られる。対応する結果が、光散乱測定で求めたコアセルベート液滴や相分離に先立ち形成される前駆的分子集合体の流体力学的サイズの温度依存性にも表れている。Fig. 4Aに示されている様に、 α -エラスチンの臨界濃度 0.11 mg/ml では、温度上昇と共に流体力学的サイズは、おそらく前駆集合体からの水分子の駆出によると思われる減少が起こるが、臨界温度に近付くと共に急激に増大した後、相分離に至る。臨界濃度から離れるにつれて、相分離に先立つ流体力学的サイズの増加の程度は抑えられ、最終的に臨界濃度から十分に離れた α -エラスチン濃度では、温度上昇と共に流体力学的サイズが減少した後に相分離に至る過程へと変化している。臨界点から離れると共に、前駆的集合体の形成から相分離を誘起するには、より大きな温度上昇が必要となる。

前駆的な分子集合体は、臨界点近傍では、早い時間経過で流体力学的サイズを大きくした後に、粒径が大きく粒径分布も広いコアセルベート液滴を分離させる一方、臨界点から十分に離れた領域では、緩徐な時間経過で流体力学サイズが収縮した後に、粒径が小さく粒径分布も狭い液滴を分離させている。弾性線維蛋白質の自己集合組織化を特徴付ける

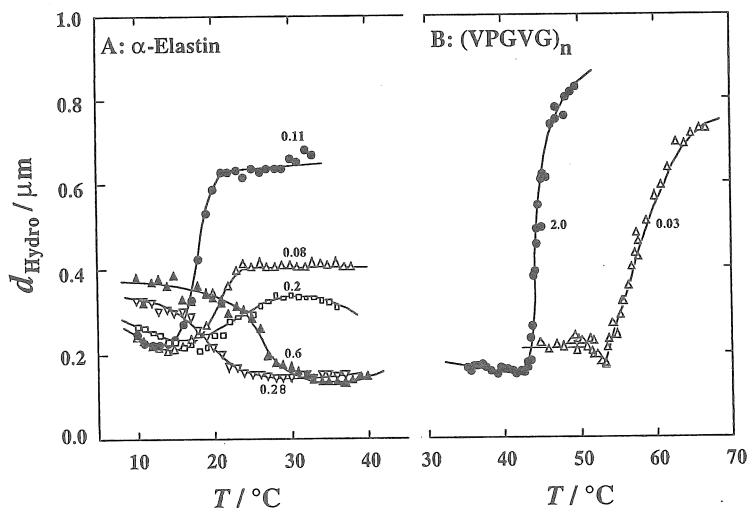


Fig. 4. Hydrodynamic diameter, d_{Hydro} , values as a function of temperature deduced from the Stokes-Einstein relation based on the apparent diffusion coefficient data.

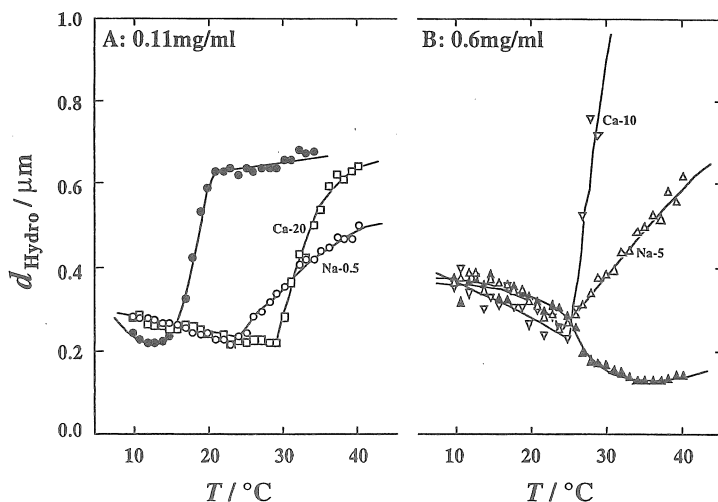
A: bovine neck ligament α -elastin-water system. α -Elastin concentration (mg/ml): 0.08 (Δ), 0.11 (\bullet), 0.2 (\square), 0.28 (\blacklozenge), 0.6 (\blacktriangle).

B: Polypentapeptide-water system. H-(Val-Pro-Gly-Val-Gly) $_n$ -Val-OMe ($n \geq 40$) concentration (mg/ml): 0.03 (Δ), 2.0 (\bullet).

Fig. 5. Effects of metal chlorides on the temperature-profiles of hydrodynamic diameter, d_{Hydro} , values at the critical (A) and off-critical (B) conditions of the bovine neck ligamental α -elastin-water system.

A: α -Elastin concentration (0.11 mg/ml); salt free (●), 0.5 mM NaCl (○), 20

mM CaCl₂ (□). B: α -Elastin concentration (0.6 mg/ml); salt free (▲) 5 mM NaCl (△), 10 mM CaCl₂ (◆).



時間経過の早い過程と緩徐な過程の基礎となる機構は、次に述べる2つの実験から、各々、基本的な疎水性相互作用と荷電性アミノ酸側鎖間の静電的相互作用の関与によると結論付ける事が出来る。 先ず、荷電性アミノ酸残基を含まず α -エラスチンに比して疎水性の高いポリペプチド-水系の場合、Fig. 4Bに示した様に、臨界濃度から十分に離れた濃度の系であっても、 α -エラスチン-水系の臨界点型の流体力学的サイズの温度変化のみが観測される。 次に、塩化ナトリウム或いは塩化カルシウム共存下で α -エラスチン-水系の測定を行うと、Fig. 5の流体力学的サイズの温度変化の結果に示した様に、臨界点近傍 (Fig. 5A) では基本的な様式の変化は見られないのに対して、臨界領域外では臨界点型様式への移行が観察される。 相分離後のコアセルベート液滴の粒径分布ヒストグラムに於ても、同様の結果が得られた。 即ち、疎水性の高いポリペプチド系では、広い濃度範囲で類似の粒径分布の広いヒストグラムが得られ、低分子量にも関わらず α -エラスチン系よりも大きな粒径のコアセルベート液滴が分離する。 又、金属塩化物が共存する系では、 α -エラスチン濃度に関係なく、無塩系での臨界点型に相当する広い粒径分布のヒストグラムが得られた。

温度依存性コアセルベーションに対する金属塩化物の効果、特に、前駆集合体の流体力学的サイズの変化やコアセルベート液滴の粒径分布への効果は、基本的に塩溶・塩析効果で理解出来、0.1 mMでは相分離は抑制され相分離温度は上昇する。 添加塩の基本的な作用は、荷電性アミノ酸残基への静電遮蔽効果である。 全ての系は α -エラスチンの等電点付近の条件が満たされ、無塩系では、静電的相互作用、おそらくは異種荷電間の引力的相互作用が、本質的な疎水性相互作用に対して時間経過の遅い抑制効果を及ぼしているの

に対して、塩添加により静電的相互作用が遮蔽され、時間経過の早い疎水性相互作用が優位になると考えられる。濃度揺らぎの相関距離が無限大となる臨界点では、本質的に疎水性相互作用が大きく静電的相互作用の寄与は小さく、添加塩効果は限定的である。

3.3.コアセルベーションに対する金属イオンの影響：遷移金属イオンの特異な効果
アミノ酸残基の荷電性側鎖とイオン間の静電的相互作用は、イオンの大きさや水和の程度等で決まり、塩溶・塩析効果等の特定の序列に従う作用以外に、特定のイオンによる選択的特異的な効果は現れ難い。一連のアルカリ金属やアルカリ土類金属イオンが臨界特性に及ぶ効果を調べた、前節の光散乱測定及び位相差顕微鏡観察による結果でも、弾性線維蛋白質との特異的な相互作用が確認されているカルシウムイオン⁶⁾でさえ、一般的な効果を示すに止まった。遷移金属イオンも基本的には同様の効果を示すが、Fig. 6の濁度測定の結果に示されている様に、亜鉛イオンを例外として、相分離開始温度を上昇させる効果が強く、特に、銅イオンとランタンイオンでは100℃付近に至って相分離が開始される系が見られた。これらの特異な作用を示す金属イオンについて、ポリペプチドのCDスペクトル、NMRスペクトル、更に遷移金属イオンのESRスペクトルの測定を行い、弾性線維蛋白質との相互作用について検討したところ、以下に述べる様な結果が得られている。

生体由来の α -エラスチンはポリアラニン部位に基づく α -ヘリックス構造も含んでいる事からも、CDスペクトルやNMRスペクトルから、各種金属イオンの結合による蛋白質の構造変化を精度良く測定するには問題点がある。一方、ポリペプチドを用いた測定の場合は、金属イオンの結合部位はペプチド骨格カルボニル酸素に限定される事になるが、ペプチド繰返し配列特有の β -スパイラル構造形成の程度を定量的に測定する事が可能となる。ところで、アミノ酸残基のカルボキシル酸素への金属イオンの結合は、一般的に塩溶・塩析効果として扱える範囲であり、相分離開始温度の上昇や下降を除けば、臨界濃度の変化等、自己集合組織化の基本的機構に影響を与えないと考える事が出来る。⁷⁾従って、これらのポリペプチドを用いた測定は、骨格ペプチドカルボニル酸素へ選択的特異的に結合し得る金属イオンを選別し、弾性線維蛋白質の自己集合組織化過程をより詳細に検討する手掛かりを与える事になる。

CDスペクトルとNMRスペクトル測定の結果は、ペプチド骨格カルボニル酸素への結合により β -スパイラル規則構造を最も効率良く壊すのはランタンイオンで、Va-Pro-Gly-Val-Gly ペプチド配列当り、最大2個のランタンイオンが結合すると思われる。カルシウムイオンのペプチド骨格への結合は濃度依存的に進行し、 β -スパイラル構造を破壊する。他のイオンについては、ペプチド骨格カルボニル酸素への結合と β -スパイラル構造への影響は限定的である。動物実験レベルであるが、ランタンイオンはカルシウムアンタゴニストとして実験的動脈硬化症の抑制に有効であるとされている。2つのイオンと弾性線維蛋白質との相互作用の違いについては更に検討する必要がある。

銅イオンについては、ペプチド骨格への結合、規則構造の破壊共に顕著ではないが、 α -エラスチン-水系でのESRスペクトル測定の結果、アミノ酸残基の側鎖カルボキシル酸素を介して四面体配位結合を形成している事を示す結果が得られた。 α -エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションに対する銅イオンの濃度依存性に不連続な部分がある事や、銅イオン共存下で観察されるマイクロコアセルベート液滴の個数が、他の金属イオンに比して極端に少ない事等、弾性線維蛋白質と銅イオン間の特異な相互作用を示唆する現象が多数観測されており、詳細な検討を行う必要がある。

3.4. 原始生命組織体モデルとしてのエラスチンマイクロコアセルベート

弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションにより分離生成したマイクロコアセルベート液滴は、想像以上に安定である。 α -エラスチン濃度0.1~0.8 mg/mlの水溶液では、温度が22~30℃で、マイクロコアセルベート液滴は5日間安定に存在し、液滴の融合は観察されなかった。高 α -エラスチン濃度の系やバイノーダル温度以上の系に於ても、コアセルベート液滴の安定性は維持され、カバーガラス面への吸着は散見されても、実験の全過程で、エラスチンコアセルベート液滴同志の融合を捉えた顕微鏡画像は観測、記録されていない。

エラスチンコアセルベート液滴の安定性は、遷移金属イオン共存下で増強される。一般的に相分離開始温度が上昇して高温での安定性が増すばかりではなく、無塩系や他の金属イオン共存下では、淡黄色の粘稠で透明なマクロコアセルベート下層を平衡液上層から分離抽出可能な~100mg/mlの高濃度条件下でも、銅イオン或いはランタンイオン共存下ではマイクロコアセルベート液滴が安定に存在し、マクロコアセルベート層の分離が阻止される現象が観察される。

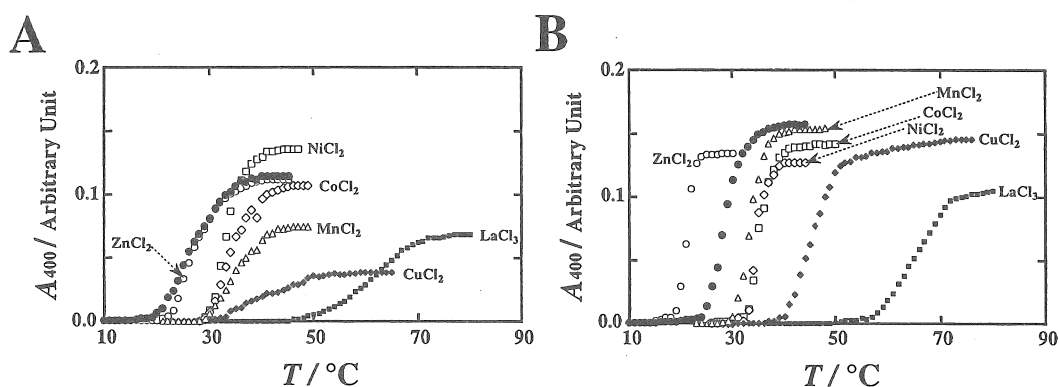


Fig. 6. Effects of 10 mM transition metal chlorides on the temperature profiles of turbidity formation of bovine neck ligament α -erastin-water system at 400 nm wave length. α -Erastin concentration: A, 0.11 mg/ml; B, 0.4 mg/ml. ●: salt-free, Δ : MnCl_2 , \diamond : CoCl_2 , \square : NiCl_2 , \blacklozenge : CuCl_2 , \circ : ZnCl_2 , \blacksquare : LaCl_3 .

生命組織体モデルとして備えるべき条件の中に、より高次の構造形成への可能性があるか否かも重要である。今まで述べて来た様に、通常観察されるエラスチンコアセルベートは球状集合組織体であるが、紐状集合体が観察される事がある。紐状エラスチンコアセルベートは長さ5～10 μm に達し、幅はコアセルベート液滴の直径に対応する大きさであるが、先にも述べた様に、球状コアセルベート液滴の会合で形成されるのではなく、相分離開始温度に達したときに、球状液滴に混在して観察される。 α -エラスチン、ポリペプチド系で共に観察されるが、 α -エラスチンの添加塩系では、特定の α -エラスチン濃度と金属イオンで観察される傾向があり興味深い現象である。紐状コアセルベートの形成条件の探索や、一般的な界面活性剤や合成高分子系で扱われている紐状集合体や高次構造集合体との関連等についても検討を進めている。

4.今後の課題

各種金属イオンが弾性線維蛋白質エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションに及ぼす作用を明確にするために、金属イオン共存下での相図を確定する事が必要である。エラスチン上の2つの金属イオン結合部位の中で、アミノ酸残基の荷電性側鎖のカルボキシル酸素への結合は、銅イオンを除いて、言わば非特異的な相互作用であるが、もう一つの金属イオン結合部位であるペプチド配列、Val-Pro-Gly-Val-Gly、の骨格カルボニル酸素への結合は高選択特異的であり、現在のところ、カルシウムイオンとランタンイオンのみが結合し得る事を見い出しており、その結合は弾性線維蛋白質の構造に大きな影響を与えており、弾性発現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と特定の分子機序を明らかにする手掛かりとなる可能性がある。

5.参考文献

- (1) 例えば、R. Monastersky and O. L. Mazzatenta, *Natl. Geograph.*, **193-3**, 54 (日本語版、**4-3**, 88) (1998).
- (2) H. Yanagawa, Y. Kobayashi, and F. Egami, *J. Biochem.*, **87**, 359, 855 (1980).
- (3) 甲斐原梢, ソルト・サイエンス研究財団平成5年度助成研究報告書II, 243 (1995).
- (4) K. Kaibara, K. Okamoto, and K. Miyakawa, in: "New Functionality Materials, Volume B: Synthesis and Function of Biofunctionality Materials", (T. Tsuruta, M. Doyama, M. Seno, Y. Imanishi [editors]), Elsevier Science Publishers B. V., 281 (1993).
- (5) K. Miyakawa, M. Totoki, and K. Kaibara, *Biopolymers*, **35**, 85 (1994).
- (6) K. Kaibara, Y. Akinari, K. Okamoto, Y. Uemura, S. Yamamoto, H. Kodama, and M. Kondo, *Biopolymers*, **39**, 189 (1996).
- (7) T. Watanabe, K. Kaibara, K. Miyakawa, K. Okamoto, and M. Kondo, *Peptide Science* 1998, 477 (1999).

**Searching for Prebiotic Organizations
in Primordial Sea Medium Enriched by Transition Metals
-Mechanisms of Self-Assembly of Elastomeric Proteins by Transition Metal Chlorides-**

Kozue Kaibara

Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University

Summary

Molecular assembly process of tropoelastin in extracellular crevice is thought to be a key step of the elastogenesis to establish the structural basis of multiple functions of elastomeric protein as an extracellular matrix. In three major components constructing arterial wall such as vascular smooth muscle cell, collagen, and elastin, only elastin is responsible for the generation of normal internal vascular pressure. It was reported, on the other hand, that the formation of particles containing elastin-like cross-linked polypeptides are observed by prebiotic chemical experiments in primordial sea medium enriched by transition metals. These molecular self-assembly processes in extracellular space and in simulated primordial conditions can be mimicked by the temperature-dependent coacervation of elastin-related polypeptides, such as tropoelastin, α -elastin, and model polypeptides with specific repeating amino acid sequences.

Phase diagram with lower critical solution temperature characterizing the temperature-dependent coacervation of bovine neck ligamental α -elastin-water system was obtained based on the light scattering photometry and phase contrast microscopy. Hydrodynamic analysis of elastin coacervate assemblies as a scattering particle and computational particle image analysis for microcoacervate droplets demonstrated that two types of dynamic processes characterizing the critical and off-critical self-assembly processes of the elastomeric protein-water system. Temperature-dependent coacervation experiments utilizing more hydrophobic elastin model polypentapeptides and α -elastin with coexisting metal cations suggested that the fast and slow processes are based on the fundamental hydrophobic interactions and supplemental electrostatic interactions of charged amino acid residues, respectively. Effects of metal cations on the temperature-dependent coacervation of elastomeric protein-water system were examined also by CD and NMR spectroscopic investigations. Interactions between metal cations and carboxyl groups of amino acid side chains only caused simple and nonspecific effects such as salting-in and salting-out mechanisms. Highly specific and selective binding of Ca^{2+} and La^{3+} ions to peptide backbone carbonyl groups, on the contrary, induced significant effects on β -spiral structure and molecular self-assembly process. Cu^{2+} ions, incapable of binding to peptide backbone carbonyl groups, also revealed important effects on the coacervate formations probably based on the formation of coordinative complex with side chain carboxyl groups.