

助成番号 9944

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  
-剪断応力場における組織体形成とマトリックス誘導トランスロケーション-

助成研究者：甲斐原 梢（九州大学 大学院理学研究科）

弾性線維蛋白質エラスチンは、アラニン、グリシン、バリン、プロリンでアミノ酸組成の80%以上を占め、胎生初期に出現して機能を発揮する等、原始的な蛋白質としての特性を有し、最大の特徴は、水溶液の温度上昇に伴い相分離現象、コアセルベーションが誘起される事である。本研究の基礎は、弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションの特性を明らかにすると共に、液-液2相分離過程に伴い形成される自己集合組織体の構造、物性、機能を明らかにし、原始生命組織体モデルとしての可能性を検討する事にある。温度上昇に伴うエラスチンコアセルベートの形成は、血管平滑筋等の細胞外間隙で進行するエラスチン生合成過程と基本的に等価であると考え事が可能であり、本研究は、動脈血管壁弾性や動脈硬化の分子機序の解明、人工血管材料等の生体機能性材料創製とも深く関わっている。

弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションは、基本的に疎水性相互作用に基づいている。一方、陽イオン性高分子電解質であるポリ塩化ジメチルジアリルアンモニウムとウシ血清アルブミンは、静電的相互作用に基づいてコアセルベートを形成する。2つの系についての比較から、蛋白質が関与する自己組織体の形成を支配する疎水性相互作用と静電的相互作用について考察した。又、剪断応力は、太古の海洋中や細胞外間隙での蛋白質の自己集合組織化に影響を与える要素と考えられる。球状のエラスチンコアセルベートと共に観察される紐状コアセルベートの形成も、剪断応力が分子集合過程の重要な因子である事を示唆している。倒立型位相差顕微鏡と、光学的に透明なコーン・プレート型アタッチメントを装着した回転粘度計を組合わせて、粘弾性位相差顕微鏡を製作した。この装置を用いる事により、粘度測定とコアセルベート液滴の顕微鏡観察を同時に行う、或いは、剪断応力を変化させながら顕微鏡観察を行う事が可能となる。光散乱測定や通常の位相差顕微鏡観察に基づいて求めた下部臨界共溶温度型の相図に比較すると、剪断応力下では相分離開始温度が上昇するものの、臨界濃度の変化は見られなかった。マトリックス構造型性を有する媒質中で、細胞や相当する大きさの粒子の移動が促進される興味深い現象は、マトリックス誘導トランスロケーションと呼ばれる。この現象について、エラスチンコアセルベート中のラテックス粒子の移動、拡散についても検討した。



助成番号 9944

## 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 -剪断応力場における組織体形成とマトリックス誘導トランスロケーション-

助成研究者：甲斐原 梢 (九州大学大学院理学研究科)

### 1. 研究目的

太古の地球上に生まれた最初の生命について探る試みは、多くの研究者の様々な分野での、長年に渡る挑戦にも拘わらず、40億年以上を遡った地球上で何が起こったかを明らかにする事は容易ではなく、結論を得るには程遠い状況となっている。<sup>1)</sup> 地球上の生命の端緒に繋がる生化学的变化は、核酸を主役としてRNAワールドで生み出されたとの提案も行われているが、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については、太古の海洋中での、化合物の離合集散と化学変化の結果として生み出されたであろうとの予測を除けば、多くの化学進化実験を始めとする研究にも拘わらず、明らかにはなっていない。原始生命体を生み出した、いわゆる原始のスープのレシピーについても多くの提案がなされ、ポリペプチドを始めとする種々の生体機能分子の形成の可能性と、分子集合体形成過程について検討されている。

我々の、この研究課題に対する弾性線維蛋白質エラスチンを用いたアプローチは、次の様なものである。<sup>2,3)</sup> 弾性線維蛋白質エラスチンのアミノ酸組成は、アラニン、バリン、グリシンを多量に含んでおり、又、胎生初期に合成され機能を発揮し始める事から、言わば原始的な蛋白質と見なす事が出来る。化学進化実験によっても、単純な化合物から、エラスチン類似の架橋を有するポリペプチドが生成する事が報告されている。この様な背景を基に、弾性線維蛋白質エラスチンの最大の特徴である温度依存性コアセルベーションについて、金属イオン共存下、特に現代の海洋に比して太古の海洋成分に豊富に含まれていたとされる遷移金属イオン共存下での特性を検討している。単純なアミノ酸組成と配列からなる蛋白質やポリペプチドを用いて、分子集合特性と機能、更に、生体機能発現の基礎となる構造形成についての研究は、原始細胞モデルとしての取扱ばかりではなく、生体機能材料として、人工生体弾性線維や人工血管材料としての可能性を探る上でも有用な研究対象となる。加えて、弾性線維蛋白質エラスチンは、大動脈壁構築弾性素材として主要な機能を果たしている事が知られており、本研究は、未だ不明な点が多い生体弾性発現機構や動脈硬化の分子機序と関連し、日本の高齢化社会が直面する加齢、老化に伴う循環器疾患の増加等、早急な解決が要請されている課題に対して、幾許かの寄与をし得る

ものと考えている。

弾性線維蛋白質エラスチンは、同じく細胞外マトリックス構成成分としてのコラーゲンについて、生体中に多量に存在する蛋白質である。エラスチンの構成アミノ酸の80%以上を占めるアラニン、バリン、グリシン、プロリンは、ポリアラニンや特徴的な繰返し配列を有するブロック共重合ポリペプチドを形成している。前駆蛋白質トロポエラスチンのポリアラニン鎖に挿入されているシステインは、酵素による酸化的脱アミノ反応により、4分子からイソデスモシン等の特有な架橋アミノ酸を生じ、分子内或いは分子間架橋を形成する事で、エラスチンに、他の蛋白質にはない、熱、アルカリに対する強固な耐久性を付与している。これ以外にエラスチンを構成している、テトラ (Val-Pro-Gly-Gly)、ペンタ (Val-Pro-Gly-Val-Gly)、ヘキサ (Ala-Pro-Gly-Val-Gly-Val) ペプチド配列等を基とする繰返しペプチド配列部位は、ブロック共重合モデルポリペプチドを用いた研究から、エラスチンの弾性機能、細胞遊走特性等の、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見なす事が出来る。<sup>4)</sup> これによると、エラスチンの最も重要な機能である弾性機能発現については、 $\gamma$ 線照射によりポリペンタモデルペプチドから得られる人工弾性線維のみが、生体弾性組織由来標本に相当する弾性機能を示す事から、ペンタペプチド配列部位が最も重要な機能を果たしていると考えられる事が出来る。同様にモデルポリペプチドを用いた研究で、細胞遊走特性を有するポリヘキサペプチドは水溶液の温度上昇と共に沈澱を形成するのに対して、ポリペンタペプチド及びポリテトラペプチドは、温度上昇と共に、ポリペプチドが高度に濃縮されたコアセルベート相とペプチドを殆ど含まない平衡液相への、液-液2分離が誘起される。

一連の研究では、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について、様々な観点から検討し、液-液2相分離を伴い形成される自己集合組織体の構造と物性を明らかにし、多様な生体機能発現の基盤として理解する事を目指す。コアセルベーションの概念は古くから取り上げられ<sup>5)</sup>、オパーリン以来の原始生命体のモデルとしても依然として興味深いものであるが、不明な点も多い。弾性線維蛋白質エラスチンは、動脈壁構成成分として唯一、正常血管内圧の発生と維持に重要な機能も果たしているが、我々は、弾性線維蛋白質エラスチンを多様な側面を有する研究対象として捉え、原始細胞モデルから動脈硬化や循環器疾患に関わる生体機能高分子としての特性、更に、生体機能材料への展開まで興味深い結果を得て来た。本研究では、弾性線維蛋白質の自己組織化過程への剪断応力の影響を調べる事で、特異な環境下での原始生命組織体や生体機能分子の集合過程、血管平滑筋の微細な間隙中で進行するエラスチンの生合成過程について、重要な知見を得る事も目的としている。マトリックス様構造を有する媒質中では、細胞や粒子の運動が促進されるマトリックス誘導トランスロケーションと呼ばれる現象が見られる。<sup>6)</sup> エラスチンコアセルベート中での同様の現象の解析は、原始生命組織体の挙動や、血管動脈壁の構築と機能発現に有用な知見が得られる事が期待される。

## 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溶解性に乏しい蛋白質であり、弾性組織の熱アルカリ処理残渣として抽出される程である。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 $\alpha$ -エラスチンを用いた。各種測定に主として用いたウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチンは、米国Elastin Products社から購入した試料を用いた。前節で述べたブロック共重合型エラスチンモデルポリペプチドについては、九州工業大学情報工学部岡元研究室より提供を受けたVal-Pro-Gly-Val-Gly配列に基づくポリペプチド、H-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>-Val-OMe (n $\geq$ 40)、を用いた。 $\alpha$ -エラスチン、ポリペプチド共に、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、0～1.0℃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を得る事が可能である

今回、球状蛋白質ウシ血清アルブミンと陽イオン性高分子電解質が、水溶液中で形成するコアセルベートについても検討を行い、弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションとの集合体形成機構の比較を行ったが、用いたポリ塩化ジアリルジメチルアンモニウム (PDMDAAC、分子量 $1.5 \times 10^5$ ) は代表的な水処理用高分子であり、東亜合成株式会社より提供された試料を用いた。後述する様にウシ血清アルブミン-PDMDAAC-水系では、静電的相互作用に基づくコアセルベーションがpH変化によって誘起されるので、酸性試料溶液にアルカリを滴定する事でpHを上昇させ、溶液の変化を追跡した。

### 2. 2. コアセルベート形成過程の観察と解析：光散乱測定と位相差顕微鏡観察

弾性線維蛋白質-水系のコアセルベート形成過程は、従来手法に従い、光散乱測定法と位相差顕微鏡観察法により検討を行った。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エラスチンコアセルベートの形成については、各条件下での相図作成を念頭に実験を行った。光散乱測定は、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行った。顕微鏡観察については、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（オリンパス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モニタ上で観察倍率1050～4200倍で観察した。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、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。更に、エラスチンコアセルベート中の細胞様粒子としてラテックス粒子（～1ミクロン）の挙動を観察し、マトリックス構造との相互作用により、粒子の特異な運動が誘起されるかについて検討した。

一方、ウシ血清アルブミン-PDMDAAC-水系のコアセルベート形成については、滴定容器中の試料溶液をペリスタルティックポンプにより数秒以内に光学セルに導き、分光光度計により濁度、蛍光分光光度計により散乱光強度を連続的にモニターすることでコアセルベート形成過程を追跡した。滴定試料溶液は同時に、エラスチンの場合と同様のカバーガラス製顕微鏡観察用装置に送られ、連続的な顕微鏡観察を行った。又、この系では、アンモニウムイオンの陽電荷が並んだPDMDAACの鎖に、球状のウシ血清アルブミンが結合して形成されるコアセルベート粒子が、pH変化に対して回転楕円体型液滴や固体沈澱等への形態を変化させる過程に注目した観察を行った。

2. 3. 粘弾性位相差顕微鏡の製作と特異な環境下でのコアセルベーションの観察  
弾性線維蛋白質-水系については、コーン・プレート型回転デジタル粘度計（トキメック DVM-EII）を用いて、ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の粘度の温度変化を測定し、温度依存性コアセルベーションに対する剪断応力の影響を検討した。

剪断応力の影響をより詳細に研究する目的で、回転粘度計と倒立型位相差顕微鏡を組み合わせ、粘弾性位相差顕微鏡を製作した。赤血球の変形能を研究する目的で最初に導入され、光学的に透明なコーン・プレートアタッチメントを装着した回転粘度計と顕微鏡を組み合わせ装置<sup>7)</sup>はレオスコープと呼ばれ、基本的に同じ装置がポリマーアロイのマイクロ相分離の研究にも適用されている。この手法を弾性線維蛋白質-水系の温度依存性コアセルベーションの研究に用いる場合、大きさも数マイクロンに達し観察が容易な赤血球やコントラストの高いポリマーのマイクロ相分離構造の観察に比して、より厳密な位相差光源の設定等、注意すべき点が多くなる。粘弾性位相差顕微鏡の製作組立ての詳細については、次節で述べる。

### 3. 研究結果と考察

#### 3. 1. コアセルベート形成に及ぼす疎水性相互作用と静電的相互作用の影響

様々な分子の自己集合組織化を誘起している力が何かを評価する場合、温度依存性の有無は、疎水性相互作用の関与と、その程度を判断する有用な指標となる。弾性線維蛋白質-水系の場合、コアセルベーションが温度依存性である事自体が、疎水性相互作用による弾性線維蛋白質の集合組織化の基本的な要因であることを示している。更に、アミノ酸組成の変化によって疎水性の程度が異なる一連のエラスチンモデルポリペプチドを用いると、疎水性の程度に応じてコアセルベーションが促進される。Fig. 1には、ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の温度上昇によりコアセルベーションが誘起されると共に、動的散乱測定から求まる自己集合組織体の様々な物性値が変化の様子が示されている。

一方、疎水性相互作用ではなく、静電的相互作用によってコアセルベーションが誘起され分子集合組織体が形成される系に於いては、温度変化はどのような効果を示すであろうか。陽イオン性の高分子電解質PDMDAACとウシ血清アルブミンが塩水溶液中でコアセ

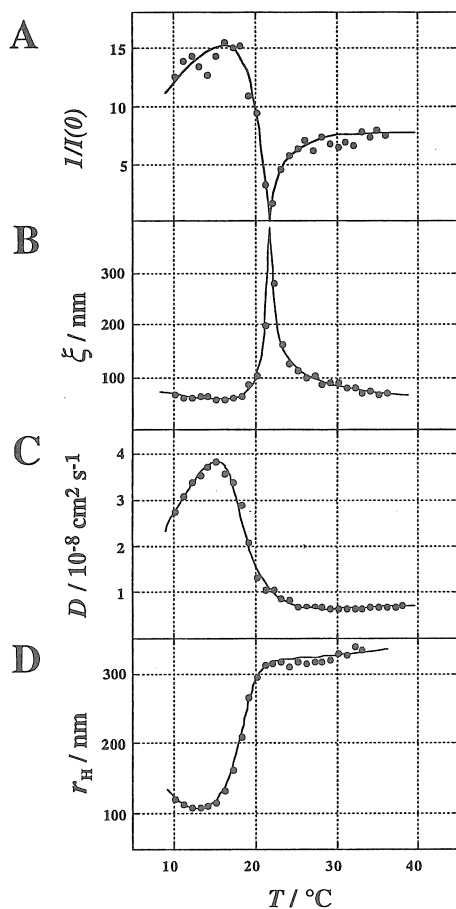


Fig. 1. Temperature-dependent changes in Physicochemical quantities characterizing the coacervation process at critical concentration of bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin, 0.11mg/ml, estimated by a dynamic light scattering experiments.

A: Inverse of the forward scattering intensity,  $I(0)$ , estimated by  $I(q)$  values at scattering vector  $q$ .

B: Correlation length of fluctuations of concentration,  $\xi$ , estimated based on the Ornstein-Zernike-Debye relation.

C: Apparent diffusion coefficient,  $D$ , estimated from the correlation function of the scattered electric field,  $g(\tau)$ , analyzed by cumulant expansion up to second order.

D: hydrodynamic radius,  $r_H$ , estimated based on the Stokes-einstein relation.

See Ref. 9 for details in calculations of respective physicochemical quantities and light scattering experiments.

ルベートを形成する過程は、アルブミンの等電点以下のpHに調整した試料溶液をアルカリで滴定し、pH上昇に伴う濁度と散乱光強度、更に、顕微鏡画像を連続的にモニターする事で明らかになる。<sup>8)</sup> その結果はFig. 2の様に、特定のpHで前駆的集合体の形成やコアセルベート液滴形成が起こる事を示している。アルブミンの等電点に近い $pH_{crit}$ で、前駆的複合組織体の形成が始まり、散乱光強度が増加するが溶液は依然として透明である。滴定の進行によりpHの上昇と共に散乱光強度が増加し、pHが $pH_{\phi}$ に達した時点で、散乱光強度は極大値をとり、同時に、複合体の荷電が中和された状態でコアセルベート液滴の形成が誘起され、濁度が急激に増加する。位相差顕微鏡の画像は、Fig. 2中の点A及びBでは視野に粒子が認められないが、点Cでは大きさの揃った球形のコアセルベート液滴が観測される。更に滴定を進めると、点Dで液滴の大きさや形が変化する $pH_{morph}$ 、更に点Eでは沈澱が生成する $pH_{precip}$ に至る。

アンモニウム基が並んだPDMDAAC鎖上に、球状蛋白質アルブミンが結合した複合体の、特定の荷電状態での $pH_{crit}$ と $pH_{\phi}$ は、Fig. 3に示した様に、アルブミンの熱変性が起こる60°C付近以下では全く温度の影響を受けない。この結果は、ウシ血清アルブミンと陽イオン性高分子電解質PDMDAAC間の相互作用と、それに基づくコアセルベーションは静電

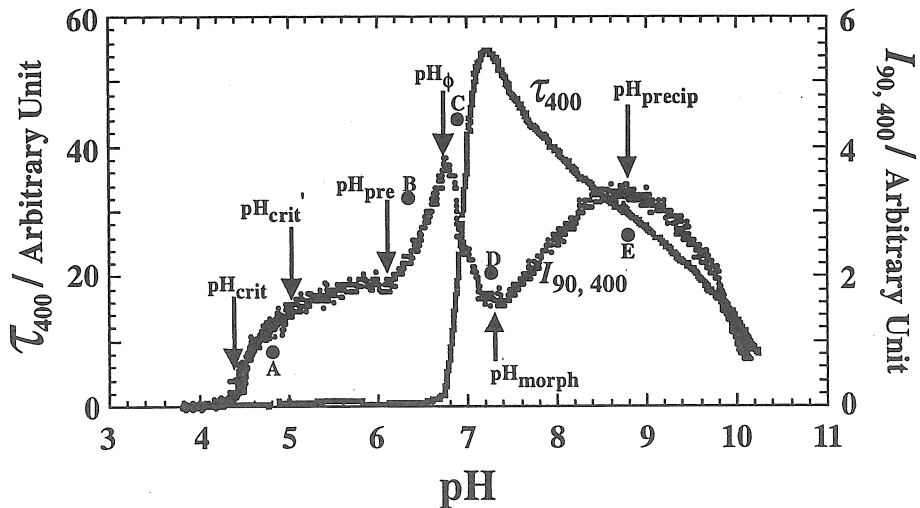


Fig. 2. Typical pH profile of turbidity,  $\tau_{400}$ , and scattering intensity,  $I_{90,400}$ , at 400 nm wavelength for test solution with bovine serum albumin (BSA) concentration of 0.60g/L, BSA/PDMDAAC weight ratio of 22.4, and NaCl concentration of 100 mM at 25°C. Arrows indicate specific pH points such as  $\text{pH}_{\text{crit}}$  and  $\text{pH}_{\phi}$ . Black dots identified by A-E refer to the where the phase contrast microscopic images are taken.

的相互作用のみで支配されていると考えて良い事を示している。温度上昇によって分子の自己集合とコアセルベーションが誘起される弾性線維蛋白質-水系では、荷電を有する $\alpha$ -エラスチン系でも荷電を持たないポリペンタモデルペプチド系でも、疎水性相互作用が相変化の本質的な駆動力となっている。勿論、 $\alpha$ -エラスチン系の等電点から離れたpHでは、一般的な場合と同様、分子内の荷電の釣合いが崩れてコアセルベーションが抑制される。しかし、ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチンの臨界点近傍での早い分子集合過程は、共存塩の影響を殆ど受けず、一方、臨界領域から充分に離れている場合の緩徐な分子集合過程は、静電的な荷電遮蔽効果により、臨界領域と同様の疎水性疎水性相互作用に基づく

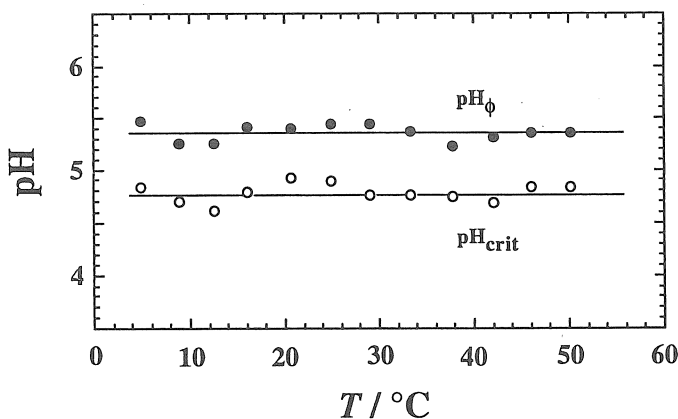


Fig. 3. Temperature independence of  $\text{pH}_{\text{crit}}$  and  $\text{pH}_{\phi}$ . At temperature above the heat denaturation point of bovine serum albumin. These pH values changed considerably.



早い集合過程へと変化する。<sup>3, 9-11)</sup> ポリペプタモデルペプチドでは荷電性側鎖がないために、添加塩の効果は、静電的相互作用によるものではなく、特定の金属イオンとの選択的相互作用等に起因するものである。これらの結果は、弾性線維蛋白質-水系は疎水性相互作用、PDMDAAC-アルブミン-水系は静電的相互作用が、各々、最も典型的に分子の自己集合挙動を支配している系であることを示しており、言わば、標準的な基準として扱える事も示している。その指標は自己組織化過程への温度の影響の評価である。

### 3. 2. 紐状コアセルベート集合体の形成と剪断応力下での自己組織化

弾性線維蛋白質-水系のコアセルベーションでは、通常の球状のマイクロコアセルベート液滴と共に、紐状の集合組織体が位相差顕微鏡の視野に捉えられる機会がある事については既に報告した。<sup>3)</sup> 分子集合体が、より高度の集積、集合状態をとる事については、リン

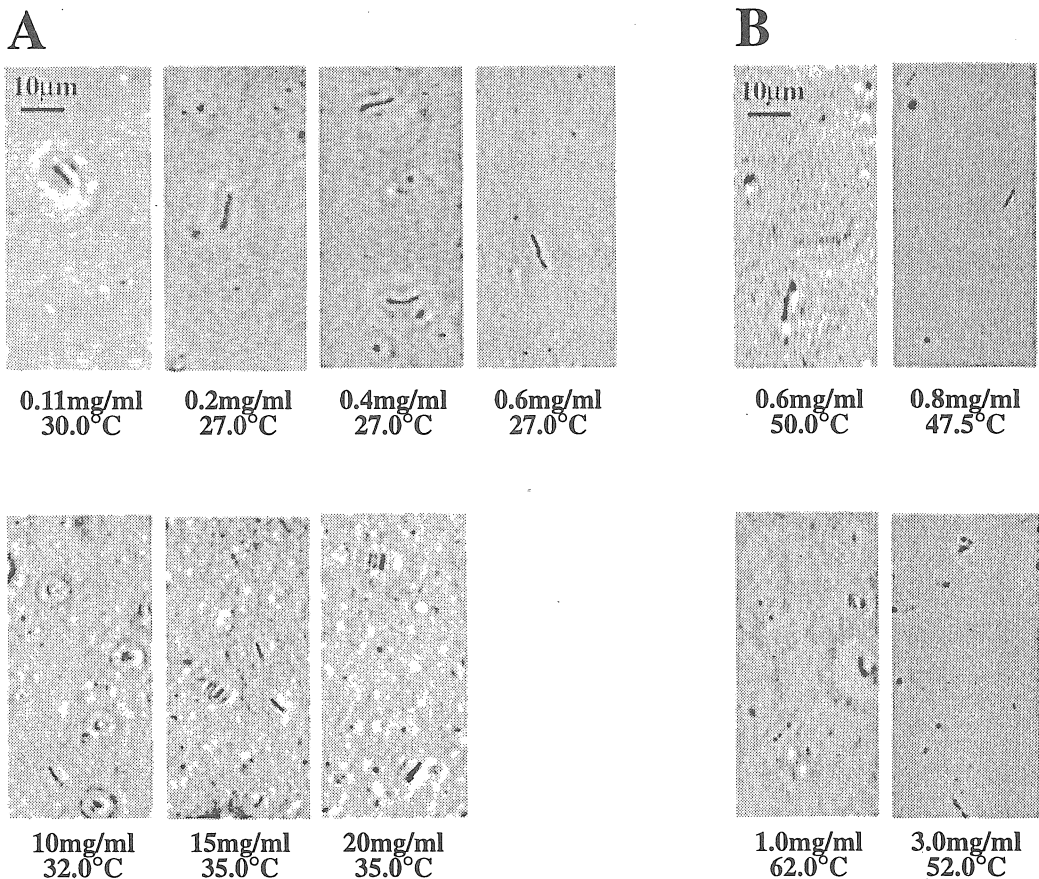
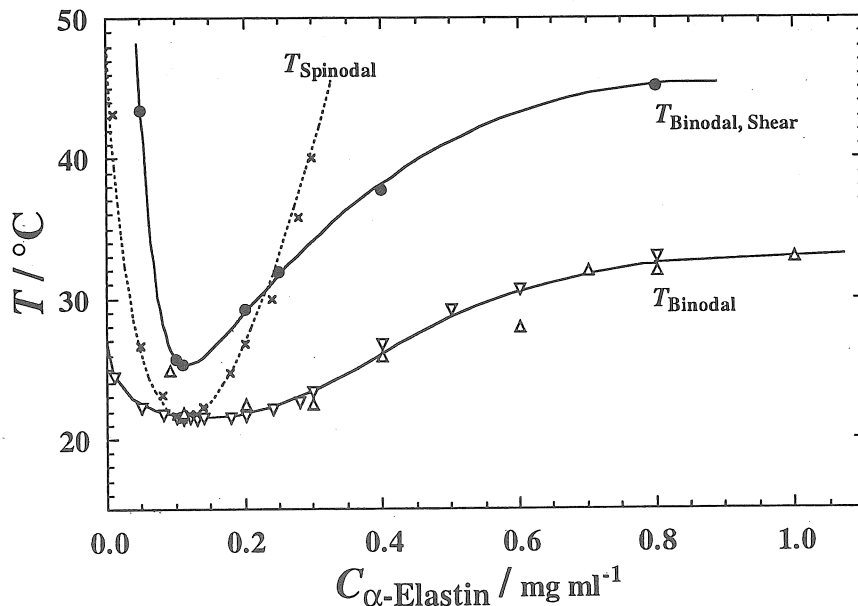


Fig. 4. Phase contrast microscope images showing the appearances of elongated aggregates in the bovine neck ligament  $\alpha$ -elastin-water system (A) and polypentapeptide, (Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>, -water system (B). Scale bar: 10 $\mu$ m. Each images were taken under conditions with denoted concentrations and temperatures.



**Fig. 5.** Phase diagram of the bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin-water system. Binodal ( $\nabla$ ) and spinodal ( $\times$ ) temperatures were estimated by static and dynamic light scattering measurements. Binodal temperature ( $\Delta$ ) was estimated also by phase contrast microscopic observation. Binodal temperature ( $\bullet$ ) under shear stress was estimated by viscosity measurements and microscopic observations utilizing with a phase contrast rheoscope.

脂質小胞体や界面活性物質の各種ミセルとラメラ構造体についても、活発な研究が行われている。生命組織体モデルが備えるべき条件としても、より高次の構造形成への可能性を持つ事は必須であり、機能性材料創製への展開を図る上でも重要である。Fig. 4は、ウシ項韌帯 $\alpha$ -エラスチン及びポリペンタペプチド系で捉えられた、紐状コアセルベート集合体の画像の例を示している。長さ5~10 $\mu$ m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の紐状集合体が、球状液滴と共に存在している。紐状コアセルベート集合体が形成される条件を特定するには至っていないが、球状液滴の会合で形成されるのではなく紐状前駆集合体が形成される可能性、観察データの蓄積と共に、特定の濃度領域や特定の塩共存下で紐状コアセルベート形成の確率が高い事等が示されつつある。

紐状集合体の存在は、溶液粘度に大きな影響を与える事になる。Fig. 5にはウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチン-水系の、既に特定していた臨界点付近の相図に、粘度測定及び次節で述べる粘弾性位相差顕微鏡を用いた観察による、剪断応力存在下での2相共存温度をプロットしてある。剪断応力存在下で、臨界点等、基本的な分子の自己集合挙動は変化していないものの、相分離温度には顕著な上昇が見られる。紐状コアセルベートを含め、剪断応力が加わる事で、疎水性相互作用に基づく分子集合挙動は抑制されている。

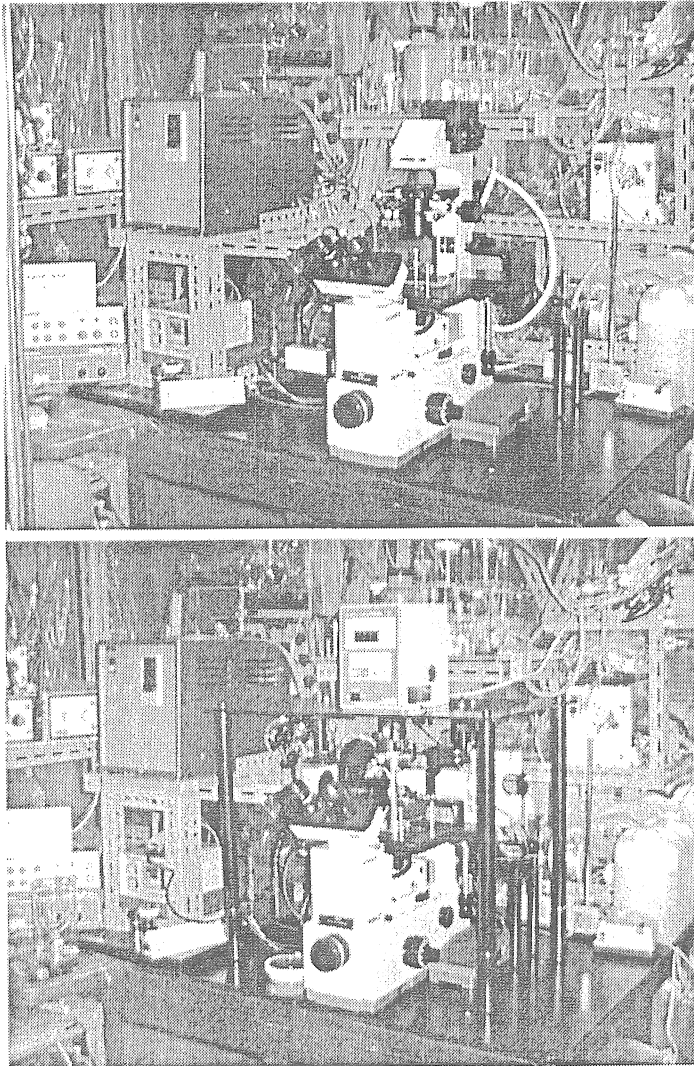


Fig. 6. Experimental setup for the normal phase contrast microscopic observations (upper frame) and setup converted for the rheoscopic observations connecting an inverted phase contrast microscope with a micro rotary viscometer equipped with a optically transparent cone-plate attachment (lower frame).

Phase contrast light source parts, originally donfigured vertical arrangement, are transformed to vertical configuration to reserve space for the viscometer head and shaft. In rheoscopic observations, sample is illuminated by phase contrast light source through a prism or mirror.

### 3. 3. 粘弾性位相差顕微鏡の製作と機能性分子の自己組織化研究への応用

エラスチンコアセルベート形成に対する剪断応力の影響を定量的に検討し、同時に、原始生命体が形成された太古の海洋内の過酷な環境、更に、弾性線維蛋白質が合成され機能する血管平滑筋細胞間隙の環境を再現する目的で、粘弾性位相差顕微鏡を製作した。倒立型位相差顕微鏡の位相差光源部を支えている柱状部分を取り外し、水平な台上に固定する。回転粘度計に光学的に透明なアクリル樹脂製の角度0.8度のコーンを取り付け、中心軸を対物レンズの光軸から僅かに偏心させて、顕微鏡のステージ上に固定する。観察試料をコーン・プレートの間隙に注入し、プリズム或いは反射鏡を介して直角に曲げた光源からの光で照明して観察する。観察結果の一部は、Fig. 5の相図作成に用いた。類似の装置が用いられている赤血球やポリマーアロイ試料は、試料自体が媒質に対して高いコントラストを示し観察対象が大きい事に比して、弾性線維蛋白質-水系ではより厳密な光源部の調整や一部改良が必要であるが、特異な環境下での蛋白質の自己組織化過程を研究

する有用な装置となった。マトリックス誘導トランスロケーションの研究では、 $\alpha$ -エラスチン水溶液中と構造化媒質としてのエラスチンコアセルベート中で、ラテックス粒子の運動が如何に異なるか測定する。温度上昇に伴うラテックス粒子の移動速度上昇分を見積もる必要があるが、適切な基準となる測定の設定に再検討を要する。現在の処、 $\alpha$ -エラスチン水溶液とエラスチンコアセルベート中のラテックス粒子の移動速度の変化と、対応する温度の塩溶液中での数値を比較する段階であり、結論は得られていない。

#### 4. 今後の課題

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ついて、種々の手法を適用して研究を継続している。多くの有用な知見を得て来たが、中心的な研究課題である弾性線維蛋白質と各種金属イオンの相互作用については、多様な側面を有する研究対象として、原始生命体モデルとしての可能性と、生理機能や物理化学的なイオン選択的相互作用とを矛盾なく関連づける事が必要である。粘弾性位相差顕微鏡を用いた研究は、生体機能分子の自己集合組織化過程に対する剪断応力の影響を評価する有力な手法である。媒質とのコントラストの低さ等、エラスチンコアセルベート液滴の観察し難さを克服する機器の改良と共に、実験手技の改善が必要と思われる。

#### 5. 参考文献

- (1) R. Monastersky and O. L. Mazzatenta, *Natl. Geograph.*, **193-3**, 54 (1998).
- (2) 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).
- (3) 甲斐原梢, ソルト・サイエンス研究財団平成10年度助成研究報告書Ⅱ, 243 (1999)
- (4) D. W. Urry, *Methods Enzymol.*, **82**, 673-716 (1982).
- (5) Bungenberg de Jong, In: "Colloid Science", (H. R. Kruit Ed.), Elsevier, Amsterdam, Vol. II, Chapter X (1949).
- (6) S. A. Newman, D. A. Frenz, J. Tomasek, and D. D. Rabuzzi, *Science*, **228**, 885 (1985).
- (7) H. S. Schmid-Schoenbein, R. Wells, and R. Schildkraut, *J. Appl. physiol.*, **26**, 674 (1969).
- (8) K. Kaibara, T. Okazaki, H. B. Bohidar, and P. L. Dubin **1**, 100 (2000).
- (9) T. Watanabe, K. Kaibara, K. Miyakawa, K. Okamoto, and M. Kondo, *Peptide Science* 1998, 477 (1999).
- (10) K. Kaibata, T. Watanabe, and K. Miyakawa, *Biopolymers*, **53**, 369 (2000).
- (11) K. Kaibara, T. Watanabe, Y. Fukumoto, I. Maeda, and K. Okamoto, *Peptide Science* 1999, 263 (2000).

# Searching for Prebiotic Organizations in Primordial Sea Medium Enriched by Transition Metals -Self-Assembly under Shear Stress and Matrix Induced Translocation-

Kozue Kaibara

Graduate School of Sciences, Kyushu University

## Summary

Elastomeric protein, elastin, is thought to be a protein having a kind of primeval characteristics, since more than 80% of amino acid contents are shared with alanine, valine, glycine, and proline, and elastin is biosynthesized and functionalized at early viviparous stages. The most important nature of the elastomeric protein-water system is a temperature-dependent coacervation process. The present investigations are carried out based on the concepts in which the structural basis of self-organized assemblies of elastomeric proteins are established during the process equivalent to the temperature-dependent coacervation. 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,  $\alpha$ -elastin, and model polypeptides with specific repeating amino acid sequences.

Temperature-dependent coacervation of the elastomeric protein-water system is controlled essentially by hydrophobic interactions, whereas in the coacervation of bovine serum albumin (BSA) with cationic poly(demethyl-diallylammonium chloride) (PDMDAAC), electrostatic interactions dominate the process. Key factor to discriminate these interactions is a effect of temperature. In the pH-induced coacervation in complexes of BSA and PDMDAAC, pH points at which primary complex and coacervate droplet formations initiate are clearly temperature insensitive. Shear stress is a possible important factor to control molecular self-assembly processes in a simulated primordial sea medium and in an extracellular space. Phase contrast rheomicroscope was introduced to estimate the shear stress effects on the coacervation of elastomeric protein-water system. The rheomicroscope is composed of an inverted microscope and a rotary viscometer equipped with an optically transparent cone-plate attachment. Rheoscope is able to measure viscosity simultaneously to observe phase contrast image during the temperature-dependent coacervation process. Microscopic observation under regulated shear stress is also available by means of changing rotation rate of viscometer cone. Binodal temperatures for the bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin-water system increased under the effects of shear stress, however the critical concentration in a lower-critical-solution-temperature type phase diagram was unaffected with and with out shear stress. Matrix induced translocation was also examined in a elastin coacervate phase by tracing a movements of latex particles as a cell model particle.