

23

助成番号 0023

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(3)
—原始的蛋白質のイオン選択特異性と自己集合組織体形成—

助成研究者：甲斐原 梢(九州大学大学院理学研究院)

オパーリンが原始生命体モデルとして提案して以来、コアセルベーションは、広く知られる用語となったが、現象については、コロイド物質を扱う科学の揺籃期から研究が行われていた。しかし、現象や系の複雑さ、理論の一般性の問題から、研究の停滞をもたらしていたが、最近、理論から応用に至るコアセルベーションの再評価がされている。本研究は、弾性線維蛋白質-水系のコアセルベーション特性を、原始細胞モデルから、動脈壁構築素材としての構造と機能、更に動脈硬化の分子機序に至る多様な側面を有する研究課題と捉えている。コアセルベート形成に伴う弾性線維蛋白質の自己集合組織化は、原始細胞発生、エラスチン生合成、生体弾性機能の発現と崩壊等に深く関わっている。

ウシ項韌帯由来 α -エラスチンとポリペプタモデルペプチド、(Val-Pro-Gly-Val-Gly)_nを用いた実験の結果は、カルシウムイオンがエラスチンコアセルベートと選択特異的相互作用をする事を示している。一般的な塩溶・塩析効果により、コアセルベート形成が促進される条件下でも、カルシウムは相分離開始温度を上昇させた。C-13ラベルポリペプタモデルペプチドを用いたNMRスペクトルは、カルシウム共存下でのみ3位と5位のGly-残基の化学シフトが大きく変化した。コアセルベート分離層をイオン交換膜として測定を行うと、カルシウムイオンのみがコアセルベート中に濃縮、沈着する傾向が強い事が示された。これらの結果から、弾性線維蛋白質上には2種類の金属イオン結合部位が存在すると結論付けられる。荷電性アミノ酸側鎖のカルボキシル基とペプタモデルペプチド繰返し配列に基づく β -スライラル骨格のカルボニル基である。骨格カルボニルに結合し得る金属イオンを、CDスペクトルによる β -スライラル破壊の程度を指標に探索すると、ランタンイオンの結合が確認された。カルシウムとランタンのエラスチンコアセルベートとの相互作用の相違点は、ランタンは、ペプタモデル骨格に結合しないイオンと同様、下部臨界共溶温度型相分離で臨界濃度を変えず、基本的な自己集合組織化過程には影響を与えないのに対して、カルシウムは臨界濃度を大きく変化させ、 β -スライラル破壊と共に分子集合様式も大きく変えている事にある。この事は、ランタンがエラスチン上へのカルシウム沈着を伴う実験動脈硬化症の改善に有効であるとの報告とも対応する。単純なアミノ酸組成を有する原始的蛋白質と言えるエラスチンで実現されているイオン選択特異性は、原始細胞としての機能から動脈壁弾性に迄関わる、重要な特性となっている。

23

助成番号 0023

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

(3) 一原始的蛋白質のイオン選択特異性と自己集合組織体形成一

助成研究者：甲斐原 梢 (九州大学大学院理学研究院)

1. 研究目的

オパーリンが原始生命体のモデルとして提案した事を契機として¹⁾、コアセルベート或いはコアセルベーションは、科学の領域ばかりではなく、広く知られる用語となったが、その現象自体については、コロイド物質を扱う科学の揺籃期に、コロイド科学の化学的、物理学的基礎を確立しようとする時期から、既に興味をもたれていた。^{2, 3)} 疎水性コロイド溶液の液-液2相分離現象は、高分子物質の分離の様相に関して、単純コアセルベーション (Simple Coacervation) と複合コアセルベーション (Complex Coacervation) に分類され、特に、天然及び化学的修飾を施したゼラチンを含む系の数多くの実験から、詳細な現象論的記述がなされ、更に、pHの影響、共存する無機塩や有機物の効果についても検討が加えられた。これらのコアセルベーションに関する実験結果の解析から、デバイ・ヒュッケル型静電相互作用とフローリー・ハギンス型モデルに基づく、ランダム相モデルと呼ばれる考え方が提出された。⁴⁾ しかし、コアセルベーション現象自体や系の構成が複雑な事、個々の系の特性が顕著に現われるために、一般的な取扱に限界がみられた事に加えて、様々な相分離、相転移現象を一般的に扱う領域や自己組織化過程を扱う研究領域で、殊更にコアセルベーション、即ち、液-液2相分離現象を詳細に議論する必要性も明確にならなかった状況もあり、コアセルベーションに関する研究は、長い間、停滞してしまう事になった。

ところで、最も初期のゼラチンの例も含めて、コアセルベーションの研究対象となって来たのは、生体系そのものや生体分子を主たる構成成分として含む系である。生体系の特徴の一つは、合目的な分子の自己集合組織化であり、コアセルベーションに相当する過程で特定の分子のコンフィギュレーションが規定される事が、各々の生体機能分子の機能発現の基礎となる構造形成の鍵となる例も多い。何らかの理由で、この様な分子のコンフィギュレーションや構造に問題が生じると、直ちに生理的な機能が障害される事になる。眼内レンズ蛋白質クリスタリンが沈澱を生じて白内障となる機序は、最も良く知られた例である。クリスタリン-水系の上部臨界共溶温度型の相図が特定されており、白内障に対応する固体結晶が析出する条件も調べられている。鎌状赤血球症、クリオ蛋白質に関連する疾患も、蛋白質分子の僅かな異常に起因する集合特性や溶解特性の変化が重

篤な病状を引き起こす。。 又、クリオイムノグロブリン複合体の相挙動はリウマチ性、感染性疾患に密接に関連している事も明らかにされて来た。

その後、生体系に於ける生体分子のコアセルベーションについては、赤血球凝集、細胞間相互作用、酵素-基質相互作用、抗原-抗体反応を含む受容体反応機構への関与も注目されるようになった事とも相まって、理論的な取扱についても再検討がなされる様になり、コロイド科学全般に渡っても重要な考え方も提出された。^{5、6)} コアセルベーション再評価の動きは、特に応用分野で著しく、例えば従来から行われていたマイクロカプセル化技術に於いても、単純な薬物内包素材から、より高度な自律機能を組込んだ薬物送達システムとしての展開が図られている。蛋白質-高分子電解質系のコアセルベーション⁷⁾は、蛋白質の分離や精製に有効な手法の一つと認識されている。又、食品化学工業においても、食品成分や香気成分を有効に封じ込めるだけではなく、細胞体や酵素を組込んだ系が開発されているが、コアセルベート中の酵素に通常より高い活性の賦与が可能な事も知られている。様々な人工臓器や医療資材の開発にもコアセルベーションに関する知見は生かされており、細胞接着や生体組織上に人工材料が、言わば、足場を築く過程の解明にも重要な概念となっている。

遷移金属に富む太古の海洋組成を模した媒質中で化学進化実験を行うと、エラストーゼでのみ消化される粒子状構造体が形成され、弾性線維蛋白質エラスチン様の構造を有する原始細胞モデルとして様々な特性を示す事が知られている (Fig. 1C参照)。一方、血管平滑筋細胞や線維芽細胞で合成されるエラスチンの前駆蛋白質トロポエラスチンは、細胞質内では小胞体状の会合体を形成しており、粗面小胞体から吐き出されるトロポエラスチンコアセルベートを含む被覆小胞体は、エクソサイトーシスにより細胞外間隙に放出される。細胞外で特定の集合状態をとったトロポエラスチンは、酵素による架橋反応を受けて、弾性線維の主構成成分であるエラスチンとなり、動脈弾性壁等の生体弾性組織を構築する蛋白質として特異な弾性機能を発揮する (Fig. 1A参照)。即ち、エラスチン生合成のキーステップは前駆蛋白質のコアセルベーションであり、細胞外マトリックスとしての多様な機能の基礎となる構造が形成される。本研究は、原始生命体の有用なモデルとなり得ると同時に、言わば生物個体の寿命を決める事にもなる重要な機能を果たしている弾性線維蛋白質エラスチンについて、コアセルベート形成過程の詳細とエラスチンコアセルベートの構造、物性、機能の解明を行って来た。

一連の助成研究の中で、遷移金属がエラスチンコアセルベート形成に与える影響の解明と、通常の溶液系とは異なる細胞外間隙や原始海洋中の環境で、エラスチンコアセルベート形成が如何なる影響を受けるかを研究する手法について検討して来た。^{8、9)} 今回は、エラスチンコアセルベートが示すイオン選択特異性が、自己集合組織体の構造、物性、機能に与える影響を検討する。原始的蛋白質としてのエラスチンが示すイオン選択性は、原始生命体の機能の基礎として獲得可能なイオン選択特異性のモデルとなり得るものであ

り、同時に、動脈硬化による機能低下に直接関わっている、弾性線維蛋白質エラスチンとカルシウムの選択特異的相互作用の分子機序は、エラスチンの弾性発現機構解明にも繋がるものである。更に、カルシウムイオンの選択特異的な相互作用に拮抗するイオンや物質の検索も同様の意義を持つと共に、高齢化社会が進行する日本の医療問題にも、一定の寄与をなし得ると考えている。

Table 1. Amino acid compositions in residues/1000 residues for normal and atherosclerotic aortas in human.

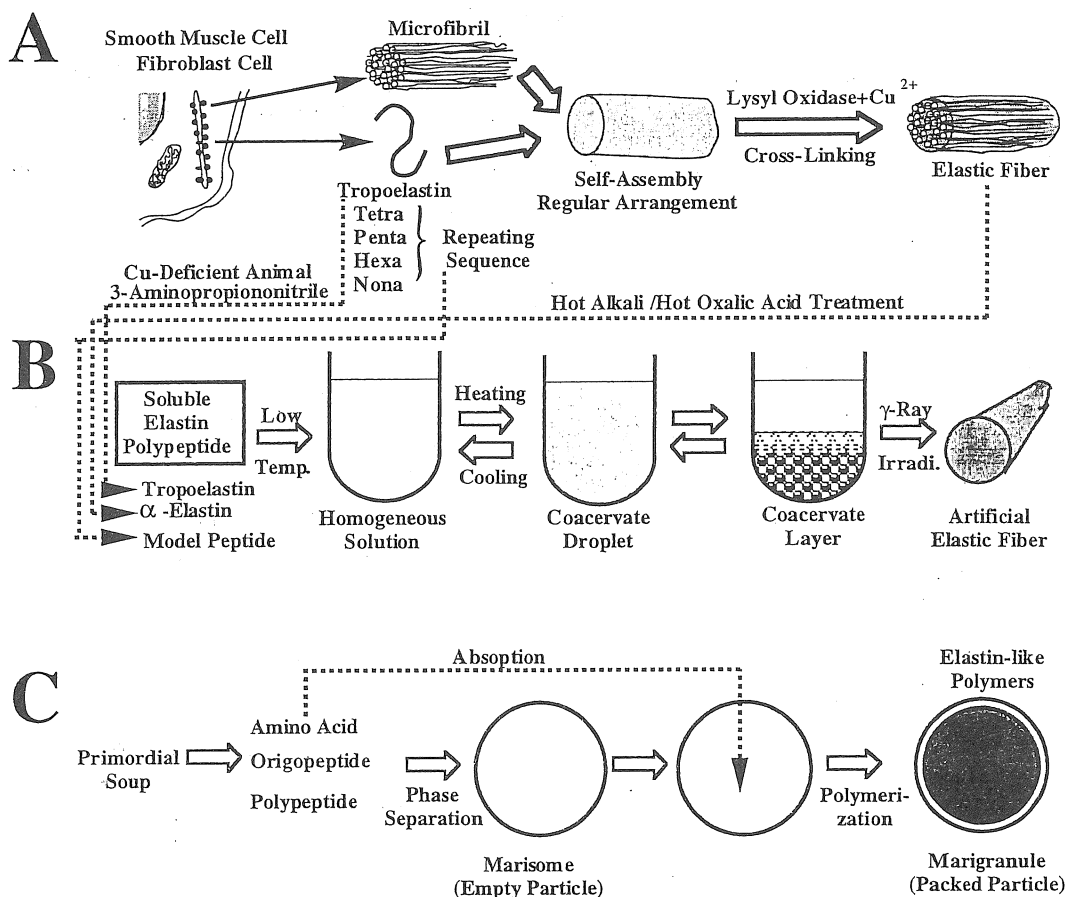
Amino Acid	Normal Aortas ^{a)}	Atherosclerotic Aortas ^{b)}	
		Noncalcified Portion ^{c)}	Calcified Portion ^{d)}
Hyp	10.2	17.7	44.5
Asp+Asn	2.9	14.0	24.9
Thr	8.2	13.4	16.4
Ser	5.4	8.8	13.5
Glu+Gln	16.8	33.1	46.2
Pro	123.4	123.3	115.6
Gly	304.9	259.4	265.3
ala	234.0	207.5	182.3
Val	143.6	140.4	121.1
Met	Nondetectable	3.2	Nondetectable
Ile	24.4	29.4	28.4
Leu	61.3	68.5	65.0
Tyr	21.9	27.0	11.0
Phe	24.7	28.1	27.5
Isodesmosine	1.6	1.5	1.5
Desmosine	3.6	3.2	3.1
Lys	5.9	7.7	11.0
His	0.2	3.0	4.8
Arg	7.7	12.1	17.6

a) Mean values for two infants (1 year 5 months of age).

b) Mean values for four patients (65, 73, 74, and 78 years of age) with macroscopic fatal atherosclerotic conditions.

c) Noncalcified region with a remarkable lipid deposition.

d) Calcified region with a remarkable calcium salt deposition.



Primordial Sea Medium Enriched by Mo, Fe, Zn, Cu, Mn, and Co//N₂-Atmosphere, 105°C, 8 Weeks

Fig. 1. Schematic representation of the correlation of elastin coacervate formations in elastogenesis (A), elastomeric protein-water system (B), and primeval cell model (C). A: Biological self-assembly of tropoelastin in an extracellular space as a key step of the elastogenesis. B: Temperature-dependent coacervation of the elastomeric protein-water system. C: Marigranule as a primeval cell model with elastin-like structure

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

弾性線維蛋白質エラスチンは、ヒト大動脈ではTable 1に示す様なアミノ酸組成を持ち、哺乳類では種、部位（項韌帯、肺、皮膚、胎盤、大動脈）間での差は非常に小さい。弾性線維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極めて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り、酵素化学的にはエラスターゼによってのみ消化される。本研究で、各種測定に供する試料としては、エラスチンを更に熱蓂酸処理によって、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ウシ項韌帯由来水溶性 α -エラスチンを用いた。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)_n-Val-OME (n \geq 40)、も用いた。Table 1に示したヒト大動脈エラスチンのアミノ酸解析についても、同研究室の協力を得た。

2. 2. コアセルベート形成とイオン選択特異性

Fig. 1Aに示したエラスチン生合成過程、Fig. 1Cに示した原始細胞モデル系の形成、この両者の何れもで、自己集合組織体形成のキーステップとなっているのはコアセルベーションである。この生体内自己組織化過程或いは原始生命組織体形成過程は、Fig. 1Bで示される、各種エラスチン関連ポリペプチド-水系の温度上昇に伴う液-液2相分離過程、温度依存性コアセルベーションで再現可能である。氷温下で完全に溶解させたポリペプチド水溶液の温度を、1分間に0.5~1.0°Cの割合で連続的或いは段階的に上昇させて、マイクロコアセルベート液滴、更にマクロコアセルベート分離層を形成させて、各種の物理化学的、生物物理学的測定を行った。位相差顕微鏡観察、レーザー光散乱測定による相分離挙動の追跡⁸⁻¹⁰⁾に加えて、分子レベルでの集合様式の変化を捉えるための、NMR、ESR、CDスペクトル測定^{11、12)}、コアセルベート相中のイオンの動きについての電気化学的測定^{13、14)}を行い、弾性線維蛋白質と各種金属イオンとの選択特異的相互作用が、エラスチンコアセルベートの分子集合特性、構造、物性、機能に如何なる影響を与えているかを検討した。

3. 研究結果と考察

3. 1. ペプチド骨格カルボニルと荷電性アミノ酸側鎖：二種類のイオン結合部位

各種測定に用いた2種のエラスチン関連ポリペプチドの中で、ウシ項韌帯由来 α -エラスチンは、Table 1に相当するアミノ酸組成で構成され、10%程度の荷電性アミノ酸側鎖をもっており、等電点付近のpHに於いて、最も低い温度でコアセルベート形成が開始され、pHの低下或いは上昇と共に、コアセルベーション開始温度は上昇する。一方、ポリペプチドモデルペプチドは荷電を持たないため、温度依存性コアセルベーションは、pHの影響を全く受けない。弾性線維蛋白質のコアセルベーションは、基本的に疎水性相互作用によって誘起される。

α -エラスチンの温度依存性コアセルベーションは、特定の遷移金属塩化物存在下では、コアセルベート形成温度が60~80°Cに上昇し、マイクロコアセルベート液滴が安定化し、マクロコアセルベート層への分離が進行しない特異な効果を示す事を報告した (Fig. 2参照)。⁸⁾ 一般的には、共存金属イオンの影響は、通常の蛋白質溶液への添加塩効果として理解する事ができる。即ち、金属塩化物濃度が低ければ、塩溶効果、一定の濃度以上で塩析効果が現われる事が、濁度測定、示差走査熱量測定で示され、更に、金属塩共存下の相分離過程の詳細について、位相差顕微鏡観察及びレーザー光散乱測定により検討

した。¹⁰⁾ 一連のアルカリ金属及びアルカリ土類金属塩化物共存下での測定結果から、コアセルベート形成開始温度が低下する相分離促進効果が一般的であるのに対して、Fig. 2にも示されている様に、塩化カルシウム共存下では、臨界点濃度 (0.11mg/mL) から0.5mg/mL付近迄は、コアセルベート形成が抑制されて開始温度が上昇している。同様の結果はポリペンタペプチド-水系でも得られ、レーザー光散乱測定による詳細な検討の結果、塩化ナトリウム共存下ではコアセルベート形成は促進、塩化カルシウム共存下では抑制される事が示された。

マクロコアセルベート分離層を液体イオン交換膜として取り扱い、イオンの選択的輸送過程を観測する事が出来る。 α -エラスチンコアセルベート膜は両性イオン交換膜として機能するので、pH変化に応じたアミノ基とカルボキシ基の解離状態の変化に対応して、陽、陰イオンに対する選択透過性が連続的に変化するはずである。種々の金属塩化物に対して予想される膜透過挙動が観測されるのに対して、塩化カルシウム系での膜電位応答はpHに依存しない。コアセルベート相内金属イオン濃度の測定を行い、外部溶液金属塩濃度が生理的塩濃度付近で比較すると、 α -エラスチンに結合しているカルシウム濃度はマグネシウムに比して5~7倍、逆にコアセルベート中のカルシウムの拡散係数はマグネシウムの1/20に過ぎないとの結果が得られた。

一般に膜電位応答は、膜内のイオン濃度と拡散係数によって規定される。ポリペンタ

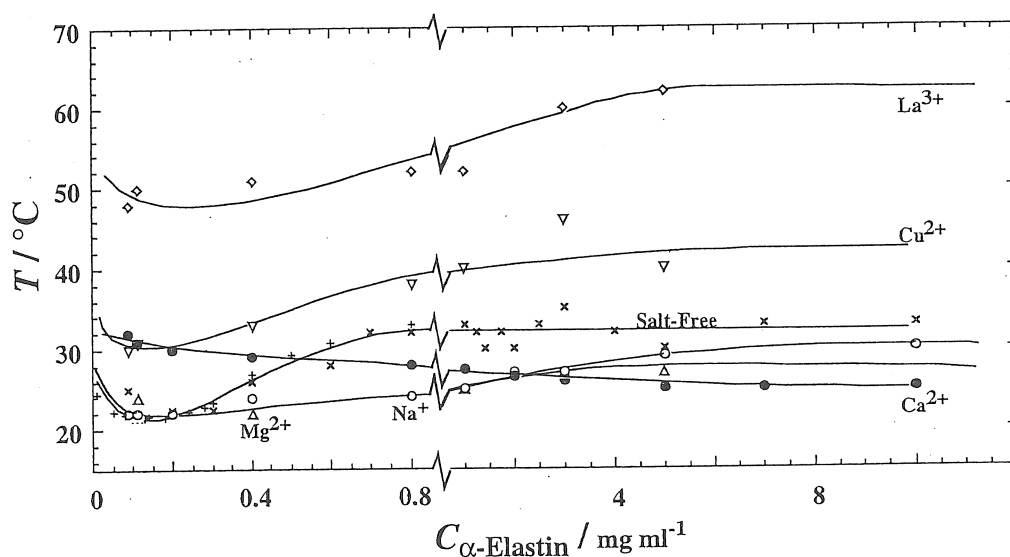


Fig. 2. Phase diagram of the bovine neck ligamental α -elastin-water system with and without metal chlorides (NaCl , CaCl_2 , MgCl_2 , CuCl_2 , and LaCl_3) showing the binodal temperatures estimated by phase contrast microscope and light scattering measurements. Metal chloride concentration: $10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$.

ペプチドコアセルベートの液体膜では、荷電基が存在しないので、溶液中の挙動に対応した静電的相互作用のない単純な拡散現象が観測され、 α -エラスチンコアセルベート膜とは全く異なる応答が、多くの金属塩化物系に対して測定された。ところが、塩化カルシウム系では、二つの膜は全く同じ応答を示し、コアセルベート膜内でのカルシウムイオンの状態、濃度と拡散係数が、 α -エラスチンコアセルベートポリペンタペプチドコアセルベート中とで同じである事を示している。ペンタペプチド配列、Val-Pro-Gly-Val-Gly、は哺乳類の弾性組織に広く見られる繰り返し配列であり、エラスチンの多様な機能の中で、弾性機能とコアセルベート特性を分担する部品と見なす事が出来る重要な配列であり、 β -スパイラルと呼ばれる特有な構造をとっている事が示唆されている。上に述べた実験結果は、 α -エラスチン中の β -スパイラルペンタペプチド配列部位、おそらくカルボニル酸素原子に、結合量に関してはイオン特異性のない側鎖カルボキシ基の5倍を越えるカルシウムが結合している事を示している。

3. 2. ペプチド骨格カルボニルへの金属イオンの結合とコアセルベーション
ペプチド骨格カルボニルの酸素原子にカルシウムイオンが選択的に結合している事を確認する実験が可能である。C-13ラベルアミノ酸を特定の割合で含むペンタペプチド配列からなるポリペプチドを合成し、NMR測定を行うと、塩化ナトリウム或いは塩化マグネシウム共存下では、骨格カルボニル領域の5つの化学シフトの変化は極めて僅かであるのに対し、塩化カルシウム共存下では、結合部位と思われる3位Glyと5位Glyのカルボニルの顕著な化学シフトの変化が観測された。2つのカルボニル酸素への選択特異的なカルシウムの結合が、広範な測定で特徴的に現われるエラスチンコアセルベートのカルシウム選択特異性の原因になっているのは明らかである。

ここで得られた結果は、弾性線維蛋白質上には、 β -スパイラルペプチド骨格カルボニル酸素と側鎖カルボキシ酸素の、2種類の金属イオン結合部位が存在する事を示している。側鎖カルボキシ酸素への金属イオン結合は選択特異的ではなく、一般的な塩溶・塩析効果や、臨界特性への効果の起源となっている。^{8, 10)} 骨格カルボニル酸素へのカルシウムの結合は、弾性線維蛋白質の構造や機能、自己組織化過程に如何なる影響を与えるのであろうか。又、カルシウム以外に、結合し得るイオンは存在するであろうか。

先ず、特異的にマイクロコアセルベート液滴を安定化し、トロポエラスチンの酵素による架橋反応に必須な銅イオンについて、C-13ラベルペンタペプチドによるNMR測定を行った。銅イオンの磁気的特性と濃度上昇によるNMRスペクトルの消失は、化学シフトの変化と移動を伴わないので、銅イオンの結合部位は側鎖のみであると結論出来る。ESRスペクトルの測定から、銅イオンは側鎖カルボキシ酸素を介してエラスチンと、一般的な平面配位ではなく四面体配位をしている事を示唆する結果を得ている。

β -スパイラルカルボニル酸素に結合し得る金属イオンを検索する目的で、CDスペクトル測定を行った。Fig. 3に、97%トリフルオロエタノール-水3%溶媒中でのポリペンタ

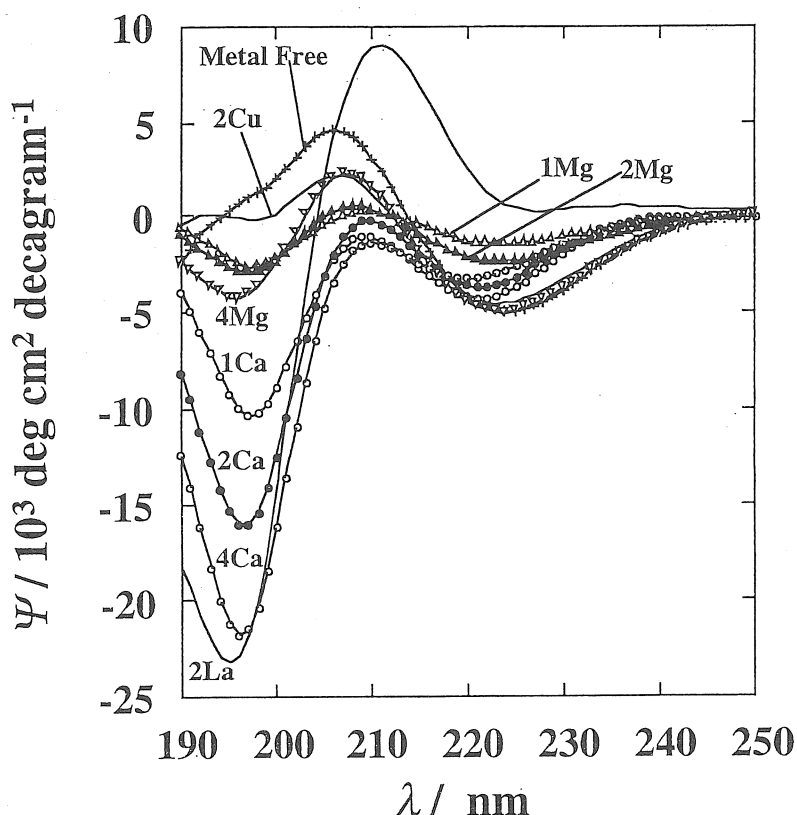


Fig. 3. CD spectra of poly(pentapeptide), H-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)_n-Val-OMe (n ≥ 40), in 97% trifluoroethanol-3% water with and without metal chlorides. Numerical values indicate the equivalent metal ion concentration per unit pentapeptide sequence.

ペプチドのCDスペクトルが、各種金属塩化物で如何なる影響を受けるかを検討した結果を示す。Val-Pro-Gly-Val-Gly繰り返し配列に特有なβ-スパイラル構造が存在する程度は、波長196nmでのスペクトル強度により評価する事が出来る。カルシウム添加により、スペクトル強度の顕著な低下が見られる事から、β-スパイラル構造の崩壊が濃度依存的に進行している事を示している。1価金属イオンはCDスペクトルに影響を与えず、側鎖アミノ酸荷電への非選択的結合のみである事が明らかとなった。2価金属イオンでも、マグネシウム、銅イオン共に波長196nmでのスペクトル強度に与える影響は軽微であり、ペプチド骨格カルボニルへの結合やβ-スパイラル構造を破壊する事はない。カルシウムイオンと他の金属イオンはコアセルベート形成に対して、各々、どの様な影響を与えるのであろうか。Fig. 2に示した結果によれば、ペプチド骨格カルボニルに結合せずβ-スパイラル構造も破壊しない金属イオンは、ウシ項靱帯α-エラスチンのコアセルベーションで、相分離開始温度に変化は与えるものの、臨界点濃度には影響を与えず、基本的な臨界特性や分子集合過程には影響を与えていない事が示唆される。一方、カルシウムイオン共存下では、開始温度と共に、臨界濃度が大きく変化しており、弾性線維蛋

白質分子の集合組織化状態が大きく変化している事を示す。60wt%の水を含むエラスチンコアセルベート相の体積は、塩化カルシウム共存下で最も大きくなる事も、規則的構造の破壊を示すと考えられる。

3. 3. 骨格カルボニルへの選択特異的イオン結合と動脈壁石灰化及び動脈硬化

β -スパイラルペプチド骨格へのカルシウムの選択特異的結合と生体内でのエラスチンの変化は、どの様に対応しているであろうか。動脈硬化病変部エラスチンの特徴は極性アミノ酸の増加であり、その傾向は脂質沈着の著しい非石灰化部位よりも、カルシウム沈着の著しい石灰化部位で特に顕著な事がTable 1に示されている。動脈硬化病変部位の極性アミノ酸増加の機序は不明であるが、病変異常エラスチンがカルシウムと強い相互作用をする事は明らかであり、弾性機能低下への、ペプチド骨格カルボニル酸素とカルシウムの相互作用の関与は確実である。

前説で述べた金属イオン共存下でのCDスペクトル測定を、塩化ランタン共存下で行うと、 β -スパイラルペプチドカルボニル酸素との強固な相互作用を示す結果が得られた。波長196nmのCDスペクトル強度の低下は、1個のペプチド当たり2当量のランタンで飽和するのに対し、カルシウムでは徐々に増加し続ける。生理学分野では、ランタノイドは特異な分光学的活性を利用して、カルシウムの作用を研究する代替物として用いる事もあり、結合部位が共通である例は多い。しかし、弾性線維蛋白質の場合、同じ様にペプチド骨格カルボニルに結合しても、Fig. 2に明らかな様に、ランタンイオンは、 α -エラスチンの臨界点濃度を変化させず、基本的な分子の自己集合様式には影響を与えない、カルシウムイオンとは全く異なる特性を示す。両金属イオンの作用機序の違いは、現段階では不明であるが、動物を用いた実験的動脈硬化症の研究で、塩化ランタンにより、動脈硬化進行に伴うエラスチンへのカルシウム沈着が抑制される、或いは、動脈硬化とカルシウム沈着が改善されるとの報告が知られており¹⁵⁾、ペプチド骨格部位への結合機構に何らかの相違がある事は確実である。ランタンイオンを含めて、カルシウムイオンと β -スパイラルペプチドカルボニル酸素との相互作用を、阻害或いは拮抗する因子の探索は、未だに不明な点の多い弾性線維蛋白質の機能発現、機能低下の分子機構を明らかにする手掛りを与えると同時に、動脈硬化を始めとする循環器疾患等、増々深刻さの度合を増し続けている、日本の高齢化社会に於ける医療問題にも一定の寄与をなし得るものであると考えている。

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、原始細胞モデルから動脈硬化症迄、多様な側面と意義を有する研究対象として、様々な物理化学的及び生物物理学的手法により検討して来た。弾性線維蛋白質-水系で明らかにされた自己集合組織化過程の特性は、広範な研究対象に共通する知見を与えるものであった。今回述べたエラ

スチンコアセルベートと金属イオンの選択特異的相互作用も、生体細胞に必要な刺激受容・応答システムの基盤をなす部分であると同時に、動脈弾性壁の機能や動脈硬化症の進行にも関わる問題点であった。本研究で、極めて単純なアミノ酸組成をもつ原始的蛋白質で、一定のイオン選択特異性を実現出来る事が明らかとなった。今後の研究の一つの方向は、機能性材料としての原始細胞や人工血管材料への展開であろう。動脈弾性壁の機能を司るエラストマーとしてのエラスチンは、いわゆる、ゴム弾性ではなく、特定の規則構造を有する弾性体として扱わねばならない。エラスチンの弾性機能がゴム状高分子の特性で説明可能なものであれば、既に人工動脈壁弾性素材が実現されている筈である。現実のエラスチンは、カルシウム沈着の進行が避けられない、言わば諸刃の剣に等しい構造特性に基礎を置いている様である。エラスチンの構造、物性、機能の研究からのみ、エラスチン代替人工生体弾性材料を創出する事が可能であると考えている。

5. 参考文献

- (1) A. I. Oparin, "The Origin of Life", Macmillan, London (1936).
- (2) M. W. Beijerrinck, *Kolloid-Z.*, **7**, 16 (1910).
- (3) H. G. Bungenborg de Jong and H. R. Kruyt, *Proc. Koninkl. Ned. Akad. Wetensch.*, **32**, 849 (1929).
- (4) J. T. G. Overbeek and M. J. Voorn, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **49**, Suppl. 1, 7 (1957).
- (5) C. J. van Oss, "Interfacial Forces in Aqueous Media", Marcel Dekker, Inc., New York (1994).
- (6) B. V. Derjaguin, *Prog. Surf. Sci.*, **43**, 60 (1993).
- (7) K. Kaibara, T. Okazaki, H. B. Bohidar, and P. L. Dubin **1**, 100 (2000).
- (8) 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 I, 299 (2000).
- (9) 甲斐原梢, ソルト・サイエンス研究財団平成11年度助成研究報告書 I, 343 (2001).
- (10) K. Kaibata, T. Watanabe, and K. Miyakawa, *Biopolymers*, **53**, 369 (2000).
- (11) 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).
- (12) H. Kodama, Y. Higashimoto, S. Kajiyama, Y. Uemura, K. Kaibara, K. Okamoto, M. Jelokhani-Niaraki, and M. Kondo, *Peptide Chemistry 1995*, 433 (1996).
- (13) K. Kaibara, K. Sakai, K. Okamoto, Y. Uemura, K. Miyakawa, and M. Kondo, *Biopolymers*, **32**, 1173 (1992).
- (14) K. Kaibata, Y. Akinari, K. Okamoto, Y. Uemura, S. Yamamoto, H. Kodama, and M. Kondo, *Biopolymers*, **39**, 189 (1996).
- (15) D. M. Kramsh, A. J. Aspen, and C. S. Apstein, *J. Clin. Invest.*, **65**, 967 (1980).

**Searching for Prebiotic Organizations
in Primordial Sea Medium Enriched by Transition Metals
-Ionic Selectivity and Self-Assembly of Primeval Proteins-**

Kozue Kaibara

Graduate School of Science, Kyushu University

Summary

“Coacervation”, liquid-liquid phase separation, has already been recognized at an early stage of the movement to establish the chemical and physical science of colloidal substances. The term “coacervation” has become vastly popular by Oparin’s scientific insight and literary talent developed in his famous work on the origin of life. But phenomenological complexities of coacervation process inhibit the scientific progress both in the theoretical and experimental points of view. Recently, reevaluations of coacervation are carried out in basic science and applications. Coacervate formation of elastin as a primitive protein with simple amino acid composition is a useful model for primeval cell system. On the other hand, self-assembly of elastin precursor protein is a key step of the elastogenesis and can be mimicked by the temperature-dependent coacervation of elastomeric protein-water system.

In a variety of experiments employing bovine neck ligamental α -elastin and polypentapeptides based on the repeating sequence, -Val-Pro-Gly-Val-Gly-, specific in elastin, calcium selective interactions of elastin coacervate were widely observed. Under the conditions where coacervation is accelerated based on the general salting-in-and-out mechanisms, calcium ions only decelerated the phase process. NMR measurements using C-13 labelled polypentapeptide showed that only calcium ions affect the chemical shifts of ^3Gly and ^5Gly groups. Ion transport experiment across coacervated layer indicated that calcium ions are more concentrated and immobilized than magnesium ions in coacervate phase. These results suggest the existence of the two types of metal cation binding sites on elastomeric protein, side chain carboxy oxygen and β -spiral peptide backbone carbonyl oxygen specific to pentapeptide sequence. CD measurements were performed to survey cations capable to bind peptide backbone. Lanthanum ions only can bind to the β -spiral carbonyl oxygen, but not modify global self-assembly process, since the critical concentration of LCST-type phase separation profiles of the elastomeric protein-water system stayed unchanged. Calcium ions are significantly active both to destroy the β -spiral structure and to modify the phase separation profiles with the increasing critical concentration. These results correlate well to the fact where lanthanum can relieve experimental atherosclerosis with calcium deposition. Ion selective characteristics of elastin as a primitive protein are important for primeval cell model and elastomeric functions of elastin as an extracellular matrix.