

# 弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の 構造、物性、機能に関する研究

九州大学 理学部

甲斐原 梢

Extracellular self-assembly process of tropoelastin, as a key step of the elastogenesis, can be mimicked by the temperature-dependent coacervation of elastin-related polypeptides such as tropoelastin,  $\alpha$ -elastin, and block copolymeric model peptide, (Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>. Homogeneous aqueous solutions of these polypeptides in low temperature become turbid with elevating temperature by the formations of coacervate droplets. Critical behaviors of the liquid-liquid phase separation of bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin-water system were observed by the laser light scattering photometry. The critical point was determined to be near 0.11mg/ml and 21.5°C. In the critical region, the estimated hydrodynamic radius was decreased gradually with elevating temperature probably due to the hydrophobic interactions excluding water molecules from the polypeptide assemblies. Then, the hydrodynamic radius increased sharply to induce liquid-liquid phase separation. On the contrary at the region far from the critical point, gradual decrease in hydrodynamic radius followed by the additional decrease to induce the phase separation. The temperature-dependent coacervation of elastin-related polypeptides are characterized by these two types of dynamic behaviors. The same modes of molecular assembly process were also observed by the rotary viscometric measurements for the critical and off-critical regions. The reduced viscosity of bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin solution was increased with elevating temperature in the region near critical point until the liquid-liquid phase separation was induced. While in the region far from the critical point, the reduced viscosity of aqueous  $\alpha$ -elastin solution was suppressed to constant levels with elevating temperature. Selective and specific interactions of calcium ions and copper ions were employed as a tool to survey structure and function of the elastin coacervate. Low diffusion coefficient and high concentration of calcium ions, seven times higher than that of magnesium ions, within coacervate phase were based on the selective binding to the electrically neutral backbone Val carbonyl groups. These selective interactions of calcium ions are tightly correlated with arteriosclerosis induced by the calcium deposition on the arterial wall elastin. Novel interactions of copper ions with elastin coacervate stabilized the microcoacervate droplet and the macroscopic phase separation to form coacervate layer and upper layered equilibrium solution phase. Unique effects of copper ions seem to present a key to clarify the molecular structural bases of elastomeric mechanisms.

## 1 緒言

細胞外マトリックスとしての弾性線維蛋白質エラスチンは、コラーゲンに次ぐ量が生体に存在しており、皮膚、動脈壁、項靱帯等、持続的な弾性が要求される組織に於て、弾性機能発現を支配し

ている。特に、大動脈壁を構成している血管平滑筋細胞、エラスチン、コラーゲンの中で、正常血圧の発生、維持に寄与しているのはエラスチンのみであり、低い圧力では平滑筋細胞が優先的に機能し、一方、高い圧力ではコラーゲンが優先的に機能して血管壁の剛性が増すと共に弾性が低下し、いわゆる動脈硬化と呼ばれる状態になる事が知られている。即ち、動脈硬化は、エラスチンの質的、量的な変化として捉える事が出来る。又、胎児期に既に機能している大動脈のエラスチンには、加齢と共にカルシウムやコレステロール等の脂質の沈着が進行して弾性機能が低下し、寿命を決定する重要な因子となっている。

Studies on Structure, Mechanism, and  
Function of Self-Assemblies  
of Elastomeric Protein

Kozue Kaibara

Department of Chemistry, Faculty  
of Science Kyushu University



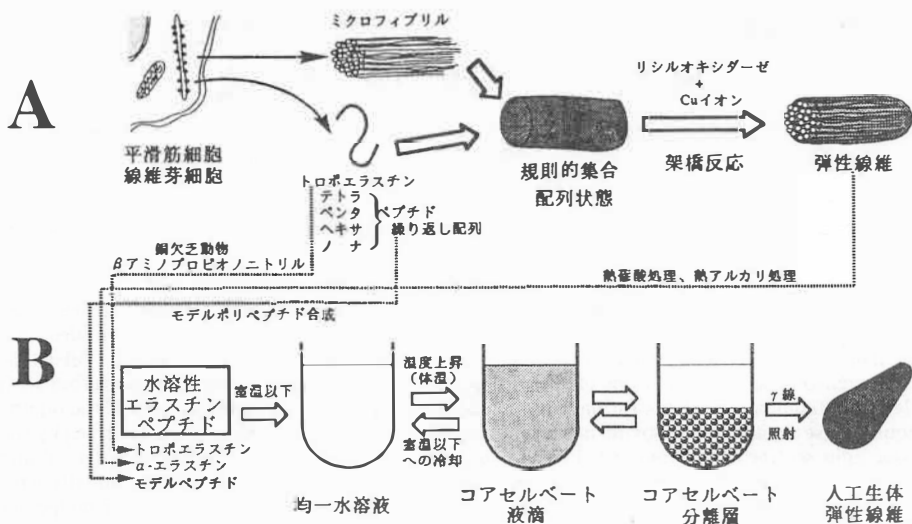


図1. 細胞外間隙での弾性線維蛋白質エラスチンの  
生合成過程 (A) と温度依存性コアセルベ  
ーション (B) の対応

この様に、弾性線維の主要構成成分として重要な機能を果たしているにも拘わらず、構造、物性、機能の何れの面に於ても、エラスチンの特性の多くが未解明のままに残されている。その最大の理由は、エラスチンが弾性組織のアルカリ処理残渣として分離抽出される程に、極度に溶解性が低い事にある。エラスチン生合成過程は、図1Aに模式的に示されるが、平滑筋細胞や線維芽細胞内で合成された前駆蛋白質トロポエラスチンがエクソサイトシスにより細胞外に送出され、規則的集合配列状態をとった後、銅イオンを補因子とするリシルオキシダーゼによる分子内、分子間架橋反応を経てエラスチンとなり、糖蛋白質であるミクロフィブリルと共に弾性線維を構成する。本研究の基礎は、生合成過程のキーステップであるトロポエラスチンの自己集合組織化過程が、図1Bに示すエラスチン関連水溶性ポリペプチド-水系の温度依存性コアセルベーションとして再現可能な事にある<sup>1)</sup>。コアセルベーションが観察されるペプチドとしては、銅欠乏動物より抽出したトロポエラスチン(アミノ酸残基数~700個)、トロポエラスチン相当の分子量を有するエラスチンの熱燻酸処理可溶化断片である $\alpha$ -エラスチン、エラスチ

ン特有な繰り返しペプチド配列に基づくブロック共重合型モデルポリペプチドであるポリペンタペプチド(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>等がある。即ち、これらのポリペプチドの水溶液は、室温以下の低い温度では均一な水溶液であるが、温度上昇と共に、コアセルベート液滴を形成して白濁し、更に、ペプチドが高度に濃縮されたコアセルベート下層とペプチド濃度の低い平衡液上層に分離する。

細胞外マトリックスとしてのエラスチンの弾性、細胞遊走性等の多様な機能は、生体内自己組織化過程で確立される分子集合体の構造特性に依っている。従って、エラスチン関連水溶性ポリペプチド-水系のコアセルベーション、即ち、液-液2相分離特性を種々の手法により明らかにする事から、弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する知見を得る事が可能である。

## 2 実験

ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン及びポリペンタモデルペプチド、(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>を用

い、種々の測定に供した。モデル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、佐賀大学理工学部近藤研究室より提供して頂いた。試料溶液は水温下で調製し、冷蔵庫内に数時間静置して均一な水溶液とした。何れの測定においても、温度を一定速度で連続的に、あるいは、段階的に注意深く温度を上昇させながら、液-液2相分離に伴う物性変化を観測した。

実験は、通常の濁度測定等の分光学的手法による集合体形成過程の追跡を行った他、コーン・プレート型回転粘度計による測定を行った。相分離過程の解析に威力を発揮するレーザー光散乱測定については、福岡大学理学部宮川研究室の御協力を得た。液-液2相分離初期過程に対しては粘度及び光散乱測定が有効であるが、濁度増加やコアセルベート液滴形成を伴う相分離が進行した段階では適用不可能となるため、今回は結果については

述べないが、ビデオ記録装置を備えた位相差顕微鏡による粒径分布変化の観察等が、相分離後期過程の解析に有効である事を確認した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 相分離挙動の光散乱法による観察と解析

図2Aにウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチンについて、蛍光分光光度計により波長400nmでの90度散乱光強度の温度及び濃度変化を示す。温度及び $\alpha$ -エラスチン濃度増加に伴い、散乱光強度が増加するが、濃度により二相性の変化が見られる。図2Bに示す様に、測定で得られた曲線aをbとcに分解して見ると、曲線bの立ち上がり温度は吸光光度計で求めた同一波長での濁度増加の開始温度と一致する。これらの結果は、液-液2相分離を伴うエラスチンペプチドの集合組織化過程で、少なくとも二つの分子過程が進行している事を示していると考えられる。その詳細について調べ、生体内自己組織化過程に関する知見を得るために、波長514.5nmのアルゴンレーザーを用いた光散乱測定を行った<sup>2)</sup>。

散乱強度Iの角度依存性の測定結果より、次式を用いて相分離過程の臨界挙動に関する知見が得られる<sup>3)</sup>。

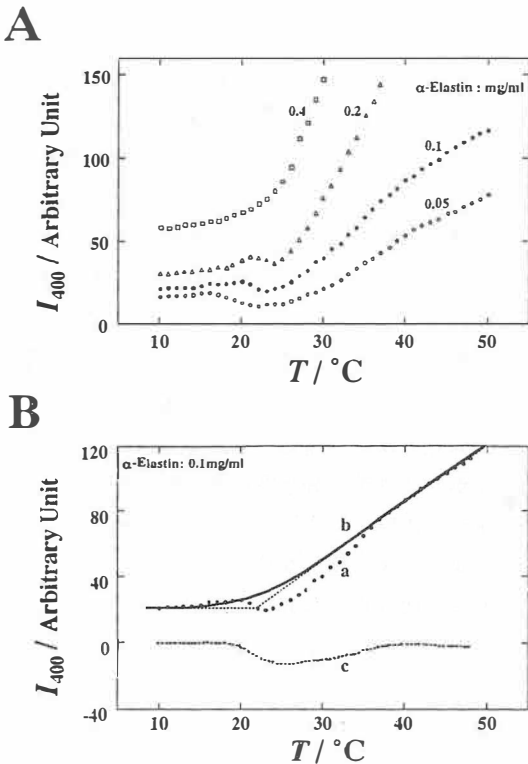


図2. ウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の90°散乱光強度の濃度及び温度依存性 (詳細は本文参照)

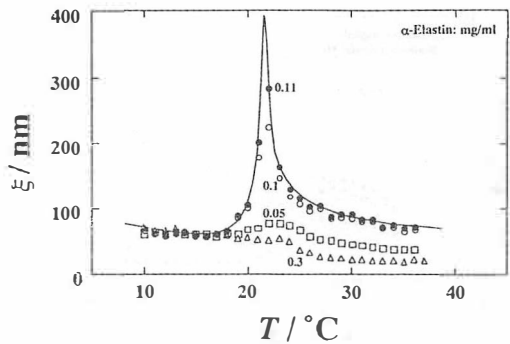


図3. ウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液に於ける濃度揺らぎの相関距離 $\xi$ の濃度及び温度依存性

$$I(q) = I(0) / (1 + \xi^2 q^2) \quad (1)$$

ここで $q$ は、 $q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta/2)$  ( $n$ 、 $\lambda$ 、 $\theta$ は各々、屈折率、波長、散乱角)で表わされる散乱ベクトルである。 $I(0)$ は前方散乱光強度と呼ばれ浸透圧縮率に比例する量である。 $\xi$ は濃度揺らぎの相関距離である。図3に種々の $\alpha$ -エラスチン濃度に於ける $\xi$ の温度変化の様子を示す。濃度0.11mg/ml、温度21.5°C付近で $\xi$ の値が発散傾向を示しており、濃度揺らぎが系全体に拡がり相分離へ向かう現象が示されている。この濃度から離れるに従い、 $\xi$ の値は急激に減少し、濃度揺らぎの範囲が局所的である状態へと移行していく事を示している。ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションが、濃度0.11mg/ml、温度21.5°C付近に臨界点を有する液-液2相分離過程である事は、図6Aに示す様に、濃度0.11mg/mlに於いて、前方散乱光強度の逆数が温度21.5°C付近で0に漸近することからも確認できる。種々の濃度に於いて、濁度測定より二相共存温度、前方散乱強度よりスピノーダル温度を求め、最終的にウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン-水系の相図が決定される。

次に、動的散乱測定により得られた相関関数 $g(\tau)$ をキュムラント展開し、相分離過程と分子集合体の特性を表わす諸量を求めた。

$$g(\tau) = \exp[-\Gamma \tau + (\mu_2/2!) \tau^2] \quad (2)$$

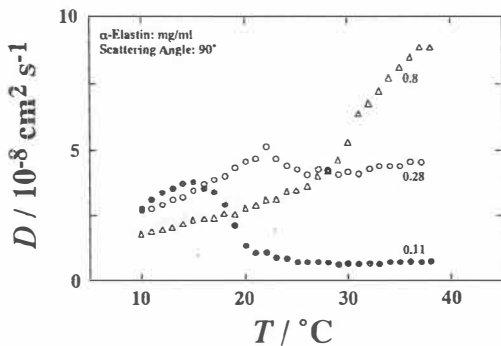


図4. 動的散乱測定により求めた拡散係数の $\alpha$ -エラスチン濃度及び温度依存性 (臨界点近傍と臨界点から十分に離れた点での拡散係数の温度依存性の相違に注意)

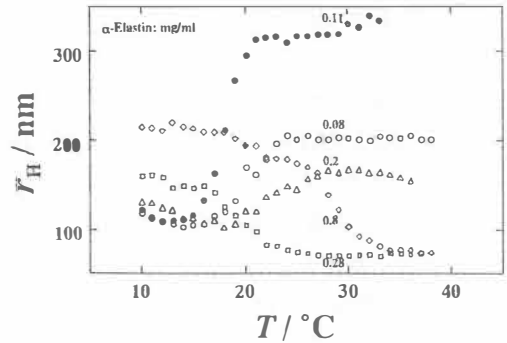


図5. 動的散乱測定より求めた流体力学的半径の $\alpha$ -エラスチン濃度及び温度依存性 (臨界濃度とその他の濃度での温度依存性の違いに注意)

ここで、 $\Gamma$ は平均緩和速度、 $\tau$ は緩和時間であり、 $\mu_2/\Gamma^2$ は分散指数と呼ばれる。散乱粒子の拡散係数 $D$ 、及び、流体力学的半径 $r$ は、以下の式で算出される。

$$D = \Gamma / q^2 \quad (3)$$

$$r = kT / 6\pi\eta D \quad (4)$$

ここで $k$ 、 $T$ 、 $\eta$ はボルツマン定数、温度、溶媒の粘度である。図4に拡散係数、図5に流体力学的半径の値を、臨界点近傍、臨界点から十分に離れた点、更に両者の中間の点について得られた結果を示す。臨界点近傍では、拡散係数は温度上昇と共に緩やかに増加した後、急激に減少して相分離に至り、ほぼ一定値を保持する。一方、臨界点から十分に離れた点では、緩やかに増加する拡散係数は、更に増加の割合を増して相分離に至る。従って、臨界点近傍での流体力学的半径の変化は、おそらくポリペプチド分子間の疎水性相互作用に基づく水分子排除による減少を経て、急激に進行する分子集合による増加を伴って相分離に至ると考えられる。臨界点から十分に離れた点での流体力学的半径の変化は、拡散係数の変化に対応した二段階の持続的な減少となっている。中間点に於ける拡散係数あるいは流体力学的半径の変化は、上に述べた二種類の分子集合挙動の組み合わせとして捉える事が出来る。図6には、臨界点近傍での種々の数値が示す特性をまとめて示した。

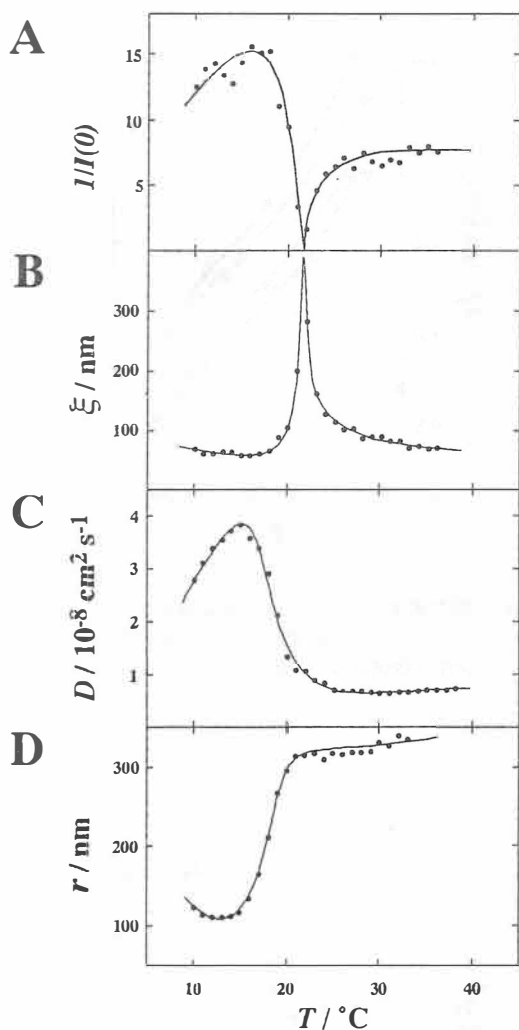


図6. 臨界点近傍での相分離挙動を表わす諸量の温度依存性  
(縦軸の諸量については本文参照)

### 3.2 粘度測定による分子集合挙動の解析

溶液内での分子集合挙動を調べる手段としては、粘度測定も有効である。少量の試料溶液で測定可能な事、剪断応力を変化させた測定等、微細な細胞外間隙で進行する生体内自己集合組織化との対応が可能な事等を考慮し、コーン・プレート型回転粘度計による粘度測定を行った。種々の濃度のウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液について、一定速度でコーンを回転させながら、温度を段階的に1~3°Cづつ上昇させながら粘度の定常値

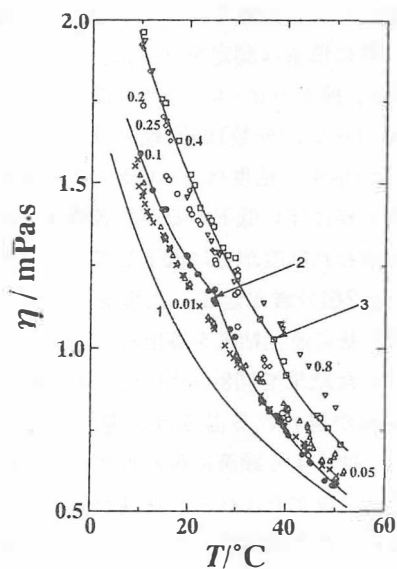


図7. ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の粘度の濃度及び温度依存性  
(曲線1は純粋の粘度、矢印2、3は各々濃度0.1、0.4mg/mlに於ける相分離温度25.3、37.3°Cを表わす)

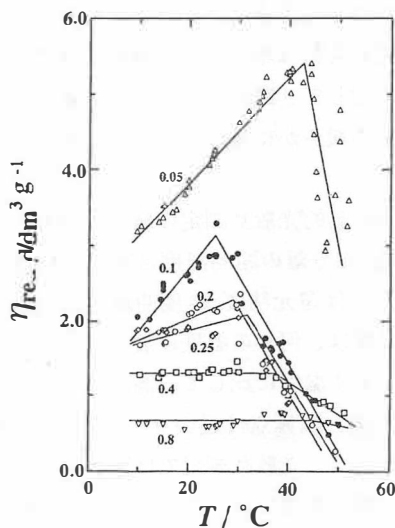


図8. ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の還元粘度の濃度及び温度依存性  
(グラフ内の数値は $\alpha$ -エラスチン濃度を表わす)

を測定した。相分離を起こすと思われる温度付近では、特に慎重な測定を行った。

図7は、種々の $\alpha$ -エラスチン濃度での、温度に対するコーン回転数100回転/分での粘度の変化の様子を示す。粘度は $\alpha$ -エラスチン濃度減少及び温度上昇に伴い低下するが、各濃度で特有な屈曲点が現われ粘度が更に低下しており、その温度で液-液2相分離が起こった事を示している。この結果を基に還元粘度を算出し、温度に対してプロットした結果を図8に示した。相分離に伴う粘度の変化が現われる温度は、還元粘度-温度プロットでは、より顕著に現われている。相分離以後の系は、コアセルバート液滴が分散した不均一系であり、粘度測定の結果から分子集合挙動に関する知見を得る事は困難である。図8は、臨界点から十分に離れた点では、還元粘度の値は温度に無関係に一定の値をとり液-液2相分離に至るのに対して、臨界点に近づくに連れて、還元粘度が温度上昇に対して増加する過程を経て相分離に至る事を示している。温度上昇に伴う還元粘度増加は、臨界点付近に於いて、最も顕著である。これらの結果は、前節で述べた動的光散乱測定の結果から導かれた、臨界点付近では分子集合体の流体力学的半径が急激な増加をする過程を経て相分離に至るのに対して、臨界点から十分に離れた点では粒径は寧ろ緩やかに減少するとの結果と良く対応している。

粘度測定と動的光散乱測定の結果の間の不一致は、液-液2相分離の開始温度にある。粘度-温度曲線あるいは還元粘度-温度曲線の屈曲点が示す相分離温度は、何れの濃度に於いても、動的光散乱測定が示す温度に比して、高温側へ移行している。例えば、臨界点付近の $\alpha$ -エラスチン濃度0.11mg/mlでは、光散乱測定では21.5°Cであるのに対して、粘度測定では、25.5°Cへと相分離開始温度が上昇した。その原因は、測定時に試料溶液にかかる剪断応力の有無にあると考えられる。そこで、回転粘度計コーンの回転数を変化させる事により、異なる剪断応力場中での粘度測定から相

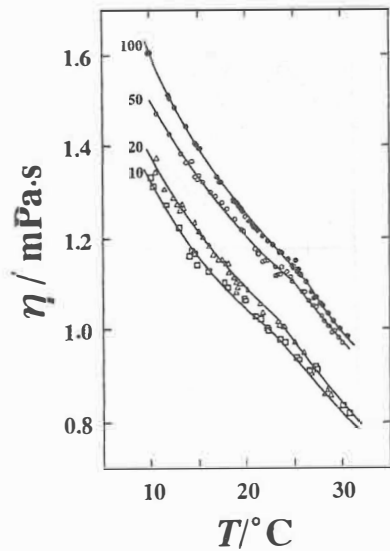


図9. 臨界濃度近傍でのウシ項韌由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液粘度のコーン回転数依存性 (数値はコーン回転数/分をあらわす)

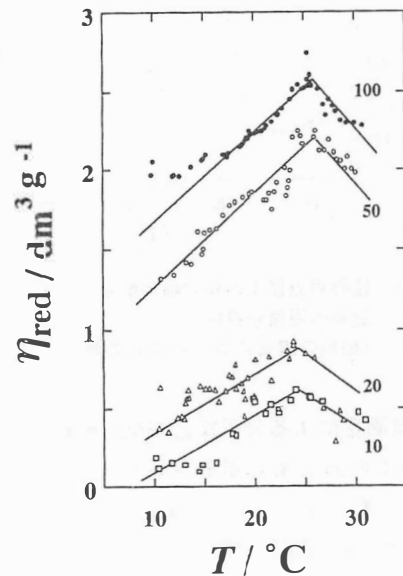


図10. 臨界濃度近傍に於けるウシ項韌由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の還元粘度のコーン回転数依存性

分離開始温度の変化を観察した結果を、図9と図10に示した。コーン回転数を100、50、20、10

回転/分と変化させるに連れて、粘度の減少と共に、液-液2相分離開始温度が低下する事が示されている。剪断応力場中での相分離、いわゆる流動誘起相分離については、種々の測定法の検討が行われ、解析法についても未だ確立されるに至っていないが、弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究に於いても、又、生体内自己集合組織化過程の詳細を知るためにも重要であり、現在、粘弾性顕微鏡を用いた研究を始めている。粘弾性顕微鏡は、倒立型顕微鏡のステージ上に、透明なコーン・プレートアタッチメント付回転粘度計を装着した装置であり、細胞外空間の特殊な環境を、ある程度再現し得ると考えている。

### 3.3 エラスチンコアセルベートの特異な挙動

生体中に最も多量に存在する蛋白質はコラーゲンであり、ゲル形成を始め、種々の生化学的、物理化学的特性が活発に研究されて来た。一方、エラスチンは動脈硬化に深く関わる蛋白質である事から、病理学等、基礎医学的な研究は精力的に行われてきたが、基礎科学的な研究は、エラスチンの最も重要な弾性機能発現の分子機構についても確定的な結論が得られていない程であり、多くの課題が残されている。前駆蛋白質トロポエラスチンやモデルポリペプチドを用いた架橋重合実験の結果より、単純な重合過程ではなく、液-液2相分離を伴う分子集合過程、即ち、温度依存性コアセルベーションを経た場合のみが、弾性機能を有する線維様生体高分子が得られる事が報告されている。従って、エラスチンコアセルベートの構造と物性は、弾性線維蛋白質としての多様な機能の基礎となる構造と物性に対応していると考えられる。我々は、種々の金属イオンが相分離挙動やエラスチンコアセルベートの物性に与える影響について各種の測定を行い、各種金属イオンとの相互作用の解明から、弾性発現の基礎となっているエラスチンコアセルベートの構造に関する検討を行っている<sup>4)</sup>。特に、以下に述べる様な、エラス

チンコアセルベートと選択特異的な相互作用をする金属イオンは、分子構造解明の有用なプローブとなる。

カルシウムイオンは、動脈壁エラスチンへの沈着が動脈硬化の素因となっている事からも、エラスチンコアセルベートとの相互作用の詳細を明らかにする事が重要である。エラスチンコアセルベート中の輸送現象について、ナトリウム、マグネシウムイオンとの比較を行うと、カルシウムイオンは、拡散係数が小さく、生理的イオン濃度条件下に於けるコアセルベート内の濃度は、マグネシウムの7倍に達した。このようなカルシウムのエラスチンへの結合は、C-13ラベルを施したモデルポリペプチド (Val<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>)<sub>n</sub>を用いたNMR測定の結果から、選択特異的に3位と5位のグリシンのカルボニル基を介している事が示された。即ち、カルシウムイオンは、ペプチド骨格鎖の電気的に中性なカルボニル基に強固に結合していると考えられる。動脈壁エラスチンへのカルシウム沈着による弾性低下機構解明は、弾性発現分子機構自身を解明するための有力な手掛かりを含んでいるはずであり、更に検討を続けている。

弾性線維蛋白質-水系の液-液2相分離に対して、一般的に、アルカリ金属及びアルカリ土類金属イオンは促進効果を示すのに対して、遷移金属イオンは抑制効果を示すが、中でも、銅イオンは相分離温度を数10℃以上も上昇させる顕著な作用を示した。更に、銅イオンの最も特徴的な効果は、液-液2相分離過程で、コアセルベート液滴状態を安定化させ、コアセルベート下層と平衡液上層への分離を阻止する作用にある。ESR測定の結果、エラスチンコアセルベートはマンガンイオンとは配位結合をしないのに対して、銅イオンとは四面体型の配位構造をとる事、上に述べたC-13ラベルモデルポリペプチドを用いたNMR測定で、銅イオンの磁性によりカルボニル炭素のケミカルシフトが消失していく中で、2位のプロリンのシグナルのみが保持される事が、明らかとなっ

た。このような銅イオンの特異な作用は、エラスチンコアセルバートの構造に関する何らかの情報を与えており、又、架橋酵素リシルオキシダーゼの補因子としての銅イオンは、前駆蛋白質トロポエラスチンの自己集合組織化の重要な役割を果たしている可能性もあると考えている。

#### 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 Editors), Elsevier Science Publisher B. V., 281 1993
- 2) K. Miyakawa and K. Kaibara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **60** 1468 1991 ; K. Miyakawa, K. Ito, and K. Kaibara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **62** 2511 1993 ; K. Miyakawa, M. Totoki, and K. Kaibara, *Biopolymers*, **35** 85 1995
- 3) H. E. Stanley, "Introduction to Phase Transitions and Critical Phenomena", Oxford Univ. Press, London, 1971.
- 4) K. Kaibara, K. Sakai, K. Okamoto, Y. Uemura, K. Miyakawa, and M. Kondo, *Biopolymers*, **32**, 1173 1992 ; K. Kaibara, Y. Akinari, K. Okamoto, Y. Uemura, S. Yamamoto, H. Kodama, and M. Kondo, *Biopolymers*, **39** in the press. (1995)