

# 藤井 敏弘

目的別テーマ： 生体材料を用いたバイオミメティックス材料の開発

17 年度研究テーマ

15-3-10：細胞内繊維構造体の分子集合を利用したマイクロマシンの創出

## ABSTRACT

*Isolation of biopolymers, tissues, and cells from the host body system is necessary to protect the implanted polymers from protease and immune systems. Encapsulation technology is thought to be an effective for solving these problems, and further can be used in bioreactor and biosensor fields. Muscle proteins such as myosin, actin, and actomyosin purified from rabbit skeletal muscle were encapsulated in gellan/chitosan polyion complex (PIC) capsules using a simple procedure. The incorporation of muscle proteins was examined by ATP hydrolysis and electrophoresis. The recoveries of myosin  $Ca^{2+}$ -ATPase activity at low and high ionic strengths were 30% and 40%, respectively, when the capsules were prepared by dropping a mixture solution of proteins and gellan into a chitosan solution. Myosin in the capsules mainly consisted of heavy chain and light chains without remarkable cleavage. The activation of Myosin  $Mg^{2+}$ -ATPase activity by actin was also observed after their incorporation into the capsules. These results suggest that this system will be an excellent model for artificial contractile apparatus.*

## 研究目的

上皮組織、結合支持組織、筋組織、神経組織から構成されている動物において、運動システムは生きていくために必要不可欠な要素である。その細胞として、骨格筋細胞、平滑筋細胞、心筋細胞が知られている。細胞運動は運動タンパク質フィラメント間の滑りによりもたらされている。運動タンパク質は、ファイバー構造とエネルギー変換機能を必ず含む。特に筋肉における基本エレメントであるミオシンとアクチンの両フィラメントは規則正しい構造と高い ATP 分解能をもつことから多くのモデルに利用されており、生体中の代表的なアクチエーターといえる。ミオシンあるいはアクチン-ミオシンをフィルム、ゲル、細胞内繊維構造体へ組み込むことは、マイクロマシンの創出にもつながる。私たちは、この足場として、PIC（ポリイオンコンプレックス）カプセルを利用して新規のアクチエーターの開発を行う。また、薬剤や生体高分子をカプセル内に導入し、その放出への影響を検討する。

本年度は、ウサギ骨格筋からミオシン、アクチンを調製し、ミオシン、アクチンおよびアクトミオシンのカプセルへの導入を確立し、生化学的な評価を行った。

## 一年間の研究内容と成果

同じ3班の山本（浩）& 大川 研究室との共同研究で、モデル酵素としてアルカリンホスファターゼを使用して PIC カプセルへの簡便な導入には成功している (Fujii T. et al., *Macromol. Biosci.*, 5, 394-400, 2005)。この技術を基盤として、カプセルの作製を行った。

作製されたカプセルは直径 3-4 mm で透明であった。また、電気泳動による構成成分分析をしたところ、ミオシン、アクチンはカプセル中に目立った分解がなく含まれていることが認められた。

ミオシン導入カプセルに ATP を加えると、分解生成物である無機リン酸の遊離は、カプセル化する前のインタクト-ミオシンと比べて数分遅れ、カプセル外液に遊離していた (Fig. 1)。カプセル化ミオシンの ATP 分解活性は、インタクト-ミオシンと比べて 30-40%程度であった。

カプセルの材料として天然高分子多糖のジェラン、キトサンを使用した。ジェラン、キトサン共にミオシン ATPase 活性には影響を与えなかった。インタクト-ミオシンの  $Mg^{2+}$ -ATP 分解活性はアクチンの存在により上昇し、10 倍以上高い活性化が見られた。アクチンとミオシンを混合して導入したカプセルにおいても、アクチン/ミオシンのモル比の増大に比例して ATP 分解活性は上昇した (Fig. 2)。

以上の結果、アクチンとミオシンの両フィラメントから成るアクトミオシン複合体が安定に形成されることが示された。

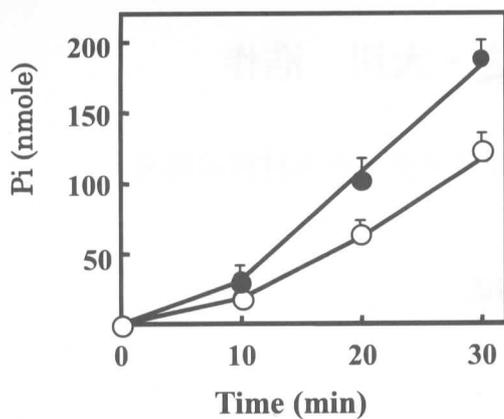


Fig. 1 Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of encapsulated myosin at low (●) and high (○) strengths.

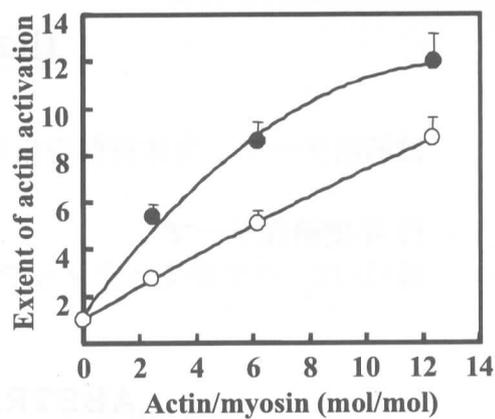


Fig. 2 Enhancement of actin on myosin Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity after encapsulation. Intact (●) and encapsulated (○) actomyosin.

## 展望

- ・ 薬剤、生体高分子をカプセル内への導入を試みる
- ・ 導入物質の放出と放出過程へのミオシン、アクチン、アクトミオシンの影響を調べる。
- ・ タンパク質分解酵素による感受性を調べる。
- ・ ATP の分解にともなう運動性の有無を調べる。
- ・ カプセル内のミオシン、アクチンフィラメントの分布状態を調べる。
- ・ アルカリンホスファターゼの毛髪フィルムへの導入にも成功しているので、アクチン、ミオシンを取り入れたフィルムの創出を行う。