

# 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

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

*Myosin is a representative motor protein distributed in skeletal and smooth muscle cells and the  $Mg^{2+}$ -ATPase activity is remarkably activated by the presence of F-actin. Myosin and actomyosin were encapsulated into the gellan-chitosan capsules. The recovery of the myosin-ATPase activity was approximately 50%. The encapsulated actomyosin complex also retained its ATPase activity, indicating the stable formation of the actomyosin complex inside the capsule. In the release tests using for two small proteins, cytochrome C and myoglobin,  $Mg^{2+}$ -ATP complex itself reduced release percentages of the small proteins from the gellan-chitosan capsules. The release percentages further decreased in coexistence of  $Mg^{2+}$ -ATP and the encapsulated actomyosin. The present study suggests that the ATPase-coupled sliding motion of the actin-myosin filaments modifies the pore size of the polymer networks in the capsule membranes.*

## 研究目的

動物にとって運動システムは必要不可欠な要素である。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。特に筋肉においての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、その他の細胞内繊維構造体に組み込み運動性をもたせれば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と薬物送達システム (DDS; Drug Delivery System) への展開を目的とする。

## 5年間の研究内容と成果

PIC カプセルの作製に関して、同じ3班の山本 (浩) & 大川 研究室には歴史があるため、共同研究として行っている。カプセル材料としてジェラン (ポリアニオン) とキトサン (ポリカチオン) の組み合わせを使用した。これらは、食用にも使用されている安全・安心な天然高分子多糖である。そして、カプセルへ封入するモデル物質としてアルカリホスファターゼを選択して、簡便な導入には成功している (Fujii, T., Ogiwara, D., Ohkawa, K., and Yamamoto, H. (2005) Preparation and characterization of alkaline phosphatase encapsulated in gellan-chitosan hybrid capsules. *Macromol. Biosci.*, 5, 394-400)。

### 低分子量タンパク質および筋肉タンパク質導入カプセルの作製

ジェラン溶液をキトサン溶液に滴下することにより、直ちにカプセルを形成した。カプセルは半透明で直径 3-5 mm の球状となった。シトクロム C またはミオグロビンを導入したカプセルは、赤褐色を示した。シトクロム C とミオグロビンは、カプセルから経時的に放出された。

カプセルに導入されたミオシンおよびアクトミオシンの分解は見られず、また、放出されることなくカプセル内部に保持された。

### 放出特性に及ぼす塩、pH、およびヌクレオチドの効果

外液のイオン強度を変化させ、低分子量タンパク質導入カプセルからのシトクロム C またはミオグロビン放出への影響について調べたところ、シトクロム C の放出量は塩濃度上昇に比例して増加した (Fig. 1a)。300 mM NaCl または KCl の共存下では、シトクロム C の放出量は塩無添加系に比べ、5-6 倍高い値となった。一方、ミオグロビンの放出量は塩濃度に対してほぼ一定であった。シトクロム

Cの等電点 (pI = 10.3) はミオグロビンの等電点 (pI = 8.1) よりも高いため、塩濃度の影響を受けやすいと考えられる。次に、pH を 6.0 から 9.8 まで変化させた溶液における両タンパク質の放出を調べた結果、シトクロム C およびミオグロビンともに、外液の pH と等電点が近い条件下で、放出量は最大となった (Fig. 1b)。等電点付近ではタンパク質は荷電が小さくなるため、タンパク質とカプセルの網目構造との間の静電相互作用が低下し、結果として低分子量タンパク質分子はカプセル内外を自由に透過するようになることが示唆された。

塩濃度と pH が一定の条件において、外液に ATP を添加した時の放出への影響を調べた結果、ATP 無添加の場合に比べ、ATP 添加系のシトクロム C の放出は 20-30%低下した。非加水分解性の ATP 誘導体である AMP-PNP、または、ピリミジン塩基の TTP を添加した場合も、同程度の放出率の低下が見られた。ATP が脱リン酸化した ADP、または、AMP を添加したとき、放出率の抑制は 10-15%であった。同様の結果は、ミオグロビンの放出実験からも得られ、ジェラン/キトサン-PIC カプセルは、ヌクレオチド感受性を示すことが分かった。

#### 筋肉タンパク質導入カプセルからの低分子量タンパク質の放出

骨格筋ミオシンは高い ATP 分解能をもつ酵素であり、アクチンはミオシンの ATP 分解活性を促進する。筋肉中において、ミオシンとアクチンはフィラメントとして存在し、両フィラメントが相互作用することで収縮-弛緩を発現している。ミオシンまたはアクチノミオシンのジェラン/キトサン-PIC カプセルへの導入を行った結果、カプセル化ミオシンの ATP 分解活性は、アクチンの共存により活性化された。そこで、シトクロム C とアクチノミオシンを導入したカプセルを作製してシトクロム C の放出率を調べた (Fig. 2)。ATP 無添加系では、カプセル内部のアクチノミオシンの導入は、シトクロム C の放出率に影響しなかった。一方、外液に ATP を添加したとき、アクチノミオシン含有カプセルからのシトクロム C の放出率は、不含有カプセルに比べて 50-55%抑制された。ミオグロビンの放出実験においても同様の結果が得られることから、アクチノミオシンを含むカプセルにおいては、ATP の添加により、低分子量タンパク質の放出率は著しく抑制されることが明らかになった。

#### 結論

ジェラン/キトサン-PIC カプセルからの放出は、導入物質の分子量、等電点に加え溶液のイオン強度、pH、ヌクレオチドの有無、さらにアクチノミオシンの共存により応答性が変化する。本研究において得られた知見は、ATP および筋肉タンパク質を利用する新たなリリースコントロール系の構築につながる。

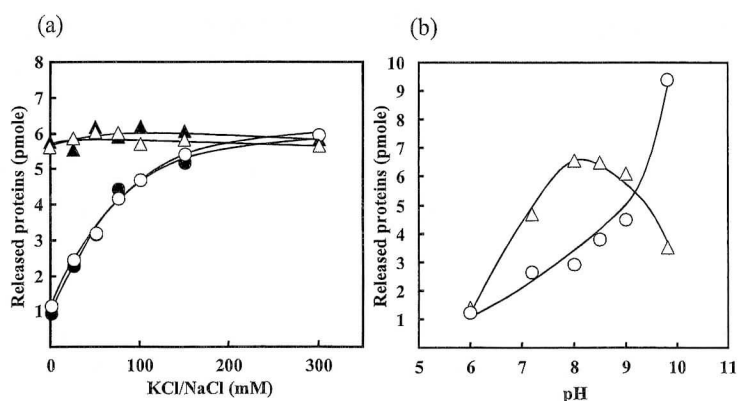


Fig. 1 Effect of salt concentrations on release of cytochrome c and myoglobin (panel a). Myoglobin was encapsulated into the gellan-chitosan capsules and subjected to the release tests in the presence of NaCl ( $\blacktriangle$ ) or KCl ( $\triangle$ ). Release of cytochrom c is also tested with NaCl ( $\bullet$ ) and KCl ( $\circ$ ). The external solution contains 5 mM  $MgCl_2$ , 20 mM Tris-HCl, (pH7.2). Effect of pH on the release of cytochrome c ( $\circ$ ) and myoglobin ( $\bullet$ ) in the presence of 75 mM NaCl (panel b).

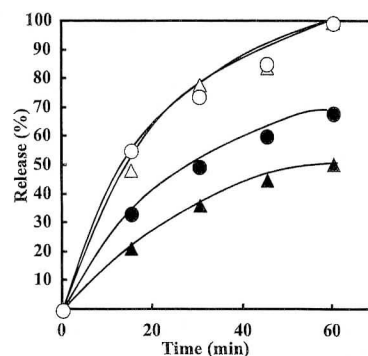


Fig. 2 ATPase-coupled release suppression of small proteins. Cytochrom c was encapsulated into gellan-chitosan PIC capsules then subjected to release tests in the absence ( $\circ$ ) and presence ( $\bullet$ ) of  $Mg^{2+}$ -ATP. Actomyosin was encapsulated together with cytochrom c then release profile of cytochrom c was determined in the absence ( $\triangle$ ) and presence ( $\blacktriangle$ ) of  $Mg^{2+}$ -ATP.