

# 膜融合ラボ

## ( Membrane Fusion Lab. )

研究項目：タンパク質誘起ベシクル膜融合機構の研究

研究期間：平成9年度～12年度

### 1. 背景

生体系では種々の超分子系(タンパク質などの生体高分子や細胞膜などの分子集合系)が役割に対応した組織構造を形成している。酸素輸送の赤血球、物質輸送のハイウェイである細胞内骨格のタンパク集合体、情報伝達の間である神経末端シナプス等々がよい例である。現在、工学的に実現されていない種々の生体機能の技術的实现を目指すとき、生体の構成要素である生体超分子系の基本特性を明らかにし、これらを自由にハンドリングすることは将来技術の基盤と考えられる。この研究では生体の情報伝達機構の一つであるシナプスにおけるタンパク質介在ベシクル融合を利用した伝達物質放出現象をお手本に、そこで行われている超分子間相互作用の機序を抽出し、その物理的側面を明らかにすることを試みた。

### 2. 研究経過と現状

この研究の枠組みでは、予算規模および研究環境を考え、分子生物学的、構造生物学的なミクロスコピックな観点からの攻め方(例えば融合促進ペプチドの機能と構造相関等)はとらず、これは他の研究グループに任せることにし、研究対象とする系の持つマクロスコピックな物理的一般則を抽出することにした。ベシクル(リボソーム)粒子間相互作用に与えるタンパク質の作用をポイントに研究を展開している。研究の組み立てとしては、(1)ベシクル-ベシクル間相互作用、(2)タンパク質-ベシクル相互作用(タンパク吸着現象)、(3)タンパク吸着ベシクル-タンパク吸着ベシクル相互作用、について実験を行った。相互作用解析の観点は物質系に存在する基本的な物質間相互作用に立つ。すなわち静電相互作用、van der Waals 相互作用、疎水の相互作用などである。生体の超分子系が存在する環境はほとんどの場合、電解質水溶液である。水溶

液中での微粒子間相互作用には真空中や空気中では見られない相互作用が現れる。物質間に普遍的に存在する静電力と van der Waals 力以外に媒質が水であるために、水素結合に原因する水和力や疎水性相互作用力、水が粘性流体であることによる流体力学的作用などを考える必要がある。さらに柔らかい生体超分子系では表面に存在する分子鎖や膜の熱運動に原因する力も寄与する。さらに、水溶液中では静電力と van der Waals 力においても物質の組み合わせによっては複雑になる。全く等価な2粒子間の場合(ホモ)の粒子間の静電力は斥力であり van der Waals 力は引力であるが、異種(ヘテロ)粒子間では、これらは条件により引力にも斥力にもなる。水の分極率に比べその大なるものと小なるものの組み合わせでは van der Waals 力は斥力になる。また、静電相互作用は粒子表面に形成される電気二重層の粒子接近の際の緩和機構に依存する。表面電荷一定での相互作用と表面電位一定での相互作用ではそれは正負まったく反転する。二粒子以上が存在する場合には、第3の粒子によるbridging相互作用、さらに浸透圧によるdepletion相互作用、多体系の相分離現象なども考慮する必要がある。

#### 2.1 ベシクル-ベシクル間相互作用について

電解質水溶液中に浮遊している膜微粒子であるベシクルはリン脂質の2分子膜で構成される含水小胞体構造である。膜を構成するリン脂質分子の基本構造は親水性の頭部と疎水性の2本の炭化水素鎖の尻尾よりなり、親水部が水溶液に面し、疎水部は水との接触を避けて二分子膜のコアを形成している。親水性部の分子構造の違いにより酸性リン脂質(pH中性領域で正味の負電荷をもつ)、両性リン脂質(pH中性領域で、正、負の電荷がバランスされて正味の電荷はゼロ)に分類される。親水基は酸性解離基の $-PO_4^-$ 、 $-COO^-$ 等、アルカリ性解離基の $-NH_3^+$ 、またその他に、水和能をもつ $-OH$ や常時正電荷をもつ $-N(CH_3)_3^+$ 等の組み合わせで構成

される。特に、膜の主要構成要素のフォスファチジルコリン(PC)は水和性の $-(\text{CH}_2)_2^+$ をもつため水和反発力(さらには膜の熱運動に原因する力)のため膜同士相互接着を阻害する。(これに関係する研究成果は先行した中項目研究テーマ「超分子の電子機能に関する研究」/“生体超分子の機能と構造”の中で報告した(電子技術総合研究所彙報 8月号,1995)。

一方、PCベシクル粒子間の静電的相互作用については、ベシクル粒子近接によるそれぞれのベシクル粒子表面に形成されている電気二重層の重なりが大きな反発作用をもたらす。この二重層は固定電荷と近似できる膜表面電荷と溶液中の対イオンの表面集積により形成されるが、この対イオンのベシクル粒子近接による再分布の挙動が相互作用の方式を決める。そこで対イオンの電気二重層内での移動度を測定することを考えた。すなわち、ベシクル表面の電気伝導度の測定である。電気二重層を流れるイオン流としてはイオンの電気伝導と媒質流れを伴う電気浸透流がある。いわゆる電導度測定ではこの両者の総和を見ているわけであるが、電気浸透流は二重層構造の拡散層に由来し、ここでは対イオンの移動度は溶液バルクのそのイオンの移動度と変わらないと考えられ、問題となるのはいわゆるStern層あるいは流体的不動層におけるイオンの移動度である。この研究では表面電位が高く電気二重層厚がベシクル粒子径に比べて十分薄い条件で(これらが事実上興味ある系である)使える近似的表現を用い、電気伝導度測定と電気泳動測定とから得られる等電気伝導度点と等電気泳動点(等電点)とをうまく用いた解析法を提案し<sup>2,3</sup>の対イオン種について二重層におけるイオン移動度を見積もった。2価イオンのCa<sup>2+</sup>などでかなりの移動度をもつことがあることがわかった。これは、これらの対イオンが存在する場合には、ベシクル粒子近接による電気二重層の重なりがあっても、いわゆる電荷制御により二重層エネルギーの緩和が起こり大きな反発作用をもたらすことはないことを示す(J.Dispersion Science & Technology, vol.20, 83-104 (1999). Colloids and Surfaces A, vol.159, 271-276 (1999) )。

## 2.2 タンパク質 - ベシクル相互作用について

タンパク質は種々のアミノ酸の重合体である。その構成アミノ酸残基の種類と配置により構造がきめら

れていると考えられる。アミノ酸残基には+や-に電荷を帯びたものや疎水性のもの親水性のものなどがある。これらの理由からたばく質は界面活性あるいは両親媒的でほとんどの材質の表面に吸着する。界面吸着に際し、タンパク質はそのコンフォメーションを変えるもの(soft protein)と変えないもの(hard protein)に大まかに分類される。また、電気的特性についてもpH中性で正味の電荷が+(塩基性タンパク質)のものや-(酸性タンパク質)のものがある。典型的なhard proteinであるLysozyme(LSZ)やCytochrom C(CC)、またsoft proteinであるBovine Serum Albumin(BSA)のリン脂質膜との相互作用を単分子膜の表面張力測定法で調べるとvan der Waals力や疎水性相互作用力に加えて静電的相互作用がかなり影響を与えている事がわかる。BSAは膜吸着に際しコンフォメーションを変えることにより疎水性相互作用を増加させ強い吸着を起こすが、LSZやCCにおいても静電相互作用が十分なとき膜吸着を起こしていることが示される。すなわち、可溶性タンパク質といえども膜面吸着現象は無視できないことを意味している。さらに、ベシクル内相に封入したプローブ分子の流出の検出実験において詳細な情報が得られる。LSZやBSAはその濃度0.01mg/ml以上で内封したプローブ分子のベシクル膜をとおしての流出を促進する。これは両タイプのタンパク質においても膜構造の破壊を促すことを示している。注目するのは静電的に膜面吸着をおこすLSZにおいても膜構造の変化を起こすことである。LSZの膜不安定化に対する作用は共存するイオン濃度の増加とともに単純に弱くなることから静電相互作用が支配的なことが示されるが、BSAの膜不安定化に対する作用は共存するイオン濃度に対して複雑な挙動を示す。この原因については現在よくわからない(Colloids and Interfaces B, vol.6 165-172 (1996). Colloids and Interfaces B, vol.8 287-294 (1997).)。

膜表面での吸着タンパク質の形態とくに表面に現れる親水性アミノ酸残基と疎水性残基の割合はその後の膜間相互作用に大きな影響を与えると考えられる。すなわち、疎水性引力相互作用と親水性(水和)反発相互作用とでは正反対の効果をもたらす。これまで、界面吸着したタンパク質表面の疎水・親水性に関する報告はなかった。そこで、われわれは界面吸着タンパク質表面の性状を観測する方法を開発し種々の

モデルシステムに適用して調べた。採用した種々のタンパク質と種々の表面(界面)との組み合わせにより細かい様相は異なるが、一般論として、疎水の表面でも親水の表面でもタンパク質の吸着量が増すほど吸着タンパク質層表面は親水性になる事が示された。しかし、特定の組み合わせ、例えば、親水性表面とBSAなどでは吸着量が少ない時点では疎水性を増加させることがあることがわかった。これらは吸着タンパクの量がタンパク吸着相をもつベシクル間の相互作用の重要な因子の1つと考えてよい事を示す。(特許 第2782502号. Colloids & Surfaces B, vol.8 181-188 (1997). Careis Research, vol.33, 473-478 (1999). Colloid Polym. Sci., vol.277 1058-1064 (1999))

タンパク吸着層をもつベシクル表面の電気的性質はこの粒子間の静電的相互作用を考える上で重要である。このようなベシクル粒子表面の電気二重層の動的特性については現在研究を進行中である。

### 2.3 タンパク吸着ベシクル - タンパク吸着ベシクル相互作用について

タンパク質が吸着したりポソーム粒子間の相互作用はこれら粒子の会合現象(図)の測定から調べる事ができる。特に、タンパク質が共存する溶液中でタンパク質分子を橋架けとしたりポソームの会合現象を分散系試料の光学的特性や顕微鏡画像から運動論的に追跡する方法が適している。タンパク質とベシクルが共存する環境ではサブミクロンからミクロン程度のサイズのベシクル同士が出会う時間に比べタンパ

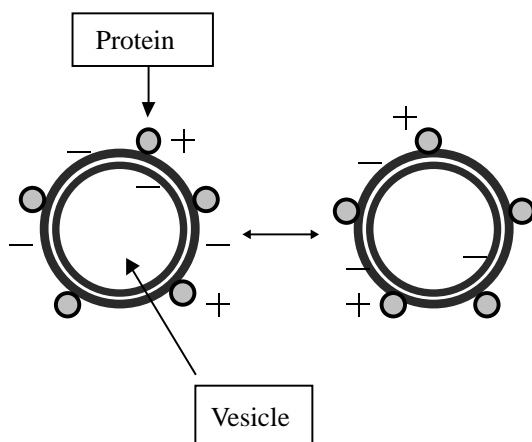


図 タンパク質誘起ベシクル相互作用

クはきわめて小さいためベシクル膜表面への吸着現象が先行する。タンパク質が表面に吸着したベシクル粒子間の会合反応の速度は拡散項とポテンシャル障壁項(高さ)と形に依存)とで表わされ、タンパク質の種類により変化するが、いずれも拡散律速でおこる急速凝集反応よりずっと遅く反応律速を示す。反応速度の各種イオン濃度依存性を調べると会合反応には静電的相互作用が大きな要因を占めていることがわかる。通常負に帯電しているベシクル表面の電荷量はタンパク質の吸着で減少する傾向を示す(LSZやCCやBSAでも同様な傾向である)。これは、タンパク質の界面吸着時に起こるイオン共含現象が主要な原因となっているものと考えられる。すなわち界面境界層の対イオン濃度の増加が静電的中和を促進するためベシクル間の反発力を減らす。このためLSZやCCの吸着では共存電解質濃度が極めて低くても会合を導く。しかし、BSAの場合は同様な条件では会合反応を起こさない。これはBSAのようなソフトタンパク質の場合は、イオン共含現象だけでなく吸着時のコンフォメーション変化とそれにもなう膜側の再配置等で全エネルギー極小の実現をはたすため、BSAはbridging会合反応に適さない状態になっていることが考えられる。たとえば、吸着BSA表面にあらわれる親水性残基による水和反発力効果があげられる。しかし、いずれの系も対イオン濃度の増加により電気二重層厚が小さくなると会合を起こす。これらは静電ポテンシャルによる障壁の形が重要な要因であることを示している。もちろん、これ以外の因子例えば膜の運動性やタンパク質のパッキング密度なども重要な因子であるがこれらについてはさらに系統的な研究が必要と考えている。

(Langmuir, vol.13, 6516-6523 (1997).

Langmuir, vol.14, 5438-5445 (1998).

J. Colloid & Interface Sci., vol.226, 44-50 (2000).)

### 3. 期待される効果

- a) ベシクルの膜透過コントロール技術の実現は薬物の集中投下・徐放等の医療分野への応用。
- b) タンパク質吸着層表面性状の測定法はバクテリア吸着のコントロールを介し衛生学領域への応用。

#### 4. 今後の展開

- a) 外部遠隔操作可能な医薬用複合微粒子を利用したバイオメディカルエレクトロニクス
- b) 生体成分吸着層の表面性状測定法の改良とその衛生学・医歯学領域への応用

#### 当該研究担当者等

##### 1) ラボ構成員(総数6名)

職員(4名) 松村英夫\* ,羽生義郎 ,真島利和(超分子部),  
山田 亨(量子放射部)

職員以外(2名) 古明地 勇人 ,清水秀明(超分子部併任)

##### 2) その他の研究協力者

川崎弘二(大阪歯科大),神原正樹(大阪歯科大),楊博(筑波大),古沢邦夫(筑波大),マリアナ・デイミトロバ(ブルガリヤ生物物理研),ワシル・ネイチェフ(ブルガリヤ生物物理研),ルーメン・ツェコフ(ブルガリヤ・ソフィヤ大),スペトラーナ・ベルビッチ(ウクライナ・科学アカデミー),スタニスラフ・デューヒン(ウクライナ・科学アカデミー)

\*ラボリーダー