

学 位 論 文 題 名

Cooperative Molecular Adsorption and Surface Characteristics of Cell

(協同的分子吸着と細胞表面特性)

学位論文内容の要旨

我々の体の構成成分である細胞は水やタンパク質など生きるために必要な物質を含み、物質の取り込みは拡散やエンドサイトーシスにより行われる。現在、特定の細胞に生理活性物質や薬を取り込ませる手法や遺伝子治療が次世代の治療として期待されており、これら物質と細胞との相互作用を研究することは大変重要となっている。しかし、細胞膜は脂質やタンパク質、糖鎖からなる複雑な系であり、様々な相互作用が混在するため統一的に理解するのは困難である。従来より細胞と分子との相互作用の研究は赤血球ゴーストやリポソームを用いて行われているが、赤血球は核を持たない特殊な細胞であり、リポソームは脂質のみからなる均一な表面であるため、必ずしも細胞のよいモデルとは言えない。

そこで本研究では酵母の細胞壁を酵素処理することによって得られる酵母プロトプラストを用いて、様々な物質との相互作用を系統的に解析することを目的とした。解析には高分子ゲルと界面活性剤との相互作用で用いてきた手法を導入するという試みをおこなった。高分子ゲルは内部に溶媒を保持し、電気や温度などの物理信号に応答して膨潤、収縮、変形する。またゲルは物質を内部に取り込んだり、粘弾性を有するという点において細胞を単純化した模倣物と考えられる。本研究ではゲルという単純な系での分子との相互作用の解析法を細胞に導入することで、従来では系統的に理解できなかった細胞と界面活性剤、ポリマー、およびタンパク質との相互作用をできるだけ定量的に検討することを試みた。

本論文は第1章の序論、第2章から6章までの本論、および第7章の結論から構成されている。

第2章では2-アクリルアミド2-メチルプロパンスルホン酸(AMPS)とN-イソプロピルアクリルアミドの共重合ゲルを合成し、カチオン性界面活性剤との相互作用を検討した。この共重合ゲルはAMPSのスルホン酸ユニットと界面活性剤がイオンコンプレックスを形成することにより吸着、収縮するという従来のPAMPSゲルに見られた現象だけでなく、ゲル内のスルホン酸基の量に対して過剰量の界面活性剤を吸着し、再膨潤するという特異的

な現象を示し、分子配列が界面活性剤の協同的な吸着を制御することを明らかにした。

第3章では酵母プロトプラストとカチオン性界面活性剤との相互作用について検討した。界面活性剤がプロトプラストに定量的に吸着することを見だし、界面活性剤のゲルへの吸着の解析法を応用することにより、その吸着量と協同性が界面活性剤のアルキル鎖長に依存することを明らかにした。ゲルと比較すると界面活性剤は協同的に細胞に吸着、浸透しており、これは細胞膜を構成する脂質二重層および種々の小器官との疎水性相互作用に起因すると考えられた。

第4章では種々の高分子とプロトプラストの相互作用について検討した。カチオン性高分子、アニオン性高分子、非イオン性高分子、疎水性基を有する主鎖荷電型高分子、およびタンパク質(アルブミン、BSA)をプロトプラスト懸濁液(pH 6)と混合し、細胞の生存率を濁度変化により解析した。カチオン性高分子はあるカチオン濃度で細胞の破壊を生起させ、細胞生存率は濃度に依存して経時的に減少した。細胞表面が負に帯電していることから静電的相互作用によりカチオン性高分子が細胞に吸着していることが示唆された。また主鎖荷電型で炭素数12を有するカチオン性高分子はその細胞生存率の経時変化より瞬時に細胞を破壊していることがわかり、側鎖荷電型高分子とは異なるメカニズムで細胞と相互作用していることが明らかにされた。細胞を破壊する濃度は界面活性剤が吸着し始める濃度と一致し、カチオン性高分子は細胞表面に吸着すると協同的に細胞を破壊することがわかった。また細胞の破壊を速度論的に解析する試みを行い、速度定数は高分子が細胞に吸着する濃度で急激に増加し、反応速度が吸着平衡により決定されることが明らかにされた。以上のことから細胞と高分子との相互作用は、電荷だけでなく疎水性、特にアルキル鎖長に依存することが速度論的、平衡論的解析により明確にされた。一方、正電荷、負電荷、および疎水性部を兼ね備えたBSAは細胞を破壊せず、細胞表面に吸着して細胞膜を不安定化していることが浸透圧変化を施すことにより明らかにされた。

そこで第5章ではBSAの細胞への吸着挙動を検討、解析した。BSAは浸透圧の維持、脂溶性物質の運搬体として血液に含まれる最も多いタンパク質である。また薬物キャリアーとしての利用も期待されており、細胞との相互作用を明確にする意義がある。BSAは細胞に吸着し、ラングミュアー型の等温吸着線が得られた。塩添加により吸着が抑制されたこと、エンタルピー変化が負であったこと、吸着のpH依存性がゼータ電位のpH依存性に対応したことから静電的相互作用が支配的であることがわかった。吸着挙動は膜の流動性に依存せず、BSA吸着後の膜の流動性にも変化がなかったことから、BSAは膜タンパク質に吸着していることが示唆された。しかし飽和吸着量はBSAが細胞表面を均一に覆った量に相当し、膜タンパク質の細胞膜中での占有面積が小さいことから、膜タンパク質のみでなく脂質の極性基とも静電的相互作用により吸着していると考えられた。

第6章ではBSAに高分子を化学修飾した複合体の細胞への吸着挙動を検討した。近年タ

ンパク質製剤の開発において、高分子修飾することにより免疫原性が低下することから種々の高分子-タンパク質複合体の研究がされているが実際に分子レベルで細胞との相互作用を検討した例はない。そこで本章ではポリエチレングリコールで修飾したBSAおよび、温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアクリルアミドで修飾したBSAの細胞への吸着挙動を未修飾のBSAの吸着挙動と比較検討した。

第7章では以上の内容を総括して結論とした。酵母プロトプラストを材料とし、細胞を単純化したゲルへの界面活性剤の吸着の解析法を用いることで、細胞と分子の相互作用は静電的、および疎水性相互作用による分子の協同的吸着により説明できることが初めて明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 田 義 仁
副 査 教 授 西 則 雄 (大学院地球環境科学研究科)
副 査 教 授 新 田 勝 利
副 査 助 教 授 糞 剣 萍
副 査 教 授 緒 方 直 哉 (上智大学理工学部化学科)

学 位 論 文 題 名

Cooperative Molecular Adsorption and Surface Characteristics of Cell

(協同的分子吸着と細胞表面特性)

生体の最小構成体である細胞は様々な物質が混在する複雑な表面を持つために、今まで物質との相互作用は統一的に理解するのが困難であった。しかしながら近年、バイオテクノロジーやバイオメディカルの分野において高分子と生体との相互作用は材料として、また医薬そのものとして大変重要になっており、高分子がどのように細胞と作用し、どのような影響をもたらすかを研究することは意義のあることである。

本論文はこのような現況にある細胞と分子の相互作用についてその吸着挙動を定量的に評価し、結果として生じる細胞の表面の変化を調べたものである。一般的にカチオン性高分子が細胞と強く相互作用することが知られているが、著者は電荷での分類だけでなく、側鎖荷電型カチオン性高分子および主鎖荷電型カチオン性高分子分子、両性電解質であるタンパク質血清アルブミンを用いてその協同的吸着が細胞の変形、破壊などを生起させることを明らかにした。

これらの解析法に著者は高分子ゲルへの界面活性剤の吸着挙動の解析法を応用した。これは今までにない試みである。高分子ゲルは内部に溶媒を包括し、物質

の出入りが自由であり、その粘弾性的性質を有する点においても細胞に類似している。高分子ゲルへの界面活性剤の吸着と細胞への分子の吸着は両者の構造が異なるにも関わらず協同的におきることは大変興味深く、吸着のメカニズムを解明することは今後さらに新しい研究分野としての発展が望まれる。

これを要するに、著者は、細胞への分子吸着において分子の電荷や構造が吸着挙動に大きく依存し、それを定量的に解析することによって多くの新知見を得、新たな研究への動機づけに対しても貢献するところ大なるものがある。

よって著者は北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格ある者と認める。