総説

人工酵素，人工膜のダイナミクスと分子認識

知恵よ，こい願くば，おれに立派な阿呆をやらせておくれ。シェイクスピア「十二夜」

京都大学工学部合成化学科 黒田 裕久
McGill 大学人工細胞・臓器研究所 西谷 孝子

From viewpoint of molecular recognition, the dynamic aspect of cyclodextrin inclusion complex and artificial bilayer membrane are discussed. The relaxation times of deuterated guest in cyclodextrin cavities and CD spectra of synthetic azo-lipid in liposomes are shown to give highly useful informations on these biomimetic systems.

Host-Guest/Cyclodextrin/Relaxation Time/Liposome/Circular dichroism/Molecular Recognition

はじめに

地球上の生物は，常温を中心にたかだか百数十度の温度幅の中で活動しているが，この温度範囲内では，液体中の分子は，激しい熱運動を行っていることが知られている。一方，生体系がその活動を維持するためには，小は酵素・レセプター基質間の相互作用，大は細胞間の組織化相互作用に至るなんらかの秩序化を必要とし，生体系が“負のエンドロピー”を食べていると言われる所以となっている。このような秩序化された分子系あるいは分子集団自体もまた当然熱的感乱を受けていると考えられるが，その秩序化—分子レベルで見た時の「分子認識」—と熱的運動の関係は必ずしも明らかではない。ここでは，生物有機化学の立場から，このような生物型分子認識を単純化・モデル化した系として，シクロデキストリン包接錯体および人工リポソーム膜を取りあげ，そのダイナミクスについて筆者らの研究を中心に紹介したい。

1. シクロデキストリン包接孔中での基質の運動

シクロデキストリンは，古く1891年に Villiers らによって *Bacillus Maccranns* の生産するオリゴ糖として

Dynamic Aspect and Molecular Recognition of Artificial Enzyme and Membrane.

Yasuhisa KURODA
Takako NISHIYA*

Department of Polymer chemistry Kyoto University
Artificial Cell & Organs Reserch Center, McGill University*

見い出されているが，その特異な包接現象が酵素・レセプターのモデル化において極めて有用なものであることが認識されたのは1950年頃からの Cramer らの一連の研究によるところが大きい¹⁾。その後，適切な分子デザインのもとに合成された修飾シクロデキストリンが種々の酵素モデルとなることが示され，現在までに数多くの誘導体が合成されてきている²⁾。この間，無置換シクロデキストリンについて，分子孔内に取り込まれた有機分子の運動を ESR，¹³C-NMR 等を用いて評価することが試みられ，多くの基質が分子孔中で比較的自由な回転運動をしていることが見い出されてきた³⁾。しかしながら，修飾基を導入し，その分子認識能を変化させた時，基質の運動がどのような変化を受けるのかは，よく知られていなかった。筆者らは，この点に検討を加える目的で，図1に示す各種置換β-シクロデキストリンを合成し，重水素でラベルしたp-メチルケイ皮酸(G)をゲストとして，その分子孔内での運動を明らかにすることを試みた⁴⁾。重水素は，いわゆる四極子緩和機構による緩和を示し，このような系の分子運動の評価には有力な手段となることは既に Lehn らによって示されている⁵⁾。また，ここで用

図1. シクロデキストリンホストとD化p-メチルケイ皮酸

表1. シクロデキストリンホストに包接されたGの緩和相関時間と会合定数^{a)}

Host	$K_{ass}(M^{-1})$	$\tau_q^M(ps)$	$\tau_q^i(ps)$
b)	—	20 ± 1	$< 1^c)$
CD(CO ₂) ₂	280 ± 30	51 ± 4	— ^{d)}
CD	440 ± 50	73 ± 2	19 ± 5
CD(N ⁺)	720 ± 60	106 ± 10	53 ± 10
CD(N ⁺) ₂	800 ± 100	160 ± 5	5.1 ± 2
Cap	3200 ± 500	270 ± 13	$< 1^c)$
CDI ₂	7400 ± 700	122 ± 22	$< 1^c)$

a) D₂O中, pD=7.0, 35°C. b) ホスト分子を入れない場合

c) 実験誤差限界以下 d) broad peak の為規定せず.

いたゲスト(G)は, オレフィン部とメチル基に2つの重水素原子を有し, 前者の緩和から分子全体の運動を, 後者の緩和からメチル基の局所運動を同時に評価することができる. 表1にこれらの分子とGの会合定数および包接されたGについて得られた重水素緩和の相関時間を示す. 表1より明らかなように, 会合定数は, ホストへのアンモニウム基導入によるクーロン引力によって増大し, カルボン酸アニオン導入によるクーロン反脱によって減少する. さらに, ジョード体, Capped シクロデキストリンでは, その疎水性相互作用の増大によって会合定数の大幅な増大が見られる. これらの結果は, 既に田伏らがシクロデキストリン系で示した相互作用の加成性が成立していることを示している⁶⁾. さて, ここで興味深いのは, これらのホスト-ゲスト系でゲスト分子全体の運動の目安となる τ_q^M (オレフィン部重水素の緩和相関時間) は, ジョード体を除いて会合定数の大きなホスト中ほど大きくなる(運動が減速される)傾向を示している点である. これは, ホスト-ゲスト間の相互作用が強いほどゲストの運動は大きく減速されることを意味し, 一見当然のようにも考えられるが, ゲストの運動減速はホスト-ゲスト錯体生成の際のエントロピーロスによる $-\Delta G$ の減少をもたらす一即ち錯体の不安定化要因となる一ことを考えれば必ずしも当然のことではない. 特に, シクロデキストリン自身の運動相関時間が400~700 psと推定されていることから考えて, Capped シクロデキストリン中でのGの運動はホストに対して相対的にほとんど停止していると言えるほど減速している. このことは, この系の大きな会合定数と合わせて考えると注目に値する. この会合定数と相関時間の関係は, 会合過程に伴う自由エネルギー変化(ΔG_{ass}°)および

相関時間から得られるGの回転運動に対する活性化エネルギー($\Delta G_M^\ddagger$)を式1, 式2より算出して比較するとより明らかになる. 即ち,

$$\Delta G_{ass}^\circ = -RT \ln(K_{ass}) \quad \text{式1}$$

$$\Delta G_M^\ddagger = RT \ln\left(\frac{kT}{h} \tau_q^M\right) \quad \text{式2}$$

ΔG_{ass}° と $\Delta G_M^\ddagger$ の間には比較的良好な傾きはほぼ1の直線自由エネルギー関係が見られる. ここでは紙面の都合で詳しい説明は省略するが, これらの結果は, 図1の一連のホスト中では, Gの回転の活性化状態がエネルギー的に非常に似た状態にあると考えると最も統一的に説明が可能となる⁷⁾. 一方, メチル基の緩和相関時間(τ_q^i)にはこのような会合定数との関係は見られず, ゲスト分子の局所運動は相互作用の大小に無関係に見える. またホストの構造をここで述べた β -から α -シクロデキストリンに変化させたり, ゲストをトリプトファンに変えたりするようなホスト-ゲスト系の大きな構造変化を行うとゲスト分子の全体運動に対しても上述の関係は成立しなくなることが明らかとなっている^{5), 8)}. このように, いくつかの例外がある点および調べられたホスト-ゲスト系の種類が少ない点から見て, このような直線エネルギー関係がどの程度の一般性をもつのか, さらに, どのような条件下で成立するのかは今の所不明である. しかし, この問題は分子認識の動力学として興味深い問題を含んでいると考えられると共に, 今後さらにより精密な分子認識を行うホスト分子の設計に重要な基礎データを提供する可能性があることから, 一層広範なホスト-ゲスト系での研究によるデータの蓄積が望まれるところである.

2. 人工細胞内での脂質, 蛋白質のダイナミックス

“人工細胞(Artificial Cells)”という言葉は, カナダ, McGill 大学医学部のChang教授によって, 1972年, 彼の著書⁹⁾の中で使われたのが最初であろう. Chang教授が当時考えていたのは, 単純な高分子マイクロカプセルであったが, 現在我々が扱っている人工細胞は, 単純な細胞の構造モデルから, 細胞の機能のいくつかが人工的に再現された, かなり高度なもので, さまざまである. 1964年, Bangham教授が見出したリボソームは, 区画形成や細胞構成成分の保持といった細胞の静的機能はもちろんのこと, 動的機能, 例えば, 物質の選択的能動輸送, 膜を介しての電子やエネルギーの移動, 細胞間の情報伝達なども, 合成蛋白質, 人工酵素, 人工DNAなどとのアセンブリによっ

て発現可能である。

生体膜の動的変化は、細胞内にアセンブリされている物質の機能発現にとって大変重要である。特に、脂質-蛋白質相互作用については、リポソーム系を用い、ESR, NMR, 熱分析, 蛍光, 電子顕微鏡, 小角 X 線回折などによる研究が行われている。筆者の研究室では、L- α -ホスホリルコリンの不斉炭素近傍に、トランスアゾベンゼン側鎖を持つ CD 活性ホスファチジルコリン (CDPC) を合成し、CDPC を含むリポソーム

図 2. CD 活性ホスファチジルコリン

ム膜が、安定で、芳香環の影響なく通常のリン脂質から成るリポソーム膜と同様の熱的挙動を示すこと、さらに、温度、CDPC の含量、他の膜構成成分などの変化によって起きる膜の動的変化に応じて、特徴的な CD スペクトルを示すことを見出した¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。

この CDPC を含むリポソーム膜を用いて、バクテリオロドプシン (BR) を再構成し、温度変化による BR の 3 量体から単量体への解離、および CDPC の相転移を CD スペクトルおよび熱測定によって観察した。BR の 538 nm の CD 強度と CDPC の 314 nm の CD 強度の温度依存性を図 3 に示す。脂質/蛋白比 (L/BR) が 16 のリポソーム膜では BR の解離と CDPC の相転移温度は約 45°C で同時に観測された。BR の解離温度と CDPC の相転移温度は、L/BR が 53 の場合は、それぞれ 35°C および 37°C、L/BR が 96 では、それぞれ、23°C および 28°C と変化した。L/BR が 96 のリポソーム膜内の BR のリジン残基を、ジメチル-3, 3'-ジチオビスプロピオネイトを用いて架橋すると、BR は 40°C でも解離せず、3 量体として膜内に存在し、CDPC の相転移温度は BR を架橋しない時と比べて 4°C 上昇した。架橋をメルカプトエタノールによる S-S 結合還元によってはずすと転 BR の解離と CDPC の相転移は、架橋しない場合とほぼ同じ温度で観測された。温度変化による BR および CDPC の CD スペクトル変化は、温度を上げて行く場合と下げて行く場合とで、ちがいがみられた。このヒステリシスは、L/BR の値が小さくなると減少した。以上の結果は、i) BR 再構成膜では“boundary lipid”が存在すること、ii) BR の解離、会

図 3. BR, CDPC を含む 2 重膜の CD 活性温度依存性
◇(314nm), ◆(538nm), L/BR=16; ○(314nm), ●(538nm), L/BR=53; □(314nm), ■(538nm), L/BR=96; △(314nm), ▲(538nm), L/BR=96 (crosslinked liposomes)

合と、脂質の動的変化はお互いに影響を及ぼしあっていることを示唆している^{15,16)}。

さらに、CDPC を含むリポソーム膜を用いて、ハチ毒の生理活性物質の 1 つであるメリチンと膜の相互作用について検討した¹⁷⁾。CDPC と卵黄レシチン (EPC) とのモル比が 1 : 1 のリポソーム (50% CDPC-EPC-リポソーム) と EPC 100% のリポソーム (EPC-リポソーム) との間では、CDPC の移動がおり、20°C (50% CDPC-EPC-リポソームはゲル状態) と 50°C (50% CDPC-EPC-リポソームは液晶状態) で、半減期はそれぞれ 24 hr と 2 hr で最終的には、25% CDPC-EPC-リポソームの CD スペクトルが観測された。メリチン存在下、20°C では、メリチンと膜との相互作用による特徴的な CD スペクトル (CD 強度の増大および CD バンドのシフト) を示し、半減期 1.5 hr で速かに、25% CDPC-EPC-リポソームへと変化した。50°C では、メリチンの影響はみられなかった。CDPC とコレステロールのモル比が 1 : 1 のリポソーム膜 (50% CDPC-CHO-リポソーム) では、20°C でも 50°C でも膜は液晶状態で、50% DPC-CHO-リポソームと EPC-リポソーム間での CDPC 移動速度はほぼ一定で、半減期約 15hr である。メリチン存在でも、この値は変化せず、CD スペクトルも影響はみられなかった。これらの結果は、メリチンがゲル状態の膜の脂質間相互作用に影響を及ぼし、脂質移動を加速していることを示している。以上のように、CD 活性リポソーム系は、脂質-脂質相互作用及び、脂質-蛋白質相互作用の研究に、きわめて有効である。

結 語

ホスト・ゲストあるいはリポソーム膜における分子認識とそのダイナミックスの関係については、従来十分な研究がなされておらず、特にその定量化については今後の研究に待つところが大きい。しかしながら、この問題は、たとえば人工酵素による光学誘導反応において基質運動をどの程度規制する必要があるのか、あるいはリポソーム膜内に機能性分子をうめ込む際に膜の流動性、機能性分子の縦・横運動をどの程度制御する必要があるのかを明らかにし、さらに、人工酵素、機能性リポソームの設計においてどのような分子設計が必要かつ最適であるのかを見通すために、ぜひとも解明される必要があると考えられる。

本項において述べた研究がこれらの問題解明に対する一助となれば幸いである。

文 献

- 1) Tabushi, I., Kuroda, Y. (1983) *Adv. Catal.*, **32**, 417.
- 2) Croft, A. P., Bartsch, R. A. (1983) *Tetrahedron*, **39**, 1417.
- 3) a) Flohr, K., Paton, R., Kaiser, E. T. (1975) *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1277.
b) Uekama, K., Hirayama, F., Koinuma, F. (1977) *Chem. Lett.*, 1393.
- 4) Tabushi, I., Kuroda, Y., Yamada, M. (1988) *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1413.
- 5) Behr, J. P., Lehn, J. -M. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1413.
- 6) Tabushi, I., Shimizu, N., Sugimoto, T., Shiozuka, M., Yamamura, K. (1976) *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7855.
- 7) Kuroda, Y., Yamada, M., Tabushi, I. (1989) *J. Chem. Soc., Perkin II*, 1409.
- 8) Tabushi, I., Kuroda, Y., Yamada, M. (1988) *J. Inclusion Phenomena*, **6**, 599.
- 9) Chang, T. M. S. (1972) *Artificial Cells*. Medical Information Services Inc.
- 10) Tabushi, I., Nishiya, T. (1986) *Tetrahedron Lett.* **27**, 4589.
- 11) Nishiya, T., Tabushi, I. (1987) *J. Chem. Soc. Jpn.* **3**, 256.
- 12) Nishiya, Y., Tabushi, I., Kugimiya, S., Okumura, Y. (1987) *J. Chem. Soc. Jpn.* **11**, 2205.
- 13) Nishiya, T., DasGupta, M., Okumura, Y., Chang, T. M. S. (1988) *J. Biochem.* **104**, 62.
- 14) Nishiya, T., Okumura, Y., Chang, T. M. S. (1988), *Chem. Phys. Lipids*, **49**, 69.
- 15) Nishiya, T., Tabushi, I., Maeda, A. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**, 836.
- 16) Nishiya, T., Maeda, A. (1989), *Chem. Phys. Lipids*, in print.
- 17) Nishiya, t., Chang, T. M. S. (1989) *Chem. Phys. Lipids*, **51**, 83.

くろだ やすひさ

1976年 九州大学薬学部 薬博.
1977年より京都大学工学部合成化学科助手.
趣味は音楽鑑賞, 将棋, 読書.

☎075-753-5657

にしや たかこ

1983年 京都大学工学部 工博.
1983年~1986年 JSPS 奨励研究員および特別研究員.
1986年よりMcGill 大学医学部助教授.
趣味はピアノ, 音楽鑑賞, テニス, スキー, ドライブ.
連絡先 Artificial Cell & Organs Research Center, 3655 Drummond Street, Montreal PQ, Canada, H3G146

☎514-398-3513