(日本化学会誌, 1980, (7), p. 1178~1180)

© 1980 The Chemical Society of Japan

リボソーム中における水-銅クロロフィル相互作用の プロトン NMR による研究

(1979 年 10 月 16 日 受理)

円満字 公 衛*・伊 藤 忠 直**

1 緒 言

テフロン板中に開けた小穴に脂質をはけなどで塗りつけてできる脂質 2 分子膜 (黒膜) 中に含まれたクロロフィルは黒膜の親水基近くに位置すると考えられている¹⁾²⁾。このような脂質とクロロフィルとの配置関係を知ることは生体内でのクロロフィル相互間のエネルギー伝達機構と膜構造の解明に対して大きな示唆を与えると考えられる。クロロフィル分子は相互作用している分子の核スピン緩和に対して影響を与えないが、マグネシウムを銅に置換した銅クロロフィル (以下 Cu-chl と略記する) は核スピンの緩和に対して大きな影響を与えるので、磁気共鳴を用いた研究においてはクロロフィルのモデル分子として使用できることが知られている^{3)~5)}。

このことからリボソーム中におけるクロロフィル分子の配置も Cu-chl を含む卵黄レシチンのリボソーム分散液のプロトン緩和現象から調べることができると考えられる。著者らは Cu-chl の水プロトンへの緩和効果を測定することにより、Cu-chl のポルフィリン環がリボソームの疎水領域でなく、親水領域に存在することを確かめた。この結果は、レシチン分子のプロトンに対する Cu-chl の影響を重水中に分散したリボソームによって調べ、レシチンのメチル基、メチレン基、末端メチル基の順にこれらが Cu-chl のポルフィリン環から遠くなることから裏づけられる。

2 実 験

2.1 試料の調製

市販の Cu-chl (半井化学製) をショ糖を固定相とするカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた Cu-chl の可視吸収スペクトルは 408nm と 667nm に吸収帯を示し、Cu-chl *a* であることがわかる。

比較に用いた銅クロロフィリン (以下 Cu-chln と略記する) はすでに報告した方法によって得た標品を使用した⁶⁾。

卵黄レシチンは Faure 法で調製した⁷⁾。

2.2 水プロトン緩和時間を求めるためのリボソームおよび Cu-chl を含むリボソームの水分散液

リボソーム水分散液: 卵黄レシチンを秤量し、これに 50% D₂O-H₂O を加え、20kHz Branson 超音波発生器で分散した。

Cu-chl を含むリボソーム水分散液: 卵黄レシチンと Cu-chl とを別々に秤量し、それぞれベンゼン溶液とする。これらのベンゼン溶液を所定のレシチン-Cu-chl 混合比になるように混合し、その後窒素気流下でベンゼンを除去し、Cu-chl を含むペースト状のレシチンとした。これに 50% D₂O-H₂O (pH 7.0, 50mmol/l リン酸緩衝液) を加え、超音波を照射して分散した。この Cu-chl を含むリボソーム水分散液を 3000×g で 10 分間遠心し、リボソーム中に含まれなかった Cu-chl を除去し、得られた均一的水分散液を試料とした。このとき、Cu-chl のモル比がレシチンに対して 1/5 の試料までは遠心分離される Cu-chl はなかった。これ以上の Cu-chl を混合するとリボソームに含まれなかった一部の Cu-chl が沈殿として分離される。

2.3 レシチン分子のプロトン緩和時間を求めるためのリボソーム D₂O 分散液

レシチン分子のプロトンに対する Cu-chl の影響をみるための試料は Cu-chl を含むペースト状のレシチンをリン酸緩衝液 (pH 7.0, 50mmol/l, 重水溶液) に分散して 3000×g で遠心し、その上ずみを試料とした。また Cu-chl を含むペーストをクロロホルム-*d* に溶かして試料とした。

2.4 リボソームに含まれた Cu-chl の定量

Cu-chl を含むリボソームの水分散液 0.5ml に 2ml のアセトンを加えて溶液としたのち、667nm における吸収強度からリボソームに含まれた Cu-chl の量を求めた。

2.5 測 定

NMR 縦緩和時間 (T_1) の測定: T_1 の測定は日本電子製 PS-100 高分解能 NMR 測定装置と FFT-100 パルス発生装置および JEC-100 スペクトラム・コンピューターを組み合わせたパルス・フーリエ・トランスフォーム装置を使用し、180°-π-90° パルス法によって行なった。

3 結果 と 考 察

3.1 Cu-chl を含むリボソームによる水プロトンの縦緩和時間

Cu-chl の含有量を変えたリボソームの 50% D₂O-H₂O 分散液の水プロトンの縦緩和時間 T_1 * を測定して図 1 の結果を得た⁷⁾。

6) M. Faure, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 32, 503(1950).

7) このとき誤差は T_1 を求めるのに使った最小二乗法によって 5% 以内であることが確認された。

* 三菱電機株式会社中央研究所, 661 尼崎市南清水字中野

** 京都大学理学部生物物理教室, 606 京都市左京区北白川追分町

- 1) F. Podo, J. E. Cain, J. K. Blasie, *Biochim. Biophys. Acta*, 419, 19(1976).
- 2) P. Nicholls, J. West, A. D. Bangham, *ibid.*, 363, 190 (1974).
- 3) 円満字公衛, 日化, 1977, 438.
- 4) 円満字公衛, 日化, 1978, 1317.
- 5) K. Enmanji, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 1275(1979).

Fig. 1 Cu-chl concentration dependence of longitudinal relaxation rates of water protons

ただし, T_{1p} は

$$\frac{1}{T_{1p}} = \frac{1}{T_1^*} - \frac{1}{T_1^0} \quad (1)$$

で定義される。ここで, T_1^0 は Cu-chl を含まないリボソーム存在下での水プロトン縦緩和時間である。図 1 で $1/T_{1p}$ は Cu-chl 量に比例して大きくなる。このことはリボソーム中での Cu-chl が会合していないで Cu-chl のポルフィリン環がリボソームの外に出ているか, あるいは, ポルフィリン環はリボソームの疎水基に囲まれてはいるが, リボソーム中を水分子が自由に通過できるために, 水分子と十分な相互作用をもつことを示している。

Cu-chl を含むリボソームによる水プロトンの T_1 を求める場合においては, (2)式で定義されるような T_{1B} を用い温度 T に対して依存性をもつ交換相関時間 τ_M と真の緩和時間 T_{1M} とによって表わすことができる⁸⁾。

$$\frac{1}{T_{1B}} = \frac{1}{f} \left(\frac{1}{T_1^*} - \frac{1}{T_1^0} \right) = \frac{1}{\tau_M + T_M} \quad (2)$$

$$\tau_M = \tau_M^0 \exp(-\Delta E/kT)$$

さらに T_{1M} は以下の式で表わすことができる⁹⁾。

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{g^2 \beta^2 \gamma_I^2}{r^6} \left(\frac{3 \tau_C}{1 + \omega_I^2 \tau_C^2} \right) \quad (3)$$

$$\tau_C = \tau_C^0 \exp(-\Delta E/kT)$$

ここで, f は H_2O と Cu-chl のモル比である。 γ_I は磁気モーメント τ_C は相関時間, r はプロトンと銅との距離 τ_C^0 は標準状態での τ_C である。 ΔE は τ_C の活性化エネルギーである。このとき $\tau_M \gg T_{1M}$ であれば $dT_{1B}/d(1/T)$ は正に, $\tau_M \ll T_{1M}$ であれば常温以上で $dT_{1B}/d(1/T)$ は負になると考えられている⁸⁾。

T_1^* と $1/T$ との関係を求め図 2 の結果を得た。Cu-chl 量が 50 mmol/l のときには T_1^* と T_1^0 の差は 1 ケタ以上違うので $1/T_1^* \gg 1/T_1^0$ とみなせるから式 (2) から近似的に $T_{1B} = f \cdot T_1^*$ とおくことができる。図 2 で T_1^* は $1/T$ に対して測定範囲内で減少していることから, この範囲では $\tau_M \ll T_{1M}$ がなり立っていることがわかる。この物理的意味は Cu-chl に配位している水分子の滞在時間が T_{1M} よりはるかに小さいことを表わす。図 1 において Cu-chl 濃度と水の比が 1:1 になる 55 mol/l まで外挿して T_{1B} を求めて $T_{1M} = 0.1$ ms が得られる。したがってこの系では

Fig. 2 Temperature dependence of T_1^* of lecithin (PC) vesicles in the presence of Cu-chlorophyll

- : 50mmol/l PC dispersion in 50mmol/l phosphate buffer (pH 7.0)
- ×: 50mmol/l PC+0.5mmol/l Cu-chl dispersion in 50mmol/l phosphate buffer
- : 50mmol/l PC+5mmol/l Cu-chl dispersion in 50mmol/l phosphate buffer
- : 50mmol/l PC+50mmol/l Cu-chl dispersion in 50mmol/l phosphate buffer
- : 50mmol/l PC dispersion+5mmol/l Cu-chl in 50mmol/l phosphate buffer

$\tau_M \ll 0.1$ ms でなければならない。

一方, Andrasko, Forsen によればリボソームで Mn^{2+} を包み込んだ系での τ_M は 0.2~2.0 ms であるといわれている¹⁰⁾。これはリボソーム膜中を水が透過する時間に相当するという。いま Cu-chl がリボソームの疎水基に囲まれた膜構造を仮定する。Cu-chl が含まれたことにより水の透過速度が大きく変わるとは考えられないから, 仮定された構造のときの τ_M も 0.2~2.0 ms に近いと考えねばならない。しかし測定された τ_M は $\tau_M \ll 0.1$ ms であるから, Cu-chl が疎水基に囲まれた構造は考えにくく, Cu-chl を含むリボソームの構造としてポルフィリン環が親水基近くにあり, 自由に水と相互作用しているとしなければならない。

リボソーム中には分散しない Cu-chl 5 mmol/l を 50 mmol/l のレシチンリボソームに添加したときの T_1^* を図 2 に併記した。この結果は 5 mmol/l の Cu-chl を含むリボソーム分散液の T_1^* とはほぼ同じ値になることがわかる。このことから Cu-chl のポルフィリン環が親水基近くにあって, 自由に水と相互作用し合うと考えられる。

3.2 Cu-chl を添加したレシチン分子のプロトンの T_1

表 1 にクロロホルム- d 中での 50 mmol/l レシチンのおのおのの基のプロトンと 5 mmol/l Cu-chl の相互作用を表わした。このようにクロロホルム- d 中では Cu-chl の銅原子は明らかに親水基側の N -メチル基近くに存在し疎水性基の末端メチル基とは遠く離れていることがわかる。

5 mmol/l Cu-chl を含んだリボソームのレシチンのおのおのの基のプロトンの $1/T_1$ の差を表 2 に示した。表 1 のように顕著ではないが, やはり N -メチル>メチレン>末端メチルの順に $1/T_{1B}$

8) T. J. Swift, R. E. Conick, *J. Chem. Phys.*, 37, 307 (1962).

9) L. Solomon, *Phys. Rev.*, 99, 559 (1955).

10) J. Andrasko, S. Forsen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 813 (1974).

Table 1 The influence of copper chlorophyll on T_1 in the chloroform- d solution

Proton No.	None $1/T_1^0$	+Cu-chl $1/T_1^*$	$1/T_1^* - 1/T_1^0$	$1/T_1^0$
$N-CH_3$	8.85 ± 0.08	13.56 ± 0.60	4.71 ± 0.68	2360 ± 340
CH_2	1.50 ± 0.01	1.73 ± 0.05	0.24 ± 0.06	120 ± 30
End group CH_3	0.80 ± 0.10	0.80 ± 0.10	0.00 ± 0.20	—

が大きくなっている。すなわち、 N -メチルが一番 Cu-chl の銅原子に近く、メチレン、末端メチルの順に遠くなっていると考えられる。表1のようにその差が顕著でないのは、クロロホルム- d 中では双極子-双極子相互作用に基づいた緩和によって $1/T_{1B}$ は銅原子-プロトン間の距離の6乗に比例するのに対して、リポソーム系では拡散による緩和が支配的で大体距離の一乗に比例するからだと考えられる¹¹⁾。

4 結 語

Cu-chl を含有した卵黄レシチンのリポソームの D_2O-H_2O 分

Table 2 The influence of copper chlorophyll on T_1 in the liposome

Proton No.	None $1/T_1^0$	+Cu-chl $1/T_1^*$	$1/T_1^* - 1/T_1^0$	$1/T_1^0$
$N-CH_3$	6.39 ± 0.26	12.16 ± 0.49	5.77 ± 0.75	57.7 ± 7.5
CH_2	3.84 ± 0.04	7.55 ± 0.75	3.70 ± 0.79	37.0 ± 7.9
End group CH_3	3.82 ± 0.15	6.61 ± 0.31	27.9 ± 0.46	27.9 ± 4.6

散液の水プロトンの縦緩和時間を測定して、Cu-chl のポルフィリン環がリポソームの親水基側にあり、水分子との間に強い相互作用をもつことを確かめた。このことはリポソーム分散液に水溶性の Cu-chln を添加した系の水プロトンの T_1 測定からも裏づけられる。さらに Cu-chl 含有レシチンリポソームのプロトン緩和時間からも得られた。 N -メチル、メチレン、末端メチルの順に Cu-chl のポルフィリン環から遠くなることもこの構造を指示するものである。

本ノートを書くにあたり何度も論文を見ていただきました三菱電機株式会社中央研究所草川英昭氏に感謝します。

- 11) P. Brulet, H. M. McConnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1451(1975).

The Proton NMR Study of the Interaction between Water and Copper Chlorophyll in Liposome

Koe ENMANJI* and Tadanao ITOH**

* Central Research Laboratory of Mitsubishi Electric Co.; Minami-Shimizu, Amagasaki-shi 661 Japan

** Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University; Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606 Japan

The authors investigated in which part of lecithin molecule, hydrophilic or hydrophobic part, copper-chlorophyll (Cu-chl) molecule interacts with it in the lecithin liposome—Cu-chl system. The longitudinal relaxation time (T_1) of water protons in the lecithin liposome system containing Cu-chl was measured by NMR. Increase in the reciprocal of T_1 was found to be linearly proportional to the amount of Cu-chl dispersed in the liposome. And this value equaled that of T_1 of copper chlorophyllin aqueous solution system. Furthermore the existence of the lecithin—Cu-chl complex was shown from measurement of the NMR spectra of lecithin—Cu-chl— $CDCl_3$ system. These results suggest that in the lecithin—Cu-chl complexes the porphyrin ring lies near protons of an N -methyl and apart from the neighbouring methylene and the end methyl group in that order, that is, exists in the hydrophilic part of the lecithin molecule.