論文特集「包接現象の化学」

(日本化学会誌, 1983, (2), p. 255~258)

© 1983 The Chemical Society of Japan

リポソーム層内に包埋されたポルフィナト鉄錯体

(1982 年 7 月 9 日 受理)

土田 英俊*・関根 幹也・西出 宏之・大野 弘幸

ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC) のリポソームに包埋された [*meso*-テトラキス[α , α , α , α -*o*-(ピバールアミド)フェニル]ポルフィナト] (1-ドデシル-2-メチルイミダゾール) 鉄(II) 錯体 [Fe(pfp)(dmi)] (リポソーム包埋ヘム) を調製した。リポソーム包埋ヘムの ^1H - および ^{31}P -NMR, 走査示差熱分析, ゲルパーミエーションクロマトグラフィー, ESR および蛍光スペクトル測定による解析結果から, [Fe(pfp)(dmi)] 錯体は DMPC リポソームが構成する二重層の疎水領域に分散して包埋されていることが明らかにされた。リポソーム包埋ヘムは, 水溶液中 pH 7 室温において, 寿命 3 時間以上の酸素錯体を生成する。

1 緒 言

従来, ポルフィナト鉄(II)錯体を用いた酸素運搬体に関する研究は数多くなされており, 非プロトン性溶媒中, 室温下での可逆的な酸素結合が知られている。しかし, 水溶液中ではポルフィナト鉄(II)-酸素錯体はプロトンとの反応によりポルフィナト鉄(III)への迅速な不可逆反応が起こり, 安定な酸素錯体は得られていない¹⁾。

水中で疎水的な環境を提供できるよく知られている方法はミセルあるいはリポソームの利用である。最近著者らは, [*meso*-テトラキス[α , α , α , α -*o*-(ピバールアミド)フェニル]ポルフィナト²⁾] (1-アルキル-2-メチルイミダゾール) 鉄(II)錯体をリン脂質リポソームに包埋³⁾すれば水溶液中 pH 7, 25°C において可逆的な酸素結合が可能になることを見いだした⁴⁾⁵⁾。これはリン脂質が形成する二重層の疎水領域に錯体が包埋された結果と推定した。

本報告では, ジミリストイルホスファチジルコリン (以下 DMPC と略記する) のリポソームに包埋された [*meso*-テトラ

Scheme 1

キス (α , α , α , α -*o*-(ピバールアミド)フェニル]ポルフィナト] (1-ドデシル-2-メチルイミダゾール) 鉄(II)錯体 [Fe(pfp)(dmi)] (図式 1) を調製し (以下リポソーム包埋ヘムと略す), リポソーム包埋ヘムの ^1H -NMR, ^{31}P -NMR, 走査示差熱分析 (DSC), ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC), 一酸化窒素で [Fe(pfp)] をラベルしたリポソーム包埋ヘムの ESR, [Zn·(pfp)] をプローブとしたリポソーム包埋ヘムの蛍光スペクトルの測定結果とその解析から, DMPC リポソームへの [Fe(pfp)(dmi)] 錯体の包埋状態を明らかにした。

2 実 験

2.1 試 薬

1,2-ジミリストイル-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルコリン (DMPC) はシグマ社製試薬特級をそのまま使用した。1-ドデシル-2-メチルイミダゾール (DMI) は臭化ドデシルと 2-メチルイミダゾールを 200°C で反応させて得た。

^1H -NMR(CDCl_3) δ (ppm): 0.95 (3 H, ドデシル- CH_3), 1.30 ~ 1.85 (20 H, ドデシル-(CH_2)₁₀), 2.30 (s, 3 H, イミダゾール 2- CH_3), 3.90 (t, 2 H, Im- CH_2 -), 6.90 (d, 1 H, イミダゾール 4 または 5- CH), 6.95 (d, 1 H, イミダゾール 4 または 5- CH)
ピケットフェンス (picket fence) ポルフィナト鉄(II)錯体は

早稲田大学理工学部, 160 東京都新宿区大久保

- 1) 土田英俊, “錯体化学からみた生体系とそのモデル”, 化学総説 20, 学会出版センター (1978).
- 2) J. P. Collman, R. R. Gagne, C. A. Reed, T. R. Halbert, G. Lang, W. T. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1427(1975).
- 3) 「包埋」とは均質な分子集合体 (ホスト) 中に協同的相互作用により, 異分子 (ゲスト) が分子分散して安定に包み込まれている状態 (構造) をいう。たとえばリン脂質二重層に蛍光分子が包埋されるとか, 細胞膜における脂質と膜タンパク質の例がこれである。
- 4) 本論文内容はゲスト分子を取り囲むホスト分子の環境が, 機能発現の重要因子となることを示す例であり, 包接現象に関連した結果と考えられる。
- 5) E. Hasegawa, Y. Matsushita, M. Kaneda, K. Ejima, E. Tsuchida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104, 793(1982).
- 6) E. Hasegawa, Y. Matsushita, M. Kaneda, K. Ejima, E. Tsuchida, *ibid.*, 105, 1416(1982).

Collman²⁾ および Sorrell⁶⁾ の報告にしたがって合成した。ピケットフェンスポルフィナト亜鉛(II)錯体はつぎのようにして合成した。ピケットフェンスポルフィンと塩化亜鉛を *N,N*-ジメチルホルムアミド中、80°C、1 時間反応させ、カラムクロマトグラフィー (ワコーゲル C-200, エーテル/石油エーテル (4/1)) により精製した (TLC $R_f=0.3$, $\lambda_{\max}$ 423, 515, 553, 592nm)。ユウロピウム塩はシグマ社製 $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{D}_2\text{O}$ をそのまま使用した。

2.2 リポソーム包埋へム

通常のリポソーム調製法⁷⁾ および既報⁴⁾ の方法を改良して行なった。[Fe^{III}(pfp)] 1 μmol , DMI 50 μmol および DMPC 0.2 mmol のジクロロメタン溶液を丸底フラスコで減圧乾固して [Fe^{III}(pfp)]/DMI/DMPC の薄膜を調製した。これに窒素雰囲気下で脱ガスした pH 7.0 リン酸緩衝液を 20 ml 加え、氷冷浴中で超音波処理して [Fe(pfp)]/DMI/DMPC を可溶化した。還元剤として L-アスコルビン酸 (Fe の 20 倍モル) を加え、窒素雰囲気下 40°C に 2 時間ももち、赤色透明水溶液を得た。可視吸収スペクトルは 535, 562nm に吸収極大をもち 5 配位型 [Fe^{II}(pfp)] 錯体の吸収スペクトル⁸⁾ と一致した。

2.3 NMR スペクトル測定

2.2 と同様の操作により Fe(III) リポソーム包埋へムの重水溶液を調製し、¹H- および ³¹P-NMR 測定を行なった (JEOL FX-100)。

2.4 走査示差熱分析 (DSC)

DMPC リポソームおよびリポソーム包埋へムのゲル-液晶相転移は走査示差熱分析装置 (Perkin Elmer DSC-II) から解析した。試料をアルミニウムパン中に封入し、毎分 5°C の昇温速度で DSC 曲線を得た。

2.5 ゲルパーミエイションクロマトグラム (GPC)

リポソーム包埋へムの GPC 測定はセファロース 4B カラム (2.2×70cm) を用いて室温で行なった。

2.6 蛍光および ESR スペクトル

DMPC リポソームに蛍光標識剤である [Zn(pfp)] の DMI 錯体を包埋し、37°C で蛍光スペクトル測定装置 (JASCO FP-550) を用いて測定した。また、ESR スペクトルは [Fe^{III}(pfp)] リポソーム包埋へム水溶液に一酸化窒素を通気して、錯体を [Fe^{II}(pfp)(NO)] としたのち、JEOL (FE-3 X) で -196°C で測定した。

3 結果および考察

リポソーム包埋へム水溶液をセファロース 4B カラムに通し、DMPC と [Fe(pfp)] に基づく 207 と 408nm の吸収を測定、図 1 に示した。両者の流出曲線が一致しているのち、[Fe(pfp)] 錯体は DMPC リポソーム中に取り込まれていることを確認した。

既報⁹⁾ でリン脂質リポソーム重水溶液に Eu^{3+} イオンを添加し、リポソーム内側に存在するコリンメチル基に基づくプロトンシグ

Fig. 1 Elution curves of liposome-incorporated [Fe^{II}(pfp)] complex solution on GPC detected at 207 nm (a) and 408nm (b)

Fig. 2 ¹H-NMR spectra of the DMPC liposome containing [Fe(pfp)(dmi)] with added Eu^{3+}

[Eu^{3+}] (mmol/l) =

a: 0, b: 2.5, c: 6.1, d: 8.7

[DMPC] = 44 mmol/l, [[Fe(pfp)]] = 0.22 mmol/l,

[DMI] = 11 mmol/l

ナルを分離し、それらのシグナル強度比からリポソームの半径を測定している。図 2 に Eu^{3+} 添加にともなうリポソーム包埋へムの ¹H-NMR スペクトル変化を示す。 Eu^{3+} 無添加 (a) でコリンメチル基に基づく 3.20 ppm のシグナルの高磁場側に肩が認められること、 Eu^{3+} 添加にともない外膜位と内膜位にあるコリンメチル基に基づくシグナル強度比が約 2.0 となることから、へムを包埋したリポソームの直径は約 400 Å と算出された。³¹P-NMR スペクトルでは 0.8 ppm に半値幅 12 Hz の鋭いシグナルが認められたが、コリンメチル基の等方的配列に対応しており¹⁰⁾, [Fe(pfp)] 包埋後もリポソーム構造を保持していることの証拠で

9) H. Ohno, Y. Maeda, E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 642, 27(1981).

10) P. R. Cullis, B. Dekruiff, *ibid.*, 507, 207(1978).

6) T. N. Sorrell, *Inorg. Synth.*, 20, 161(1980).

7) D. Papahadjopoulos, J. C. Watknis, *Biochim. Biophys. Acta*, 135, 639(1967).

8) J. P. Collman, J. I. Brauman, K. M. Doxsee, T. R. Halbert, E. Bunnenberg, R. E. Linder, G. N. LaMar, J. D. Gaudio, G. Lang, K. Spartalian, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 4182(1980).

Fig. 3 ESR spectra of the nitroxide-labeled $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ complex at 77 K

- a : $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})(\text{NO})]$ in DMF
 b : $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})(\text{NO})]$ dispersed in H_2O
 c : Liposome-incorporated $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})(\text{NO})]$ in H_2O

ある。

リポソーム包埋ヘムの重水溶液の FT NMR スペクトル測定 (37°C) では DMPC に基づくシグナルのほか、 -0.1 ppm に $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ のピバロイル基に基づくシグナルも観測されたが、 25°C ではコリンメチル基に基づくシグナルのみであった。これは DMPC のゲル-液晶相転移温度以上の条件では DMPC リポソームの二重層内に $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ が均一分散していることを示唆する。

NO ラベルした $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})]$ 錯体の ESR スペクトルを図 3 に示した。DMF 中に均一溶解した $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})(\text{NO})]$ 錯体 (a) では、ニトロキシドラジカルのシグナルが三分裂して z 方向に現われるほか、 x , y 両方向のシグナルも認められた。これに対し、 $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ 錯体をポリ(1-ビニル-2-ピロリドン)で可溶化した水溶液 (b) では x , y 方向のシグナルが消失し、固相状態のスペクトルと同一であった。NO ラベルリポソーム包埋ヘムのスペクトルは (a) に類似しており、 $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ 錯体がリポソーム内に均一分散し、溶解していることを支持した。

図 4-(a) に示すように DMPC リポソーム水溶液の DSC 測定から、ゲル-液晶転移温度は 24°C と決定された。一方、リポソーム包埋ヘム水溶液系 (b) では、疎水領域のアルキル鎖の相転移に基づく吸収ピークが幅広くなった。また相転移温度も 22°C であり、低温側へのシフトが認められた。これは $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ 錯体の埋込みによりアルキル鎖の配向が一部乱され、DMPC の相転移エンタルピーの減少に対応する。

$[\text{Fe}(\text{pfp})]$ のかわりに $[\text{Zn}(\text{pfp})(\text{dmi})]$ を蛍光標識分子として DMPC リポソームに埋込むと、 413 nm の励起光により 614 ,

Fig. 4 DSC thermograms of DMPC liposome (a) and liposome-incorporated $[\text{Fe}(\text{pfp})(\text{dmi})]$ complex (b) DMPC : 5 wt%

Fig. 5 Fluorescence spectra of $[\text{Zn}(\text{pfp})(\text{dmi})]$ complex

- a : in CH_2Cl_2
 b : Liposome-incorporated complex in H_2O
 $[\text{Zn}(\text{pfp})] = 0.05 \text{ mmol/l}$

664 nm に極大値をもつ蛍光スペクトルが得られた (図 5)。蛍光極大値は同濃度の $[\text{Zn}(\text{pfp})(\text{dmi})]$ を含むジクロロメタン溶液系と一致するが強度は $2/3$ 程度である。この結果、 $[\text{Zn}(\text{pfp})]$ は DMPC リポソームに分子分散していること、 $[\text{Zn}(\text{pfp})]$ を囲む疎水環境はジクロロメタン溶液とほぼ同一の効果と考えられる。

このように得られたリポソーム包埋ヘム溶液に酸素を吹き込むと、ただちに酸素錯体のスペクトル (546 nm) が観測され、半寿命は 37°C において 3 時間であった。窒素導入によりデオキシ (535 , 562 nm) に移行、この変化は等吸収点 518 , 584 nm をもって可逆的に起こる。リポソーム包埋 $[\text{Fe}(\text{pfp})]$ が酸素錯体を安定に生成する理由は、錯体が DMPC 小胞二重層の疎水領域に分散しており、プロトン攻撃を避けうることによると考えられる。

**Special Articles on
Chemistry of Inclusion Phenomena**

(Porphinato)iron Complex Incorporated in Lipid Bilayer of Liposome

Eishun TSUCHIDA*, Mikiya SEKINE, Hiroyuki NISHIDE
and Hiroyuki OHNO

*Department of Polymer Chemistry, Waseda University;
Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan*

[*meso*-Tetrakis[α , α , α , α -*o*-(pivalamido)phenyl]porphinato]iron(II) ([Fe(pfp)]) complex with 1-dodecyl-2-methylimidazole (DMI) was incorporated into the hydrophobic region of liposome of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC). The incorporation was confirmed by ^1H -NMR (Fig. 2), ^{31}P -NMR, differential scanning calorimetry (Fig. 4), gel permeation chromatography (Fig. 1), ESR (Fig. 3), and fluorescence (Fig. 5) measurements. The liposome-incorporated [Fe(pfp)] complex formed in the pH 7 aqueous medium at 37°C an oxygen adduct with a life-time of 3 h reversibly.

~~~~~