人工環状脂質の立体選択的合成とその自己組織化 – 古細菌に学ぶ新規機能性脂質の開発 – Stereoselective Syntheses and Self-Assemblies of Artificial Cyclic Lipids – Development of Novel Functional Lipids by Mimicking Archaeal Membrane Lipids –

芝上基成

産業技術総合研究所

〒305-8565

茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 5

Motonari SHIBAKAMI

National Institute of Advanced Industrial Science
 and Technology (AIST), Central 5th, 1-1-1 Higashi,
 Tsukuba, Ibaraki
 305-8565, JAPAN

論文要旨：高温・高圧・強酸性下等の過酷な条件下に棲息する古細菌の存在が知られている。この高度な耐環境性の源として、生体膜に含まれる環状脂質が挙げられている。われわれは機械的・熱的に安定な脂質膜の構築を目的として、この天然の環状脂質をモデルとした人工環状脂質の合成とその自己組織化に取り組んだ。人工環状脂質の構造上の特徴として、(1) 環状骨格、(2) 環状骨格内のジアセチレン基、(3) エーテル (またはアミド) 結合、(4) 環状骨格の両端に位置する親水基が挙げられる。二種の保護基を選択的に脱保護する、あるいはあらかじめ用意したいくつかのキラルなビルディングブロックをカップリングさせることにより、立体選択的な人工環状脂質の合成に成功した。さらに種々の自己組織化法により、これらの人工環状脂質がさまざまな自己集合体を構築することを見出した。

Abstract: Considerable resistance of archaea to harsh environments is derived from unique cyclic lipids observed in their biomembranes. We have synthesized artificial cyclic lipids that mimic the natural lipids for the purpose of constructing mechanically and thermally stable membranes. The structural features of these lipids include (i) a cyclic framework, (ii) two diacetylene units, (iii) ether (amide) bonds and (iv) two hydrophilic groups. These are the minimum structural elements that would be necessary in order to create functional equivalents of the archaeal lipids. In this paper, we report (i) molecular design, (ii) stereoselective syntheses, and (iii) self-assemblies of the artificial cyclic lipids into various nanostructures including tubules, fibers, and ribbons.

Key words: Cyclic Lipid, Archaea, Stereoselective Synthesis, Self-Assembly

1 はじめに

リン脂質や糖脂質など、生体由来の二本鎖脂質が構築する人工的な脂質二分子膜は高い生体親和性を示すことが知られている。そのためこのタイプの脂質二分子膜は

過去数十年にわたって、生体膜モデルとして、またドラッグデリバリーシステムのキャリア候補として精力的に研究がなされてきた¹⁻⁴⁾。しかしその一方で、脂質二分子膜は本質的に脆いという欠点を抱えている⁵⁾。細胞膜は脂質二分子膜だけで構築されているのではなく、裏打ちタンパク質に代表される様々な「補強システム」を採用し、その結果生体中で安定に存在しているのである。

連絡者：芝上基成
 E-mail : moto.shibakami@aist.go.jp

Fig. 1 Typical Archaeal Membrane Lipid.

Scheme 1 Molecular Design Process of Artificial Cyclic Lipid.

細胞膜の一構成要素である二本鎖脂質を取り出して安定性を求めるのはやや酷なのかもしれない。

脂質二分子膜, 特にベシクルに強度を与えるいくつかの試みがなされてきた。筆者が知る代表的なものとして重合性ベシクルが挙げられる⁶⁻⁸⁾。これは二本鎖脂質の一部に重合可能な官能基を導入し, ベシクル形成後に照射等により脂質間を架橋することで安定性を付与するものである。機械的な安定性は飛躍的に向上する一方, 生体膜特有の膜流動性は相当程度失われてしまう。

このような背景から, われわれは古細菌に見られる環状脂質に着目した。古細菌とはその多くが高温・高圧・強酸性下に棲息する生物群であり, 名前に反してその提唱は約 30 年前と比較的新しい。そして古細菌の示すこの高度な耐環境性の源の一つとして, その生体膜の主要な構成分子である環状骨格を持つ脂質, すなわち環状脂質の存在が挙げられている (Fig. 1)⁹⁻¹¹⁾。

そこでわれわれは, 作業仮説『天然の環状脂質を模した人工環状脂質は, 機械的・熱的に安定かつ流動性に富んだ脂質膜を構築する』を設定し, 脂質二分子膜の脆さを克服しうる有効な手段として, 人工環状脂質および環状脂質膜の開発に取り組んだ。

2 人工環状脂質の開発

2.1 人工環状脂質の分子設計

この作業仮説の下, 過去 5 年間われわれは約 40 種類ほどの人工環状脂質の分子設計および合成を行ってき

た¹²⁻¹⁴⁾。人工環状脂質の分子設計の第一段階として, 当然ではあるがエーテル結合 (またはアミド結合) を有する環状骨格を採用した (STEP 1)。続いて天然の環状脂質に見られる両親媒性を人工環状脂質に与えることが天然本来の特性 (生体親和性, 膜形成能等) を発揮させるために肝要であると考え, 環状骨格の両端に親水基を付与した (STEP 2)。さらに環状骨格内に, 古細菌に見られるイソプレン構造の代わりにジアセチレン基を導入した (STEP 3)。これは環状骨格に剛直性を持たせることで分子間相互作用をより強固にできるのでは, と考えたためである。

2.2 人工環状脂質の合成

代表的な人工環状脂質の構造を Fig. 2 に示す。親水部と疎水部を結ぶ官能基がエーテル基であることから, エーテル型人工環状脂質と呼んでいる。環状脂質の構造上の特徴としてはエーテル結合に加えて, (1) 環状骨格, (2) 両端に親水性のホスホコリン基, 中央部に疎水性の環状骨格を配した両親媒性, そして (3) 環状骨格中のジアセチレン基の 3 点が挙げられる。Fig. 2 の脂質は長鎖アルキル基の炭素数が 20 個であることから本論

Fig. 2 Typical Ether Cyclic Lipid (C20).

Scheme 2 Synthetic Scheme of (*R,R*)-C 20. Scheme 3 Synthetic Scheme of (*S,S*)-C20.

文では C20 と呼ぶこととする。

エーテル型環状脂質には不斉炭素が二つある。Fig. 2 に示す環状脂質はいずれも R 配置であるが、その合成経路を Scheme 2 に示す¹²⁾。

出発物質はグリセロールである。このグリセロールに対して保護、脱保護を繰り返して 2 級水酸基がフリーとなった **(-)-4** を得た。この水酸基に、末端にアセチレ

ン基を持った長鎖アルキル基を導入した。得られた **(-)-5** に対して Glaser カップリング反応を施し、二量体 **6** を得た。トリチル (Tr) 基を脱保護した後、フリーとなった水酸基にジアセチレン基を持つ長鎖アルキル基を導入し **8a** を得た。続いて分子内 Glaser カップリング反応を施し環状骨格を持つ **9a** を得た。*p*-メトキシベンジル (PMB) 基を脱保護した後、ホスホコリン基を導入

Scheme 4 Synthetic Scheme of (R, S)-C20.

Scheme 5 Synthetic Scheme of Antiparallel C20.

入することにより目的化合物 (1a) を得た。

この合成スキームの特徴として, Tr および PMB 基の脱保護の順番を変更することにより, 立体選択的な環状脂質の合成を可能とすることが挙げられる。Scheme 2

では Tr 基を初めに脱保護し, PMB 基を有するジオール体 7a を経由して (R, R) 体の目的化合物を得た。一方 Scheme 3 に示すように, PMB 基を初めに脱保護すると (S, S) 体 (1b) が得られる¹²⁾。

Fig. 3 Amide Cyclic Lipid.

さらに Scheme 4 に従ってジアステレオマー (*R, S*) 体 (1c) を合成することも可能である¹²⁾。

以上は親水基が同一方向にある *syn* 型人工環状脂質であるが, *anti* 型人工環状脂質の合成スキームも既に確立している。その概要を Scheme 5 に示す¹³⁾。立体選択性は, キラルなビルディングブロック (16–19) を適宜組み合わせ合わせて Alami 反応によりカップリングさせることに基づく。

このほか, 炭素数が異なるもの, あるいは親水部と疎水部をつなぐ官能基がアミド基であるものなど, これまでに合成した人工環状脂質の構造は多岐にわたる。Fig. 3 に, 親水部と疎水部を結ぶ官能基が C20 に見られるようなエーテル基ではなく, アミド基であるアミド型人工環状脂質を示す¹⁴⁾。

エーテル基に替わってアミド基を用いることにより, より強固な分子間相互作用の形成が期待されることが, この脂質合成の動機であった。この脂質の自己組織化の詳細については後述する。

3 人工環状脂質の自己組織化

『得られた人工環状脂質は果たして自己組織化能を持つのであろうか?』われわれはさまざまな手法で自己組織化能の検証を試みた。その結果, 人工環状脂質の大部分が自己組織化能を示すことが明らかとなった。脂質の種類や調製法により, 形態が異なる自己集合体を得られた。以下に詳細を記す。

3.1 マイクロチューブ

二本鎖脂質から構成される脂質フィルムに水を加える, あるいはフィルムを水蒸気にさらすことにより直径

が 10 μm を超えるジャイアントベシクルが構築されることが知られている^{15–17)}。この方法は一般に静置水和法と呼ばれるものである。ちなみに, ジャイアントベシクルは光学顕微鏡で容易に観察できること, および膜の曲率やサイズが細胞膜に近いことから生体膜モデルとして古くから用いられている^{18–24)}。

まずはじめに, この静置水和法で人工環状脂質からのベシクル調製を試みた。スライドガラス上に人工環状脂質 C20 を溶解したクロロホルム/メタノール混合溶液をごく少量置き, 続いて有機溶媒を除くことにより脂質フィルムを調製した。このフィルムに Milli-Q 水を加え, 水和を開始した。Fig. 4(a) に 1 か月間水和させて得られた自己集合体の微分干渉顕微鏡写真を示す。あたかも素麺のように見える。Fig. 4(b), (c) はそれぞれ透過型電子顕微鏡 (TEM) 像, 走査型電子顕微鏡 (SEM) 像である。直径はおおよそ 600 nm, 長さは数十 μm 以上に及ぶものも見られる。TEM 像では「きしめん」のように見え, SEM 像では「葉巻」のように見える²⁵⁾。しかし, いずれの電子顕微鏡観察も高真空下で行われるため, 水中での構造を調べるには必ずしも適当ではない。

Fig. 5 Scanning Probe Micrographs of Tubules Derived from (*R, R*)-C20. (a) amplitude attenuation: 0.021, (b) amplitude attenuation: -0.390 (Reprinted with permission from: ref. (25). Copyright 2003 Chem. Soc. Jpn.).

Fig. 4 Microscopic Images of Tubules Derived from (*R, R*)-C20. (a) differential interference contrast micrograph (bar: 10 μm), (b) transmission electron micrograph (bar: 1 μm), (c) scanning electron micrograph (bar: 1 μm) (Reprinted with permission from: ref. (25). Copyright 2003 Chem. Soc. Jpn.).

そこで、水中でのナノレベル観察が可能な走査プローブ顕微鏡 (SPM) 観察を行った。Fig. 5 は Si_3N_4 カンチレバー (長さ $100\text{ }\mu\text{m}$, バネ定数 0.09 N/m) を使い、構造体の同じ場所を、振幅減衰率を 0.021 および -0.390 に設定してタッピングモードで得られた画像である。TEM 像や SEM 像と同様に、幅がおおよそ 600 nm 程度の帯状の構造をとっていることがわかる。SPM は高さ方向の情報も得られることが一つの大きな特徴である。振幅減衰率が 0.021 の場合の断面図が示すように、最大高さは 93 nm であった。一方、振幅減衰率が -0.390 の場合、幅に大きな変化は見られなかったが、高さは 9.6 nm に減少した。再度振幅減衰率を 0.021 に戻すと再び最大高さがおおよそ 90 nm に戻ることを確認した。ここで振幅減衰率が -0.390 の時に得られた高さ (9.6 nm) に着目した。C20 の最大長は 4.8 nm である。 9.6 nm は 4.8 nm の二倍であることから、高さ 9.6 nm は単分子膜二枚分に相当する。また高さが復元することから、この構造体は柔軟性に富むものと考えられる²⁵⁾。

以上の結果を考察すると、この構造体は単分子膜で構成された、非常に柔軟性に富み、かつ内部に空洞を持つチューブと考えられる。なお振幅減衰率を 0.021 で測定した際にチューブの断面に「波打ち」が見られたが、これはチューブの柔軟性を示したものと考えられる。

Fig. 6 Transmission Electron Micrograph of Lipid Fibers Composed of (R, R) -C20 (bar: 50 nm). (Reprinted with permission from: ref. (26). Copyright 2004 Jpn. Soc. Appl. Phys.).

Fig. 7 Scanning Probe Micrograph of Ribbons Composed of (R, R) -C20. (Reprinted with permission from: ref. (26). Copyright 2004 Jpn. Soc. Appl. Phys.).

3.2 ナノファイバー

人工環状脂質 C20 の構造的な特徴として、疎水部にジアセチレン基を持つことが挙げられる。ジアセチレン基は光照射等により重合することが知られているが、重合にはジアセチレン基同士が立体的に接近していることが求められる。Fig. 6 は静置水和法により調製した脂質ナノ構造体 (主として Fig. 4 に見られるようなチューブ) に対しておおよそ 30 分にわたる TEM 観察の間、電子線を照射し続けた後の画像である²⁶⁾。数本のファイバーが寄り集まってうねっている様子がわかる。一本のファイバーの太さは約 4 nm であることから、このファイバーは人工環状脂質同士が重合して構築された、一分子の幅を持ったファイバーであると考えられる。現段階ではまだ明確な証拠は得ていないが、ポリジアセチレンがこのファイバー中に構築されているのではなかろうか?

続いて静置水和法で調製した脂質ナノ構造体 (主としてチューブ) に紫外線照射を試みた。ハンディ型の UV ランプで 5 分間、常温で至近距離から光照射を試みたところ、自己集合体の一部がリボン状に変化した (Fig. 7)²⁶⁾。画像は Si_3N_4 カンチレバー (長さ $100\text{ }\mu\text{m}$, バネ定数 0.09 N/m) を使い、タッピングモードで得たものである。幅はおおよそ 25 nm , ピッチが 130 nm 程度の右回りのヘリカルリボンである。リボンの構築メカニズムについては不明なところが多く残されているが、脂質分子間の重合に基づくものと考えている。また、らせん構造は脂質のキラリティに由来するものであろう。

3.3 ナノリボン

人工環状脂質研究の当初の目的は、脂質二分子膜の本質的な欠点である機械的・熱的な脆さを克服することにあった。その一方で環状骨格により膜内に整然と配列されるジアセチレン基は、材料創製へのポテンシャルを秘めている。

エーテル型人工環状脂質を構成分子とする脂質膜は、実験室に設置してある蛍光灯や日光程度の光には安定であり、ジアセチレン基間の重合はまったくといってよい

Fig. 8 Gelation of Amide Cyclic Lipid. (a) before and (b) after UV irradiation.

Fig. 9 Transmission Electron Micrograph of Gel Derived from Amide Cyclic Lipid. (Reprinted with permission from: Ref (14). Copyright 2003 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, New York.).

ほど進行しないようである。一方、3・2で記したナノファイバーは、電子線や紫外線等の比較的強度の高い光照射によりはじめて構築されるものと考えている。このことから、親水部のホスホコリン基の高さがジアセチレン基間の接近を妨げているものと考えている。そこでジアセチレン基間のパッキングをより密にすることを目的として、2・1に記したアミド型人工環状脂質を分子設計・合成した(2・1参照)。環状骨格本来のパッキングのよさに加えて、環状骨格の末端に含まれる4つのアミド基間の分子間水素結合により、ジアセチレン基をより整然と配列させようという意図である。

アミド型人工環状脂質は、分子内にアミド基を4つ持つことから容易に想像されるように、多くの有機溶媒にきわめて難溶であったが、熱したクロロホルム/メタノール混合溶媒にかりうじて可溶であった。この脂質をごくわずかに溶解した熱クロロホルム/メタノール混合溶媒を室温に放置したところたちまち固化し、容器を逆さまにしても落ちてこなかった(Fig. 8(a))。さらにUV照射すると紫色に変化した(Fig. 8(b))¹⁴⁾。この紫色の発色は、ポリジアセチレン骨格の形成を意味しているにほかならない。

このゲル化の機構をさらに詳しく検討するためにゲルのTEM観察を行った。Fig. 9に示すように、ピッチ186 nm、幅27 nmのリボンが観察された。そして、このナノリボンがところどころで交差していることがあわせて見られた¹⁴⁾。現段階ではあくまでも仮説であるが、ナノリボンがこの交差により3次元ネットワークを構築し、このネットワーク内に有機溶媒が取り込まれているのであろうと考えている。

4 まとめ

古細菌に見られる環状脂質をモデルとした人工環状脂質は当初の期待通り、さまざまな形態の自己集合体を構築することが明らかとなった。スペースの関係上本稿には記さなかったが、ジャイアントリポソームや平面膜、さらには本稿で記した脂質リボンで形成される高次の構

造体を構築することもすでに見出している。

本研究の当初の目的は、機械的・熱的に安定な脂質膜の構築であった。これを裏付けるための実験は現在もなお継続中であるが、現在までに超高感度熱量測定やSPM観察、分光測定等で得られている結果は、脂質二分子膜を凌駕する分子配列オーダーや熱安定性等、環状骨格に由来する環状脂質膜の特徴を示している。特に水中でのSPM観察は、生体膜モデルとして、あるいは生体材料としての環状脂質膜の特性を評価するために有効な手段と考え、現在精力的に行っている。

謝辞

本論文の執筆にあたり、人工環状脂質の合成および観察に共同して取り組んで頂いた産業技術総合研究所 高木俊之、宮脇和博、原田敦弘、藤崎里子、後藤理恵の諸氏に感謝します。また本稿で紹介したSPM観察において数々の技術的サポートを頂いた、エスアイアイ・ナノテクノロジー株式会社 繁野雅次氏に感謝します。また本研究の一部はNEDO 産業技術研究助成事業の支援を受けて行った。

文 献

- 1) A.D. Bangham & R.W. Horne, *J. Mol. Biol.*, 12, 660-8 (1964).
- 2) J. Wilschut & D. Papahadjopoulos, *Nature*, 281 (5733), 690-2 (1979).
- 3) C.G. Knight, *Liposomes, from physical structure to therapeutic applications*, Amsterdam; New York New York: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; Elsevier North-Holland (1981).
- 4) G. Gregoriadis, *Liposome Technology*, Boca Raton, Fla., CRC Press (1993).
- 5) H.T. Tien & A.L. Ottova, *J. Membrane Sci.*, 189 (1), 83-117 (2001).
- 6) S.L. Regen, B. Czech & A. Singh, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (21), 6638-40 (1980).
- 7) H.H. Hub, B. Hupfer, H. Koch & H. Ringsdorf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 19 (11), 938-40 (1980).
- 8) E. Lopez, D.F. Obrien, & T.H. Whitesides, *J. Am. Chem.*

- Soc.*, 104 (1), 305-7 (1982).
- 9) T.A. Langworthy, *Current Topics in Membranes and Transport*, 17, 45-77 (1982).
 - 10) M. Derosa, A. Gambacorta & A. Gliozzi, *Microbiol. Rev.*, 50 (1), 70-80 (1986).
 - 11) M. Hanford & T.L. Peeples, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 97 (1), 45-62 (2002).
 - 12) K. Miyawaki, T. Takagi & M. Shibakami, *Synlett*, 8, 1326-8 (2002).
 - 13) K. Miyawaki, R. Goto, T. Takagi & M. Shibakami, *Synlett*, 9, 1467-70 (2002).
 - 14) K. Miyawaki, A. Harada, T. Takagi & M. Shibakami, *Synlett*, 3, 349-52 (2003).
 - 15) J.P. Reeves & R.M. Dowben, *J. Cell. Physiol.*, 73 (1), 49-60 (1969).
 - 16) A. Darszon, C.A. Vandenberg, M. Schonfeld, M.H. Ellisman, N.C. Spitzer & M. Montal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77 (1), 239-43 (1980).
 - 17) D. Needham & E. Evans, *Biochem.*, 27 (21), 8261-9 (1988).
 - 18) G. Riquelme, E. Lopez, L.M. Garcia-Segura, J.A. Fer-
ragut & J.M. Gonzalez-Ros, *Biochem.*, 29 (51), 11215-22 (1990).
 - 19) M.I. Angelova, N. Hristova & I. Tsoneva, *Eur. Biophys. J.*, 28 (2), 142-50 (1999).
 - 20) A. Fischer, T. Oberholzer & P.L. Luisi, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1467 (1), 177-88 (2000).
 - 21) C. Dietrich, L.A. Bagatolli, Z.N. Volovyk, N.L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson & E. Gratton, *Biophys. J.*, 80 (3), 1417-28 (2001).
 - 22) T. Tanaka & M. Yamazaki, *Langmuir*, 20 (13), 5160-4 (2004).
 - 23) N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia & P. Schwille, *J. Struct. Biol.*, 147 (1), 77-89 (2004).
 - 24) A. Viallat, J. Dalous & M. Abkarian, *Biophys. J.*, 86 (4), 2179-87 (2004).
 - 25) K. Miyawaki, R. Goto & M. Shibakami, *Chem. Lett.*, 32 (12), 1170-1 (2003).
 - 26) M. Shibakami, K. Miyawaki, R. Goto & M. Shigeno, *Jpn. J. Appl. Phys.*, Part 1-Regular Papers Short Notes & Review Papers, 43 (7B), 4655-8 (2004).

会誌 10 号発送についてのお詫び

(社)日本油化学会 事務局

平素は日本油化学会の運営にご支援、ご協力をいただき、誠にありがとうございます。

さて、会誌「オレオサイエンス」と「J. Oleo Science」の 10 号を会員各位にお送りする際、一部の方の配送宛名書きの「所属部署」と「お名前」が記入もれとなり、配送に支障を生じました。これにより配送に遅延が生じたり、会員各位に郵便物配送確認を行っていただいたりと多大のご迷惑をおかけいたしましたこととお詫び申し上げます。今後、再発防止を徹底いたしますのでご容赦のほど重ねてお願い申し上げます。

なお、お手もとに会誌 10 号が届いていない方は、恐縮ですが担当者までご連絡をお願いいたします。

会誌編集・送達担当者：二上捷之

Fax: 03-3271-7464,

メール：k-futakami@jocs-office.or.jp