

平成21年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18710186
 研究課題名 (和文) 生体膜脂質が構成する脂質ラフトの構造解析と分子間相互作用の解明
 研究課題名 (英文) Structural Analysis and Elucidation of the Molecular Basis of Lipid Raft
 研究代表者
 葛西 祐介 (KASAI YUSUKE)
 東北大学・大学院理学研究科・COE フェロー
 研究者番号：50379286

研究成果の概要：脂質ラフトは生体膜上に形成されるドメインであり、様々なシグナル伝達の場合として機能していると推測されている。本研究では、脂質ラフトの分子基盤解明のための分析手法として、固体 NMR が有用であることを示すことができた。また、植物由来の抗酸化活性を有する天然物エラジタンニンの合成を通して、新たなピラノース配座制御法の確立、天然物の高効率の合成方法および高立体選択的グリコシルエステル調製法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：天然物化学、生物分子科学、有機合成化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体膜、分子複合体、固体 NMR、アンフォテリシン B、エラジタンニン、反転糖、配座制御

1. 研究開始当初の背景

近年、生体膜中で脂質分子が形成するマイクロドメインが注目を集めている。膜脂質はそれまで均一な2次元流体を形成する成分(流動モザイクモデル)とだけ考えられており、脂質分子のヘッドグループやアシル側鎖の多様性は考慮されていなかった。しかし最近、生体膜には「脂質ラフト」と呼ばれる情報伝達に関わる機能性分子が集中したドメインが存在し、膜を介した情報伝達のプラットフォームとして重要な機能を有している

と考えられるようになった。様々な疾病との関連も指摘されており、関心が高まっている。

脂質ラフトは膜脂質であるスフィンゴミエリンとコレステロールに富んだ比較的かたいドメインであり、脂質分子間の物理的相互作用によって形成されると考えられている。しかしラフトにタンパク質が局在化する理由やラフト中での分子の配列、ラフト形成の駆動力など、その分子基盤はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

これまでの脂質ラフトに関する研究は、脂質に特異的に作用する蛍光プローブを用いたラフト領域のイメージングや可視化されたラフト分子の動的挙動の観測が主であった。一方、脂質分子がラフトを形成する要因やその構造解析は計算科学的手法を用いて試みられており、分子間相互作用も推測されている。しかし実験的には証明されておらず、脂質ラフトの詳細な構造解析に迫る研究はほとんどなされていなかった。

本研究ではラフトの構造を精密に解析し、ラフト形成の要因や関与する弱い脂質分子間相互作用の分子レベルでの解明を目的とした。脂質ラフトの分子基盤の解明は、細胞膜を介した様々な生命現象の機構解明につながるかと期待した。

3. 研究の方法

これまで構造解析に用いられてきた主な分析手法として、X線結晶構造解析および溶液 NMR が挙げられる。しかしながら、脂質膜サンプルは非結晶性であり、かつ異方性の大きな環境であることから、上記2法の適用は困難である。そこで、最近膜タンパクの脂質膜中での構造解析に威力を発揮している固体 NMR に着目した。我々は脂質膜中で分子複合体を形成することによって生理活性を発現する天然物アンフォテリシン B に着目し、分子複合体の構造解析に固体 NMR を用いた研究を行っている。すなわち、複合体を構成する分子に NMR 観測可能な標識原子を有機合成によって導入し、その標識原子間の距離を測定することで、分子複合体の構造に関する情報を得ることに成功している。この手法を脂質ラフトの構造解析にも適用することを考えた。すなわち、脂質ラフト形成分子に標識原子を導入し、固体 NMR による解析を行うことで、ラフト形成分子の構造解析を行い、形成分子間の相互作用を解明することを目指した。

4. 研究成果

① アンフォテリシン B が脂質膜中で形成する分子複合体の構造解析

抗真菌物質アンフォテリシン B (AmB) は、細胞膜中でステロールと共にイオンチャネル複合体を形成して活性を発現するといわれているが、その構造は未解明である。AmB はリジッドなマクロリド骨格にヘプタエン発色団を有することから、UV/CD スペクトルを用いた構造解析が数多くなされている。AmB の脂質膜中での濃度が上昇すると、ヘプタエンの振動構造に由来する UV 吸収が減少し、代わって短波長側に新たな UV 吸収が現れる。また、その吸収に対応する大きな

負の分裂型 CD 吸収も現れ、それらスペクトル変化が複合体形成の指標とされていた。しかし、脂質膜中でのチャネル複合体と UV/CD スペクトルの相関は正確にはわかっていない。

ところで我々は、AmB-ステロール共有結合連結体を用いた固体 NMR 解析を行い、チャネル形成時にステロールがヘプタエン部分に近接していることを観測することに成功している。そこで連結体の egg PC 膜中での UV/CD 測定を行った。膜サンプル調製の際、AmB をリボソーム形成前に添加することで、膜に結合していない会合体 AmB の影響を排除した。測定の結果、連結体は新たな UV 吸収や大きな分裂 CD を示さず、モノマーに類似したスペクトルを与えた。連結体のチャネル活性試験と比較した結果、強い活性を有するものほど、短波長に現れる UV 吸収や分裂型 CD の強度が減少する傾向が認められた。ステロールが近接することで、隣り合う AmB 分子のヘプタエン間相互作用が妨げられると考えられ、従来の解釈とは異なり、チャネル形成時にはモノマーに類似したスペクトルを示すこと、さらに分裂型 CD はチャネル形成時以外の AmB 分子間相互作用に起因することが示唆された。

以上の結果を踏まえ、これまで提唱されていたものとは異なる、新たな分子複合体モデルを提案した。すなわち、ステロールは AmB 分子同士の間を埋めるように位置するのではなく、AmB 分子複合体の外側に配置することで会合体を安定化していると推測した。

② アキシアルリッチ糖骨格を有するエラジタンニン類の合成研究

エラジタンニンは植物が生産する二次代謝産物であり、一般に抗酸化活性を有することから、様々な慢性疾患の予防への応用が期待されている。特にエラジタンニンのグルコース部が通常では熱力学的に不安定なアキシアルリッチ配座 ($^1C_4/B$) を有する天然物は、エラジタンニンの構造的特徴であるヘキサヒドロキシジフェノール (以下 HHDP) 基の構築が困難である。すなわち、安定なエカトリアルリッチ配座 (4C_1) の、ピラノース配座の反転を伴った HHDP 基の構築は困難であり、あらかじめ糖骨格を反転させる等の工夫が求められた。

$^1C_4/B$ エラジタンニンの HHDP 基架橋様式として、グルコースの 3 位と 6 位 (3,6-HHDP)、1 位と 6 位 (1,6-HHDP)、および 1 位と 3 位 (1,3-HHDP) が架橋された天然物が報告されている。当研究室ではこれまでに、3,6-HHDP および 1,6-HHDP 基の構築法を開発した。そこで、本研究では 1,3-HHDP 基構築の確立を目指した。

3,6- および 1,6-HHDP 基は、グルコースの連続するヒドロキシ基に嵩高いシリル基を導入することで、ピラノース配座を ${}^1C_4/B$ 型に反転できることを利用して構築した。しかし 1,3-HHDP 基構築の際には、連続するヒドロキシ基が存在しないことになるため、新たな配座制御法の開発が必要であった。そこで、グルコースの 2 位および 4 位ヒドロキシ基を架橋保護することで反転糖骨格を保持することを考えた。1,6-anhydro- β -D-glucose を出発原料として 2,4-ヒドロキシ基の架橋化を検討した結果、1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサニリデン架橋を高収率で構築することに成功した。続く 1,6-アセタール開裂で得られた 2,4-架橋グルコースは、 1H NMR 結合定数の解析の結果、アキシアルリッチ骨格を保持していることを見出した。この結果によって 1,3-HHDP 基の構築と共に、新たな配座制御法による高立体選択的グリコシル化の開発が期待される。

③ 高 β 選択的グリコシルエステル調製法の開発と、(+)-ダビジン全合成の改善

エラジタンニン¹は D-グルコースのヒドロキシ基がエステル結合した構造を有しているが、アノマー位のエステルの立体配座は β 配向であるものが多いため、高 β 選択的なグリコシルエステル構築法の開発が望まれた。しかし、一般にアノマー位の立体制御に汎用される隣接基関与法では、2 位にアシル基を有する必要があるが、アノマー位に形成したエステル存在下での選択的脱保護に問題が生じる。ところで当研究室では、ピラノースの配座制御に基づく高立体選択的グリコシル化を開発している。すなわち、グルコースの隣接する水酸基を嵩高いシリル基で保護することで配座をアキシアルリッチに制御した糖供与体は、アルコールとのグリコシル化を行うと、高 β 選択的にグリコシドを与える。そこで、糖受容体としてカルボン酸を用いて検討を行った結果、高立体選択的に β -グリコシルエステルを与える条件を見出した。この知見を用い、当研究室において以前全合成を達成した 1,6-HHDP 基を有するエラジタンニン、(+)-ダビジン全合成のステップ数の軽減および全収率の改善に成功した。また今回開発した高立体選択的グリコシルエステル調製法は、より効率的な方法論としてこれからの進展が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Cao Yang, Yusuke Kasai, Masafumi Bando, Mayumi Kawagoe, Hidetoshi Yamada

A 2,4-O-[(Z)-2-Butenylene]-Bridged Glucopyranose: Efficient Construction of the Bicyclic Skeleton and its Axial-rich Twist-Boat Conformation

Tetrahedron **65**(12), 2574-2578 (2009). (査読有)

② Hidetoshi Yamada, Kohei Nagao, Kazutoyo Dokei, Yusuke Kasai, Naoki Michihata
Total Synthesis of (-)-Corilagin

J. Am. Chem. Soc. **130**(24), 7566-7567 (2008). (査読有)

③ Nobuaki Matsumori, Yusuke Kasai, Tohru Oishi, Michio Murata, Kaoru Nomura
Orientation of Fluorinated Cholesterol in Lipid Bilayers Analyzed by ${}^{19}F$ Tensor Calculation and Solid State NMR

J. Am. Chem. Soc. **130**(14), 4757-4766 (2008). (査読有)

④ Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Yuichi Umegawa, Shigeru Matsuoka, Hiroyuki Ueno, Hiroki Ikeuchi, Tohru Oishi, Michio Murata

Self-Assembled Amphotericin B Is Probably Surrounded by Ergosterol: Bimolecular Interactions as Evidenced by Solid-State NMR and CD Spectra

Chem. Eur. J. **14**(4), 1178-1185 (2008). (査読有)

⑤ Satoshi Sekiguchi, Junpei Naito, Hiromi Taji, Yusuke Kasai, Akinori Sugio, Shunsuke Kuwahara, Masataka Watanabe, Nobuyuki Harada

Synthesis of Enantiopure 2-Aryl-2-methoxypropionic Acids and Determination of Their Absolute Configurations by X-ray Crystallography

Chirality **20**(3/4), 251-264 (2008). (査読有)

⑥ Yusuke Kasai, Akinori Sugio, Satoshi

- Sekiguchi, Shunsuke Kuwahara, Takatoshi Matsumoto, Masataka Watanabe, Akio Ichikawa, Nobuyuki Harada
Conformational Analysis of M α NP esters, Powerful Chiral Resolution and ¹H NMR Anisotropy Tools. Aromatic Geometry and Solvent Effects on $\Delta\delta$ Values
Eur. J. Org. Chem. (11), 1811-1826 (2007). (査読有)
- ⑦ Shunsuke Kuwahara, Junpei Naito, Yoko Yamamoto, Yusuke Kasai, Takuma Fujita, Kazutoshi Noro, Kumiko Shimanuki, Megumi Akagi, Miwa Watanabe, Takatoshi Matsumoto, Masataka Watanabe, Akio Ichikawa, Nobuyuki Harada
Crystalline State Conformational Analysis of M α NP esters, Powerful Resolution and Chiral ¹H NMR Anisotropy Tools
Eur. J. Org. Chem. (11), 1827-1840 (2007). (査読有)
- ⑧ Takatoshi Matsumoto, Yoshio Kinoshita, Yusuke Kasai, Shunsuke Kuwahara, Masataka Watanabe
Conformational analysis of methyl 2-methyl-2-(1-naphthyl)propionate
Tetrahedron **63**(3), 615-624 (2007). (査読有)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① (+)-ダビジインの全合成の改善
葛西祐介・道畑直起・西村英久・山田英俊
日本化学会第 89 春季年会 (2009 年 3 月 27 日、千葉)
- ② 新規リフォールディング剤の効果の検討
埜幸作・伊藤廉・葛西祐介・山田英俊・芝野智久・白木賢太郎・日高雄二・奥村正樹・大須賀陽子・山口宏
第 45 回ペプチド討論会 (2008 年 10 月 29 日、東京)
- ③ ダビジイン全合成を目的とした β -Glucosyl Gallate の効率的合成法
河内祐樹・葛西祐介・西村英久・山田英俊
- 第 28 回日本糖質学会年会 (2008 年 8 月 18 日、筑波)
- ④ Hipporhamnin の合成研究
葛西祐介・山田英俊
第 35 回有機反応懇談会 (2008 年 8 月 1 日、大阪)
- ⑤ 1,3-ヘキサヒドロキシジフェノール基を有するエラジタンニン類の合成研究
葛西祐介・山田英俊
日本化学会第 88 春季年会 (2008 年 3 月 26 日、東京)
- ⑥ 4,6-ヘキサヒドロキシジフェノール架橋エラジタンニン、Strictinin の合成研究
道畑直起・谷川康太郎・葛西祐介・山田英俊
日本化学会第 88 春季年会 (2008 年 3 月 26 日、東京)
- ⑦ 1,2,4-エチリジングルコースを用いた 3,6-HHDP 架橋グルコースの高効率合成
谷川康太郎・葛西祐介・山田英俊
日本化学会第 88 春季年会 (2008 年 3 月 26 日、東京)
- ⑧ 酒石酸誘導体を不斉補助基とした hexahydroxydiphenoyl 基の不斉合成
藤本翔平・葛西祐介・今川洋・岡田康則・山田英俊
日本化学会第 88 春季年会 (2008 年 3 月 26 日、東京)
- ⑨ アンフォテリシン B-ステロール連結体が脂質膜中で形成する分子複合体の構造解析
葛西祐介・梅川雄一・松森信明・大石徹・村田道雄
日本化学会第 87 春季年会 (2007 年 3 月 25 日、大阪)
- ⑩ Membrane Permeabilizing Assembly of Amphotericin B - REDOR Experiments for Fluorine-labeled Antibiotics and Sterols
Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Hiroshi Tsuchikawa, Yuichi Umegawa, Tohru Oishi, Michio Murata
第 45 回 NMR 討論会 (2006 年 11 月 22 日、京都)
- ⑪ Amphotericin B-Sterol Covalent Conjugates Forming Molecular Assemblage in Membrane Studied by Solid State NMR
Yusuke Kasai, Nobuaki Matsumori, Shigeru Matsuoka, Yuichi Umegawa, Hiroyuki Ueno,

Hiroki Ikeuchi, Tohru Oishi,, Michio Murata
ICOB-5 & ISCNP-25 IUPAC International
Conference on Biodiversity and Natural
Products (23 July, 2006, Kyoto, Japan)

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

- ⑫ アンフォテリシン B-ステロール連結体が
形成する複合体の固体 NMR による構
造解析
葛西祐介
第41回天然物化学談話会 (2006年7月
3日、北海道)

研究者番号：

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：リフォールディング剤および蛋白質の
リフォールディング方法
発明者：山口宏・伊藤廉・葛西祐介・山田英
俊
権利者：山口宏・伊藤廉・葛西祐介・山田英
俊
種類：特許
番号：2008-277109
出願年月日：平成20年10月28日
国内外の別：国内

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 祐介 (KASAI YUSUKE)
東北大学・大学院理学研究科・COE フェロ
ー
研究者番号：50379286

(2) 研究分担者

()