

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05404

研究課題名(和文) モジュール構造変更アナログ脂質の二重膜キャラクタリゼーション

研究課題名(英文) Bilayer characterization of analog lipids having modified module structure

研究代表者

松木 均 (MATSUKI, Hitoshi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：40229448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非天然のモジュール構造変更アナログ脂質として、脂質分子骨格に2つの疎水鎖がアミド結合により対称的に連結したアミド結合型リン脂質、ジアシルアミドデオキシホスファチジルコリンを有機合成により作製した。これら非天然脂質の形成する二重膜の特性を示差走査熱量測定、高圧光透過率測定および核磁気共鳴測定から調査し、骨格への鎖結合様式および疎水鎖長が二重膜へおよび影響について検討した。分子骨格へのアミド結合の導入は、二重膜中で隣り合う分子間でアミド結合同士が分子間水素結合を形成するといった強い骨格間相互作用に起因して、ゲル相や水和結晶相のような凝縮相の充填状態を顕著に強めることを結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまで、天然に存在するリン脂質が形成する二重膜の膜状態を脂質分子構造と関連させながら系統的に明らかにしてきた。本研究では、これまでの研究を脂質分子骨格中の共通のモジュール構造自体の配列順序や鎖結合様式を変化させた非天然のモジュール構造変更アナログ脂質へと拡張した。アミド結合型リン脂質を有機合成で作製し、その膜状態をキャラクタリゼーションすることで、グリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質の差異に関する有用な情報を得ることができた。今後、さらなるモジュール構造変更アナログ脂質を用いることで、生体膜脂質の存在意義や使命に関する根源的な情報が得られるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：As unnatural analog lipids having modified module structure, amide-linked phospholipids which have the two hydrophobic chains bonded to the lipid molecular backbone by an amide linkage, diacylamidodeoxyphosphatidylcholine, were made by organic synthesis. The properties of bilayer membranes formed by these unnatural phospholipids were investigated by methods of differential scanning calorimetry, high-pressure light transmittance and nuclear magnetic resonance measurements and the effects of chain-linkage types to the backbone and hydrophobic chain lengths on the bilayer membranes were considered. It was concluded that introduction of amide bonds to the molecular backbone significantly tightens the molecular packing states in condensed phases such as gel and hydrated crystalline phases according to strong interaction between the backbones as the formation of intermolecular hydrogen bonding between amide bonds of adjacent molecules in the bilayer membrane.

研究分野：生物物理化学

キーワード：モジュール変更アナログ脂質 グリセロリン脂質 スフィンゴリン脂質 ホスファチジルコリン 脂質 二重膜 相転移 高圧力 熱測定

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜を構成する主要な天然脂質は、3価アルコールであるグリセロールをその基本骨格とし、2つのアルコール側鎖に脂肪酸が、もう1つのアルコール側鎖にコリンのような種々の極性基がリン酸を介して脱水縮合したグリセロリン脂質である。天然脂質は何故このような分子構造を取るのだろうか。単純なC3化合物であるグリセロールは、細胞内で容易に合成可能であり、基本骨格となることは予想できる。また、長い二本鎖を有する活性剤はミセルではなくベシクルを形成し、これは二重膜形成に必須である。したがって、この基本構造に単純な構造の極性基が結合すれば、二重膜形成が可能になることから、膜形成に必要な脂質の種類は比較的になくてよいと思われる。しかし、脂質の種類(いわゆる構成単位数)は数千種類以上も存在し、他の生体分子である核酸やタンパク質の構成単位であるヌクレオチド(5種)やアミノ酸(20種)に比べて桁外れに多い。脂質分子の示す大きな多様性は、この分子構造中の疎水基と親水基が可変可能なモジュール構造であり、両者の組み合わせが無数に存在することに起因する。その一方で、各モジュール間の配列様式は(骨格への疎水鎖結合様式やリン酸を介した極性頭部の結合など)に関しては、大半の膜脂質で共通となっており、例外はほとんど見られない。

### 2. 研究の目的

生体分子は、合目的にその機能が発現することを考える時、脂質の基本構造には何か利点が存在するはずである。我々は、脂質多様性の原因となっている脂質分子骨格中の疎水基と親水基のような各モジュール自体の変化では無く、モジュールの基本的な配列様式を変化させ、天然脂質と構造が類似した非天然のモジュール構造変更アナログ脂質を有機合成し、作製した非天然アナログ脂質と天然脂質の二重膜物性の比較研究を行うことにした。

本研究では、真核生物の生体膜脂質であるグリセロリン脂質とスフィンゴリン脂質の分子構造上の差異に着目した。グリセロリン脂質の骨格と疎水鎖の結合様式を1つアミド結合にすれば、スフィンゴリン脂質と類似した構造をとることができるが、天然にはそのような脂質は存在せず、スフィンゴリン脂質はスフィンゴシンと言うわざわざ構造の複雑な骨格を採用し、アミド結合を導入している。この理由を調査するために、脂質分子骨格にアミド結合を有するモジュール構造変更アナログ脂質を研究対象とした。

### 3. 研究の方法

脂質分子骨格に2つの疎水鎖がアミド結合により対称的に連結したアミド結合型リン脂質、ジアシルアミドデオキシホスファチジルコリン(DAADPC)を有機合成により作製した。

濃度 1 mmol kg<sup>-1</sup> の DAADPC 分散液を調製し、各 PC 二重膜の主転移温度以上において数分間の超音波処理後、冷蔵保存したものを測定に供した。水和結晶(L<sub>c</sub>)相の観測のために、試料溶液に静的(試料溶液を一定温度下において静置)および動的(試料溶液に凍結融解処理を繰り返し実施)な熱的アニーリング処理を実施した。

脂質膜相転移の観測は、常圧(大気圧)下においては示差走査熱量(DSC)および核磁気共鳴(NMR)測定で、高圧下においては光透過率測定で行った。

### 4. 研究成果

本研究では、DAADPCを合成後、まず疎水鎖長が18のアミド結合型PCであるジパルミトイルアミドデオキシPC(DPADPC)の二重膜物性を同鎖長で疎水鎖結合様式が異なるエステル型PCであるジパルミトイルPC(DPPC)およびエーテル型PCであるジヘキサデシルPC(DHPC)の二重膜のものと比較した。これら脂質の分子構造を図1(a)に示す。続いて、疎水鎖長が異なる4種類のDAADPCの二重膜状態を温度-圧力相図から精査した。

#### (1) DAADPCの有機合成

DPADPCの合成スキームを図1(b)に挙げる。ジアミノプロパン酸を出発原料として、トリエチルアミンと塩化パルミトイルを反応させてアミド骨格を生成後に、二つのパルミチン酸をア

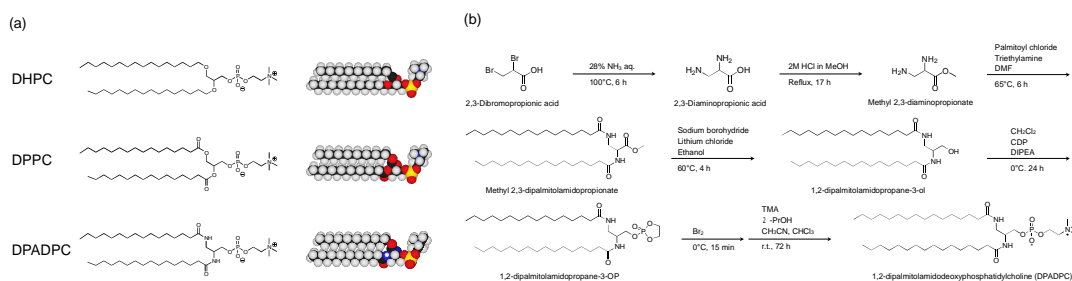


図1 (a) 疎水鎖結合様式が異なる PC の分子構造、(b) DPADPC の合成スキーム

ミド結合で連結させた疎水鎖アルコールを得た。得られたアルコールをリン系の五員環化合物と反応後、環を開裂させて、目的物である DPADPC の生成物を得た。生成物は、カラムおよびイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、 $^{31}\text{P-NMR}$  および LC-MS 測定によって確認した。同様な手順で疎水鎖長の異なる同族体 ( $n = 12, 14, 18$ ) を合成した。

### (2) DPADPC 二重膜の温度および圧力誘起相転移

低温 ( $5^\circ\text{C}$ ) で静的アニーリング処理した DPADPC 二重膜の DSC サーマグラムを図 2 (a) に示す。一度目の昇温過程では、 $41.4^\circ\text{C}$  に単一の大きな吸熱ピークを観測した。昇温後、降温し、再度昇温すると  $34^\circ\text{C}$  付近の発熱反応に続いて  $40.6^\circ\text{C}$  に単一の大きな吸熱ピークを観測した。高温下における静的アニーリング処理試料の熱的挙動から、 $41.4^\circ\text{C}$  の吸熱ピークを  $L_c$  相から液晶 ( $L_\alpha$ ) 相への転移、 $40.4^\circ\text{C}$  の吸熱ピークを高秩序ゲル (Gel (h)) 相から  $L_\alpha$  相への転移、 $34^\circ\text{C}$  の発熱ピークを低秩序ゲル (Gel (l)) 相から Gel (h) 相への転移と決定した。

図 2 (b) に圧力一定下における DPADPC 二重膜の光透過率-温度曲線を挙げる。動的アニーリング処理の有無により、光透過率曲線の挙動は大きく異なった。動的アニーリング処理した試料は  $L_c$  相形成を伴うため、光透過率曲線は比較的単純な挙動を示したが、アニーリング未処理試料では、常圧下の熱測定で観測された二つのゲル相に加え低圧領域で Gel (x) 相が、高圧領域で Gel (y) 相が観測された。

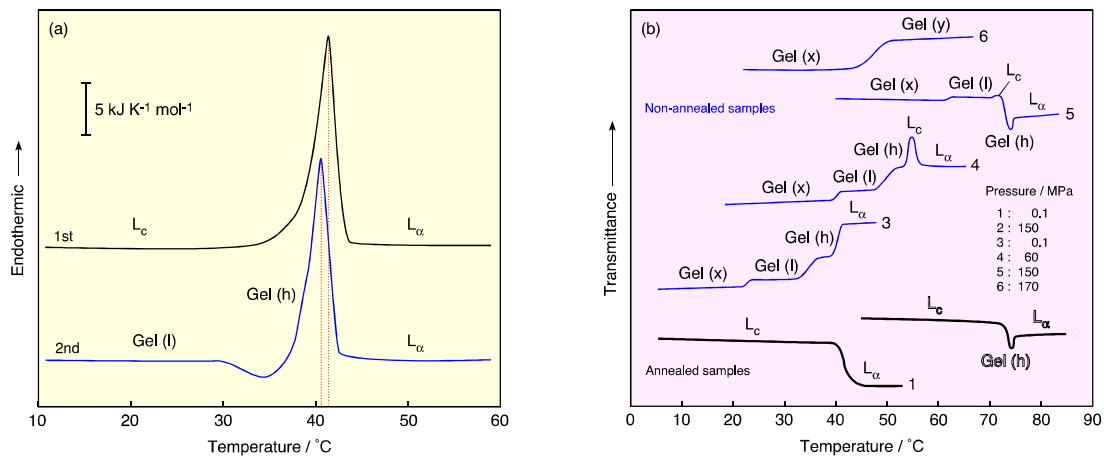


図 2 (a) DPADPC 二重膜の DSC サーマグラム、(b) DPADPC 二重膜の高圧光透過曲線

### (3) DPADPC 二重膜の温度-圧力相図：鎖結合様式の影響

DSC 測定および光透過率測定において得られた相転移データを用いて、DPADPC 二重膜の温度 ( $T$ ) - 圧力 ( $p$ ) 相図を作成した。結果の相図を疎水鎖結合様式が異なる DPPC および DHPC 二重膜のものと共に図 3 に示す。まず、以前の  $T-p$  相図や相転移熱力学量の特徴を検討し、Gel (x) 相をラメラゲル ( $L_\beta'$ ) 相、Gel (l) 相を低秩序リップルゲル ( $P_\beta'(l)$ ) 相、Gel (h) 相を高秩序リップルゲル ( $P_\beta'(h)$ ) 相、Gel (y) 相を指組み構造ゲル ( $L_\beta I$ ) 相と同定した。3 種類の PC 二重膜の相図を比較してみると、ゲル-液晶転移である主転移の曲線の挙動は全 PC 二重膜間ではほぼ同様な挙動を取り、同鎖長の鎖融解転移は類似性を示唆した。ゲル相の多形は全 PC 二重膜で見られ、DHPC、DPPC、DPADPC の順序で観測されるゲル相数が増加した。注目すべきは  $L_\beta I$  相の挙動であり、DHPC 二重膜は常圧下、水和のみで  $L_\beta I$  相を形成するが、DPPC および DPADPC 二重膜では圧力下で誘起され、DPADPC 二重膜が最も高圧力を必要とした。 $L_c$  相に関しては、 $L_c$  相関連転移の転移温度は DHPC、DPPC、DPADPC の順序で約  $20^\circ\text{C}$  ずつ上昇した。また、 $L_c$  相の形成

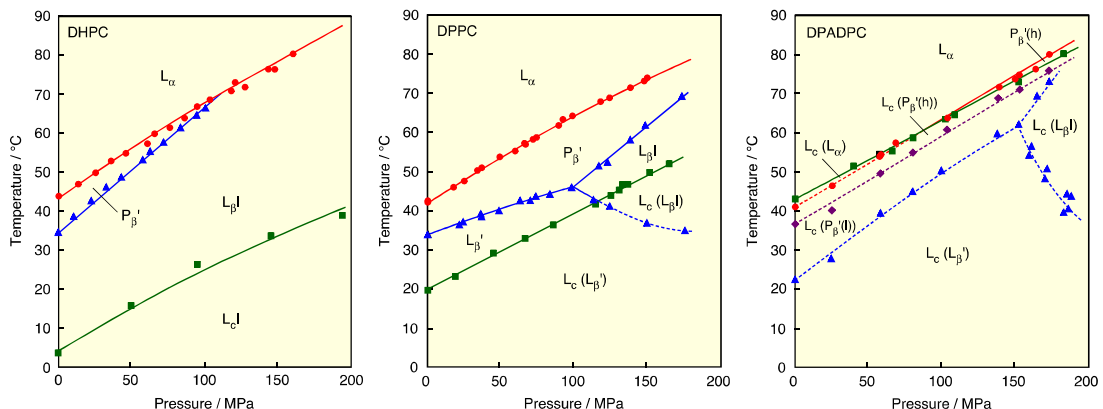


図 3 疎水鎖結合様式が異なる PC 二重膜の温度-圧力相図

に關係するゲル相の安定性は、DHPC、DPPC、DPADPC の順序で、完全安定相、一部が準安定相、ほぼ全てが準安定相へと變化した。これらの結果から、ゲル相や  $L_c$  相においては、PC 分子間相互作用が DHPC、DPPC、DPADPC の順序で強められることが明らかとなった。

#### (4) DPADPC の二重膜内運動性

3 種類の PC 二重膜内における脂質分子運動性を  $^{13}\text{C}$ -NMR 測定により得られたピークスペクトルの半値幅値から評価した。PC 分子中のコリンメチル基以外のピークは、主転移温度以下の低温領域では、ほぼ消失してしまうので、コリンメチル基の挙動から運動性を評価した。図 4 は各 PC 二重膜に対して得られた降温過程における半値幅値の温度依存性である。いずれの PC 二重膜においても温度降下に伴い、半値幅値は主転移温度近傍で急激に増大し、 $L_\alpha$  相からゲル相への変化に伴い運動性が顕著に抑制されることが分かる。 $L_\alpha$  相では、DPPC と DHPC 両二重膜はほぼ同程度の値を示したが、対照的に DPADPC 二重膜は非常に大きな値となった。一方、ゲル相では、半値幅値は DHPC 二重膜が DPPC 二重膜よりも低値となった。DPADPC 二重膜では、 $L_\alpha$  相と同様にゲル相においても両二重膜よりも非常に大きな半値幅値となった。上記の結果は、DHPC 分子と DPPC 分子の  $L_\alpha$  相中における運動性は類似しているが、ゲル相では DPPC 分子が DHPC 分子に比べて束縛を受けていることを示している。他方、DPADPC 二重膜では、 $L_\alpha$  相とゲル相共に分子運動性が極端に低下し、非常に大きな分子束縛を受けているのが理解できる。DPADPC 二重膜に見られる強い分子運動抑制は、二重膜中で隣り合う分子間でアミド結合同士が分子間水素結合を形成するといった強い骨格間相互作用に起因している。

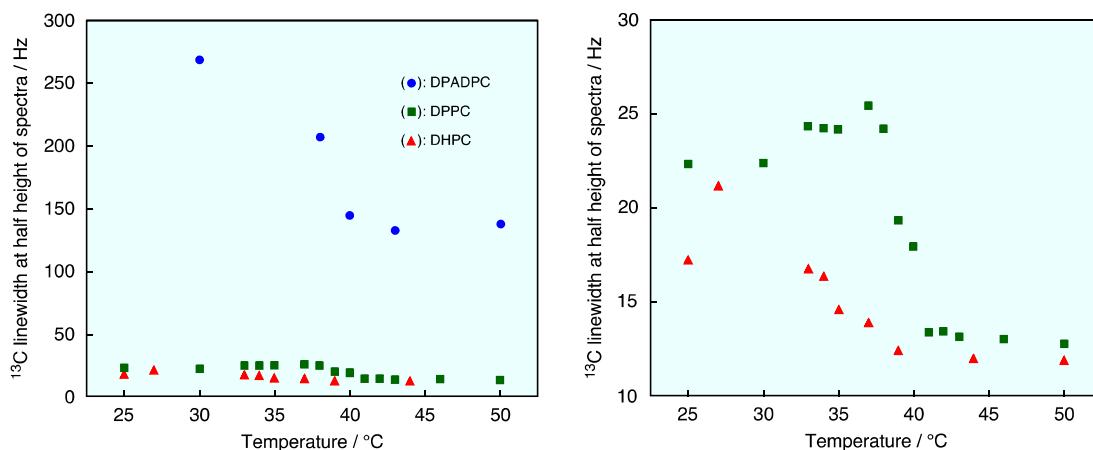


図 4 疎水鎖結合様式が異なる PC 二重膜の  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルにおけるコリンメチル基半値幅の温度依存性 (左図は右図の低半値幅領域の拡大図)

#### (5) DAADPC 二重膜の温度-圧力相図：疎水鎖長の影響

同様な実験手法で鎖長が異なるアミド結合型 PC (ジラウロイル (DLADPC)、ジミリストイル (DMADPC) およびジステアロイル (DSADPC)) の相転移を常圧および高圧下で調査し、これらアミド結合型 PC 二重膜の  $T$ - $p$  相図を構築した。結果の  $T$ - $p$  相図を DPADPC のものと共に図 5 に示す。全圧力範囲において DLADPC 二重膜では、主 ( $L_\beta/L_\alpha$ ) 転移は観測できず、 $L_c/L_\alpha$  転移のみを観測した。常圧下、DMADPC、DPADPC および DSADPC 二重膜では一度目の昇温過程では  $L_c/L_\alpha$  転移を、二度目の昇温過程では主転移を観測した。疎水鎖長の伸長および加圧により相転移温度は上昇し、後者 3 種類の PC 二重膜では、主転移温度曲線の勾配 ( $dT/dp$ ) が  $L_c$  関連曲線にもよりの大きいことから、両曲線は鎖長依存的に高圧領域で交差し、この交差点でゲル相の安定性が變化した。DPADPC 二重膜は 150 MPa 以上の高圧力領域で  $L_{\beta I}$  相の形成が見られ、DSADPC 二重膜では、常圧下において通常のゲル相では無く、凝集性が顕著に高い相 (X 相) の

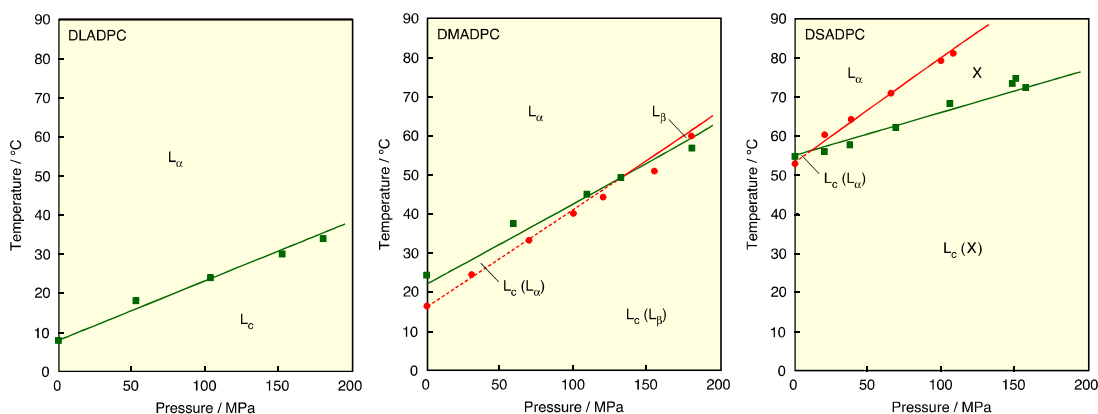


図 5 疎水鎖長が異なるアミド結合型 PC 二重膜の温度-圧力相図

形成が示唆された。これらの結果より、DAADPC 二重膜は鎖長伸長による疎水性相互作用の増大が、強い骨格間相互作用に相乗的に作用して、これら PC 二重膜の相挙動に大きな影響を与えることを結論づけた。

本研究は、PC 分子内へのアミド結合の導入によりその膜状態に与える影響を明確にした。一方で合成したアミド結合型 PC はラセミ体であり、純粋な光学異性体間との比較にも興味を持たれる。また、現在、天然脂質分子構造のモジュール配列順序を疎水鎖、骨格、極性頭部、リン酸へと変化させた極性頭部転置型の非天然グリセロリン脂質の有機合成に着手しており、今後、これらモジュール構造変更アナログ脂質の二重膜状態についても調査していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Goto, H. Sawaguchi, N. Tamai, H. Matsuki	4. 巻 239
2. 論文標題 Subgel-phase formation of membranes of ether-linked phosphatidylcholines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Phys. Lipids	6. 最初と最後の頁 105119, 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2021.105119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Nakao, M. Goto, M. Kurashina, N. Tamai, M. Yasuzawa, H. Matsuki	4. 巻 95
2. 論文標題 Temperature- and Pressure-Induced Bilayer Phase Transitions of an Amide-Linked Phosphatidylcholine: A Contrasting Effect of Chain-Linkage Type	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 261-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20210395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 松木 均	4. 巻 31
2. 論文標題 高圧力下におけるリン脂質二重膜相転移の研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 高圧力の科学と技術	6. 最初と最後の頁 96-111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4131/jshpreview.31.96	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 H. Matsuki, M. Goto, M. Motohashi, A. Kiguchi, T. Nakao, N. Tamai	4. 巻 1862
2. 論文標題 Formation of Intermediate Gel-Liquid Crystalline Phase on Medium-Chain Phosphatidylcholine Bilayers: Phase Transitions Depending on the Bilayer Packing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta	6. 最初と最後の頁 183197, 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松木 均	4. 巻 47
2. 論文標題 リン脂質二重膜相転移の熱力学的研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 熱測定	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計51件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 中尾俊樹, 後藤優樹, 倉科 昌, 玉井伸岳, 安澤幹人, 松木 均
2. 発表標題 モジュール構造変更アナログ脂質の合成と二重膜物性
3. 学会等名 日本膜学会第43年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤優樹, 中尾俊樹, 玉井伸岳, 松木 均
2. 発表標題 アミド結合同型リン脂質ジアシルアミドデオキシホスファチジルコリン二重膜の常圧および高压相転移
3. 学会等名 第72回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾俊樹, 後藤優樹, 倉科 昌, 玉井伸岳, 安澤幹人, 松木 均
2. 発表標題 ホスファチジルコリン二重膜におよぼす疎水鎖結合様式の影響
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中尾俊樹, 後藤優樹, 倉科 昌, 玉井伸岳, 安澤幹人, 松木 均
2. 発表標題 スフィンゴ脂質類似アミド結合型ホスファチジルコリンの有機合成と二重膜物
3. 学会等名 日本膜学会第42年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中尾俊樹, 後藤優樹, 倉科 昌, 玉井伸岳, 安澤幹人, 松木 均
2. 発表標題 スフィンゴリン脂質類似アミド型リン脂質二重膜の熱的相転移: 鎖結合様式の対照的效果
3. 学会等名 第56回熱測定討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松木 均	4. 発行年 2020年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 394
3. 書名 熱量測定・熱分析ハンドブック(第3版), 5.4.9 脂質の安定性 - 生体膜の相転移 -, 5.4.10 脂質の安定性 - 脂質膜の相転移 -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	玉井 伸岳  (TAMAI Nobutake)  (00363135)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・准教授   (16101)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	後藤 優樹  (GOTO Masaki)  (30507455)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学 域）・准教授    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関