

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870381

研究課題名(和文)有機化学を基盤とした古細菌膜脂質分子の生合成および動態の解明

研究課題名(英文) Study on the biosynthesis and the dynamics of archaeal membrane lipids using synthetic lipid probes

研究代表者

渡辺 文太 (Watanabe, Bunta)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、古細菌膜脂質の生合成および動態を追跡することのできる脂質プローブの合成法の確立である。目標化合物の合成経路および反応条件を精査した結果、アーキチジルエタノールアミンの極性頭部に蛍光発色団を導入した脂質プローブの合成を達成した。また、古細菌型膜脂質のsn-2位あるいはsn-3位に蛍光発色団が存在し、極性頭部の構造を様々に変化させることのできる鍵合成中間体の創出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Structure of membrane lipids of Archaea significantly differs from that of Bacteria and Eukarya. In this study, we designed and synthesized archaeal membrane lipid analogs that bear a fluorescent group in order to unveil the biosynthesis and the dynamics of membrane lipids of Archaea. Detailed investigations of synthetic routes achieved a successful synthesis of a fluorescent-labeled archaetidylethanolamine derivative, as well as key synthetic intermediates that enable efficient preparation of archaeal-type fluorescent lipid probes with various polar head groups.

研究分野：有機合成化学、生物有機化学

キーワード：古細菌 エーテル型膜脂質 化学プローブ 蛍光ラベル 脂質生物学 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

古細菌は、リボソーム小サブユニットの分子系統解析より提唱された生物の三ドメイン説において、真正細菌、真核生物と並ぶ第三の生物群を構成している。進化系統樹では、生命の共通祖先からまず真正細菌が分岐し、次いで古細菌と真核生物にわかれている。古細菌の生物学的・生化学的な性質は、独自の特徴に加えて他の生物群と共通の性質も併せ持つため、古細菌、真正細菌、および真核生物の生命システムを比較することで、生命の進化の過程を解明することができる。

古細菌に固有な生物学的特徴の一つに膜脂質の構造があげられる。古細菌の膜脂質は、以下に述べる点が真正細菌や真核生物と大きく異なる(図1)。

1. 古細菌の膜脂質は、sn-2位およびsn-3位にアルキル鎖が結合しており、sn-1位およびsn-2位に脂肪酸を有する他生物の膜脂質と鏡像異性体の関係にある。
2. 古細菌の脂質アルキル鎖はエーテル結合によりグリセロール骨格に結合している。
3. 古細菌の脂質アルキル鎖は直鎖状ではなく、分岐したイソプレノイド鎖である。
4. 脂質分子の末端同士が結合した膜貫通型脂質が存在する。

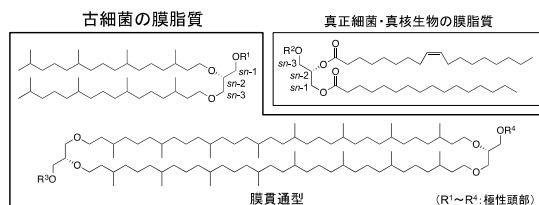


図1. 古細菌膜脂質の構造.

古細菌膜脂質生合成の概要は以下の通りである。ジヒドロキシアセトンリン酸より誘導される sn-グリセロール-1-リン酸の sn-3位に、イソペンテニルリン酸およびジメチルアリルリン酸から生合成されたゲラニルゲラニルリン酸が反応して、ゲラニルゲラニルグリセロールリン酸が生じる。さらに sn-2位にゲラニルゲラニル基が結合して、鍵中間体であるジゲラニルゲラニルグリセロールリン酸となる。これ以降の生合成反応によって古細菌膜脂質の多様性が生じるが、明らかにすべき点が数多く存在する。

例えば、膜貫通型脂質の生合成については全く分かっていない。この段階では不活性なメチル基間のカップリングという有機化学の常識からかけ離れた反応が示唆されており、生合成酵素の単離・同定が注目を集めている。また、生合成された膜脂質の動態についても知見は乏しい。古細菌の細胞膜は他の生物群と同様に非対称性を有しており、内葉と外葉で極性頭部の分布が異なる。真正細菌や真核生物と同様にフリップ-フロップによる内葉-外葉間での輸送が想像され、実際に

古細菌のゲノム上には膜輸送を行う ATPase 遺伝子が多数見出されているが、*in vitro* および *in vivo* における膜脂質のフリップ-フロップや局在性に関する知見は無い。さらに、他の生物群と同様古細菌にも脂質分子が結合したリポタンパク質が存在するが、その生合成過程は不明である。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、古細菌の脂質ダイナミクスを真正細菌および真核生物と比較しながら詳細に検討し、脂質生物学の観点から生命の進化を明らかにすることにある。この一環として、本研究では古細菌の膜脂質を対象とし、その生合成および動態の解明を目的とする。具体的には、蛍光標識を導入した膜脂質プローブを有機化学的に合成し、合成した脂質プローブを菌体に投与して脂質分子の動態の可視化や新規生合成関連酵素の探索を行うことで、古細菌膜脂質分子の生合成から輸送や同化に至る一連の過程を明らかにすることを目指す。蛍光標識を導入した古細菌型膜脂質に関してはこれまでに合成例が一切無いため、本研究では脂質プローブ合成経路の確立に主眼を置き、図2に示す脂質プローブ1-3を合成目標化合物として設定した。

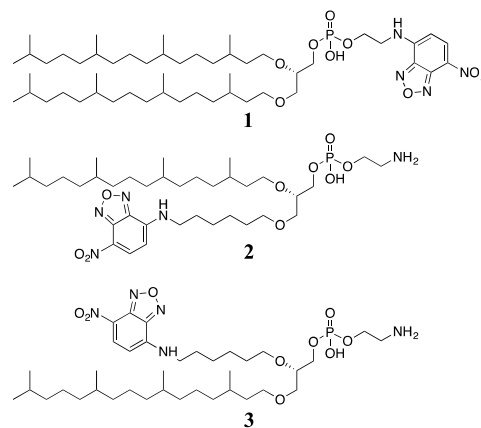


図2. 本研究で合成を目指す脂質プローブ.

3. 研究の方法

(1) 脂質プローブ1の合成

脂質プローブ1の合成経路を図3に示す。市販のフィトール(4)の二重結合を接触水素化により還元した後、一級水酸基をメタンスルホニル化してメシレート5を得た。フィトールの接触水素化では、溶媒はエタノールよりもテトラヒドロフランが好ましく、触媒にパラジウム炭素を用いた場合、大部分のアルコールがアルカンへと還元されてしまった。得られたメシレート5を、ジムシルアニオンの存在下、(R)-ソルケタールから二段階の反応で調製したジオール6と反応させ、グリセロールの sn-2位および sn-3位がアルキル化されたジフィタニル体7を得た。このも

この *sn*-1 位の *p*-メトキシベンジル (PMB) エーテルを 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノベンゾキノン (DDQ) を用いて除去した後、得られた一級アルコール **8** をジイソプロピルアンモニウムテトラゾリドの存在下、別途調製したホスホロアミダイト **9** と反応させ、次いで *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) で処理することで極性頭部を導入した。さらに、化合物 **10** の保護基をトリフルオロ酢酸 (TFA) で酸性加水分解した後、得られたアーキチジルエタノールアミンのアミノ基を蛍光ラベル化剤である 4-クロロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール (NBD-Cl) と反応させ、目的とする脂質プローブ **1** の合成を達成した。

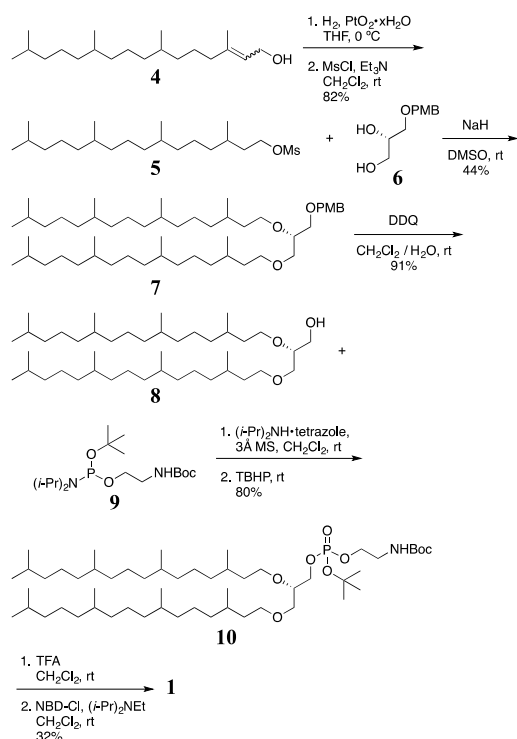


図 3 . 脂質プローブ 1 の合成 .

(2) 脂質プローブ 2 の合成研究

脂質プローブ **2** の合成経路を図 4 に示す。*(S)*-ソルケタール (**11**) と、6-クロロヘキサン-1-オールから二工程で調製したメシレート **12** をジムシルアニオンの存在下反応させて *sn*-3 位をアルキル化した後、アセトニドを酸性条件下加水分解してジオール **13** を得た。このものの一級水酸基を選択的にトリフェニルメチル (Tr) 基で保護して二級アルコール **14** とした後、粉末状の水酸化カリウムの存在下、還流ベンゼン中で前述のフィタニルメシレート **5** と反応させることで、*sn*-2 位にフィタニル基を導入した。このアルキル化反応には、塩基として粉末状水酸化カリウムの使用が適しており、ジムシルアニオンでは化合物 **14** の二級アルコールをアルキル化することができなかった。次に、化合物 **15** のアジド基を水素化リチウムアルミニウムで還元してアミン **16** とした後、炭酸水素ナト

リウム の存在下 NBD-Cl と反応させ、*sn*-3 位のアシル鎖末端に蛍光発色団を導入した。さらに、化合物 **17** の Tr 基をギ酸を用いて酸性加水分解して、一級アルコール **18** を得た。本反応条件では、*sn*-1 位がギ酸エステルとなった副生成物が収率 11% で同時に得られた。化合物 **18** は脂質プローブ **1** の合成で述べたように、ホスホロアミダイト **9** と反応させることでアーキチジルエタノールアミン型の脂質プローブ **2** へと誘導することが可能である。また、アーキチジルエタノールアミン型以外の極性頭部を導入することもできるため、古細菌型膜脂質プローブ合成において有用な鍵合成中間体である。

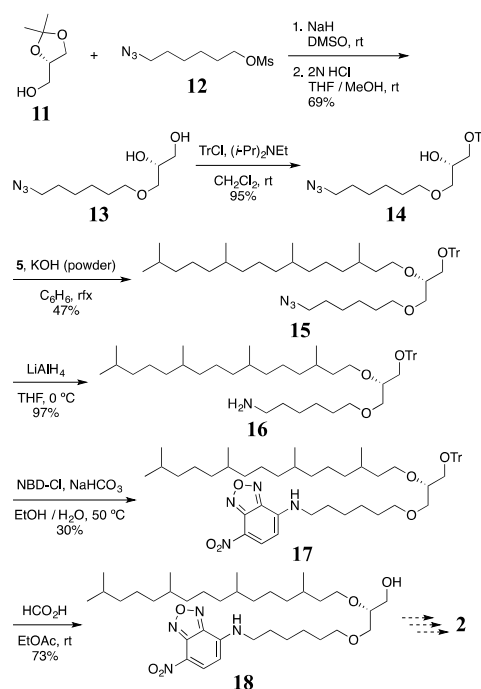


図 4 . 脂質プローブ 2 の合成 .

(3) 脂質プローブ 3 の合成研究

脂質プローブ **3** の合成経路を図 5 に示す。*(S)*-ソルケタール (**11**) とフィタニルメシレート **5** をジムシルアニオンの存在下反応させた後、アセトニドを酸性条件下加水分解してジオール **19** を得た。このものの一級水酸基を Tr 基で選択的に保護した後、得られた化合物 **20** の二級水酸基を、粉末状の水酸化カリウムの存在下、前述のメシレート **12** を用いてアルキル化した。次に、化合物 **21** のアジド基を水素化リチウムアルミニウムで還元してアミン **22** とした後、エチルジイソプロピルアミンの存在下 NBD-Cl と反応させて、*sn*-2 位のアシル鎖末端に蛍光発色団を導入した化合物 **23** を得た。化合物 **23** はこれまでに述べた方法により、*sn*-2 位に蛍光発色団を導入したアーキチジルエタノールアミン型の脂質プローブ **3** へと変換することが可能である。また、アーキチジルエタノールアミン型以外の極性頭部を導入することもできるため、古細菌型膜脂質プローブ合成におい

で有用な鍵合成中間体である。

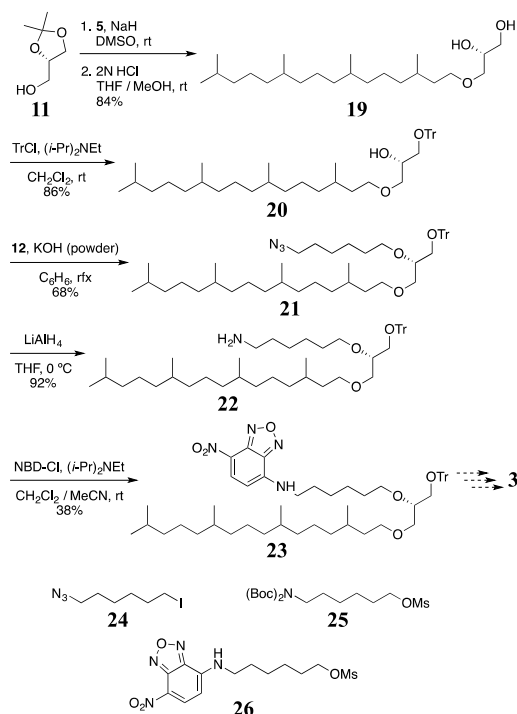


図5．脂質プローブ2の合成．

なお、本研究では末端にアジド基を持つメシレート 12 をアルキル化剤として用い、アジドを還元してアミノ基とした後、蛍光発色団である NBD 基を導入しているが、その他のアルキル化剤の使用や反応条件についても検討を行った。図5に示すヨウ化物 24 は、メシレート 12 から容易に調製できる。Miyawaki らは、グリセロールの1位と3位を Tr 基と PMB 基でそれぞれ保護した化合物の二級水酸基を、*N,N*-ジメチルホルムアミド中水素化ナトリウムおよびテトラブチルアンモニウムヨードジドの存在下メシレートと反応させて、アルキル化を高収率で得ている (*Synlett* 2002, 1326-1328; *ibid.* 2002, 1467-1470)。そこで本研究ではこの反応条件を参考に、ヨウ化物 24 と二級アルコール 20 を *N,N*-ジメチルホルムアミド中で水素化ナトリウムの存在下反応させたが、反応はほとんど進行しなかった。また、6-アミノヘキサン-1-オールから五工程で誘導されるメシレート 25 は、ジムシルアニオンあるいは粉末状水酸化カリウムを用いたアルキル化の条件で分解することが明らかとなった。さらに、6-アミノヘキサン-1-オールから二段階の反応で調製したメシレート 26 は、2,4,6-コリジンに対しては安定であったが、より塩基性の高い 4-ジメチルアミノピリジンに対しては不安定であった。

4．研究成果

本研究では古細菌膜脂質の生合成および動態を追跡することのできる脂質プローブの合成法の確立を目指し、有機合成化学の手

法を用いて研究を進めた。その結果、アーキチジルエタノールアミンの極性頭部に蛍光発色団 (NBD 基) を導入した脂質プローブ 1 の合成を達成した。また、脂質分子のアルキル鎖末端に NBD 基を導入するために好適な反応条件およびアルキル化剤 12 を見出し、古細菌型膜脂質の *sn*-3 位あるいは *sn*-2 位に NBD 基が存在し、極性頭部の構造を様々に変化させることのできる鍵合成中間体 18 および 23 の合成に成功した。古細菌膜脂質をベースとした蛍光脂質プローブの開発は、本研究が世界で最初の例である。本研究で得られた成果を基盤として、今後、古細菌膜脂質の生合成および動態に関する研究が飛躍的に進展するものと期待される。

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0件)

[学会発表](計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

渡辺 文太 (WATANABE, Bunta)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637