

末端にパーフルオロブチル基を有するエーテル結合型ホスファチジルコリン
水和二分子の構造および熱力学的研究

Structural and thermodynamic studies of hydrated bilayers composed of ether-linked
phosphatidylcholine with terminal perfluorobutyl groups

宮崎真哉¹, 蟻坂知佳¹, 中川原亜依¹, 笹木菜々子¹, 高橋 浩^{2*}, 高木俊之³, 網井秀樹^{1,4},
園山正史^{1,4,5}

¹群馬大学大学院理工学府 分子科学部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

²群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

³産業技術総合研究所 細胞分子工学研究部門, 〒305-8565 茨城県つくば市東 1-1-1

⁴群馬大学未来先端研究機構元素科学研究部門, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

⁵群馬大学食健康科学教育研究センター, 〒376-8515 桐生市天神町 1-5-1

Masaya MIYAZAKI¹, Chika ARISAKA¹, Ai NAKAGAWARA¹, Nanako SASAKI¹, Hiroshi
TAKAHASHI^{2*}, Toshiyuki TAKAGI³, Hideki AMII^{1,4}, Masashi SONOYAMA^{1,4,5}

¹Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University,
Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

²Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma
University, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

³Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST, Tsukuba, Ibaraki 305-8565, Japan

⁴Gunma University Initiative for Advanced Research (GIAR), Gunma University, Kiryu, Gunma
376-8515, Japan

⁵Gunma University Center for Food Science and Wellness (GUCFW), Gunma University, Kiryu,
Gunma 376-8515, Japan

1 はじめに

細胞膜の主要構成成分であるリン脂質は、水中で自発的にリポソームを形成する。リポソームは薬物送達システムとして広く活用されるとともに、膜タンパク質の構造・機能解析における再構成材料としても重要な役割を担っている。こうした応用においては、リポソームが機械的・化学的刺激に対して高い安定性を持つことが不可欠であり、構成脂質自体の化学的安定性も同様に求められる。

安定なリポソームを実現するための戦略として、二つのアプローチが注目されてきた。一つは、古細菌一般に見出されるエーテル結合型リン脂質の活用である。細菌や真核生物のリン脂質ではグリセロール骨格と脂肪酸鎖がエステル結合で連結されているのに対し、古細菌のリン脂質ではエーテル結合が採用されており、これが高温・高塩濃度などの極限環境への適応を可能にする高い化学的安定性の源泉と考えられている[1,2]。もう一つのアプローチは、パーフルオロアルキル基 (Rf 基、 C_nF_{2n+1})、すなわち、炭化フッ素鎖の導入である。Rf 基は疎水性かつ疎油性という特異な物性を持ち[3]、この性質を利用した部分フッ素化エステル型ホスファチジルコリン (Fn-PC) がこれまでに開

発され、生化学・生物医学的応用の観点から研究が進められてきた[4-12]。

特に、部分フッ素化ジミリスチル PC (Fn-DMPC) シリーズを用いた先行研究では、モデル膜タンパク質であるバクテリオドロプシン (bR) の再構成に成功し、天然状態に極めて近い高次構造・光サイクルおよび高い熱安定性が実現されることが示された [8-10,12]。これは通常の DMPC を用いた場合に相転移により 20°C も低い温度で bR 三量体が解離するという問題点を克服するものであり、部分フッ素化リン脂質が膜タンパク質研究において卓越した潜在能力を持つことを示している。

しかしながら、エーテル結合と Rf 基という二つの安定化要素を組み合わせた化合物に関する系統的な研究はほとんど行われておらず、特にアルキル鎖長が膜物性に与える影響については知見が乏しかった。そこで本研究 [13]では、末端にパーフルオロブチル基 (C_4F_9) を持ち、アルキル鎖長の異なる三種類の新規エーテル結合型 PC (di-O-F4-Cn-PC、 $n=14, 16, 18$) を合成し、示差走査熱量測定 (DSC) および X線回折 (XRD) を用いて、その熱力学的・構造的性質を体系的に解明す

ることを目的とした。得られた知見は、膜タンパク質の生物物理学的・生化学的研究への応用に向けた基盤情報として位置づけられる。

2 実験

試料の合成方法、X線回折(XRD)実験以外の実験方法の詳細は、原論文[13]を参照のこと。ここでは、放射光XRD実験法のみ記述する。XRD測定は、高エネルギー加速器研究機構(KEK、つくば)のフォトンファクトリー(PF)ビームライン6A[14]にて、波長0.150 nmの放射光を用いて実施した。脂質サンプル(10~20 wt%)はソーダ石灰ガラスキャピラリー(壁厚10 μm 、半径約1 mm)に封入し、蒸発を防ぐためにフレームシールを施した。試料温度はHSC302-LN190温度制御ステージにより制御した。回折パターンの検出には二次元ピクセルアレイ検出器を使用し、小角領域にはPILATUS1M(有効面積24.3 \times 20.0 cm^2)、広角領域にはPILATUS100K(有効面積8.38 \times 3.35 cm^2)をそれぞれ用いた。露光時間は120秒とし、得られた二次元回折像データはFIT2Dソフトウェア[15]で処理した。

電子密度プロファイルの算出には、観測されたラメラ回折ピーク強度をLorentzian関数でフィッティングして得た強度データを使用した。各回折ピークの位相の決定には、水溶性高分子PVP(平均分子量40,000)の浸透圧を利用した膨潤実験を行い、Shannonのサンプリング定理に基づく連続フーリエ変換を用いた解析によって決定した[16]。

3 結果および考察

XRD実験はdi-O-F4-C14-PCを主な対象として実施した。

広角XRD測定では、低温域(1 $^{\circ}\text{C}$)において複数の鋭い回折ピークを伴うブロードなパターンが観測され、このパターンはF4-DMPCの低温相のパターン[6]に類似しており、通常のDMPCゲル相とは異なる特徴を示した。DSC測定で観測された3.5 $^{\circ}\text{C}$ の微小な転移ピーク(プレ転移)を経た後温度6 $^{\circ}\text{C}$ では鋭い回折ピークが消失し、疎水性鎖の充填秩序が喪失したことが示された。さらに転移温度以上の10 $^{\circ}\text{C}$ では単一のブロードなピークへと変化し、液晶相への転移が確認された。この液晶相における広角回折ピークのトップ位置は $Q = 12.7 \text{ nm}^{-1}$ (実空間換算0.495 nm)であり、通常のPC二分子膜の液晶相(約0.46 nm)[17]とは異なり、F4-DMPCの液晶相の値とほぼ一致した。この差異は炭化水素鎖と炭化フッ素鎖のファンデルワールス体積の違いを反映していると解釈できる。

小角XRD測定は温度1 $^{\circ}\text{C}$ および6 $^{\circ}\text{C}$ にて実施し、いずれの温度においても5次までラメラの高次回折が検出された。純水中でのラメラ周期は1 $^{\circ}\text{C}$ で

5.56 nm、6 $^{\circ}\text{C}$ で5.85 nmであった。

電子密度プロファイルの解析において特徴的だったのは、二分子膜中心部に高い電子密度のピークが観測された点である。これはフッ素原子が水素原子より多くの電子を持つことに由来しており、通常のPC膜では中心部(末端メチル基領域)に電子密度の極小が現れるのとは対照的な分布を示した。また、リン原子に対応する極大ピーク間距離($d_{\text{p-p}}$)は1 $^{\circ}\text{C}$ で3.54 nm、6 $^{\circ}\text{C}$ で3.64 nmであった。この値は、アルコール添加などによって誘導されたDPPCの指組ゲル相(約3.0~3.3 nm)[18,19]や、完全水和した純粋なdi-O-C16-PC二分子膜の指組ゲル相(約3.0 nm)[20,21]と比較して明らかに大きい。疎水性鎖の炭素数が少ないにもかかわらず $d_{\text{p-p}}$ 値が大きいことから、di-O-F4-C14-PCは指組ゲル構造を形成せず、通常の二分子膜構造を採ることが結論づけられた。di-O-F4-C16-PCおよびdi-O-F4-C18-PCも同様の基本構造を持つことから、これらも通常の二分子膜構造を形成すると推定された。

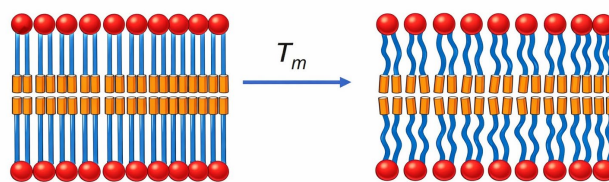


図1: (左)ゲル相および(右)液晶相におけるdi-O-F4-Cn-PC二分子膜の模式図。水色の直線状の棒はゲル相における炭化水素セグメントを、水色の緩やかな鎖状は、液晶相における炭化水素を、円柱状の棒はフルオロカーボンセグメントを、それぞれ模式的に表している。

本研究によって得られた最も重要な結論は、di-O-F4-Cn-PCの熱力学的相転移において、末端のペルフルオロブチル(C_4F_9)セグメントはほとんど構造変化に関与せず、炭化水素セグメントが相転移を主として担っているという点である。図1に、これを模式的に示した。

この結論は以下の熱力学的測定結果に基づいている。DSC測定により、di-O-F4-Cn-PCの転移エンタルピー(ΔH)および転移エントロピー(ΔS)はアルキル鎖の伸長に伴い線形に増加するが、その勾配は対応する非フッ素化エーテル型PC(di-O-Cn-PC)のそれとほぼ同一であった。さらに決定的な根拠として、di-O-F4-Cn-PCの ΔH および ΔS 値を C_4F_9 基を除いた炭化水素鎖長(ポリメチレン鎖長)の関数として改めてプロットし直すと、非フッ素化PCのデータから外挿した直線上にほぼ正確に乗ることが示された。これは、 C_4F_9 基が相

転移の熱力学に実質的に寄与していないことを強く示唆する。

この挙動の物理的解釈として、ペルフルオロブチル基の剛直性と分子間における極めて弱い相互作用[3]が挙げられる。ゲル相では炭化水素セグメントが秩序だった配列を形成する一方、C₄F₉部分はその剛直な円筒状構造を維持したまま存在している。液晶相への転移後は炭化水素セグメントが無秩序な構造へと融解するが、フッ素化部分は転移前後でほぼ同じ構造を保持する。この描像は、炭化水素・フッ化炭素ジブロック *n*-アルカンの固体-固体相転移に関する先行研究[22,23]とも整合的である。

また、相転移温度 (T_m) についても重要な知見が得られた。C₄F₉基の導入により、いずれの鎖長においても非フッ素化PCと比べて T_m が約 20°C 低下することが示された。これは炭化水素鎖とフッ化炭素鎖の分子断面積の違いに起因する分子間相互作用の弱体化によるものと考えられる。一方、鎖長の伸長に伴う T_m の上昇挙動は非フッ素化PCとほぼ平行であり、C₄F₉基は転移温度を系統的に低下させるものの、その鎖長依存性の本質的には影響しないことがわかった。さらに前述したXRD解析結果から、di-O-F4-C14-PCは従来のエーテル型PCで見られるような指組ゲル相構造ではなく、通常二分子膜構造を採ることが明らかになった。二分子膜中心部の電子密度が高いという特徴はフッ素原子の電子数の多さを反映しており、通常のPC膜と比較して逆転した電子密度分布を示すという構造的異性も確認された。

4 まとめ

本研究の結果は、炭化水素とフッ化炭素という二種類の構造ブロックの組み合わせによって膜の熱力学的挙動を精密に制御できる可能性を示しており、安定なリポソームや膜タンパク質再構成系の分子設計に向けた重要な指針を提供するものである。

謝辞

高木秀彰博士をはじめとするPF小角散乱ビームラインスタッフの皆様に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] J. Lombard *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.* **10** 507 (2012).
- [2] E.L. Romero and M.J. Morilla, *Int. J. Pharm.* **634** 122632 (2023).
- [3] M.P. Krafft and J.G. Riess, *Chem. Rev.* **109** 1714 (2009).
- [4] C. Santaella *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **30** 567 (1991).
- [5] N.C. Yoder *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **129** 9037 (2007).
- [6] M. Yoshino *et al.*, *Chem. Lett.* **41** 1495 (2012).
- [7] H. Takahashi *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **559** 107 (2013).

- [8] M. Yoshino *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **117** 5422 (2013).
- [9] H. Takahashi, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1861** 631 (2018).
- [10] K. Morita *et al.*, *Chem. Lett.* **48** 1105 (2019).
- [11] T. Yanagi *et al.*, *Biophys. Rev.* **11** 395 (2019).
- [12] M. Hashimoto *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1863** 183686 (2021).
- [13] M. Miyazaki *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1866** 184261 (2024).
- [14] N. Shimizu *et al.*, *J. Phys. Conf. Ser.* **425** 202008 (2013).
- [15] A.P. Hammersley *et al.*, *High Press. Res.* **14** 235 (1996).
- [16] D. Sayre, *Acta Crystallogr.* **5** 843 (1952).
- [17] T. T. Mills *et al.*, *Biophys. J.* **95** 669 (2008).
- [18] T. J. McIntosh *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **731** 109 (1983).
- [19] T. Adachi *et al.*, *Biophys. J.* **68** 1850 (1995).
- [20] J. T. Kim *et al.*, *Biochemistry* **26** 6592 (1987).
- [21] F. S. Hing *et al.*, *Biochemistry* **34** 11904 (1995).
- [22] M. Fujiwara *et al.*, *Macromolecules* **39** 5836 (2006).
- [23] J. Höpken *et al.*, *Makromol. Chem.* **189** 911 (1988).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp