

生体膜の化学について、以下の2つのテーマで研究を行った。

1. 生体膜構成成分のトポグラフィー解析

生体膜の種々の機能や構造をよりよく理解するためには、構成成分が膜のどの深さに挿入されているか、どのような配向をとっているかを知ることが必須である。1970年代より、Khorana, Breslowらによって、生体膜の in situ 構造解析のため光ラベル法が試みられたが、これまで成功していない。その原因は脂質2分子膜の無秩序構造に起因すると考えられる。そこで膜貫通型光感受性リン脂質プローブ1をデザインし、これとコレステロールの併用による秩序ある膜構造における光化学反応を考えた(図1)。

膜貫通鎖の中央に位置するベンゾフェノン基は、光照射により二分子膜中央部を選択的にラベルすることが期待できる。

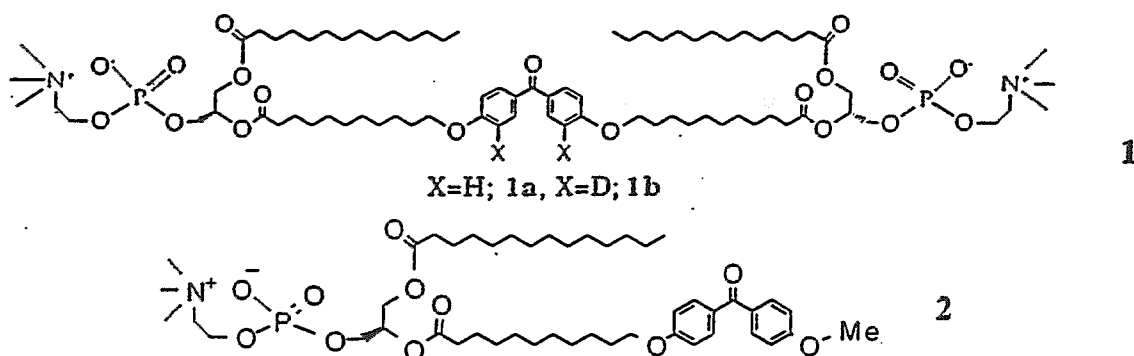


図1 : Structure of photosensitive phospholipidic transmembrane probes 1 and a "half-probe" 2.

まず、プローブ1を合成した(論文1)。次いで、1の物理化学的性質を調べた結果、特に、ジミリスチルフォスファチジルコリン(DMPC)ベシクル中で1bがほぼ膜貫通型コンフォーメーションをとって挿入されること、また、固体²H-NMR測定によって、10%までのプローブ1aの挿入は二分子膜を乱さぬこと、が明らかになった。

DMPC/プローブ1a/コレステロール系ベシクルの光照射では、コレステロール含量が増加するに従ってラベルの選択性が高まった。特に、33%のコレステロール存在下で、これまでに見られなかった高度の位置選択的光ラベルが、リン脂質アシル基およびコレステロール(C-25位)に見出された(図2)。

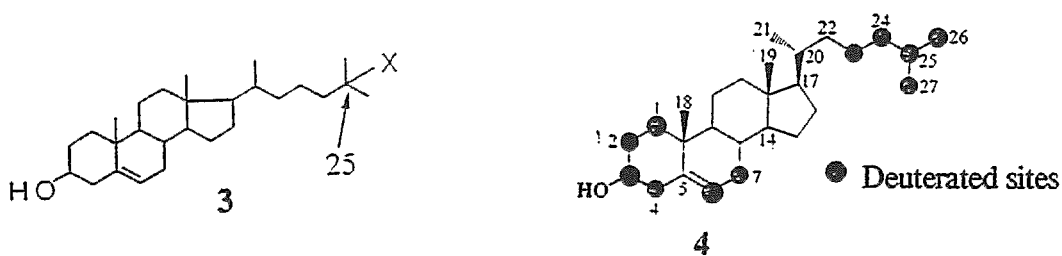


図2 : Structure of cholesterol functionalized at C-25 3 and of an extensively deuterated cholesterol 4.

このようにして、コレステロールの二分子膜配向について、分子軸が膜面に垂直で、C-3 位の水酸基がベシクル内、外水層に面していることがはじめて化学的直接法により証明され（論文2、3）、本研究は pour la Science (1994年5月号, No.199, p.18) で高く評価された。

次いで、Khorana, Breslowらが選択的光ラベルに成功しなかった”ハーフ・プローブ”（二分子膜の半分の長さ）を用いる場合でも、系に多量のコレステロールを加えれば選択性が高まるのではないかと考え試みた。実際、”ハーフ・プローブ”2を用いたリン脂質鎖ラベルにおいて、コレステロール 33 mol% 存在下では、膜貫通プローブ1と匹敵する位置選択性が得られた（論文4）。2の合成は容易なので有用となろう。

砂本グループとの共同研究で、本光ラベル法を用いてのグリコフォリンA（赤血球の主要タンパク質）の、膜中におけるトポグラフィー解析が進行中である。

また、固体 $^2\text{H-NMR}$ 法により、膜中の異なる深さのダイナミックスや分子配向を調べるため、重水素多置換コレステロール4を合成した（論文5）。

光ラベル法の相補的手段として、蛍光エネルギー転位法 (fluorescence energy transfer) が考えられる（図3）。

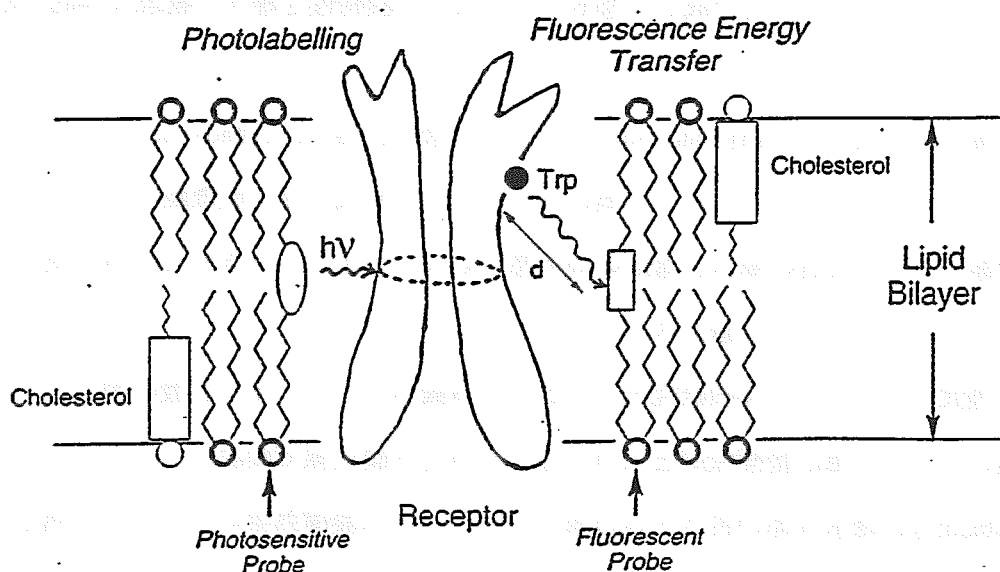


図3 : Determination *in situ* of the topography of proteins in membranes (Photolabelling and Fluorescence energy transfer).

本方法の可能性を検討するため、膜貫通性蛍光プローブ5, 6を合成した(図4)(論文6)。また、DMP Cベシクルでの蛍光偏光解消実験から、ジ・リン脂質プローブ5のみならず、ジエステルプローブ6も膜中で膜貫通型コンフォーメーションをとることが暗示された(論文7)。

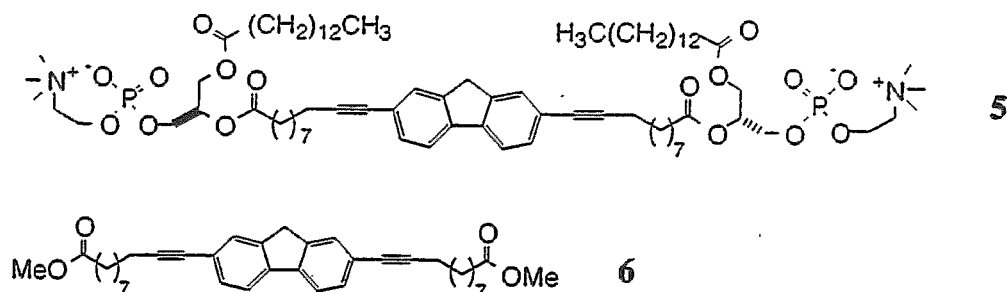


図4 : Structure of fluorescent transmembrane probes 5 and 6.

2. "原始生体膜"を求めて: Prebiomimetic Chemistry, Cytomimetic Chemistry

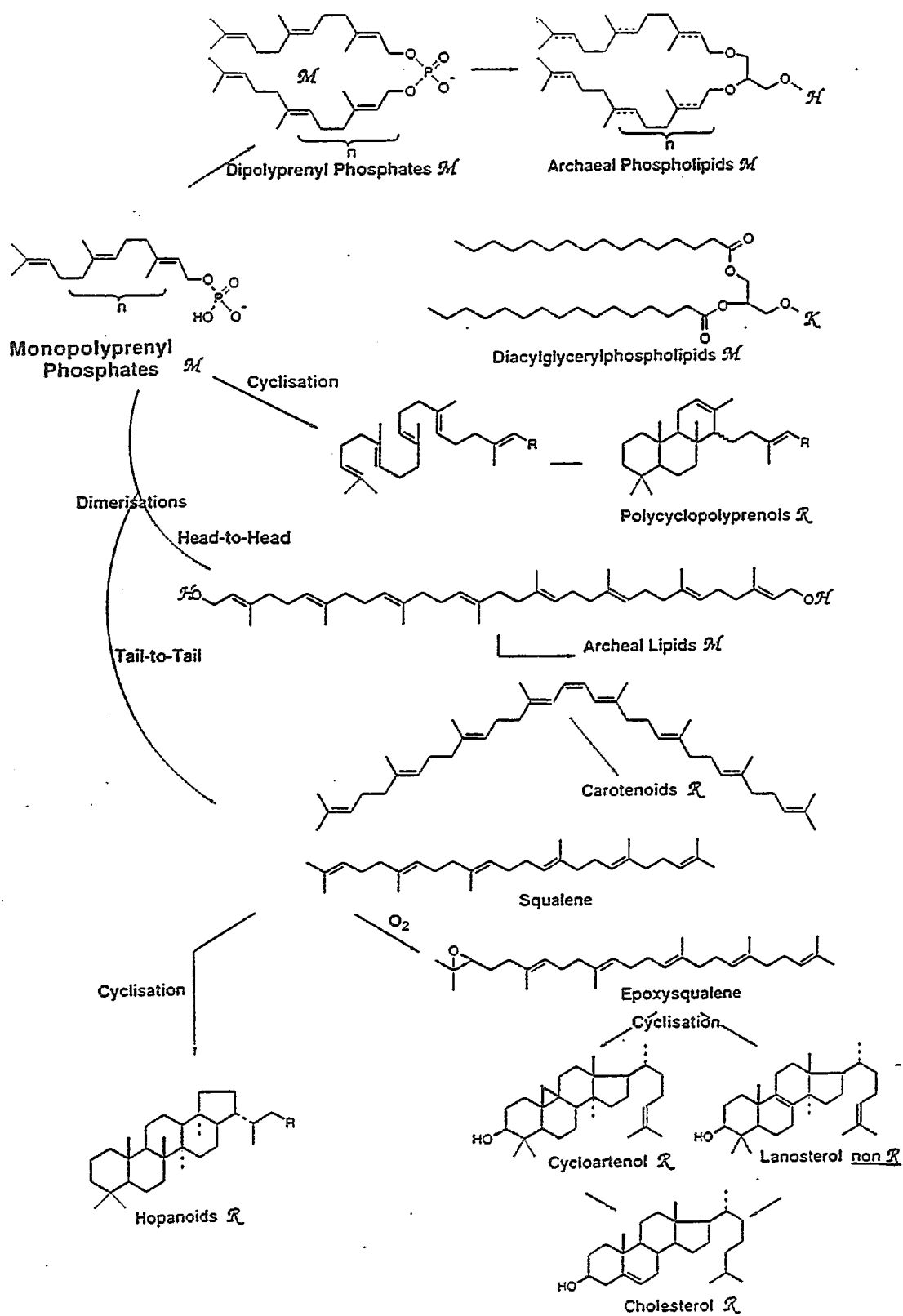
生命の起源について、これまでも核酸(遺伝)やタンパク質(代謝)の面からの研究論文は多くみられるが、生体膜の起源についての議論はほとんどなかった。

本グループでは、テルペノイドが膜の補強剤(真核生物および原核生物)として、または膜の主構成成分(古細菌)として、必ず生体膜に存在する事実に注目し、生体膜に存在するテルペノイドの"系統樹"を作って進化をさかのぼることにより、"原始生体膜"の構成成分としてポリプレニルリン酸(テルペニルリン酸)を推定した(図5)。

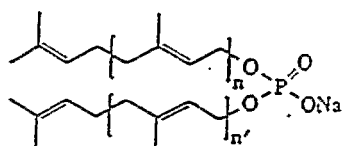
まず、イソプレレン単位数や、二重結合数の異なるいくつもの二本鎖ポリプレニルリン酸(di-polyprenylphosphates)を合成し(図6)、それらの膜特性を種々の物理化学的手法を用いて調べた。

C₂₀リン酸(di-geranylgeranylphosphate), C₁₅リン酸(di-farnesylphosphate)のみならず、di-geranylphosphate など C₁₀リン酸からもベシクル形成が電子顕微鏡(cryomicroscopy)で観察された。後者の場合、普通の膜の厚さ約30 Åに比して、きわめて薄い膜(16 Å)が形成されたことになる(論文8)。

次いで、国武グループとの共同研究で、これら二本鎖ポリプレニルリン酸の膜にはどのような構造のテルペン類が膜補強剤となりうるか、単分子膜実験で検討した。テルペン分子長が膜構成成分の疎水性部の長さとはほぼ等しいとき、最も凝縮効果のあることが明らかとなった(論文9)。



⊠ 5 : Hypothesis of the evolution of biomembrane constituents (\mathcal{M}) and reinforcers (\mathcal{R}). This scheme shows how actual diverse membrane constituents could be derived from monopenylnyl phosphates.



Identical chains

Non-identical chains

DPPNa ($n=n'=0$)

PGPNa ($n=0, n'=1$)

DGPNa ($n=n'=1$)

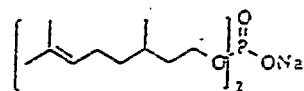
GFPNa ($n=1, n'=2$)

DFPNa ($n=n'=2$)

GGGPNa ($n=1, n'=3$)

DGGPNa ($n=n'=3$)

FGGPNa ($n=2, n'=3$)



DCPNa

Abbreviations

D : di-

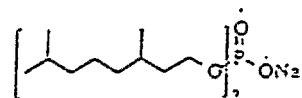
P : prenyl (C-5)

G : geranyl (C-10)

F : farnesyl (C-15)

GG : geranylgeranyl (C-20)

C : citronellyl (C-10)



DTGPNa

TG : tetrahydrogeranyl (C-10)

図6 : Structure of synthesized diverse di-polyprenylphosphates.

さらに、もう一段階進化をさかのぼって、単鎖ポリプレニルリン酸(mono-polyprenyl-phosphates) (図5参照) がベシクルを形成するかどうか調べるため、いくつかの同族体を合成した。電子及び光学顕微鏡 (Nomarski型)、蛍光およびコンフォーカル顕微鏡により、炭素数 15 またはそれ以上の単鎖ポリプレニルリン酸が自己組織化して、ベシクル構造を形成することが明らかになった (図7) (論文10)。

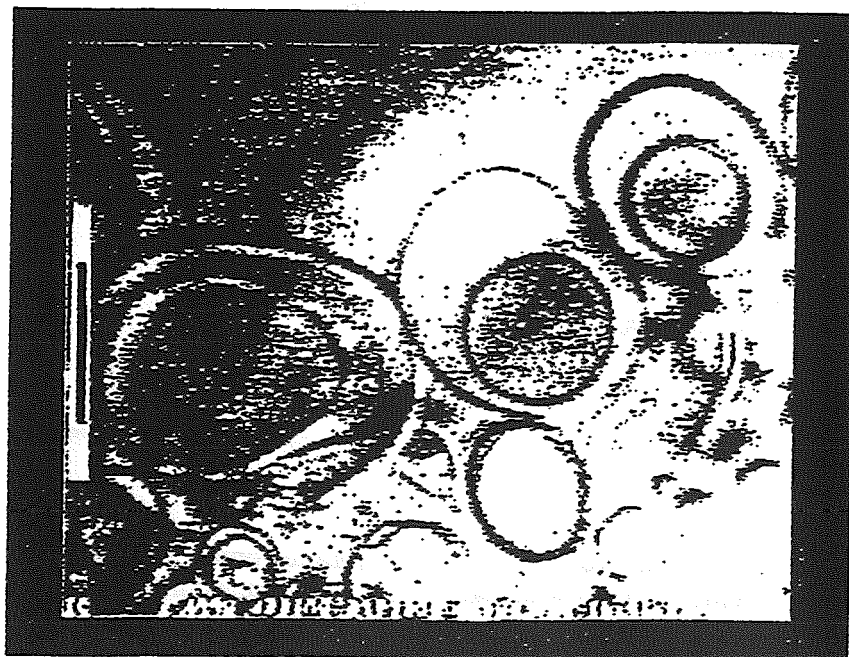


図7 : Image of giant vesicles of sodium geranylgeranylphosphate observed by an optical microscope (Nomarski type); bar : 5 μ m.

単鎖ポリプレニルリン酸が、最も”原始的な膜”の構成成分の1候補と考えられ、”原始地球”に存在したと推定される簡単な分子から、どのような前生物的条件 (prebiotic) でこれらが生成したか、研究を進めている。

その他、ポリテルペノイド生合成中間体として重要な位置を占めるスクアレン (squalene) (図5参照) を、前生物的還元反応条件 (硫化鉄、硫化水素、嫌氣的) のもとに、ファルネソール (farnesol) から一段階で合成した (論文11)。

これまでの研究結果を総合して、細胞膜の起源についてテルペン説を提唱し (論文12、13)、Nature (1994年9月8日号, No. 371, p. 101) および Pour la Science (1996年3月号, No. 221, pp. 22-23) にて高く評価された。

Publications

1. Studies of the topography of biomembranes : the four step synthesis of a photoactivatable transmembrane phospholipidic probe and its dideuterated analogue.
Yamamoto M., Dollé V., Warnock W., Diyizou Y., Yamada M., Nakatani Y., Ourisson G.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1994, 131, 317-329.
2. Studies on the topography of biomembranes: regioselective photolabelling in vesicles with the tandem use of cholesterol and a photoactivatable transmembrane phospholipidic probe.
Nakatani Y., Yamamoto M., Diyizou Y., Warnock W., Dollé V., Hahn W., Milon A., Ourisson G.
Chem. Eur. J., 1996, 2, 129-138.
3. New tools for the study of the topography of biomembranes.
Nakatani Y., Ourisson G.
J. Synth. Org. Chem. Jpn., 1995, 53, 811-821.
4. Increased selectivity of a simple photosensitive probe in the presence of large proportions of cholesterol.
Fredriksen S.B., Dollé V., Yamamoto M., Nakatani Y., Goeldner M., Ourisson G.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, 33, 1230-1232.
5. Extensively deuterated sterols.
Starck J.-P., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G.
Bull. Soc. Chim. Fr., 1994, 131, 210-216.
6. Synthesis of two new phospholipidic fluorescent probes for membrane studies.
Starck J.-P., Nakatani Y., Ourisson G.
Tetrahedron, 1995, 51, 2629-2638.
7. Fluorene derivatives as membrane probes. Steady-state and time-resolved fluorescence studies in DMPC vesicles.
Starck J.P., Nakatani Y., Ourisson G., Cowley D.J., Duportail G.
New J. Chem., 1996, 20, 1293-1299.
8. Di-polyprenyl phosphates as models of primitive membrane constituents : synthesis and phase properties.
Birault V., Pozzi G., Plobeck N., Eifler S., Schmutz M., Palanché T., Raya J., Brisson A., Nakatani Y., Ourisson G.
Chem. Eur. J., 1996, 2, 789-799.
9. Reinforcing effect of polyterpenoids on polyprenyl phosphate monolayers.
Kamino A., Agira K., Kunitake T., Birault V., Pozzi G., Nakatani Y., Ourisson G.
Colloids & Surfaces, 1995, A103, 183-194.
10. Single-chain polyterpenyl phosphates form primitive membranes.
Pozzi G., Birault V., Werner B., Dannenmuller O., Nakatani Y., Ourisson G., Terakawa S.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996, 35, 177-180.
11. A one-step synthesis of squalene from farnesol under prebiotic conditions
Keller M., Hatenbradl D., Stetter K.O., Teller G., Nakatani Y., Ourisson G.
Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1995, 34, 1898-1900.
12. The terpenoid theory of the origin of cellular life : the evolution of terpenoids to cholesterol.
Ourisson G., Nakatani Y.
Chem. & Biol., 1994, 1, 11-23.
13. Die Terpenoidtheorie des Ursprungs zellulären Lebens - Die Evolution der Terpenoide bis hin zum Cholesterol.
Ourisson G., Nakatani Y.