

氏名	周 哲
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	論工博第3243号
学位授与の日付	平成9年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	NMR studies of phospholipids and liposomal membranes (核磁気共鳴法によるリン脂質およびリポソーム膜の研究)
論文調査委員	(主査) 教授 砂本順三 教授 生越久靖 教授 森島 績

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、人工的に形成された脂質2分子膜小胞(リポソーム)膜中におけるリン脂質分子の挙動およびイオンの脂質2分子膜透過に関して、核磁気共鳴(NMR)法を利用しておこなった研究成果について5章にわたり記述している。天然に存在するリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)はその構造中に長鎖脂肪酸のグリセロールエステル結合を持つ。第1章および第2章においては、このエステル結合をアミド結合にて置き換えた構造を持ち、人工境界脂質となりうる非天然型のリン脂質、1,2-ジミリスタミド-1,2-デオキシホスファチジルコリン(D<sub>14</sub>DPC)が、リポソーム膜内において示す挙動の解明をおこなっている。また第3章以降においては、リポソーム脂質2分子膜の内外に存在するイオン種をNMRにより区別して観測するという方法論に基づき、種々の陽イオンおよび陰イオン種の脂質2分子膜透過に関して検討をおこなっている。これらの研究成果は以下のとおり要約することができる。

第1章ではリポソーム膜中における脂質分子の分布および運動性に関するNMRを利用した研究について述べている。<sup>1</sup>H-NMRにおける核オーバーハウザー効果-交換分光法(NOESY)および核オーバーハウザー効果差分光法(NOEDF)により1,2-ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)とD<sub>14</sub>DPCとの間でコリンのメチル基のケミカルシフトが異なること、さらにD<sub>14</sub>DPC/DMPC混合リポソーム中では、D<sub>14</sub>DPCは脂質2分子膜外層に偏在していることを明らかにした。また<sup>1</sup>H検出<sup>13</sup>C-NMR法をリポソーム膜系の測定に初めて適用し、この測定法の利用により、従来よりも高感度の測定が可能となることを示した。

第2章では<sup>31</sup>P-NMRを用いて脂質2分子膜中における脂質分子の立体構造および運動性に関して検討をおこなっている。ここではD<sub>14</sub>DPC単独から形成されたりポソーム膜中ではD<sub>14</sub>DPC分子の極性頭部の立体構造および運動性が、DMPCとは異なることを明らかとし、これが分子内水素結合に起因している可能性を指摘した。さらにD<sub>14</sub>DPC/DMPC混合リポソーム膜中ではD<sub>14</sub>DPC分子の極性頭部のコンフォメーションおよび運動性はDMPCとほぼ同じであり、この混合膜中では両脂質分子間の水素結合の寄与は小さいと考えられることを示した。

第3章では陽イオンのリポソーム膜透過のNMRによる観測に関して述べている。ここではまず抗生物質である septamycin が  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  および  $\text{Cs}^+$  イオンのリポソーム脂質2分子膜透過を促進するイオノフォアとして機能することを初めて明らかにした。さらに  $^{23}\text{Na}$ -NMR を利用して  $\text{Na}^+$  イオンの輸送速度を決定し, septamycin の膜表面における  $\text{Na}$  イオン結合定数は他のイオノフォリックな抗生物質と比較して著しく低いことを示した。またさらにリポソーム膜透過による  $\text{Na}^+$  イオンと  $\text{Cs}^+$  イオンとの交換速度を決定した。

第4章ではハライド陰イオンのNMRによる観測およびそのリポソーム膜透過に関して述べている。まず  $\text{Mn}^{2+}$  が極めて効率の良いNMR緩和試薬であることを見出した。そして  $\text{Mn}^{2+}$  を緩和試薬として用いることにより, 従来不可能であったリポソーム膜内水相に存在する  $^{35}\text{Cl}^-$  もしくは  $^{81}\text{Br}^-$  と外水相に存在するこれらのイオンとの区別を初めて可能とし, これらのアニオンの膜透過の測定をおこなった。実際にテトラブチルアンモニウムイオンもしくはベンジルトリブチルアンモニウムイオン相間移動触媒による, あるいはバリノマイシン-アンモニウムイオンコンプレックスとのイオンペア形成によるハライドイオンの輸送を観測した。

第5章では実細胞内に存在する  $\text{Cl}^-$  イオンのNMRによる観測に関して述べている。 $\text{Cl}^-$  イオンは通常の哺乳類細胞中に最も高濃度で存在する陰イオン種であるが, これまでこの細胞内  $\text{Cl}^-$  イオンはNMRにおいては観測不能と考えられていた。ここでは第4章において開発した手法に基づいて  $^{35}\text{Cl}$ -NMRにおけるコントラスト試薬として  $\text{Mn}^{2+}$  を利用することにより, 赤血球内の  $\text{Cl}^-$  イオンに由来するNMRピークを初めて観測することに成功した。さらにスピン-スピン緩和時間を求めた。

### 論文審査の結果の要旨

本論文では, 核磁気共鳴(NMR)法によるリポソーム膜中のリン脂質の挙動およびイオンの膜透過に関する研究結果を5章にわたり述べている。第1章および第2章では, 天然型ホスファチジルコリン(PC)の持つエステル結合に代えてアミド結合を持ち, 人工境界脂質となりうる非天然型リン脂質, 1,2-ジミリスタミド-1,2-デオキシホスファチジルコリン( $\text{D}_{14}\text{DPC}$ )の, リポソーム膜内挙動を解明している。また第3章以降では, 脂質2分子膜の内外に存在するイオン種をNMRにより区別し, その膜透過を検討している。これらの研究成果は以下に要約される。

- (1)  $\text{D}_{14}\text{DPC}/\text{DMPC}$  混合リポソーム脂質2分子膜中では, 外層へ  $\text{DMPC}$  よりも  $\text{D}_{14}\text{DPC}$  が偏在することを明らかにした。この際  $^1\text{H}$  検出  $^{13}\text{C}$ -NMR法の適用により, 従来法よりも高感度の測定を可能にした。
- (2)  $\text{D}_{14}\text{DPC}$  分子の極性頭部の立体構造および運動性は,  $\text{D}_{14}\text{DPC}$  単独から形成したリポソーム膜中では  $\text{DMPC}$  とは異なるが,  $\text{D}_{14}\text{DPC}/\text{DMPC}$  混合リポソーム膜中では  $\text{DMPC}$  とほぼ同じであり, 混合膜中においては両脂質分子間の水素結合の寄与は小さいことを示した。
- (3) 抗生物質 septamycin が  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  および  $\text{Cs}^+$  イオンの膜透過を促進するイオノフォアとして機能することを初めて明らかにした。
- (4) 緩和試薬として  $\text{Mn}^{2+}$  を用い, 従来不可能であったリポソーム膜内外の  $^{35}\text{Cl}^-$  あるいは  $^{81}\text{Br}^-$  の

識別および膜透過の観測を可能とした。さらにこの手法により赤血球内外の  $\text{Cl}^-$  イオンの区別をも初めて可能にした。

以上、本論文では  $\text{D}_{14}\text{DPC}$  の膜内挙動の詳細を NMR 法により解明し、 $^1\text{H}$  検出  $^{13}\text{C}$ -NMR 法による脂質分子の挙動解明の可能性を開いた。また主要な生命現象であるイオンの膜透過の研究への NMR 法のさらなる利用の可能性を示した。これらはいずれも学術的にも実際的にも極めて意義のある成果であり、依って本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成 9 年 2 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項に関して試問をおこない、その結果、合格と認めた。