

2P080

ダンシルヒドラゾンを発色団に用いた新規コレステロール誘導体の合成と脂質二重層膜プローブへの応用

(群馬大工) 吉原 利忠 ・ 荒井 健太郎 ・ 落合 純一 ・ 飛田 成史

【序論】

細胞膜はリン脂質を基本骨格とし、糖脂質、糖タンパク質、コレステロールなどの多くの分子から成り立っている。特に、コレステロールは、細胞膜の流動性調節の役割を果たしており、その膜内含量は細胞内オルガネラによって大きく変化する。このようなコレステロールの分布や挙動を観察する手法として、けい光プローブ分子を用いる方法があり、現在、植物に存在するジヒドロエルゴステロール(DHE)、ニトロベンゾフラザンを骨格とする NBD - コレステロールや BODIPY - コレステロールなどがある。しかしながら、DHE はけい光量子収率が低く、NDB, BODIPY - コレステロールは、コレステロール本来の挙動を示さないなど、コレステロールプローブとしては不適當であることが示されている。最近、コレステロールの6位にダンシルヒドラゾンを結合したプローブが合成され、コレステロールに近い性質を示すことが報告された[1]。ここでは、ダンシルヒドラゾンをコレステロールの20位に結合させた化合物(DCho20, 図1)を新規に合成し、光化学特性および脂質二重層膜への親和性の検討を行った。

【実験】

リン脂質二重層膜(DMPC 膜)はエタノールインジェクション法を用いて調製し、プローブ濃度は膜濃度に対して 1/100 となるようにした。膜存在下での溶媒はトリス塩酸緩衝液(pH=7.0)を用いた。DCho20 は以下のように合成を行い、アルミナカラム(展開溶媒はクロロホルム：エタノール(95：5))で精製した。

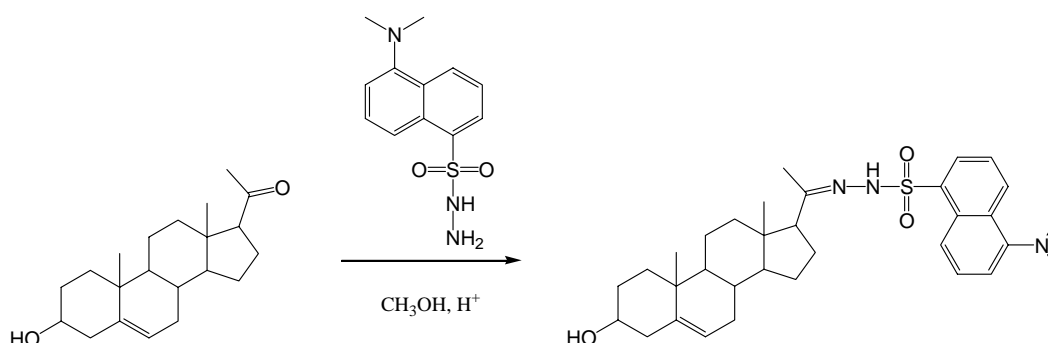


図1 DCho20の合成スキーム

【結果・考察】

図2にDCho20の各溶媒(*n*-ヘキサン(*n*-Hex), ジエチルエーテル(DEE), アセトニトリル(MeCN), 水:エタノール(H₂O:EtOH) 95:5)中の吸収, けい光スペクトルを示す。DCho20は各溶媒中で340nm付近に吸収極大波長を示す。けい光スペクトルは,*n*-Hex中で465nmに極大波長を示し, 溶媒の極性の増加とともに長波長シフトする。一方, H₂O:EtOH(95:5)中では, MeCN中よりも短波長に極大波長が観測される。これは, DCho20が凝集し, 疎水性領域を形成しているためであると考えられる。各溶媒中のけい光量子収率(Φ_f)を測定したところ, Φ_f 値は0.3以上であり, DCho20はけい光プローブ分子として十分な Φ_f 値を有している。一般に, ダンシル誘導体は水中で著しい水誘起けい光消光が観測されるが, DCho20は水中において分子が凝集し, 疎水性領域を形成するため大きな Φ_f 値を示している。図3に35 μ m, DMPC膜(1.0 x 10⁻³ M)存在下でのコレステロールのモル分率(χ_{Cho})に対するDCho20のけい光スペクトル変化を示す。 $\chi_{Cho}=0$ においてけい光極大波長は, 538nmに観測され, H₂O:EtOH(95:5)中の極大波長と比較して26nm長波長シフトしている。これはDCho20がDMPC膜存在下において, 凝集状態から膜中に分散して分布していることを示唆している。コレステロールの添加効果に対しては χ_{Cho} 値が増加するにつれて, 極大波長が短波長シフトしている。特に $\chi_{Cho}=0.2$ 以上で著しくシフトしている。DMPC膜のような飽和脂質膜の液晶状態(相転移温度以上)において, コレステロールは膜の流動性を低下させることが知られている。このため, DCho20のけい光状態が安定化されないことが考えられる。また, コレステロールの含量が増加するにつれて, DCho20が膜内でより極性の低い場所に多く分布している可能性もある。DCho20の膜内の分布については, けい光消光実験を行う必要があり, 今後検討していく予定である。

[1] V. Wiegand, T.-Y. Chang, J. F. III. Strauss, F. Fahrenholz, and G. Gimple, *FASEB J.*, **2003**, *17*, 782-784.

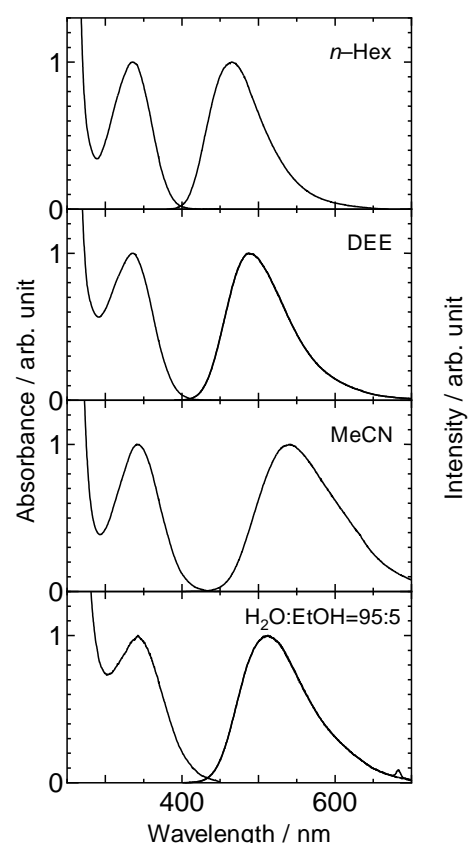


図2 各溶媒中におけるDCho20の吸収・けい光スペクトル

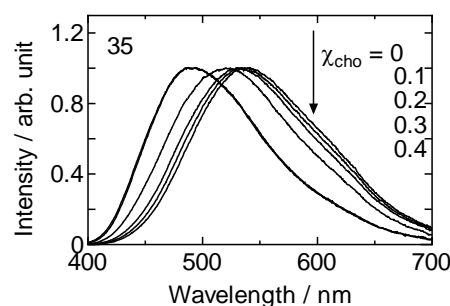


図3 DMPC膜存在下でのコレステロールのモル分率(χ_{Cho})に対するDCho20のけい光スペクトル変化