

Title	重水素固体NMRを用いた古細菌脂質PGP-Meが形成する二重膜の構造解析
Author(s)	山上, 正輝
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72660
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (山 上 正 輝)

論文題名 重水素固体NMRを用いた古細菌脂質PGP-Meが形成する二重膜の構造解析

論文内容の要旨

Phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me, 1)は、古細菌の一種である高度好塩菌*Halobacterium salinarum*の細胞膜の主要構成成分である。古細菌脂質から構成される二重膜は、幅広い温度範囲(-120~120°C)において液晶相状態を保持し、高塩濃度環境下でも二重膜構造を形成するといった特徴的な膜物性を有している。しかし、このような古細菌脂質膜特有の膜物性を引き起こす構造要因については未だ明らかとなっていない。その主な原因としては、古細菌脂質が有するメチル分岐側鎖の二重膜環境中における構造が詳細に解明されていないことが挙げられる。そこで本研究では、膜環境下での分子の運動性や配向情報が取得可能な重水素固体NMR駆使することで、二重膜中におけるメチル分岐鎖の構造を解明することを目的とした。

(1)立体選択的なPGP-Meの全合成および重水素標識PGP-Me誘導体の調製

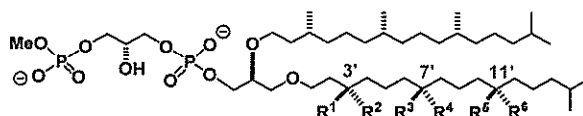
まず、PGP-Me(1)の全合成を行い、重水素標識体調整にも適応可能な効率的合成法の確立を行った。メチル分岐鎖は飽和イソプレノイド誘導体であることから、高光学純度のイソプレヌユニットを繰り返し連結させることにより効率的に合成した。その後、キラルニリン酸頭部とのカップリング反応によりPGP-Me(1)の全合成を達成した。重水素標識PGP-Me調製においては、非標識および重水素標識イソプレヌユニットの連結させる順番を変更させることで、各分岐メチル基に位置および立体選択的に重水素標識を導入した3種類の重水素標識PGP-Me誘導体(2-4)の合成を達成した。

(2)重水素固体NMRを用いた古細菌脂質膜の膜物性解析

メチル分岐鎖が膜物性に与える影響を観測するため、3'-CD₃,D-PGP-Me(2)および4',4'-D₂DMPCを用いて水和二重膜を調製し、0~60°Cにおいて重水素固体NMR測定を行った。その結果、PGP-Me膜ではすべての測定温度においてC-CD₃結合およびC-D結合由来のピークが観測されたのに対して、DMPC膜では10°C以下においてゲル相への転移を示すピークの消失が観測された。更に、各脂質二重膜を5.0M NaClで再水和させた後に重水素固体NMR測定を行ったところ、DMPC膜ではセンターピークの強度が著しく増加したことから、高NaCl条件下では平面二重膜構造が保持されていないことが明らかとなった。これらの結果から、古細菌脂質膜が幅広い温度領域において流動性を保持し、高塩濃度条件下でも平面二重膜構造を形成する上で重要な役割を担っていることが示唆された。

(3)重水素固体NMRおよび分子動力学計算によるメチル分岐鎖の構造解析

古細菌脂質膜に特有の膜物性を引き起こす構造要因を明らかとするため、重水素固体NMRおよび分子動力学計算を用いてメチル分岐鎖の脂質二重膜中における構造解析を行った。その結果、メチル分岐鎖の上部では『折れ曲がり構造』を平均配向として有しているが、側鎖末端に近づくにつれて『直鎖構造』へと変化していることが明らかとなった。更に、脂質二重膜においてメチル分岐鎖同士が絡み合っていることが示唆され、この側鎖間の絡み合いが古細菌脂質膜特有の膜物性を引き起こす要因であることを明らかとした。



PGP-Me (1) : R¹ = R³ = R⁶ = CH₃, R² = R⁴ = R⁵ = H
 3'-CD₃,D-PGP-Me (2) : R¹ = CD₃, R² = D, R³ = CH₃, R⁴ = H, R⁵ = CH₃, R⁶ = H
 7'-CD₃,D-PGP-Me (3) : R¹ = CH₃, R² = H, R³ = CD₃, R⁴ = D, R⁵ = CH₃, R⁶ = H
 11'-CD₃,D-PGP-Me (4) : R¹ = CH₃, R² = H, R³ = CH₃, R⁴ = H, R⁵ = CD₃, R⁶ = D

図1 PGP-Me(1)および重水素標識PGP-Me誘導体(2-4)の化学構造

Phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me, 1) is the major component of the purple membrane (PM) of the halophytic archaea *Halobacterium* spp. PGP-Me has characteristic structural features represented by the methyl-branched alkyl chains, which bind to the glycerol moiety via ether linkages in contrast to the ester linkages of mammalian lipids. The membrane composed of methyl-branched chain lipids is known to have unique features such as a lack of phase transition across a wide temperature range. However, the precise structural elements of these lipids have not yet been identified, mainly because the rapid and anisotropic movement of the lipids has hampered their conformational analysis in the membrane. Therefore, in this study, I aimed to elucidate the structure of methyl branch chain in the membranes by utilizing deuterium solid state NMR (^2H NMR) that can acquire the mobility and orientation information of molecules in membrane environment.

(1) Enantioselective total synthesis of PGP-Me and preparation of deuterated derivatives

I aimed to accomplish the enantioselective first total synthesis of PGP-Me (1) and established the efficient synthetic method for selective deuterium labeling. Enantiopure methyl branching side chain could successfully constructed via an iterative cross-coupling reaction of an enantiopure isoprene unit ($\geq 99\%$ ee) as a key building block. Then, the coupling reaction with chiral diphosphoric head group led to the enantioselective total synthesis of PGP-Me (1). Following the established method, CD_3, D -PGP-Me derivatives (2, 3, 4) were successfully prepared in a highly regio and stereo selective manner only by changing the coupling of od non-labelled and deuterated isoprene units.

(2) Analysis of the membrane properties of methyl-branched lipid by using ^2H NMR

^2H NMR measurements at 0 to 60°C with $3', D_3, D$ -PGP-Me(2) and $4', 4', D_2$ -DMPC in order to investigate the influence of methyl-branching chain to the membrane properties. As the result, PGP-Me membrane showed the doublet peaks derived from CD_3 and D respectively at all measurement temperature, whereas DMPC showed the disappearance of the doublet due to formation of the gel phase below 10°C. These results clearly reveal the importance of methyl branching for maintaining the fluidity over a wide range of temperatures. Furthermore, ^2H NMR measurements under 5.0M NaCl condition revealed that structural change from bilayer tended to occur for DMPC membrane under such high salt concentration condition. These results clearly revealed the importance of methyl branching chain to the characteristic membrane properties of archaeal lipid.

(3) Structural analysis of methyl-branched chain by ^2H NMR and molecular dynamics calculation

The ^2H NMR analysis of three kinds of CD_3, D -PGP-Me derivatives (2, 3, 4) and the appropriate MD calculations revealed the unique and depth-dependent average conformational change of methyl-branched chains most likely responsible for their characteristic membrane properties. The structural features of methyl-branched lipids uncovered this study, which may partly account for the high temperature stability of archaeal cell membranes and the functional conservation of membrane proteins, could help in the development of membrane materials with high thermal performance.

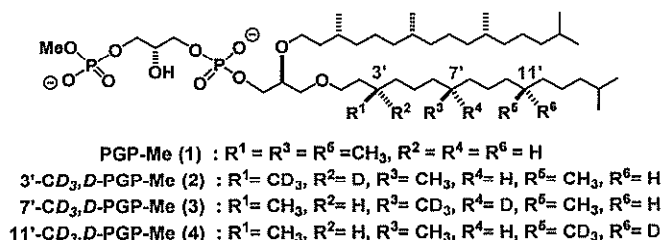


Fig.1 Chemical structure of PGP-Me (1) and CD_3, D -PGP-Me derivatives (2, 3, 4)

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (山 上 正 輝)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	村 田 道 雄
	副 査	教 授	小 川 琢 治
	副 査	教 授	笹 井 宏 明

論文審査の結果の要旨

山上氏は学位論文研究において、古細菌の脂質二重膜が有する高温や高塩濃度に対する耐性機構を化学的に解明することを目的とした。古細菌の脂質の物理的安定性は以前より注目されており、膜タンパク質の電気生理実験においても広く応用されてきたが、その分子的要因の詳細は不明であった。

山上氏は、高度好塩菌の紫膜に見られ、古細菌脂質特有のメチル分岐鎖を有するリン脂質 PGP-Me に着目した。まず、PGP-Me を立体配置選択的に化学合成することに成功し、これを用いて計算科学的手法を組み合わせることで、メチル分岐鎖の脂質二重膜中における詳細な構造解析を行った。具体的には、固体 NMR 測定に必要となる重水素標識 PGP-Me 誘導体の合成に向けて、高光学純度イソプレヌユニットを繰り返し連結させて炭素鎖を伸長し、立体選択的に PGP-Me の全合成を行った。更に、標識 PGP-Me 誘導体の合成については、非標識ユニットと重水素標識ユニットの連結させる順番を変更するだけで、PGP-Me のフィタニル鎖の 3'位、7'位および 11'位のそれぞれに 2つの標識基(CD₃と CD)を導入した。次に、3'位の重水素化 PGP-Me を用いた重水素固体 NMR 測定を行うことで、メチル分岐鎖の局所的な運動情報を取得し、二重膜の物性評価を行った。その結果、古細菌脂質の水和二重膜が幅広い温度範囲において液晶相状態を保持し、またこの安定性にメチル分岐側鎖が重要な役割を担っていることを確認した。続いて 7'位および 11'位標識体でも重水素固体 NMR 測定を行い、各メチル分岐位置における C-D 結合および C-CD₃ 結合の配向パラメーターを算出し、平均的配座と平均的配向を推定した。その結果、脂質二重膜中における PGP-Me のメチル分岐側鎖の立体配座は、飽和脂肪酸結合型リン脂質の直鎖アルキル鎖における平均構造とされている『直鎖構造』とは異なることが示唆され、新たな構造として『折れ曲がり構造』を着想するに至った。更に、共同研究によって重水素固体 NMR から得られた構造情報を基に、分子動力学計算による構造解析を行った結果、メチル分岐鎖は、膜の浅い部分では折れ曲がり構造を有しているが、末端に近づくにつれて徐々に『直鎖構造』へと近づくことと云った深度依存的な構造変化が生じていると推定された。さらに、重水素固体 NMR の結果は、折れ曲がり構造がフィタニル鎖の絡み合った構造を導くことを示唆しており、それによって古細菌の脂質膜が熱や塩濃度に対して高度に安定化していると推定した。

山上氏の博士論文研究は古細菌脂質を取り上げ、特異な膜安定性に関して構造的要因を詳細に明らかにした点において高い学術的意義がある。以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。