

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			

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

# 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

平成 30 年度

学位論文

# 山上正輝

化学専攻

大阪大学大学院理学研究科

## 目 次

第一章 序論

1-1	古細菌と膜脂質	-1-
1-2	高度高塩菌 Halobacterium salinarum の紫膜脂質の構造と機能	-6-
1-3	メチル分岐鎖を有する脂質の物性および構造解析	-11-
1-4	固体 NMR を用いた生体膜の構造解析	-14-
1-5	本研究の目的	-20-
<b>_</b>	L. Hel	

参考文献

第二章	章 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
2-1	先行合成研究	-26-
2-2	PGP-Meの逆合成解析	-34-
2-3	高光学純度イソプレンユニットの合成	-35-
2-4	立体選択的な PGP-Me の全合成	-41-
2-5	重水素標識 PGP-Me 誘導体の調製	-44-
参考	文献	

## 第三章 重水素固体 NMR を基盤とした古細菌脂質 PGP-Me の構造解析

3-1 重水素固体 NMR を用いた古細菌脂質膜の物性評価	-57-
3-2 重水素固体 NMR を用いたメチル分岐側鎖の構造解析	-63-
3-3 分子動力学(MD)計算を用いたメチル分岐側鎖の構造解析	-66-
3-4 章のまとめ	-75-
参考文献	
第四章 結論	-77-
実験の部	-79-
スペクトルデータ	-102-
謝辞	-155-
付録	-156-

# 略語表

Ac	acetyl
aq	aqueous
atm	atmosphere
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphtyl
Bn	benzyl
bR	bacteriorhodopsin
Bu	buthyl
Bz	benzoyl
CoA	coenzyme A
CF	carboxyfluorescein
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DCC	dicyclohexyl carbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DHAP	dihydroxyacetone phosphate
DIBAL-H	diisobuthylaluminium hydride
DMAP	N,N-dimethylaminopyridine
DMAPP	dimethylallyldiphosphate
DMPC	1,2-dimyrystoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DMF	N,N-dimethylformamide
DMP	Dess-Martin periodinane
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPhPC	1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DSC	differential scanning calorimetry
ee	enantiomeric excess
eq	equivalent
ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
GGPP	geranylgeranyldiphosphate
<sup>2</sup> H	deuterium
IPP	isopentenyl diphosphate
LDA	lithium diisopropylamide
LiAlD <sub>4</sub>	lithium aluminium deuteride

LiAlD <sub>4</sub>	lithium aluminium hydride
LiHMDS	lithium hexamethyldisilazide
MD	molecular dynamics
Me	methyl
MLV	multilamellar vesicles
Ms	mesyl
MS	mass spectrum
MaNP	2-methyl-2-(1-naphtyl)propionic
<i>n</i> -	normal
NaHMDS	sodium hexamethyldisilazide
NBS	N-bromosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
<i>p</i> -	para
PA	phosphatidic acid
PC	phosphatidylcholine
PG	phosphatidylglycerol
Ph	phenyl
PGP-Me	phosphatidylglycerophosphate methyl ester
PM	Purple Membrane
PMB	p-methoxybenzyl
ppm	parts per million
Pr	propyl
PS	phosphatidylserine
Pv	pivaloyl
Ру	pyridine
quant.	quantitative
rt	room temperature
SM	sphingomyelin
S/N	signal to noise
t-	tertiary
TBAF	tetrabuthylammonium fluoride
TBDPS	<i>t</i> -buthyldiphenylsilyl
TBS	<i>t</i> -buthyldimrthylsilyl
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid

TMS	trimethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
Thx	thexyl
TLC	thin layer chromatography
Tm	phase transition temperature
Tr	trityl
Ts	<i>p</i> -toluenesulfonyl
UV	ultraviolet

#### 第一章 序論

#### 1-1 古細菌と膜脂質

1-1-a 古細菌

古細菌(Archaea)とは、<u>生物</u>を基本的な<u>遺伝</u>の仕組みや生化学的性質を元に大きく<u>分類</u> する3<u>ドメイン</u>説において、真正細菌(Bacteria)ドメイン、真核生物(Eucarya)ドメイン と並んで全生物界を三分する「古細菌ドメイン」を構成する原核微生物群である(図 1-1)<sup>1,2)</sup>。古細菌の中には、100°Cを超える高温環境や、飽和濃度近くの食塩を含む高 塩濃度環境、極端な酸性およびアルカリ性の環境など、極めて過酷な環境に生息して いる極限微生物を含んでいる<sup>3)</sup>。さらに古細菌というドメインは二つの門に分けられ、 片方はクレンアーキオータ(Crenarchaeota)、もう一方はユーリアーキオータ (Euryarchaeota)と呼ばれている。クレンアーキオータの代表的なものには、pH=1~3 と いう強酸性環境に生息する好熱好酸菌や、80°C以上の環境に生息する超好熱菌等が挙 げられる。一方、ユーリアーキオータはメタン菌や高度好塩菌を含み、その代表的な ものは、魚のピンクアイから単離された Halobacterium salinarum が挙げられる。



図 1-1 Woese らにより提唱された生命系統図

[1] Thermotogales [2] Flavobacteria [3] Cyanobacteria [4] Puple bacteria [5] Gram-positive bacteria [6] Green nonsulfer bacteria [7] Pyrodictium [8] Thermoproteus [9] Thermococcales [10] Methanococcales [11] Methanobacteria [12] Methanomicrobacteria [13] Halophiles [14] Animals [15] Ciliates [16] Green plants [17] Fungi [18] Flagellates [19] Microsporidia Reprinted with permission from *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4576.<sup>2)</sup> Copyright© (1990) National Academy of Science.

#### 1-1-b 古細菌膜脂質の構造的特徴

古細菌は、真性細菌や真核生物群に属する生物には見られない生物学的特徴を有している。それは古細菌の細胞膜を構成する脂質(古細菌膜脂質)の構造であり、その化学構造は他生物のものと大きく異なっている<sup>4-0</sup>。

図 1-2 には、代表的な真正細菌・真核生物の細胞膜を構成する膜脂質(真正細菌・ 真核生物膜脂質)および古細菌膜脂質の構造を示しており、最も大きな違いとしては 疎水性側鎖の構造が挙げられる。真正細菌・真核生物膜脂質の疎水性側鎖が直鎖のア ルキル鎖(脂肪酸)であるのに対して、古細菌膜脂質は不斉メチル基が分岐したアル キル鎖(フィタニル鎖)を有している。このフィタニル鎖は、その構造中に炭素5の 繰り返し構造、すなわちイソプレン骨格を有する飽和イソプレノイド誘導体である。 更に、これらの疎水性側鎖のグリセロール部位への結合様式も異なっており、古細菌 脂質ではエステル結合ではなくエーテル結合であることも特徴の一つとして挙げら れる。一般的にエーテル結合はエステル結合と比較して化学的に安定であるため、エ ーテル結合であることが極限環境に生息する古細菌の耐性に関与していると推測さ れているが、詳細な理由は未解明である。また上記2点に加えて、グリセロール部位 の立体配置も異なっている。真正細菌・真核生物膜脂質のグリセロール部位はR体で あるが、古細菌膜脂質ではS体となっており、これらは鏡像異性の関係にある。グリ セロール部位の立体配置の違いは、疎水性側鎖のグリセロールへの結合位置の違いに 起因しており、真正細菌・真核生物膜脂質では疎水性側鎖が sn-1 および sn-2 位に結 合した sn-グリセロール-3-リン酸骨格であるのに対して、古細菌膜脂質は sn-2 および Sn-3 位に結合した sn-グリセロール-1-リン酸骨格を有しているためである。これらの 構造的特徴は、生合成経路・関与する酵素の違いに起因している。



図 1-2 真正細菌・真核生物脂質と古細菌脂質の構造比較

#### 1-1-c 古細菌膜脂質の生合成経路

古細菌膜脂質の生合成経路はいまだ未解明な部分も存在するが、まずその特徴的な 脂肪酸炭素骨格は、アセチル CoA を出発物質としたメバロン酸経由で生合成される とされている<sup>7-9)</sup>(スキーム1-1)。まずは2分子のアセチル CoA の縮合反応によって アセトアセチル CoA が生成した後に、もう1分子のアセチル CoA との縮合反応を経 て3段階でメバロン酸が生じる。続いて、酵素による連続的なリン酸化を受けること によりジホスホメバロン酸へと変換される。その後、2級アルコールのリン酸化、続 く脱炭酸を伴った脱リン酸が起こることでイソプレンユニットであるイソペンテニ ルニリン酸(IPP)が生成し、酵素によって IPP の異性化が起りジメチルアリルニリン 酸(DMAPP)を生成する。また、古細菌からはイソペンテニルリン酸を IPP へと変換 する酵素が発見されており、古細菌特有の変形メバロン酸生合成経路の存在が提唱さ れている。しかし、ホスホメバロン酸からイソペンテニルリン酸を合成する酵素は発 見されておらず、未解明な部分も多い。

続いて、古細菌脂質の分岐メチル側鎖は、イソプレンユニットである IPP を繰り返 し縮合させることで生合成されている。まずは、DMAPP からの二リン酸(OPP)の脱 離によりアリルカチオン中間体が生じ、このアリルカチオンに対して IPP の二重結合 が攻撃して縮合反応が起こることで、C10のゲラニルニリン酸が合成される。更に、 同様の縮合反応を繰り返し行い、炭素鎖を伸長していくことによって C20のイソプレ ノイド鎖であるゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP)が効率的に合成されている。



スキーム 1-1 イソプレンユニット(IPP)の縮合反応によるメチル分岐鎖の生合成経路。

次に古細菌膜脂質のグリセロール部位は、既述した通り sn-グリセロール-1-リン酸 である。この化合物は、真正細菌・真核生物のグリセロリン脂質と同様の前駆体であ るジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)が、sn-グリセロール-1-リン酸デヒドロゲナ ーゼによる立体選択的還元反応を受けることで生合成される<sup>10)</sup>。続いて生じた sn-グ リセロール-1-リン酸に対し、GGPP が sn-3、次いで sn-2 に順次連結されることで<sup>11,12)</sup>、 両親媒性を持つグリセロ脂質の基本的な分子骨格が形成される。この不飽和アーキチ ジン酸は、すべての古細菌脂質の生合成中間体であると考えられている。最後に、ゲ ラニルゲラニルリダクターゼによって疎水性側鎖部のすべての二重結合が立体選択 的に水素化されアーキオール骨格となることで<sup>13)</sup>、最も単純な構造を有する古細菌脂 質であるアーキチジン酸が生合成される。このアーキチジン酸が酵素によって頭部修 飾などを受けることで、古細菌膜脂質の構造に多様性が与えられる。



スキーム 1-2 アーキチジン酸の生合成経路

#### 1-1-d 古細菌膜脂質の構造や機能

上述のように、古細菌の中には100℃を超える高温環境や、飽和濃度に近い高塩濃 度環境など、真正細菌や真核生物では生息できない極限環境下で活動するものが存在 する。更には、古細菌の細胞膜を構成する脂質は、不斉メチル基を多数有するメチル 分岐側鎖(フィタニル鎖)を疎水性側鎖に持つなど、真正細菌や真核生物とは異なる 構造的特徴を有している。そのため、これらの特徴的な構造が、古細菌が極限環境下 で生息する際に重要な機能を担っていると考えられてきた。詳しくは次節で説明する が、高度高塩菌の一種である Halobacterium salinarum の細胞膜(紫膜)上に存在する 膜タンパク質であるバクテリオロドプシンの構造解析研究を通して、紫膜を構成する 古細菌脂質の構造が膜タンパク質の構造保持や機能発現に重要であることが知られ るようになった。しかし、これまで盛んに研究が行われてきたにもかかわらず、古細 菌膜脂質の構造の重要性は未解明な部分が多く、古細菌膜脂質の構造や、膜タンパク 質に与える影響を理解することは、現在でも興味深い研究分野である。

#### 1-2 高度高塩菌 Halobacterium salinarum の紫膜脂質の構造と機能

#### 1-2-a 紫膜を構成する脂質の構造

高塩菌 Halobacterium salinarum の細胞膜である紫膜(Purple Membrane, PM)<sup>14</sup>は、頭部 が負に帯電した極性脂質と電荷をもたない非極性脂質によって構成されている(図1-3)。極性脂質の頭部構造としては、グリセロールリン酸やグリセロール二リン酸、硫 酸化されたグリセロールや糖等いくつか種類があるものの、疎水性部は側鎖に2つフ ィタニル鎖を有するグリセロール骨格(アーキオール)で統一されている。また紫膜 を構成する脂質の 90%が極性脂質であり、更にはその主要構成成分は phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me)であることが明らかとされている<sup>15-20)</sup>。また、紫膜にはバクテリオロドプシン(bacteriorhodopsin, bR)が唯一膜タンパク質と して含まれており、その構成重量比は bR が 75%、脂質分子が 25%であると報告され ている<sup>2122)</sup>。これらの紫膜脂質は、真正細菌・真核生物膜脂質と比較すると、リン酸 頭部および疎水性側鎖共に特異的な構造を有していることから、bR が紫膜中で構造 を保持し、プロトンポンプ機能を発現する際にこれらの構造が重要な役割を担ってい ると考えられてきた。

【極性脂質】





squalene

menaquinone 8 (MK-8)

図 1-3 紫膜(PM)に含まれる脂質の構造

1-2-b バクテリオロドプシンの構造と機能

バクテリオロドプシンは、1971 年に Stoeckenius らにより高度高塩菌 Halobacterium salinarum の紫膜<sup>14)</sup>から単離された 7 回膜貫通型の膜タンパク質である<sup>23,24)</sup>。bR は 248 残基のアミノ酸から構成されており、光駆動型のプロトンポンプとして機能する ことが知られている<sup>25)</sup>。また、ヘリックス G 上に存在する Lys216 には all-trans レチ ナールがシッフ塩基を介して結合しており、このレチナールが光を受けて 13-cis レチ ナールへと光異性化を起こすことで、一連の光反応サイクルに伴うプロトンポンプ機 能が発現し、プロトンが細胞膜外に放出される。その結果、細胞膜内外にプロトンの 電気化学ポテンシャル勾配が生じることとなり、次いで ATP 合成酵素を介した細胞 膜内へのプロトンの流入が引き起こされる<sup>26)</sup>。その際に ATP の合成が行われること から、bR は光を利用してエネルギーを生産する光 - エネルギー交換機関であるとい える。

bRの光駆動プロトンポンプの分子機構は詳細に明らかにされており<sup>27)</sup>(図1-4)、 異なるUV吸収スペクトルを持つ光中間体を経由する光サイクル反応によってプロト ンの輸送を行っている<sup>28-30)</sup>(図1-5)。bRのUV吸収は発色団であるレチナールに起 因しており、その吸収波長は周辺環境の影響を強く受ける。そのため、吸収波長の変 化は bRの構造変化と密接に関係しており、光中間体の構造はこのUV吸収波長の違 いによって定義されている。bR光サイクルの分子機構としては、まず all-*trans*レチナ ールが13-cisレチナールへと光異性化をすることから始まり、シッフ塩基上のプロト ンが近傍に存在するAsp 85へと受け渡される。その際、Helix Cの構造が僅かに変化 することでプロトンの移動を促進させている。続いて、脱プロトン化によるレチナー ルの構造変化が起こり、Helix Fが外側に折れ曲がることでレチナールが細胞質側に 押し上げられる。その結果、Asp 96からレチナールへとプロトンの移動が起こり、レ チナールが再びプロトン化される。次にN中間体において、細胞質側からプロトンが

流入して Asp 96 がプロトン化されると共に、Asp 85 のプロトンが水分子を含んだ水 素結合ネットワークを通じて細胞外に放出される<sup>15,31)</sup>。加えて、M 中間体において Helix Cの正に帯電した Arg 82 が細胞膜外側へ移動することが報告されており、この わずかな動きによってプロトンとの静電反発を和らげ、N 中間体における細胞膜外へ のプロトンの放出に大きく寄与している。



all trans BR568 0.5 0 all trans 13-cis J<sub>620</sub> O<sub>640</sub> 3 ps K<sub>590</sub> 13-cis N<sub>530</sub> 13-cis L550 50 µs 13-cis M<sub>412</sub> H+ 13-cis

hv

図 1-4 bR プロトンポンプの分子機構 Reprinted with permission from Nature 2000, 406, 569.27)

Copyright© (2000) Nature Publishing Group.

図 1-5 bR の光サイクル反応 Reprinted with permission from *Photochemistry* and Photobiology, **2009**, 85, 590<sup>28)</sup> Copyright© (2009) John Wiley and Sons.

更に、紫膜中において、bR はタンパク質表面に存在する脂質分子(周辺脂質)とと もに三量体構造を形成しており(図 1-6)<sup>24)</sup>、bR 三量体1つに対する周辺脂質数は30 分子程度であること(中心付近に6分子のS-TGA-1が存在すると推定)が報告されて いる 15)



図 1-6 バクテリオロドプシン(bR)三量体の X 線解析構造(PDB:1M0L)。(a) 細胞膜 外側から、(b) 細胞膜側面側から見た bR 三量体。単量体を赤、青、黄のリボンモデル で示している。bR の周辺脂質を緑、スクアレンは黄、レチナールをオレンジ、レチナ ールとシッフ塩基を形成する Lys216 は青の球棒モデルで示している。

1-2-c バクテリオロドプシン-周辺脂質相互作用

バクテリオロドプシン(bR)の構造研究は、主に X 線結晶構造解析により行われてき た。高分解能の構造が明らかとされるに伴い、その X 線結晶構造中においてタンパク 質表面に周辺脂質の側鎖が観測された<sup>15,32-37)</sup>。このことから、膜貫通領域において bR と疎水性側鎖間には特異的な相互作用が存在し、bR の構造保持や機能発現に密接に 関わっていると考えられてきた。また、紫膜に界面活性剤を作用させて部分的に脂質 を除去すると、bR の構造が局所的に変化すること、更には光サイクル反応の動態が 変化しプロトンポンプ活性に影響を与えることがわかっている<sup>38-40)</sup>。更に、bR の周 辺脂質環境の重要性は、bR を様々な真核生物脂質膜中に再構成させる研究を通して も確認されている<sup>41-47)</sup>。川竹らは、界面活性剤処理によって部分的に脱脂質した bR を種々の真核生物脂質膜に再構成させ、レーザーフラッシュフォトリシス(LFP)測定 により bR 光サイクル反応における M 中間体の崩壊速度定数(*k*410)を算出<sup>41)</sup>すること で、周辺脂質環境が bR プロトンポンプ活性に与える影響を見積もっている(図 1-7) <sup>47)</sup>。その結果、酸性の頭部構造を有する PA、PG および PS リン脂質膜中においては プロトンポンプ機能が発現したが、中性のリン脂質である PC 膜中では機能が発現さ れなかった。そのため、bR が脂質膜中で機能を発現するには、酸性のリン酸基構造が 必要であることが明らかとなった。しかしこれまでの研究では、脂質の頭部構造が bR の構造や機能に与える影響を観測しているものがほとんどであり、周辺脂質の疎水性 側鎖構造に着目した研究例は少ない。そのため、周辺脂質の疎水性側鎖が bR の構造 や機能に与える影響や、その相互作用機構の全容が明らかとなっているとは言い難い。

また、近年のタンパク質 X 線結晶解析技術の発展により、重要な膜タンパク質においても高分解能な構造が明らとされており、その結晶構造中には bR と同様に周辺脂質の電子密度も観測されていることから、特定の脂質が特定の部位に結合していることが明らかとなっている<sup>48-56</sup>。そのため、膜タンパク質周辺の脂質環境は、膜タンパク質を細胞膜へ保持させるだけでなく、膜タンパク質と相互作用をする性質を併せ持っことで、その生理機能発現に関わる重要な役割を担っているとされている。しかし、膜タンパク質と周辺脂質疎水性側鎖との相互作用機構は未解明である。その原因として、膜貫通領域における膜タンパク質-周辺脂質相互作用を解析する方法論が確立されていないことが挙げられる。そのため、bR を含めた膜タンパク質と周辺脂質側鎖の相互作用機構を明らかとする上では、方法論の確立が重要な課題である。



図 1-7 各リン脂質膜中における M 中間体挙動のレーザーフラッシュフォトリシス (LFP)解析。酸性の頭部構造を有する PA, PG, PS リン脂質膜中において効率的にプロ トンポンプ機能が発現された。

Reprinted with permission from *Biochim. Biophys. Acta.* **2016**, *1858*, 2106. <sup>47)</sup> Copyright© (2016) Elsevier.

近年、膜タンパク質周辺の脂質環境の重要性が認識されてきている。古細菌の一種 である高度高塩菌 Halobacterium salinarum の紫膜に着目すると、その主要構成脂質は PGP-Me であることから、本脂質が紫膜の安定性や高塩耐性に重要な役割を担ってい ると考えられる。更には周辺脂質として、bR の構造保持や機能発現に密接に関わっ ていることが明らかとなっている。実際に過去の研究において、PGP-Me の存在が bR の構造保持に重要であること、bR のプロトンプ機能発現には周辺脂質の酸性リン酸 頭部構造が重要であることが見出されてはいるものの、膜貫通領域において周辺脂質 側鎖が膜タンパク質に与える影響については未解明である。そのため膜タンパク質 -周辺脂質相互作用をより詳細に理解する上で、古細菌が有するメチル分岐側鎖がどの ようにして、特徴的な膜物性や bR の安定化に寄与しているのかを詳細に明らかとす ることは重要な課題である。

1-3 メチル分岐鎖を有する脂質の物性および構造解析

1-3-a メチル分岐鎖を有する脂質の膜物性解析

古細菌膜脂質のような疎水側部にメチル分岐鎖を有する脂質は、その特徴的な構造 から物理化学的性質にも興味がもたれ、分析化学的手法 57-63)および計算科学的手法 64-67を用いて研究がなされてきた。Chan らは、真正細菌・真核生物脂質と同じグリセロ ールの立体配置、エステル結合でありながら、疎水性側鎖にフィタニル鎖を有する 1,2diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPhPC、図 1-8)を化学合成し、DPhPC で構 成された脂質二重膜を用いて示差走査熱量(DSC)測定を行った。DSC 測定は脂質二重 膜のゲル相から液晶相への相転移を観測する最も一般的な手法であり、ゲル相から液 晶相への転移の際に吸収される熱量を観測することで、ゲル相が液晶相へ転移する温 度(相転移温度:*Tm*)を決定することができる。その結果、DPhPC 二重膜において は、-120~120℃の温度範囲においてゲル相から液晶相への転移を示す熱量吸収が観 測されなかったことから、DPhPC は幅広い温度領域(-120~120℃)において液晶相状態 を保持していることを明らかとした 57)。



図 1-8 Diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC)の化学構造

また福田らは、リポソーム内側からの蛍光色素の流出実験を行い、メチル分岐鎖を 有する脂質の塩耐性を研究している<sup>63)</sup>。彼らは、疎水性側鎖に直鎖アルキル鎖を有す る 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphatidylcholine (DPPC)と卵黄レシチン (図 1-9a)、 メチル分岐鎖を有する DPhPC を用いて、蛍光色素 Carboxyfluorescein (CF)を内包した リポソームを調整した。そして、リポソーム外側の NaCl 濃度を 0.5~5.0M の範囲で 変化させた際の蛍光色素 CF の外部水層への流出量を 495nm の UV 吸収から算出し、 各脂質から成るリポソームの塩濃度耐性を見積もった。その結果、DPPC と egg-yolk lecithin リポソームでは、外部 NaCl 濃度の上昇に伴って顕著な CF 流出量の増加が確 認されたことから(図 1-9b)、これらのリポソームは高塩濃度条件下では破壊され、 二重膜構造を保持していないことが示唆された。しかし一方で、DPhPC リポソームで は外部 NaCl 濃度が 5.0M であっても CF の流出が少ないことから、高塩濃度条件下で も二重膜構造を保持しており、塩濃度の変化に強いことが明らかとなった。本測定に 用いられた脂質はすべて、同じリン酸頭部構造を有しているため、CF 流出の違いは 疎水性側鎖の構造に起因していると推察できる。以上の結果から、古細菌が高塩濃度 条件下で生息する上で、メチル分岐鎖が重要な役割を担っていることが明らかとなっ た。



図 1-9 (a) DPPC および代表的な卵黄レシチン(egg-yolk lecithin)の化学構造。(b) 各リ ン脂質で構成された Carboxyfluorescein (CF)内包リポソームからの塩濃度依存的な CF 流出実験 DPPC(●),卵黄レシチン(■), DPhPC (○)。DPPC および卵黄レシチンのリポ ソームでは外部 NaCl 濃度の上昇に伴って CF 流出量が顕著に増加したのに対して、 DPhPC リポソームでは高 NaCl 濃度においても CF 流出は少なかった。各脂質のリン

酸頭部構造は同じであることから、高 NaCl 濃度条件下での CF 流出の差には疎水性 側鎖の構造が起因している。

Reprinted with permission from *Biochim, Biophys, Acta* **1992**, *1110*, 171.<sup>63)</sup> Copyright© (1992) Elsevier.

1-3-b 脂質二重膜中におけるメチル分岐鎖の構造解析

メチル分岐鎖を有する脂質は、直鎖アルキル鎖を有する脂質とは異なる特徴的な膜物性を有することから、脂質二重膜中でのメチル分岐鎖の構造にも興味が持たれてきた。篠田らは、長年にわたり DPhPC を用いた分子動力学計算を行っており、その中で DPhPC 側鎖の脂質二重膜中での構造推定を行っている<sup>64)</sup>。彼らは MD 計算から得られた DPhPC の原子座標から、メチル分岐側鎖における各炭素結合間の二面角を計算した。その結果、分岐メチル基を有する炭素とそれに隣接する炭素間の結合においては顕著に gauche 配座の割合が増加する一方で、その他の結合においては anti 配座を優先的に取っていることが判明した (図 1-10)。分岐メチル基周りで gauche 配座が増加する要因としては、分岐メチル基が存在することで anti 配座においても主鎖との立体反発が生じ、結果として anti 配座と gauche 配座間のエネルギー差がなくなり、容易に交換が起こるためである。この結果から、メチル分岐側鎖は、分岐メチル基周りにおいて特異的に折れ曲がった構造を有していると推察された。しかし、このような計算科学的手法を用いて得られた構造は計算条件に大きく依存するため、実験的に得られた構造情報との比較が必要不可欠である。



図 1-10 (a) DPPC および DPhPC 側鎖の各炭素-炭素結合間における *gauche* 配座の割 合: DPPC (*Sn*-1;●), DPPC(*sn*-2;○), DPhPC(*sn*-1;▲), DPhPC(*sn*-1, △)。(b) MD 計算から 推定された分岐メチル鎖の構造。各分岐メチル基の周辺で特異的に折れ曲がっている。 Reprinted with permission from *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14030.<sup>64)</sup> Copyright© (2003) American Chemical Society.

以上の結果をまとめると、古細菌膜脂質のようなメチル分岐鎖を有する脂質の物理 化学的性質に関する研究は盛んに行われており、疎水性側鎖上の多数の不斉メチル基 の存在が上記の特徴的な膜物性を引き起こす要因であることが示唆されている。その ため、メチル分岐鎖の膜中における構造にも興味が持たれ、計算科学的手法を用いて 研究がなされている。その結果、メチル分岐鎖はその不斉メチル基付近において、直 鎖アルキル鎖を有する脂質とは異なる特徴的な構造(配座)を有していることが提唱 され、これが古細菌脂質膜の膜物性に大きく影響を与えている可能性が示唆された。 しかし、図1-4のようなメチル分岐鎖の構造は MD 計算によってのみ示されたもので あり、実験的な証拠が少なく、推測の域を出ていない。すなわち、脂質二重膜中での メチル分岐鎖の構造に関する情報は乏しい現状であり、どのような構造的要因がこの ような特徴的な膜物性を引き起こしているかについては未解明である。その原因とし ては、二重膜環境中での脂質分子は、動的な性質や不均一性といった特殊な特徴を持 つことから、その構造を実験的に観測する手法が少ないことが挙げられる。

1-4 固体 NMR を用いた生体膜の構造解析

1-4-a 固体 NMR

生体膜は様々な生物機能発現の場であり、膜結合分子間の相互作用には多くの関心 が寄せられているが、未だに原子レベルでの解析は困難である。その理由として、解 析に必要な生体膜試料は非結晶性・異方的な環境といった性質を持つことから、高い 分解能を有する構造解析手法である X 線結晶構造解析や溶液 NMR が適用困難である ことが挙げられる。一方、固体 NMR<sup>68-70)</sup>では、これらの生理的条件下でも測定が可能 となるため、生体膜解析においては極めて有用な手法であり、精密な原子間距離情報 や構造情報の取得に用いられている。これらの距離、構造情報を利用することで、固 体状態においても X 線結晶構造解析や溶液 NMR と同様に精度の高い構造決定が可能 となってきている。

Isotope	Spin	Natural abundance	Magnetgyric ratio	Frequency ratio
		<i>x</i> / %	$\gamma / 10^7 \text{ rad s}^{-1} \text{ T}^{-1}$	ξ/%
$^{1}\mathrm{H}$	1/2	99.985	26.752	100
$^{2}\mathrm{H}$	1	0.0115	4.107	15.350
<sup>13</sup> C	1/2	1.10	6.728	25.145
$^{15}N$	1/2	0.366	-2.713	10.137
$^{19}$ F	1/2	100	25.181	94.094
<sup>31</sup> P	1/2	100	10.839	40.481

表 1-1 生体膜の解析に用いられる核種 71)

1-4-b 重水素固体 NMR (<sup>2</sup>H NMR)を用いた配向解析

固体 NMR の一種である重水素固体 NMR (<sup>2</sup>H NMR)は、重水素標識部位の運動性や配向を見積も る強力な測定手法である。粉末状態やリポソームを 用いた <sup>2</sup>H NMR 測定では Pake doublet と呼ばれる形 状のスペクトルが観測され (図 1-11)、このピーク の幅を四極子分裂幅(quadrupolar splitting,  $\Delta v$ )とい い、四極子分裂幅から局所的な運動や構造情報 を得ることが可能である。

一般的に四極子分裂幅 Δv は次式によって与



図 1-11<sup>2</sup>H NMR 測定で 観測される Pake doublet の模式図

えられる;  $\Delta \nu = \Delta \nu_0 S \left(\frac{3\cos^2 \gamma - 1}{2}\right), S = \left\langle \frac{3\cos^2 \theta_{\gamma} - 1}{2} \right\rangle$ 

式中の  $\Delta v_0$  は粉末状態における四極子分裂幅、S は分子回転軸 R に対する C-D 結合 の揺らぎを表すオーダーパラメーターである (図 1-12)。よって、<sup>2</sup>H NMR 測定から 得られるスペクトルから四極子分裂幅  $\Delta v$  を算出することで、オーダーパラメーター S および、分子回転軸 R と C-D 結合軸のなす角度 y を求めることが出来る。すなわ ち、測定に用いた重水素標識体の運動性や配向情報を取得することが可能となる。



図 1-12 外部磁場 B<sub>0</sub>、膜法線 n、分子回転軸 R および C-D 結合の関係。

測定サンプルがリポソームの場合、外部磁場 $B_0$ と膜法線nのなす角度は $\alpha=90^\circ$ であり、 膜法線nと分子回転軸Rは一致する( $\beta=0^\circ$ )とみなすことができる。 $\gamma$ は分子の運動や 結合まわりの回転などにより揺らぎが生じる。

1-4-c 重水素固体 NMR (<sup>2</sup>H NMR)を用いた脂質の解析

近年、固体 NMR は膜脂質を含む生体分子の構造解析に広く用いられている<sup>72-75)</sup>。特 に重水素標識脂質を用いた<sup>2</sup>H NMR は、生体膜を模した条件下でリン脂質のアシル鎖 の局所的運動性および配向情報を得るための強力な手法である<sup>76-80)</sup>。過去の研究では、 アシル鎖上のすべての水素が重水素に置換された脂質(per-deuterated lipid)を用いて、 アシル鎖の運動性や配向解析が行われてきた。しかし、per-deuterated lipid を用いた<sup>2</sup>H NMR 測定では、すべての重水素のシグナルが重なった複雑なスペクトルが得られる ことになるが、各シグナルがどの重水素由来であるか明確に帰属することが難しく、 詳細な解析が困難であるという問題があった。

そこで近年、脂質の疎水性側鎖に位置選択的に重水素標識を導入し、脂質二重膜中での局所的な解析を行う手法が注目を浴びている<sup>81,82)</sup>。松森らは、スフィンゴシン鎖とアシル 鎖に位置選択的に重水素標識を導入したスフィンゴミエリン(SM)を合成し、コレステロール (Chol)存在下および非存在下における<sup>2</sup>H NMR 測定を行っている(図 1-13)。その結果、両 側鎖ともに側鎖中央部の運動性が最も減少していることが明らかとなり、コレステロールと相 互作用していることが示唆された。従来の per-duterated lipid を用いた解析では、脂質側鎖 の運動性は、グリセロールに近い付け根部分が最も運動性が低く、側鎖末端に近づくにつ れて運動性が上昇すると考えられていた。しかし本手法を用いて、脂質側鎖の局所的な運 動性を網羅的に解析することで、コレステロールとの相互作用によって膜中央部の運動性 が抑えられることが判明した。



図 1-13 位置選択的に重水素標識を導入した直鎖アルキル鎖の運動性解析。スフィ ンゴシン鎖、アシル鎖ともに 10 位付近での運動性が最も抑えられていることから、 側鎖中央部にてコレステロールの剛直なステロイド骨格と相互作用していることが 示唆された。

Reprinted with permission from *Biochemistry*, **2012**, *51*, 8363. <sup>81)</sup> Copyright© (2012) American Chemical Society.

1-4-d 重水素固体 NMR (<sup>2</sup>H NMR)の古細菌脂質への適用

<sup>2</sup>HNMR はこれまでに、真核生物脂質のみならず、古細菌脂質の疎水性側鎖の構造 解析にも適用されている。柿沼らは、両側鎖末端付近に重水素標識を導入した古細菌 脂質(図1-14)の合成を報告しており<sup>83)</sup>、更に、合成した重水素標識脂質から成る配 向膜を作成し、重水素固体 NMR を用いて脂質二重膜中でのメチル分岐側鎖の配向解 析を行った<sup>84)</sup>。測定に用いた古細菌脂質は重水素を4つ有していることから、理論的 には4組のダブレットが観測されるはずであるが、実際には5~6組のダブレットが観 測されたと報告している。この結果から、古細菌脂質のメチル分岐側鎖は、脂質二重 膜中において2種類以上の配向を取って存在しており、多数のダブレットが観測され たと推察された。



図 1-14 重水素標識古細菌脂質の化学構造。各側鎖末端付近に合計 4 つの重水素標 識を有する。

Smith らは生合成的手法を用いて、高度好塩菌(*H. cutirubrum*)の極性脂質(分岐メチ ル基に隣接するメチレン炭素)の1'位と2'位に重水素標識を導入することに成功し た。さらに、重水素標識極性脂質の混合物から成るリポソームサンプルを調整し、重 水素固体 NMR を用いて各標識部位の縦緩和(*T*<sub>1</sub>緩和)時間を測定することで、メチ ル分岐側鎖の動態解析を行っている<sup>85)</sup>。その結果、頭部付近の各標識部位における*T*<sub>1</sub> 緩和時間は異なるものの、8~10°Cにおいて極小となる同様の傾向を示したことから (図1-15)、脂質側鎖が一様の軸回転運動をしていると推察した。



図 1-15 重水素化脂質の温度依存的 *T*<sub>1</sub>緩和時間の変化。4つ曲線は 1'位、2'位の標識体の観測された4種類の Pake doublets に対応している(シグナルは帰属されていない)。 Reprinted with permission from *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *54*, 115.<sup>85)</sup> Copyright© (1990) Elsevier. 上記のように、古細菌脂質のメチル分岐側鎖は、その特徴的な構造から膜中での構造に も興味が持たれ、少数であるが、重水素固体 NMR を用いた研究も行われてきた。しかし過 去の研究では、メチル分岐側鎖の頭部付近と末端付近の複数個所に重水素標識を有する 脂質が用いられていたために、得られる<sup>2</sup>H NMR スペクトルが複雑となり、詳細な分岐メチ ル側鎖の構造解析が困難であった。重水素固体 NMR を用いたメチル分岐鎖の構造解析 には、中央付近を含めた側鎖の複数個所に重水素標識を導入することが必要不可欠であ るが、標識体を比較的容易に調整可能な生合成的手法では、特定の箇所に選択的に標識 を導入することが難しく、複数個所が標識されてしまうため詳細な構造解析が困難になると いう問題が生じる。この問題を解決するためには、前項に記載したように、疎水性側鎖に位 置選択的に重水素標識を導入した脂質を用いることが考えられる。しかし、疎水性側鎖に 不斉メチル基を多数有する古細菌脂質の合成は非常に困難であるため、固体 NMR 測 定に使用可能な純度を有する重水素標古細菌脂質を化学合成的に調整することは極 めて挑戦的な課題であるといえる。

以上をまとめると、位置選択的に重水素標識を導入した古細菌脂質の合成という困難な課題を解決する必要があるものの、本脂質を用いた NMR 測定から取得できる側鎖の局所的な構造情報からは、いまだ未解明であるメチル分岐鎖の膜中における構造を原子レベルで詳細に解析することが可能であり、ひいては古細菌脂質の特徴的な物性を構造的な観点から解析できると期待される。

1-5 本研究の目的

メチル分岐鎖を有する古細菌脂質は、特徴的な化学構造・膜物性を有するだけでな く、膜タンパク質の周辺脂質としても重要であることから、これまでに数多くの研究 者の注目を集め、合成化学的手法、分光学的手法および分子動力学計算などによる計 算化学的手法を用いた研究が行われてきた。

上述のとおり、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℃) において液晶相状態を保持する(相転移を示さない)という真核生物脂質とは異なる 特徴的な膜物性を有していることが明らかとなっており、更には、bR の X 線結晶構 造においてタンパク質表面に古細菌脂質の疎水性側鎖が観測されたことや、数多くの bR 再構成実験を通して、古細菌脂質の構造が bR の構造保持や機能発現に周辺脂質と して重要な役割を担っていることも明らかとなってきている。しかし、古細菌脂質二 重膜のどのような構造的要因がこのような特徴的な膜物性を引き起こしているのか、 更には、膜貫通領域において bR と周辺脂質がどのように相互作用しているのかにつ いては未だ未解明なままである。その主な原因としては、二重膜環境中における古細 菌脂質のメチル分岐側鎖の詳細な構造が解明されていないことが挙げられる。一般的 に二重膜環境中での脂質分子は、動的な性質や不均一性といった特殊な特徴を持つこ とから、その構造を直接的に観測する手法が少なく、脂質分子の詳細な構造解析は非 常に困難である。過去にも分光科学的・計算科学的手法を用いてメチル分岐鎖の構造 解析が行われてはいるものの、側鎖全体の大まかな情報にとどまっており、詳細な構 造が明らかになっているとは言い難い。そのため、古細菌脂質膜の膜物性や膜タンパ ク質 - 周辺脂質相互作用を解析する上で、古細菌脂質のメチル分岐鎖の詳細な構造情 報は必要不可欠であるといえる。

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 を駆使することで、二重膜中における古細菌脂質特有のメチル分岐鎖の構造を 解明することを目的とした。すなわち、古細菌脂質として bR の主要周辺脂質である PGP-Me に着目し、そのメチル分岐鎖の原子レベルでの構造解析を行うことで、古細 菌特有の性質につながる構造的要因を明らかにすることとした。具体的には、以下に 示すアプローチで本研究目的を達成することを計画した。

- (1) PGP-Me 全合成を達成し、位置選択的重水素標識 PGP-Me 調整に適用可能な効率 的合成経路を確立する。
- (2) メチル分岐鎖に位置選択的重水素標識を有する PGP-Me を調整し、重水素固体 NMR 測定を行う。

(3) NMR 測定結果と MD 計算を組み合わせてメチル分岐鎖の構造的特徴を明らかとし、古細菌脂質特有の膜物性との関連を明らかとする。

以上の課題を克服し、本研究によって二重膜環境中でのメチル分岐鎖の構造が明ら かとなれば、古細菌脂質が相転移を示さない膜を形成する構造的要因が解明できると 期待される。更には、bR の X 線結晶構造と組み合わせてドッキングシミュレーショ ンを行うことで精密な bR と PGP-Me の相互作用解析へと繋げることが可能となり、 ひいては膜タンパク質 - 周辺脂質相互作用を解析する新たな手法の開発へと繋がる ことが期待される。 参考文献

- 1) Woese, C. R. Microbial. Rev. 1987, 51, 221.
- 2) Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 4576.
- 3) 古賀洋介, 亀倉正博, 古細菌の生物学, 1998
- 4) Kate, M. Prog. Chem. Fats Lipids 1978, 15, 301.
- 5) De Rosa, M.; Gambacorta, A. Microbiol. Rev., 1986, 50, 70.
- 6) Koga, Y.; Nishihara, M.; Morii, H. Akagawa-Matsushita, M. Microbiol. Rev. 1993, 57, 164.
- 7) Koga, Y.; Morii, H. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2007, 71, 97.
- 8) Lombard, J.; Lopez-Garcia, P.; Moreira, D. Nat. Rev. Microbiol. 2012, 10, 507.
- 9) Pereto, J.; Lopez-Garcia, P.; Moreira, D. Trends Biochem. Sci. 2004, 29, 469.
- 10) Nishihara, M.; Koga, Y. J. Biochem. 1995, 117, 933.
- 11) Zhang, D. L.; Daniels, L.; Poulter, C. D. J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1264.
- 12) Hemmi, H.; Shibuya, K.; Takahashi, Y.; Nakayama, T.; Nishino, T. J. Biol. Chem. 2004, 279, 50197.
- 13) Nishimura, Y.; Eguchi, T. J. Biochem. 2006, 139, 1073.
- 14) Stoeckenius, W.; Owen, R. J. Cell Biol. 1967, 34, 365.
- 15) Luecke, H.; Schobert, B.; Richter, H. T.; Cartailler, J. P.; Lanyi, J. K. J. Mol. Biol. 1999, 291, 899.
- 16) Kates, M.; Kushwaha, S. C.; Sprott, G. D. Methods Enzymol. 1982, 88, 98.
- 17) Kates, M.; Moldoveanu, N.; Stewart, L. C. Biochim. Biophys. Acta. 1993, 1169, 46.
- 18) Grigorieff, N.; Beckmann, E.; Zemlin, F. J. Mol. Biol. 1995, 254, 404.
- 19) Krebs, M. P.; Isenbargar, T, A. Biochim. Biophys. Acta. 2000, 1460, 15.
- 20) Corcelli, A.; Lattanzio, V. M.; Mascolo, G.; Papadia, P.; Fanizzi, F. *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 132.
- 21) Bridgen J.; Walker, I. D.; Biochemistry 1976, 15,792.
- 22) Gerber, G. E.; Gray, C. P.; Wildënauer, D.; Khorana, G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977, 74,5426.
- 23) Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. Nature 1971, 233, 149.
- 24) Blaurock, E.; Stoeckenius, W. Nature New Biol. 1971, 233, 152.
- 25) Oesterhelt, D.; Stoeckenius, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2853.
- 26) Freisleben, H. J.; Zwicker, K.; Jezek, P.; John, G.; Bettin-Bogutzki, A.; Ring, K.; Nawroth, T. Chem. Phys. Lipids. 1995, 78, 137.
- 27) Kuhlbrandt, W. Nature 2000, 406, 569.
- 28) Pieper, J.; Buchsteiner, A.; Dencher, N. A.; Lechner, R. E.; Hauß T. Photochemistry and

Photobiology, 2009, 85, 590-597

- 29) Birge, R. R.; Gillespie, N. B.; Izaguirre, E. W.; Kusnetzow, A.; Lawrence, A. F.; Singh, D.; Song, Q. W.; Schmidt, E.; Stuart, J. A.; Seetharaman, S.; Wise, K. J. J. Phys. Chem. B, 1999, 103, 10746.
- 30) Lanyi, J. K., Ann. Rev. Physiol. 2004, 66, 665.
- 31) Lanyi, J. K. Biochim. Biophys. Acta. 2006, 1757, 1012.
- 32) Grigorieff, N.; Ceska, T. A.; Downing, K. H.; Baldwin, J. M.; Henderson, R., J. Mol. Biol. 1996, 259, 393.
- 33) Essen, L.; Siegert, R.; Lehmann, W. D.; Oesterhelt, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95, 11673.
- 34) Belrhali, H.; Nollert, P.; Royant, A.; Menzel, C.; Rosenbusch, J. P.; Landau, E. M.; Pebay-Peyroula, E., *Struct.* **1999**, *7*, 909.
- 35) Sato, H.; Takeda, K.; Tani, K.; Hino, T.; Okada, T.; Nakasako, M.; Kamiya, N.; Kouyama, T., *Acta Crystallogr. D* 1999, 55, 1251
- 36) Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Murata, K.; Miyazawa, A.; Kidera, A.; Kimura, Y.; Fujiyoshi, Y., J. Mol. Biol. 1999, 286, 861–882.
- 37) Faham, S.; Bowie, J. U.; J. Mol. Biol. 2002, 316, 1.
- 38) Mukhopadhyay, A. K.; Dracheva, S.; Bose, S.; Hendler, R. W. Biochemistry 1996, 35, 9245.
- 39) Tanio, M.; Tuzi, S.; Yamaguchi, S.; Konishi, H.; Naito, A.; Needleman, R.; Lanyi, J. K.; Saito, H. Biochim. Biophys. Acta. 1998, 1375, 84.
- Joshi, M. K.; Dracheva, S.; Mukhopadhyay, A. K.; Bose, S.; Hendler, R. W. *Biochemistry*, 1998, 37, 14463.
- 41) Dencher, N. A.; Kohl, K. D.; Heyn, M. P. Biochemistry, 1983, 22, 1323.
- 42) Jain, M. K.; Zakim, D. Biochim. Biophys. Acta. 1987, 906, 33.
- 43) Watts, A. Biophys. Chem. 1995, 55, 137.
- 44) Dracheva, S.; Bose, S.; Hendler, R. W. FEBS Lett. 1996, 382, 209.
- 45) Sonoyama, M.; Kikukawa, T.; Yokoyama, Y.; Demura, M.; Kamo, N.; Mikatsu, S. *Chem. Lett.* **2009**, *38*, 1134.
- 46) Yokoyama, Y.; Negishi, L.; Kitoh, T, Sonoyama, M.; Asami, Y.; Mitaku, S. J. Phys. Chem. B 2010, 114, 15706.
- 47) Kawatake, S.; Umegawa, Y.; Matsuoka, S.; Murata, M.; Sonoyama, M. *Biochim. Biophys. Acta.* **2016**, *1858*, 2106.
- 48) Doyle, D. A.; Morais, Cabral, J.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. *Science* **1998**, *280*, 69.
- 49) Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Ruta, V.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. Nature 2003,

423, 33.

- 50) Long, S. B.; Tao, X.; Campbell, E. B.; MacKinnon, R., Nature 2007, 450, 376.
- Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C.; *Science* 2007, *318*, 1258.
- 52) Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Roth, C. B.; Griffith, M. T.; Jaakola, V.-P.; Chien, E. Y. T.; Velasquez, J.; Kuhn, P.; Stevens, R. C., *Structure*, **2008**, *16*, 897.
- 53) Wacker, D.; Fenalti, G.; Brown, M. A.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Cherezov, V.; Stevens, R. C., J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 11443.
- 54) Xiang, Y.; Rybin, V. O.; Steinberg, S. F.; Kobilka, B., J. Biol. Chem. 2002, 277, 34280.
- 55) DiPilato, L. M.; Zhang, J., Mol. BioSyst. 2009, 5, 832.
- 56) Bokoch, M. P.; Zou, Y.; Rasmussen, S. G. F.; Liu, C. W.; Nygaard, R.; Rosenbaum, D. M.; Fung, J. J.; Choi, H.-J.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Puglisi, J. D.; Weis, W. I.; Pardo, L.; Prosser, R. S.; Mueller, L.; Kobilka, B. K., *Nature*, **2010**, *463*, 108
- 57) Linsey, H. Peterson, N. O.; Chan, S. I. Biochim, Biophys, Acta 1979, 555, 147.
- 58) Ekiel, I. H.; Marsh, D.; Smallbone, B. W.; Kates, M.; Smith, I. C. P. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1981**, *100*, 105.
- 59) Hiraki, K.; Hamanaka, T.; Mitsui, T.; Kito, Y. Biochim, Biophys, Acta 1981, 647, 18.
- 60) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. Chemistry Letters 1998, 9, 901.
- 61) Mathai, J. C.; Sprott, G. D.; Zeidel, M. L. J. Biol. Chem. 2001, 276, 27266.
- 62) Tristrum-Nagle, S.; Kim, D. J.; Akhunzada, N.; Kučerka, N.; Mathai, J. C.; Katsaras, J.; Zeidel, M. Nagle, J. F. *Chem. Phys. Lipids* **2010**, *163*, 630.
- 63) Yamaguchi, K.; Doi, K.; Kinoshita, M.; Kii, F.; Fukuda, H. *Biochim, Biophys, Acta* **1992**, *1110*, 171.
- 64) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 14030.
- 65) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. J. Phys. Chem. B 2004, 108, 9346.
- 66) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. Chem. Phys. Lett. 2004, 390, 35.
- 67) Shinoda, K.; Shinoda, W.; Mikami, M. M. Phys. Chem. Chem. Phys. 2007, 1467, 198.
- 68) Duer, M. J. "Introduction to Solid-State NMR" Blackwell Publishing Ltd. 2004
- 69) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. "Multidimensional Solid-State NMR and Polymers" Academic Press Ltd. 1994
- 70) 「固体 NMR 実践編」日本電子株式会社
- 71) Harris, R. K.; Becker, E. D.; Cabral de Menezes, S. M.; Goodfellow, R.; Granger, P. *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance* **2002**, *9*, 5.
- 72) Murata, M.; Sugiyama, S.; Matsuoka, S.; Matsumori, N. Chem. Rec. 2015, 15, 675.

- 73) Molugu, T. R.; Lee, S.; Brown, M. F. Chem. Rev. 2017, 117, 12087.
- 74) Zhang, R.; Mroue, K. H.; Ramamoorthy, A. Acc. Chem. Res. 2017, 50, 1105.
- 75) Naito, A.: Matsumori, N.; Ramamoorthy, A. Biochim. Biophys. Acta 2018, 1862, 307.
- 76) Seeling, A.; Seelig, J. Biochemistry 1974, 13, 4839.
- 77) Seeling, J. Q. Rev. Biophys, 1977, 10, 353.
- 78) Davis, J. H. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 737, 117.
- 79) Kinnun, J. J.; Mallikarjunaiah, K. J.; Petrache, H. I.; Brown, M. F. Biochim. Biophys. Acta. 2015, 1848, 246.
- 80) Molugu, T. R.; Brown, M. F. Chem. Phys. Lipids 2016, 199, 39.
- Matsumori, N.; Yasuda, T.; Okazaki, H.; Suzuki, T.; Yamaguchi, T.; Tsuchikawa, H.; Doi, M.; Oishi, T.; Murata, M. *Biochemistry*, 2012, 51, 8363.
- 82) Yasuda, T.; Kinoshita, M; Murata, M.; Matsumori, N. Biophys. J. 2014, 106, 631.
- 83) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakimura, K. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1998, 71, 2419.
- 84) 荒川賢治 東京工業大学大学院理工学研究科 学位論文 1999
- 85) Stewart, L. C.; Kates, M.; Ekiel, I. H.; Smith, I. C. P. Chem. Phys. Lipids 1990, 54, 115.

第二章 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

緒 言

古細菌脂質から構成される脂質二重膜は、幅広い温度範囲(-120~120℃)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保持できるといった、真正細菌・ 真核生物膜脂質にはない特徴的な膜物性を有している。これらの膜物性は、高酸性や 高塩濃度などの極限環境で生息する古細菌には必要なものであると考えられている。 古細菌脂質の構造的な特徴としては、疎水性側鎖に多数の不斉メチル基を有しており、 この疎水性側鎖がグリセロール部位にエステル結合ではなくエーテル結合で連結し ている点が挙げられる。これらの特異的な構造が古細菌脂質の膜物性に大きく影響を 与えていると考えられているが、その構造的要因は未だ解明されておらず、脂質二重 膜中における疎水性側鎖の詳細な構造情報の取得が望まれている。固体 NMR は脂質 二重膜中における生体分子の構造解析に広く用いられており、中でも重水素固体 NMR (<sup>2</sup>H NMR)は分子の運動性や配向情報が取得できる強力な測定手法である。<sup>2</sup>H NMR を用いて古細菌脂質の側鎖に特有の分岐メチル基周辺の構造解析を行うために は、不斉メチル基に重水素標識を導入した PGP-Meの調製が必要不可欠であり、更に、 疎水性側鎖全体の構造解析を詳細に行うには、側鎖の複数点における構造情報の取得 が望まれる。そのためには、各メチル分岐部分が位置選択的に重水素標識された PGP-Me 誘導体を調製する必要があるため、本研究においてはいかにしてそれら複数の重 水素標識体を効率的に調製するかが重要な課題である。しかし、その構造的な複雑さ のためか PGP-Me 自身の全合成はこれまで報告されておらず、効率的な合成手法は確 立されていなかった。そこで本章ではまず、PGP-Meの初の全合成を達成することで、 重水素標識体調製にも適用可能な PGP-Me の効率的合成手法の確立を行った。そして 更に、確立した合成手法を適用することで、各不斉メチル部位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PGP-Me誘導体の調製を行った(図1-1)。



PGP-Me (1) :  $R^1 = R^3 = R^5 = CH_3$ ,  $R^2 = R^4 = R^6 = H$ 3'- $CD_3$ , D-PGP-Me (2) :  $R^1 = CD_3$ ,  $R^2 = D$ ,  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = H$ ,  $R^5 = CH_3$ ,  $R^6 = H$ 7'- $CD_3$ , D-PGP-Me (3) :  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = CD_3$ ,  $R^4 = D$ ,  $R^5 = CH_3$ ,  $R^6 = H$ 11'- $CD_3$ , D-PGP-Me (4) :  $R^1 = CH_3$ ,  $R^2 = H$ ,  $R^3 = CH_3$ ,  $R^4 = H$ ,  $R^5 = CD_3$ ,  $R^6 = D$ 

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

2-1 先行合成研究

#### 2-1-a 古細菌脂質の合成研究

古細菌脂質は興味深い膜物性と特異的な構造を有していることから多くの有機化 学者の注目を集め、その膜物性解析に向けた合成研究も盛んに行われている<sup>1,2)</sup>。

特に柿沼らによって、これまでに環状および非環状古細菌脂質の合成報告がなされている<sup>3-7)</sup>。彼らは36員環古細菌脂質の合成において<sup>4)</sup>(スキーム2-1)、市販の(*R*)-3-ヒドロキシ-2-メチル-プロピオン酸(A-1)から誘導したイソプレンユニット(A-2,3)を塩 基性条件下でカップリングさせ、続くバーチ条件での脱スルホン化によって不斉1,5 ジメチル骨格の構築に成功している。さらに同様の手法を繰り返し適用することで C<sub>20</sub>イソプレノイド誘導体(A-7)へと変換した後に、グリセロール部位とのエーテル化 によって2,3-ジアルキルグリセロ骨格(A-8)を構築した。その後、側鎖末端のアルコー ルをアルデヒドへと酸化し、McMurryカップリング、続く水素化反応によって36員 環の構築に成功している。最後に*sn*-1位のリン酸化、続くコリン化を行い、(*R*)-3-ヒ ドロキシ-2-メチル-プロピオン酸から最長直線工程25段階、全収率1.7%で36員環状 古細菌脂質(A-9)の合成を達成した。



スキーム 2-1 柿沼らによる環状古細菌脂質の合成

更に柿沼らは、本合成法を用いて疎水性側鎖に重水素標識を導入した非環状古細菌 脂質の合成にも成功している<sup>7)</sup>(スキーム 2-2)。まずは共通中間体である不斉 1,5 ジ メチルスルホン(A-6)に対して(R)-ヨウ化シトロネロール(A-10)をカップリングさせる ことで C<sub>20</sub> イソプレノイド誘導体(A-11)を合成した。その後、末端オレフィンから変 換したメチルエステル部位を LiAlD4 で還元することで重水素標識の導入に成功して いる。その後、グリニャール試薬とのクロスカップリング反応により側鎖末端を導入 し、*sn*-1 位のリン酸化、続くコリン化を行うことで、最長直線工程 30 段階、全収率 1.3%で重水素標識ジフィタニル PC(A-14)の合成を達成した。



スキーム 2-2 柿沼らによる重水素標識古細菌脂質の合成

上述の合成研究例から見て取れるように、その構造的な複雑さのため古細菌脂質の 全合成は多段階を要し、かつ全収率も高いとは言えず、非常に困難であることがわか る。その原因としては、疎水性側鎖上の多数の不斉メチル基を構築する際に、生合成 経路の様にすべての不斉メチル基を立体選択的に一挙に構築する手法は確立されて おらず、上記スキームの様に不斉メチル基を有するユニットを繰り返し連結させる戦 略を取らざるを得ないためである。

重水素標識体調整においては、古細菌脂質自体の合成の困難さから、化学合成的に 重水素標識古細菌脂質が調製された例は少なく<sup>2,7)</sup>、特に詳細な膜物性解析に必須で ある疎水性側鎖の不斉メチル基部分に重水素標識を導入した合成例は存在しない。ま た過去の合成法では、同じ合成戦略で複数の標識体を作り分けることが困難であるた め標識位置ごとに合成経路を確立しなければならず、またキラルプール合成法である ことから不斉メチル基部分の標識化が困難であるという問題点がある。そのため本研 究においては、各不斉メチル基に効率的に重水素標識が導入可能となる、不斉 1,5 ジ メチル骨格構築法の確立も重要な課題と言える。

#### 2-1-b 飽和イソプレノイド鎖の合成研究

飽和イソプノイド鎖(不斉 1,5 ジメチルアルキル鎖)は古細菌脂質の疎水性側鎖部 のみならず、ビタミン<sup>8,9)</sup>、昆虫フェロモン<sup>10,11)</sup>、海洋天然物<sup>12,13)</sup>などの生物活性化合 物中に幅広く見られる部分構造である。そのため、多くの有機合成化学者の興味を惹 き、これまでに数多くの不斉 1,5 ジメチルアルキル鎖の効率的合成手法が報告されて いる。

Hadley らは、Ireland-Claisen 転移<sup>14)</sup>を鍵反応とした不斉1,5 ジメチル骨格の構築を 報告している<sup>15)</sup>(スキーム2-3)。まずは、ケトン(B-1)とアクロレイン(B-2)とのアル ドール反応により不斉メチル基を導入した後に、4 段階でアリルエステル(B-4)へと変 換した。そして、アリルエステル(B-4)を塩基性条件下でケテンシリルアセタール(B-5) へと変換することで Claisen 転移が起こり、不斉1,5 ジメチル骨格を構築した。その 後、水素添加反応やグリニャール試薬とのクロスカップリング反応を経て、不斉1,5 ジメチルアルコール(B-7)の合成を達成している。





スキーム 2-3 Hadley らによる不斉 1,5 ジメチルアルコール(B-7)の合成
Minnaard らは、独自に開発した不斉 1,4-付加反応を鍵反応とした不斉 1,5 ジメチル 骨格を有する昆虫フェロモンの合成を報告している<sup>16)</sup>(スキーム 2-4)。彼らはシクロ オクタジエノン(C-1)に対して、不斉ホスホロアミダイト配位子(C-2)存在下における ジメチル亜鉛試薬の立体選択的な 1,4-付加反応<sup>17,18)</sup>を繰り返し行った後に、TMSOTf を作用させてシリルエノールエーテル(C-3)へと変換した。そして、オゾン分解により 二重結合を切断することで、両末端が官能基化された anti-1,5 ジメチル骨格を有する アルコール体(C-4)を得た。その後、両末端において順次グリニャール試薬とのクロス カップリング反応を行うことで、不斉 1,5 ジメチル骨格を有する昆虫フェロモン(C-6, 7)の合成を達成している。



スキーム 2-4 Minnaard らによる昆虫フェロモン(C-6,7)の合成

Piccirilli らは、マイコバクテリアの細胞膜中に存在する糖脂質であるホスホミコケ チド合成に向けて、C<sub>32</sub>- Mycoketide(**D-5**)の合成を報告している<sup>19,20</sup>)(スキーム 2-5)。 彼らは市販の(*S*)-3-ヒドロキシ-2-メチル-プロピオン酸(**D-1**)から誘導したイソプレン ユニットであるアルデヒド体(**D-2**)と PT-スルホン体(**D-2**)を Julia-Kocienski オレフィン 化により連結させた後に、生じた二重結合にジイミド還元を適用することで効率的に 不斉 1,5 ジメチル骨格の構築に成功している。更に、同様の反応を繰り返し行って炭 素鎖を伸長させることで、不斉メチル基を 5 つ有する、C<sub>32</sub>- Mycoketide(**D-5**)の合成を 達成している。



スキーム 2-5 Piccirilli らによる C32-Mycoketide(D-5)の合成

また C<sub>15</sub> イソプレノイド誘導体である(3*R*, 7*R*)-3,7,11-トリメチルドデカノールは、 ビタミン類や抗酸化物質、古細菌脂質<sup>21)</sup>合成における重要な合成中間体であるため、 これまでにその効率的合成法が多数報告されている。

Wuらは、イソプレノール(E-1)から2段階で調製したジエン(E-2)に対して、テキシ ルボラン(ThxBH<sub>2</sub>)を用いた環状ヒドロホウ素化反応<sup>22)</sup>を行い化合物 E-3 へと変換し た後に、ホウ素のカルボニル化<sup>23)</sup>、続く位置選択的エノール化<sup>24)</sup>を行うことでシリル エノールエーテル(E-4)を得た(スキーム 2-6)<sup>25)</sup>。そして、オゾン分解により二重結 合を切断して両末端が官能基化された *syn*-1,5 ジメチル骨格を有するカルボン酸(E-5) とした後に、グリニャール試薬とのクロスカップリング反応により側鎖末端を導入す ることで、(3*R*, 7*R*)-3,7,11-トリメチルドデカノールの合成を達成している<sup>26)</sup>。



スキーム 2-6 Wu らによる(3*R*, 7*R*)-3,7,11-トリメチルドデカノールの合成 根岸らは、独自で開発したアルケンに対するカルボアルミニウム化反応(ZACA)<sup>27-29)</sup>

によってメチル基を導入し、生じたイソプレンユニットを繰り返し連結させる合成戦略により(3R,7R)-3,7,11-トリメチルドデカノールの合成を行っている(スキーム 2-7)。 まずは、アルケン F-1 に対して、不斉触媒存在下でトリメチルアルミニウムを作用させることでメチルを導入した後に、本反応によって生じるヒドロキシ基を足掛かりとして、酵素を用いた光学分割(LICA)<sup>30-32)</sup>を行うことで光学純度が99% ee 以上のイソ プレンユニットの調製に成功している(スキーム 2-4)。その後、市販のイソペンチル グリニャール試薬、続くイソプレンユニットから調製したヨウ素体(F-4)とのクロスカ ップリング反応を順次行い、高光学純度の(3R,7R)-3,7,11-トリメチルドデカノールの 合成を達成している<sup>33)</sup>。



スキーム 2-7 根岸らによる(3R, 7R)-3,7,11-トリメチルドデカノールの合成

以上の様に、飽和イソプノイド鎖(不斉1,5ジメチルアルキル鎖)合成においては、 その合成戦略にある程度の共通点を見出すことができる。すなわち、高光学純度の不 斉メチル基を有するイソプレンユニットを調製した後に、クロスカップリング反応等 によりイソプレンユニット同士を連結させることで不斉1,5ジメチル骨格を構築して いる。Piccirilli らの合成手法は不斉1,5ジメチルアルキル鎖を効率的に構築できる強 力な手法ではあるが、不斉メチル基を有する出発物質を用いるキラルプール合成法で あることから、不斉メチル基へと重水素標識を導入した古細菌脂質合成には適用が困 難である。一方、根岸らの合成法のように立体選択的なメチル化反応を利用すること で、不斉メチル基へと重水素標識を導入した重水素標識イソプレンユニットが容易に 調製可能となると考えられる。更に、イソプレンユニットを基本構成単位として炭素 鎖を伸長させていく本合成戦略であれば、非標識イソプレンユニットの代わりに重水 素標識イソプレンユニットを連結させることで容易に重水素標識が導入可能である。 イド鎖合成にも有用な手法であると言える。

# 2-1-c PGP-Me 誘導体の合成研究

当研究室の Jin は、PGP-Me のキラルニリン酸頭部構造の合成法を確立し、疎水性 側鎖に直鎖アルキル鎖を有する PGP-Me 誘導体および重水素標識 PGP-Me 誘導体の合 成に成功している<sup>34)</sup> (スキーム 2-8)。まずは、市販の(*R*)-solketal から 5 段階で調製し たアルコール体(G-1)に対して、リン酸化試薬 G-2 を作用させ H-ホスホネート(G-3)へ と変換した。そして、酸性条件下での脱 PMB 保護、続くホスホロアミダイト(G-4)に よるリン酸化を行うことで、PGP-Me のキラルニリン酸頭部を構築した。その後、疎 水性部位(G-5, 6)とのカップリング反応・脱ベンジル続くイオン交換反応に付すこと で、疎水性側鎖に直鎖アルキル鎖を有する PGP-Me 誘導体および重水素標識 PGP-Me 誘導体の合成を達成している。



スキーム 2-8 Jin らによる PGP-Me 誘導体の合成

<sup>2-2</sup> PGP-Me の逆合成解析

PGP-Me(1)の逆合成解析をスキーム 2-9 に示す。PGP-Me(1)はキラルニリン酸頭部と 分岐メチル基を有する疎水性部から構成されているため、当研究室ですでに合成法が 確立されていた二リン酸頭部(5)<sup>34</sup> とアーキオール(6)とのカップリング反応によって 合成可能であり、アーキオール(6)の不斉メチル基を有する疎水性側鎖は、グリセロー ル部位7とトシル体8をエーテル化反応によって連結させることで合成が可能である と考えた。続いてトシル体8が飽和イソプレノイド誘導体であることから、過去の飽 和イソプノイド鎖合成手法を参考にした。すなわち、イソプレンユニット 12 から容 易に調製可能なグリニャール試薬9とトシル体10およびイソペンチルグリニャール 試薬 11 をクロスカップリング反応によって繰り返し連結させて炭素鎖を伸長させる ことで効率的に合成可能であると考えた。更に本合成法の利点として、図 2-2 に示し た様に、非標識イソプレンユニットと重水素標識イソプレンユニットの連結させる順 番を変更させるだけで標識部位の変更が可能であるため、位置選択的に重水素標識を 導入した PGP-Me 誘導体が容易に作り分け可能となると考えた。一般的に膜の性質は、 わずかな不均一性によって大きく影響を受けることが知られているため、化学合成に より調製した脂質を用いて膜物性解析を行うためには、脂質の光学純度が 95% ee 以 上であることが望ましいとされている。そして、本合成法を用いて光学純度が95% ee 以上の PGP-Me を合成するためには、光学純度が 99% ee 以上のイソプレンユニット を用いて合成を進める必要がある。そのため、いかにして高光学純度のイソプレンユ ニットを調製するかが本合成において重要な課題といえる。



スキーム 2-9 PGP-Me(1)の逆合成解析



図 2-2 重水素標識体合成における本合成法の利点

2-3 高光学純度イソプレンユニットの合成

2-3-a イソプレンユニットの合成 (A ルート)

まずは、PGP-Me 全合成において鍵となる高光学純度(≧99% ee)イソプレンユニットの調製を行った。Feringa らは、不斉配位子 Josiphos を有する銅触媒存在下、α,β-不飽和チオエステルに対してメチルグリニャール試薬を作用させることで、高立体選択的に不斉メチル基を導入にすることに成功している(スキーム 2-10)<sup>35)</sup>。



スキーム 2-10 α,β-不飽和チオエステルへの立体選択的共役付加反応

本反応の生成物であるチオエステル 17 は、容易にイソプレンユニット 12 へと変換 可能であるため、本共役付加反応を鍵反応として、イソプレンユニット 12 の合成を 開始した(スキーム 2-11)。

まずは Minnaard らの報告<sup>36</sup>に従い、市販のエチレングリコール(18)およびブロモ酢酸(19)からそれぞれ 2 段階で調製したアルデヒド 20 とチオエステル 21 を Wittig 反応 により連結させ、共役付加前駆体である α,β-不飽和チオエステル 16 を得た。続いて、 Josiphos 配位子存在下、MeMgBr を作用させることでカルボニル基の β 位へメチル基 の導入を行った後に、チオエステル部を DIBAL によって還元することでアルコール 22 へと変換した。得られたアルコールに対して塩基性条件下での Bn 保護を試みたと ころ、TBDPS 基も脱保護されてしまい両ヒドロキシル基が Bn 保護された化合物が副 生した。そこで、酸性条件で Bn 保護が可能な TriBOT<sup>37)</sup>を用いたところ、TBDPS 基が 脱離することなく Bn 化が進行した。最後に TBAF により TBDPS 基を脱保護するこ とで、エチレングリコール(18)およびブロモ酢酸(19)から 7 段階でイソプレンユニッ ト 12 の調製に成功した。



スキーム 2-11 イソプレンユニットの合成 (A ルート)

2-3-b イソプレンユニットの光学純度確認

逆合成解析(2-2)の際に記載したように、本合成法を用いて膜物性測定に使用可能な 光学純度を有する PGP-Me を合成するためには、高光学純度(≧99% ee)のイソプレン ユニットが必要である。そこで、合成したイソプレンユニット 12 が望む光学純度を 有しているかを MaNP エステルへと変換することで確認した。MaNP エステル法は <sup>1</sup>H NMR を用いてアルコール類の絶対立体配置が決定可能な手法であり<sup>38)</sup>、ナフタレ ン部位の強い磁気異方性効果によって、δ および ε 位の立体配置をも区別することが できる強力な手法である<sup>39)</sup>。イソプレンユニット 12 に対して、(*R*)- MaNP acid を作 用させて MaNP エステル 23 へと変換後 (スキーム 2-12)、<sup>1</sup>H NMR 測定を行った(図 2-3)。<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて、各エナンチオマーの不斉メチル基由来であるダ ブレットピークの積分値の比から光学純度を算出したところ 88% ee という結果とな り、目標とする光学純度には達していことが明らかとなった。そのため、更なる精製 操作を行い光学純度を改善させる必要があった。



スキーム 2-12 MaNP エステル化反応



図 2-3 MaNP エステル 23 の<sup>1</sup>H NMR スペクトル

まずは、結晶化による光学純度の向上を行った。イソプレンユニット 12 および合成中間体 22 から誘導体化した Bz 体 24a, 25a、*p*-Br-Bz 体 24b, 25b およびカルバメート体 26 に対して結晶化を試みた (図 2-4)。種々結晶条件の検討を行ったが、アルキル鎖特有のフレキシブルな性質のためか結晶を得ることが困難であったため、結晶化によって光学純度を向上させることはできなかった。



図 2-4 結晶化による精製を試みた誘導体

続いて根岸らの報告を参考にして<sup>30-33</sup>、酵素を用いた光学分割によって光学純度の 向上を試みた。具体的には、容易に入手可能なリパーゼを利用したアルコールのアセ チル化反応を行うことにより、各エナンチオマー間の反応速度の違いを利用して速度 論的光学分割を行った。まずリパーゼ存在下 0℃にて、イソプレンユニット 12 に対し て酢酸ビニルを作用させたところ、望む立体配置であるイソプレンユニット 12 が優 先的にアセチル化されることが判明した (図 2-5a)。続いて、水酸化カリウムを用い て加水分解を行った後に、生じたアルコールを MaNP エステル化することで、<sup>1</sup>H NMR 測定から光学分割後のイソプレンユニットの光学純度確認を行った (図 2-5b)。その 結果 99% ee 以上であることが判明し、望む光学純度を有していることがわかった。 しかし一方で、光学分割の際の収率が 43%であり、収率の低さに課題が残った。本反 応の収率を向上させるべく、反応条件の検討(反応温度の上昇、反応時間の延長)を 試みたが、収率の向上に伴って光学純度が減少するという結果に終わり、光学純度 99% ee 以上のイソプレンユニットを高収率で得ることは困難であった。



図 2-4 (a) 酵素を用いた光学分割 (b) MαNP エステル(23)の<sup>1</sup>H NMR スペクトル(上:精製後 下:精製前)

2-4 イソプレンユニットの合成 (Bルート)

不斉銅触媒存在下における立体選択的メチル化を鍵反応とした合成経路(Aルート) では、イソプレンユニット 12 の光学純度向上に課題が残った。その原因として、不 斉メチル化反応における生成物がエナンチオマー混合物となるため、目的とする光学 純度を有するイソプレンユニット 12 を得るためには光学分割が必須となる点が挙げ られる。そこで新たな合成戦略として、不斉補助基を用いてメチル化を行うこととし た。(スキーム 2-13)本手法の利点としては、不斉メチル化の生成物がジアステレオ マー混合物となるためカラムクロマトグラフィー等によって分離が可能となるため、 容易に光学純度の向上が行えると考えた。

まず Heathcock らの報告に従い<sup>40)</sup>、塩基性条件下での γ-ブチロラクトン(15)の開環 続くヒドロキシル基の Bn 化を同時に行うことでカルボン酸 28 を得た。続いて、Suresh らの報告に従い<sup>41)</sup>、カルボン酸 28 に Evans 不斉補助基<sup>42)</sup>を縮合させ化合物 30 とし た後に、NaHMDS とヨウ化メチルを作用させてカルボニル炭素のα位にメチル基を 導入することでイミド 31 を得た。予想通り、本反応の副生成物であるジアステレオ マー(メチル基の立体配置: *R*)はカラムクロマトグラフィーによって容易に分離す ることが可能であった。最後に LiAlH<sub>4</sub> を用いてイミド部位の還元を行うことでイソ プレンユニット 12 へと変換し、同様に MαNP エステル法を用いて光学純度を見積も ったところ、99% ee 以上であることが確認できた(図 2-6)。以上をもって、γ-ブチロ ラクトン(15)から4 段階かつカラム精製のみで目的とする光学純度(≧99% ee)を有 するイソプレンユニット 12 を合成することに成功し、効率的な合成法を確立した。





図 2-6 本合成法で得たイソプレンユニット 12 の光学純度確認

## 2-4 立体選択的な PGP-Me の全合成

高光学純度を有するイソプレンユニット 12 の合成法を確立できたため、本イソプレンユニット 12 を基本構成単位として炭素鎖を伸長させる合成戦略に基づき、PGP-Me(1)の疎水性側鎖であるフィタノール(32)の合成に取り掛かった(スキーム 2-14)。

まずはイソプレンユニット12のトシル化を行いトシル体10へと変換した後に、銅 触媒存在下において市販の 2-ブロモイソペンタンから調製したイソペンチルグリニ ャール試薬11とのクロスカップリング反応43,44)に付すことで、炭素鎖が伸長された C10 ベンジルアルコール 33 を 85%の収率で得た。そして、BCl3 を用いた脱ベンジル 化、続くトシル化を行うことでトシル体35へと変換した後に、別途化合物10から2 段階で調製したグリニャール試薬9との2度目のクロスカップリング反応を行った。 グリニャール試薬9は不斉メチル基を持つなど複雑な構造を有しているため、本反応 が上手く進行しない可能性が懸念されたが、反応は問題なく進行し C15 ベンジルアル コール 36 を 82%の収率で得ることに成功した。化合物 36 に対して同様の手順(脱べ ンジル保護およびトシル化)を繰り返すことでトシル体 37 へと変換した後に、再び グリニャール試薬9との3度目のクロスカップリング反応、続く脱ベンジル化反応に 付すことでフィタノール(32)の合成を達成した。得られたフィタノール(32)の旋光度 を測定したところ、過去の報告 45)と非常に良い一致を示したことから、本合成により フィタノール(32)が高い光学純度で得られたことを確認した。以上の結果から、イソ プレンユニット 12 を基本構成単位として炭素鎖を伸長させる本合成戦略は、飽和イ ソプレノイド合成において有用な合成手法であると証明することができた。



高光学純度フィタノールの合成が完了したので、次に PGP-Me(1)の全合成に取り掛 かった (スキーム 2-15)。まずはフィタノールに対してトシル化を行いトシル体8と した後、別途調製したグリセロール部位 7<sup>34)</sup>とのエーテル化反応、続く脱ベンジル保 護を行うことでアーキオール(6)を得た。次に、PGP-Meの特徴的なキラル二リン酸頭 部を構築するために、当研究室ですでに確立されている方法<sup>34)</sup>を適用した。すなわち、 市販の(R)-solketal から8段階で別途調製したビスホスホネート(5)を、塩化ピバロイル を縮合剤として用いてアーキオール(6)に連結させ<sup>46,47)</sup>、生じたホスフェートをヨウ 素で酸化することで化合物 38 へと変換した。その後先行研究に従い、アダムス触媒 (PtO2)を用いた加水素分解条件に付すことで両ベンジル基の脱保護体を得た。しかし その際に、ベンゼン環が水素化された副生成物が10%程度得られるという結果となっ た。そのため、PtO2よりも穏やかな条件で脱保護が可能なパラジウムー炭素(Pd/C)や パールマン触媒(Pd(OH)2)での脱保護を検討したが、脱ベンジル化はうまく進行しなか った。最後に、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を用いてトリエチルアンモニウム塩の塩 変換を行うことで、PGP-Me(1)をナトリウム塩の状態で得ることに成功した。塩交換 の完了は、<sup>1</sup>H NMR におけるトリエチルアミン由来のピークの消失を基に確認した。 以上の結果より、市販品である γ-ブチロラクトン(15)から最長直線工程 20 段階、全収 率 3.9%で PGP-Me(1)の初の全合成を達成するとともに、重水素標識 PGP-Me 誘導体 の調製にも容易に適用可能な効率的合成法の確立に成功した。



#### 2-5 重水素標識 PGP-Me 誘導体の調製

## 2-5-a 重水素標識 PGP-Me 誘導体の設計

確立した合成法を基にして重水素標識 PGP-Me 誘導体の調製を行うにあたり、まず は重水素標識体の設計を行った。第1章で述べた様に、重水素固体 NMR 測定からは 重水素標識部位の運動性や配向に関する情報を取得することが可能であり、適切な位 置に重水素標識を導入することが重要となる。本研究は古細菌脂質に特有な分岐メチ ル基周辺における、①疎水性側鎖の構造解析、②バクテリオロドプシン(bR)の膜貫通 領域との相互作用解析を目的としているため、不斉メチル基およびその付け根のメチ ン水素を重水素へと置換した CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me を重水素標識体として設計した(図 2-7)。本標識体は、<sup>2</sup>H NMR 測定から C-D 結合および C-CD<sub>3</sub> 結合の運動性・配向情報が 同時に得られることから、メチル分岐位置の局所的な構造を詳細かつ効率的に解析可 能であると考えた。更に、疎水性側鎖の深度依存的な構造解析を行うため、3<sup>'</sup>位、7<sup>'</sup> 位および 11<sup>'</sup>位それぞれのメチル分岐位置に位置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)を調製することとした。



3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (2) : R<sup>1</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= D, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (3) : R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= D, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H 11'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (4) : R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= D

図 2-7 重水素標識 PGP-Me 誘導体(2-4)の設計

#### 2-5-b 重水素標識 PGP-Me 誘導体の逆合成解析

重水素標識 PGP-Me 誘導体の逆合成解析をスキーム 2-16 に示す。非標識 PGP-Me(1) と同様に (スキーム 2-9)、重水素標識 PGP-Me 誘導体(2-4)は、重水素標識アーキオー ル(39-41)に対してキラル二リン酸頭部をカップリングさせることで合成可能であり、 重水素標識アーキオール(39-41)は、グリセロール部位 42 と重水素標識イソプレノイ ド誘導体 43-45 をエーテル化反応によって連結させることで合成が可能である。続い てトシル体 43-45 の合成は、図 2-2 に示した様に、非標識イソプレンユニット 9-11 お よび重水素標識イソプレンユニット 48,49 をクロスカップリング反応によって繰り返 し連結させることで効率的に合成可能である。また標識体調製をより簡略化するため

に、非標識フィタニル鎖を有するグリセロール誘導体 42 については、生合成経路を 参考に合成することとした。すなわち、phytol(47)のオレフィン部を不斉水素添加反応 により3位の不斉メチル基を構築することで非標識フィタノールを調製し、続いてト シル体8へと誘導後、アルコール体46とのエーテル化反応によってグリセロール部 位 42 を簡便に合成できると考えた。





3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (2, R<sup>1</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= D, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H) 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (3, R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= D, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H) 11'-CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me (4, R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= D)

РМВО

3'-CD<sub>3</sub>,D-archaeol (39, R<sup>1</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= D, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H) 7'-CD<sub>3</sub>,D-archaeol (40, R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= D, R<sup>5</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= H) 11'- $CD_{3}$ , D-archaeol (41, R<sup>1</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup>= H, R<sup>3</sup>= CH<sub>3</sub>, R<sup>4</sup>= H, R<sup>5</sup>= CD<sub>3</sub>, R<sup>6</sup>= D)



スキーム 2-16 重水素標識 PGP-Me 誘導体 2-4 の逆合成解析

### 2-5-c 重水素標識イソプレンユニットの合成

まずは、重水素標識 PGP-Me 誘導体調製において重要となる高光学純度(≧99% ee)の 重水素標識イソプレンユニットの調製を行った(スキーム 2-17)。PGP-Me(1)合成中間 体であるカルボン酸28をヨウ化メチルを用いてメチルエステル体50へと変換した後 に、CH<sub>3</sub>OD 中で DBU を作用させることでカルボニル基のα位に重水素を導入し、化 合物 51 とした。本プロトン交換反応を2回行った後に、<sup>1</sup>H NMR におけるα位水素 の積分値の減衰度合から重水素標識率を算出したところ 93%であることが判明した。 次に、メチルエステル部の加水分解、続く生じたカルボン酸と不斉補助基の縮合反応 を行い化合物 53 とした後に、重水素標識ヨウ化メチル<sup>48)</sup>を用いてメチル化を行うこ とでイミド 54 へと変換した。最後に、LiAlH4 還元によって不斉補助基を除去するこ とで望む CD3.D 標識を有する重水素標識イソプレンユニット 55 を合成し、非標識イ ソプレンユニット12と同様に MaNP エステル化法<sup>38)</sup>を用いて光学純度の確認を行っ た。重水素標識イソプレンユニット 55 に対して(S)-および(R)-MaNP acid を作用させ て両ジアステレオマーを調製し、<sup>1</sup>H NMR におけるメチレンプロトン(H<sub>b</sub>)のピークを 比較した(図 2-8)。その結果、R体において観測された 1.30 ppm 付近のピークが S体 においては全く観測されなかったことから、重水素標識イソプレンユニット 55 の光 学純度は99% ee 以上であると決定した。以上をもって、カルボン酸28から6段階か つカラム精製のみで目的とする光学純度(≧99% ee)を有する重水素標識イソプレン ユニットを合成することに成功した。



スキーム 2-13 重水素標識イソプレンユニットの合成



図 2-7 MaNP エステル化法による重水素イソプレンユニットの光学純度の確認 (上) (*S*)-MaNP エステル、(下) (*R*)-MaNP エステルの<sup>1</sup>H NMR スペクトル 高光学純度を有する重水素標識イソプレンユニット(55)の合成が完了したので、次 に 3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)の合成に向け、3-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (56)の合成に取り掛かった (ス キーム 2-18)。まずは、アルコール 55 から 2 段階でブロモ体 58 を調製した後に、reflux 条件下で Mg を作用させることで重水素標識 Grignard 試薬へと変換した。続いてスキ ーム 2-14 で調製した C<sub>15</sub>トシル体 37 とのクロスカップリング反応を行うことで 3 位 に CD<sub>3</sub>,D 標識を有する C<sub>20</sub>ベンジルアルコール 59 とし、最後に BCl<sub>3</sub> を用いた脱ベン ジル化反応に付すことで 3-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (56)を合成した。



スキーム 2-14 3-CD3, D-phytanol (56)の合成

3 位重水素標識フィタノールの合成を完了したので、次に重水素標識アーキオール 合成のカップリング前駆体であるグリセロール部位 42 の合成を行った。逆合成解析 (スキーム 2-16) に示した様に、化合物 42 のフィタニル鎖は Phytol(47)の不斉水素添 加反応により調製することとした。Pfaltz らは不斉 Ir 触媒を用いたファルネソール(66) の高圧不斉水素添加反応を行っており、高立体選択的(> 99% ee)なメチル基の導入に 成功している (スキーム 2-19)<sup>49)</sup>。そこで本反応を phytol(47)へと適用し、フィタノー ル(32)の合成を試みた (スキーム 2-20)。Ir 触媒存在下、50 atm の水素圧下において 6 時間反応させたところ 84%収率で phytanol(32)を得ることに成功した。得られた phytanol(32)の光学純度を MaNP エステル化法 <sup>38)</sup>を用いて確認したところ 93.7% ee で あった(図 2-9)。既述したように、化学合成した脂質の膜物性解析を行うには光学純 度 95% ee 以上であることが求められるので、合成戦略の都合上、本水素添加反応の 選択性は 98% ee 以上であることが望ましい。そのため、本反応から得た phyatnol(32) の光学純度は重水素標識 PGP-Me 誘導体合成には不十分であった。

次に Sita の報告を参考にし<sup>50</sup>、不斉配位子として(s)-T-BINAP を有する Ru 触媒を 用いたアリルアルコールの水素添加反応を試みた<sup>51</sup>。MeOH 溶媒中 50 atm の水素圧 下において 24 時間反応させたところ、92%収率で phytanol(34)を得ることに成功した。 続いて MaNP エステル化法<sup>38)</sup>を用いて光学純度を確認したところ(図 2-9)98.5% ee であり、標識体合成に必要な純度を有していることを確認した。以上の結果から、Ru 触媒を用いた水素化反応により合成した phytanol(32)をグリセロール部位 42 の合成に 使用することとした。



スキーム 2-16 phytol(47)の不斉水素添加反応



図 2-8 MaNP エステル化法による光学純度の確認

不斉水素添加反応により得た phytanol(32)をトシル体 8 へと変換した後に、市販の (*R*)-solketal から 3 段階で別途調製したアルコール 46<sup>34)</sup>とのエーテル化反応に付すこ とで化合物 68 とした (スキーム 2-21)。最後に、酸性条件下においてトリチル基の除 去を行いカップリング前駆体 42 を 3 段階収率 79%で合成した。



スキーム 2-17 グリセロール部位 42 の合成

3-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (56)およびグリセロール部位 42 が合成出来たため、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe(2)の合成に取り掛かった(スキーム 2-22)。まずは 3-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (56)をト シル化して重水素標識イソプレノイド誘導体 43 へと変換した後に、NaH 存在下にお いてグリセロール部位 42 とのエーテル化を行うことで、2,3-ジフィタニルグリセロ骨 格を構築した。続いて、DDQ により Sn-1 位の PMB 基を除去することで 3 段階収率 78%で 3'-CD<sub>3</sub>,D-archaeol (39)の合成に成功した。最後に 3'-CD<sub>3</sub>,D-archaeol (39)に対し て、PGP-Me(1)の合成(スキーム 2-15)と同様の変換によりキラル二リン酸頭部構造 の構築を行うことで、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (2)の合成に成功した。リン酸頭部の脱ベンジ ル保護反応においては、Pd/C よりも強力な Pd Black を用いることで、Pt 触媒の際に 問題となったベンゼン環の水素化を伴うことなく目的の脱保護反応が可能であるこ とを見出した。以上の結果より、PGP-Me(1)全合成の際に確立した合成手法が、重水 素標識 PGP-Me 合成にも問題なく適用可能であることを明らかとした。



スキーム 2-22 3'-CD3, D-PGPMe (2)の合成

## 2-5-e 7'-CD3, D-PGPMe (3)および 11'-CD3, D-PGPMe (4)の合成

メチル分岐側鎖の複数点における構造情報の取得を行うため、同様の合成手法を用いて 7'-CD<sub>3</sub>, D-PGPMe (**3**)および 11'-CD<sub>3</sub>, D-PGPMe (**4**)の合成を行った。

まず 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (3)合成においては (スキーム 2-23)、ブロモ体 58 から調製し た重水素標識グリニャール試薬と C<sub>10</sub>トシル体 35 とのクロスカップリング反応を行 い化合物 61 とした後に、BCl<sub>3</sub>を用いた脱ベンジル化、続くトシル化を行い 3 段階収 率 74%で C<sub>15</sub> 重水素標識トシル体 62 へと変換した。その後、不斉グリニャール試薬 9 とのクロスカップリング反応に付すことで C<sub>20</sub>炭素鎖へと伸長し、最後に脱ベンジル 化反応に付すことで 7-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (60)を合成した。続いて、得られた 7-CD<sub>3</sub>,Dphytanol(60)に対して、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (2)の合成 (スキーム 2-22) と同様の変換を行 うことで、6 段階収率 22%で 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (3)の合成を達成した。



スキーム 2-13 7'-CD3, D-PGPMe (3)の合成

最後に、11'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (4)の合成を行った(スキーム 2-24)。まずは重水素標 識トシル体 57 とイソペンチルグリニャール試薬 11 とのクロスカップリング反応に よって側鎖末端を導入し、続く BCl<sub>3</sub>を用いた脱ベンジル化反応に付すことで重水素 標識 C<sub>10</sub> アルコール 64 を 2 段階収率 82%で得た。その後、同様の操作([1] トシル 化、[2] 銅触媒存在下における不斉グリニャール試薬 9 とのクロスカップリング反 応、[3] 脱 Bn 保護 )を 2 回繰り返し行い炭素鎖を順次伸長させていくことで、11-CD<sub>3</sub>,D-phytanol(63)を合成した。その後は 3'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe (2)の合成(スキーム 2-22)と同様の変換を行うことで、6 段階収率 16%で 11'-CD<sub>3</sub>,D-PGPMe(4)の合成を達 成した。



スキーム 2-20 11'-CD3, D-PGPMe (4)の合成

以上のように、図 2-2 に示した合成戦略通り、非標識イソプレンユニットと重水素 標識イソプレンユニットの連結させる順番を変更させるだけで、3'位、7'位および 11' 位それぞれのメチル分岐位置に CD<sub>3</sub>,D 標識を導入した 3 種類の重水素標識 PGP-Me 誘導体(2-4)を効率的に調製することに成功した。以上の結果から、イソプレンユニッ トを連結させて炭素鎖を伸長させる本本合成手法は重水素標識を導入した古細菌脂 質の調製においても有用な合成手法である事が判明した。 参考文献

- 1) Heathcock, C. H.; Finkelstein, B. L.; Jarvi, E. T.; Radel, P. A.; Hadley, C. R. J. Org. Chem. 1988, 53, 1922.
- 2) Stewart, L. C.; Kates, M. Chem. Phys. Lipids 1989, 50, 23.
- 3) Eguchi, T.; Terachi, T.; Kakimura, K. Tetrahedron Lett. 1993, 34, 2175.
- 4) Eguchi, T.; Arakawa, K.; Terachi, T.; Kakimura, K. J. Org. Chem. 1997, 62, 1924.
- 5) Eguchi, T.; Kano. H.; Arakawa, K.; Kakimura, K. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1997, 70, 2545.
- 6) Eguchi, T.; Ibaragi. K.; Kakimura, K. J. Org. Chem. 1998, 63, 2689.
- 7) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakimura, K. Bull. Chem. Soc. Jpn. 1998, 71, 2419.
- 8) Mercier, C.; Chabardes, P. Pure Appl. Chem. 1994, 66, 1509.
- 9) Doed, P.; Hershline, R.; Ham, S. W.; Naganathan, S. Nat. Prod. Rep. 1994, 11, 251.
- Aldrich, J. R.; Oliver, J. E.; Lusby, W. R.; Kochansky, J. P.; Borges, M. J. J. Chem. Ecol. 1994, 20, 1103.
- 11) Nakamura, Y.; Mori, K. Eur. J. Org. Chem. 1999, 2175.
- 12) Minale, L. In Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives; Scheuer, P. J., Ed.; Academic Press. 1978, 1, 175.
- Sankaranaraynan, S.; Sharma, A.; Chattopadhyay, S. *Tetrahedron asymmetry* 2002, 13, 1373.
- 14) Ireland, R. E.; Willand, A. K. Tetrahedron Lett. 1975, 16, 3975.
- 15) Heathcock, C. H.; Finkelstein, B. L.; Jarvi, E, T,; Radel, P. A.; Hadley, C. R. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1922.
- van Summeren, R. P.; Reijmer, S. J. W.; Feringa, B. L.; Minnaard, A. J. Chem. Commun. 2005, 1387.
- 17) Feringa, B. L.; Pineschi, M.; Arnold, L. A.; Imbos, R.; De Vries, A. H. M. Angew Chem. Int. Ed. 1997, 36, 2620.
- 18) Jagt, R. B. C.; Imbos, R.; Naasz, R.; Minnaard, A. J.; Feringa, B. L. *Isr. J. Chem.* **2001**, *41*, 221.
- 19) Li, N. S.; Piccirilli, J. A. Tetrahedron 2013, 69, 9633.
- 20) Li, N. S.; Scharf, L.; Adams, E. J. Piccirilli, J. A. J. Org. Chem. 2013, 78, 5970.
- 21) Mancuso, C. A.; Odham, G.; Westerdahl, G.; Reeve, J. N.; White, D. C. *J. Lipid Res.* 1985, 26, 1120.
- 22) Still, W. C.; Darst, K. P. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7385.
- 23) Brown, H. C.; Negishi, E. J. Am. Chem. Soc. 1967, 89, 5477.
- 24) Cox, P. J.; Simpkins, N. S. Tetrahedron Asymm. 1991, 2, 1.

- 25) Berkowitz, W. F.; Wu. Y. J. Org. Chem. 1997, 62, 1536.
- 26) Berkowitz, W. F.; Wu. Y. Tetrahedron Lett. 1997, 38, 8141.
- 27) Kondakov, D. Y.; Negishi, E. J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 10771.
- 28) Huo, S.; Shi, J.; Negishi, E. Angew Chem. Int. Ed. 2002, 41, 2141.
- 29) Negishi, E. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 6738.
- 30) Xu, S.; Lee. C. T.; Wang, G.; Negishi, E. Chem Asian J. 2013, 8, 1829.
- 31) Xu, S.; Oda, A.; Kamada, H.; Negishi, E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2014, 111, 8368.
- 32) Xu, S.; Oda, A.; Negishi, E. Chem Eur. J. 2014, 20, 16060.
- 33) Matsueda, Y.; Xu, S.; Negishi, E. Tetrahedron Lett. 2015, 56, 3346.
- 34) Cui, J.; Kawatake, S.; Umegawa, U.; Lethu, S.; Yamagami, M.; Matsuoka, S.; Sato, F.; Matsumori, N.; Murata, M. Org. Biomol. Chem. 2015, 13, 10279.
- 35) Mazery, R. D.; Pullez, M.; López, F.; Harutyunyan, S. R.; Minnaard, A. J.; Feringa, B. L J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 9966.
- 36) Horst, B.; Feringa, B. L.; Minnaard, A. J. Org. Lett. 2007, 9, 3013.
- 37) Yamada, K.; Fujita, H.; Kunishima, M. Org. Lett. 2012, 14, 5026.
- 38) Kasai, Y.; Sugio, A.; Sekiguchi, S.; Kuwahara, S.; Mathumoto, T.; Watanabe, M.; Ichikawa, A.; Harada, N. *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 1811.
- 39) Xu, S.; Oda, A.; Kamada, H.; Negishi, E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014, 111, 8368.
- 40) Szczepankiewicz, B. G.; Heathcock, C H. tetrahedron 1997, 53, 8853.
- 41) Chakraborty, T. K.; Suresh, V. R. Tetrahedron: Lett 1998, 39, 7775.
- 42) Evans, D. A., Ennis, M. D., Mathre, D. J. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104, 1737.
- 43) Terao, J.; Todo, H.; Begum, S. A.; Kuniyasu, H.; Kambe, N. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 2086.
- 44) Lethu, S.; Matsuoka, S.; Murata, M. Org. Lett. 2014, 16, 844.
- 45) Kates, M.; Joo, C. N.; Palameta, B.; Shier, T. Biochemistry 1967, 6, 3329.
- 46) Garegg, P. J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, R.; Stroömberg, R.; Henrichson, C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4051
- 47) Kraszewski, A.; Stawinski, J. Pure Appl. Chem. 2007, 79, 2217.
- 48) Cheng, Y.; Ding, W. H.; Long, Q.; Zhao, M.; Yang, J.; Li, X. Q. J. Label Compd. Radiopharm. 2015, 58, 355
- 49) Wang, A.; Wüstenberg, B.; Pfaltz, A. Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 2298.
- 50) Sita. L. S. J. Org. Chem. 1993, 58, 5285.
- 51) Takaya, H.; Ohta, T.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S.; Inoue, S.; Kasahara, I.; Noyori, R. J. J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 1596.

第三章 重水素固体 NMR を基盤とした古細菌脂質 PGP-Me の構造解析

3-1 重水素固体 NMR を用いた古細菌脂質膜の物性評価

メチル分岐鎖を有する脂質は、その特徴的な構造から物理化学的性質にも興味がもた れ、これまでに多くの膜物性解析研究がなされてきた。その結果、幅広い温度領域に おいて相転移を示さず、また、高塩濃度耐性を有する二重膜を形成することが明らか とされている。しかしこれらの研究では、脂質膜全体としての物性を評価したに過ぎ ず、メチル分岐鎖の詳細な解析を行うまでには至っていない。これらの特徴的な膜物 性に起因する構造要因を明らかとする上では、メチル分岐鎖の局所的な情報を得るこ とが求められる。重水素固体 NMR 測定からは重水素標識部位の局所的な運動性情報 を得ることができ、これを基に二重膜の相状態を見積もることが可能である。そこで 本節では、第2節で合成を達成した位置および立体選択的重水素標識 PGP-Me 誘導体 を用いて、分岐メチル基周辺の局所的な運動性情報から膜物性の評価を行った。

## 3-1-a 古細菌脂質二重膜の熱安定性評価

一般的に、分岐メチル基が膜物性に与える影響としては、膜の流動性の増大が挙げ られる<sup>1-5)</sup>。実際に、DSC, X線および NMR を用いた過去の研究において、疎水性側 鎖に分岐メチル基を有する脂質で構成された二重膜は、直鎖の飽和脂肪酸が結合した 脂質の二重膜と比較して相転移温度が低く、フィタニル鎖を有する古細菌脂質膜は -120~120℃において液晶相状態(La相)を保持していることが明らかとされている <sup>6-10)</sup>。脂質二重膜の温度依存的な相状態の変化は、脂質分子の疎水性側鎖間のパッキ ングの変化によって説明される。一般的な直鎖脂肪酸結合リン脂質の場合は、側鎖の 配座として anti 配座がエネルギー的に有利であるため、相転移温度(Tm)以下において は側鎖間に密なパッキングが形成され、流動性の低いゲル相状態となる。しかし、温 度の上昇に伴い gauche 配座の割合が増加していくにつれて側鎖間の密なパッキング が失われ、その結果として液晶相への転移が起るとされている。一方、メチル分岐側 鎖では、anti 配座においても主鎖と分岐メチル基の間に立体反発が生じることから、 anti および gauche 配座間のエネルギー差が大幅に減少する。その結果、容易に配座交 換が起きることで側鎖間の密なパッキングが阻害され、膜の流動性の増大が引き起こ される。そこで、古細菌に特有の分岐メチル鎖の物性を原子レベルにおいて精確に解 析するために、PGP-Me 側鎖の温度依存的な運動性変化を重水素固体 NMR 測定によ って観測し、真核生物膜脂質である 1,2-dimyrystoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC)との比較を行った。炭素鎖長が PGP-Me と同じ直鎖アルキル鎖(炭素数 16) を有する 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine(DPPC)は相転移温度が高く (*Tm*=41°)、二重膜状態における運動性を幅広い温度範囲において測定することが困難 であった。そのため、相転移温度の低い炭素数 14 の DMPC (*Tm*=24°)を用いて、PGP-Me の四極子分裂幅(Δv)との比較を行った。更に、各不斉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 PGP-Me 誘導体(36-38)を用いることで、分岐メチル鎖内 での深度依存的な解析も行った。

まず、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)および 4',4'-D<sub>2</sub>-DMPC を用いて 多重層ベシクル(MLV, multilamellar vesicles)を作成し、様々な温度条件下において<sup>2</sup>HNMR スペクトルを測定 した (図 3-1a,b)。DMPC の標識位置は、<sup>2</sup>H NMR 測定結果を 3'-CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me(2)と直 接的に比較できるよう、グリセロール骨格からの自由回転可能な結合数を揃える目的 で4位を選択した。図 3-1a に示した様に、3'-CD3, D-PGP-Me(2)の<sup>2</sup>HNMR スペクトル は2組のダブレットから構成されており、外側のブロードなものがメチン重水素(D) 由来のダブレットであり、内側のものがメチル基(CD3)由来である。また、0 ppm に観 測される等方的なピークは、サンプル調製時に形成されたミセル由来であると帰属し た。3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)と4',4'-D<sub>2</sub>-DMPCの測定結果を比較すると、低温領域におい て顕著な違いが観測された。PGP-Me 二重膜においては 0~60℃ においてシグナルが 観測されたのに対して、DMPC 二重膜では 10℃ 以下においてピークが消失した。脂 質二重膜を用いた<sup>2</sup>HNMRにおいては、脂質側鎖の運動性が低下し、比較的流動性の 低いゲル相をとった際にはシグナルが観測されないことが知られている<sup>11)</sup>。すなわち 本測定結果は、DPPC 二重膜は 10℃ 以下においてゲル相へと転移しているのに対し て、PGP-Me 二重膜は 0℃ のような低温領域においても液晶相状態を保持しているこ とを示している。古細菌の中には低温環境(0℃付近)においても生育可能な種が存 在しており、分岐メチル鎖はそれらの古細菌にとっては必須の構造であるといえる。

次に、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)および 4',4'-D<sub>2</sub>-DMPC の各温度における四極子分裂幅の 値の比較を行った(図 3-1d)。3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)の<sup>2</sup>H NMR スペクトルにおいては、 そのシグナルの形状から非対称性を有することが示唆されたため、過去の報告を参考 にしてスペクトルフィッティングを行い、異方性パラメータ(η)を考慮して各化学シフ ト値( $\delta_{xx}, \delta_{yy}, \delta_{zx}$ )を算出することで分裂幅を計算した(図 3-1c)<sup>12,13)</sup>。その結果、3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)の分裂幅は、メチン重水素(D)およびメチル基(CD<sub>3</sub>)共に 0~60°C にお いてほとんど変化していないことから、フィタニル鎖 3'位の流動性が本測定温度領域 においてはほとんど変化しないことが明らかとなった。一方、DMPC 膜では、温度の 上昇に伴って四極子分裂幅の値が顕著に減少したことから、膜の流動性の上昇(側鎖 の運動性の上昇)が示唆された。これらの測定結果から、分岐メチル基は脂質二重膜 が幅広い温度領域において流動性(液晶相状態)を保持する上で重要な役割を担って



図 3-1 (a) 3'-CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me(2)の<sup>2</sup>H NMR スペクトル。外側のダブレットは D、内側の ダブレットは CD<sub>3</sub> 由来。0 ppm のピークはミセル由来であると帰属した。(b) 4', 4'-D<sub>2</sub>-

DMPC の<sup>2</sup>H NMR スペクトル。(c) NMR 測定(30°C, 黒線)およびシミュレーション (赤線)により得た<sup>2</sup>H NMR スペクトル。シミュレーションから異方性パラメーター (η)および、各化学シフト値( $\delta_{xx}, \delta_{yy}, \delta_{zz}$ ,)を算出し、各測定温度における分裂幅を計算 した( $\delta_{\perp}=(\delta_{xx},+\delta_{yy})/2$ )。(d)四極子分裂( $\Delta v$ )の温度依存性。\*DMPC の相転移温度(*Tm*)は 24°C であるため、20°C での測定では液晶相とゲル相が共存している可能性がある。

### 3-1-b 古細菌脂質膜の高塩濃度安定性評価

古細菌の一種である高度好塩菌は、飽和濃度近くの食塩を含む高塩濃度環境といった、真正細菌や真核生物では生息できない極限環境下で生育することが可能である。 高度好塩菌がその様な極限環境で生息する上では、古細菌に特有の分岐メチル鎖構造 が重要な役割を担っていると考えられる。実際に過去の研究において、 Carboxyfluorescein (CF)を内包したリポソームを用いた蛍光色素の流出実験から、高 NaCl 濃度条件下においてリポソームが二重膜構造を保持する上で分岐メチル基が重 要であることが示されている<sup>14)</sup>。そこで本研究では、<sup>2</sup>HNMRを用いて分岐メチル基 が脂質二重膜の塩濃度耐性に与える影響を観測することとした。

高度好塩菌 Halobacterium salinarium は、高 NaCl 濃度環境下において生育し、その 細胞膜内外には NaCl 濃度勾配を有することが知られている<sup>15)</sup>。上述の熱安定性評価 (3-1-a)に用いた膜サンプルは、MLV 調製の際に 0.1M NaCl を用いて再水和を行ってお り、膜内外における NaCl 濃度勾配はほとんど存在していない。そこで、実際の環境 を模した条件下で測定を行うため、5.0M NaCl を用いて再水和を行い膜内外に NaCl 濃 度勾配を有する MLV を調製し<sup>2</sup>H NMR 測定に使用した。0.1 M, 5.0 M NaCl 条件下に おける 3'-CD3, D-PGP-Me(2)および 4', 4'-D2-DMPC の測定結果を図 3-4 にまとめた。 PGP-Me 膜では 5.0M NaCl 条件下においても 0.1M NaCl 条件下とほぼ同様のスペクト ル形状であったのに対して(図 3-4a)、5.0M NaCl条件下における DMPC 膜では顕著 にセンターピークの強度が強くなった(図 3-4b)。<sup>2</sup>H NMR における 0 ppm のセンタ ーピークはミセル等の等方的な成分に由来するため、DMPC では 5.0M NaCl 条件下に おいて平面二重膜構造が形成されていないことが確認された。すなわち、本測定結果 から分岐メチル側鎖が脂質二重膜の高塩濃度耐性に大きく寄与していることが明ら かとなった。5.0M NaCl 条件において PGP-Me および DMPC 二重膜での四極子分裂幅 が 0.1M NaCl 条件下よりも増加している原因は以下の様に説明される。一般的に脂質 二重膜中におけるリン脂質には、側鎖間のファンデルワールス力による引き合う力と、 電荷を帯びたリン酸頭部間のクーロン力による静電的な反発の両方が生じている。し かし高 NaCl 濃度条件下では、リン酸頭部の電荷が Na<sup>+</sup>および Cl<sup>-</sup>によって相殺される

ことで、リン酸頭部間のクーロン力による反発が小さくなる。そのため、疎水性側鎖 間の引き合う力が相対的に強くなり、リン脂質同士がより密にパッキングされること になる。その結果として側鎖の運動性が抑えられ、四極子分裂幅の増加に繋がってい ると推定される。



図 3-4 0.1 M および 5.0 M NaCl 条件下における <sup>2</sup>H NMR スペクトル (a) 3'-CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me, (b) 4', 4'-D<sub>2</sub>-DMPC (上段: 50°C,中段: 40°C,下段: 30°C) 5.0M NaCl 条件下における DMPC 膜では、ミセル等の等方的な成分に由来するセンターピークの強度が顕著に強く観測され、平面二重膜が形成していないことが確認された。

次に、5.0M NaCl 条件下における PGP-Me 二重膜の熱安定性を確認すべく、0~60°C において測定を行った(図 3-5)。その結果、60°C においてセンターピークの強度が強くなり、また 2.3 kHz の分裂幅を有する新たなダブレットが観測された。そのため、5.0M NaCl かつ 60°C では二重膜(ラメラ)構造とは異なる相状態が混在していることが示唆された。過去に行われた X 線小角散乱(LAXS, Low Angle X-ray Scattering)を用いた研究によると<sup>16</sup>、高度好塩菌 *Halobacterium Halobium* の細胞膜から抽出した極性脂質混合物(約 80%が PGP-Me)から構成される二重膜では、4.0M NaCl 条件下かつ 60°C 以上になるとへキサゴナル(H<sub>II</sub>)相およびキュービック相が形成されることが報

告されている。すなわち、本測定における 60°C での <sup>2</sup>H NMR スペクトル形状の変化 も同様に、ヘキサゴナル(H<sub>π</sub>)相およびキュービック相が形成されたためであると考え られる。よって、本測定結果から、PGP-Me 純膜は、5.0M NaCl 条件下においては 50°C まで二重膜(ラメラ)構造を保持できることが明らかとなった。



図 3-5 (a) 5.0M NaCl 条件下での 3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me(2)の <sup>2</sup>H NMR スペクトル。(b) NMR 測定 (30°C, 黒線)のスペクトルフィッティング結果 (赤線)。シミュレーションから 異方性パラメーター(η)および、各化学シフト値( $\delta_{xx}, \delta_{yy}, \delta_{zz}$ )を算出し、各測定温度に おける分裂幅を計算した( $\delta_{\perp=}(\delta_{xx}, +\delta_{yy})/2$ )。

本節では、位置および立体選択的重水素標識 PGP-Me を用いた重水素固体 NMR に より得た分裂幅から分岐メチル基周辺の運動性解析を行い、膜物性の評価を行った。 その結果、古細菌脂質に特有のメチル分岐側鎖は、脂質二重膜が 0~60°C にわたる幅 広い温度範囲において液晶相状態を保持し、また高 NaCl 条件下において二重膜構造 を形成する上で重要な役割を担っていることを、局所的な運動性の観点から改めて明 らかにした。古細菌の中には低温環境で生育可能なものや、高度好塩菌の様に生育に 飽和濃度近くの NaCl 濃度を必要とするなどの様々な種が存在するため、古細菌がこ れらの幅広い環境に適応するために、細胞膜が分岐メチル側鎖を有するリン脂質で構 成されているのではないかと推察される。 3-2 重水素固体 NMR を用いたメチル分岐側鎖の構造解析

前節では<sup>2</sup>H NMR を用いて、分岐メチル基が脂質二重膜の熱安定性や高塩濃度耐性 に与える影響を観測し、古細菌膜脂質が幅広い温度範囲において液晶相状態を保持し、 また高 NaCl 条件下において二重膜構造を形成する上で分岐メチル基が重要な役割を 担っていることを明らかとした。そこで本節では、これらの特徴的な膜物性を引き起 こす分子的要因を分子レベルで詳細に明らかとするため、重水素標識 PGP-Me 誘導体 を用いた<sup>2</sup>H NMR 測定の結果を基に、脂質二重膜中における PGP-Me 分岐メチル鎖

(フィタニル鎖)の配向解析を行った。図 3-6a-c には各重水素標識 PGP-Me 誘導体の 30°C における <sup>2</sup>H NMR スペクトルを示している。7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (3)と 11'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me (4)に対してもスペクトルフィッティングを行うことで分裂幅を算出し(図 3-6d, e)、得られた値を用いて各メチル分岐位置での C-D 結合および C-CD<sub>3</sub> 結合のオー ダーパラメーター*S*<sub>CD(D)</sub>, *S*<sub>CD(CD3)</sub>を算出した(表 3-1)。



Carbon Number	η <sup>a]</sup>	CD <sub>3</sub>			D		
		δ <sub>xx</sub>	δ <sub>yy</sub>	δ <sub>zz</sub>	δ <sub>xx</sub>	δ <sub>yy</sub>	δ <sub>zz</sub>
7'	0.04	5.2	5.6	10.8	19.9	21.6	41.6
11'	0	3.0	3.0	6.0	14.8	14.8	29.6
					a] Asyn	nmetric p	parameter

図 3-6 (a) 3'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me, (b) 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me, (c) 11'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me の 30℃ にお ける <sup>2</sup>H NMR スペクトル。(d) 7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me および (e) 11'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me のスペ クトルフィッティング結果 (赤線)。異方性パラメーター(η)および、各化学シフト値 (δ<sub>xx</sub>, δ<sub>yy</sub>, δ<sub>zz</sub>,)を算出し、各測定温度における分裂幅を計算した(δ<sub>⊥</sub>=(δ<sub>xx</sub>,+δ<sub>yy</sub>)/2)。

Carbon	Splittin (δ <sub>xx</sub> +δ <sub>y</sub>	g value <sub>y</sub> )/2 kHz	Order Parameter (S <sub>CD</sub> ) <sup>1)</sup>		
Number	CD3	D	CD <sub>3</sub> D		
3'	6.2	18.8	0.049 0.147		
7'	5.4	20.8	0.042 0.163		
11'	3.0	14.8	0.024 0.116		

表 3-1 C-D, C-CD3 結合のオーダーパラメーター(ScD))

序論でも述べたように、これまでに PGP-Meのメチ分岐側鎖に関する詳細な情報は ほとんど得られていない。そこで、PGP-Meと同じ炭素数(C20)の分岐メチル鎖を有し ており、これまでに膜厚などの膜物性に関する情報が実験的および計算科学的手法を 用いて多く得られている 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3- phosphatidylcholine (DPhPC)に着 目した<sup>14,17,18)</sup>。まず過去のX線回折結果によると、DPhPC液晶相の膜厚(DHH:リン 酸頭部間の距離)は 36.4 Å であると報告されており<sup>19)</sup>、これは PGP-Me や DPhPC と 同じ炭素鎖長(炭素数16)の直鎖アルキル鎖を有する DPPC の膜厚 37.8 Å<sup>20)</sup>よりも僅 かに小さい値であることがわかっている。また、篠田らの MD 計算結果によっても<sup>18)</sup>、 DPhPC の膜厚 ( $D_{PP}$  = 38.2Å,  $D_{PP}$ : MD 計算におけるリン原子間距離) は DPPC の膜厚 (*D*<sub>PP</sub> = 39.6 Å)とほぼ同程度の厚さ(DPhPC 膜が DPPC 膜よりも 3.5%程薄い)であ ることが裏付けられている。そのため、PGP-Meも DPPC と同程度の膜厚を有するこ とが予想された。しかし、PGP-Me 膜ではこれまでに実験的に膜厚が測定された例は 存在しないため、過去に飽和脂肪酸結合型リン脂質の直鎖アルキル鎖において確立さ れた、<sup>2</sup>HNMR 測定から得た脂質側鎖のオーダーパラメーター(Scn)から脂質二重膜の 疎水性領域の厚さを算出する手法<sup>21)</sup>を適用して、PGP-Me および DPPC の膜厚を計算 し比較することとした。PGP-Meの各メチル分岐位置での 30℃ における C-D 結合の

<sup>1)</sup>  $S_{CD} = \Delta v / \Delta v_0 \ (\Delta v_0 = 127.5 \text{ kHz})$ 

オーダーパラメーター(ScDD)は表 3-1 にまとめた様に、3'位では 0.147、7'位では 0.163、 11'位では 0.116 となった。一方、液晶相状態の DPPC におけるオーダーパラメーター (Scp)は、Seelig らの報告<sup>22)</sup>を参考にすると、3位では0.20、7位では0.20、11位では 0.16 程度であると算出できる。これらの値を基に計算した PGP-Me および DPPC の部 分的な膜厚を比較すると、3'位付近では約13%、7'位付近では約9%、11'位付近では 約 21%も PGP-Me 二重膜が DPPC 二重膜よりも薄いという結果となり、PGP-Me は DPPC と比較して顕著に薄い二重膜を形成することが示唆された。この予想に反する 結果から、脂質二重膜中における PGP-Me のメチル分岐側鎖の構造(配向)は、DPPC の様な飽和脂肪酸結合型リン脂質の直鎖アルキル鎖において前提とされている『直鎖 構造』(図 3-7a、膜法線に対する C-D 結合の配向が 90°となる)とは異なることが推 察された。そこで、脂質二重膜中におけるメチル分岐側鎖の新たな構造として『折れ 曲がり構造』(図 3-7b)を着想した。篠田らの MD 計算により、分岐メチル鎖におい ては分岐メチル基周辺で顕著に gauche 配座の割合が増加することが示唆されている が(図 1-10a)<sup>18)</sup>、本構造では主鎖の特定の C-C 結合が膜法線と平行となるため、膜 法線に対する C-D および C-CD3 結合の配向が、anti 配座または gauche 配座のいずれ においても変化しないと推察される。そのため、3'-CD3.D-PGP-Me(36)の<sup>2</sup>H NMR 測 定で観測された、オーダーパラメーター(分裂幅)が温度に関わらずほぼ一定となっ た結果(図 3-1d)を上手く説明することができ、測定結果と矛盾しない。



図 3-7 メチル分岐鎖における (a)直鎖構造および (b)折れ曲がり構造の模式図。
3-3 分子動力学(MD)計算を用いたメチル分岐側鎖の構造解析

3-3-a 各メチル分岐位置における配座解析

3-2節では<sup>2</sup>H NMR 測定から得たオーダーパラメーターを基に配座解析を行うこと で、メチル分岐鎖(フィタニル鎖)が脂質二重膜中において、直鎖アルキル側鎖に一 般的な『直鎖構造』(図 3-7a)ではなく、『折れ曲がり構造』(図 3-7b)を有している 可能性を示した。そこで本節では、メチル分岐鎖(フィタニル鎖)の構造をより詳細 に解析するために、分子動力学(MD)計算を用いた構造解析を行った。なお、MD 計算 は、名古屋大学大学院工学研究科の篠田渉准教授に行って頂いた。

まずは、MD 計算結果における PGP-Me 原子座標から、各メチル分岐位置での C-D 結合および C-CD3 結合と膜法線のなす角度を計算することでオーダーパラメーター *ScD(D)*, *ScD(CD3)* およびそれらの比 *ScD(CD3)*/*ScD(D)*を算出し、<sup>2</sup>H NMR 測定結果との比較 を行った(表 3-2)。MD 計算から得た各オーダーパラメーターおよびそれらの比は、 <sup>2</sup>H NMR 測定結果とよい一致を示したことから、今回用いた計算条件<sup>23)</sup>は実験系(実 際の PGP-Me 二重膜環境)を良く再現していることが確認できた。

表 3-2 MD 計算および<sup>2</sup>H NMR 測定から得た C-D, C-CD<sub>3</sub> 結合のオーダーパラメータ -(*Sco*)およびそれらの比 *Sco(cD3)*/*S(cD)* 

MD計算				<sup>2</sup> H NMR測定		
Carbon Number	Order Parameter (S <sub>CD</sub> )		S	Order Parameter (S <sub>CD</sub> )		e /e
	CD3	D		CD <sub>3</sub>	D	SCD(CD3)/SCD(D)
3'	0.048	0.140	0.34	0.049	0.147	0.33
7'	0.044	0.170	0.26	0.042	0.163	0.26
11'	0.022	0.115	0.19	0.024	0.116	0.20

次に、各メチル分岐位置における配座解析を行った。脂質側鎖のオーダーパラメー ター(ScD)は膜法線に対する配向に大きく依存しており、直鎖アルキル鎖において観測 される温度上昇に伴うオーダー(四極子分裂幅)の減少は(図 3-1d)、anti および gauche 配座間の交換によるものとされている<sup>11, 24, 25)</sup>。一般にメチル分岐系における gauche<sup>-</sup> 配座は、立体障害の影響(図 3-8a)により anti 配座および gauche<sup>+</sup> 配座よりもエネル ギー的に不利となるため、その存在確率はかなり低いとされている。そこで、脂質二 重膜中におけるメチル分岐鎖の配座を詳細に解析するため、各メチル分岐位置周辺で の二面角の分布を計算し、それを基に回転異性体の存在比率を算出した。(図 3-8b, c)。 その結果、予想に反してすべてのメチル分岐位置において gauche<sup>-</sup> 配座が存在してお り、特に3'位ではgauche<sup>+</sup> 配座よりも多く存在していることが明らかとなった。3'位 においてgauche<sup>-</sup> 配座が増加する明確な要因は定かではないが、脂質側鎖間のパッキ ングの影響ではないかと推察される。すなわち、gauche<sup>-</sup> 配座を取った際にはメチル 分岐側鎖同士のパッキングが増加し、その結果、脂質二重膜としての安定化効果が得 られるため、gauche<sup>-</sup> 配座を取ることで生じるエネルギーロスを補うことができるの ではないかと考えた。

(a)



図 3-8 (a) エーテル酸素-C5'位の Newman 投影式。(b) *Sn*-3 鎖の各メチル分岐位置周 辺での二面角分布 (赤:3'位、青:7'位、緑:11'位)。(c) MD 計算から算出した回転 異性体の比率。3'位では、エネルギー的に不利である *gauche*- 配座が *gauche*<sup>+</sup> 配座よ りも多く存在している。

## 3-3-b オーダーパラメーターの比 (ScD(CD3)/SCD(D)) を用いた配向解析

続いて、C-D 結合と C-CD<sub>3</sub> 結合のオーダーパラメーターの比  $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ を用い て、脂質二重膜中での分岐メチル鎖 (フィタニル鎖)の詳細な配向解析を試みた。今 回算出したオーダーパラメーター $S_{CD}$ は、C-D 結合と膜法線とのなす角度  $\theta$  のみなら ず分子回転軸のゆらぎ (分子全体のオーダーパラメーター:  $S_{mol}$ )にも依存する。しか し、各結合に対して実験的に得られる分裂幅は 1 つであるため、 $\theta$  および  $S_{mol}$ の両方 を決定することができない。そこで、C-D 結合と C-CD<sub>3</sub> 結合のオーダーパラメーター の比  $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ をとることで  $S_{CD}$ に対する  $S_{mol}$ の寄与を除去することができ、膜法 線とのなす角度  $\theta$  のみに依存する値として取り扱うことが可能となる。なお、C-D 結 合および C-CD<sub>3</sub> 結合はそれぞれ同じ炭素 (C3', C7', C11')に結合していることから、 各メチル分岐位置における両結合の  $S_{mol}$ は同じであると仮定している。

まず、『直鎖構造』および『折れ曲がり構造』での、各配座 (anti, gauche<sup>+</sup>, gauche<sup>-</sup>) における C-D, C-CD3 結合の膜法線に対する配向を計算し、その際に予測されるオー ダーパラメーターScD(D), ScD(CD3)を算出した(図 3-9a,b)。『折れ曲がり構造』では、配 座が変化しても C-D 結合・C-CD3 結合ともに膜法線に対する配向が変わらないため、 オーダーパラメーターの値も変化しない。そして、図 3-8c に示した各回転配座の比率 およびメチル基特有の ScD(CD3)のスケーリング効果(ScD3, 図 3-9c)を考慮し、メチル分 岐鎖が『直鎖構造』および『折れ曲がり構造』を取った際に、各メチル分岐位置(C3', C7', C11')で予測される ScD(CD3)/ScD(D)をそれぞれ算出した(図 3-9d)。一般的に、CD3 基は C-C 結合軸周りの早い回転運動によって平均化されるため C-D 結合と同等であ ると見なすことができるが、観測されるオーダーパラメーターScD(CD3)はこの速い回転 によるスケーリング効果(ScD3)によって約31%(C-C-D 結合角が111°の場合)に減衰 する。本予測によって得た ScD(CD3)/SCD(D)を<sup>2</sup>HNMR 測定および MD 計算から得た値と 比較した結果、C7'位での実験値(ScD(CD3)/ScD(D)=0.26)が『折れ曲がり構造』の際に 予測される値と非常に良い一致を示した。『直鎖構造』で予測される値(0.17)とは明ら かに異なることから、C7'位における平均配向は『直鎖構造』ではなく『折れ曲がり構 造』であることが示唆された。一方で C3'位での実験値(ScD(CD3)/ScD(D)=0.33)は、『折 れ曲がり構造』ではなく『直鎖構造』での予測値(0.36)に近く、一見して『直鎖構造』 であるかのように思われた。そこで、C3'位周辺のより詳細な構造解析を試みた。



図 3-9 各配座(*anti*, *gauche*<sup>+</sup>, *gauche*<sup>-</sup>)における膜法線とのなす角度から予測したオー ダーパラメーターS<sub>CD</sub>の値 (a) 直鎖構造; (b) 折れ曲がり構造。(c) C-C 結合軸回転によ る S<sub>CD(CD3</sub>のスケーリング効果(S<sub>CD3</sub>)。(d) 回転異性体の存在比とスケーリング効果 (S<sub>CD3</sub>)を考慮して算出した『直鎖構造』および『折れ曲がり構造』における S<sub>CD(CD3</sub>/S<sub>CD(D)</sub> 予測値を<sup>2</sup>H NMR 測定および MD 計算結果と比較した。

まず MD 計算結果から、PGP-Me 側鎖 (*sn*-2 および *sn*-3 鎖) の O-C1 結合ベクトル の膜法線に対する角度分布 (図 3-10a)、および各 O-C1-C2-C3 結合における二面角分 布 (図 3-10b) を算出した。*Sn*-2 鎖では、O-C1 結合ベクトルの角度分布は  $\theta$ =180° (cos  $\theta$ = -1.0; 膜法線と並行) で最も多くなり、かつ O-C1-C2-C3 結合では *anti* 配座が優位 であることから、C3 位周辺の平均構造は上述の『折れ曲がり構造』であることが示唆 された。一方、*sn*-3 鎖における O-C1'結合ベクトルの膜法線に対する角度分布は、 $\theta$ = 180° だけでなく  $\theta$ =120° (Cos  $\theta$ = -0.5)付近においても分布が多くなることが明らか となった。『直鎖構造』を取った際の O-C1'結合ベクトルと膜法線のなす角度は  $\theta$ = 145° (Cos  $\theta$ = -0.82)であることから、*sn*-3 鎖の C3'位では『直鎖構造』および『折れ 曲がり構造』ではない、新たな配向の存在が示唆された。そこで、O-C1'結合ベクトル の膜法線に対する配向に加えて、O-C1'-C2'-C3'結合の二面角においても *anti* 配座が 優位であることを考慮し、この新たな配向は、不斉メチル基がリン酸頭部方向を向い た『上向き折れ曲がり構造』(図 3-10c) ではないかと考えた。本構造中では、O-C1' 結合ベクトルと膜法線のなす角度は $\theta$ = 111° (Cos  $\theta$ = -0.36)となるため、図 10-3a の sn-3 鎖において $\theta$ = 120° (Cos  $\theta$ = -0.5)付近の分布が増加した MD 計算結果とよく一 致する。そのため、C3'位で観測される  $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$  には本構造の寄与を考慮する必 要がある。そこで、C2'-C3'結合軸の回転によって生じる各回転配座(anti, gauche<sup>+</sup>, gauche<sup>-</sup>)中での、C-D および C-CD<sub>3</sub>結合と膜法線とのなす角度からオーダーパラメー ター $S_{CD}$ を予測した。C3'位での存在割合が最も多く、 $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ への寄与が最も大 きいと考えられる anti 配座(図 3-8c) では $S_{CD(CD3)}>S_{CD(D)}$ であり、本配座での値を基 にオーダーパラメーターの比を算出すると $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ =0.36 となる。この値は、『折 れ曲がり構造』のみでの予測値である $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ =0.26 よりも大きく、『直鎖構造』 のみでの予測値である 0.36 と同じである。すなわち、C3'位での $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$ の実験 値が『直鎖構造』と『折れ曲がり構造』の中間的な値(0.33)となったのは、この『上向 き折れ曲がり構造』が混在していることが原因であると推察された。

続いて C11'位に関して考察を行った。C11'位の<sup>2</sup>H NMR 測定結果から算出したオ ーダーパラメーターの比 (*ScD(CD3)/ScD(D)*=0.20) は、『折れ曲がり構造』のみでの予測 値(0.26)より小さく、『直鎖構造』のみでの予測値(0.17)より大きいという結果を示した。 そのため C11'位では、『折れ曲がり構造』から『直鎖構造』へと変化しており、それ らの中間的な配向を有しているのではないかと考えた。オーダーパラメーターの比 (*ScD(CD3)/ScD(D*))を用いた各メチル分岐位置における配向解析の結果をまとめると、C7' 位では『折れ曲がり構造』を平均配向として有しているのに対し、C3'位では『折れ曲 がり構造』に加え、『上向き折れ曲がり構造』が特異的に存在していることが確認され た。更に、C11'位では『折れ曲がり構造』から『直鎖構造』への変化が起きていると 推察されたことから、脂質二重膜中においてメチル分岐側鎖は深度依存的に配向を変 化させていることが明らかとなった。

このメチル分岐側鎖における深度依存的な配向の変化は、今回行った MD 計算結果 からも確認されている。図 3-11 は、PGP-Me sn-3 鎖の各メチル分岐位置での C-D 結合 および C-CD<sub>3</sub> 結合の膜法線に対する角度分布(赤線: C-D 結合、青線: C-CD<sub>3</sub> 結合) を示しており、特に C-CD<sub>3</sub> 結合における配向分布は各メチル分岐位置において顕著に 変化している。一方、DPPC の各 C-H 結合の膜法線に対する配向分布は(図 3-12)、 対応する各炭素位置においてほとんど変化がないことから、直鎖アルキル鎖は側鎖全 体で同様の配向を有していることが示唆される。故に、今回観測された深度依存的な 配向の変化は PGP-Me のメチル分岐鎖に特有の現象であるといえる。また、膜法線と のなす角から算出した cos  $\theta$  の値に着目すると、C-CD<sub>3</sub> 結合の場合、3'位では cos  $\theta$  が 正の値( $\theta > 90^\circ$ )となる分布が多いものの、11'位に向かうにつれて徐々に負の値( $\theta$ < 90°)となる分布が増加している。この結果は、『上向き折れ曲がり構造』(*anti*, *gauche*-配座: Cos  $\theta = 0.36$ , *gauche*<sup>+</sup>配座: cos  $\theta = -1.0$ )から、『折れ曲がり構造』(Cos  $\theta$  = -0.36) および『直鎖構造』(*anti*, gauche-配座: Cos  $\theta$  = 0, gauche<sup>+</sup>配座: Cos  $\theta$  = -0.82) への構造変化に対応していると考えられる。更に C-D 結合での結果を見てみる と、11'位では 7'位と比較して cos  $\theta$  が負の値をとる分布が相対的に増加しているため、 11'位に向かうにつれて『直鎖構造』への構造変化が起きているということと矛盾しな い。故に、これらの MD 計算結果は、 $S_{CD(CD3)}/S_{CD(D)}$  から推定した各メチル分岐位置で の平均配向の変化(膜の浅い箇所では『折れ曲がり構造』をとり、側鎖末端に近づく につれて徐々に『直鎖構造』へと近づく)を明確に支持する結果といえる。



図 3-10 (a) PGP-Me 側鎖(黒線: *Sn*-2 鎖、赤線: *Sn*-3 鎖)の各 O-C<sub>1</sub> 結合の膜法線に対す る角度分布。(b) 各 O-C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub> 結合の二面角分布(黒線: *sn*-2 鎖、赤線: *sn*-3 鎖)。(c) 上向き折れ曲がり構造の模式図および各配座(*anti*, *gauche*<sup>+</sup>, *gauche*<sup>-</sup>)における膜法線 とのなす角度から予測した C-D 結合および C-CD<sub>3</sub> 結合のオーダーパラメーター*S*<sub>CD</sub> の値。



図 3-11 PGP-Me sn-3 鎖の各メチル分岐位置における C-D 結合(赤線)および C-CD<sub>3</sub> 結合(青線)の膜法線に対する角度分布。 (a) 3'位, (b) 7'位, (c) 11'位



図 3-12 DPPC *sn*-3 鎖における各 C-H 結合の膜法線に対する角度分布。 (a) 3 位, (b) 7 位, (c) 11 位

次に、<sup>2</sup>H NMR 測定および MD 計算の結果から得られた構造的知見に基づき、PGP-Me 二重膜が幅広い温度範囲において液晶相を保持し、また、高塩濃度環境下であっ ても二重膜構造を保持できるといった、直鎖アルキルを有するリン脂質にはない特徴 的な膜物性を有する構造的要因を考察した。

図 3-13 は、PGP-Me および DPPC から構成された脂質二重膜の、MD 計算中におけるスナップショットを示している。DPPC 二重膜においては(図 3-13a)、直鎖アルキル鎖が『直鎖構造』を取っており、側鎖全体として膜法線と平行となる配向を有していることが見て取れる。一方 PGP-Me 二重膜においては(図 3-13b)、フィタニル鎖は局所的に折れ曲がり、ねじれた構造を有していることが確認された。これらの構造的な相違を受け、各脂質二重膜中における側鎖の C1 位と C15 位を結ぶチェーンベクトルと膜法線との角度分布の算出を行った(図 3-13c)。その結果、直鎖アルキル鎖およびフィタニル鎖ともに膜法線と平行(cos  $\theta = -1.0$ )となる分布が最も多いものの、フ

ィタニル鎖は直鎖アルキル鎖と比較して顕著にブロードな分布を示した。これは、フ ィタニル鎖の不規則にねじれた(折れ曲がった)構造によって脂質側鎖の密なパッキ ングが妨げられることに起因しており、その結果、PGP-Me 単一分子の側鎖間(sn-2 鎖とsn-3 鎖間)においては隙間が生じやすいことが推察された。実際に、図 3-13bの 拡大図に示した様に、MD 計算のスナップショットからもフィタニル鎖間に隙間が生 じていることが観測され、更には、この隙間を埋めるために近傍に存在するフィタニ ル鎖が間に挟まることで、側鎖間での絡み合いが起こっていることが確認された。こ の側鎖間の絡み合いは、フィタニル鎖の運動性を抑えることに繋がり、その結果、高 温条件下においても運動性があまり変化せず、適度な流動性を有する要因であると考 えられる。また、この側鎖間の絡み合いにより、フィタニル鎖間の密なパッキングが 阻害されることでゲル相への転移が抑制され、PGP-Me 二重膜が低温においても流動 的な液晶相状態を保持できると推察できる。

更に、<sup>2</sup>H NMR 測定および MD 計算の両方において、C7<sup>\*</sup>位でのオーダーパラメー ター(*Scop*)が最も大きくなる結果となった(表 3-2)。この結果を考慮すると、フィタ ニル鎖の中央部分において、側鎖間の絡み合いが起こりやすいことが示唆された。側 鎖間の絡み合いはフィタニル鎖の末端付近においても起こることが想定されるが、側 鎖末端は高い運動性を有しており、絡み合い構造がすぐに解消されるため、オーダー パラメーター(*Sco*)の増加に繋がらないのではないかと考えた。一方で、側鎖の中央部 で絡み合いが生じた場合は、上述のように側鎖の運動性が抑えられることで *Sco* が増 加するものと考えた。 (b)

(a)



図 3-13 (a) DPPC および (b) PGP-Me から構成された脂質二重膜での MD 計算スナッ プショット。脂質の疎水性側鎖を棒状、エーテル結合を含むリン酸頭部は VDW 球 体で表示(赤:酸素原子、シアン:炭素原子、タン:リン原子)。(c) 膜法線とチェ ーンベクトルとの角度分布(赤線: PGP-Me、黒線: DPPC)。各疎水性側鎖の C1 位 と C15 位を結ぶベクトルをチェーンベクトルと定義した。

3-4 章のまとめ

本章ではまず、3'-CD<sub>3</sub>, D-PGP-Me(2)を用いた<sup>2</sup>HNMR 測定を行い、DMPC 膜との比較を行う事で、古細菌脂質特有の膜物性を解析した。その結果、PGP-Me 膜は 0°C 付近でもゲル相への転移が起こらず、幅広い温度範囲において液晶相状態を保持できる事を確認した。更には、5.0M NaCl 条件下においても測定を行い、PGP-Me が高塩濃度条件下でも二重膜構造を形成できることを明らかとした。以上の結果から、幅広い極限環境に適応するために、古細菌の細胞膜が分岐メチル側鎖を有するリン脂質で構成されているのではないかと推察した。

続いて、<sup>2</sup>HNMR 測定および MD 計算から、各メチル分岐位置における C-D 結合お よび C-CD3 結合のオーダーパラメーター(*Sco*)を算出し、更にそれらの比 *Sco(co3)/S(co)* を用いてメチル分岐鎖の配向解析を行った。その結果、側鎖上部では『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 化していることが判明し、メチル分岐鎖では深度依存的に配向が変化することを明ら かとした。

最後に、<sup>2</sup>HNMR 測定および MD 計算の結果から得られた構造的知見に基づき、メ チル分岐鎖(フィタニル鎖)間の相互作用を推定した。その結果、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明らかとなり、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。

#### 参考文献

- 1) Silvius, J. R.; McElhaney, R. N. Chem. Phys. Lipids. 1980, 26, 67.
- 2) Lewis, R. M. A. H.; McElhancy, R. N. Biochemistry 1985, 24, 2431.
- 3) Lewis, R. M. A. H.; McElhancy, R. N. Biochemistry 1987, 26, 4036.
- 4) Lewis, R. M. A. H.; Mantsch, H. H.; McElhancy, R. N. Biophys. J. 1989, 56, 183.
- 5) Jenske, R.; Lindstromöm, F.; Gröbner, G.; Vetter, W. Chem. Phys. Lipids 2008, 154, 26.
- 6) Linsey, H. Peterson, N. O.; Chan, S. I. Biochim. Biophys. Acta 1979, 555, 147.
- 7) Ekiel, I. H.; Marsh, D.; Smallbone, B. W.; Kates, M.; Smith, I. C. P. Biochem. Biophys. Res. Comm. 1981, 100, 105.
- 8) Hiraki, K.; Hamanaka, T.; Mitsui, T.; Kito, Y. Biochim. Biophys. Acta 1981, 647, 18.
- 9) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. Chemistry Letters 1998, 9, 901.
- 10) Stewart, L. C.; Kates, M.; Ekiel, I. H.; Smith, I. C. P. Chem. Phys. Lipids 1990, 54, 115.
- 11) Davis, J. H. Biochim. Biophys. Acta. 1983, 737, 117.
- 12) Huang, T. H.; Skarjune, R. P.; Wittebort, R. G.; Oldield, E. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7377.
- 13) Gall, C. M.; DiVerdi, J. A.; Opella, S. J. J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 5039.
- 14) Yamaguchi, K.; Doi, K.; Kinoshita, M.; Kii, F.; Fukuda, H. *Biochim, Biophys, Acta* **1992**, *1110*, 171.
- 15) Christian, J. H.; Waltho, J. A. Biochim, Biophys, Acta 1962, 65, 506.
- 16) Tenchov, B.; Vecio, E. M.; Sportt, G. D.; Zeidel, M. L.; Mathai, J. C. J. Biol. Chem. 2006, 281, 10016.
- 17) Linsey, H.; Peterson, N. O.; Chan, S. I. Biochim. Biophys. Acta 1979, 555, 147.
- 18) Shinoda, W.; Mikami, M.; Baba, T.; Hato, M. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 14030.
- 19) Tristrum-Nagle, S.; Kim, D. J.; Akhunzada, N.; Kučerka, N.; Mathai, J. C.; Katsaras, J.; Zeidel, M. Nagle, J. F. Chem. Phys. Lipids 2010, 163, 630.
- 20) Kučerka, N.; Tristram-Nagle, S.; Nagle, J. F. Biophys. J. Biophys. Lett. 2006, 90, L83.
- Kinnun, J. J.; Mallikarjunaiah, K. J.; Petrache, H. I.; Brown, M. F. *Biochim, Biophys, Acta* 2015, 1848, 246.
- 22) Seeling, A.; Seeling, J. Biochemistry, 1974, 13, 4839.
- 23) 計算条件の詳細は実験項を参照。
- 24) Seeling, J. Q. Rev. Biophys, 1977, 10, 353.
- 25) Tuchtenhagen, J.; Ziegler, W.; Blume, A. Eur. Biophys. J. 1994, 23, 323.

#### 第四章 結 論

本研究では、重水素固体 NMR から得られる構造情報を基盤とし、分子動力学計算 による計算科学的手法を組み合わせることで、古細菌脂質に特有のメチル分岐鎖の脂 質二重膜中における詳細な構造解析を行った。

まずは、重水素固体 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、立体選択的な PGP-Me の全合成を行った。高光学純度イソプレンユニットを繰り返し連結させて炭素鎖を伸長させることで、古細菌脂質特有のメチル分岐側鎖を効率的に構築することに成功し、続いて PGP-Me の全合成を達成した。更に重水素標識 PGP-Me 誘導体合成においては、非標識イソプレンユニットと重水素標識イソプレンユニットの連結させる順番を変更させるだけで、PGP-Me の *Sn*-3 鎖の 3'位、7'位および 11'位それぞれのメチル分岐位置に *CD*<sub>3</sub>,*D* 標識を導入した 3 種類の重水素標識 PGP-Me 誘導体(2-4)を効率的に調製することに成功した。よって、本研究において確立したイソプレンユニットを連結させてメチル分岐鎖を合成する手法は、重水素標識を導入した古細菌脂質の合成においても有用な手法である事を明らかとした。

次に、3'-CD<sub>3</sub>,D-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 側鎖の局所的な運動情報を取得し、PGP-Me 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、また高 NaCl 条件下において二重膜構造を形成する上で、メチル分岐側鎖が重要な役割を担ってい ることを局所的な運動性の観点から確認した。

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、測定結果のスペクトルフィッティングから得た分裂幅を基に、各メチル分岐位置における C-D 結合および C-CD3 結合オーダーパラメーター(*ScD*)を算出し、平均的配座と平均的配向を推定することによって構造解析を行った。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構造は、飽和脂肪酸結合型リン脂質の直鎖アルキル鎖において前提とされている『直鎖構造』とは異なっていることが示唆され、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、名古屋大学大学院工学研究科の篠田渉准教授との共同研究によって、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。 その結果、メチル分岐側鎖は、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』へと近づくといった、深度依存的な配向の 変化が起こっていることが推察された。加えて 3'位においては、不斉メチル基がリン 酸頭部方向を向いた『上向き折れ曲がり構造』が特異的に存在していることが示唆さ れた。そして、この様な折れ曲がった構造を有するメチル分岐側鎖間には隙間が生じ やすく、その隙間を埋めるように近傍に存在する側鎖が挿入されることでメチル分岐 側鎖間での「絡み合い」が起こっていることが示唆された。更に、重水素固体 NMR 測定から得た結果を考慮すると、この絡み合い構造が側鎖中央部で起こりやすいこと が推察された。そして、この絡み合い構造が古細菌脂質に特徴的の膜物性を引き起こ す構造的要因であると結論付けた。

以上の様に本研究では、重水素固体 NMR から得られる構造情報と分子動力学計算 を組み合わせることで、脂質二重膜中におけるメチル分岐側鎖の平均構造を実験的に 初めて推定することに成功した。本研究では脂質純膜中での構造解析に留まったが、 膜タンパク質共存下における脂質側鎖の構造解析への適用も期待できる。そのため本 研究では、生体膜環境下での精密な膜タンパク質-周辺脂質相互作用を解析するため の新たな方法論を確立することができたとも言える。

### I. General information

Unless otherwise indicated, all reactions were carried out with magnetic stirring in oven-dried glassware under argon atmosphere. Commercially available reagents were purchased from Nacalai Tesque, Sigma-Aldrich, TCI, and were used without further purification. The dehydrated solvents dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Kanto Chemical Co. Inc. and were used without further dehydration. Analytical thin-layer chromatography (TLC) were carried out on Merck pre-coated silica gel 60 F-254 plates and revealed with UV irradiation (254 nm) and stained with phosphomolybdic acid. Flash chromatographies were performed with Biotage prepacked columns using a Biotage Isolera One purification system. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a JEOL ECS 400 (400 MHz) or JEOL ECA 500 (500 MHz) spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) relative to the solvent residual peak of CDCl<sub>3</sub> (7.26 ppm for <sup>1</sup>H, 77.0 ppm for <sup>13</sup>C) or CD<sub>3</sub>OD (4.78 ppm for <sup>1</sup>H, 49.0 ppm for <sup>13</sup>C). Splitting patterns are indicated as followed: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; oct, octet; m, multiplet; b, broad and combinations thereof. Coupling constants (J) are reported in hertz (Hz). <sup>31</sup>P NMR chemical shifts are reported using ammonium phosphate as external standard, referenced at 1.0 ppm. IR spectra were realized on JASCO FT/IR-6100. High resolution mass spectra (HRMS) and optical rotation were recorded on a LTQ-Orbitrap XL instrument and JASCO P-1010 polarimeter respectively.

# II. Experimental procedures for the synthesis of PGP-Me and <sup>2</sup>H-labelled derivatives

# 1) General procedures

### i) Preparation of Grignard reagents

To a suspension of magnesium turnings (1.5 eq) in THF (0.5 mL/mmol of substrate) containing a small iodine crystal and 1,2-dibromoethane were added few drops of the appropriate brominated compound (1.0 eq) in THF (0.5 mL/mmol of substrate). The mixture was heated until the reaction started, then the brominated compound was added dropwise to maintain a non-assisted gentle reflux. After complete addition of the starting material, the mixture was heated under reflux for 2 h. The solution of Grignard reagent was cooled down and titrated prior to use.

## ii) Cu-catalyzed cross-coupling

To a 0.1 M solution of appropriate tosylates (1.0 eq) in THF at 0 °C under argon atmosphere, were added CuCl<sub>2</sub> (0.05 eq), 1-phenyl-1-propyne (0.2 eq) and the appropriate Grignard reagent (2.0 eq). After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was quenched by sat NH<sub>4</sub>Cl aq, then water layer was extracted with EtOAc (×3). Combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 0/1 to 1/10) to afford the corresponding Bn-protected alcohols.

## iii) Removal of benzyl group

To a 0.1 M solution of the appropriate Bn-protected alcohols (1.0 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added boron trichloride (2.0 eq, 1.0M in heptane) at -78 °C. After stirring for 1.5 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with MeOH and diluted with water. then water layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (×3). Combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/5) to afford corresponding alcohols.

# iv) Tosylation

To a 0.1 M solution of appropriate alcohols (1.0 eq) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> were added TsCl (1.2 eq), Et<sub>3</sub>N (2.5 eq) and DMAP (0.3 eq) sequentially. After stirring for 4.5~6 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with sat NH<sub>4</sub>Cl aq, then water layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (×3). Combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 0/1 to 1/5) to afford corresponding tosylates.

# v) MaNP esterification

To a solution of primary alcohol (1.0 eq) in  $CH_2Cl_2$  was added (*R*) or (*S*)-2-methoxyl-2-(1phenyl) propionic acid (MaNP acid, 2.1 eq), *N*,*N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 3.0 eq) and DMAP (3.0 eq) sequentially. After stirring for 12 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl aq, then water layer was extracted with  $CH_2Cl_2$  (×3). Combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flash column chromatography (EtOAc/Hexane = 1/20) to afford MaNP esters.

(S)-4-(benzyloxy)-2-methylbutan-1-ol 12: To a solution of imide 31 (17.1 g, 46.5 mmol) in dry Et<sub>2</sub>O (300 mL) was added sodium lithium aluminum hydride (1.9 g, 51.1 mmol) at -20°C. The reaction mixture was stirred for 2 h at the same temperature, then sat. Rochelle salt aq. was added. After stirring for 30 min, the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO4, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/5) to afford alcohol 12 (7.7 g, 85%) as a pale yellow oil.  $[\alpha]^{25}_{D} = -5.73$  (c = 1.25, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.37-727 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 3.62-3.41 (m, 4H), 1.89-1.76 (m, 1H), 1.74-1.66 (m, 1H), 1.62-1.54 (m, 1H), 0.93 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.1, 128.5, 127.8, 127.8, 73.2, 68.8, 68.2, 34.2, 34.2, 17.3; IR (thin film): v = 3374, 2925, 2866, 1454, 1364, 1092, 1077, 1039, 1026, 735, 696 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 217.1204, found: 217.1200.

(*S*)-4-(benzyloxy)-2-methylbutyl 4-methylbenzenesulfonate 10: Following the tosylation procedure with alcohol 12 (5.1 g, 26.3 mmol), the desired tosylate 10 was obtained as a colorless oil (8.7 g, 95%).  $[\alpha]^{25}_{D}$  = +11.1 (c = 1.28, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.77-7.75 (m, 2H), 7.35-7.25 (m, 7H), 4.43 (s, 2H), 3.93 (dd, *J* = 5.2, 9.6 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 6.4, 9.6 Hz, 1H), 3.48-3.40 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.00 (oct, *J* = 6.4 Hz, 1H) , 1.70-1.62 (m, 1H), 1.47-1.39 (m, 1H), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 144.7, 138.4, 133.2, 129.9, 128.5, 128.0, 127.7, 75.1, 73.0, 67.7, 32.8 30.3, 21.7, 16.6; IR (thin film): v = 2963, 2926, 2859, 1356, 1187, 1096, 1027, 961, 939, 831, 737, 698, 665, 554 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 371.1293, found: 371.1289.



(*R*)-(((3, 7-dimethyloctyl)oxy)methyl)benzene 33: Following the preparation procedure of Grignard reagent with commercially available 1-bromo-3-methylbutane (4.0 g, 26.5 mmol) and the Cu-catalyzed cross-coupling procedure with tosylate 10 (1.0 g, 2.9 mmol), the desired compound 33 was obtained as a colorless oil (0.61 g, 85%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +1.59$  (c = 0.89, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35-7.25 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.55-3.46 (m, 2H) , 1.71-1.07 (m, 10H), 0.88-0.86 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.8, 128.4, 127.7, 127.5, 73.0, 68.9, 39.4, 37.4, 36.9, 30.0, 28.1, 24.8, 22.8, 22.7, 19.8; IR (thin film): v = 2953, 2925, 2866, 1465, 1378, 1203, 1100, 1027, 732, 696 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 271.2038, found: 271.2033.



(*R*)-3, 7-dimethyloctan-1-ol 34: Following the Bn removal procedure with compound 33 (0.60 g, 2.41 mmol), the desired alcohol 34 was obtained as a pale yellow oil (0.31 g, 82%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +2.93$  (c = 0.95, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.72-3.63 (m, 2H), 1.63-1.48 (m, 3H), 1.39-1.25 (m, 5H), 1.18-1.10 (m, 2H), 0.90-0.85 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  61.3, 40.1, 39.3, 37.5, 29.6, 28.0, 24.8, 22.8, 227, 19.2; IR (thin film): v = 3356, 2954, 2925, 2869, 1464, 1366, 1334, 1053, 1009 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 181.1568, found: 181.1560.



(*R*)-3,7-dimethyloctyl 4-methylbenzenesulfonate 35: Following the tosylation procedure with alcohol 34 (0.38 g, 2.40 mmol), the desired tosylate 35 was obtained as a pale yellow oil (0.73 g, 92%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +1.90$  (c = 2.40, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.81-7.78 (m, 2H), 7.35-7.33 (m, 2H), 4.11-4.02 (m, 2H), 2.49 (S, 3H), 1.70-1.62 (m, 1H), 1.56-1.41 (m, 3H), 1.20-1.05 (m, 6H), 0.86-0.80 (m, 9H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 133.4, 129.9,

128.0, 69.2, 39.1, 36.9, 35.8, 29.3, 28.0, 24.6, 22.7, 22.6, 21.7, 19.2; IR (thin film): v = 2954, 2926, 2868, 1359, 1187, 1097, 942, 888, 813, 760, 663, 554 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 335.1657, found: 335.1651.

(*S*)-((4-bromo-3-methylbutoxy)methyl)benzene S1: To a solution of tosylate 10 (7.0 g, 20.1 mmol) in DMF (140 mL) was added LiBr (2.6 g, 30.1 mmol). After stirring for 20 h under reflux, the reaction mixture was allowed to cool to room temperature and quenched with iced water. Then water layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (×3). Combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (EtOAc/Hexane = 1/15) to afford bromide S1 (4.0 g, 90%) as a colorless oil.  $[\alpha]^{25}_{D} = +4.28$  (c = 1.93, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.38-7.28 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 4.94 (bt, *J* = 6.0 Hz, 1H), 3.57-3.50 (m, 2H), 3.44 (dd, *J* = 4.5, 10.0 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 4.0, 10.0 Hz, 1H), 2.04 (oct, *J* = 6.0 Hz 1H), 1.84-1.77 (m, 1H), 1.56-1.53 (m, 1H), 1.04 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.5, 128.5, 127.7, 127.7, 73.1, 67.9, 41.6, 34.7, 32.2, 18.8; IR (thin film): v = 2961, 2930, 2857, 1454, 1364, 1246, 1097, 1026, 734, 696, 651, 618 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>BrO<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 279.0360, found: 279.0355, 281.0334.



((((3*R*, 7*R*)-3,7,11-trimethyldodecyl)oxy)methyl)benzene 36: Following the preparation procedure of Grignard reagent with bromide S1 (1.0 g, 3.9 mmol) and Cu-catalyzed cross-coupling procedure with tosylate 35 (200 mg, 0.64 mmol), the desired compound 36 was obtained as a pale yellow oil (167 mg, 82%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +1.26$  (c = 2.20, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.37-7.28 (m, 5H), 4.53 (s, 2H), 3.56-3.51 (m, 2H) , 1.81-1.08 (m, 17H), 0.94-0.87 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.8, 128.4, 127.7, 127.5, 73.0, 68.9, 39.5, 38.7, 37.6, 37.5, 37.4, 36.9, 32.9, 30.0, 28.1, 24.9, 24.5, 22.7, 19.9, 19.8; IR (thin film): v = 2954, 2924, 2854, 1455, 1365, 1100, 733, 697, 404 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 271.2038, found: 271.2032.



(*3R*,7*R*)-3,7,11-trimethyldodecan-1-ol S2: Following the Bn removal procedure with compound **36** (160 mg, 0.50 mmol), the desired alcohol S2 was obtained as a pale yellow oil (99 mg, 86%).  $[\alpha]^{25}_{D}$  = +2.35 (c = 0.48, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.72-3.63 (m, 2H), 1.64-1.49 (m, 3H), 1.38-1.05 (m, 14H), 0.90-0.83 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  61.3, 40.0, 39.4, 37.6, 37.4, 37.3, 32.9, 29.6, 28.1, 24.9, 24.4, 22.8, 22.7, 19.8, 19.8; IR (thin film): v = 3361, 2953, 2924, 2868, 1462, 1377, 1056, 1008 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>32</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 251.2351, found: 251.2344.



(*3R*,7*R*)-3,7,11-trimethyldodecyl 4-methylbenzenesulfonate 37: Following the tosylation procedure with alcohol **S2** (115 mg, 0.50 mmol), the desired tosylate **37** was obtained as a pale yellow oil (173 mg, 90%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +1.34$  (c = 0.75, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.81-7.78 (m, 2H), 7.36-7.33 (m, 2H), 4.10-4.03 (m, 2H), 2.45 (S, 3H), 1.69-1.64 (m, 1H), 1.55-1.02 (m, 16H), 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 133.4, 129.9, 128.0, 69.2, 39.4, 37.3, 37.1, 35.8, 32.8, 29.3, 280, 24.9, 24.3, 22.8, 22.7, 21.7, 19.8, 19.3; IR (thin film): v = 2953, 2925, 2867, 1463, 1364, 1188, 1176, 1097, 943, 889, 813, 762, 664, 554 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 405.2439, found: 405.433.



((((3*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy)methyl)benzene S3: Following the preparation procedure of Grignard reagent with bromide S1 (0.50 g, 1.9 mmol) and the Cucatalyzed cross-coupling procedure with tosylate 37 (70 mg, 0.18 mmol), the desired compound S3 was obtained as a pale yellow oil (65 mg, 92%).  $[\alpha]^{25}_{D} = +1.46$  (c = 2.15, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35-7.27 (m, 5H), 4.51 (s, 2H), 3.55-3.47 (m, 2H) , 1.71-1.64 (m, 1H), 1.61-1.50 (m, 2H), 1.46-1.04 (m, 21H) 0.89-0.84 (m, 15H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 

138.8, 128.4, 127.7, 127.5, 73.0, 68.9, 39.5, 37.6, 37.6, 37.5, 37.4, 36.9, 32.9, 30.0, 28.1, 24.9, 24.6, 24.5, 22.8, 22.7, 19.9, 19.9, 19.8; IR (thin film): v = 2953, 2925, 2866, 2857, 1461, 1376, 1100, 733, 696 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 411.3603, found: 411.3597.



**phytanol (32)**: Following the Bn removal procedure with compound **S3** (65 mg, 0.17 mmol), phytanol (**32**) was obtained as a pale yellow oil (46 mg, 92%). [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = +2.16 (c = 1.80, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.72-3.63 (m, 2H), 1.63-1.49 (m, 3H), 1.38-1.05 (m, 21H), 0.89 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.90-0.83 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 61.3, 40.1, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 37.4, 32.9, 29.6, 28.1, 24.9, 24.5, 24.5, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8; IR (thin film): v = 3566, 3030, 2932, 2858, 1731, 1454, 1362, 1286, 1087 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 321.3133, found: 321.3129.



(*3R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl 4-methylbenzenesulfonate 8: Following the tosylation procedure with alcohol 34 (46 mg, 0.15 mmol), the desired tosylate 8 was obtained as a pale yellow oil (66 mg, 95%). [α]<sup>25</sup><sub>D</sub> = +1.64 (c = 1.25, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80-7.78 (m, 2H), 7.35-7.33 (m, 2H), 4.10-4.02 (m, 2H), 2.45 (S, 3H), 1.68-1.65 (m, 1H), 1.60-1.03 (m, 23H), 0.87-0.80 (m, 15H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.7, 133.4, 130.0, 128.0, 69.2, 39.5, 37.5, 37.4, 37.3, 37.1, 35.8, 32.9, 32.8, 29.3, 28.1, 24.9, 24.5, 24.3, 22.8, 22.7, 21.7, 19.8, 19.8, 19.3; IR (thin film): v = 2953, 2924, 2867, 1460, 1364, 1187, 1097, 944, 888, 813, 761, 663, 583, 571, 554 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 475.3222, found: 475.3216.



(((*S*)-2,3-bis(((*3R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy)propoxy)methyl)benzene **S4**: To a solution of separately prepared alcohol **7** (12 mg, 66 µmol) in DMSO (0.75 mL) was added sodium hydride (5.3 mg, 133 µmol, 60% in oil) at 0 °C. After stirring for 30 min at 0 °C, tosylate **8** (60 mg, 133 µmol) as a 0.75 mL of DMSO solution was added in the mixture. After stirring for 22 h at room temperature, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (EtOAc/Hexane = 1/15) to afford compound **S4** (27 mg, 56%) as a pale yellow oil. [ $\alpha$ ]<sup>25</sup><sub>D</sub> = +1.76 (c = 1.43, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.34-7.26 (m, 5H), 4.56 (s, 2H), 3.66-3.41 (m, 9H),1.65-1.49 (m, 8H), 1.41-1.02 (m, 40H), 20.88-0.84 (m, 30H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.5, 128.4, 127.7, 127.6, 78.1, 73.5, 70.9, 70.5, 70.1, 69.0, 39.5, 37.6, 37.6, 37.5, 37.4, 37.2, 36.8, 32.9, 32.9, 30.0, 29.9, 29.8, 28.1, 24.9, 24.6, 24.5, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8, 19.8; IR (thin film): v = 2951, 2923, 2857, 1513, 1642, 1376, 1301, 1247, 1171, 1110, 1040, 820 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>50</sub>H<sub>94</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 765.7101, found: 765.1110.



Archaeol (6): Following the Bn removal procedure with compound S4 (25 mg, 34 μmol), archaeol (6) was obtained as a pale yellow oil (20 mg, 90%).  $[α]^{25}D = +4.88$  (c = 0.53, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.34-7.26 (m, 5H), 4.56 (s, 2H), 3.66-3.41 (m, 9H), 1.71-1.64 (m, 1H), 1.65-1.49 (m, 8H), 1.42-1.02 (m, 40H) 0.88-0.84 (m, 30H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 78.4, 71.1, 70.3, 68.7, 63.2, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 37.4, 37.2, 36.7, 32.9, 30.0, 29.9, 28.1, 24.9, 24.6, 24.4, 22.8, 22.7, 19.8, 19.8, 19.8; IR (thin film): v = 3456, 2953, 2925, 2867, 1462, 1376, 1114, 1050, 799 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>43</sub>H<sub>88</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 675.6631, found: 675.6625.



Phosphate 38: To a solution of archaeol (6) (20 mg, 31 µmol) and separately prepared bisphosphate 6 (8.1 mg, 15 µmol) in dry pyridine (1.0 mL) at 0 °C was added pivaloyl chloride (5.7 µL, 46 µmol). After stirring for 1.5 h at room temperature, iodine (3.9 mg, 15 μmol) in pyridine/H<sub>2</sub>O (0.50 mL/25 μL) was added. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1 h, then 0.5 mL of Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (2.0 M) was added. After stirring for 10 min, the mixture was diluted with water and extracted with CHCl<sub>3</sub> (×3). The organic layer was combined, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flush column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N = 100:5:1) to afford phosphate **38** (13.7 mg, 76%) as a pale yellow oil.  $\left[\alpha\right]^{25} = +1.03$  (c = 0.88, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.36-7.27 (m, 10H), 5.06-5.00 (m, 2H), 4.65 (ABq,  $\delta \Delta_{AB} = 0.04$ , J = 12.0 Hz, 1H), 4.29-4.24 (m, 1H), 4.16-4.11 (m, 1H), 403-4.00 (m, 2H), 3.92-3.90 (m, 2H), 3.86-3.81 (m, 1H), 3.69 (d, J = 10.8 Hz, 1.5H), 3.68 (d, J = 10.8 Hz, 1.5H), 3.63-3.51 (m, 4H), 3.36-3.41 (m, 3H), 3.06-3.00 (m, 6H, HNEt<sub>3</sub>), 1.61-1.47 (m, 6H), 1.38-0.99 (m, 51H), 0.87-0.82 (m, 30H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138.2, 136.0, 136.0, 128.6, 128.6, 128.6, 128.4, 128.0, 127.8, 127.7, 78.1, 78.0, 77.3, 72.2, 71.1, 70.1, 69.4, 69.3, 69.0, 67.1, 67.1, 65.4, 65.4, 63.8, 63.8, 54.4, 54.4, 46.5, 45.6, 39.5, 37.7, 37.7, 37.6, 37.5, 37.4, 37.4, 37.3, 36.8, 32.9, 32.9, 30.1, 29.9, 28.1, 24.9, 24.6, 24.5, 22.8, 22.7, 19.8, 19.8, 19.8, 19.2, 8.6; <sup>31</sup>P NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.01, 0.74 ; IR (thin film): v = 2952, 2924, 2866, 2857, 1457, 1377, 1236, 1038, 859, 735, 697 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>61</sub>H<sub>109</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-HNEt<sub>3</sub>]<sup>-</sup>: 1079.7451, found: 1079.7435.



phosphatidylglycerophosphate methyl ester (PGP-Me, 1): To a solution of phosphate 38 (12 mg, 10  $\mu$ mol) in MeOH (0.5 mL) was added platinum oxide (2.3 mg, 10  $\mu$ mol). The mixture was hydrogenated for 12 h under 1.0 atm of hydrogen gas then platinum black was filtered. After concentration, the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O = 20:10:1) to afford corresponding deprotected product as a

triethylamine salt form.

The deprotected product was mixed with 0.2 mL of NaClO<sub>4</sub> solution (4 M). The mixture was stirred with a vortex mixer. After centrifugation the supernatant solution was removed, the precipitate was washed with distilled water, and dissolved in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (1:1). The organic solvent was concentrated to afford PGP-Me (1) (6.9 mg, 72% in two steps) as a white solid.  $[\alpha]^{25}_{D} = +2.34$  (c = 0.73, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v), using CD<sub>3</sub>OD as the lock)  $\delta$  4.00-3.84 (m, 7H), 3.62-3.50 (m, 7H), 3.45-342 (m, 3H), 3.41-3.35 (m, 4H), 1.62-1.43 (m, 6H), 1.36-0.97 (m, 42H), 0.85-0.80 (m, 30H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v))  $\delta$  78.1, 78.0, 77.8, 70.9, 70.1, 70.0, 70.0, 69.9, 68.7, 66.2, 66.2, 64.8, 64.7, 52.3, 52.2, 39.3, 37.4, 37.3, 37.3, 37.2, 37.0, 36.6, 32.7, 32.7, 29.8, 29.7, 27.9, 24.7, 24.3, 24.3, 22.2, 22.2, 19.4, 19.3, 19.3; <sup>31</sup>P NMR (125 MHz, CD3OD/CDCl3 (4/3 v/v)):  $\delta$  3.00, 1.74; IR (thin film): v = 3402, 3278, 2953, 2924, 2868, 1652, 1461, 1377, 1212, 1088, 1053, 834 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C47H97O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-2Na+H]<sup>-</sup>: 899.6512, found: 899.6497.



[2,2-*d*<sub>2</sub>]-methyl-4-(benzyloxy)butanoate 51: To a solution of butanoate 50 (10.0 g, 48.0 mmol) in CH<sub>3</sub>OD (100 mL) was added DBU (14.4 mL, 96.0 mmol). After stirring for 16 h under reflux, the mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/5). This procedure was repeated again to afford deutarated butanoate 51 (7.8 g, 77%, 93%D) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.35-7.25 (m, 5H), 4.49 (s, 2H), 3.64 (s, 3H), 3.50 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.44-2.40 (m, 0.15H) 1.93 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.0, 138.5, 128.4, 127.7, 127.6, 73.0, 69.2, 51.6, 31.0-30.1 (m) 25.1; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>D<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 233.1123, found: 233.1109.



 $[2,2-D_2]$ -4-(benzyloxy)butanoic acid 52: To a solution of deuterated butanoate 51 (6.9 g, 32.8 mmol) in THF (140 mL) and D<sub>2</sub>O (10 mL) was added KOH (3.7 g, 65.6 mmol). After stirring for 12 h at room temperature, the reaction mixture was allowed to cool to 0°C and acidified

with 6N HCl, then extracted with EtOAc (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure to afford deuterated carboxylic acid **52** (6.4 g, quant) as a colorless oil. This compound was used for next reaction without further purification. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.37-7.29 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 3.54 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.50-2.46 (m, 0.15H) 1.95 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  179.9, 138.3, 128.5, 127.7, 73.0, 69.1, 30.9-30.2 (m), 24.7; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>D<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 195.0990, found: 195.0982.



[2,2-D<sub>2</sub>]-(S)-4-benzyl-3-(4-(benzyloxy)-butanoyl)oxazolidin-2-one 53: To a solution of carboxylic acid 52 (6.3 g, 32.4 mmol) in THF (150 mL) was added EtN<sub>3</sub> (9.0 mL, 64.9 mmol) and pivaloyl chloride (4.4 mL, 35.7 mmol) at -20°C. After stirring for 45 min at same temperature, LiCl (1.5 g, 35.7 mmol) and (S)-4-benzyl-oxazolidin-2-one (26) (5.6 g, 31.8 mmol) in THF (50 mL) were added sequentially. The reaction mixture was stirred for 16 h at room temperature before quenching with 0.2 N HCl aq (150 mL) at 0°C, then extracted with EtOAc (×3). The combined organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> aq, brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 2/5) to afford deuterated imide 53 (10.4 g, 91%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36-7.31 (m, 6H), 7.28-7.25 (m, 2H), 7.20-7.18 (m, 2H), 4.63-4.58 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.15-4.07 (m, 2H), 3.58 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.27 (dd, J = 3.5, 8.0 Hz, 1H), 3.07-3.02 (m, 0.15H), 2.70 (dd, J = 10.0, 13.5 Hz, 1H), 2.03 (t, J = 6.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.2, 153.6, 138.5, 135.5, 129.5, 129.0, 128.5, 1278, 127.7, 127.4, 73.0, 69.3, 66.2, 55.2, 38.0, 32.3-31.6 (m), 24.5; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>D<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 378.1650, found: 378.1642.



[2,2-CD<sub>3</sub>,D]-(S)-4-benzyl-3-((S)-4-(benzyloxy)-butanoyl)oxazolidin-2-one 54: To a solution of deuterated imide 53 (9.6 g, 27.0 mmol) in THF (150 mL) was added sodium bis(trimethylsilyl)amide (41 mL, 41 mmol, 1.0M in THF) over 10 min at -78°C. After stirring for 30 min at same temperature, iodomethane- $d_3$  (5.2 mL, 81.0 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 6 h at -78°C before quenching with sat NH<sub>4</sub>Cl aq, then extracted with Et<sub>2</sub>O (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated, and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/1) to afford CD<sub>3</sub>,D-labeled imide 54 (7.0 g, 70%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.32-7.21 (m, 8H), 7.17-7.15 (m, 2H), 4.43-4.34 (m, 3H), 3.97 (dd, J = 3.0, 9.0 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 3.60-3.52 (m, 2H), 3.20 (dd, J = 3.5, 13.5 Hz, 1H), 2.71 (dd, J = 9.5, 13.5 Hz, 1H), 2.20-2.15 (m, 1H), 1.74 (dt, J = 5.0, 14.0 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  177.2, 153.4, 138.6, 135.5, 129.5, 128.9, 128.4, 127.7, 127.6, 127.3, 72.9, 68.6, 65.9, 55.3, 38.1, 34.7 (t,  $J_{C-D}$  =20.0 Hz), 33.6; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>D<sub>4</sub>NO<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 394.1932, found: 394.1932.



[2,2-CD<sub>3</sub>,D]-(S)-4-(benzyloxy)-2-methylbutan-1-ol 55: To a solution of CD<sub>3</sub>,D-labeled imide 54 (7.0 g, 18.8 mmol) in dry Et<sub>2</sub>O (150 mL) was added sodium lithium aluminum hydride (1.4 g, 37.7 mmol) at -20°C. The reaction mixture was stirred for 2 h at the same temperature, then sat. Rochelle salt aq. was added. After stirring for 30 min, the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. Filtrate was concentrated and the residue was purified with flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/5) to afford CD<sub>3</sub>,D-labeled alcohol 55 (3.4 g, 91%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.37-727 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 3.62-3.41 (m, 4H), 1.73-1.66 (m, 1H), 1.56 (dt, *J* = 5.2, 10.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ .138.1, 128.5, 127.8, 127.8, 73.2, 68.5, 68.0, 33.9, 33.5 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.1 Hz); HRMS (ESI+) *m*/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>D<sub>4</sub>O<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 221.1456, found: 221.1451.

[2,2-CD<sub>3</sub>,D]-(*S*)-4-(benzyloxy)-2-methylbutyl 4-methylbenzenesulfonate 57: Following the tosylation procedure with CD<sub>3</sub>,D-labeled alcohol 55 (3.2 g, 16.1 mmol), CD<sub>3</sub>,D-labeled tosylate 57 was obtained as a colorless oil (5.3 g, 94%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78-7.75 (m, 2H), 7.35-7.25 (m, 7H), 4.43 (s, 2H), 3.93 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.84 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 3.46-3.42 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.02-1.95 (m, 0.14H) , 1.69-1.62 (m, 1H), 1.46-1.39 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 138.5, 133.2, 129.9, 128.5, 128.0, 127.7, 75.0, 73.0, 67.7, 32.6, 29.7 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.1 Hz), 21.7; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>D<sub>4</sub>O<sub>4</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 375.1544, found: 375.1537.



[3,3-CD<sub>3</sub>,D]-(*S*)-((4-bromo-3-methylbutoxy)methyl)benzene 58: Following the same procedure as described for bromide S1 with CD<sub>3</sub>,D-labeled tosylate 57 (3.0 g, 8.5 mmol), CD<sub>3</sub>,D-labeled bromide 58 was obtained as a colorless oil (1.9 g, 87%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38-7.29 (m, 5H), 4.52 (s, 2H), 3.56-3.51 (m, 2H), 3.44 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.34 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 2.07-2.01 (m, 0.15H), 1.85-1.77 (m, 1H), 1.60-1.53 (m, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 138.5, 128.5, 127.7, 127.6, 73.1, 67.9, 41.5, 34.6, 31.6 (t,  $J_{C-D} = 19.9$  Hz); HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>D<sub>4</sub>BrONa [M+Na]<sup>+</sup>: 283.0612, found: 283.0607, 285.0586.



[3,3-CD<sub>3</sub>,D]-((((3R,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy)methyl)benzene 59: Following the preparation procedure of Grignard reagent with bromide 58 (1.0 g, 3.8 mmol) and the Cu-catalyzed cross-coupling procedure with tosylate 37 (140 mg, 0.37 mmol), the desired compound 59 was obtained as a pale yellow oil. The pure coupling products couldn't be obtained due to contamination of the Wurtz coupling products of the Grignard reagent. Thus, compound 59 was only partially purified and used in next step.



**3-***CD*<sub>3</sub>,*D***-phytanol (56)**: Following the Bn removal procedure with compound **59**, 3-*CD*<sub>3</sub>,*D*-labeled phytanol (**56**) was obtained as a pale yellow oil (83 mg, 75% in 2 steps). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.72-3.63 (m, 2H), 1.64-1.47 (m, 3H), 1.40-1.01 (m, 20H), 0.87-0.84 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  61.3, 39.9, 39.5, 37.5, 37.5, 37.4, 37.4, 32.9, 28.9 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.3 Hz), 28.1, 24.9, 24.5, 24.4, 22.8, 22.7, 19.9, 19.3; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>D<sub>4</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 325.3384, found: 325.3378.



**Phytanol (32)**: To a solution of phyatol (1.0 g, 3.4 mmol) in MeOH (15 mL) was added (s)-Ru(OAc)<sub>2</sub>(T-BINAP)<sup>3</sup> (61 mg, 0.067 mmol). The mixture was hydrogenated for 24 h under 50 atm of hydrogen gas. After concentration, the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 1/5) to afford phytanol (**32**) as a pale yellow oil (0.95 g, 94%).



(((*R*)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-(((3*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy) propoxy)methane trityl)tribenzene 68: To a solution of separately prepared alcohol 46 (1.0 g, 2.2 mmol) in DMF (15 mL) was added sodium hydride (88 mg, 2.2 mmol, 60% in oil) at 0 °C. After stirring for 30 min at same temperature, tosylate 8 (0.83 g, 1.8 mmol) in 5 mL of DMF solution was added in the mixture. After stirring for 17 h at room temperature, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 0/1 to 1/5) to afford compound 68 (1.2 g, 90%) as a pale yellow oil.  $[\alpha]^{25}_{D} = +4.35$  (c = 1.40, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.46-7.44 (m, 6H), 7.29-7.18 (m, 11H), 6.85-6.82 (m, 2H), 4.45 (dd, J = 11.5, 17.5 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.61-3.52 (m, 5H), 3.20 (d, J = 4.5 Hz, 2H), 1.67-1.45 (m, 3H), 1.41-1.03 (m, 21H), 0.88-0.83 (m, 15H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.2, 144.2, 130.6, 129.2, 128.9, 127.8, 127.0, 113.8, 86.6, 78.5, 73.0, 70.3, 69.1, 63.7, 55.3, 39.5, 37.7, 37.6, 37.5, 37.4, 37.3, 32.9, 32.9, 30.0, 28.1, 24.9, 24.6, 24.5, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8; ; IR (thin film): v = 2951, 2924, 2865, 1512, 1462, 1246, 1089, 1035, 762, 745, 703, 632 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>50</sub>H<sub>70</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 757.5172, found: 757.5164.



(*S*)-3-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-(((*3R*,*7R*,11*R*)-3,*7*,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy) propan-1-ol 42: To a solution of glycerol derivative 68 (1.1 g, 1.5 mmol) in MeOH (9 mL) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was added p-toluenesulfonic acid monohydrate (57 mg, 0.30 mmol). After stirring for 3.5 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl aq, then water layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 2/5) to afford alcohol **42** (0.68 g, 92%) as a pale yellow oil.  $[\alpha]^{25}_{D} = -6.67$  (c = 2.20, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.25-7.23 (m, 2H), 6.89-6.86 (m, 2H), 4.47 (dd, *J* = 11.5, 14.0 Hz, 2H), 3.80 (m, 3H), 3.73-3.69 (m, 1H), 3.64-3.59 (m, 2H), 3.57-3.49 (m, 4H), 2.09 (bt, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.64-1.59 (m, 3H), 1.18-1.04 (m, 20H), 0.87-0.83 (m, 15H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159.4, 130.2, 129.4, 113.9, 78.5, 73.3, 69.8, 38.7, 63.1, 55.4, 39.5, 37.6, 37.5, 37.5, 37.4, 37.4, 37.2, 32.9, 29.9, 28.1, 24.9, 24.6, 24.4, 22.8, 22.7, 19.8, 19.8; ; IR (thin film): v = 3457, 2951, 2924, 2866, 1512, 1461, 1246, 1090, 1038, 820 cm<sup>-1</sup>; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>31</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 515.4076, found: 515.4070.



[3,3-CD<sub>3</sub>,D]-(3R,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl 4-methylbenzenesulfonate 43: Following the tosylation procedure with alcohol 3-CD<sub>3</sub>,D-labeled phytanol (56) (83 mg, 0.27 mmol), 3-CD<sub>3</sub>,D-labeled tosylate 43 was obtained as a pale yellow oil (119 mg, 95%). <sup>1</sup>H NMR

(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.79-7.78 (m, 2H), 77.34-7.32 (m, 2H), 4.09-4.02 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.68-1.62 (m, 1H), 1.56-0.96 (m, 22H), 0.86-0.81 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 133.4, 129.9, 128.0, 69.2, 39.5, 37.5, 37.5, 37.4, 37.3, 36.9, 35.6, 32.9, 32.8, 28.6 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.3 Hz), 28.1, 24.9, 24.5, 24.2, 22.8, 22.7, 21.7, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 479.3473, found: 479.3464.



[3',3'-CD<sub>3</sub>,D]-1-(((*S*)-2,3-bis(((3*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl)oxy)propoxy) methyl)-4-methoxybenzene S5: To a solution of alcohol 42 (130 mg, 0.26 mmol) in DMF (2.0 mL) was added sodium hydride (10.6 mg, 0.26 mmol, 60% in oil) at 0 °C. After stirring for 30 min at 0 °C, tosylate 43 (100 mg, 0.22 mmol) in 0.5 mL of DMF was added in the mixture. After stirring for 16 h at room temperature, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (EtOAc/Hexane = 1/15) to afford compound S5 (155 mg, 91%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.27-7.25 (m, 2H), 6.88-6.86 (m, 2H), 4.48 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.63-3.44 (m, 9H), 1.65-1.49 (m, 5H), 1.41-1.06 (m, 42H), 0.88-0.84 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.2, 130.6, 129.3, 113.8, 78.1, 73.1, 71.0, 70.1, 70.0, 68.9, 56.3, 39.5, 37.6, 37.6, 37.5, 37.4, 37.4, 372, 36.6, 2.9, 32.9, 29.9, 29.3 (t, *J*<sub>C-D</sub> =18.3 Hz), 28.1, 24.9, 24.6, 24.5, 24.4, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/z calcd for C<sub>51</sub>H<sub>92</sub>D4O4Na [M+Na]<sup>+</sup>: 799.7457, found: 799.7452.



**3'-CD**<sub>3</sub>,**D-archaeol (39)**: To a solution of compound **S5** (135 mg, 0.17 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) and H<sub>2</sub>O (0.2 mL) was added dichlorodicyanoquinone (43 mg, 0.19 mmol). After stirring for 2 h at room temperature, the reaction mixture was diluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and quenched with

sat. NH<sub>4</sub>Cl aq, then water layer was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (×3). The combined organic layer was washed with brine and dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, then filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flush column chromatography on silica gel (gradient EtOAc/Hexane = 1/10 to 2/5) to afford 3'-CD<sub>3</sub>,D-archaeol (**39**) (104 mg, 91%) as a pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.75-3.46 (m, 9H), 1.65-1.48 (m, 5H), 1.47-1.03 (m, 42H), 0.89-0.84 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 78.4, 71.1, 70.2, 68.7, 63.2, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 37.4, 37.2, 36.5, 32.9, 29.9, 29.3 (t, *J*<sub>C</sub> D =19.1 Hz), 28.1, 24.9, 24.6, 24.4, 24.4, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>43</sub>H<sub>84</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 679.6882, found: 679.6873.



**3'-***CD*<sub>3</sub>,*D*-**phophate S6**: Following the same procedure as described for compound **38** with 3'-*CD*<sub>3</sub>,*D*-archaeol (**39**) (80 mg, 0.12 mmol), 3'-*CD*<sub>3</sub>,*D*-labeled phosphate **S6** was obtained as a pale yellow oil (54 mg, 75%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v), using CD<sub>3</sub>OD as the lock)  $\delta$  7.32-7.23 (m, 10H), 5.03-5.00 (m, 2H), 4.66-4.58 (m, 2H), 4.24-4.20 (m, 1H), 4.13-4.07 (m, 1H), 3.96 (bt, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.85 (bt, *J* = 5.0 Hz, 2H), 3.80-3.77 (m, 1H), 3.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 1.5H), 3.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 1.5H), 3.58-3.56 (m, 3H), 3.49 (ddd, *J* = 2.0, 4.0, 5.5 Hz, 1H), 3.43-3.40 (m, 3H), 3.09 (q, *J* = 7.5 Hz, 6H, HNEt<sub>3</sub>), 1.57-1.43 (m, 7H), 1.38-1.03 (49H), 0.84-0.80 (27H); <sup>13</sup>CNMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  138.0, 135.6, 135.6, 128.6, 128.6, 128.5, 128.2, 127.9, 1279, 127., 127.7, 127.6, 79.7, 79.4, 79.2, 78.0, 77.8, 76.6, 72.0, 72.0, 70.8, 69.9, 69.7, 69.7, 68.7, 66.9, 66.9, 65.1, 65.1, 63.5, 63.4, 54.4, 54.3, 54.3, 54.3, 46.3, 39.3, 37.4, 37.3, 37.3, 37.2, 37.1, 36.5, 32.8, 32.7, 32.7, 29.7, 27.9, 24.7, 24.4, 24.3, 22.3, 22.2, 19.4, 19.4, 19.4, 8.3; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>61</sub>H<sub>105</sub>D<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>Na [M-HNEt<sub>3</sub>]: 1083.7702, found: 1083.7686.



**3'-CD**<sub>3</sub>,**D**-phosphatidylglycerophosphate methyl ester (**3'-CD**<sub>3</sub>,**D**-PGP-Me, **2**): Following the same procedure as described for PGP-Me (**1**) with 3'-CD<sub>3</sub>,*D*-labeled phosphate **S6** (20 mg, 17 µmol), desired 3'-CD<sub>3</sub>,*D*-PGP-Me (**2**) was obtained as a white solid (10 mg, 65% in 2 steps). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v)), using CD<sub>3</sub>OD as the lock) δ 4.01-3.96 (m, 7H), 3.73-3.66 (m, 7H), 3.60-3.55 (m, 3H), 1.76-1.56 (m, 6H), 1.50-1.08 (m, 41H), 0.98-0.92 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v)) δ 78.1, 77.8, 70.9, 70.1, 70.1, 70.0, 69.9, 68.7, 66.2, 66.2, 64.7, 64.7, 52.3, 52.2, 39.3, 37.5, 37.3, 37.3, 37.2, 37.0, 36.6, 32.7, 32.7, 29.8, 29.7, 27.9, 24.7, 24.3, 24.3, 22.3, 22.2, 19.4, 19.4, 19.3; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>47</sub>H<sub>93</sub>D<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-2Na+H]<sup>-</sup>: 903.6768, found: 903.6744.



**Tosylate 62**: Pale yellow oil (52 mg).<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.80-7.78 (m, 2H), 7.35-7.33 (m, 2H), 4.10-4.02 (m, 2H), 2.45 (S, 3H), 1.69-1.63 (m, 1H), 1.56-1.48 (m, 1H), 1.44-1.00 (m, 14H), 0.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H), 0.82 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 133.4, 129.9, 128.0, 69.2, 39.4, 37.3, 36.9, 35.6, 32.8, 28.6 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.1 Hz), 28.1, 24.9, 24.2, 22.8, 22.7, 21.7, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 386.2793, found: 386.2785.

HO D 7-CD<sub>3</sub>,D-phytanol (60)

**7-CD**<sub>3</sub>,**D**-phytanol (60): Pale yellow oil (28 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.71-3.63 (m, 2H), 1.64-1.48 (m, 3H), 1.36-1.05 (m, 20H), 0.90-0.84 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 61.3, 40.1, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 37.3, 37.2, 32.9, 32.1 (t, *J*<sub>C-D</sub> =18.1 Hz), 29.6, 28.1, 24.9, 24.5, 24.4, 22.8, 22.7, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>D<sub>4</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 325.3384, found: 325.3373.



**7'-CD**<sub>3</sub>,**D**-archaeol (40): Pale yellow oil (35 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.74-3.60 (m, 3H), 3.56-3.45 (m, 6H), 1.66-1.88 (m, 2H), 1.56-1.47 (m, 4H), 1.47-1.03 (m, 41H), 0.89-0.84 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 78.4, 71.1, 70.2, 68.7, 63.2, 39.5, 37.6, 37.5, 37.5, 37.4, 37.4, 37.2, 36.7, 32.9, 32.3 (t, *J*<sub>C-D</sub> =18.3 Hz), 30.0, 29.9, 28.1, 24.9, 24.8, 24.6, 24.5, 24.4, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>43</sub>H<sub>84</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 679.6882, found: 679.6872.



**7'-CD<sub>3</sub>,D-phosphatidylglycerophosphate methyl ester (7'-CD<sub>3</sub>,D-PGP-Me, 3)**: white solid (7.2 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v)), using CD<sub>3</sub>OD as the lock) δ 4.01-3.90 (m, 7H), 3.72-3.64 (m, 7H), 3.57-3.53 (m, 3H), 1.71-1.54 (m, 6H), 1.47-1.08 (m, 41H), 0.95-0.90 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v)) δ 78.1, 78.0, 77.8, 70.9, 70.1, 70.0, 70.0, 69.9, 68.7, 66.2, 66.2, 64.8, 64.7, 52.3, 52.2, 39.3, 37.5, 37.3, 37.3, 37.2, 37.0, 36.6, 32.7, 32.7, 29.8, 29.7, 27.9, 24.7, 24.3, 24.3, 22.2, 22.2, 19.4, 19.3, 19.3; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>47</sub>H<sub>93</sub>D<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-2Na+H]<sup>-</sup>: 903.6768, found: 903.6750.



Alcohol 64: Pale yellow oil (550 mg). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.80-7.77 (m, 2H), 7.35-7.33 (m, 2H), 4.10-4.01 (m, 2H), 2.44 (S, 3H), 1.67-1.61 (m, 1H), 1.53-1.37 (m, 2H), 1.29-0.99 (m, 6H), 0.84 (d, *J* = 6.8 Hz ,6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.6, 123.2, 129.8, 127.8, 69.1, 39.1, 36.6, 35.5, 28.4 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.1 Hz), 27.9, 24.4, 22.6, 22.5, 21.6; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 339.1908, found: 339.1905.



Alcohol 65: Pale yellow oil (211 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.80-7.78 (m, 2H), 7.35-

7.33 (m, 2H), 4.10-4.02 (m, 2H), 2.44 (S, 3H), 1.70-1.63 (m, 1H), 1.56-1.38 (m, 3H), 1.30-0.98 (m, 12H), 0.86 (d, J = 7.0 Hz , 6H), 0.80 (d, J = 6.5 Hz , 3H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  144.7, 133.4, 129.9, 128.0, 69.2, 39.4, 37.1, 37.1, 35.8, 32.0 (t,  $J_{C-D} = 19.1$  Hz), 29.3, 28.0, 24.8, 24.2, 22.8, 22.7, 21.7, 19.3; HRMS (ESI+) m/z calcd for C<sub>22</sub>H<sub>34</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>SNa [M+Na]<sup>+</sup>: 386.2793, found: 386.2785.



**11-***CD*<sub>3</sub>,*D*-**phytanol (63)**: Pale yellow oil (140 mg). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.72-3.63 (m, 2H), 1.64-1.48 (m, 3H), 1.40-1.00 (m, 20H), 0.90-0.84 (m, 12H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  61.3, 40.1, 39.5, 37.6, 37.5, 37.4, 37.3, 37.2, 32.9, 32.1 (t, *J*<sub>C-D</sub> =18.3 Hz), 29.6, 28.1, 24.8, 24.5, 24.5, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8; HRMS (ESI+) *m*/*z* calcd for C<sub>20</sub>H<sub>38</sub>D<sub>4</sub>ONa [M+Na]<sup>+</sup>: 325.3384, found: 325.3380.



**11'-***CD*<sub>3</sub>,*D*-archaeol (41): Pale yellow oil (92 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.75-3.46 (m, 9H), 1.65-1.48 (m, 5H), 1.47-1.03 (m, 42H), 0.89-0.84 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 78.4, 71.1, 70.2, 68.7, 63.2, 39.5, 37.6, 37.5, 37.5, 37.4, 37.4, 37.2, 36.5, 32.9, 29.9, 29.3 (t, *J*<sub>C-D</sub> =19.1 Hz), 28.1, 24.9, 24.6, 24.4, 24.4, 22.8, 22.7, 19.9, 19.8, 19.8; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>43</sub>H<sub>84</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: 679.6882, found: 679.6873.



**11'-***CD*<sub>3</sub>,*D*-**phosphatidylglycerophosphate methyl ester (11'-***CD***<sub>3</sub>,***D***-<b>PGP-Me, 4**): white solid (7.0 mg). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v)), using CD<sub>3</sub>OD as the lock)  $\delta$  4.01-3.96 (m, 7H), 3.73-3.66 (m, 7H), 3.60-3.55 (m, 3H), 1.76-1.56 (m, 6H), 1.50-1.08 (m, 41H),

0.98-0.92 (m, 27H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD/CDCl<sub>3</sub>(4/3 v/v))  $\delta$  78.1, 77.8, 70.9, 70.1, 70.1, 70.0, 69.9, 68.7, 66.2, 66.2, 64.7, 64.7, 52.3, 52.2, 39.3, 37.5, 37.3, 37.3, 37.2, 37.0, 36.6, 32.7, 32.7, 29.8, 29.7, 27.9, 24.7, 24.3, 24.3, 22.3, 22.2, 19.4, 19.4, 19.3; HRMS (ESI+) *m/z* calcd for C<sub>47</sub>H<sub>93</sub>D<sub>4</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub> [M-2Na+H]<sup>-</sup>: 903.6768, found: 903.6755.

## **III. Solid-state NMR measurements**

### 1) Sample preparation for solid-state NMR measurements

 $CD_3$ , D-PGP-Me derivatives (2.0 mg) was dissolved in MeOH/CHCl<sub>3</sub> (1:1 v/v). After removing the solvent in vacuo for 20 h, the dried membrane film was added with 3.0 µL of 0.1M NaCl aq. and 0.5 mL of distilled water, and then vigorously vortexed to make multilamellar vesicles. The resultant lipid dispersion was freeze-thawed six times, lyophilized, and rehydrated with 0.1M or 5.0M NaCl in deuterium-depleted water to make 60% water (w/w). Then the mixture was again freeze-thawed and packed into disposable high-resolution MAS insert (Bruker, Germany) sealed with Araldite epoxy glue (NICHIBAN CO. LTD, Japan).

## 2) Solid-state <sup>2</sup>H NMR measurement

<sup>2</sup>H NMR spectra were collected on a JEOL (JEOL, Japan) ECA 400 spectrometer equipped with a 5 mm <sup>2</sup>H static probe (Doty Scientific, USA) using a quadrupolar echo sequence.<sup>1</sup> The 90° pulse width was 3.9  $\mu$ s. Relaxation delay and the sweep width were 1.0 s and 140 kHz respectively.

# IV. General procedure for Molecular dynamics (MD) simulations

MD simulations of DPPC and PGP-Me lipid bilayer systems have been conducted for 1µs, respectively. A DPPC bilayer system was composed of 128 DPPC, 4017 water molecules, and a PGP-Me bilayer system was composed of 128 PGP-Me, 9472 water, and 276 Na+ and 20 Clions. The latter system was constructed to simulate the membrane in 0.1M NaCl aqueous solution as in the given experimental condition. The CHARMM 36 force field<sup>2</sup> was employed. The missing parameters for PGP-Me were adopted from the CHARMM General force field.<sup>3</sup> All MD simulations have been carried out using the NAMD software version 2.12.<sup>4</sup> Periodic boundary condition was applied. Pressure was controlled at 1 atm using the Langevin-piston method<sup>5</sup> with the semi-isotropic coupling. Temperatures were set to 323 K and 303 K for DPPC and PGP-Me systems, respectively, using the Langevin thermostat. The cutoff of the nonbonded Lennard-Jones interaction was 1.2 nm with the LJ force switching function applied from 1.0 to 1.2 nm. The Coulomb interaction was calculated using particle mesh Ewald (PME) method.<sup>6</sup> All bond lengths including hydrogen atoms are constrained using the SHAKE algorithm.<sup>7</sup> Time step size was 2 fs. Initial configurations were prepared using the CHARMM-GUI.<sup>8</sup> After equilibrium MD simulation for 10 ns, 1µs production MD runs were carried out. Trajectory data were saved every 10 ps for analyses.

#### V. References

- 1) Davis, J. H.; Jeffrey, K. R.; Bloom, M.; Valic, M. I.; Higgs, T. P. Chem. Phys. Lett. 1976, 42, 390.
- 2) Klauda, J. B.; Venable, R. M.; Freites, J. A.; O'Connor, J.; Tobias, D. J.; Mondagon-Ramirez, C.; Vorobyov, I.; MacKerell, Jr., A. D.; Pastor, R. W. J. Phys. Chem. B, 2010, 114, 7830.
- 3) Vanommslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; MacKerell, Jr., A. D. J. Comput. Chem. **2010**, *31*, 671.
- 4) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781.
- 5) Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. J. Chem. Phys. 1995, 103, 4613.
- 6) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. J. Chem. Phys. 1995, 103, 8577.
- 7) Ryckart, J.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. J. Comput. Phys. 1977, 23, 327.
- 8) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. J. Comput. Chem. 2008, 29, 1859.


VI. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra of synthetic intermediates and products



















































180.0 170.0 160.0 150.0 140.0 130.0 120.0 110.0 100.0 90.0 80.0 70.0 60.0 50.0 40.0 30.0 20.0 10.0 0

73.061 ---- 67.920 ----

41.487 34.570 31.809 31.610 31.411

128.498 127.710 127.619

138.529 -

X : parts per Million : Carbon13








































































0

-20.0

-30.0

-10.0

-40.0

-50.0

-60.0

-70.0

20.0

10.0

abundance 0 0.01

60.0 X : kilohertz : Deuterium

50.0

40.0

30.0









## 謝辞

本研究は大阪大学大学院理学研究科化学専攻生体分子化学研究室で行われたもの であり、本研究を行うにあたり大変多くの方々の御指導、御協力を賜りましたことに 対し、ここに感謝の意を表明させて頂きます。

大変興味深い研究テーマを与えてくださると共に、いつも懇篤なる御指導、ご鞭撻 くださいました村田道雄教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたって、直接の御指導および数多くの御助言を賜りました土川博史助教に深く感謝致します。

研究を行うにあたり、適切かつ丁寧な御助言を頂きました花島慎弥講師に深く感謝 いたします。

研究を進めるにあたり、有意義な御助言を頂き、御指導および御討論頂きました梅 川雄一特任助教に深く感謝いたします。

分子動力学計算を遂行して頂くと共に、数多くの御助言および御討論頂きました名 古屋大学大学院工学研究科 篠田渉准教授に深く感謝いたします。

NMR 測定を行うにあたって多大なご協力を頂きました大阪大学大学院理学研究科技術部 稲角直也博士および戸所泰人博士に深く感謝いたします。

有意義な研究生活を支えて頂きました本研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、経済的、精神的に支えてくださいました家族に深く感謝いたします。

付録

参考論文

Stereoselective synthesis of the head group of archaeal phospholipid PGP-Me to investigate bacteriorhodopsin-lipid interactions. Cui, J.; Kawatake, S.; Umegawa, Y.; Lethu, S.; Yamagami, M.; Matsuoka, S.; Sato, F.; Matsumori, N.; Murata, M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10279-10284.