

| | |
|---------|-----------------------------|
| 氏名（本籍） | 南 雲 明 |
| 学位の種類 | 薬学博士 |
| 学位記番号 | 薬博第 202 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 4 年 3 月 27 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科専門課程 | 東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 薬学専攻 |
| 学位論文題目 | 脂質膜素材としてのホパノイドの利用に関する基礎研究 |

(主 査)

| | | |
|--------|---------|---------|
| 論文審査委員 | 教授 鈴木康男 | 教授 橋本嘉幸 |
| | | 教授 長 哲郎 |

論文内容要旨

ホパノイド (hopanoids) は細菌やある種の植物などに存在するステロール類似構造を持つ 5 環トリテルペノイドの総称であり、その命名は熱帯植物 *Hopea* の樹脂から分離されたことに由来する。地球化学的な研究によると、その類縁化合物は 1 億 5 千万年以前の沈積物 (石炭, 石油, 頁岩, 粘土) 中にも広く存在し (geohopane), その総量は $10^{11} \sim 10^{12}$ トンに達すると推定される。沈積物中のホパン誘導体は 150 種以上に達し、その生因は不明であるが、化学構造からみると、微生物の最終的分解物ではないかと考えられる。細菌からも様々な誘導体が発見され、これまでにアミノ酸, グルコサミン, カルバミン酸などの付加体やアデノシンの結合したものなどが確認されている。原核生物におけるホパノイドの存在意義としては、物理化学的性質及び構造類似性から、真核生物におけるステロール類と同様、生体膜の維持に重要な役割を果たしているものと推定される。本研究は、このようなホパノイドの物理化学的性質を更に明らかとし、これを新しい膜素材として利用することを目的とした。

(1) ホパノイドの分離・精製

ホパノイドは、ほとんどが疎水性の基本骨格に極性物質の付加した両親媒性分子として存在し、多種の誘導体の共存などにより、単一のホパノイドを多量に得ることは困難である。そこで、まずホパノイドの量的確保を目的として、その分離精製法について検討した。その結果、放線菌 *Streptomyces carzinostaticus* var. F-41 から diploptene (Dipl), 紅色非イオウ細菌 *Rhodopseudomonas palustris* A から 35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol (ABHT) 及び bacteriohopane-32-mono-ol (BHM) の効率的な分離精製法を確立した。これらのホパノイドのうち、BHM は cholesterol (Chol) との構造類似性などから、脂質膜における基礎的知見を得るために最適の物質と考え、以下これを用いて実験を行った。

(2) Bacteriohopane-32-mono-ol とリン脂質との相互作用

ホパノイドとリン脂質との相互作用を明らかにすることを目的として、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) で構成されるリポソームに BHM を組み込むことにより、その安定性に及ぼす影響を検討した。リポソームはリン脂質を水中に懸濁させたときに得られる閉鎖型の小胞であり、膜構造や膜透過研究の人工モデル膜として利用することができる。ここでは、蛍光物質 6-carboxyfluorescein (CF) を封入したリポソームを逆相蒸発法により調製し、CF の経時的漏出を安定性の指標とした。また、リポソームの安定性は構成するリン脂質の相転移温度 (T_m) を境にして大きく変化するので、DPPC の相転移温度 (41°C) を挟んだ 2 種の温度 (37°C , 45°C)

における BHM の効果を Chol のそれと比較した。その結果、BHM も Chol と同様リポソームを安定化する作用のあることが明らかとなったが、いくつかの点で両者の作用に相違点が認められた。特に BHM 添加リポソームは Chol のそれに比べ熱感受性が低く、BHM は温度に対して抵抗性のある膜を形成することが示された。

(3) 膜流動性に及ぼす bacteriohopane-32-mono-ol の影響

BHM の膜安定化作用は chol と比較していくつかの相違点を持つ。この機構を明らかにするため、リポソームの安定性に大きく寄与する膜流動性に着目し、これに対する BHM の影響を電子スピン共鳴法 (ESR) により検討した。本法は、脂質分子に安定なラジカルを含むスピラベル剤を結合させたものを、脂質膜に組み込んで ESR スペクトルを記録し、そのラジカルならびに周辺の状態を解析する方法である。まず、膜表面領域の状態に関する情報を得るため、5-spin labeled stearic acid (5-SASL) を膜に取り込ませた。一般に、ニトロキシド基がカルボキシル基に近いときは分子軸まわりの回転運動が主となる。膜流動性の指標として、膜内におけるラジカルの配向度に直接関係するパラメーターである maximum splitting value を用いた。DPPC では Chol の添加により、測定した温度範囲では maximum splitting value がすべて上昇し、膜流動性の減少することが観察された。Chol の代わりに BHM を添加すると、膜流動性は T_m 以上でわずかに減少したが、BHM 20mol% 添加 DPPC リポソームでは T_m 以下で膜流動性が著しく増加し、さらに温度を上昇させてもその流動性は大きな変化を示さなかった。ゲル状態にある膜は Chol 含有率 20mol% を critical point としてその性質を大きく変えることが知られているが、これは 20mol% までは Chol が膜内に不均一に分布しており、Chol・リン脂質混合相のほかにリン脂質のみからなる相も共存するためと考えられている。BHM も 20mol% までは膜内における分布が不均一となり、これが流動性を増加させる原因の 1 つと考えられる。つぎに、膜内部領域の流動性におよぼす BHM の影響を検討するため、16-spin labeled stearic acid (16-SASL) を用いて同様の実験を行った。16-SASL はニトロキシド基がカルボキシル基から遠いため、その運動は多数の C-C 軸まわりの運動やトランス-ゴーシュ変換などの総和となる。また、膜流動性の指標としては、低磁場側と中心磁場のピークの高さの比、すなわち $h(+1)/h(0)$ を用いた。Chol 添加リポソームでは、その膜流動性が T_m 以下では増加し (fluidizing effect)、 T_m 以上では減少 (condensing effect) した。また、その効果は Chol 含有率の増加とともに大きくなった。このような 2 面性をもつ Chol の作用は、脂質 2 重層が Chol によってゲルでも液晶でもない中間状態になるためと考えられている。BHM 添加リポソームでは、 T_m 以下での fluidizing effect はみられたが、 T_m 以上での condensing effect は観察されなかった。BHM の膜内部領域流動性におよぼす影響は Chol に比べて小さく、特に T_m 以下では未添加のものとは

とんど変わらなかった。Egg PCでは、膜表面及び膜内部のどちらの領域においてもその流動性にはほとんど影響を及ぼさなかった。脂質2重層の炭化水素鎖領域は液晶状態で高い流動性を持ち、それはリン脂質の head groups から遠くなるほど大きくなると考えられる。Chol はアシル鎖の端部にまでその影響をおよぼすが、BHM ではその効果は小さかった。

Chol は環構造部分の片側だけにメチル基を持つのに対し、BHM はその両側にメチル基を持つ。また、極性基 (—OH) の位置が Chol では環構造部分に、BHM では側鎖にあるため、膜内における存在状態は互いに逆向きであると考えられる。このような、構造上及び膜内における存在状態の違いが、BHM に特有の効果をもたらす原因であると推測される。

B. acidocaldarius などの好熱細菌には分岐脂肪酸や ω -シクロヘキサン脂肪酸を含むリン脂質が存在し、これらリン脂質は T_m 以上で直鎖の脂肪酸を含む DPPC などより凝集した膜を形成する。これはその脂肪酸残基がかさだかで、 T_m 以上ではより配列性が高く流動性の低い液晶状態を形成するためと考えられている。したがって、ホパノイドとこのようなリン脂質を組み合わせることが、高温でこれら細菌の生体膜を維持するために必要となるのであろう。

(4) Bacteriohopane-32-mono-ol の細胞毒性

BHM を含むリポソームは高い安定性を示すため、薬物担体として薬剤学領域への応用が考えられるが、これを動物に投与しようとするとき、その安全性が問題となる。BHM は構造及び脂質膜に対する作用が Chol に類似しているが、真核生物における体内動態については全く不明である。そこで、ホパノイドの安全性を検討するための予備的実験として、*in vitro* でマウス白血病細胞に及ぼす BHM の影響について検討した。マウス白血病細胞 L1210 及び P388 を BHM 存在下で培養し、72時間後の細胞数を計測して、これら細胞の増殖に及ぼす BHM の影響を調べた。BHM はこれら細胞の増殖を濃度依存的に抑制し、それぞれの細胞増殖を50%阻害する濃度 (IC_{50}) は $22 \mu M$ および $19 \mu M$ であった。また、BHM $25 \mu M$ を含む培地中で L1210 を120時間培養したが細胞の増殖は認められなかった。位相差顕微鏡による観察結果から、BHM は細胞破壊的に働くものと考えられる。細胞障害性のある物質の中で、界面活性剤様の作用を示す生理活性物質は、脂質2分子膜に構成脂質成分と同様の配向性で取り込まれ、これにより膜の integrity が崩れ毒性を示す。BHM はその物理化学的性質などから、脂質膜を直接崩壊に導くとは考えにくい。したがって、BHM の毒性機構は脂質膜への直接的な障害ではなく、脂質膜の性質の変化によって引き起こされる2次的影響によるものと考えられる。Chol の酸化によって生成する oxysterol は、細胞内の DNA 合成やタンパク合成を阻害するが、HMG-CoA 還元酵素の活性を阻害することから、細胞のステロール代謝に対する影響も考えられる。しかしその詳細な毒性機構については、未だ解明されていない。BHM においても Chol を共存させることによりわずかに

毒性が抑制されることから，Chol の代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

以上のように，BHM は新しい膜素材としての利用が期待できるだけでなく，哺乳動物細胞に対する生理活性物質でもある。したがってその機構を解明することにより医薬品としての利用も考えられる。また，様々な側鎖を持つ他のホパノイドについても，それぞれが多様な性質を持つことが考えられ，その応用範囲は広いと考えられる。

審査結果の要旨

ホパノイドは原核生物から分離されるトリテルペノイドの総称であり、細菌からも種々の誘導体が検出されている。これらはその化学構造から、ステロール類似物質として、ステロール類の存在しない生物の細胞膜の構造維持に重要な役割を果していると考えられているが、その物理化学的な性質や生理作用についての研究はほとんど行われていない。

本研究は、まず数種の細菌から種々のホパノイドを効率よく分離精製する方法を検討し、diploptene, 35-aminobacteriohopane-32,33,34-triol, bacteriohopane-32-mono-ol (BHM) を分離するための簡便な方法を確立した。またその物理化学的性質と含量や収率の観点から、人工脂質膜の素材として利用が可能であるのは、BHMであることを明らかにした。

つぎに、BHM を dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を主構成成分とする脂質膜に組み込んでリポソームを作製し、得られるリポソーム膜の性質に及ぼす影響を検討した。その結果、BHM の共存はその含有率の増加に伴い、強く膜を安定化することを明らかにした。この作用は、従来から真核生物の膜安定化物質としてよく知られているコレステロールよりも強く、とくに相転移温度以上の高温においても著しい膜安定化作用を持っていた。従って BHM は、温度変化に対して抵抗性のある膜を作製するための素材として利用できると考えられる。

さらにこの BHM の膜安定化の機構を知るため、その添加が脂質膜の流動性にどのような影響を及ぼすかを、ESR 法で検討した。その結果、DPPC 膜では BHM の共存によって、脂質膜表面領域および中央領域の流動性のいずれも、温度の上昇による変化は未添加の場合の変化と変わらないことが分かった。このような物性変化に対する影響は、コレステロールでは認められない効果であり、ホパノイドの膜中での存在状態はステロール類とは異なっていることを示唆している。従って BHM を組み込むことにより、従来の膜素材では得られない人工膜が作製できる可能性があり、種々の細胞の性質を解明するための新しい生体膜モデルが構築できるものと考えられる。

また、リポソームを薬物担体として薬剤学的に利用する場合を考え、ホパノイドの安全性を培養細胞を用いて検討した。その結果、BHM にはマウス白血病細胞に対する細胞障害作用が認められた。この細胞障害作用は、コレステロールが共存すると軽減されるので、ホパノイドはステロール類などの脂質代謝に対してもなんらかの作用を有していることが示唆された。

以上本研究は、ホパノイドを分離してその生体膜中における存在意義を解析し、高等動物に対する生理活性を初めて明らかにしたものであり、これらを新しい膜素材として利用する際に役立つ研究であると考えられる。ホパノイドとして現在多種類の化学構造の物質が分離されており、それぞれが異なった物性と生理作用を有しているものと考えられるので、その端緒となる本研究は、学位を与えるに十分な内容であると判断する。