

合成糖脂質の超分子集合体に関する研究

早稲田大学 理工学部

武岡 真司

Amidic glycolipids, 1,5-bis-O-alkyl-N-maltooligonoyl-L-glutamate (**1**), having various lengths of two hydrocarbon chains (carbon number, *m*: 14, 16, 18) and maltooligotose (glucose unit, *n*: 3, 5, 7) and N-glycosidic lipid, 1,5-bis-O-octadecyl-N-maltopentaosyl-L-glutamate **2** were synthesized. The assembling structures were analyzed by microscopic observation such as negatively stained TEM, cryo-TEM, and AFM. The glycolipid **1a** (*m,n*: 14,5) showed a fiber-like structure, while **1b** (16,5) showed a fiber-like structure when the hydrating temperature was above the gel-to-liquid crystalline phase transition temperature (T_c) and a large disk-like structure when incubated below the T_c . The glycolipid **1c** (18,5) took a large disk-like structure by hydrating the powder above the T_c . The glycolipids **1d** (18,3) and **1e** (18,7) showed the mixture of large disks and large vesicles and the mixture of small disks and micelles, respectively. While, N-glycoside lipid **2** made vesicular structure only.

Preparation procedure using high shear stress such as extrusion or sonication converted the large disk of **1c** to the smaller assemblies such as small disk, cone, and granule-like assemblies, having low molecular packing states. The glycolipid molecules in the plane part of the disk were packed so tight that the segmental mobility was very low even above the T_c ; and the reactivity of the saccharide chain against Concanavalin A (ConA) was also very low. These data indicate that high reactivity should come from the loose packing of saccharide chains around the edge part of the assemblies.

The disks make a unique supramolecular assembling structure by complex formation with ConA. The stacking of several disks forms a rouleaux-like structure, and the structures further assemble to construct hyperbranched three-dimensional aggregates. This supramolecular assembly would be a model of an extracellular matrix, an effective matrix to keep bound water, or a material which releases hydrophilic or hydrophobic substances with controllable rates.

1 緒言

細胞表面に局在する糖鎖は、生体系において情報の担持と伝達の役割を担っている。例えば、抗原抗体反応、細胞間認識(接着と融合、接触阻害)、細胞の分化などにおいて、その情報伝達機能が分子レベルで明らかにされてきている。本研究では分子構造と分子認識からその生理活性を追及する糖鎖工学的手法に対して、糖脂質自体の物理化学的な性質に焦点を当て、単純構造の合成糖脂質が形成する分子集合形態に関する基礎知見を得ることを目的としている。既に、オリゴ糖の還元末端に疎水基を導入して構造の明確な糖脂質の簡便合成法を確立し、構造(糖鎖の長さや結合様式、疎

水部のアルキル鎖長や糖鎖との結合)の異なる一連の糖脂質を合成、これがリン脂質小胞体の分散安定度の向上や凍結融解操作に対する安定度向上に寄与することを報告している^{1~3)}。更に糖脂質集合体をレセプター蛋白質(ConA)と複合させて超分子集合体を形成させることができた⁴⁾。これは細胞外マトリックスや新しい薬物保持・徐放材料の構築に対して工学的な手法を与えることが期待される。

2 実験

2.1 試料

実験に用いた2種類の糖脂質構造を Figure 1 に示す⁵⁾。ここで、アルキル鎖がグルタミン酸のカルボン酸基とエステル結合した中間体が糖鎖末端とアミド結合した amidic glycolipid 系を **1**、アミノ結合した N-glycosidic lipid 系を **2** とした(Figure 1)。1 に関してグルコース単位数 3, 5, 7, アルキル鎖炭素数 14, 16, 18 を組み合わせた糖脂質を合成した。



Research on Supramolecular Assemblies of Synthetic Glycolipids
Shinji Takeoka
School of Science and Engineering,
Waseda University

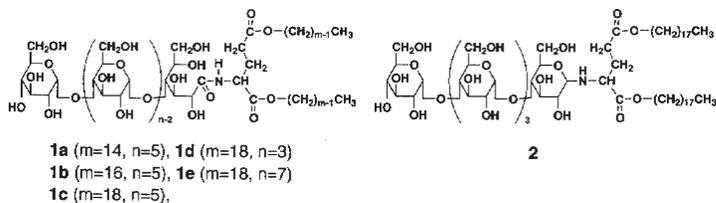


Figure 1 Structure of synthetic glycolipids.

2.2 分子集合形態の観察

透過型電子顕微鏡 (TEM, JEOL JEM-100CX), Cryo-TEM (Philips, CM12), 原子間力顕微鏡 (AFM, Digital Instruments Nanoscope II) について各々の常法に従って試料を作成し, 集合体形態を観察した. 透過型電子顕微鏡観察ではリンタンゲステン酸あるいはモリブデンアンモニウムをネガティブ染色剤とした.

2.3 $^1\text{H-NMR}$ 測定による分子充填状態の解析

D_2O に糖脂質を分散させて集合体 (2mM) を形成, DMSO を糖脂質に対し 2mol% を外部参照として添加し, $^1\text{H-NMR}$ (JEOL JNM-LA500) にて 25°C から 70°C までの各温度にて測定した.

2.4 等温型滴定熱量分析による *ConA* との結合解析

等温型滴定熱 分析には Microcal 社の MCS ITC を用いた. *Concanavalin A* (*ConA*) (0.812mM) 溶液を糖脂質分散液 (0.8mM) に滴下した際の熱から会合定数 (K), エンタルピー変化 (ΔH), 結合数 (n) を計算した.

3 結と考察

3.1 糖脂質分子構造と集合形態

アミド結合糖脂質 1 の粉末に純水を添加してゲル-液晶相転移温度 T_c 以上で静置すると, 自発的に分散し集合体を形成する. 1a

では静置温度が T_c 以上の場合に繊維状 (幅 8.4nm, 厚さ 10nm) の集合体を形成し, T_c 以下の場合には大きな円盤型 (直径約 180nm) の集合体 (Figure 2 (b)) となる. AFM 観察によると膜厚は 9nm であり, 糖脂質の

二分子長 (10nm) とほぼ一致し, これが二分子膜であることを確認した. 1c では T_c 以上で分散させると静置温度に関係なく大きな円盤型二分子膜を形成した. また, 1d と 1e は各々, 大きな円盤型二分子膜と大きな二分子膜小胞体の混合系, 小さな円盤型二分子膜と球状ミセルの混合系であった. この様に集合形態はアルキル鎖長の伸長に伴い繊維状→円盤型二分子膜へと変化し, 糖鎖長の伸長に伴い小胞体→大きな円盤型二分子膜→小さな円盤型二分子膜, ミセルへと変化する傾向が認められた (Table 1). これは, 糖脂質の糖鎖部の割合が相対的に大きくなるに従って, 曲率の小さな円盤や小胞体から曲率の大きな集合形態 (小さな円盤, 繊維, ミセルなど) へ変化することを示している. 他方, N-glycoside lipid 2 では二分子膜小胞体構造のみが確認された.

更に調製方法 (分散エネルギーの大きさ) によってとり得る集合形態が異なることを見出した. 例えば, 糖脂質 1c では (i) T_c 以上での分散静置にて大きな円盤状二分子膜 (平均直径 400nm)

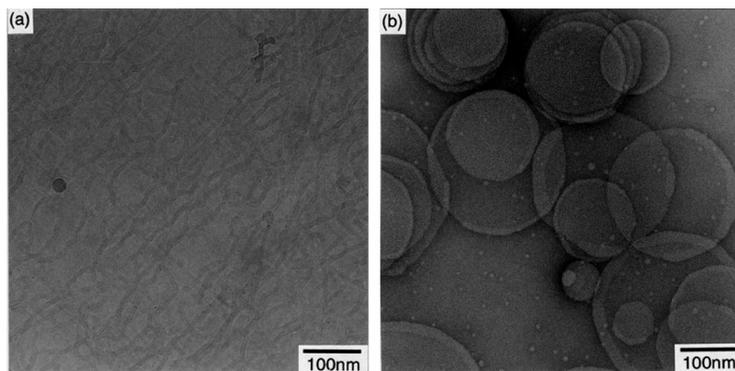


Figure 2 Microscopic observation of glycolipid assemblies. (a) Cryo-TEM of fiber-like assemblies (1a), (b) TEM of large disk-like assemblies (1b) below T_c .

Table 1 The areas per molecule, collapse pressures of glycolipids, and physical properties of the glycolipid assemblies.

glycolipids	molecular area at 30mN/m ¹⁾ (Å ²)	collapse pressure ¹⁾ (mN/m)	CMC ¹⁾ (mM)	T _c (°C)	ΔH (kcal/mol)	assembling structures
1a	56.0	44.0	0.72	non	—	fiber
1b	59.0	51.1	0.47	45	4.8	large disk (<T _c), fiber (>T _c)
1c	51.5	52.3	0.0083	58	8.1	large disk, small disk, grain, and cone
1d	47.5	51.8	0.015	57	6.6	vesicle and large disk
1e	soluble	soluble	0.82	non	—	spherical micelle and short fiber
2	52.0	50.0	<10 ⁻²	54 66	1.3 10.6	vesicle

¹⁾ 25°C in pure water

A を形成, (ii) これを均一孔径のメンブランフィルター (孔径 0.1 μm) に強制的に透過させると小さな円盤状二分子膜 (平均直径 50nm) B, あるいは楕円状, 棒状形態が観測されるが、同一視野の傾斜観察から楕円状, 棒状体は小さな円盤状集合体の縁部であることが明らかになった (Figure 3 (a)). (iii) B に超音波照射を行なうと顆粒状 (長径 18nm, 短径 9nm) のミセル C が得られた (Figure 3 (b)).

3.2 分子動力学計算による集合形態の考察

分子力学計算 (Discover 97.0, msi 社) による 1 の分子構造は, 螺旋状オリゴ糖鎖がアルキル鎖からみた分子軸に対して大きく屈曲した構造が最も安定であった (Figure 4 (a) - (i)). アルキル

鎖軸にほぼ沿った構造 (Figure 4 (a) - (ii)) が 6.9kcal/mol のわずかな差でこれに続いた. これは疎水部に結合している糖が開環しており糖鎖配向の自由度が大きいためである. 他方, 閉環構造の 2 はほぼアルキル鎖軸に沿った構造 (Figure 4 (a) - (iii)) をとった. 次に 1 の屈曲構造分子 (i) を 40 分子水中に分散させて動力学計算を行ったところ, 曲率の高い楕円ミセル様集合構造を形成した (Figure 4 (b)). また, 伸長構造 (ii) では二分子膜を形成した. 従って, 1 では屈曲構造の分子の集合が二分子膜縁部の安定化に寄与できるために, 円盤状の集合形態 A, B が可能であり, 更にこれを高エネルギーにて分散させると全ての分子が屈曲構造となり顆粒状ミセル C として安定化する機構が考察される. また, 円盤状集合体に水素結合を切断する尿素を添加するとミセル状に

形態変化することから, この円盤形態の安定化には糖鎖間の水素結合も寄与していることが示唆された.

3.3 ¹H-NMR による分子セグメント運動の測定

1c の 3 種類の集合体について, ¹H-NMR のピーク強度 (半幅値) の測定から各集合体における糖脂質分子各部の運動状態 (これは分子充填状態に関係する) を検

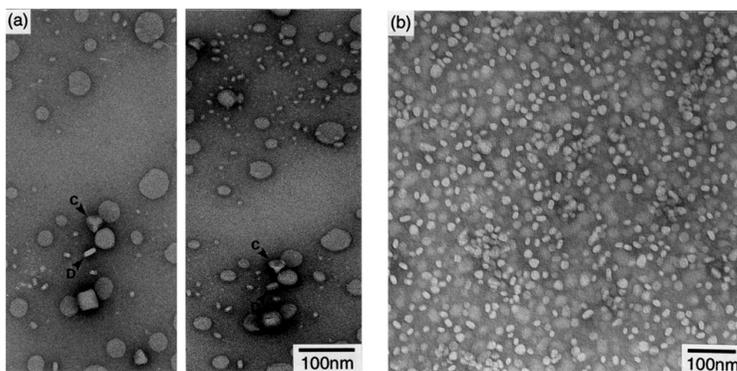


Figure 3 Microscopic observation of glycolipid assemblies (1c). (a) Two TEMs of small disk-like assemblies changing the observation angle with 45 degree. Arrows C and D in the pictures indicate cone- and disk-like assemblies, respectively. (b) TEM of granule-like assemblies.

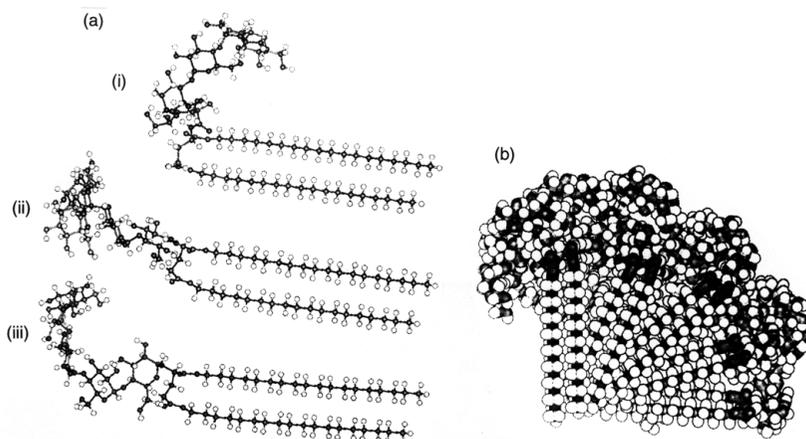


Figure 4 Simulation of glycolipid structure and its molecular assembly. (a) Structure of (i) 1c bending, (ii) 1c stretching, (iii) 2. (b) A part of granule-like assembly of 1c with the bending structure.

討した (Figure 5). A では相転移温度 (58°C) 以下では糖鎖 (3.2~4.0ppm), アルキル鎖 (0.8, 1.2ppm) プロトンのピークは観測されず, 相転移温度以上でアルキル鎖プロトンのピークが僅かに観測されたのみであった (Figure 5 (a)). これは分子充填状態が高くセグメント運動が著しく抑制されていることを示している. B では相転移温度以下でも糖鎖, アルキル鎖の幅広なピークが観測

され, 温度上昇に伴いピーク強度は増大, 縁部の乱れが中心部まで及んでいることが示唆された (Figure 5 (b)). C では低温域でも糖鎖, アルキル鎖のピーク強度は大きく, 温度上昇に伴いアルキル鎖のピーク強度が大きく増大した (Figure 5 (c)). 従って, 分子充填状態は大きな円盤状二分子膜→小さな円盤状二分子膜→楕円球状ミセルの順に低下し, 高エネルギーで分散

3. 4 等温滴定型微小熱量分析による糖鎖認識の解析

分子充填状態の異なる糖脂質集合体 A, B, C について, 分子内に4つ糖認識部位を持つ蛋白質

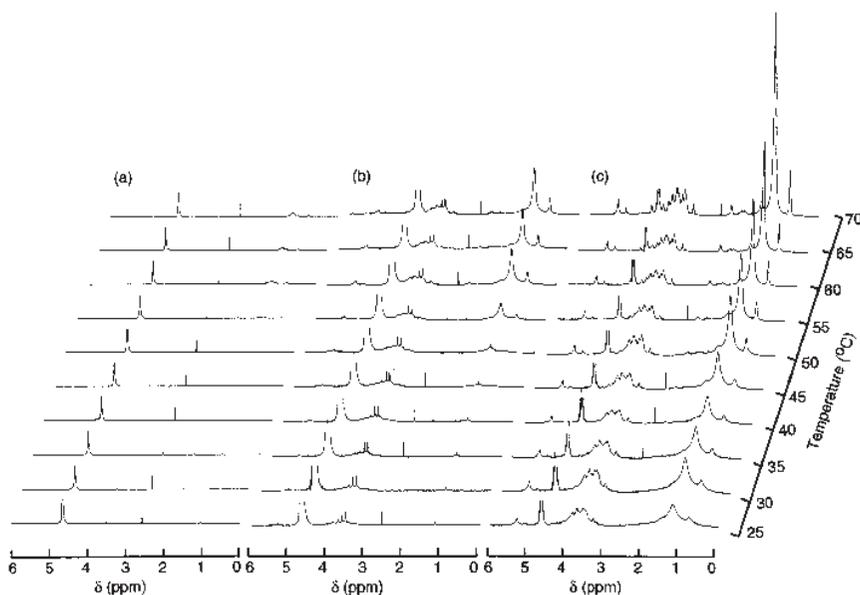


Figure 5 Temperature dependence of segmental motion in glycolipid assemblies obtained from $^1\text{H-NMR}$ spectra of their D_2O dispersions. (a) Large disk-like assembly A, (b) small disk-like assembly B, (c) granule-like assembly C.

Table 2 Thermodynamic parameters of the binding of Con A to various glycolipid assemblies at 25°C .

preparations	main assembling structure	binding ratio (glycolipid/Con A)	binding constant K (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)
(i)	large disk	ca. 303	$(6.1 \pm 1.6) \times 10^4$	-22.4 ± 40.6
(ii)	small disk	43.5 ± 0.9	$(2.6 \pm 0.4) \times 10^4$	-16.2 ± 3.8
(iii)	grain	25.9 ± 2.0	$(5.8 \pm 0.9) \times 10^4$	-25.9 ± 2.5

(ConA) に対する複合体形成能を等温滴定量微小熱量分析を用いて解析した (Table 2). 各集合体分散溶液と ConA 水溶液を混合すると直ちにしますが, 濁度上昇度は C>B>A の順で大きかった. 結合定数と ΔH は A と C でほぼ等しい値を示したが, A への ConA の結合量は C と比較して 9% 程度に過ぎなかった. 一方, B では結合定数, ΔH は A や C に比較して小さな値であったが, ConA の結合量は A, C の中間値であった (C の 60% 程度).

以上の結果から, 分子充填状態の最も低い C では集合体全体に ConA が結合できるが, A ではその大部分を占める分子充填状態の高い平板部には ConA は結合できず, C と類似の分子充填状態を持つ縁部に限定されると推測される. B では縁部の乱れが中心部まで及んでおり, 縁部だけでなく平板部にも ConA が結合するが, その結合定数, 結合量は縁部ほど高くないと考えられる.

3.5 円盤型集合体と ConA からなる超分子集合体

小さな円盤型集合体 B に対して, 構成糖脂質と当モル量の ConA を加えると白濁し沈殿物を形成する. これを TEM 観測すると Figure 6 に示した様に 3~5 個の円盤が連なった連鎖構造を単位として主に側面-平面結合を主とする多分岐状の超分子集合体が観測された. 円盤の間隔は 8 nm

であり, ConA 一分子に相当する. また, 円形構造は紙面に対して垂直に伸びた連鎖構造体と推測され, これが 3 次元構造物であることを示唆している. 側面を結合サイトとする集合体は, 前述したように縁部に ConA が多く結合しており, これが架橋構造を取り易い自由度を持っているためと考察される. もし, 平面部に ConA が結合し易い充填構造をとるのであれば, カラム状の超分子集合体が得られるであろう.

4 総括

単純ではあるが, 従来にない親疎水結合構造を持つ一連の糖脂質を合成し, 分子構造と分子集合形態との間の相関について検討した. 親水部が大きく自由度の高い構造の分子では, 曲率の大き

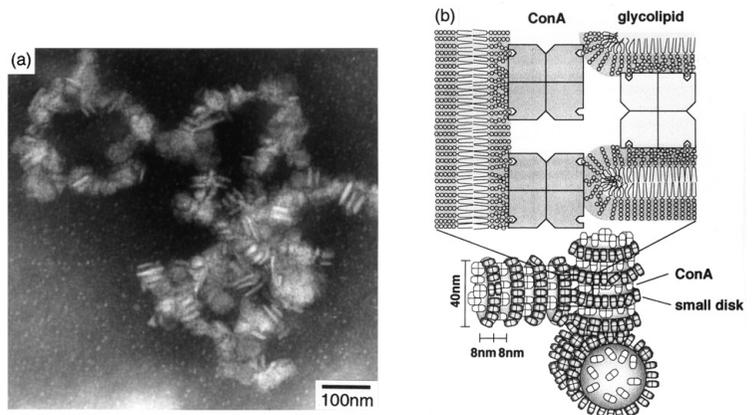


Figure 6 Rouleaux-like structure prepared by the addition of a Con A aqueous solution to the dispersion of disk-like assemblies of 1c. (a) TEM photograph, and (b) estimated illustration. The structure would be constructed by crosslinking between the plane sides or between the plane sides and edge parts of the disk by four binding sites of ConA for the glycosyl group of 1c.

な集合形態と充填状態の高い平板状態の両極端が可能となるため、円盤型集合体を得られ、これを分子動学的にシミュレーションできた。調製時のエネルギーが高くなるほど、より分子充填状態の低い集合形態へと変化し、*ConA* との結合性が高くなった。また、*ConA* と円盤型集合体を複合させることにより3次元多分岐状超分子集合体を得られた。これは細胞外マトリックスモデルあるいは結合水を有効保持できる新しいマトリックス、水溶性・疎水性薬剤の徐放材料などの応用が期待できる。

引用文献

- 1) Takeoka S, Sakai H, Takisada M, et al., :Inhibition of intervesicular aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of dialkyl oligosaccharide glycerol, Chem. Lett., 1992, 1877-1880.
- 2) Takeoka S, Sakai H, Ohno H, et al., :Inhibition effect of aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of glycolipids, J. Colloid Interface Sci., 152, 351-358, 1992.
- 3) Sakai H, Takisada M, Takeoka S, et al., :Cryoprotection of synthetic glycolipids for phospholipid vesicles, Chem. Lett., 1993, 1891-1894.
- 4) Takeoka S, Sou K, Ohgushi T, Tsuchida E, :Disk-like assemblies of a synthetic glycolipid and their association with Concanavalin A, Supramol. Sci., 5, 159-162, 1998.
- 5) Takeoka S, Sou K, Boettcher C, Fuhrhop J-H, Tsuchida E, :Physical properties and packing states of molecular assemblies of synthetic glycolipids in aqueous dispersions, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 94, 2151-2158, 1998.