

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	古細菌大環状脂質の合成及び膜機能に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	荒川賢治
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第4190号, 授与年月日:1999年9月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柿沼 勝己
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第4190号, Conferred date:1999/9/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

古細菌大環状脂質の合成及び
膜機能に関する研究

1999

東京工業大学大学院理工学研究科化学専攻

荒川 賢治

目次

第 1 章 序論	1
第 2 章 McMurry 反応を用いた古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の合成	
2-1 はじめに	17
2-2 イソプレン鎖の改良合成法の開発	25
2-3 McMurry 反応による 36 員環脂質の合成	27
2-4 古細菌非環状ジエーテル型脂質の合成	29
2-5 まとめ	34
第 3 章 オレフィンメタセシス反応を用いた古細菌大環状脂質の全合成	
3-1 はじめに	35
3-2 ジエンの閉環メタセシス反応による 36 員環形成及び 開環メタセシス反応の検討	42
3-2-1 合成計画	42
3-2-2 36 員環形成及び開環メタセシス反応の検討	44
3-3 ジエンの分子間メタセシス反応及び非環状トリエンの 閉環メタセシス反応による 72 員環形成	49
3-3-1 合成計画	49
3-3-2 72 員環形成の検討	50
3-4 まとめ	53
第 4 章 大環状リン酸ジエステル型モデル化合物の合成及びその脂質膜 の性質	
4-1 はじめに	54
4-2 リン酸ジエステル型モデル化合物の合成	60
4-3 脂質膜の性質	64

4-3-1	リポソームの調製法	65
4-3-2	電子顕微鏡による観察	67
4-3-3	熱分析 (DSC)	68
4-3-4	水分散液の赤外吸収スペクトル	71
4-3-5	単分子膜の分子占有面積	72
4-3-6	蛍光偏光解消	74
4-4	まとめ	78
第 5 章 古細菌 36 員環脂質の脂質膜の性質		
5-1	はじめに	80
5-2	極性基の導入	83
5-2-1	ホスホコリン化	83
5-2-2	糖脂質誘導体化	84
5-3	脂質膜の性質	86
5-3-1	光学顕微鏡によるリポソームの観察	87
5-3-2	熱分析 (DSC)	89
5-3-3	単分子膜の分子占有面積	91
5-3-4	炭化水素鎖の運動性	92
5-3-4-1	DMPC- d_{27} 混合配向膜の NMR 解析	94
5-3-4-2	重水素化ジエーテル型リン脂質の合成	96
5-3-4-3	配向膜の NMR 解析	98
5-3-5	蛍光偏光解消	99
5-3-6	リポソームの水透過性	102
5-3-6-1	エクストルーダーによるサイジング処理	102
5-3-6-2	リポソームの水透過性	103
5-3-7	リポソームのプロトン透過性	107
5-3-8	リポソームの熱安定性	112
5-3-8-1	メタン菌の培養及び極性脂質の抽出	112
5-3-8-2	リポソームの熱安定性	113

5-4	まとめ	120
第6章 古細菌 72 員環モデル化合物のリン脂質誘導体化及びその性質		
6-1	はじめに	123
6-2	リン脂質誘導体化	126
6-3	脂質膜の性質	129
6-3-1	熱分析 (DSC)	129
6-3-2	分散液の ^{31}P -NMR	131
6-3-3	電子顕微鏡観察	135
6-4	まとめ	137
第7章 総括		
		140
実験の部		
		143
参考文献		
		205
謝辞		
		215

第 1 章 序論

約 40 億年前に地球上に生命体が誕生して以来、生物は地球環境の変化に応じ様々な進化を遂げてきた。これら多種多様な生物の中には、非常に特殊な環境を好んで生育する生物がある。例えば、海底火山，湖沼，水田，ルーメン（反芻動物の第一胃）などの絶対嫌気性環境下メタンを生成する際にエネルギーを獲得するメタン生成細菌や、炭坑のボタ山（50~70 °C, pH 2），酸性温泉，浅海底硫気孔などで見出される好熱好酸菌、塩蔵魚の赤い斑点（ピンク・アイ），天日塩田，塩湖などで見出される高度好塩菌などが挙げられる^{1,2)}。一例として、図 1-1 に石川県能登の塩田土壌から Horikoshi らにより世界で初めて単離された、三角形平板状の形態を有した高度好塩菌の写真を示す^{2d)}。

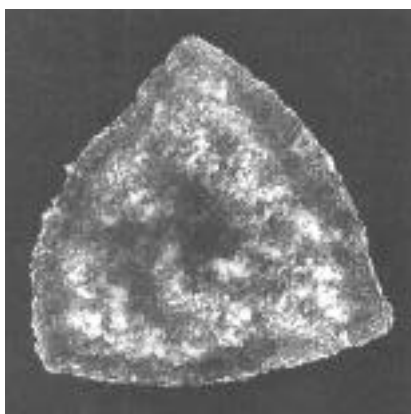


Figure 1-1 好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株の電子顕微鏡写真

直接相互に関連性が見られないこれらの微生物は現在、同一の生物群であることが分かっている。1977 年微生物分類学者 Woese らが、すべての生物に共通の生体高分子であるリボソーム小サブユニットの RNA（原核生物では 16 S rRNA，真核生物では 18 S rRNA）塩基配列を指標にして分類したところ、メタン菌同士の類縁性係数 S_{AB} は 0.25

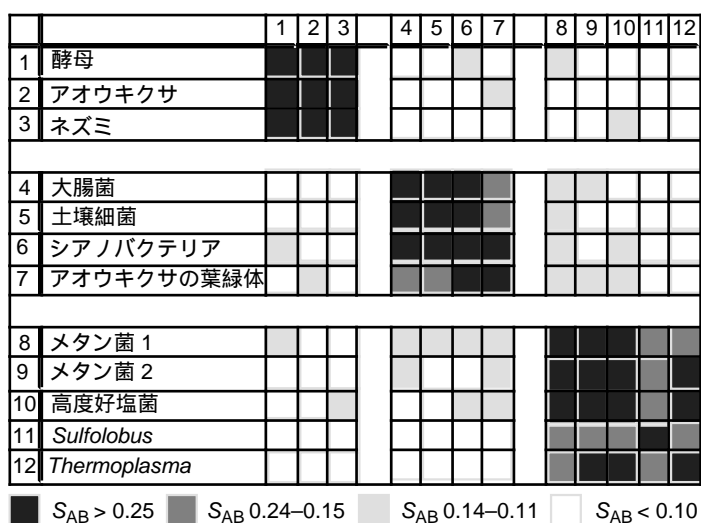


Figure 1-2 リボソームの構造類似性

以上 (図 1-2) と十分大きく、近縁種であることを示したが、メタン菌と従来から知られていたふつうの細菌 (真正細菌) との S_{AB} は、真正細菌と真核生物との間の S_{AB} と同じくらい小さいことを発見した^{1a)}。このことはメタン菌が真正細菌と全く系統関係のかけ離れた生物種であることを示すものである。この結果に基づいて Woese らはそれまでの生物界二分法に代わり、従来の真核生物 (Eukaryotes そののち Eucarya), 真正細菌 (Eubacteria そののち Bacteria) に ”古細菌 (Archaeobacteria そののち Archaea) ” を加えた三大生物系統を提唱した¹⁾。その系統樹を図 1-3 に示す。

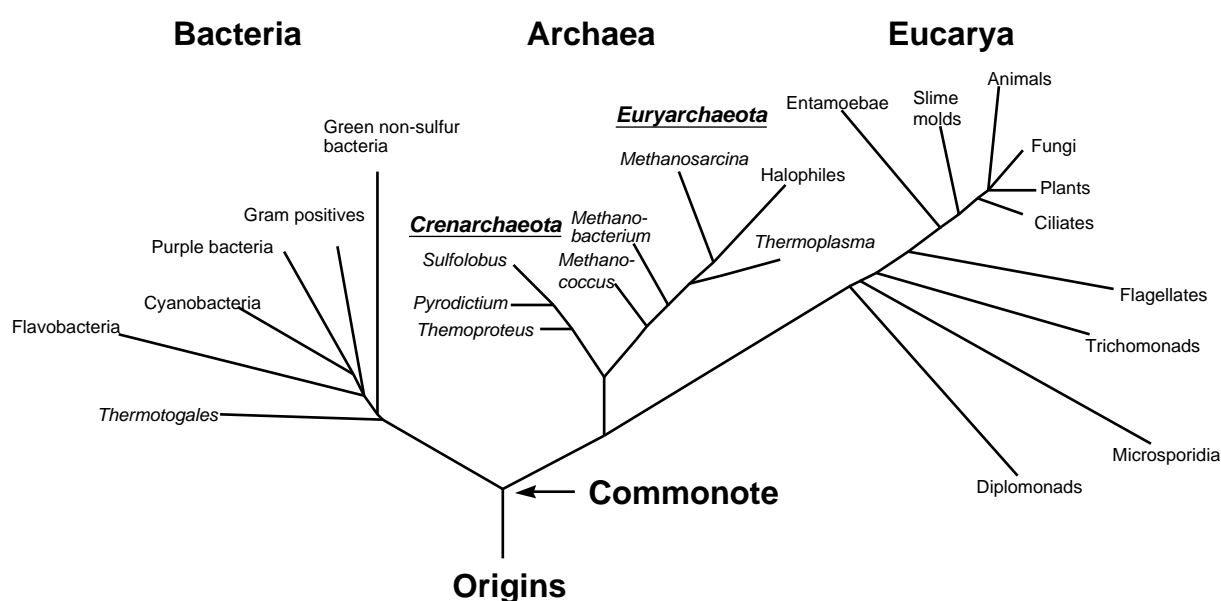


Figure 1-3 系統樹

古細菌 (Archaeobacteria) という名称は、太古の地球と類似した環境で生育する、取り残された細菌というニュアンスでつけられたが、必ずしも古生物が現生していることを意味するものではない。その後、好熱好酸菌や高度好塩菌も古細菌に分類された^{1b)}。

これら古細菌は rRNA 以外にも他の生物群と異なる特徴を有している。古細菌, 真正細菌, 真核生物の生化学的特徴を表 1-1 に示す。

	古細菌	真正細菌	真核生物
リボソーム サブユニット	70 S 30 S + 50 S	70 S 30 S + 50 S	80 S 40 S + 60 S
染色体 核 イントロン	×	×	
脂質 結合様式 結合部位 炭化水素鎖	エーテル <i>sn</i> -2,3 イソプレノイド	エステル <i>sn</i> -1,2 高級脂肪酸	エステル <i>sn</i> -1,2 高級脂肪酸
細胞表層	シュードムレイン (メタン菌) S-レイヤー (古細菌全般) なし (<i>Thermoplasma</i>)	ムレイン	セルロース (植物) なし (動物)
ミトコンドリア	×	×	

Table 1-1 古細菌，真正細菌，真核生物の生化学的特徴

この表からも分かる通り、最も特徴的な相違点として細胞膜脂質の化学構造が挙げられ、また現在、分類上の最も大きな指標となっている。

生命体の最小単位である細胞は、細胞膜で自己と外界とを仕切ることで生命活動を営んでいる。すなわち、細胞膜こそが生命活動の根幹を担っているといっても過言ではない。その生体膜はどのような構造をとっているのだろうか。1925年ゴルテルとグレンデルが赤血球から抽出した脂質で単分子膜を形成したところ、表面積の2倍となったことから、赤血球膜は脂質二重膜で構成されていることを見出した³⁾。その後生体膜の構造モデルは変遷を経て、現在広く受け入れられているのが、1972年発表された Singer-Nicolson の「流動モザイクモデル」である(図 1-4)⁴⁾。脂質二重膜に膜タンパク質が入り混じった構造をしており、膜の内層と外層で膜タンパクの量及び脂質分子の組成が異なっていることが分かっている。また脂質分子は膜表面を速い速度で側方拡散 (lateral diffusion) し、さらに非常に遅い速度ではあるが、内層と外層の脂質分子が交換 (flip-flop) している。これら脂質二重膜の流動性は、その構成成分によって決まる。

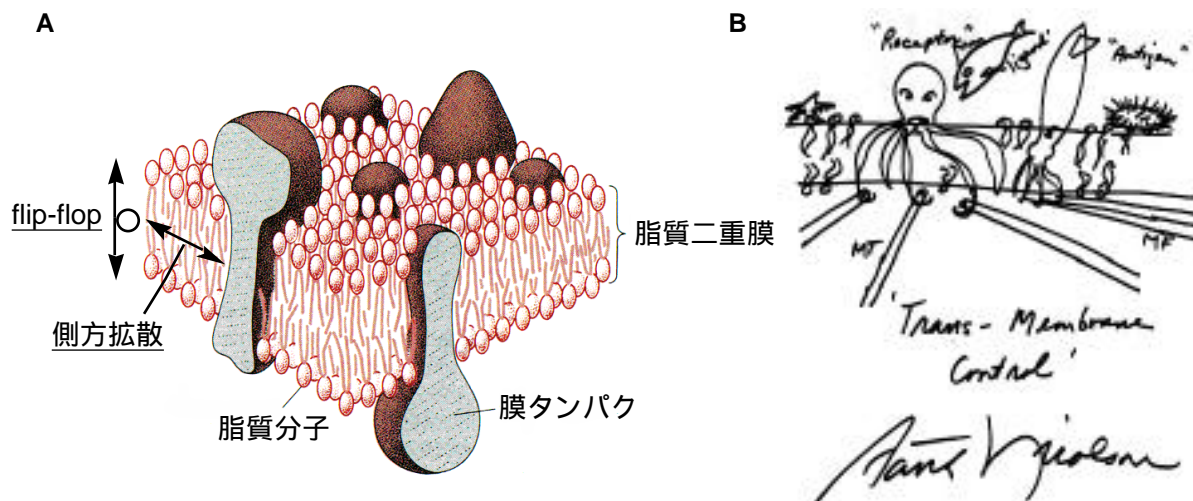


Figure 1-4 A) 流動モザイクモデル , B) Nicolson による膜流動性のスケッチ

古細菌細胞膜は図 1-5 に示したエーテル型脂質で構成され、一方真核生物・真正細菌のそれはエステル型脂質で構成される。このように生体膜の構成成分が異なることで生体膜の性質も大きく変化し、その結果生物の生育環境への適応に少なからず影響を及ぼしていると考えられる。エーテル型脂質は、他の生物群では真核生物の血小板活性因子 (PAF) やプラズマローゲン, 超好熱性真正細菌 *Aquifex pyrophilus* の細胞膜脂質に例外的に見出されているのみであり、古細菌に特有なものとみなすことが出来、生物進化を考える上でも重要な要素となっている。

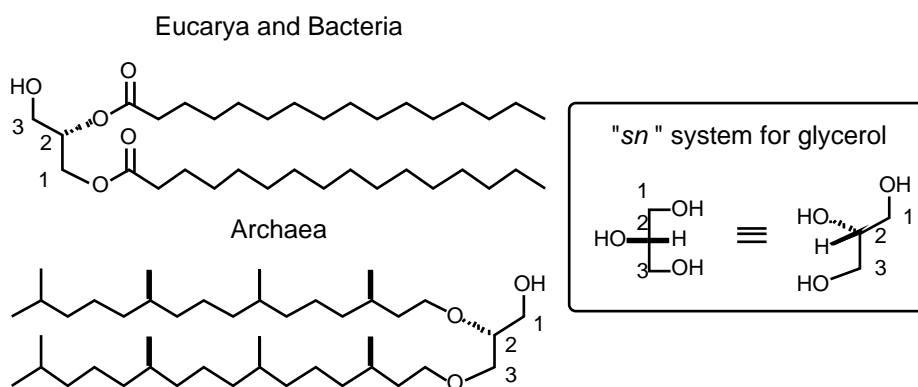


Figure 1-5 真核生物・真正細菌と古細菌のコア脂質構造の違い

古細菌脂質はエーテル構造を有しているのみでなく、その他にも特徴点がみられる^{2,5,6)}。以下に 3 点示す。

まず第一にアルキル鎖とグリセロールとの結合部位である。真核生物, 真正細菌ではグリセロールの *sn*-1,2 位でエステル結合しているのに対し、古細菌では

グリセロールの *sn*-2,3 位でエーテル結合している (図 1-5)。つまり、グリセロールの *sn*-2 位に関してあたかも鏡像異性体の関係にある。通常生物は分子の不斉構造を厳密に区別するものであり、例えば乳酸デヒドロゲナーゼやアミノ酸トランスフェラーゼなどの酵素では、D 型に作用する酵素と L 型に作用する酵素はそのアミノ酸配列から高次構造に至るまで全く異なっていることが知られている^{7a)}。実際、メタン生成細菌 *Methanobacterium thermoautotrophicum*^{6c)} においてグリセロール-1-リン酸 (G-1-P) を合成する酵素 (G-1-P デヒドロゲナーゼ) を精製・クローニングしたところ、この酵素は G-1-P のみを生産すること及び大腸菌 (*Escherichia coli*) の G-3-P 合成酵素と全く塩基配列での相同性がないことが確認されている^{7b-e)}。古細菌が何故他の生物群と鏡像体のグリセロールを膜成分に利用しているのかについては未だ不明である。

第二に炭化水素鎖の違いである。真核生物、真正細菌では主として直鎖脂肪酸であり、その長さは 14 から 20 と幅広く分布しているのに対し、古細菌における炭化水素鎖はイソプレノイドであり、その長さは基本的に炭素数 20 及び 40 と一定している。

最後に挙げる最も特徴的な点は、図 1-6, 表 1-2 に示した 36 員環, 72 員環といった大環状脂質の存在である。36 員環ジエーテル型脂質 5 は、水深 2600 m の海嶺熱水湧出孔付近より採取された至適生育温度 85 °C の高度好熱性メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii*^{6m,n)} や、その他の好熱性メタン生成細菌 *Methanococcus igneus*, *Methanohalobium evestigatum* の計 3 種で見出されている^{6t)}。一方、72 員環テトラエーテル型脂質 7 は、高度好塩菌にはみられないものの、17 種ものメタン生成細菌及び好熱好酸菌の細胞膜構成成分として広く分布している^{5,6g,t)}。また、テトラエーテル型脂質の中にはシクロペンタン環を分子中に 1 から 8 個有した 8 も好熱好酸菌で幅広く存在している^{6e,f)}。さらにごく最近超好熱性メタン菌 *Methanothermus fervidus* から炭化水素鎖の中央付近で共有結合した、C₈₀ の H 型炭化水素鎖を有した新規コア脂質 9 が発見された (図 1-7)^{6u)}。テトラエーテル型脂質の全脂質に占める割合は菌種により様々であるが、pH 2, 56 °C が至適生育条件である好熱好酸菌 *Thermoplasma acidophilum* の膜脂質は 80 % 以上テトラエーテル型脂質であることが知られている^{6g)}。これ

ら大環状脂質は高温・高圧・高酸性といった環境下に生育する古細菌に見出されることが多く、苛酷な環境への適応に何らかの役割を果たしていると考えられている。

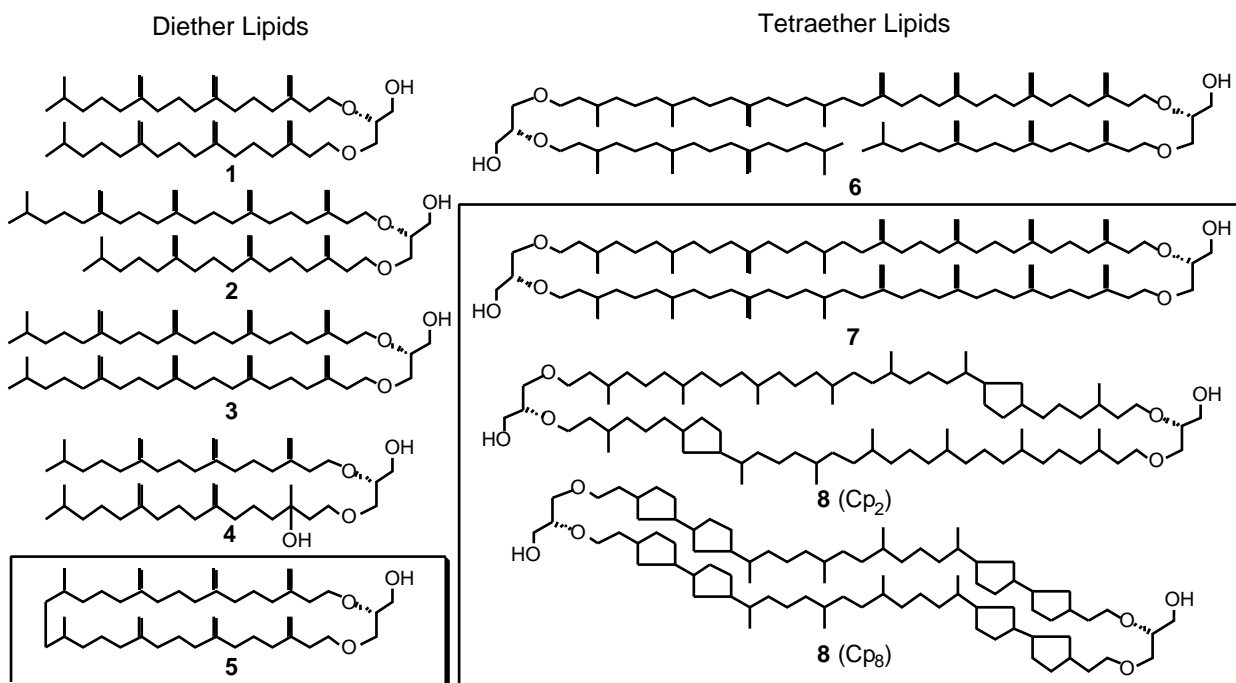


Figure 1-6 古細菌膜脂質の基本構造

	1	2	3	4	5	6	7	8
メタン菌								
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>		x	x	x	x	x		x
<i>Methanococcus jannaschii</i>		x	x	x		x		x
<i>Methanosarcina barkeri</i>		x	x		x	x	x	x
高度好塩菌								
<i>Halobacterium salinarum</i>		x	x	x	x	x	x	x
<i>Haloarcula japonica</i>		x	x	x	x	x	x	x
<i>Natronococcus</i> sp.				x	x	x	x	x
好熱好酸菌								
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		x	x	x	x			
<i>Thermoplasma acidophilum</i>		x	x	x	x	x		

Table 1-2 菌種による脂質構造の違い

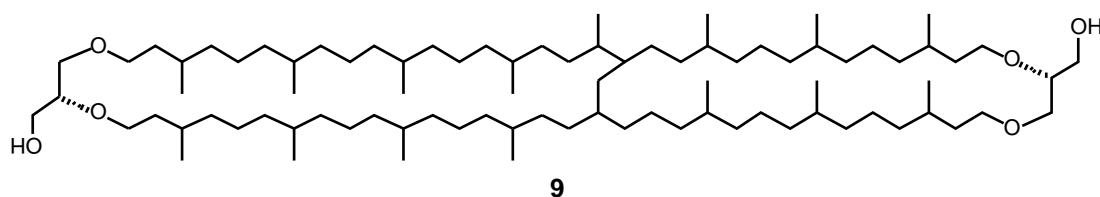


Figure 1-7 H型テトラエーテル脂質の推定基本構造

生物は最小単位である細胞において、生体膜の物質輸送を介して生命活動を営んでいる。その物質運搬を円滑に行うために膜流動性は重要な因子であることは前述の通りである。その流動性を規定する要因の一つに相転移があり、これは脂質分子の配列状態（相構造）が変化することである。相転移が生じる温度は相転移温度 (T_c) とよばれ、脂質においてはこの温度を境界としてゲル状態 (T_c 以下) と液晶状態 (T_c 以上) とが相互変化する (図 1-8)。脂質分子に着目すると、これは分子が膜面に直角に配向した状態 (L_β) と、膜面を自由に拡散運動する状態 (L_α) とが変化する温度として理解される⁸⁾。すなわち相転移温度以上になると整然と稠密に並んでいた炭化水素鎖が自由に分子運動 (トランス - ゴーシュ変換; 図 1-8) することで脂質分子間の間隔が広がり、その結果膜厚の低下, 物質透過性の向上がみられるようになる。

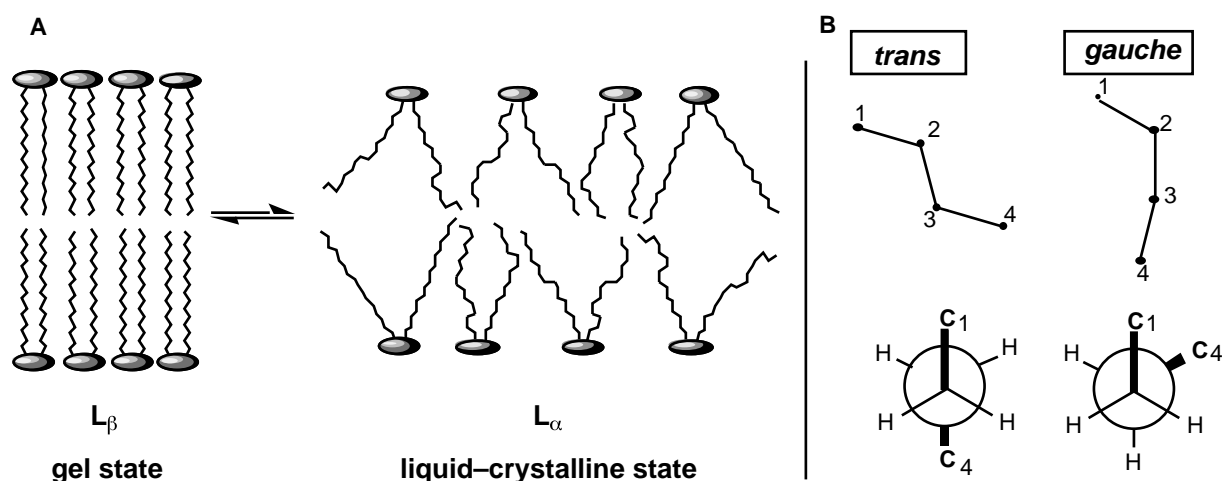


Figure 1-8 A) 相転移温度における脂質分子の変化, B) 炭化水素鎖の *trans* 配座と *gauche* 配座

脂質膜の状態は T_c を境に劇的に変化するが、これは膜の構成成分に左右され、一般に以下に示した性質がみられる⁸⁻¹⁰⁾。

- 1) 炭化水素鎖が長いほど T_c は上昇する
- 2) 二重結合を有した脂質分子の T_c は低下する
- 3) 分岐側鎖があるほど T_c は低下する
- 4) コレステロールを含有した膜の相転移は消失する

まず 1) であるが、これは炭化水素鎖が長くなるにつれて分子間の疎水性相互作用が増大することに起因する (図 1-9)。

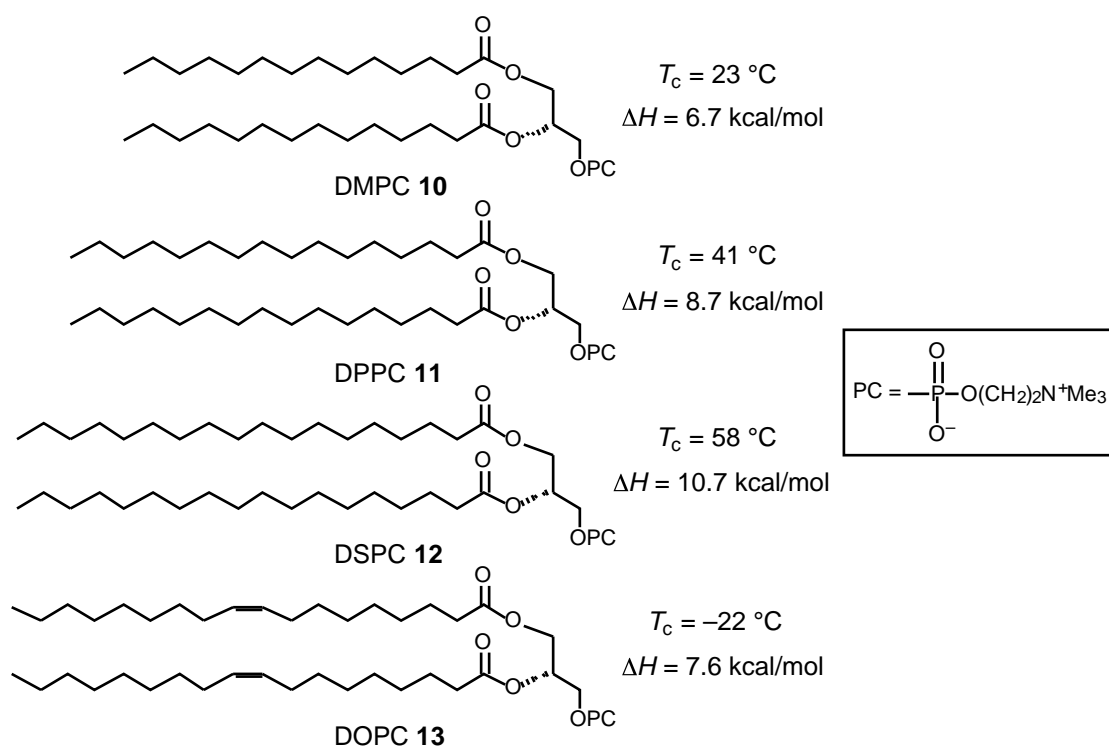


Figure 1-9 ジエステル型脂質の鎖長，二重結合と相転移温度との関係

2) は、例えば図 1-9 に示したように炭素数 18 の 1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン 12 (DSPC) の 9,10 位にシス二重結合を導入した 1,2-ジオレイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン 13 (DOPC) は、 T_c が $58\text{ }^\circ\text{C}$ から $-22\text{ }^\circ\text{C}$ へと劇的に減少する。これは炭化水素鎖のねじれにより脂質分子が規則正しく並びにくくなるためである。

3) については古細菌型脂質の分岐メチル基を想定し、Menger ら^{9a)}及び Morr ら^{9b)}が各々図 1-10 に示した基質の相転移現象を測定している。その結果、分岐鎖の数が多いほど T_c が低いこと (17 vs 18, 19), 及び炭化水素鎖の中央部に分岐鎖が存在している 15 が、エステル部付近及び末端に有している 14, 16 より T_c が低いことが分かった。このことは分岐鎖の導入によりトランス-ゴーシュ変換がより活発に生じるようになったことに起因する。さらに後者は、炭化水素鎖の運動性が中央部付近において最も大きいことを示すものである。

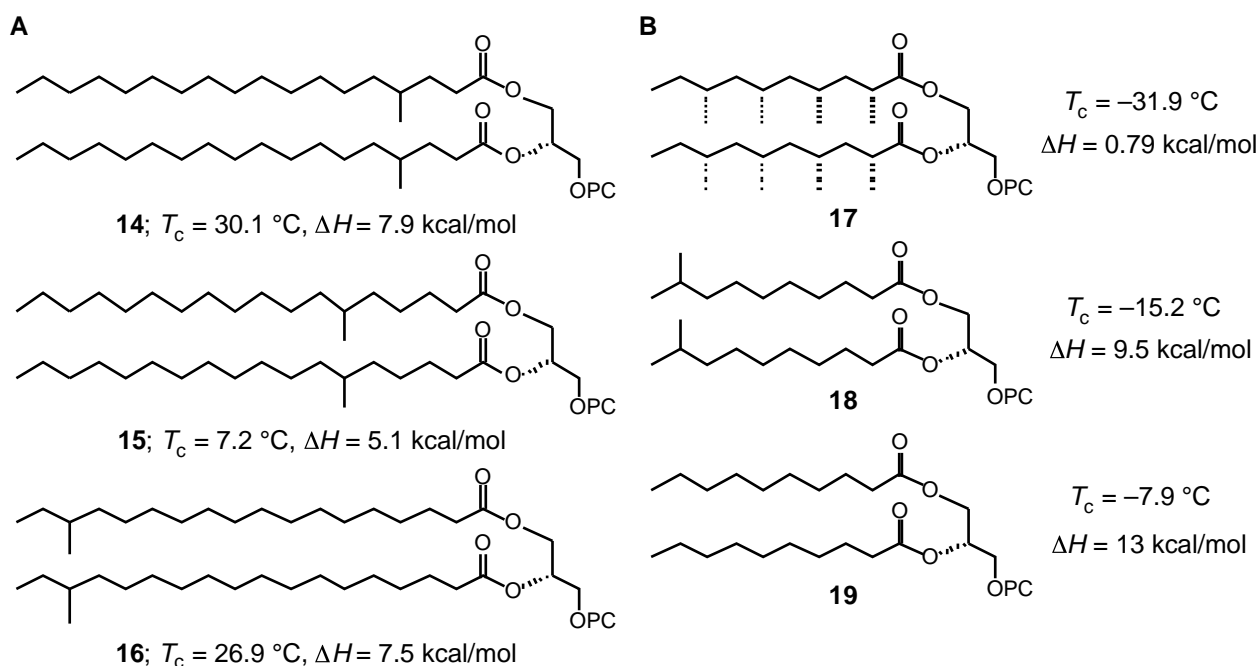


Figure 1-10 A) メチル基の位置 , 及び B) 数と相転移温度との関係

最後の 4) について、コレステロールは動物の形質膜成分として大量に含まれており、赤血球膜やミエリン膜ではリン脂質とほぼ等モルの割合で存在する。コレステロールが 20 mol% 以上含まれた脂質膜では脂質分子の凝集化及び結晶化を阻害する、つまり相転移が消失する。このことはコレステロールと脂質分子との強い相互作用に起因する。すなわちコレステロールの水酸基が脂質のアシル基と水素結合し、さらにステロイド骨格が炭化水素鎖と疎水性相互作用することで脂質分子の運動性を低下させている。コレステロールをリン脂質から成る生体膜モデルに取り込ませたところ、脂質分子の分子占有面積が低下し、密なパッキング (充填度) の脂質膜を形成することが知られている¹⁰⁾。

生物は脂質膜を介して物質運搬を行っているので、生命活動を営むためには脂質膜が液晶状態にあることが必要である。以上のことを総合すると、真核生物・真正細菌は不飽和脂肪酸を有した脂質及びコレステロールを取り込むことによって、古細菌は分岐メチル基を有した脂質で構成されていることによって T_c を下げ、生命活動を営んでいるといえる。

古細菌の特異な脂質構造 (エーテル結合, イソプレレン鎖, 環状構造, 二量体 (テトラエーテル型) 構造) は、極限条件下での適応にどのような寄与をしているのであろうか。様々な特徴を有する古細菌型脂質から成る膜の機能を明らかにするために、モデル化合物を用いた研究が世界中で盛んに行われてきている¹¹⁻¹⁴⁾。

第一に古細菌脂質がエーテル結合で形成されていること¹¹⁾についてであるが、エステル型脂質と比べ、酸, アルカリなどの化学的条件に安定であろうということはいうまでもない^{5b)}。さらにエーテル結合が膜の性質にも影響を与えていることが Moss らによって示された (図 1-11)^{11b)}。極性基にアルカリ加水分解される官能基を有した脂質からリポソーム (脂質二重膜の閉鎖小胞; 第 4 章で詳述) を調製し、加水分解速度を測定することでフリップフロップの速度を見積もったところ、エーテル型脂質 **20** の方がエステル型脂質 **21** と比べて活発なフリップフロップ運動をしていることを報告している。

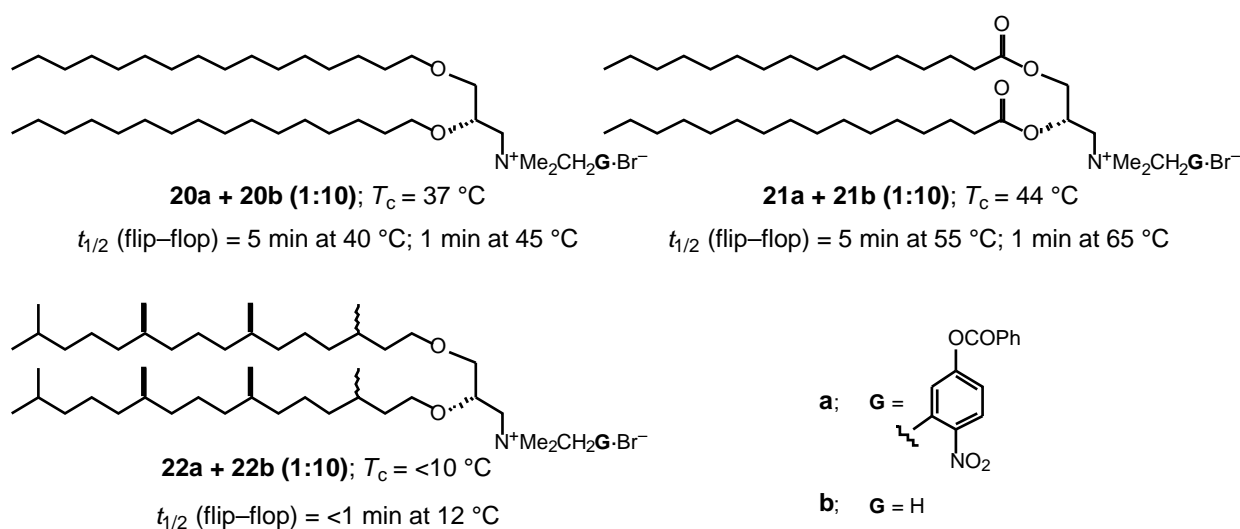


Figure 1-11 Moss らのジエステル, ジエーテル型モデル化合物

第二にイソプレレン鎖¹²⁾であるが、Moss らは同様に炭化水素鎖がフィタニル基の四級アンモニウム塩 **22** についてもフリップフロップの速度を求めている (図 1-11)^{12c)}。分岐メチル基を多く有していることで液晶状態にあり、直鎖アルキル型脂質と比べて活発なフリップフロップを行うことを見出している。

Yamauchi らは好塩性古細菌などのコア脂質であるジフィタニルグリセロールのモデルとしてホスホコリン誘導體 **23** を合成し、そのリポソームの性質について調べている (図 1-12)^{12d)}。それによると高塩濃度でも一ヶ月以上安定なりポソームを形成し、そのリポソームは通常生物の脂質である 1,2-ジパルミトイル -sn-グリセロ-3-ホスホコリン **11** (DPPC), 卵黄レシチン (eggPC) と比べて比較的物質保持能, 耐塩性 (浸透圧応答) に優れていたと報告している。

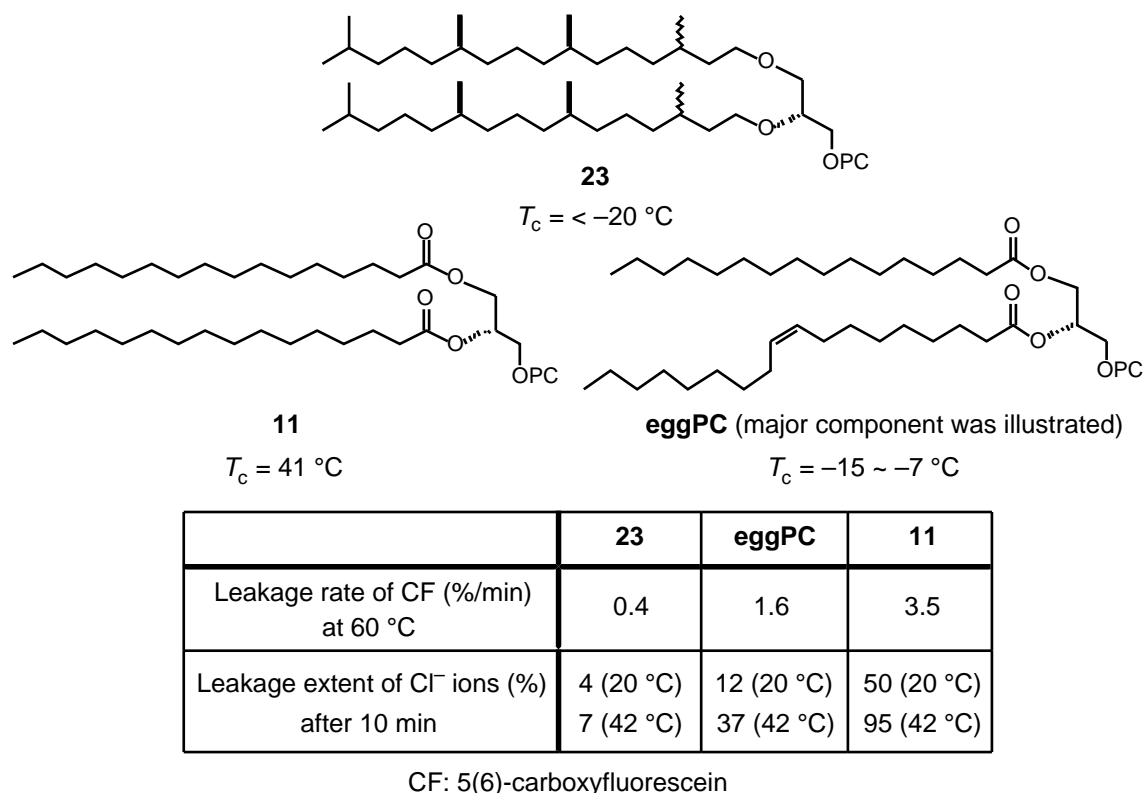
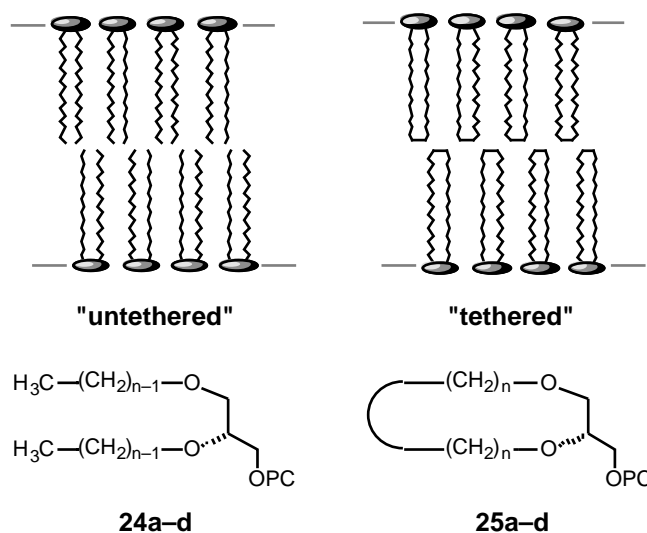


Figure 1-12 Yamauchi らのジフィタニルグリセロリン脂質

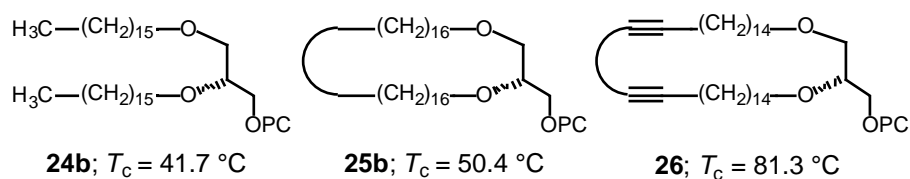
第三の特徴である環状構造の、膜の性質に与える影響についても盛んに研究が進められている¹³⁾。Menger らは化学合成により得た 32, 36, 40, 44 員環ジエーテル型モデル化合物 **24** (tethered lipids) の熱力学的挙動について、対応する非環状脂質 **25** (untethered lipids) のそれと比較検討している (図 1-13)^{13b)}。それによると、アルキル鎖末端の結合によりその運動性が抑制され、その結果 T_c の上昇, 相転移エンタルピー変化 H_c , 相転移エントロピー変化 S_c の低下がみられたと報告している。



	n	T_c (°C)	ΔH_c (kcal/mol)	ΔS_c (cal/mol·K)	T_c (°C)	ΔH_c (kcal/mol)	ΔS_c (cal/mol·K)
a	14	26.9	5.4	17.8	21.0	1.2	3.9
b	16	41.7	8.4	26.7	50.4	2.8	8.5
c	18	55.6	9.6	29.2	70.1	5.1	14.6
d	20	66.5	10.4	30.6	82.6	6.9	19.4

Figure 1-13 Mengerらによる環状脂質，非環状脂質の熱力学的パラメーター

また Ladika らは膜中で光重合するモデル脂質の設計を行い、そのリポソームの性質について検討している (図 1-14)^{13c)}。その結果ジーンを有した **26** は様々な外的要因に耐性であることが分かった。また環状脂質 **25b**、**26** と非環状脂質 **24b** との比較では、前者の方がリパーゼに対する安定性が高かったと報告している。



Conditions	% Leakage of CF from liposome		
	24b	25b	26
50 °C, 24 hr	>85	>85	<15
Ethanol (33 wt %), 20 °C, 3 days	100	100	12
Igepal 620 (0.1 wt %), 20 °C, 3 days	100	99	11
Wheat germ lipase (0.59 wt %), 20 °C, 3 days	36	6	7

Figure 1-14 Ladikaらのモデル脂質及びリポソームの性質

第四の特徴であるテトラエーテル型構造についてであるが、これは単分子の層で脂質二重膜に相当する膜を形成し得ると考えられ、また脂質二重膜に含まれたテトラエーテル型脂質は膜を貫通したくさびの役割を果たすことで膜の流動性、物質透過性などを調節していると考えられている。テトラエーテル型構造についても様々なモデル実験が試みられている¹⁴⁾。

Yamauchi らは図 1-15 に示した擬似 72 員環モデル脂質を合成し、それらのリポソーム形成能及び性質について調べている^{14a-c)}。それによると直鎖アルキルから成るテトラエーテル型化合物 **27** は単独では蒸留水中でリポソームを形成せず、シート状の膜を形成するのみであった^{14a)}。一方、フィタニル基を有したモデル化合物 **28** は単独でリポソームを形成し、ジエーテル型脂質 **24b** と比較して T_c が低いにも拘わらず高温で比較的安定なリポソームを形成している。**28** がリポソームを形成した理由としては、一部の分子が U 字型をとり、外層に位置して膜が曲率をとれるようになったため (space filling) と考えられる^{4b)}。

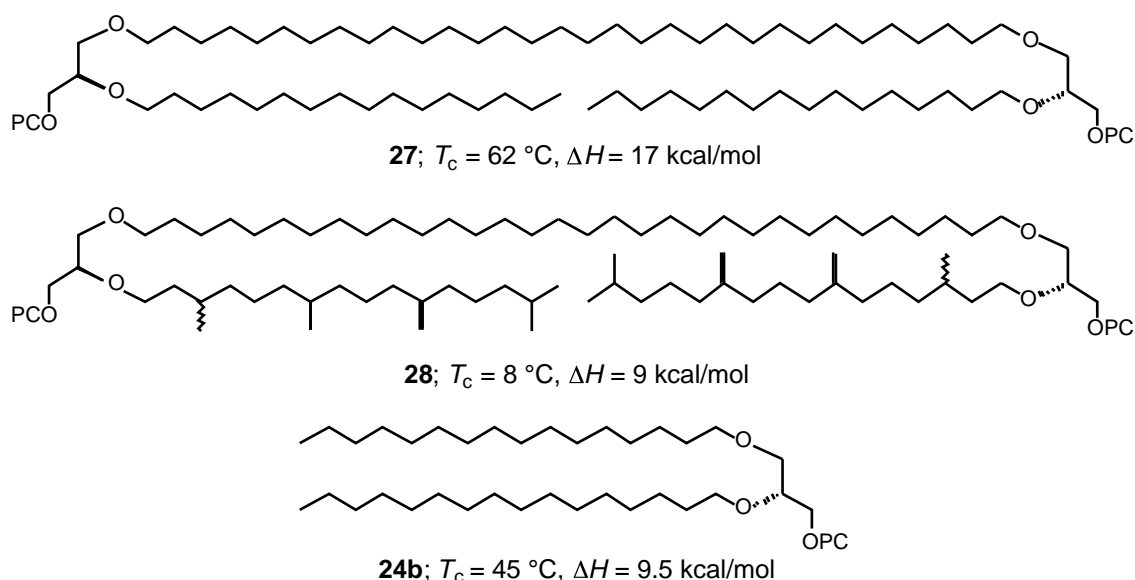


Figure 1-15 Yamauchi らの擬似 72 員環テトラエーテルモデル脂質及び熱力学的パラメーター

Moss らも擬似 72 員環テトラエーテル型化合物を合成し、ジエーテル型脂質との混合リポソームを調製し、そのフリップフロップの速度を求めている (図 1-16)^{14d,g)}。それによると、直鎖炭化水素鎖テトラエーテル型化合物 **29** はジエーテル化合物のみと比べて活発なフリップフロップをしているのに対し、ビフェニル基を有したモデル **30** ではフリップフロップが非常に抑制されていることが分かった。速い加水分解速度及び遅い加水分解速度との比率からテトラエーテル型脂質の極性基の分布を見積もったところ、**29** では外層に U 字型コンフォメーションで多く存在していることが分かり、一方 **30** は外層と内層の極性基の分布が 1:1 であり、膜貫通型コンフォメーションをとっていると報告している。

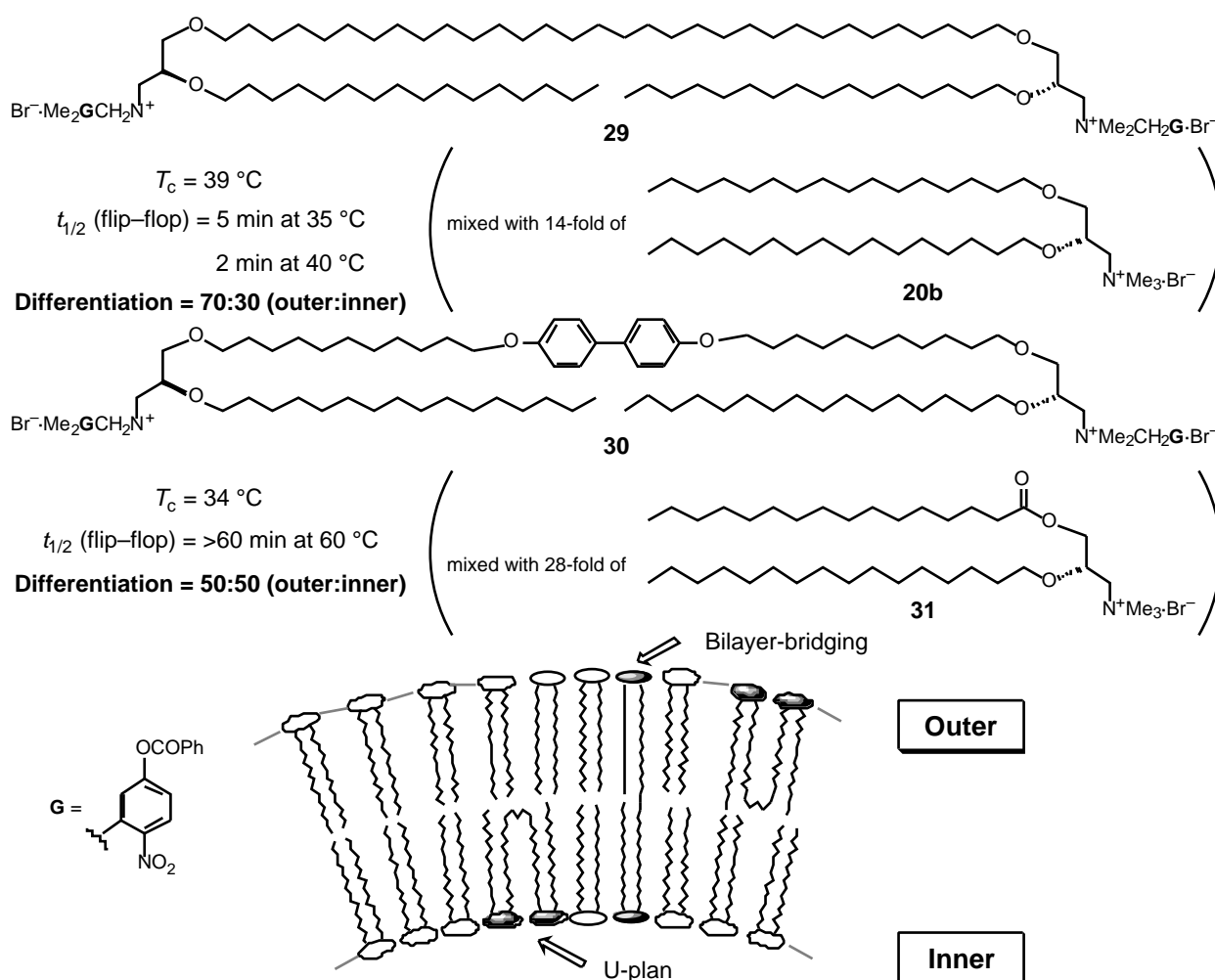


Figure 1-16 Moss らの擬似 72 員環テトラエーテルモデル脂質及びフリップ - フロップ速度

テトラエーテル型かつ環状構造を有した化合物に関する研究は、これまで Menger らの 72 員環大環状モデル化合物 **32** の合成研究しか報告がない (図 1-17)^{13d)}。しかも論文によればこのビスホスホコリン体は著しく溶解性に乏しく NMR の測定すら困難であり、膜の性質検討には至れなかったと報告している。

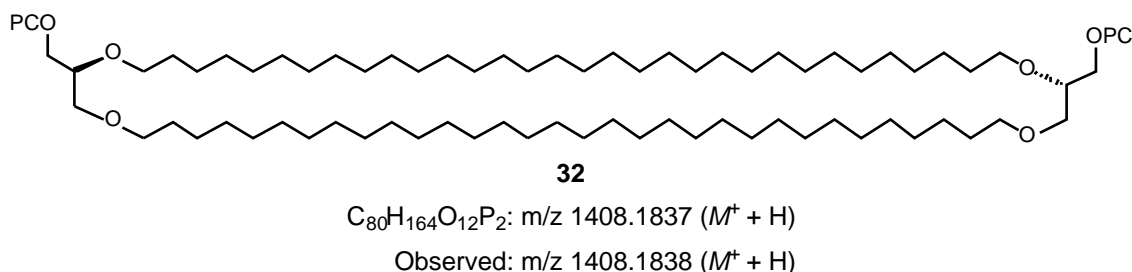


Figure 1-17 Menger らの 72 員環大環状テトラエーテルモデル化合物

以上のように古細菌の特異な脂質構造 (エーテル結合, イソプレン鎖, 環状構造, 二量体 (テトラエーテル型) 構造) の個々の性質に関する研究は、列挙したモデル化合物での研究により次第に明らかになりつつある。しかしながら大環状脂質を純粋かつ十分量入手するのが困難であったため、単一化合物による研究は全くなされておらず、天然由来の脂質混合物による検討¹⁵⁾を除いて、天然型の古細菌大環状脂質の膜機能に関してはほとんど明らかにされていない。

本研究では古細菌の特異な大環状脂質が、苛酷な環境への適応にどのような役割を果たしているかを見出すことを究極の目的とし、大環状脂質を化学合成により純粋かつ十分量得て、その脂質膜の性質の検討を行った。

第 2 章では古細菌大環状脂質を従来法よりも効率的に得るべく、その要素であるイソプレン鎖の合成法を改良したこと及び McMurry 反応を環化反応に用いて古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の十分量な合成を達成したことについて述べた。

第 3 章では多種多様な反応様式を有するオレフィンメタセシス反応を用いて古細菌大環状脂質、特に 72 員環テトラエーテル型脂質の効率的合成ルートを確立したことについて述べた。

第 4 章では大環状リン酸ジエステル型モデル化合物について、Glaser 反応を環化の鍵反応に適用して合成し、環状構造が脂質膜の性質に与える影響を分子レベ

ルで詳細に検討したことについて述べた。

第 5 章では古細菌の、高温環境への適応に対する大環状脂質の寄与を見出すべく、天然型古細菌 36 員環ジエーテル型脂質からなるリポソームの性質を種々の測定法を用いて総合的に調べたことについて述べた。

第 6 章では 72 員環テトラエーテル型モデル化合物のリン脂質誘導体化及びその脂質膜としての性質を各種測定法で検討したことについて述べた。

第 7 章では本研究の総括を述べた。

以下、これらについて詳述する。

第2章 McMurry 反応を用いた古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の合成

2-1 はじめに

1974 年 DeRosa らは好熱好酸菌 *Sulfolobus acidocaldarius* より単離した脂質を三塩化ホウ素で分解したところ、図 2-1 1 の分解生成物であるグリセロールと炭素数 20 のモノクロリド $C_{20}H_{41}Cl$ とともに炭素数 40 のジクロリド $C_{40}H_{76-80}Cl_2$ が得られたと報告した^{6d)}。このことは炭化水素鎖の両末端がエーテル結合した構造、すなわち大環状構造の存在を示唆するものであった(当時は大環状ジエーテル構造 5 と考えられていた)。この興味深い発見をきっかけに古細菌脂質の研究が盛んとなり、1977 年 Langworthy が高度好熱菌 *Thermoplasma acidophilum* より単離した脂質について同様に解析し、この構造は 72 員環テトラエーテル型であるとし、平面構造 7b を提案した^{6g)}。

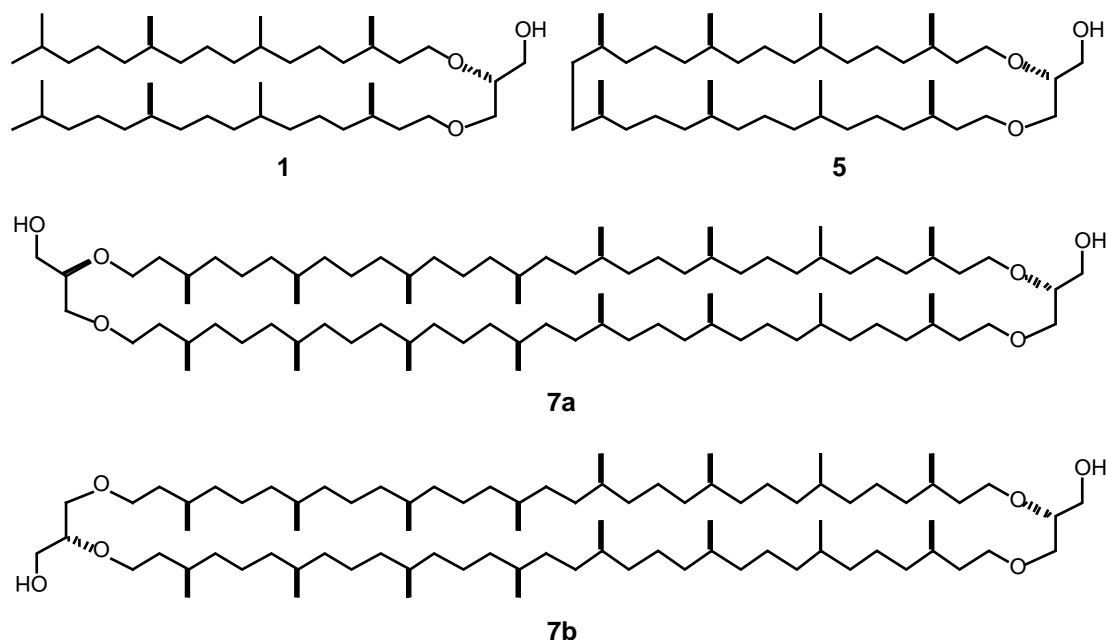


Figure 2-1 古細菌コア脂質の構造

その後立体化学についても解明が進み、グリセロールと炭化水素鎖は 1 の場合と同様に *sn*-2,3 位で結合していることが Kates らにより明らかとされ^{6a)}、さら

に炭化水素鎖ビフィタン部の分岐メチル基の立体化学に関しては、1986年 Heathcock らが合成的手法により **7ab** に示したものであることを証明した¹⁶⁾。すなわち図 2-2 に示したように、Evans の不斉アルドール反応，Claisen 転位を利用して合成した炭素数 40 のジオールのうち、**33** の各種スペクトルデータが天然体の分解物と一致したことにより決定している。

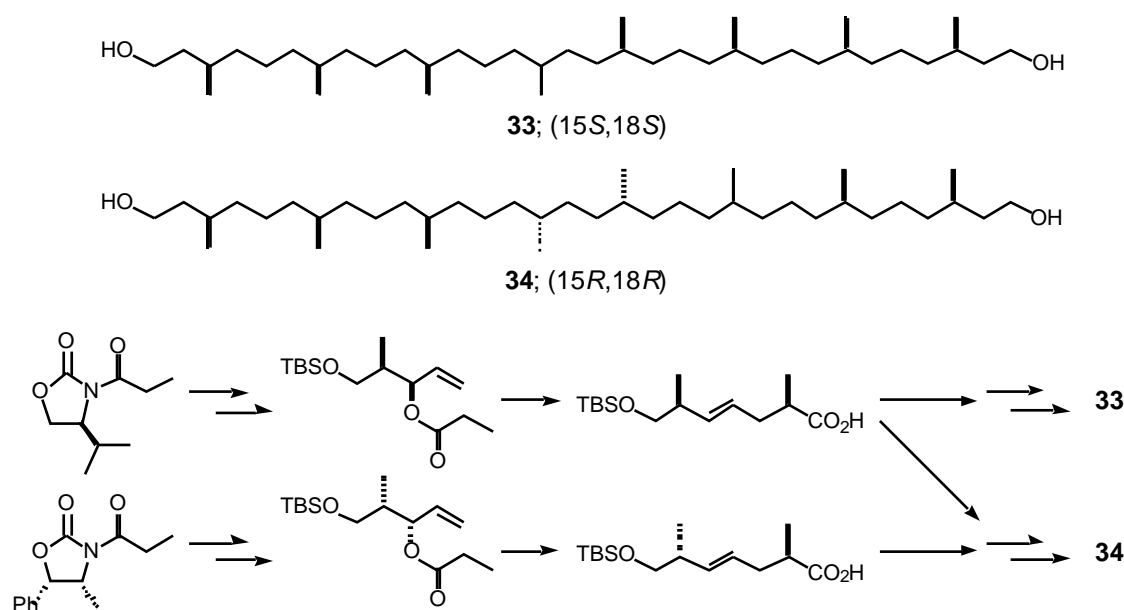


Figure 2-2 Heathcock らの C₄₀ ジオール

一方、36員環ジエーテル型脂質 **5** は、1982年有人深海調査艇 ALVIN 号により、海底 2,600 m の熱水湧出孔から採取された高度好熱性メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* で初めて見出された^{6m,n)}。Comita らは採取した極性脂質を酸加水分解して得られたコア脂質の分子量が基本構造よりも 2 マスユニット小さいことに着目し、さらにその後三臭化ホウ素による分解，ヒドリド還元を行って得た化合物が各々ジブロミド C₄₀H₈₀Br₂，及びビフィタンであったことを見出している (図 2-3)。これらのことより彼らは二量化したテトラエーテル型構造でない大環状脂質、すなわち **5** の存在を提唱した^{6m,n)}。

5 の立体化学は厳密には決定されていないが、今まで報告されている古細菌脂質は、例外なくグリセロールの *sn*-2,3 位でエーテル結合していること，及びビフィタン部はテトラエーテル脂質と同様の生合成経路で形成されることが考えられることにより、図示した構造であろうと予想できる。

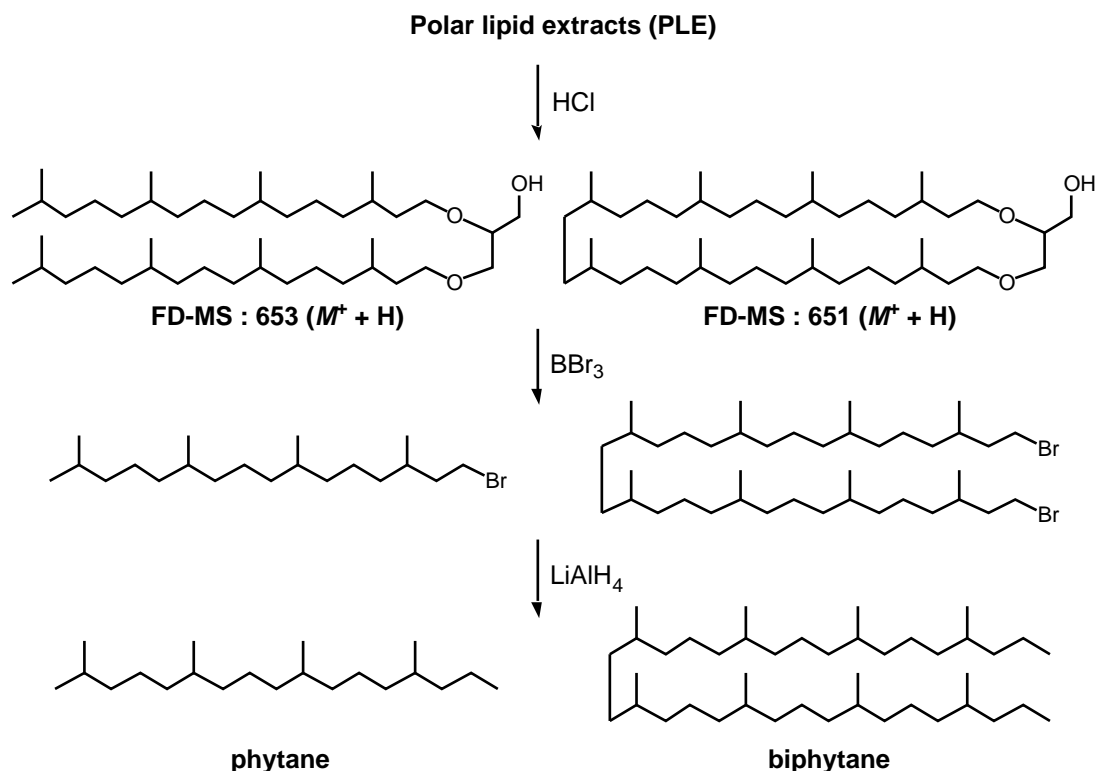
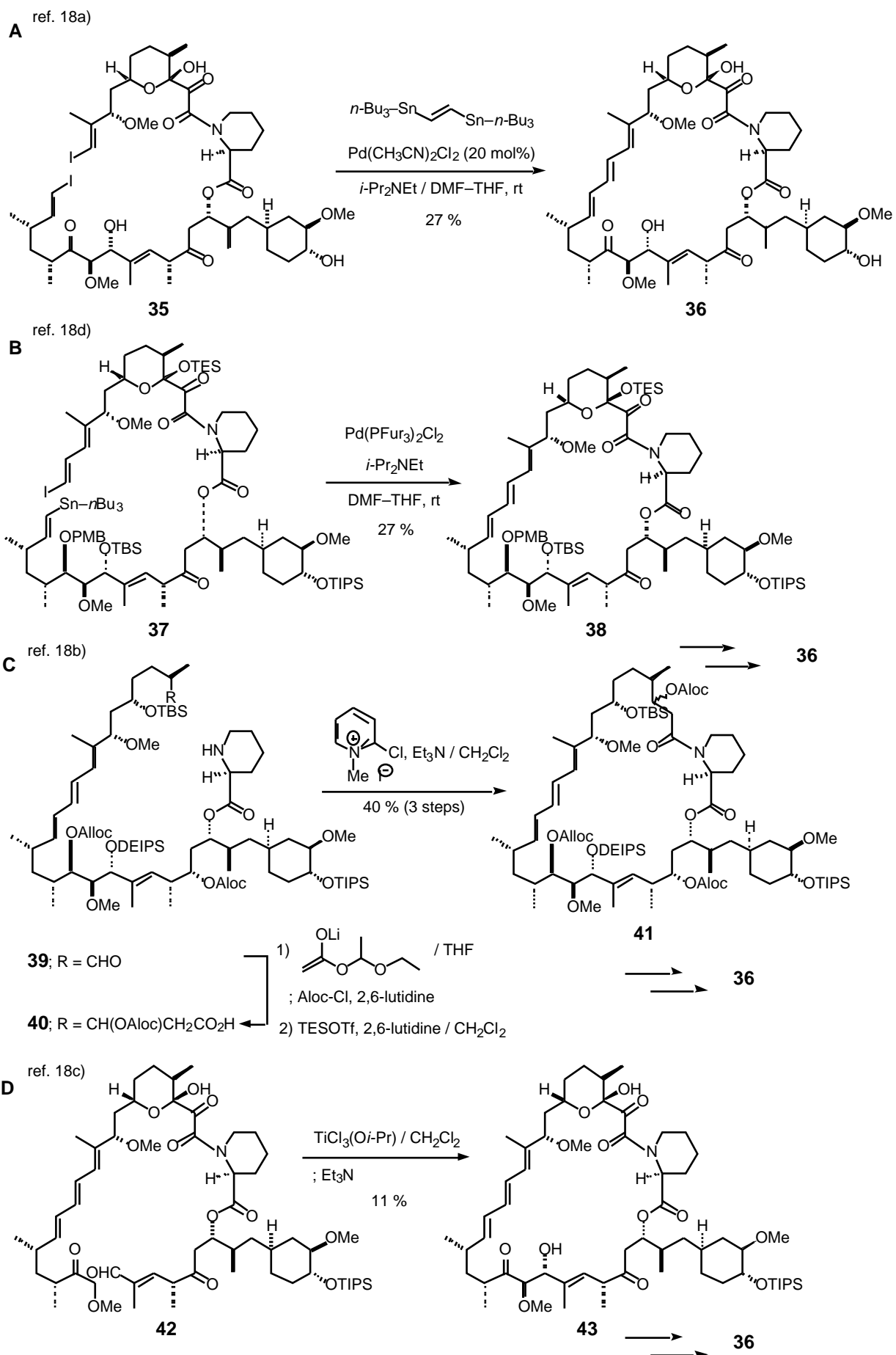


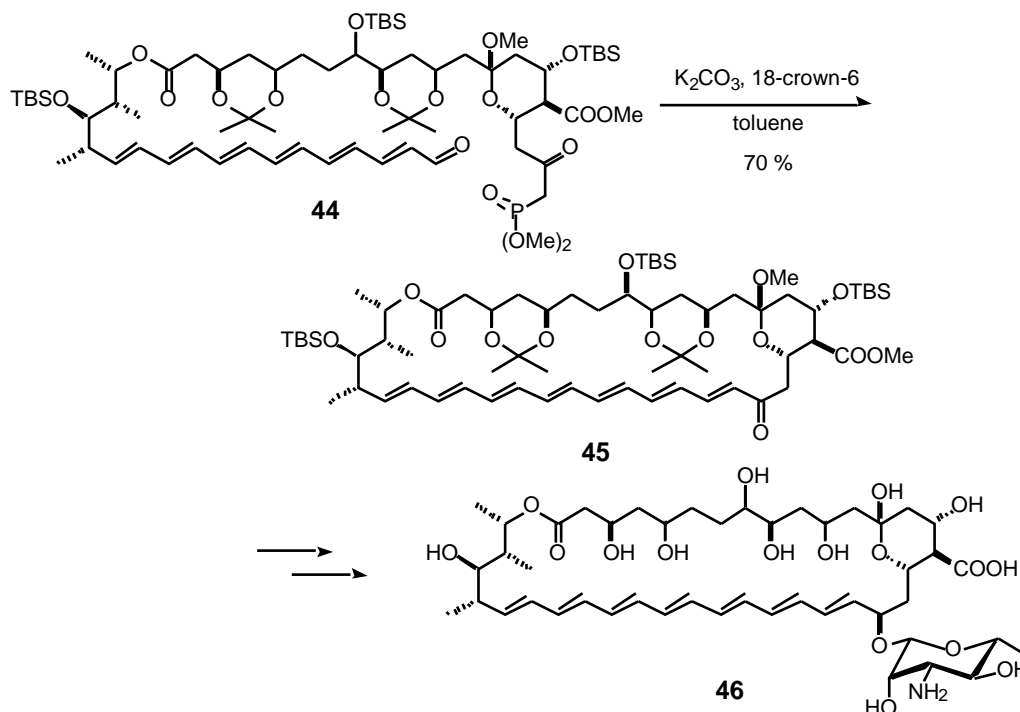
Figure 2-3 Comitaらによる36員環脂質の分解反応

古細菌脂質にみられる大環状構造は何故存在しているのだろうか。苛酷な環境への適応に必然性があるのだろうか。この問題を解決するにはこれら古細菌大環状脂質を何らかの手段を講じて単一化合物として入手する必要があるが、特殊な菌体であることが多く、培養により純粋かつ十分量入手するのは困難である。そこで本研究ではこれらの課題を解決するため、古細菌大環状脂質を化学合成により入手することを目指した。

古細菌大環状脂質のような大環状化合物を化学合成で得るにあたり、問題となるのは当然環化反応である¹⁷⁾。以下に大環状化合物のこれまでの合成例をいくつか挙げる。例えば29員環化合物(-)-rapamycin **36**の全合成は分子内Stilleカップリング(スキーム2-1 A, B), マクロラクタム化及び分子内アルドール反応(スキーム2-1 C, D)を分子内環化反応に適用して計4グループが達成している¹⁸⁾。これらの環化反応では分子間反応をさけるためにいずれも高希釈条件下で行っているが、いずれも低収率にとどまっている。

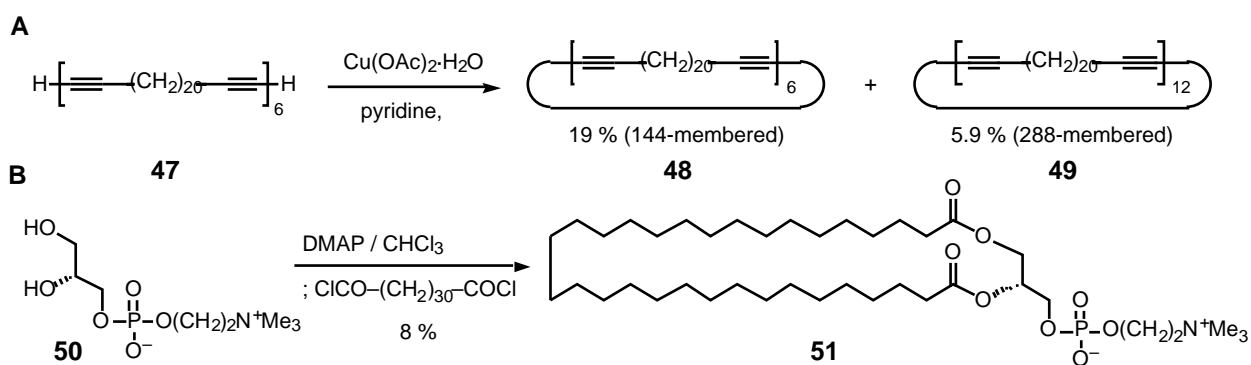


また 36 員環マクロリド化合物 amphotericin B **46** の全合成は Nicolaou らにより、Horner-Wadworth-Emmons 反応を分子内環化反応に適用して達成されている (スキーム 2-2)¹⁹⁾。この場合は 70 % の良好な収率で環化反応が進行している。



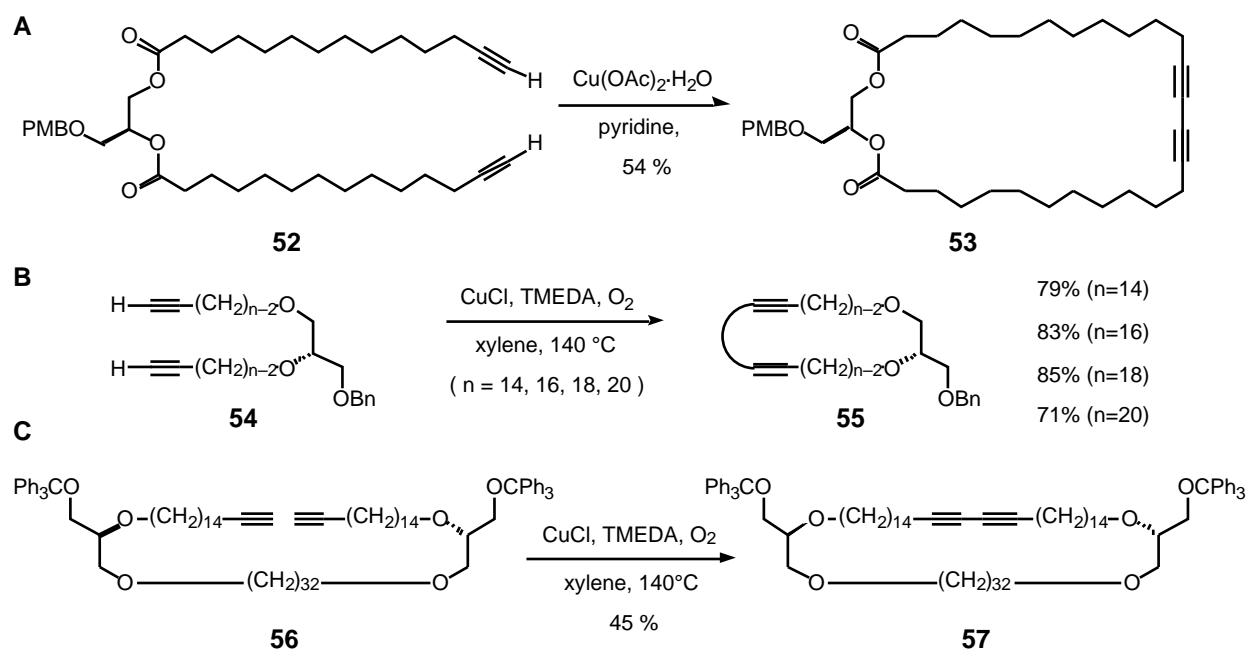
Scheme 2-2 amphotericin B の合成例

天然物以外に目を向けると、スキーム 2-3 A に示した 288 員環化合物 **49** が今まで知られている中で最大の員数である²⁰⁾。これは Glaser 反応²¹⁾を高希釈条件下で行い、6 % の低収率ながら得られたものである。また古細菌大環状脂質に関する例として、Yamauchi らは 36 員環ジエステル型モデル化合物 **51** を、炭化水素鎖とグリセロールの分子間エステル化を利用して合成しているが、その収率は 8 % と低いものであった (スキーム 2-3 B)²²⁾。



Scheme 2-3 A) 288 員環化合物の合成例, B) Yamauchi らの 36 員環化合物の合成例

古細菌大環状脂質に関する例ではさらに、スキーム 2-4 に示した Glaser 反応によるモデル化合物の合成例が挙げられる¹³⁾。Hébert らはポリマー化し得る膜脂質として大環状ジエステル型化合物 **53** を^{13a)}、Menger らは同様の手法で 32, 36, 40, 44 員環の大きさをもつジエーテル型化合物 **55**^{13b)} 及び 72 員環テトラエーテル型化合物 **57**^{13d)} を、反応系を高希釈条件に保つことによりいずれも良好な収率で得ている。



Scheme 2-4 Glaser 反応での大環状化合物合成例

天然型大環状脂質を構築する際も同様に、炭化水素鎖とグリセロールの分子間エーテル化及びジアルキル化合物の分子内環化で得る方法が考えられるが、後者の方が高希釈にすることで分子間反応などの副反応が抑えられ、反応性・効率性の両面からみて有効であると考えられる。そこで分子内環化で得ることとすると、新たに結合を生じさせる二つの官能基が同じものである方が、基質調製の容易さから望ましい。その点で先に述べた Glaser 反応は、反応性・効率性の両面からみて非常に有効な大環状化合物合成法の一つといえる。しかしながら天然型脂質を得るためには Glaser 反応は不適當である。なぜなら Glaser 反応で得られる環状化合物は連続する 4 個の sp 炭素を有することになり、後に天然体にみられる位置にメチル基を立体選択的に導入することは事実上不可能だからである。すなわち天然型脂質の全合成を行うためには、反応点に隣接した炭素にメチル基を有した基質に対して適用可能で、かつ効率のよい環化反応を選択する必要がある。

そこで様々な小・中員環化合物の閉環反応に利用され、その有用性が確立されている McMurry 反応を適用することとした^{23,24)}。反応は低原子価チタンを活性種とするラジカルカップリングである。まず図 2-4 のようにカルボニル基が一電子還元を受けてケチルが生じ、その二量化

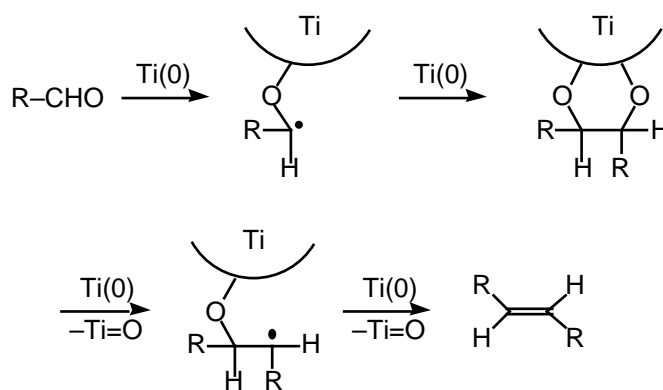
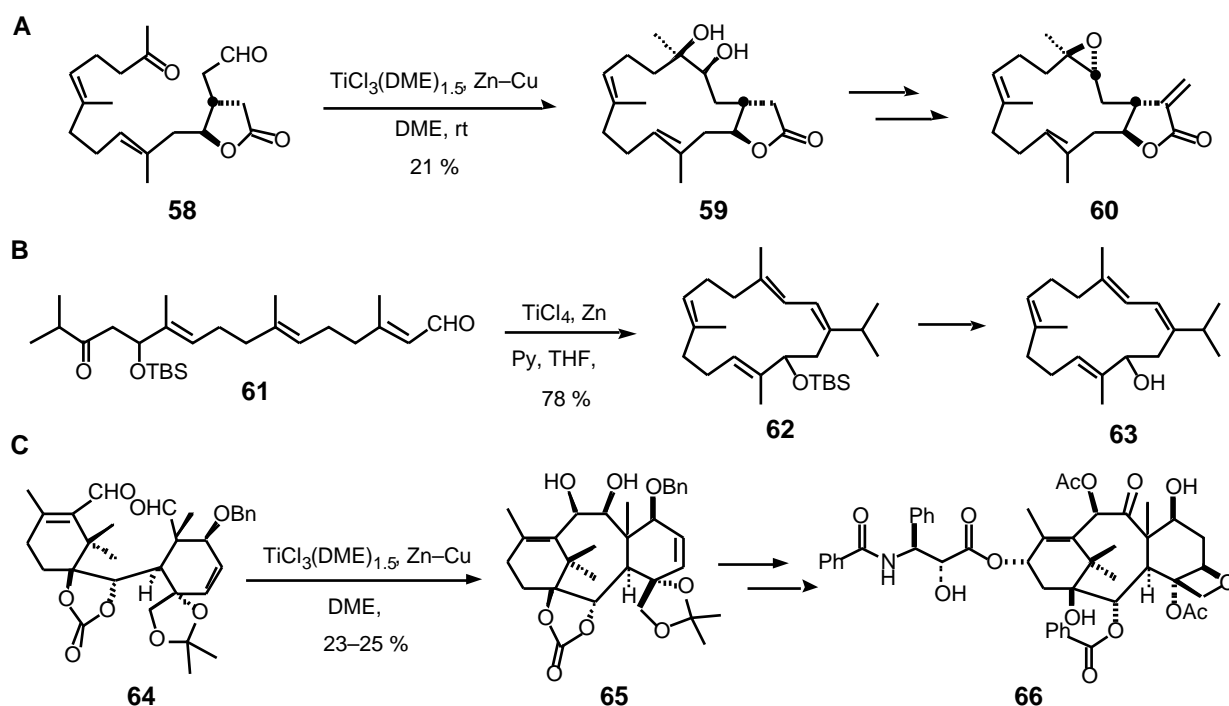


Figure 2-4 McMurry反応の反応機構

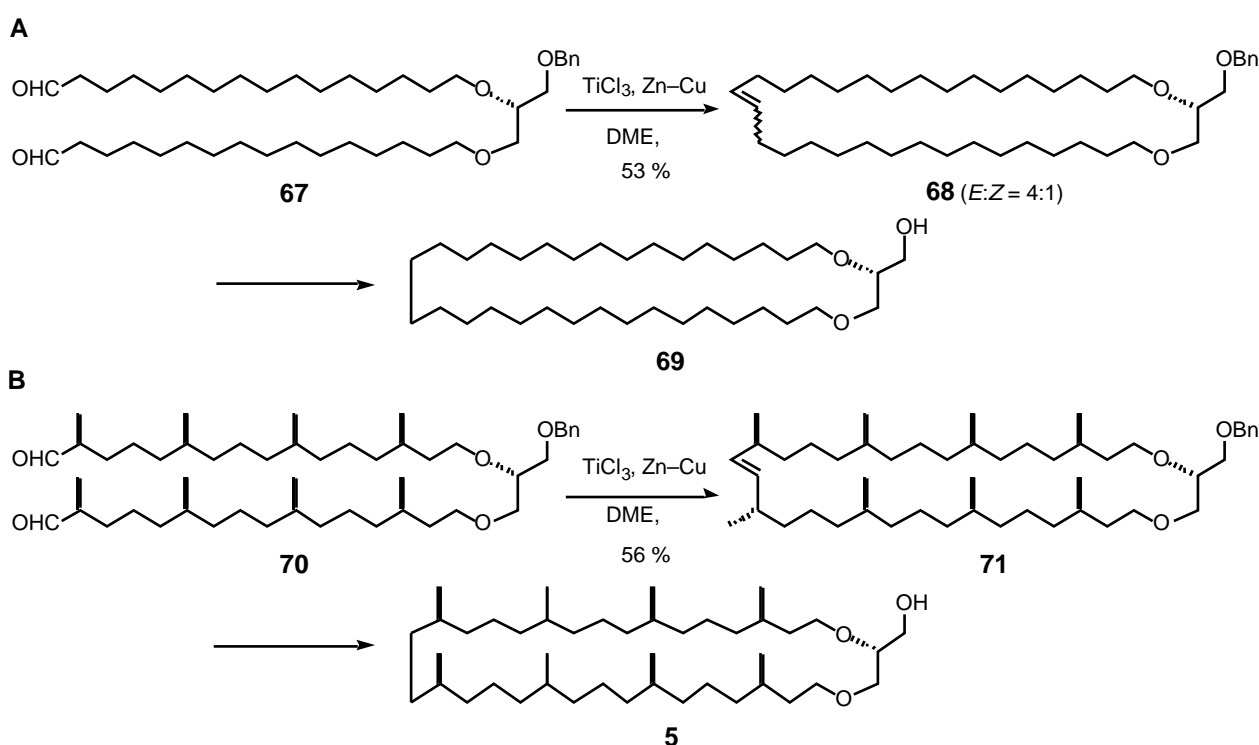
でピナコールとなり、C-O結合がさらに一電子還元を受けて Ti=O が脱離し、最終生成物のオレフィンを与えるという反応機構で進行すると考えられている。すなわち、分子内環化では反応系を高希釈条件にすることでチタン表面の近傍に分子内カルボニル基が吸着される確率が高くなり、その後のラジカルカップリングが分子内で円滑に進行すると考えられるからである。

ピナコールカップリングを用いた天然物の全合成例としては、スキーム 2-5 に示した (±)-crassin **60**^{23c)}, isosarcophytol A **63**^{23d)}, taxol **66**^{23e)} などの 20 員環程度までの合成例が報告されているが、30 員環を越える化合物への適用例はこれまで報告されていない。



Scheme 2-5 McMurry反応での環状化合物合成例

McMurry 反応は、反応点の接近を制約する要因がなければ、さらなる大員環形成反応にも適用可能であると考えられる。当研究室では世界に先駆けて、McMurry 反応による 36 員環モデル化合物 **69** の合成を達成している (スキーム 2-6 A)²⁵⁾。環化反応は 53 % という良好な収率で進行しており、これは McMurry 反応の有用性を示すものである。その後さらに、天然型 36 員環ジエーテル型脂質 **5** の全合成も McMurry 反応を環化反応に適用することにより達成している (スキーム 2-6 B)^{26a)}。しかしながら実際はイソプレン鎖構築に多段階を要し、脂質膜の性質を検討するのに十分な量を得るのが困難であった。

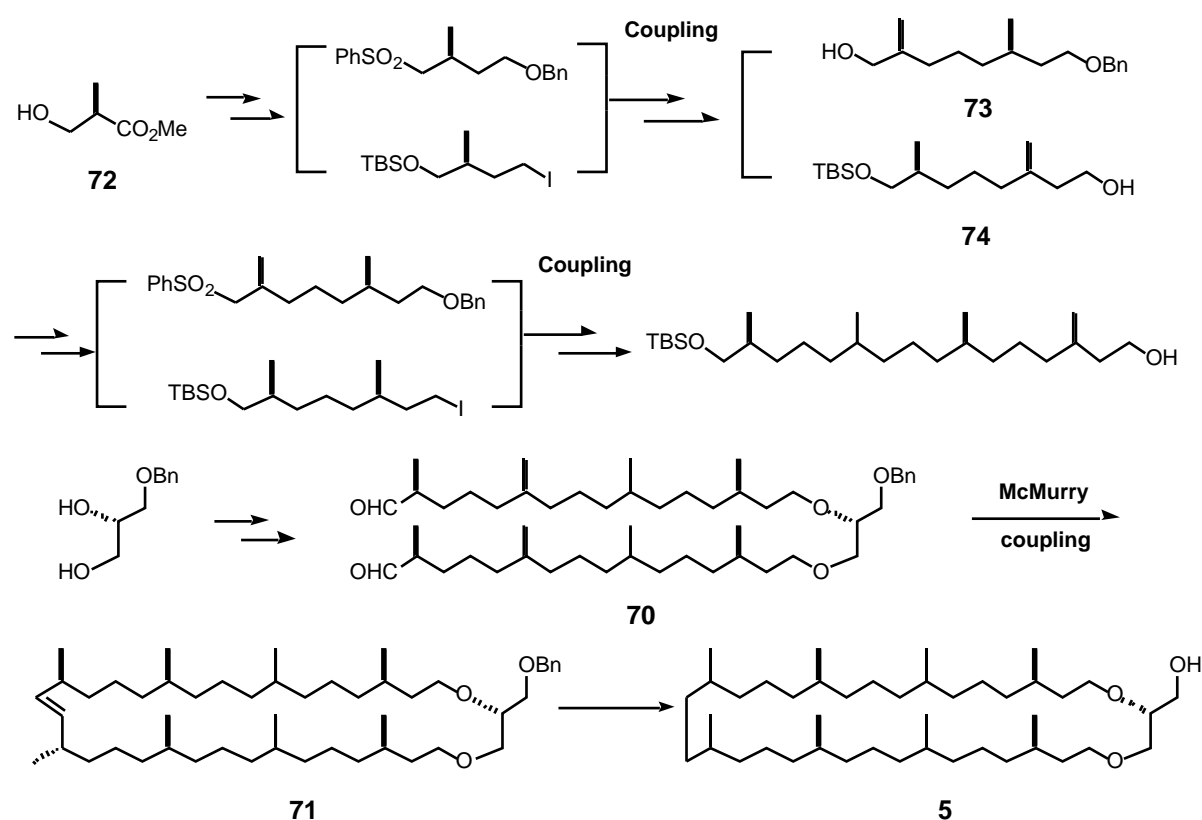


Scheme 2-6 McMurry反応での36員環ジエーテル化合物の合成

本章では古細菌 36 員環ジエーテル型脂質を十分量得るべく、その要素であるイソプレン鎖の短工程な合成法の確立を行い、全合成を達成したことについて述べる。

2-2 イソプレレン鎖の改良合成法の開発

すでに当研究室では (*R*)-3-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸メチル **72** を出発原料としてスキーム 2-7 に示したルートで古細菌 36 員環ジエーテル型脂質 **5** の全合成に成功している^{26a)}。しかしながらこのルートではユニット同士のカップリングを2度行う必要があり、さらに工程数も多く、必ずしも効率のよいものとはいえなかった。イソプレレン鎖の効率的合成法の確立は、36 員環脂質、さらには 72 員環脂質を十分量入手するための根幹をなす問題である。

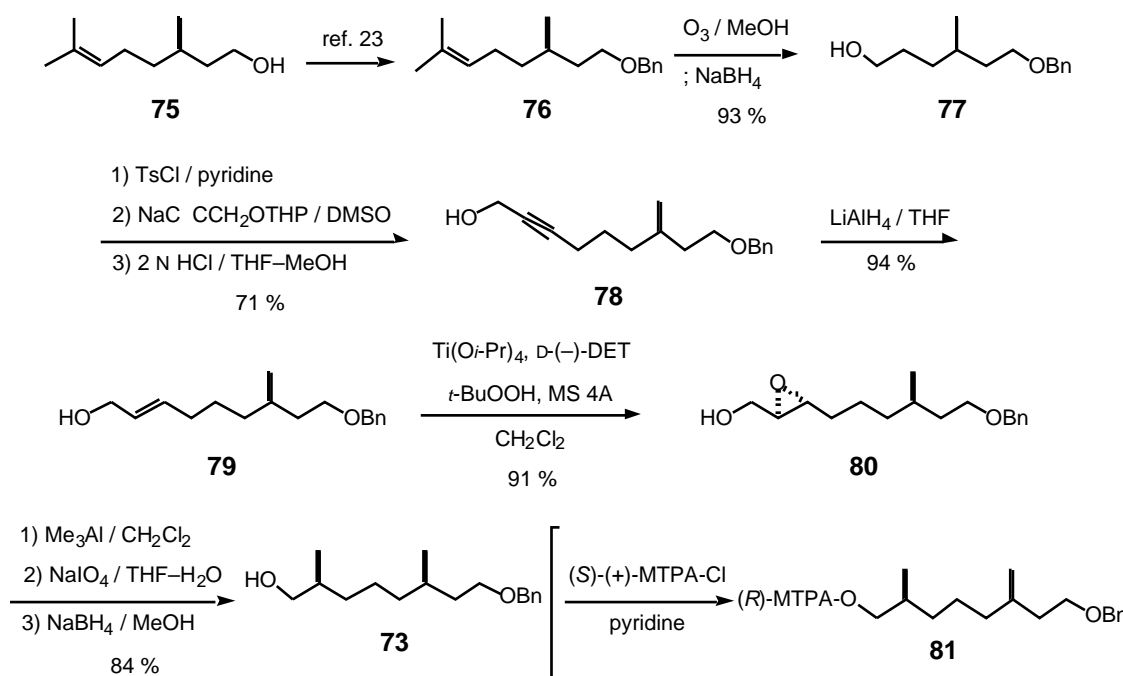


Scheme 2-7 古細菌 36 員環脂質合成の第 1 世代ルート

そこでイソプレレン鎖を短工程かつ効率的に得るべく新規合成ルートの開発を行った。合成経路をスキーム 2-8 に示す。出発原料に安価に入手可能な (*R*)-シトロネロール (98 % ee) **75** を用い、まず水酸基をベンジル基で保護し²⁷⁾、オゾン分解、続く還元処理によりアルコール **77** を得た。水酸基に脱離基導入後アセチリドアニオンと反応させ 3 炭素増炭し、酸加水分解を行ってプロパルギルアルコール **78** を 3 段階 71 % の収率で得た。得られた **78** を 0 °C で水素化リチウムア

ルミニウムと反応させ、94%の収率でアリルアルコール **79** へと変換した。なおこの際、反応温度が 10 °C 以上となるとアレンの副生がみられた。

アリルアルコール **79** に対し、Katsuki-Sharpless の不斉エポキシ化²⁸⁾ を行い、91%の収率でエポキシド **80** を得た。次に Nozaki らの方法²⁹⁾ に従い、エポキシド **80** に対しトリメチルアルミニウムにより位置及び立体選択的なメチル基の導入を行い、得られた 1,2-ジオールの酸化的開裂、続くヒドリド還元により炭素数 10 のアルコール **72** が 3 段階 84% で得られた。この **73** の新たに導入した 2 位メチル基の立体選択性は MTPA エステル³⁰⁾ 誘導体 **81** の ¹H-NMR のシグナル強度から 95% de であると決定した。

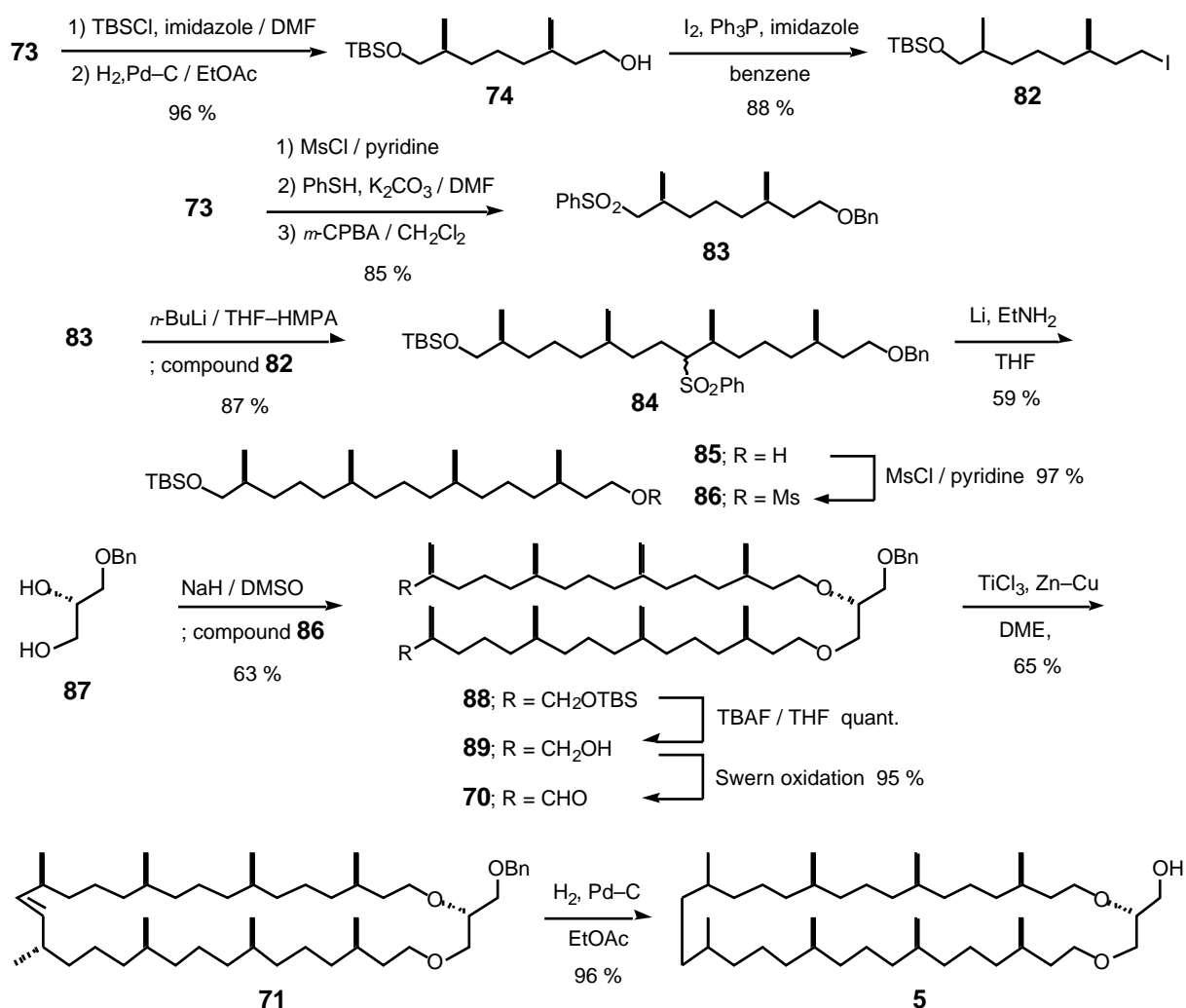


Scheme 2-8 イソプレレン鎖の新規合成ルート

このようにして **73** を 11 段階 47% で得ることが出来た。 **72** を出発原料とした従来のルートでは 17 段階 17% であり、新規ルートの開発によりイソプレレン鎖の大量調達が可能となった。なお、このルートは 72 員環テトラエーテル型脂質のイソプレレン鎖構築にも適用可能であり、古細菌大環状脂質の十分量の調達に道を開くことが出来た。

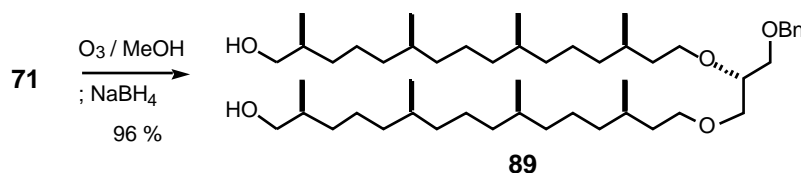
2-3 McMurry 反応による 36 員環脂質の合成

前節で述べたイソプレン鎖を用い、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の全合成を行った。合成経路をスキーム 2-9 に示す。アルコール **73** を共通原料としてヨウ化物 **82** , スルホン **83** の両者へと導き、両者をカップリングして 87 % の収率で炭素数 20 のユニット **84** を得た。Birch 還元により脱ベンジル , 脱硫を同時に行いアルコール **85** とし、続いてメシラート **86** へと変換した。 **86** と *sn*-1-*O*-ベンジルグリセロール **87**³¹⁾ との間でジエーテル化を行い、脱保護 , 酸化を経て McMurry 反応の基質であるジアルデヒド **70** を調製した。



Scheme 2-9 McMurry 反応による古細菌 36 員環脂質の全合成

McMurry 反応は以下のように行った。すなわちアルゴン気流下、 TiCl_3 及び Zn-Cu を加えて予め 1 時間加熱還流した DME 中に、高希釈条件を保ちながら基質 **70** の DME 溶液を電動シリンジポンプで 48 時間かけて滴下し、さらに 18 時間加熱還流したところ（最終濃度；3.3 mM）、大員環形成反応が進行し最大 65 % という収率で 36 員環閉環体 **71** を得ることが出来た。 $^1\text{H-NMR}$ では 5.10 ppm に 2 個分のオレフィンプロトンが観測出来、EI-MS からは m/z 738 に M^+ を、フラグメントピークとして 647 (M -benzyl) を観測することが出来、**71** の構造を支持している。また $^{13}\text{C-NMR}$ では二重結合炭素由来のシグナルとして 134.97 ppm に 1 本のみが見出され、単一の化合物であることが分かった。このことよりおそらく、生じた二重結合の立体化学はトランス体のみには制御されていると考えられる。また、環化の際カルボニル 位のエピメリ化が懸念されたが、得られた閉環体 **71** をオゾン分解し、続く還元的処理によりジオールへと戻し、その化合物の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを原料の **89** と比較したところ、95 % de 以上目的の立体化学であり、環化の際にエピメリ化は生じていないことが分かった。



Scheme 2-10 エピメリ化の有無の確認

次いで水素添加に付すことで **5** を得た。EI-MS では m/z 650 に M^+ が、またその高分解能マススペクトルでは m/z 650.6607 (計算値；650.6577) が観測された。また得られた化合物のスペクトルデータは文献記載の天然体のデータと一致した⁶ⁿ⁾。以上により古細菌 36 員環ジエーテル型脂質 **5** を、物性測定に十分な量合成することが出来た²⁶⁾。

2-4 古細菌非環状ジエーテル型脂質の合成

環状構造が脂質膜の性質にもたらす影響を調べるには、対応する非環状脂質と比較検討することが必要不可欠である。古細菌脂質の基本構造ともいえる **1** のリン脂質誘導体 **23** の脂質膜研究は、Yamauchi らにより耐塩性・安定性などを指標にして盛んに行われている^{5b,e,12d,e)}。しかしながら図 2-5 に示したようにグリセロールの立体化学が逆であり、さらにフィタニル基の 3 位メチル基が *R,S* 混合物 (天然体は *R*) であり全体として天然型脂質のジアステレオマー混合物による検討であって、必ずしも天然型そのものの性質を表現しているとはいえない。

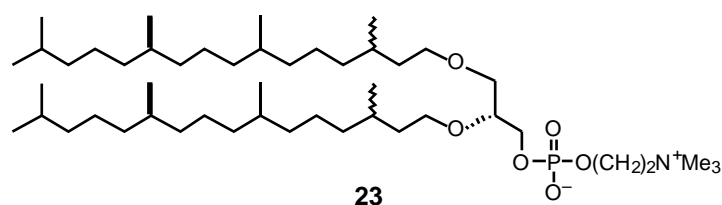


Figure 2-5 Yamauchi らのホスホコリン誘導体

Plusquellec らは最近、図 2-6 に示したテトラエーテル型モデル脂質の分散液について電子顕微鏡観察し、グリセロール不斉炭素の立体化学が異なる (**90** と **91**) と脂質集合体の構造が変化することを見出している¹⁴ⁱ⁾。これは不斉炭素の立体化学の違いが分子のパッキングに影響を与えた結果であろうと考察している。すなわち古細菌脂質の膜機能を検討するには、天然体と全く同じ立体化学の脂質を利用する必要がある。天然体の合成は Site によってなされている³²⁾ が、脂質膜の性質検討には至っていない。

そこでまず環状脂質 **5** の膜機能を調べるための比較対象物である非環状脂質 **1** の合成を行った。

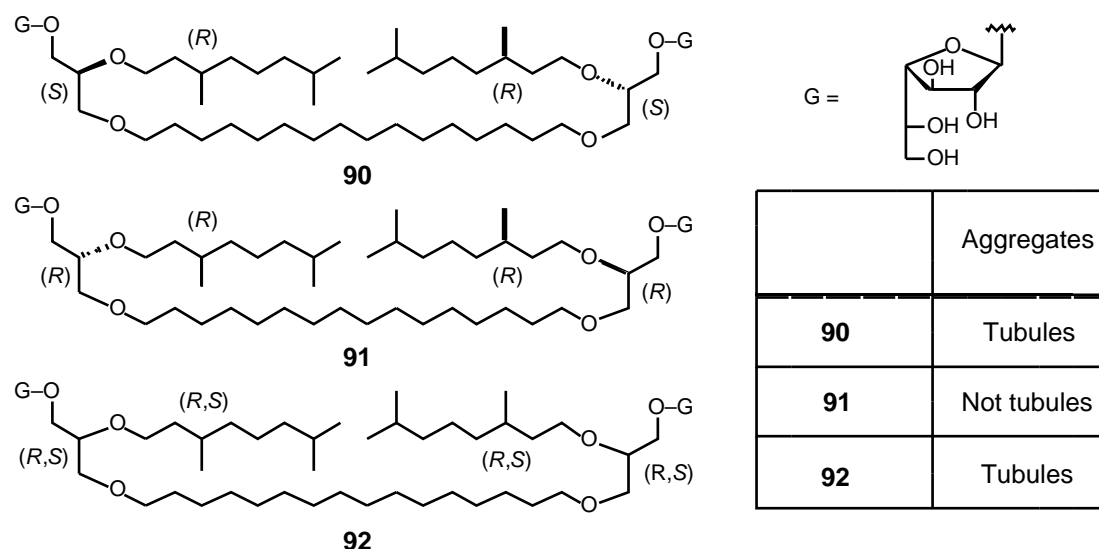


Figure 2-6 グリセロールの立体化学と脂質集合体との関係

1 のイソプレン鎖のメチル基の立体化学は (3*R*,7*R*,11*R*) であるので、出発原料にフィトール **93** を用い、3 位の不斉制御は不斉水素添加により行うこととし³³⁾、その触媒に Noyori らの開発したキラルなジホスフィンであるビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル (BINAP) を配位子としたルテニウム錯体を用いた (図 2-7)。反応はステンレス強化容器を用い、耐圧ガラス管中、90 kgf/cm² の高圧水素雰囲気下で行い、92% の収率でフィタノール **94** が得られた (スキーム 2-11)。得られた **94** の絶対立体配置は旋光度の比較から *R* 体であると決定した^{6a)}。

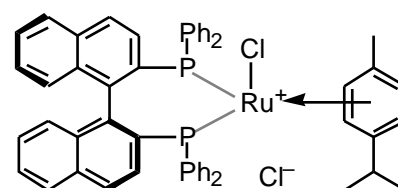
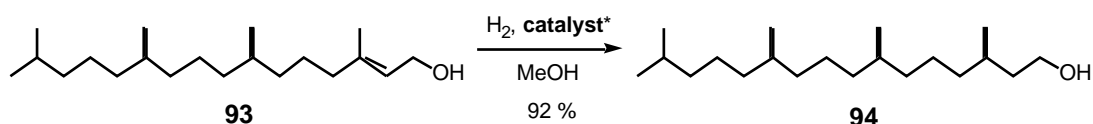
[(*S*)-(-)-2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl]chloro(*p*-cymene)-ruthenium chloride

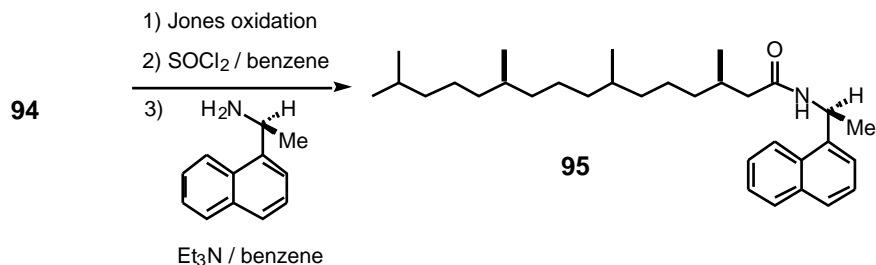
Figure 2-7 Noyori らのルテニウム触媒

反応はステンレス強化容器を用い、耐圧ガラス管中、90 kgf/cm² の高圧水素雰囲気下で行い、92% の収率でフィタノール **94** が得られた (スキーム 2-11)。得られた **94** の絶対立体配置は旋光度の比較から *R* 体であると決定した^{6a)}。

catalyst; [(*S*)-BINAP]chloro(*p*-cymene)ruthenium chloride

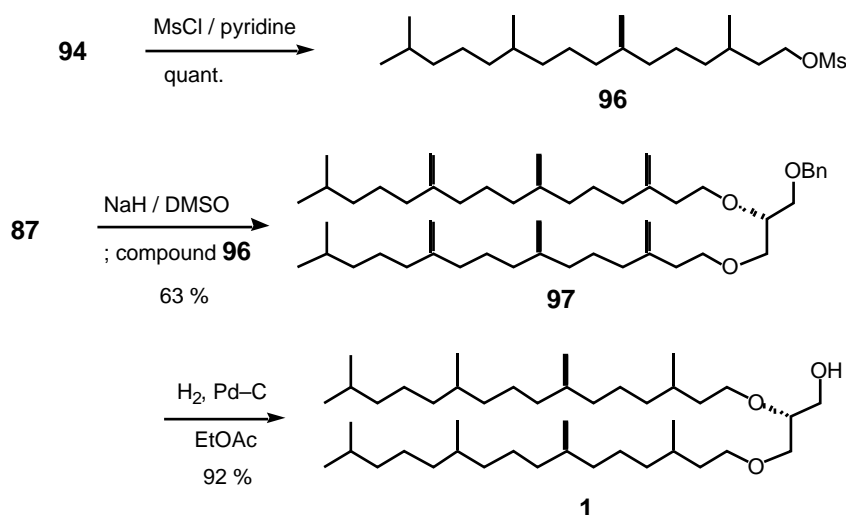
Scheme 2-11 不斉水素添加反応

またその立体選択性はスキーム 2-12 のように **94** を酸化後酸塩化物とした後、(S)-1-(1-ナフチル)-エチルアミンと縮合して得られたアミド **95** を HPLC により分析して 95 % de であると思積もった^{33a)}。



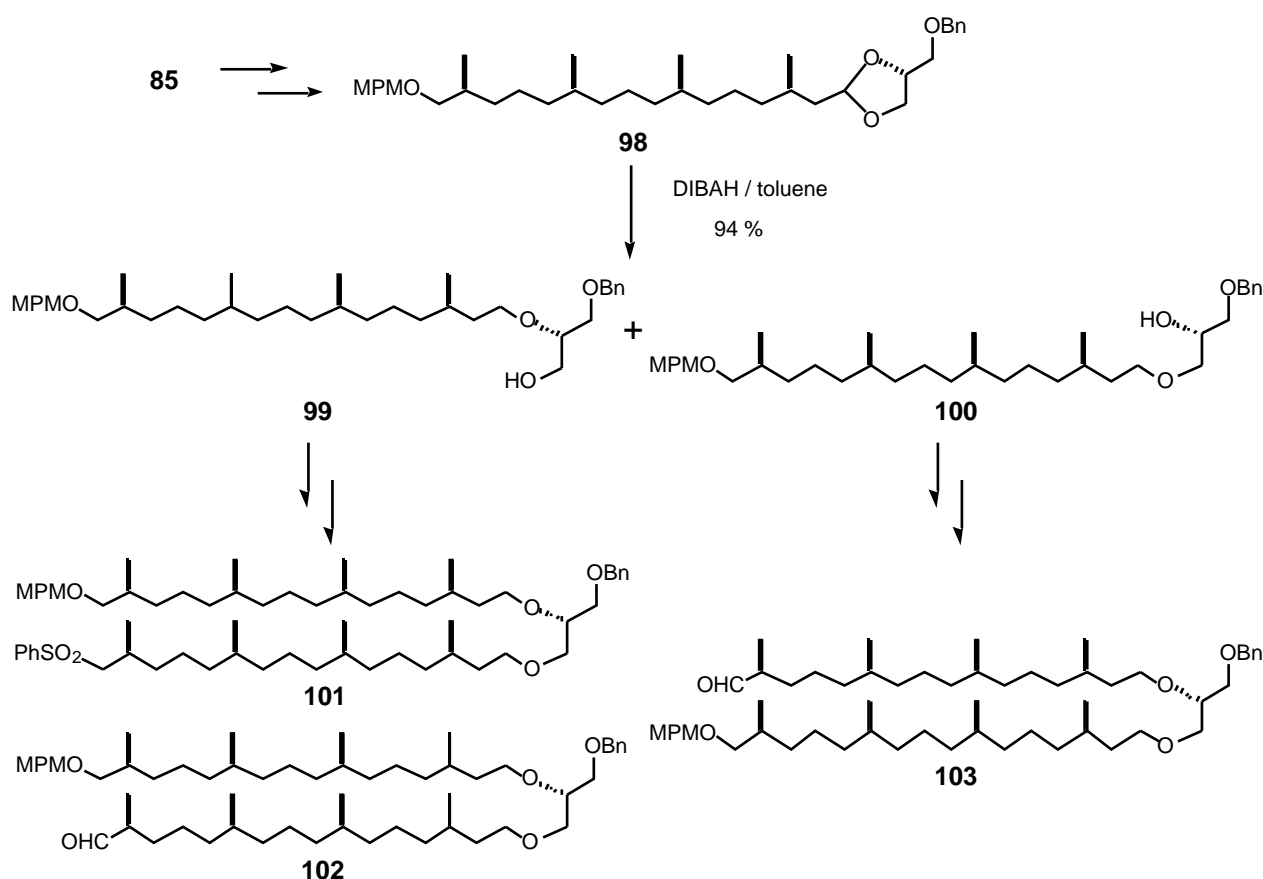
Scheme 2-12 アミド誘導体化

その後は **5** の合成手順に従い、**94** をメシル化し、**87** との間でジエーテル化、接触還元を経て非環状ジエーテル型脂質 **1** を得た (スキーム 2-13)。**1** は報告されている天然体のスペクトルデータ^{6b)} と一致し、また旋光度 $[\alpha] = +8.66^\circ$ (c 1.07, CHCl₃) も文献値 ($[\alpha] = +8.4^\circ$ (c 3.8, CHCl₃)) とよい一致を示したことから、非環状ジエーテル脂質 **1** の合成を達成することが出来た。

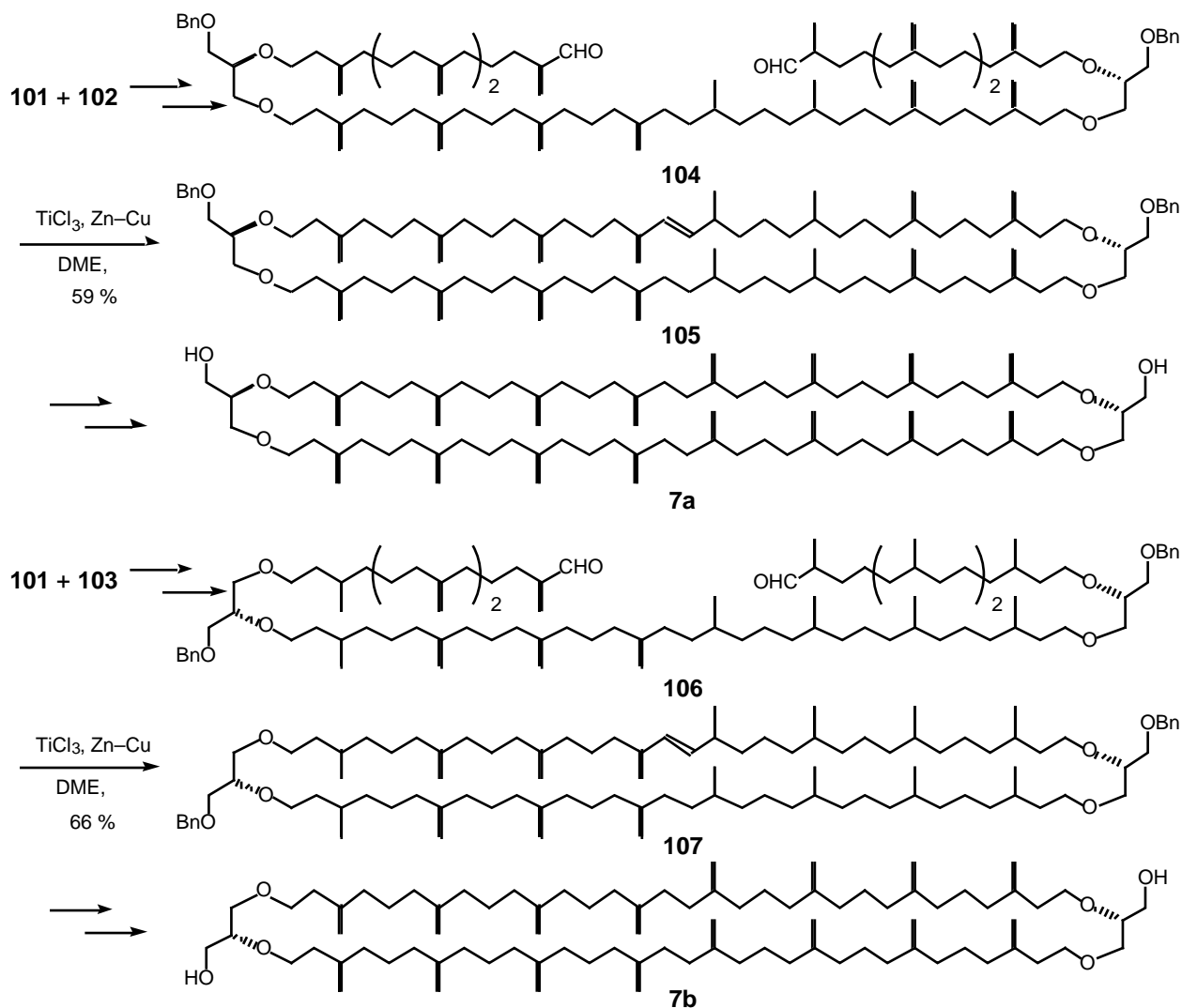


Scheme 2-13 古細菌非環状ジエーテル型脂質の合成

また本イソプレン鎖合成法及び環化反応に McMurry 反応を用いることにより、当研究室で最近古細菌 72 員環テトラエーテル型脂質 **7a**, **7b** の全合成が達成された³⁴⁾。この際環化反応の収率は各々 59 %, 66 % であり、環の大きさに関係なく良好な収率で閉環体が得られることが分かった。また生じた二重結合は 36 員環閉環体 **71** と同様に *E* 体であり、一方分岐メチル基を有さないデスメチル体では 36 員環閉環体 **68**²⁵⁾ 及び 72 員環閉環体 (第 6 章)³⁵⁾ のどちらでも *E*:*Z* = 4:1 であった。すなわち生じる二重結合の *E*/*Z* 選択性は、環構造の大小よりもむしろ、反応点の隣接官能基 (この場合は分岐メチル基) によるコンフォメーションの規制に起因するものと考えられる。



Scheme 2-14 McMurry反応による古細菌 72 員環テトラエーテル型脂質の合成 (その 1)



Scheme 2-15 McMurry反応による古細菌 72 員環テトラエーテル型脂質の合成 (その2)

第3章 オレフィンメタセシス反応を用いた古細菌 大環状脂質の全合成

3-1 はじめに

前章で述べた通り McMurry 反応は古細菌 36 員環, 72 員環脂質といった大環状化合物の合成に有用であることが分かった。しかしながら本研究の究極的な目標は古細菌大環状脂質の膜機能の解明であり、そのためには大環状脂質のさらに十分量の供給が望まれる。36 員環脂質 **5** (アルコール **73** から 14 工程) の十分量の合成は達成できたものの、72 員環脂質 **7a**, **7b** の合成ルートはまだ工程数が多く、物性測定に十分な量を得るのが困難であった (**73** から各々 29 工程)³¹⁾。

当研究室では当初、72 員環テトラエーテル型脂質には **7a**, **7b** のグリセロール位置異性体が両方存在していると考え、全合成を行ってきた。天然のテトラエーテル型脂質の両極性基が必ず異なる種類のもので構成されており^{6l,36)}、ジエーテル型脂質の生合成中間体がテトラエーテル型脂質に取り込まれたとする報告³⁷⁾ を考え合わせると、テトラエーテル型脂質は脂質二重膜に並んだジエーテル型脂質が二量化して生合成されると想起され、その際反応点から遠く離れたグリセロール部位まで認識されるとは考えにくく、天然には両位置異性体の混合物で存在していると予想されるからである (図 3-1)。

その後 Arigoni らは *Methanobacterium thermoautotrophicum*^{6c)}, *Thermoplasma acidophilum*^{6g)}, *Sulfolobus solfataricus*^{6k)} から得た天然由来テトラエーテル型脂質のグリセロールの *sn*-2 位エーテル結合を選択的に開裂させる分解反応 (図 3-2) を行い、テトラエーテル型脂質は **7a**, **7b** が約 1:1 の混合物として存在していることを明らかにした³⁸⁾。これは我々の予測をまさに裏づけるものであった。

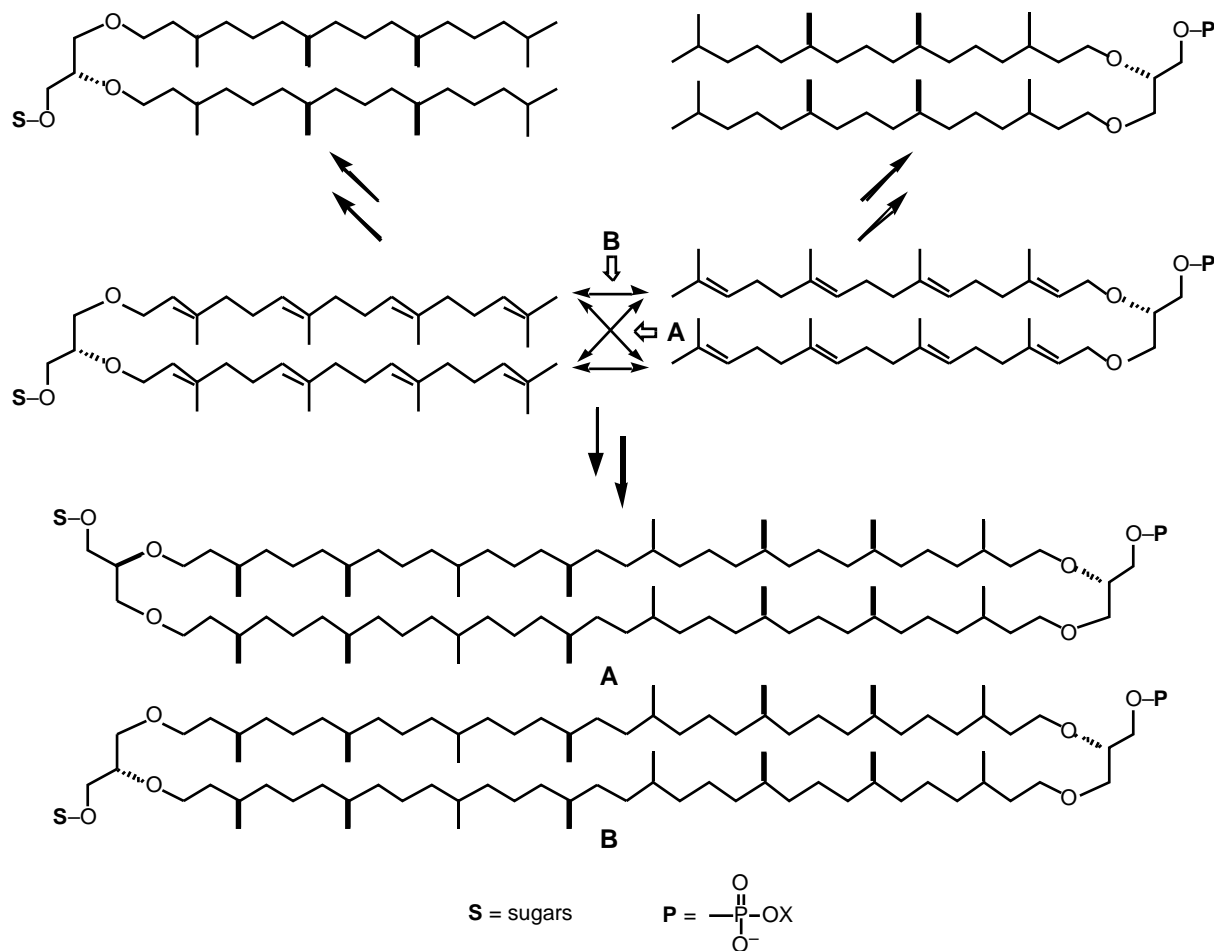


Figure 3-1 推定されている古細菌脂質生成経路

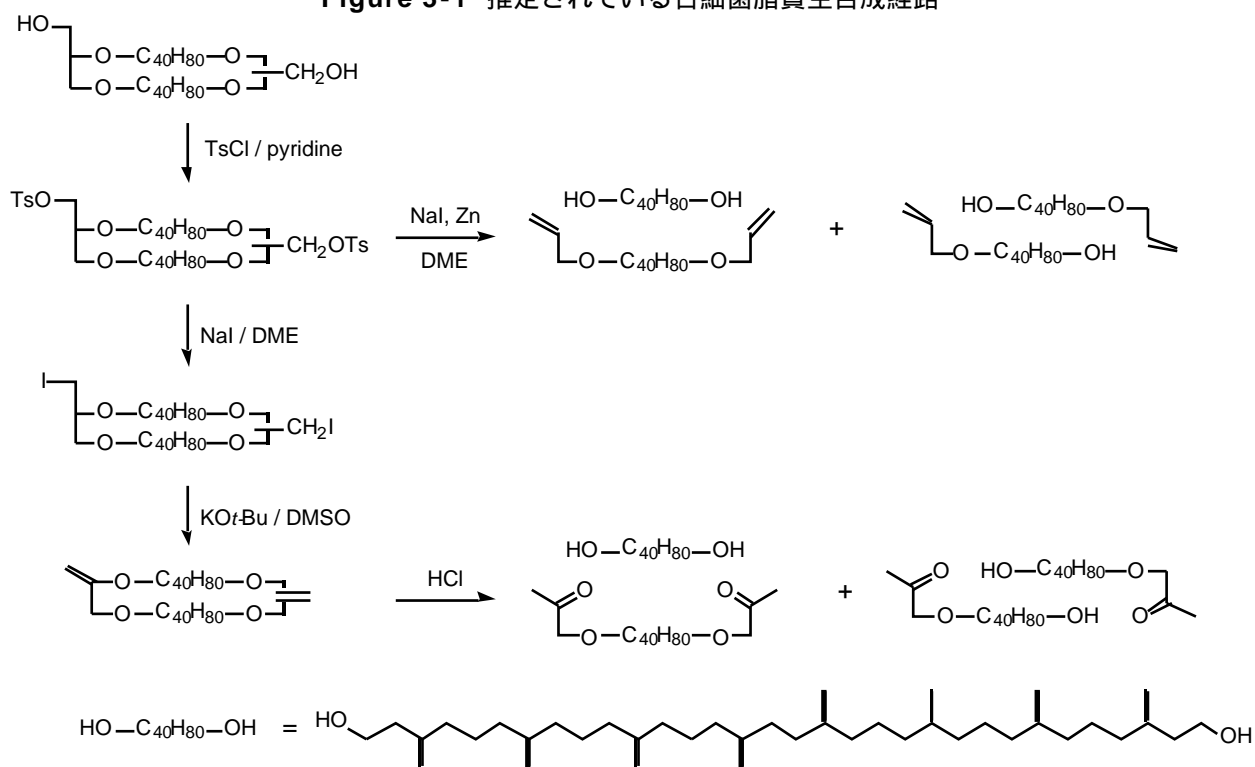


Figure 3-2 Arigoni らによるテトラエーテル型脂質の分解反応

また当研究室で合成した **7a**, **7b** (第2章) の乾燥試料について DSC 測定をしたところ、相転移温度 T_c や相転移エンタルピー変化 H_c , エントロピー変化 S_c といった熱力学的パラメーターの値に有意な差は認められなかった (図 3-3)³⁴⁾。このことは両位置異性体が分光的性質のみならず脂質集合体としての性質にも違いがみられないことを意味するものである。以上のことを考え合わせると 72 員環テトラエーテル型脂質の脂質膜としての性質を検討するためには必ずしも両者を厳密に作り分ける必要性がないと考えられる。

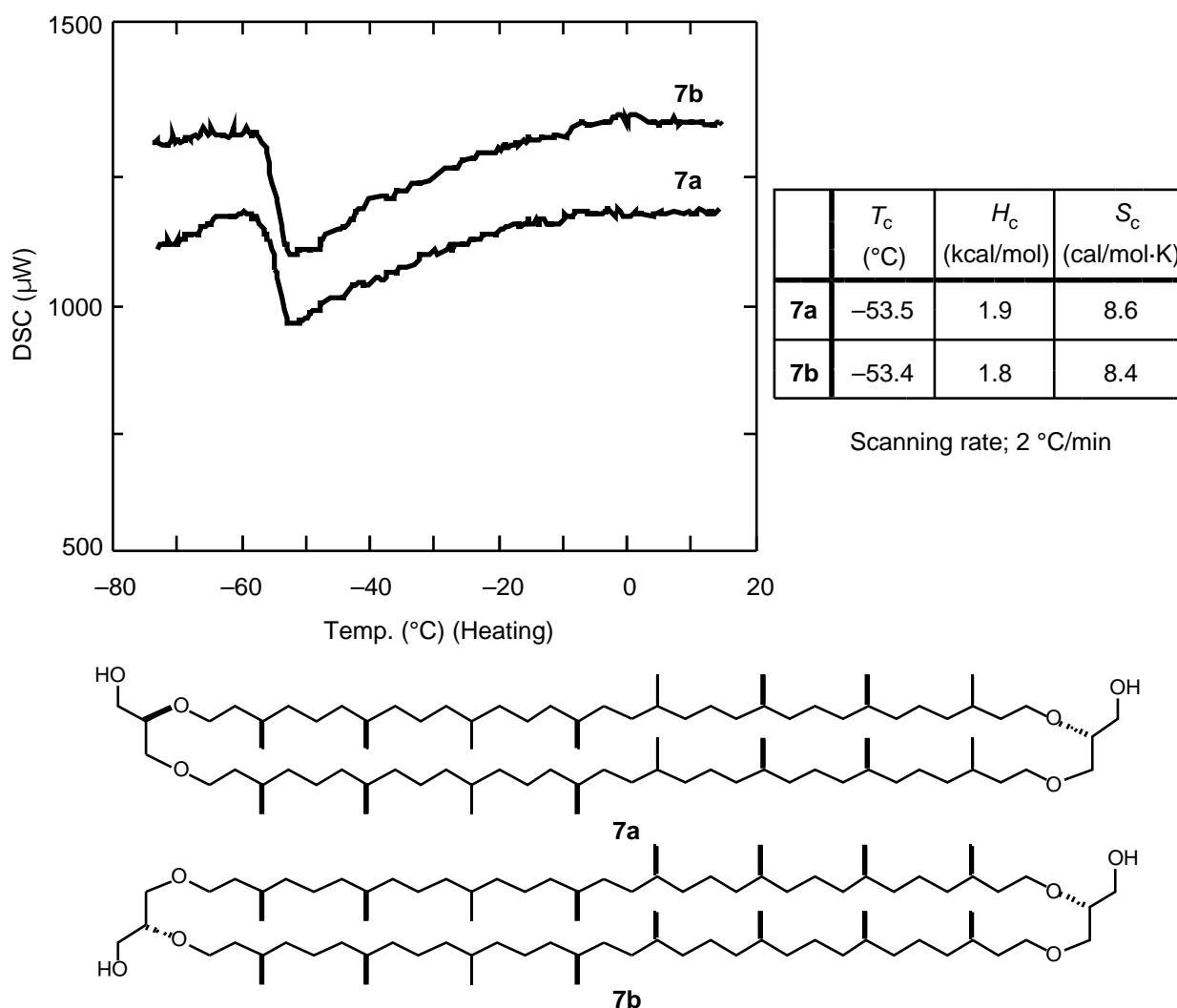
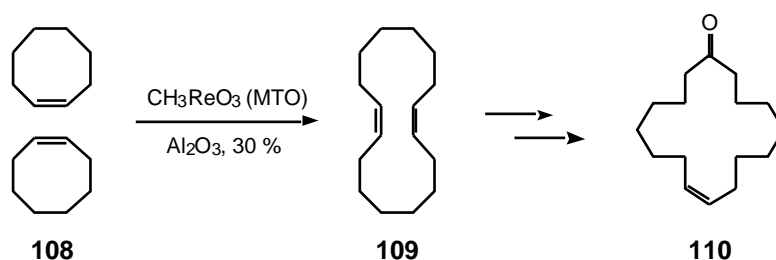


Figure 3-3 古細菌 72 員環テトラエーテル型コア脂質の DSC 曲線

グリセロール部位の位置異性体にこだわらないとすると、従来のように段階的に官能基変換を行ってジエーテル型化合物を結合させていく必要性がなくなる。またもし適切な環化反応があれば、反応点の官能基が同じ基質でもよいことになり、基質調製の容易さからも合成の効率性が向上する。つまりテトラエーテル型

脂質合成と同様にジエーテル型脂質の二量化で得る合成計画が可能となる。

香料シクロヘキサデセノン **110** を得る際のシクロオクテン **108** の二量化は、メチルトリオキシレニウム (CH_3ReO_3 , MTO) を触媒に利用するオレフィンメタセシス反応で実現されている (スキーム 3-1)³⁹⁾。そこでオレフィンメタセシス反応を古細菌大環状脂質の効率的合成に適用すべく検討することとした。



Scheme 3-1 MTO 触媒を用いたメタセシス反応によるシクロヘキサデセノンの合成

遷移金属を用いた炭素 - 炭素結合生成反応として知られているオレフィンメタセシス反応は、とりわけ図 3-4 に示した Schrock らによるモリブデンカルベン錯体 **111**⁴⁰⁾, Grubbs らによるルテニウムカルベン錯体 **112**, **113**⁴¹⁾ の開発により、革新的な環化反応の新技术として近年様々な中員環天然物合成に利用されている^{42,43)}。例えば 21 員環ラクトン 20-eicosanolide **116**^{43a)}, fluvirucin B₁ **119**^{43c,h)}, 16 員環多官能基マクロライド epothilone A **122**^{43d,e)} や 19 員環化合物 tricolorin A **125**⁴³ⁱ⁾ の全合成にも利用されている (スキーム 3-2)。また今までの天然物への適用例としては 21 員環が最大の環であった^{43a)}。

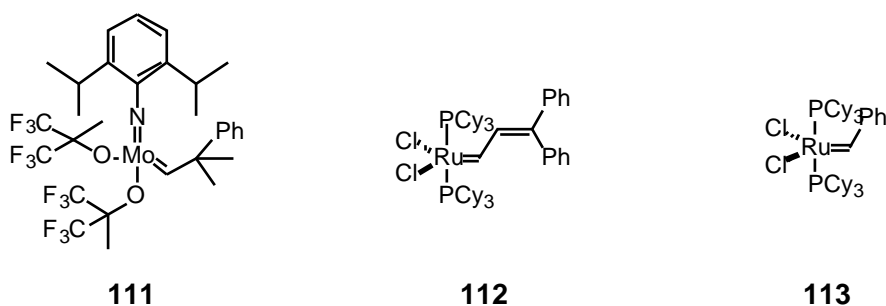
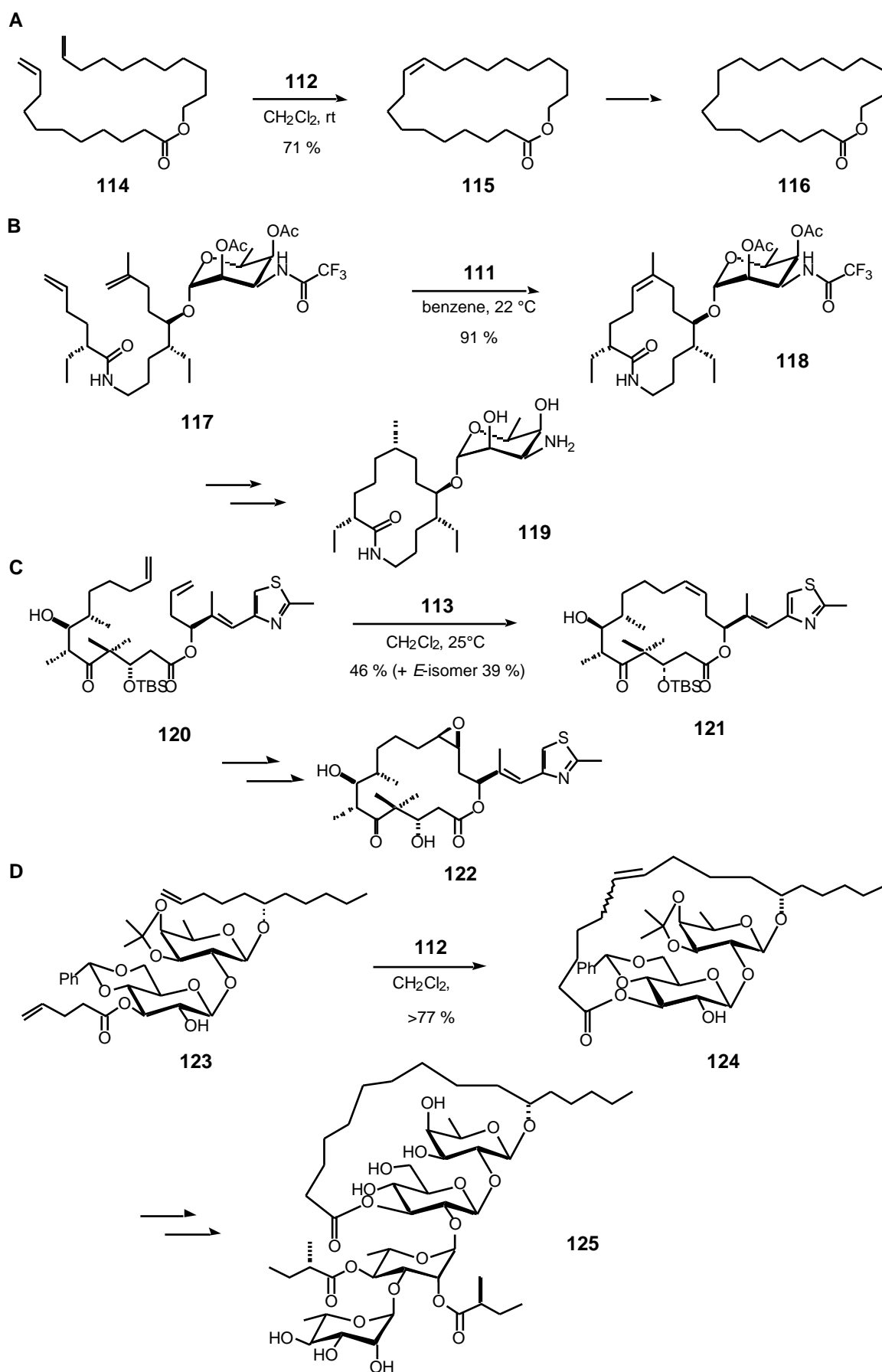


Figure 3-4 よく利用されているカルベン錯体



Scheme 3-2 A) 20-icosanolide の合成, B) fluvirucin B₁ の合成, C) epothilone A の合成, D) tricolorin A の合成

オレフィンメタセシス反応の特徴の一つに、その反応様式の多様性が挙げられる⁴²⁾。主なものを図 3-5 に示す。先程述べたジエンの分子内環化反応である閉環メタセシス反応 (RCM)の他に、閉環体の開環反応をともなう開環メタセシス反応 (ROM), ジエンの分子間反応である鎖状ジエンメタセシス重合 (ADM), 二種のアルケンによるクロスメタセシス, さらにはアルケンとアルキンによるエンインメタセシスなどが知られており、スキーム 3-3 に開環メタセシス, クロスメタセシス, エンインメタセシスの利用例 (各々 **A**^{41d)}, **B**^{42b)}, **C**⁴⁴⁾) を示す。このようにオレフィンメタセシス反応は様々な有機合成に利用可能である。

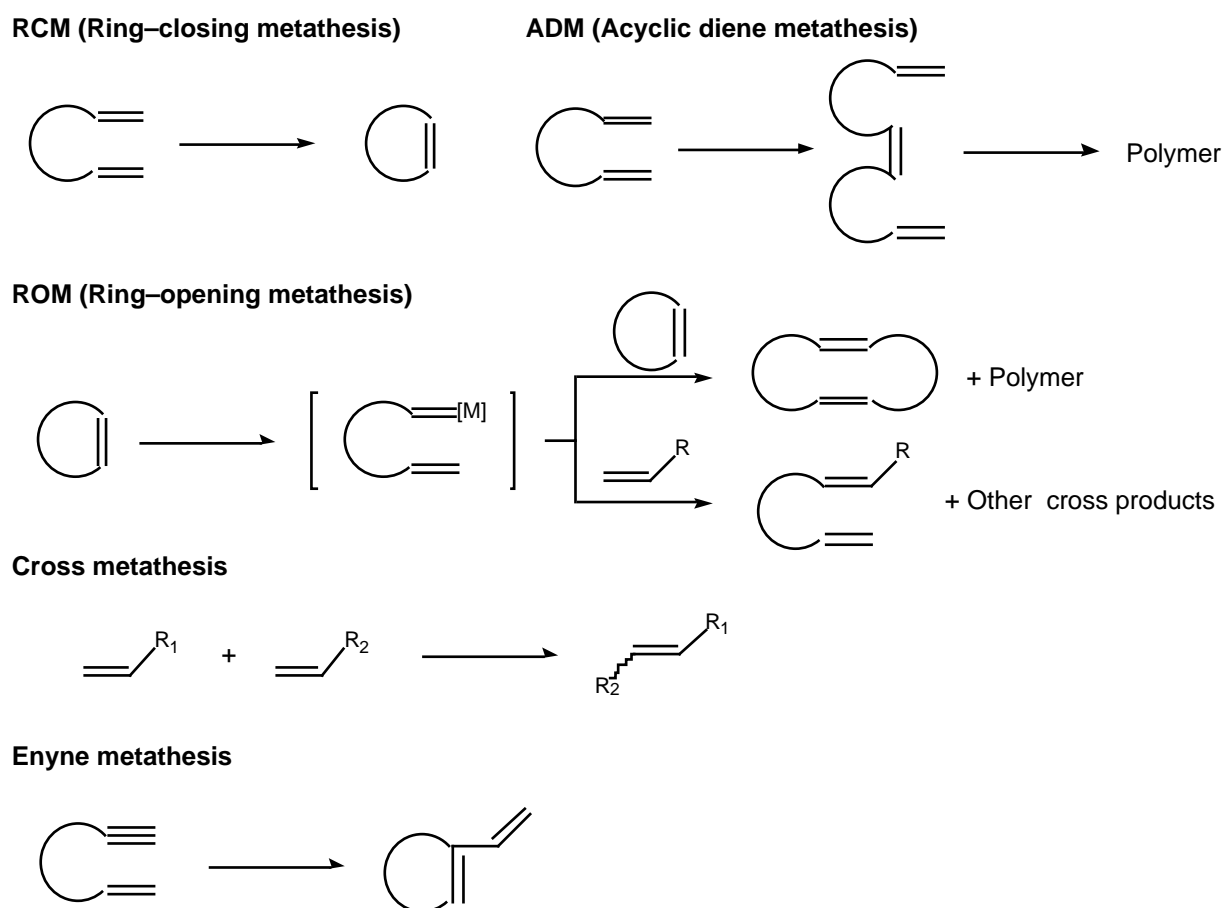
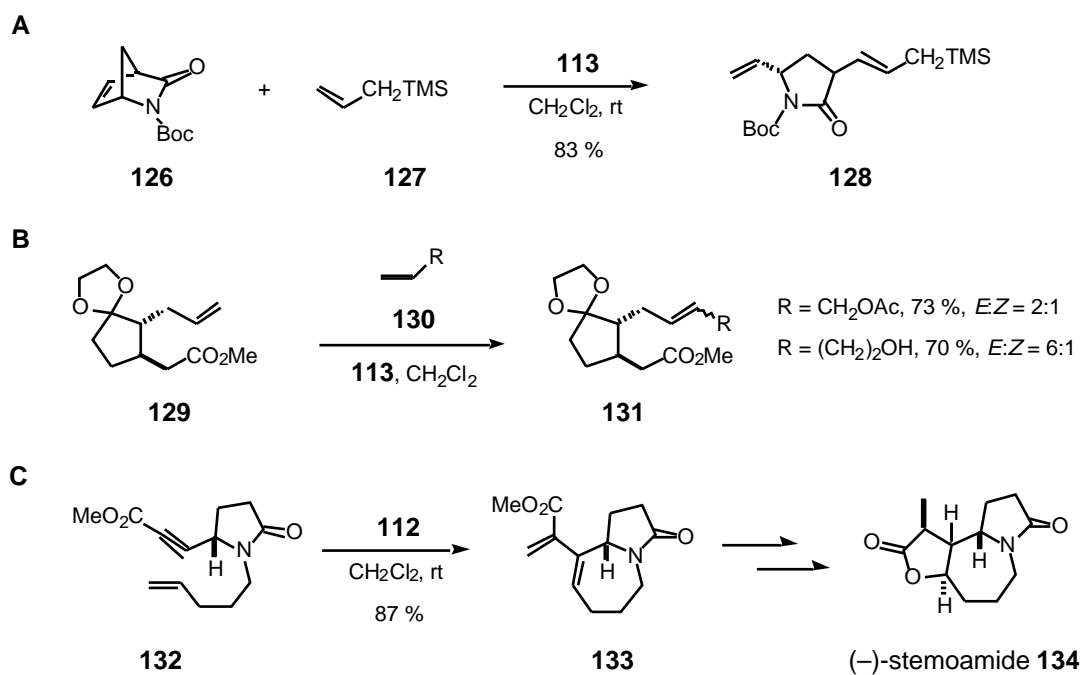


Figure 3-5 オレフィンメタセシス反応の反応様式



Scheme 3-3 A) 開環メタセシス (ROM), B) クロスメタセシス, C) エンインメタセシスを用いた合成例

本章ではこれら多種多様な反応様式を有するオレフィンメタセシス反応を用いて古細菌大環状脂質、特に 72 員環テトラエーテル型脂質の効率的合成ルートを確立したことについて述べる。

3-2 ジエンの閉環メタセシス反応による 36 員環形成及び 開環メタセシス反応の検討

3-2-1 合成計画

分子内閉環メタセシス反応，開環メタセシス反応を用いた古細菌 36 員環脂質
及び 72 員環脂質の新規合成デザインを各々図 3-6, 3-7 に示す。

36 員環閉環体 **136** は、環化前駆体のジエン **135** を高希釈条件で分子内閉環
メタセシス (RCM) 反応を優先させることによって合成可能と考えられる。この
とき基質濃度が高いと分子間反応と競合して非環状トリエン **137** や 72 員環閉
環体 **138** などの重合体が生成すると考えられる。

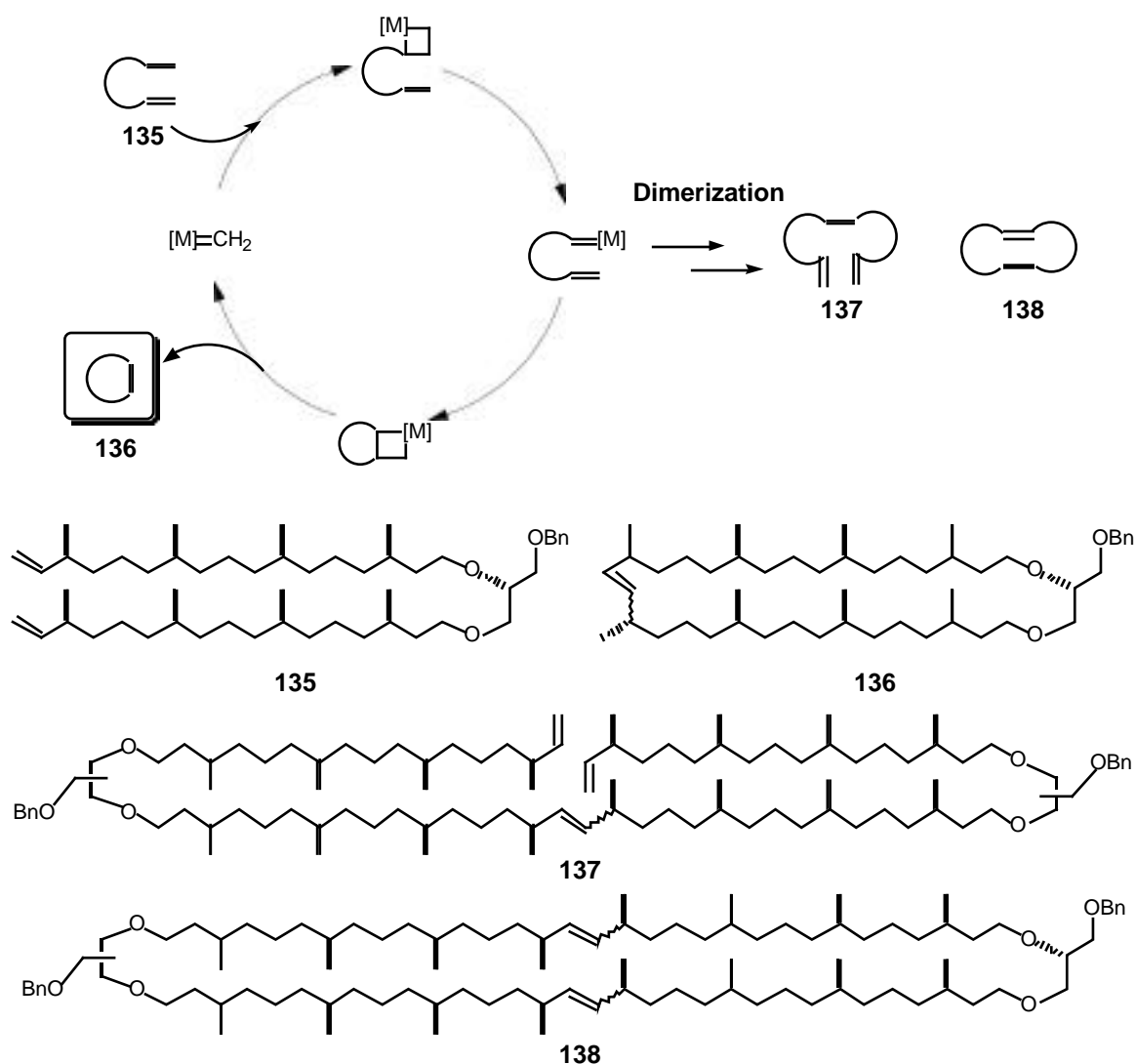


Figure 3-6 RCMによる36員環閉環体**136**の合成計画

一方、その二量体である 72 員環閉環体 **138** は、スキーム 3-1 に示した例のように 36 員環閉環体 **136** の開環メタセシス (ROM) 反応を経由することで合成可能と考えられる。すなわち **136** の開環反応を伴ってもう一分子の **136** と反応して二量化し、閉環メタセシス反応を経て 72 員環脂質 **138** が得られることになる。この際、72 員環脂質は位置異性体混合物として得られるが、すでに述べたように脂質膜の性質を検討する上では問題ない。開環メタセシス反応はノルボルネン骨格のような歪んだ環状化合物に対しては速やかな開環反応の進行が知られているが、**136** のような大環状化合物に対する適用例は知られていなかった。

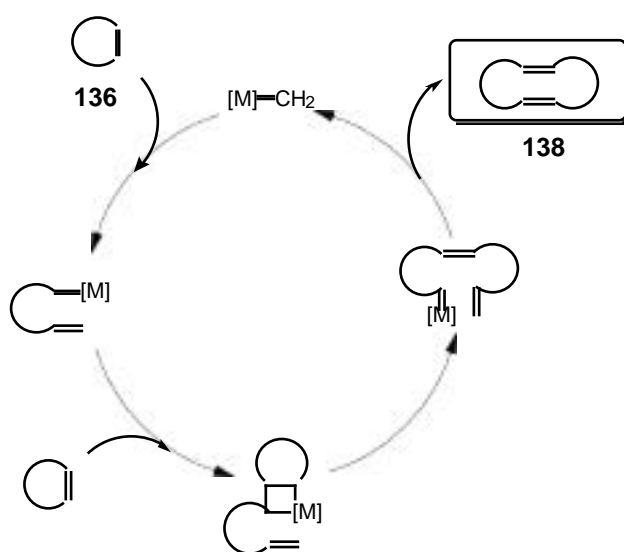


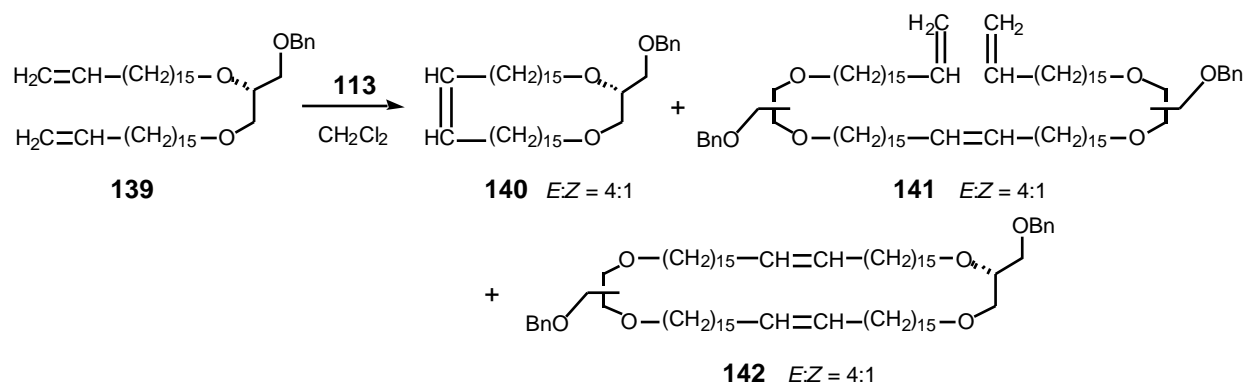
Figure 3-7 ROMによる72員環閉環体**138**の合成計画

この合成ルートが上手く機能するためには、Glaser 反応や McMurry 反応のように不均一系触媒の表面を介して反応点を近づけるものとは異なり、オレフィンメタセシス反応のような反応点を近づける因子のない反応でも大員環形成が進行するのか、また 36 員環閉環体 **136** に対して開環メタセシス反応が効率的に進行するかどうかの検討が必要であった。

3-2-2 36 員環形成及び開環メタセシス反応の検討

今までのオレフィンメタセシス反応の合成例⁴³⁾を参照すると、用いる触媒、溶媒の種類により反応性が全く異なることが知られている。

そこでまずオレフィンメタセシス反応が 36 員環，72 員環閉環体の合成に適用可能かどうか確認するために、まずジアルデヒド **67**²⁵⁾ から調製したジエン **139** の閉環メタセシス反応 (スキーム 3-4) について、触媒及び溶媒の検討を行った。予備的検討により、触媒については、モリブデン触媒 **111** よりもルテニウム触媒 $\text{RuCl}_2(=\text{CHPh})(\text{PCy}_3)_2$ **113** の方がメタセシス反応のよい再現性を示し、またその取り扱いが簡便であった。溶媒については、広く利用されているジクロロメタンとベンゼンとを試したところジクロロメタンの方が反応加速性が高かった。以上のことより今後の実験では触媒に **113** を、溶媒にはジクロロメタンを用いることとした。



Scheme 3-4 モデル化合物の閉環メタセシス反応

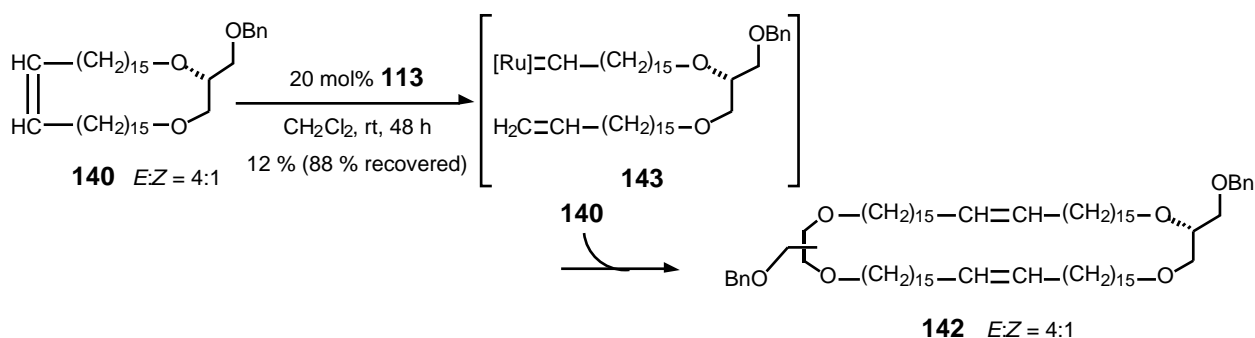
ジエン **139** の閉環メタセシス反応では **113** 存在下、高希釈条件で加熱還流したところ、75 % の収率で 36 員環閉環体 **140** を得ることが出来た (スキーム 3-4, 表 3-1)。また同時に分子間反応生成物である 72 員環閉環体 **142** も得ることが出来た。このことは 36 員環及び 72 員環閉環体の合成にオレフィンメタセシス反応が適用可能であることを示すものである。非環状トリエン **141** の生成はほとんどみられなかったが、この **141** は反応系中で速やかに閉環メタセシスにより **142** を形成するか、もしくは内部オレフィンと反応して **140** を形成することで消費されたと考えられる。

Entry	Substrate (mM)	Catalyst (mol%)	Conditions	Isolated yield (%)			Recovered 139 yield (%)
				140	141	142	
1	2.9	20	reflux, 15 h	75	trace	5	12
2	6.2	5.4	rt, 34 h	47	trace	13	30

Table 3-1 モデル化合物の開環メタセシス反応

次に **140** への開環メタセシス反応を行った。もしこの反応が進行するならば 36 員環閉環体の開環反応により中間体 **143** を生じ、次いでもう一分子の **140** と反応することで **142** もしくは更なる重合体が生成すると考えられる。実際に反応を行ったところ、12% の収率ながら開環メタセシス反応が進行し、目的の 72 員環閉環体 **142** を得ることが出来た (スキーム 3-5)。

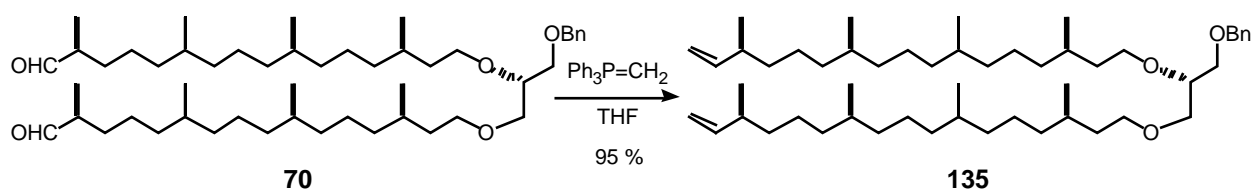
このことは **142** が、図 3-7 に示した合成計画の通り、ジエン **139** のメタセシス反応で同時に得られる 36 員環閉環体 **140** から構築可能であることを示している。



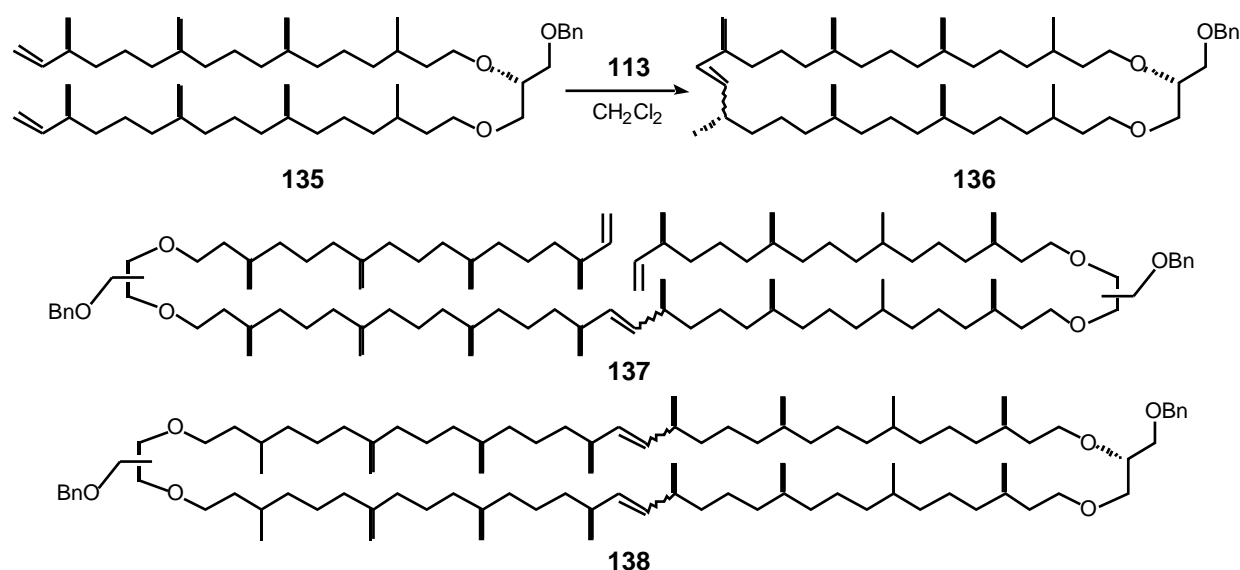
Scheme 3-5 モデル化合物の開環メタセシス反応

モデル基質での検討から、大環状脂質の合成においてオレフィンメタセシス反応が適用可能であることをまず見出すことが出来た。

次に天然型での検討を行った。基質であるジエン **135** は前章で述べたジアルデヒド **70** に Wittig 試薬を作用させて 95% の収率で得た (スキーム 3-6)。

Scheme 3-6 ジエン **135** の合成

まず 36 員環閉環体 **136** を効率的に得るべく、**135** の閉環メタセシス反応の検討を行った。その結果を表 3-2 に示す。



Scheme 3-7 ジエン **135** の閉環メタセシス反応

Entry	Substrate (mM)	Catalyst (mol%)	Conditions	Isolated yield (%)		
				136	137	138
1	5.1	10	rt, 115 h	0	0	0
2	3.8	29	reflux, 42 h	79	trace	6
3	7.8	22	reflux, 36 h	55	6	11
4	29	20	reflux, 12 h	15	12	11

Table 3-2 ジエン **135** の閉環メタセシス反応

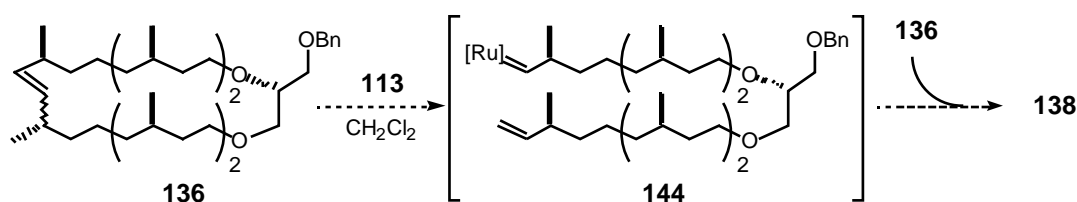
基質濃度 5.1 mM という高希釈条件下、室温で行ったところ、反応の進行は全くみられなかった (表 3-2, entry 1)。この結果は先のモデル実験とは全く異なるものであった。つまり天然型基質では室温での分子内環化反応が進行しないことを示している。そこで反応温度を上げ、加熱還流したところ原料は消失し、目的の 36 員環閉環体 **136** を 79 % という良好な収率で得ることが出来た (表 3-2, entry 2)。このことは反応温度を上げることで基質の分子運動が活発化し、分子内の反応点同士が近づくことによって環化反応が進行することを示している。またこの際分子間反応生成物である **137**, **138** の生成も確認出来た (これら化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離可能)。この知見により、反応条

件の最適化により 72 員環閉環体が得られる可能性をまず見出すことが出来た。

加熱還流条件下、基質濃度をさらに上げていくと、136 の収率が低下していくことが分かった (表 3-2, entries 3,4)。これは基質濃度の上昇により分子間反応が競合して分子内環化よりも優先され、ポリマー化が進んだ結果と考えられる。

以上より、天然型基質 135 への閉環メタセシス反応は加熱して十分に反応系に熱運動を与えることによって実現可能であり、室温程度の反応温度では分子内環化反応が進行しないことが分かった。このことは室温において、基質濃度を上げることによって環化反応が進行することなく分子間メタセシス反応が進行し、非環状トリエンが優先的に得られる可能性を示唆するものである。

次に得られた 136 から開環反応を経て 138 を得るべく開環メタセシス (ROM) 反応を行った。しかしながら反応は全く進行せず、原料回収に終わった (スキーム 3-8, 表 3-3)。モデル基質では 36 員環閉環体から優先的に 72 員環閉環体を得ることが出来たが、天然体では残念ながら開環メタセシス経路 (図 3-7) による 138 の合成は出来なかった。



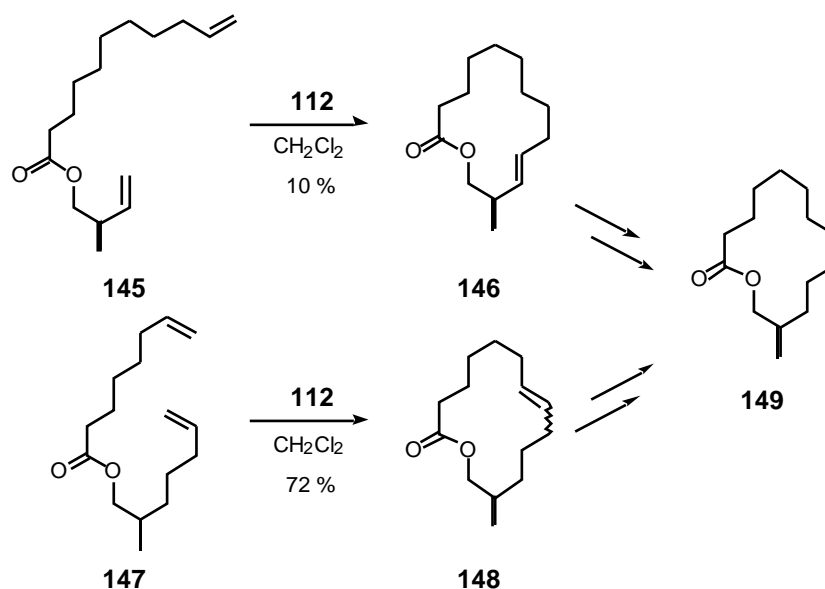
Scheme 3-8 36 員環閉環体 136 の開環メタセシス反応

Entry	Substrate (mM)	Catalyst (mol%)	Conditions	Isolated yield (%)	
				136	138
1	5.0	23	reflux, 43 h	—	0
2	16	43	reflux, 53 h	—	0

Table 3-3 36 員環閉環体 136 の開環メタセシス反応

モデル基質と天然型基質との間における反応性の著しい違いから次のようなことが考えられる。すなわちオレフィンメタセシス反応においては、その反応性に対して、オレフィンに隣接する分岐メチル基の立体的要因が影響するということが出来た。これに関しては、すでに Fürstner らが (12*R*)-(+)-12-メチル-13-トリ

デカノライド **149** を合成する際、オレフィンに隣接したメチル基を有する基質 **145** では閉環メタセシス反応が 10 % 程度しか進行せず、一方反応点近傍に分岐メチル基がない基質 **147** では 72 % の収率で進行していることを報告している (スキーム 3-9)^{43a)}。



Scheme 3-9 (12*R*)-(+)-12-メチル-13-トリデカノライド合成における閉環メタセシス反応

これらの結果より、天然型基質 **135** においては室温で閉環反応が全く進行しないこと、36員環閉環体 **136** の内部オレフィン (2置換オレフィン) には全く反応性がないことが分かった。このことは逆に幸いなことに、非環状トリエン **137** に対する閉環メタセシス反応が末端オレフィンでのみ生じ、内部オレフィンにおいてはメタセシス反応が進行しないと考えられ、官能基選択的なメタセシス反応が可能であることを示している。

3-3 ジエンの分子間メタセシス反応及び非環状トリエンの閉環メタセシス反応による 72 員環形成

3-3-1 合成計画

前節の実験から室温程度の温度では閉環メタセシス反応が進行しないこと、³⁶ 員環脂質 **136** に対する開環メタセシス反応が全く進行しないことが分かった。これらの知見は各々室温で基質濃度を上げると非環状トリエンが優先的に得られる可能性、内部オレフィンの低反応性により、オレフィンの位置選択的なメタセシス反応が進行する可能性を示唆するものであった。

そこで分子間鎖状ジエンメタセシス反応、分子内閉環メタセシス反応を組み合わせた古細菌 72 員環脂質の合成ルートの概略を図 3-8 に示す。72 員環閉環体 **138** は、**135** の分子間鎖状ジエンメタセシス (ADM) 反応により **137** とした後、反応条件を変えて高希釈条件下分子内閉環メタセシス反応を行うことで合成可能と考えられる。すなわち、**136** 及び **138** は同一の基質 **135** から構築することが出来る。この合成ルートが上手く機能するためには、分子間反応が重合化を避ける形で収率よく進行するのか、さらには非環状トリエン **137** のオレフィンメタセシス反応が末端ジエンのみで反応すること、すなわち位置選択的にメタセシス反応が進行することが可能かどうかの検討が必要であった。

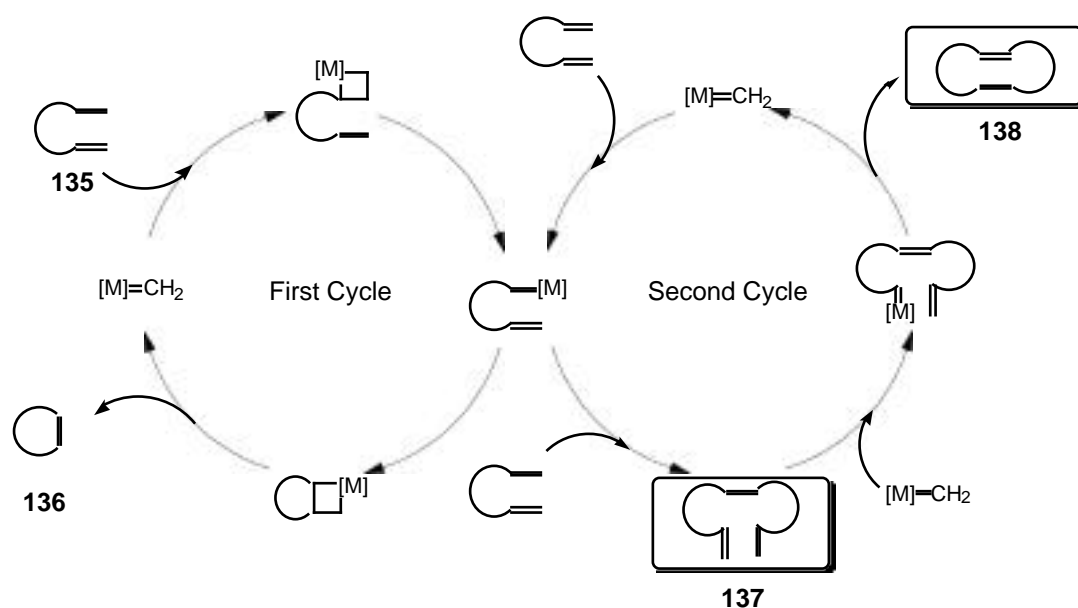
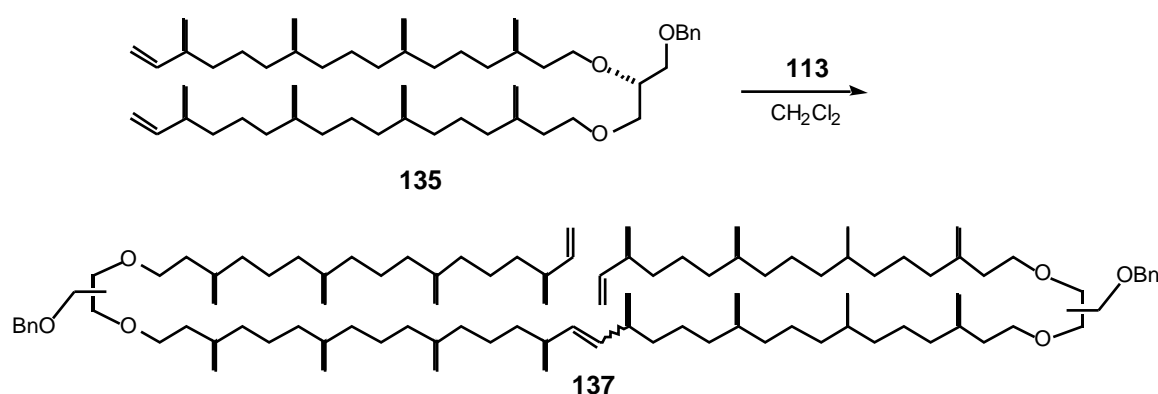


Figure 3-8 ADM, RCMを組み合わせた 72 員環閉環体 **138** の合成計画

3-3-2 72 員環形成の検討

まず、非環状トリエン **137** を得るべく、ジエン **135** の鎖状ジエンメタセシス (ADM) 反応の検討を行った。前節での知見から室温程度の反応温度では分子内環化は起こらないことを見出した。つまり分子間反応生成物である **137** を優先的に得るためには、反応温度を下げて分子内環化反応を防ぎ、また基質濃度を上げて分子間反応を優先させればよいことになる。この際、さらなる重合化をさけるような基質濃度を最適化する必要がある。その検討結果を表 3-4 に示す。

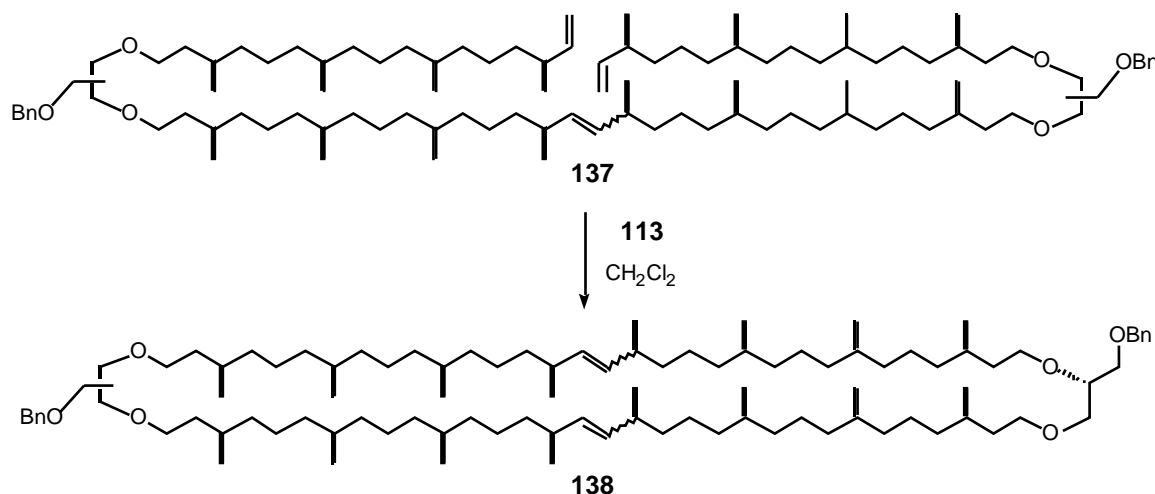
反応時間、変換効率の両者を考慮した上で最も効率的であった条件は基質濃度 108 mM で 9 時間反応させた場合であり、35% (原料回収 57%) の収率で **137** を得ることが出来た (表 3-4, entry 3)。原料回収を考慮に入れた変換効率は 81% であり、原料を再利用することで **137** を十分量得ることが出来る。

Scheme 3-10 ジエン **135** の鎖状ジエンメタセシス反応

Entry	Substrate (mM)	Catalyst (mol%)	Conditions	Isolated yield (%)		Conversion yield of 137 (%)
				recovered 135	137	
1	40	7	rt, 63 h	60	28	70
2	78	20	rt, 22 h	59	26	63
3	108	20	rt, 9 h	57	35	81
4	408	20	rt, 20 h	43	19	33

Table 3-4 ジエン **135** の鎖状ジエンメタセシス反応

得られた **137** に分子内環化反応を行い 72 員環閉環体 **138** を得るべく、閉環メタセシス反応の検討を行った。その結果をスキーム 3-11, 表 3-5 に示す。基質濃度 1.0 mM という高希釈条件下、加熱還流して反応を行ったところ 46 % (原料回収 40 %) の収率で **138** を得ることが出来た。

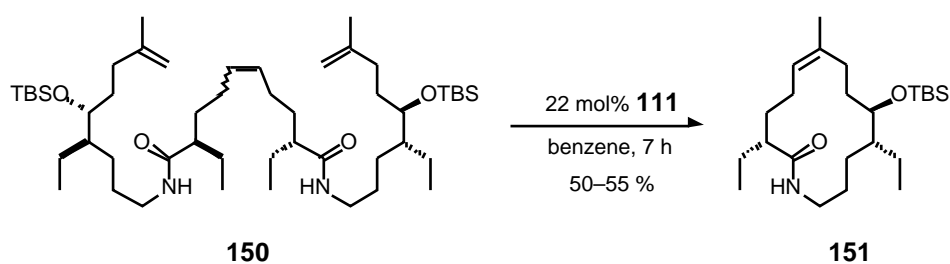


Scheme 3-11 非環状トリエン **137** の閉環メタセシス反応

Entry	Substrate (mM)	Catalyst (mol%)	Conditions	Isolated yield (%)		Conversion yield of 138 (%)
				recovered 137	138	
1	1.0	36	reflux, 72 h	40	46	77
2	2.9	40	reflux, 68 h	5	19	20

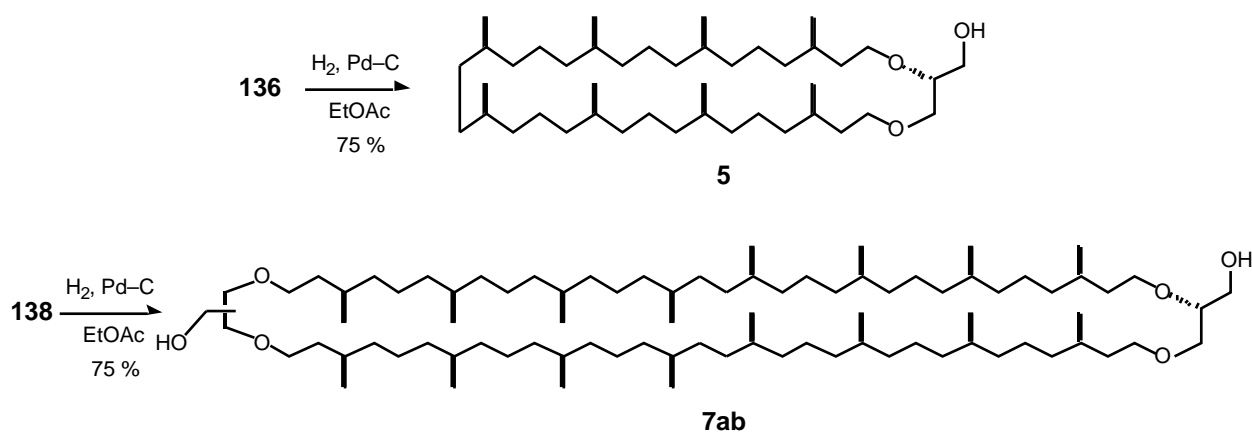
Table 3-5 非環状トリエン **137** の閉環メタセシス反応

なお、この際スキーム 3-12 の fluvirucin B₁ アグリコン **151** の合成例^{43h)} にみられるように末端オレフィンが内部オレフィンと反応する可能性、すなわち非環状トリエン **137** の内部オレフィンと反応して 36 員環閉環体 **136** を形成する可能性が懸念されていたが、72 員環閉環体 **138** だけが得られ、**137** に対しては官能基選択的なメタセシス反応が進行することが分かった。これは二重結合に隣接するメチル基の立体的要因によるものであろうと考えられる。



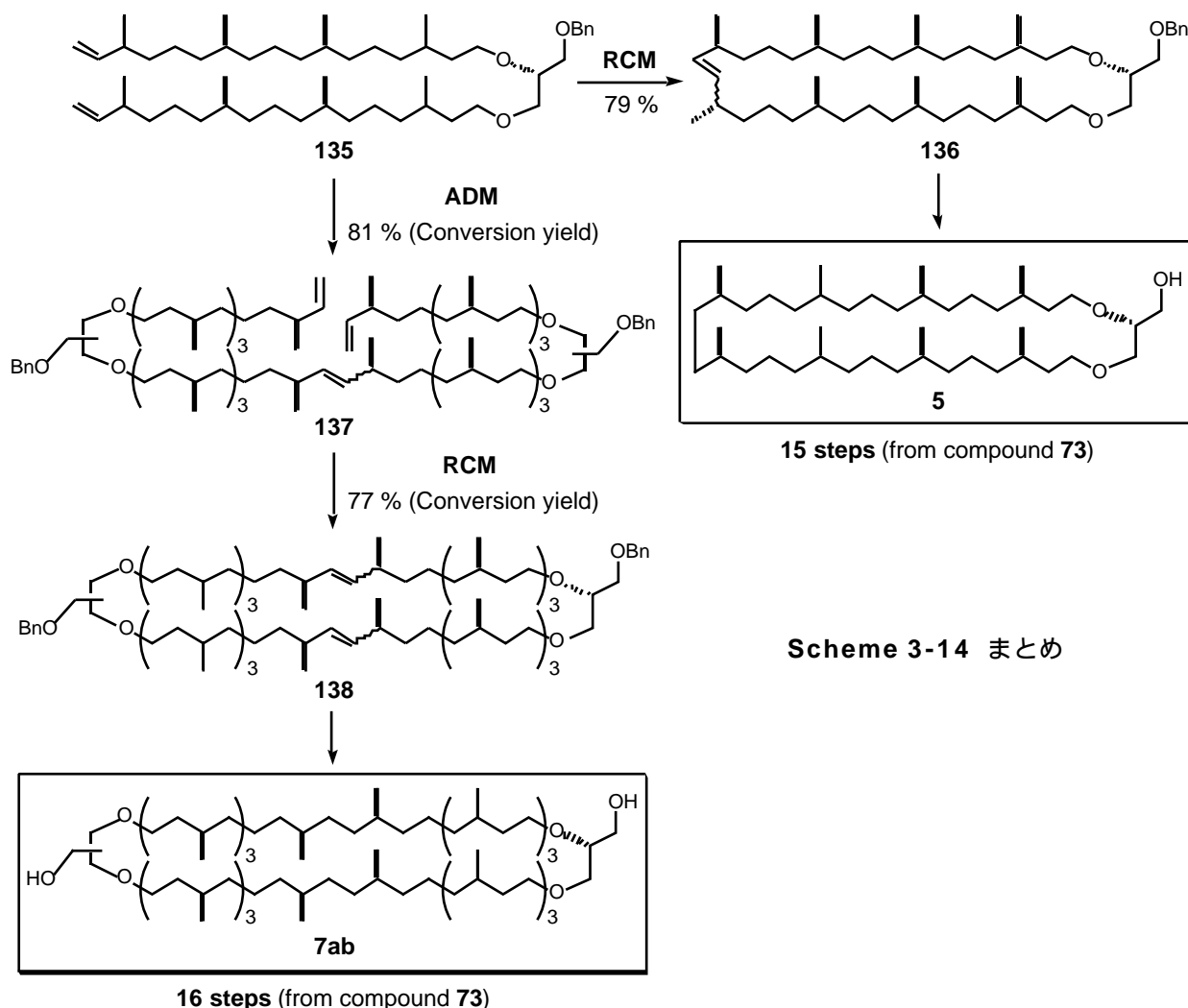
Scheme 3-12 非環状トリエンの末端オレフィンと内部オレフィンとの反応例

このようにして得られた 36 員環閉環体 **136** 及び 72 員環閉環体 **138** について接触水素添加を行い、天然型古細菌 36 員環ジエーテル型脂質 **5** 及び 72 員環テトラエーテル型脂質 **7ab** を各々得ることが出来た (スキーム 3-13)⁴⁵⁾。これらは McMurry 反応を分子内環化反応に適用して合成したもの^{26,34)}、及び天然物の各種スペクトルデータ^{6j,n)}と比較することで構造を確認した。

Scheme 3-13 古細菌 36 員環 **5**、72 員環コア脂質 **7ab** の合成

3-4 まとめ

多様な反応様式をもつオレフィンメタセシス反応を用いることにより、36員環**136**及び72員環閉環体**138**を計画通り同一の基質**135**から得ることが出来た。72員環脂質はグリセロールの位置異性体混合物で得られるため、単純に合成効率を比較することは出来ないが、以前の合成ルート(29工程)と比べて著しく短工程で合成可能となった(16工程)。**138**は、**136**の開環メタセシスにより得ることは困難であったが、まず室温程度の温度で分子間反応を行い非環状トリエン**137**とし、次いで反応条件を変え、高希釈条件下加熱還流することで得ることが出来た。これは分子間の鎖状ジエンメタセシス(ADM)反応と分子内閉環メタセシス(RCM)反応とを組み合わせたタンデム型オレフィンメタセシスの、天然物への最初の応用例である。



Scheme 3-14 まとめ

第4章 大環状リン酸ジエステル型モデル化合物の合成及びその脂質膜の性質

4-1 はじめに

生体膜脂質は水中に分散させると分子単独では存在せず、脂質分子の種類や分散液の pH, 塩濃度などに応じて様々な分子集合体を形成する。このことは古くから観察されていることであったが、1964年 Bangham らが、生体膜脂質で構成される集合体がイオンを通さない閉鎖小胞であることを発見したことにより、脂質分子が生体膜にとって最も重要な機能であるバリアー能を担っていることが分かった⁴⁶⁾。この閉鎖小胞は分子の疎水部を互いに向け合い、一方親水部を外水相、内水相にさらした脂質二重膜でなっていることが明らかとなっており、今日ではリポソームと呼ばれている。リポソームは水に懸濁させるだけで容易に調製可能であり、また内水相及び脂質二重膜中に各々親水性分子、疎水性分子を内包したのもも調製出来るため、生体膜モデルとして様々に利用されてきている^{8b,47)}。模式図を図 4-1 に示す。

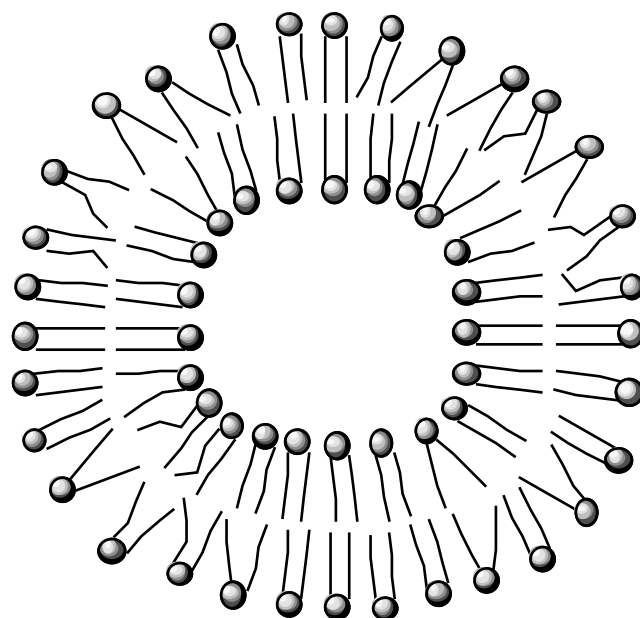


Figure 4-1 リポソームの模式図

このリポソームは生体膜脂質のみでなく、合成モデル脂質からも調製出来る。1977年、Kunitake, Okahata らはリン脂質ではない、長鎖ジアルキルアンモニウム塩のような両親媒性化合物でも二分子膜を形成することを見出している^{48a)}。また彼らは、二分子膜を形成するにはある程度の長さをもった二本鎖 (C_{12} - C_{18} 程度)、もしくは鎖中央部に "rigid segment" と呼ばれる分子間相互作用の強いグループを有した一本鎖型化合物であることが必要であるとも提唱している^{48b,c)}。図 4-2 に Kunitake, Okahata らの主な二分子膜形成モデル化合物を示す^{8b,48)}。

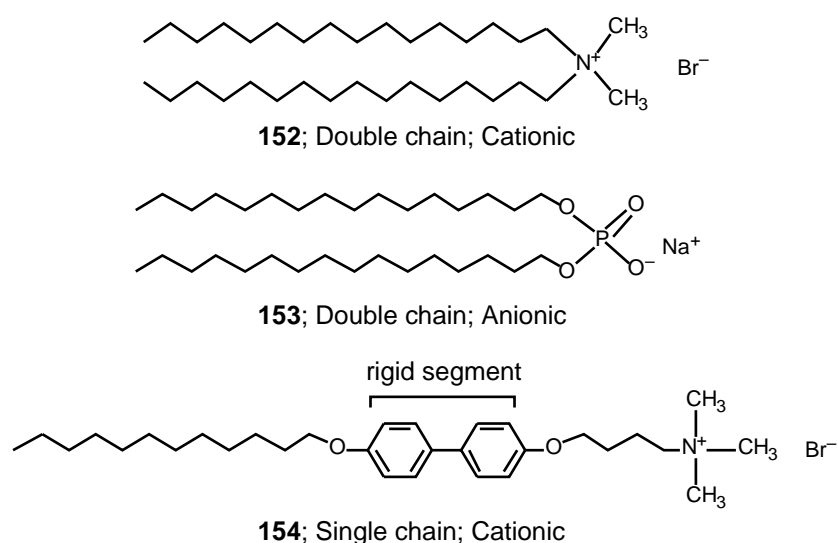


Figure 4-2 二分子膜を形成するモデル化合物

極性基の種類・大きさも集合体の構造に大きな影響を及ぼす (図 4-3)。親水性と疎水性とが適切なバランスを保っている分子はシリンダー型分子とよばれ、その会合体はラメラ構造をとる。ホスホコリンを極性基に有した脂質分子がこれに分類される。また疎水性が相対的に大きいときはコーン型分子とよばれ、疎水部を外側に向けてチューブ状に配列するヘキサゴナル II 相をとる。ホスホエタノールアミンを極性基に有した脂質が分類される。一方疎水性より親水性の方が相対的に大きいときには逆コーン型 (くさび型) 分子とよばれ、ミセルを形成する。リゾホスファチジルコリンや界面活性剤がこの例である。

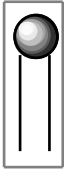
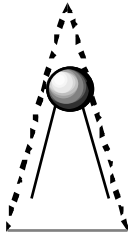
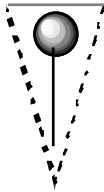
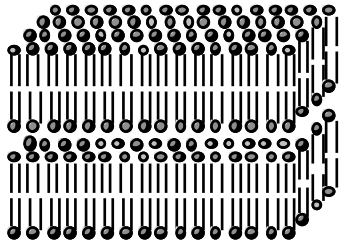
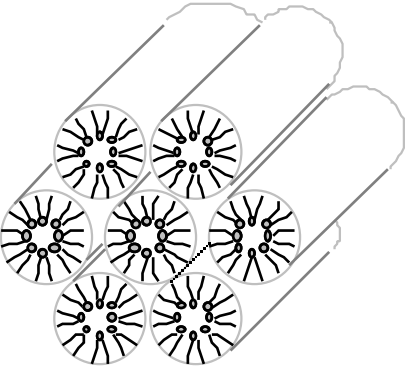
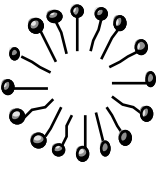
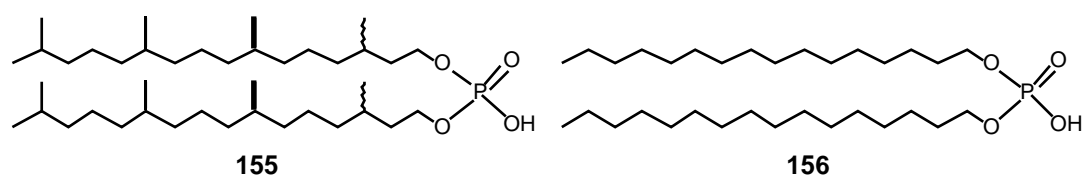
	シリンダー型分子	コーン型分子	逆コーン型分子
分子形			
会合体			
	二分子膜 (ラメラ相)	ヘキサゴナル II 相	球状ミセル
代表脂質名	ホスファチジルコリン スフィンゴミエリン 飽和型ホスファチジル エタノールアミン	不飽和型ホスファチジル エタノールアミン	リゾホスファチジルコリン 遊離脂肪酸塩

Figure 4-3 脂質の形状とその会合体の構造

このように脂質集合体の形成能に分子の各成分 (炭化水素鎖の鎖長・鎖数, 極性基の種類など) が担う役割が次第に明らかになってきた。脂質膜の機能解明に合成モデル脂質が果たしてきた役割は大きい^{8b, 47b, 48)}。

ここで古細菌脂質の特徴の一つであるイソプレン鎖に関するモデル研究を 2 例挙げる。Nishikawa らは直鎖アルキル基の代わりにフィタニル基を有するリン酸ジエステル型モデル化合物 **155** を合成し、その脂質膜の性質について検討している (図 4-4)。それによると単純な直鎖アルキル基をもつもの **156** と比べて安定なりポソームを形成したと報告している^{12g)}。



	155 + DPPC (1:2)	156 + DPPC (1:2)	DPPC
Leakage extent of CF (%) after 60 min at 45 °C	17	83	76

Figure 4-4 Nishikawa らのモデル化合物

Nakatani らは膜の分子進化におけるイソプレン鎖伸長反応の過程でポリプレニル基を有したリン酸ジエステル型化合物が生じ、これが "primitive membrane" として働く、という仮定の下に、それらのベシクル形成能や熱安定性といった性質を調べている (図 4-5)^{12h,i,49)}。

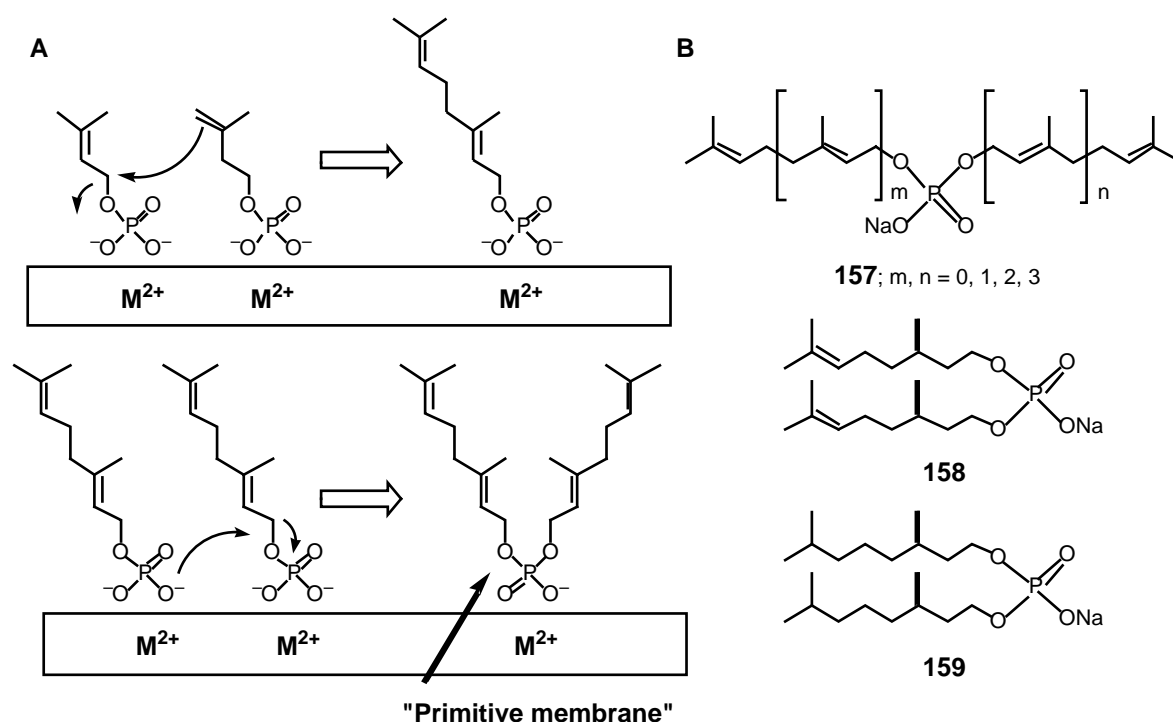


Figure 4-5 A) "primitive membrane" の仮想図, B) ポリプレニルモデル化合物

古細菌脂質で最も特徴的である環状構造は脂質膜の性質にどのような影響を与えるのであろうか。興味深いこの環状脂質に関する研究は数少なく、図 4-6 に示した Menger らの例^{13b)}や Ladika らの例^{13c)}の他、数例あるのみである。Menger らの研究は、相転移時の状態変化の度合いを調べているものであり、これより環

状脂質はその炭化水素鎖末端が結合していることで状態変化に大きな熱運動を必要とすることが分かった。また Ladika らはジインを分子中に有した環状脂質が外的要因に安定なリポソームを形成することを見出している。しかしながらこれらはいずれも液晶状態での膜の性質（運動性，膜流動性など）について深く言及したのではなく、環状脂質の生体膜モデルとしては不十分なものであった。

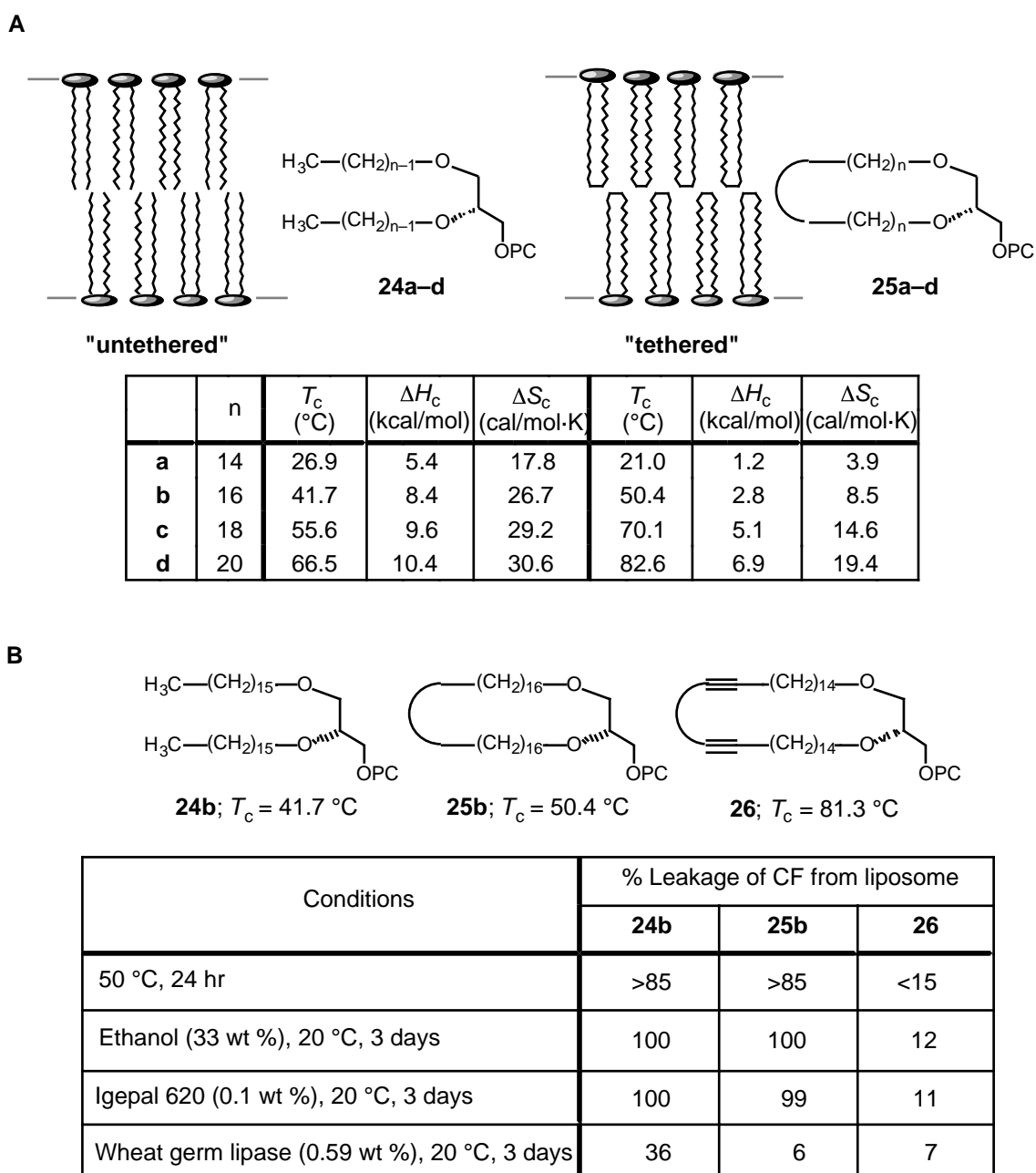


Figure 4-6 A) Menger らのモデル化合物，B) Ladika らのモデル化合物

環状脂質の膜機能の解明にあたっては、生体膜に必須なバリアー能を司る脂質分子の運動性，膜流動性をまず比較評価することが肝要である。炭化水素鎖の運動性評価を NMR, IR などのスペクトル解析で行うためには、極性基を含め、脂質分子の構造が単純であることが望ましい。

そこで本章では環状構造の膜にもたらす影響を見出すべく図 4-7 に示したような構造の単純な大環状リン酸ジエステル型化合物 **160** を合成し、その脂質膜の性質について対応する非環状脂質 **156** と比較検討した。また炭化水素鎖の運動性に関する知見を得るため部位特異的重水素化化合物 **161**, **162** も各々合成し、併せて検討を行った。それらの経緯について述べる。

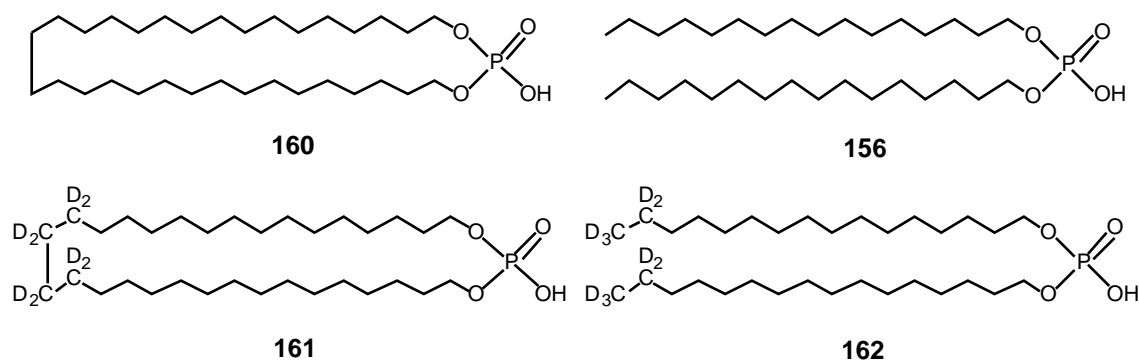
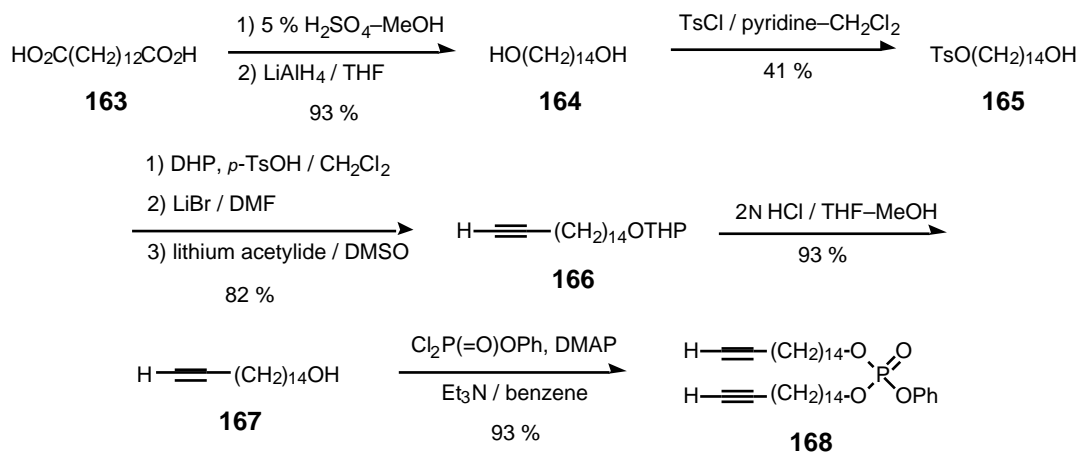


Figure 4-7 合成ターゲット

4-2 リン酸ジエステル型モデル化合物の合成

大環状リン酸ジエステル型化合物を得るにあたり、大員環形成反応にはジアセチレンカップリングである Glaser 反応²¹⁾ を適用することにした。Glaser 反応で得られる生成物は 4 つの連続した sp 炭素を環状化合物の炭化水素鎖中央部にもつことになる。このジインを重水素で接触還元することで炭化水素鎖の運動性を評価するのに有用なプローブ **161** を併せて合成出来るメリットがある。

そこでまず基質であるジイン **168** を合成した。1,14-テトラデカン二酸 **163** を出発原料とし、スキーム 4-1 のように 7 段階で行った。すなわち、**163** のジメチルエステル化、続くヒドリド還元でジオール **164** とし、1 当量の塩化トシルによりモノトシラート **165** とした。さらに THP 保護, 臭素化, アセチリドによる処理を経て **166** とし、続く酸加水分解により **167**^{13b)} を得た。得られた **167** をトリエチルアミン及び触媒量の DMAP 存在下、フェニルリン酸ジクロリド⁵⁰⁾ と作用させることでジイン **168** を得た。

Scheme 4-1 ジイン **168** の合成

Glaser 反応は図 4-8 のような反応機構で進行していると考えられている。すなわち、銅触媒と二座配位子のジアミンとが錯体を形成し、二つのアセチレンユニットと複合体 **169** をとってカップリングが進行している。この時、酸素分子は末端アセチレンから引き抜かれたプロトンと結合し、水分子になることが明らかにされている。分子内環化反応はいうまでもなく高希釈条件で実現可能であり、さらにキシレン中で加熱還流することで発生する水を系外に出し、錯体形成をより進行させることが出来る²¹⁾。

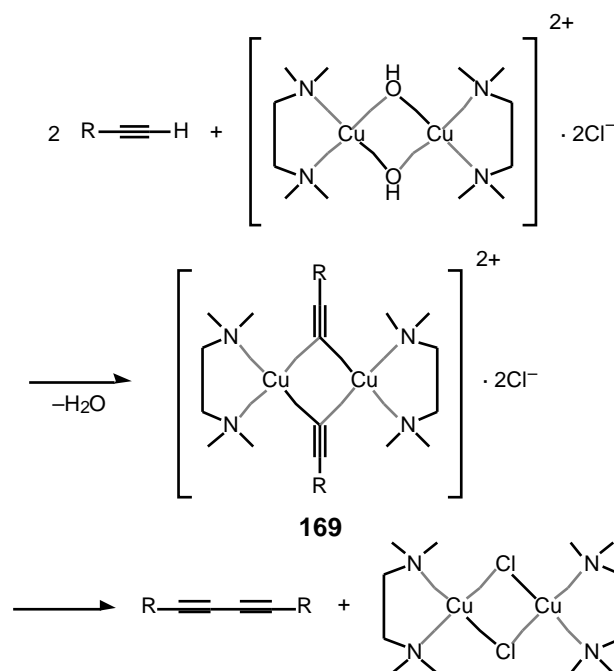
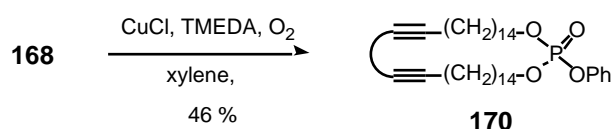


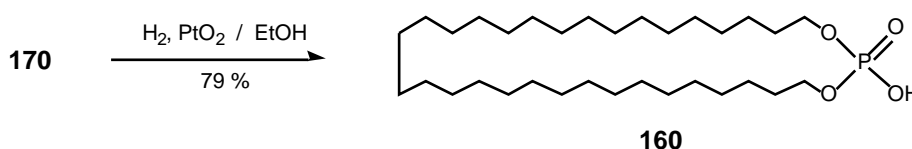
Figure 4-8 Glaser 反応の反応機構

Glaser 反応は Menger らの条件^{13b,d)}に従い、以下のようにして行った。すなわち酸素ガス気流下、予め 2.5 当量の CuCl 及び 2.6 当量の TMEDA (*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン) を加えて 2 時間加熱還流したキシレン中に、基質 **168** のキシレン溶液を電動シリンジポンプで約 5 時間かけて滴下 (最終濃度; 4.4 mM) し、さらに 30 分還流した後、溶媒のキシレンを減圧留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、洗浄, 濃縮, 精製したところ、46% という良好な収率で 35 員環閉環体 **170** を得ることが出来た (スキーム 4-2)。生成物は ¹H-NMR におけるアセチレン末端のプロトンシグナルの消失、及びマススペクトル (EI) において分子イオンピーク 612 (*M*⁺) を検出したことなどで確認した。



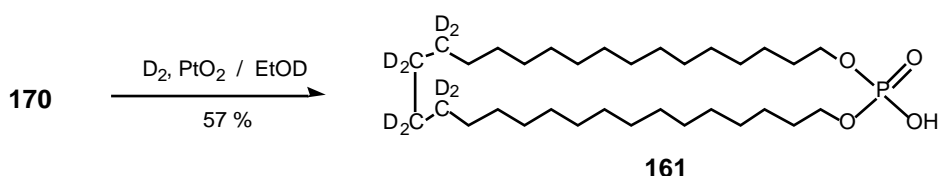
Scheme 4-2 Glaser 反応

その後白金触媒による接触還元を行い、目的の環状リン酸ジエステル **160** を得た。マススペクトル (negative FAB) を測定したところ、分子イオンピーク 543 (M^+-1) が検出でき、目的物であることを確認した。



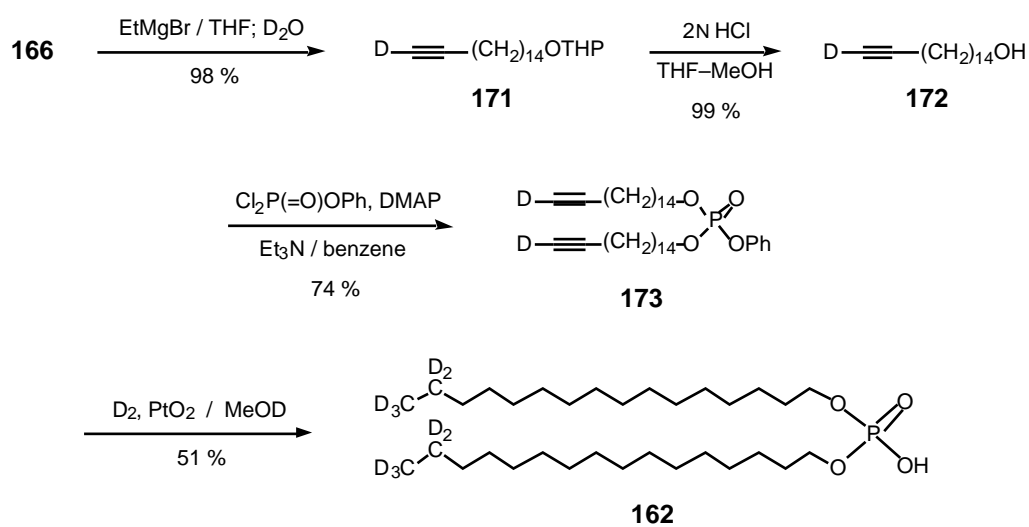
Scheme 4-3 大環状リン酸ジエステル**160**の合成

さらに、環状分子の炭化水素鎖の運動性を評価するために炭化水素鎖中央部を重水素化した化合物 **161** の合成を行った。これは **160** の合成中間体 **170** を利用すれば容易に得ることが出来る。**170** を白金触媒存在下、エタノール-*d* 中で重水素添加を行って目的の環状リン酸ジエステル-*d*₈ **161** を得ることが出来た。**160** の場合と同様にマススペクトル (negative FAB) で分子イオンピーク 551 (M^+-1) を検出し、その構造を確認した。



Scheme 4-4 重水素化大環状リン酸ジエステル**161**の合成

環状重水素化脂質 **161** との比較検討を行うための対照として、非環状重水素化脂質 **162** も併せて合成した。まず、炭化水素鎖として **167** の末端水素が重水素置換された **172** を調製する必要がある。化合物 **166** をグリニャール試薬でアセチリドアニオンとし、次いで重水で処理することで **171** とした。さらに酸加水分解により **172** へと導いた。その後前述の方法によりリン酸トリエステル体 **173** とし、白金触媒存在下、メタノール-*d* 中で重水素添加を行ってリン酸ジエステル-*d*₁₀ **162** へと導いた。同様にマススペクトル (negative FAB) の分子イオンピーク 555 (M^+-1) の検出によりその構造を確認した。



Scheme 4-5 重水素化非環状リン酸ジエステル162の合成

なお、非環状脂質 156 は市販品を用いた。

4-3 脂質膜の性質

脂質膜の性質を測定する手段にもたくさんの種類があり、さらに膜の性質を言い表すためには、様々な測定法により総合的に評価しなければならない (図 4-9)。例えば炭化水素鎖の運動性と膜の流動性とは大きい相関関係があり、前者は熱分析や IR, 配向膜の $^2\text{H-NMR}$ で、後者は蛍光偏光解消により測定でき、各々の結果を照らし合わせることで膜の性質を議論する必要がある。

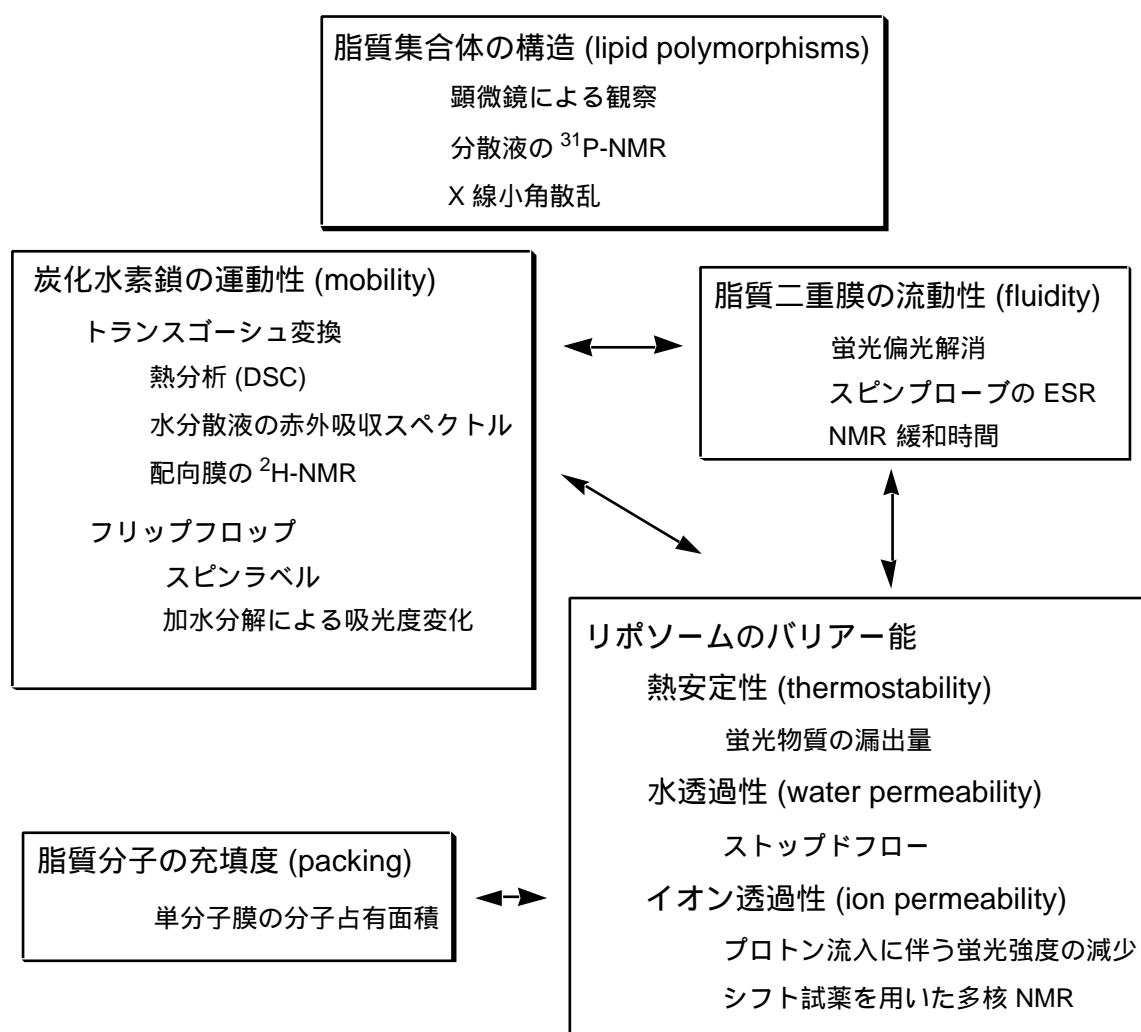


Figure 4-9 脂質膜の性質と対応する測定法

本章, 第 5 章, 第 6 章で述べる脂質膜の性質は、ここに挙げたいずれかの測定法で求めたものである。

なお、本章の測定は通商産業省工業技術院物質工学工業技術研究所 田口 和宏博士との共同研究によって行ったものである。

4-3-1 リポソームの調製法

まずリポソームの調製法について述べる。用途に応じて一枚膜のものも多重膜のものも調製できるし、様々な大きさのリポソームも得ることが出来る^{8b,47,51}。

多重膜リポソーム (Multilamellar vesicle; MLV)

脂質を有機溶媒に溶かし、ナスフラスコに入れ、アルゴン気流下で溶媒を留去し、さらに有機溶媒を完全に除くために真空ポンプで一晩減圧留去してフラスコに脂質薄膜を形成させる。これに適量の緩衝液を加え、 T_c より 10°C 以上高い温度でボルテックス (振とう) 処理することで MLV の懸濁液が出来る。

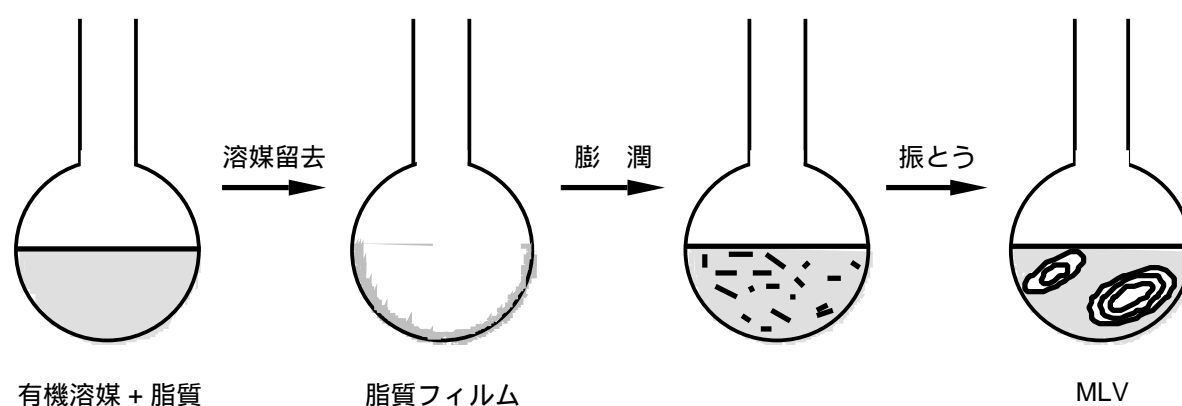


Figure 4-10 多重膜リポソーム (MLV) の調製法

この方法で調製されるリポソームのサイズ分布はまちまちであるが、作成法が簡便であること、MLV が熱力学的に安定な系であることから幅広く利用されている。本研究では熱分析実験に利用した。

小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle; SUV)

一枚膜リポソームは比較的均一な大きさのものが調製でき、多重膜リポソームよりもより生体膜モデルに近い系として様々な実験に利用されている。

小さな一枚膜リポソーム (SUV) は実際の生体細胞と比べてサイズは小さく、直径数十 nm である。したがって物質封入の保持効率は小さい。しかし粒径は比較的均一なものが得られる。SUV を得る方法として超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法などが知られている。ここでは超音波処理法を紹介す

る。

先に述べたボルテックス法で得られた MLV 懸濁液をプローブ型ソニケーターで 10~15 分間超音波処理をすると、ベシクルサイズが次第に小さくなり、比較的透明な SUV 分散液が得られる。この際プローブのチタンチップが混入する可能性があるため、遠心分離をして取り除く必要がある。

大きな一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicle; LUV)

MLV の多重膜構造， SUV の保持効率の小ささを改善するために、生体細胞に匹敵する大きさのリポソームの調製法が開発された。 LUV 調製法にはエーテル注入法，界面活性剤除去法， Ca^{2+} 融合法，凍結融解法，逆相蒸発法などがある。本研究ではこの中で凍結融解法を用いた。

ボルテックス法で得た MLV 分散液をドライアイス - アセトンバスで凍結し、ゆっくりと室温で融解する。このとき脂質分子の再配列が生じ、直径 50~500 nm の大きな一枚膜リポソームが得られる。これを数回繰り返すことにより LUV 分散液が得られる。

LUV は物質の保持効率がよいため、リポソーム内水相にマーカーを封入し、そのバリアー能を検討する測定に用いた。

巨大一枚膜リポソーム (giant unilamellar vesicle; GUV)

数 μm の大きさをもつリポソーム (GUV) の調製法も数例知られている。一例として静置水和法をあげる。脂質溶液をカバーガラスなどの平板に滴下し、窒素気流によりゆっくりと溶媒を除去し、その後蒸留水をゆっくり滴下し、しばらく静置する。本研究では位相差顕微鏡による GUV の観察の際に利用した。

4-3-2 電子顕微鏡による観察⁴⁷⁾

【原理】脂質集合体の構造を観察するには、透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope; TEM) を用いて直接観察する方法が有効である。電子顕微鏡は鏡体、電源及び真空排気装置の 3 つから構成されており、鏡体内は 10^{-5} Pa 程度の高真空に保たれている。図 4-11 に鏡体構造の概略を示す。5 枚の磁界レンズによって結像される。まず電子銃から発生した電子線を第一集束レンズ、第二集束レンズによって試料の適切な位置へ照射し、対物レンズ、中間レンズ、投影レンズによって試料像を拡大させる。この試料像は蛍光体を塗布したスクリーン (蛍光板) 上に結像され、肉眼で観察できるようになる。また、この像はカメラ室に収められたフィルムに直接撮影出来る。

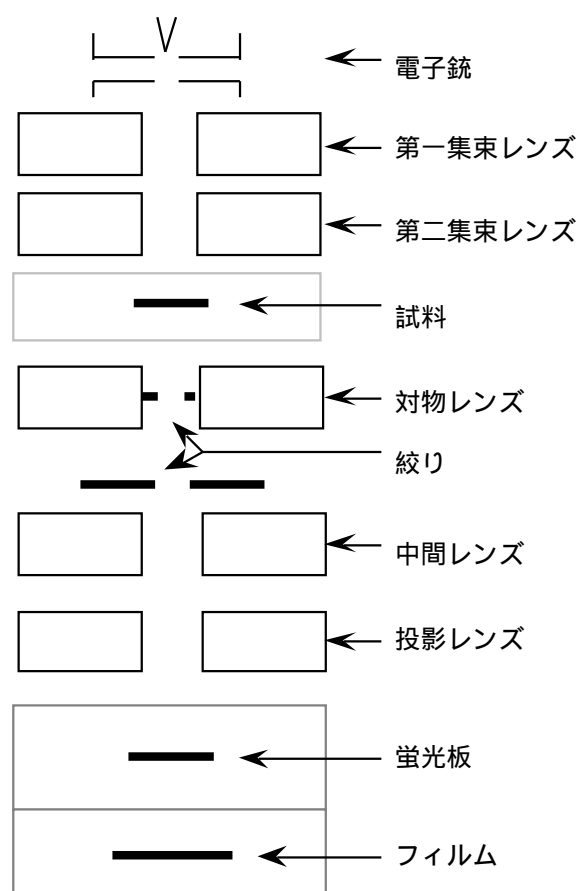


Figure 4-11 TEM 鏡体構造の模式図

透過型電子顕微鏡を用いた試料観察法には、1) ネガティブ染色法, 2) フリーズフラクチャーレプリカ法, 3) 凍結試料法 (コールドステージ法) 等があるが、ここでは 3) の方法を用いた⁵²⁾。得られる像は平面的ではあるものの、ネガティブ染色法のように化学処理をしないためにより実際に近い像を得ることが出来る。

【実験】まず超音波処理リポソーム分散液を調製し、カーボン膜が載った銅メッシュ上に少量滴下する。数分後に余分な小滴を濾紙で吸い取り、そのグリッドを液体エタン中で急速凍結する。ガラス状になったグリッドを試料ホルダーに移し、 -170°C で観測した。

【結果】得られた 160 の脂質分散液の電子顕微鏡写真を図 4-12 に示す。非環状脂質と同様に環状脂質でもリポソームを形成し、その形状は 20 nm から 100 nm の多角形状ベシクルであることが観測された。このことにより環状脂質もリポソームを形成することが確認できた。

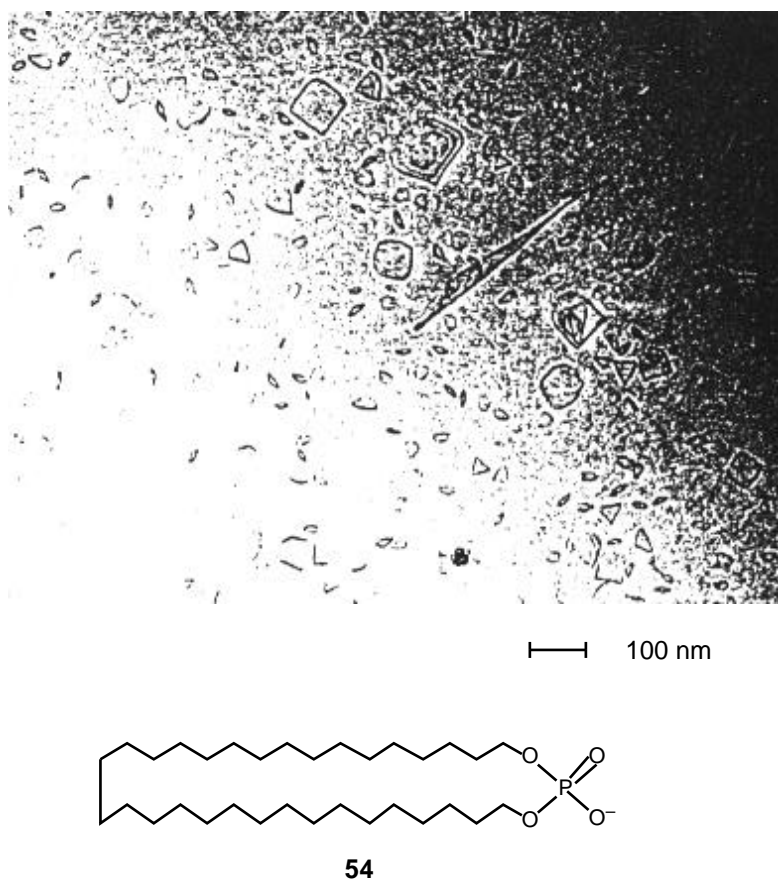


Figure 4-12 大環状リン酸ジエステル160の電子顕微鏡写真

4-3-3 熱分析 (DSC)^{8b,47)}

【原理】示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry; DSC) とは、一定の熱量を加えていった試料と基準試料との間に温度差が生じたときにその差を補償するように与えられた熱量を連続的に測定する装置である。たとえば試料に吸熱変化が生じるとき、今迄一定量加えられていた熱量がその吸熱変化に用いられてしまうので温度差が生じる。このとき試料 - 基準試料との間の温度差をゼロに制御するのに必要な熱量を逐一計測するのが DSC である。実際には、単位時間当たりの熱量 (dq/dt) を昇温速度 (dT/dt) で割った値として求められる。すなわち、試料 - 基準試料間の熱容量差 (C_p) が求められる (式 4-1)。

$$(dq/dt)/(dT/dt) = dq/dT = C_p \quad (\text{式 4-1})$$

脂質二重膜 (ラメラ) における状態変化は、図 4-13 に示したような、脂質分子が整然と配列したゲル状態から自由に運動する液晶状態へと変化するゲル - 液晶

相転移である。その相転移付近の DSC サーモグラムを模式的に図 4-13 A に示す。相転移に伴うエンタルピー変化量 (H) は DSC 吸熱ピークとベースラインに囲まれた面積に相当し、次式に従って求められる。

$$H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dt \quad (\text{式 4-2})$$

T_1 及び T_2 は相転移の開始及び終結の温度である。 H の T に対する関係を図 4-13 B に示すが、 H は二分子膜ベシクルの液晶相のエンタルピー (H_l) とゲル相のエンタルピー (H_g) の差 ($H = H_l - H_g$) に相当することがわかる。

また Gibbs 自由エネルギー G は $G = H - TS$ で表されるので、相転移前後における Gibbs 自由エネルギー変化 G は次式 4-3 によって求められる。

$$G = H - T S \quad (\text{式 4-3})$$

相転移前後では自由エネルギーの変化はないので、相転移におけるエントロピー変化 S は式 4-4 によって表される。

$$S = H/T \quad (\text{式 4-4})$$

この熱量変化測定により相転移温度の確認、相転移に要する熱量が求められ、脂質分子の熱力学的性質に関する情報を導き出すことが出来る。

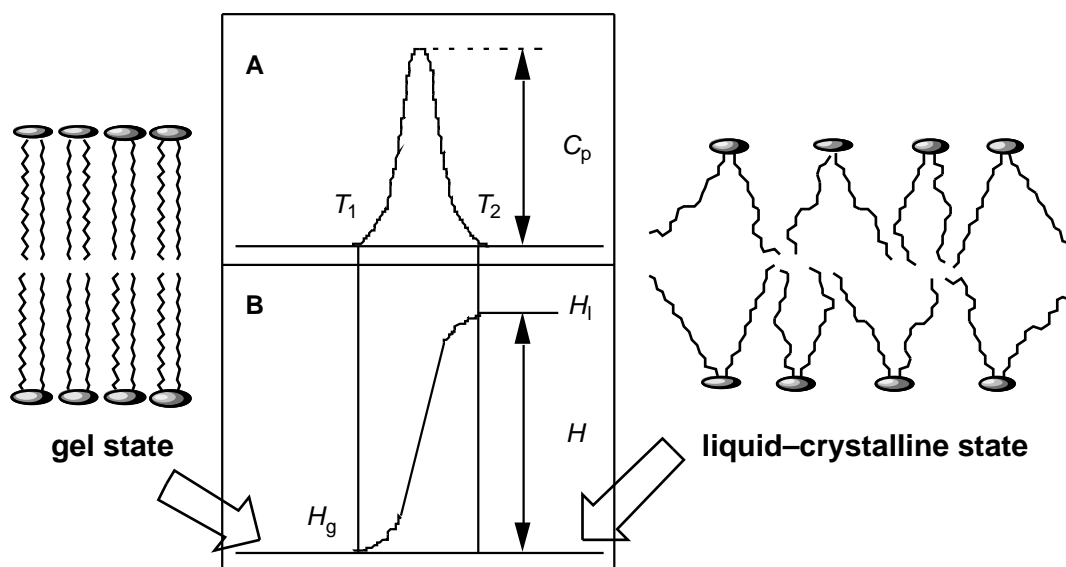


Figure 4-13 A) 相転移における熱容量差, B) 相転移におけるエンタルピー変化

4-3-4 水分散液の赤外吸収スペクトル^{8b,47,53)}

【原理】メチレン基の赤外特性吸収帯の波数シフトは、脂質分子における炭化水素鎖の運動性を評価するのに有効な手段である。トランス構造と比べて高エネルギーなゴーシュ構造をとると吸収スペクトルが高波数シフトをするので、メチレン基のコンフォメーションの平均状態を見出すことが出来る。すなわち活発にトランス-ゴーシュ変化が生じる T_c 以上になると急激な高波数シフトが生じる。また重水素で置換された部位は同位体シフトにより全く異なる領域にピークが生じるので、非標識体と比べて低波数にピークを検出したならばその部位がゴーシュ構造をとっていることを示す。このように FT-IR で波数シフトを測定することでリポソームの脂質分子の平均配列状態に関する情報が得られる。

【実験】測定セルには水に不溶な CaF_2 を窓材とした液体セルを用いることとし、セルホルダーには還流水を流して温度調節をした。試料には各脂質のナトリウム塩に重水を加えて得られた MLV 分散液を用いた。

【結果】160, 156, 161, 162 の分散液の C-H 逆対称伸縮振動ピーク (2920 cm^{-1} 付近) のシフト値の温度変化グラフを図 4-15 に示す。

ゲル状態において 160 とその重水素化体 161 の比較を行うと、160 で高波数シフトが生じていることが分かった (変化幅 A)。この比較より、環状脂質のアルキル鎖中央 (つまり、重水素化されている部位) にゴーシュ構造が存在していることが示唆される。

一方液晶状態では環状脂質 160, 161 と非環状脂質 156, 162 との比較で、非環状脂質の方が高波数シフトしていることが分かった (変化幅 B)。つまり、液晶状態においては非環状脂質の方がゴーシュ構造を多く有していることを示している。全体をみると環状脂質の方が相転移前後の変化幅が小さいことも見出される。この波数の変化幅の違いは H_c の大小と強い相関がある。

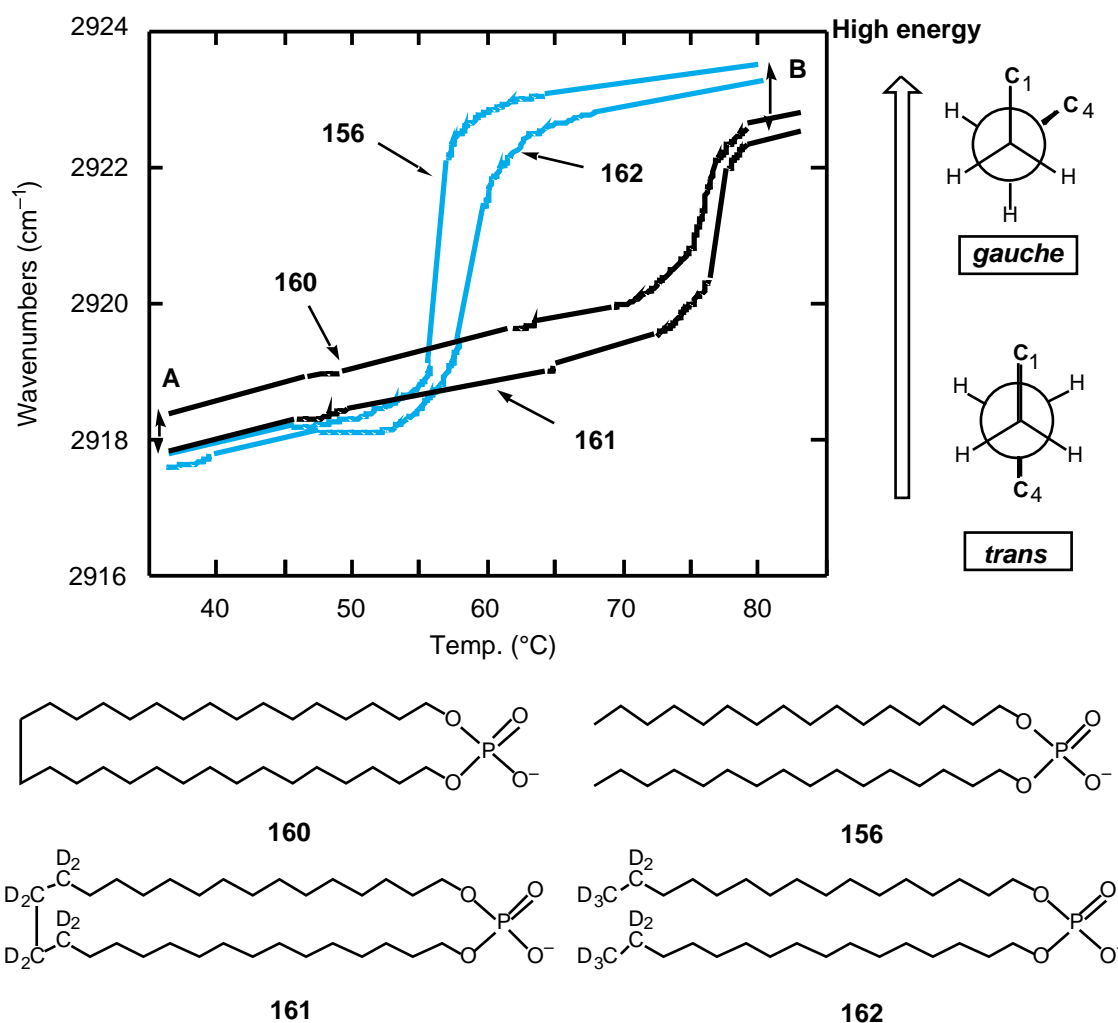


Figure 4-15 リン酸ジエステルモデル化合物のメチレン逆対称伸縮振動ピークの温度変化

[30 mM Lipid dispersion in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0).]

4-3-5 単分子膜の分子占有面積^{8b,47,54)}

【原理】 模式図を図 4-16 に示す。水もしくは緩衝液で満たしたラングミュアートラフ上に脂質のクロロホルム溶液をゆっくり滴下して形成した単分子膜フィルムを一定の速度で圧縮する際に得られる表面圧 () のデータを分子面積 (A) の関数としてプロットすると π -A 曲線が得られる。この π -A 曲線からは脂質の分子占有面積 limiting area (曲線の補外線の切片) および崩壊圧 collapse pressure (曲線の変曲点にあたる表面圧) が算出でき、脂質膜のパッキング (充填度) に関する知見が得られる。

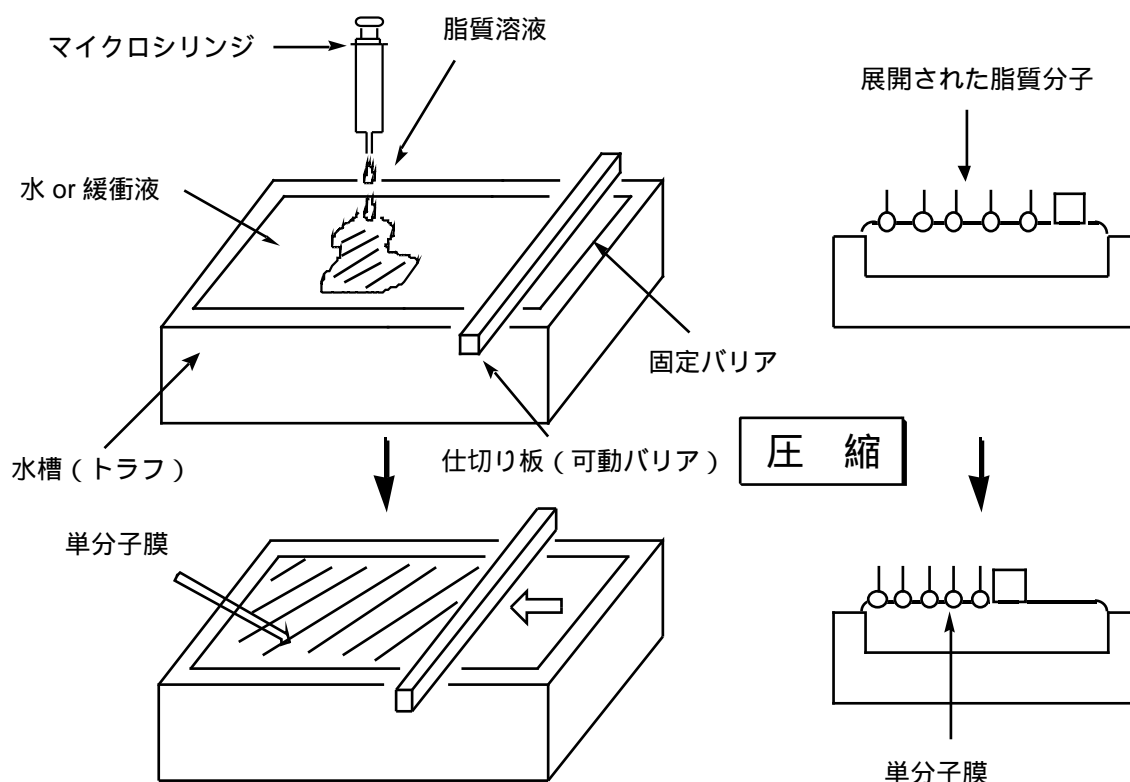


Figure 4-16 単分子膜測定の様式図

【実験】 23 °C の緩衝液上に脂質溶液を滴下して 5 分間静置した後、0.25 mm/sec の一定速度で可動バリアを押していき π -A 曲線を得た。

【結果】 測定結果を図 4-17 に示す。グラフからは 160, 156 のどちらも同じ分子占有面積 $0.48 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ を有しており、崩壊圧時の分子占有面積も各々 $0.42, 0.39 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ とほぼ同じであった。測定温度は相転移温度以下で、環状脂質も非環状脂質もゲル状態にあり、両方とも脂質分子が整然と配列していると考えられる。直鎖炭化水素鎖の分子占有面積は一本あたり $0.20 \text{ nm}^2/\text{molecule}$ であることが知られており^{54a)}、これらの結果は二本分に相当している。すなわち炭化水素鎖が規則正しい配列をしていることを示しており、160, 156 のどちらも密なパッキングを有した単分子膜を形成していることが分かった。これは同時に、ゲル状態においては 160 の炭化水素鎖中央部でゴーシュ型の折れ曲がりが存在していることを示唆している。崩壊圧は環状脂質 54 の方が小さい値を示した。これは凝縮相において、炭化水素鎖中央部の屈曲したコンフォメーションによりその安定性が低下したものと考えられる。

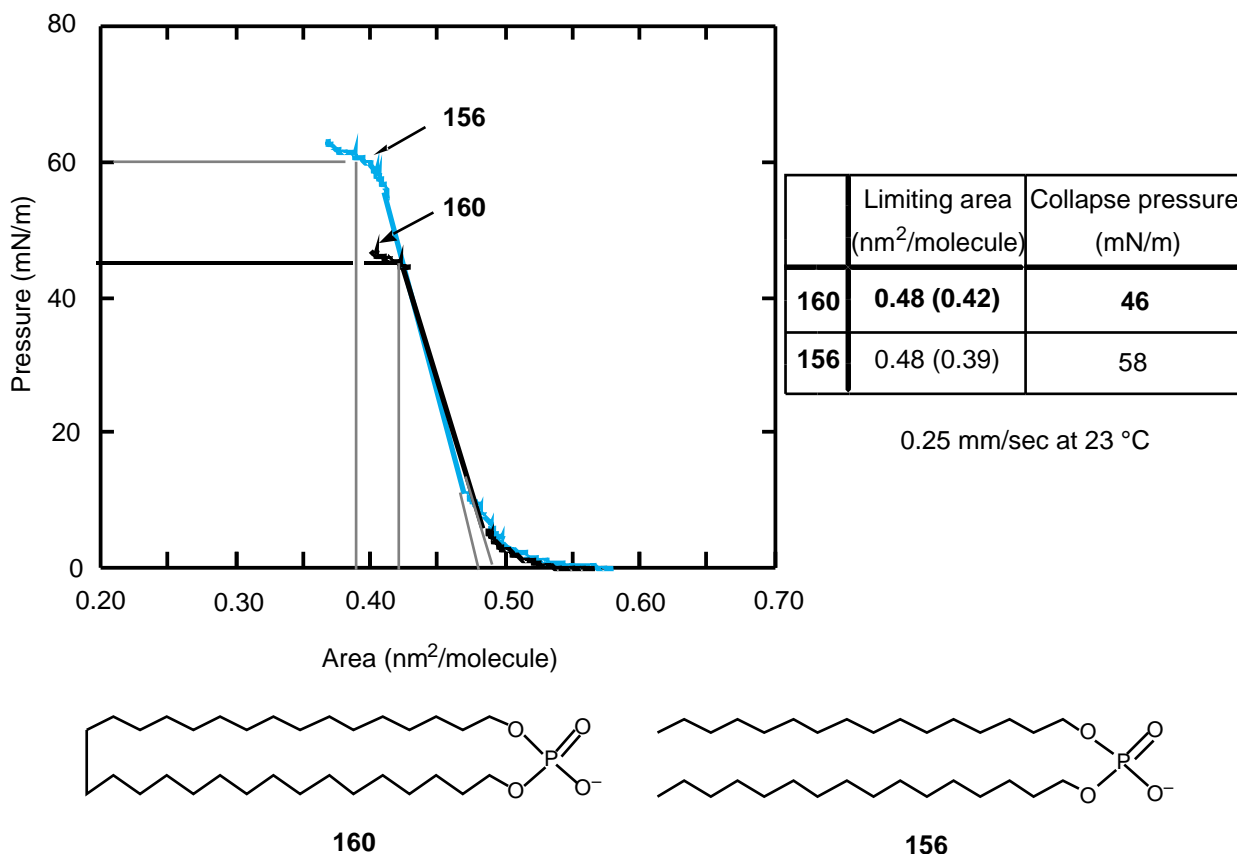


Figure 4-17 リン酸ジエステルモデル化合物の π -A 曲線
 [Lipid monolayers on 100 mM NaCl-10 mM Tris buffer (pH 8.0).]

4-3-6 蛍光偏光解消^{8b,47,55)}

【原理】蛍光性分子は偏光した光で励起されると、発せられる蛍光もある程度偏光すると考えられる。しかし蛍光分子がブラウン運動による回転などを起こしている、励起分子の配向が解消して蛍光の偏光度が低下する。図 4-18 において原点にある試料に Z 軸方向に振動する直線偏光を X 方向から当てて励起させると、その蛍光の偏光は XY 平面上から観察したときに最も強く、Z 軸方向へは偏光しない光が放出される。

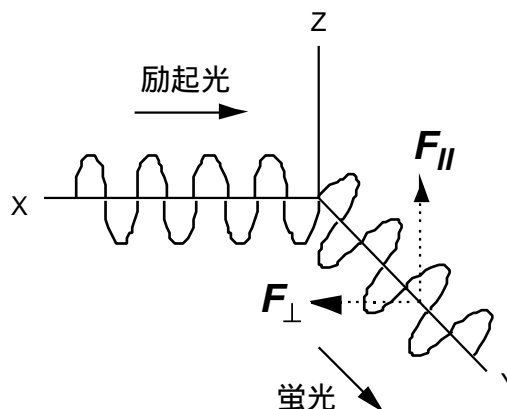


Figure 4-18 蛍光の偏光成分

蛍光偏光を測定するには、直線偏光を励起光に用い、励起光の光路及び振動面に垂直な Y 方向から観測する。蛍光偏光の解消の程度を表すものとして、以下の式で定義される蛍光偏光度 P あるいは蛍光の異方性パラメーター r が用いられる。

$$P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp}) \quad (\text{式 4-5})$$

$$r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp}) \quad (\text{式 4-6})$$

ここで F_{\parallel} は励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分であり、 F_{\perp} は励起光の振動方向と直角に振動する偏光強度成分である。

この性質を利用して脂質二重膜の流動性を評価することが出来る。

すなわち、図 4-19 に示したように脂質二重膜に垂直に取り込まれた蛍光プローブが、膜の流動化によりその配向が乱され蛍光偏光の解消が生じ、その結果 P 及び r 値が低下するので、間接的に脂質膜の流動性を見出すことが出来る。この測定からは相転移温度も見積もることが出来る。つまり、 r 値が急激に変化する温度が相転移温度である。

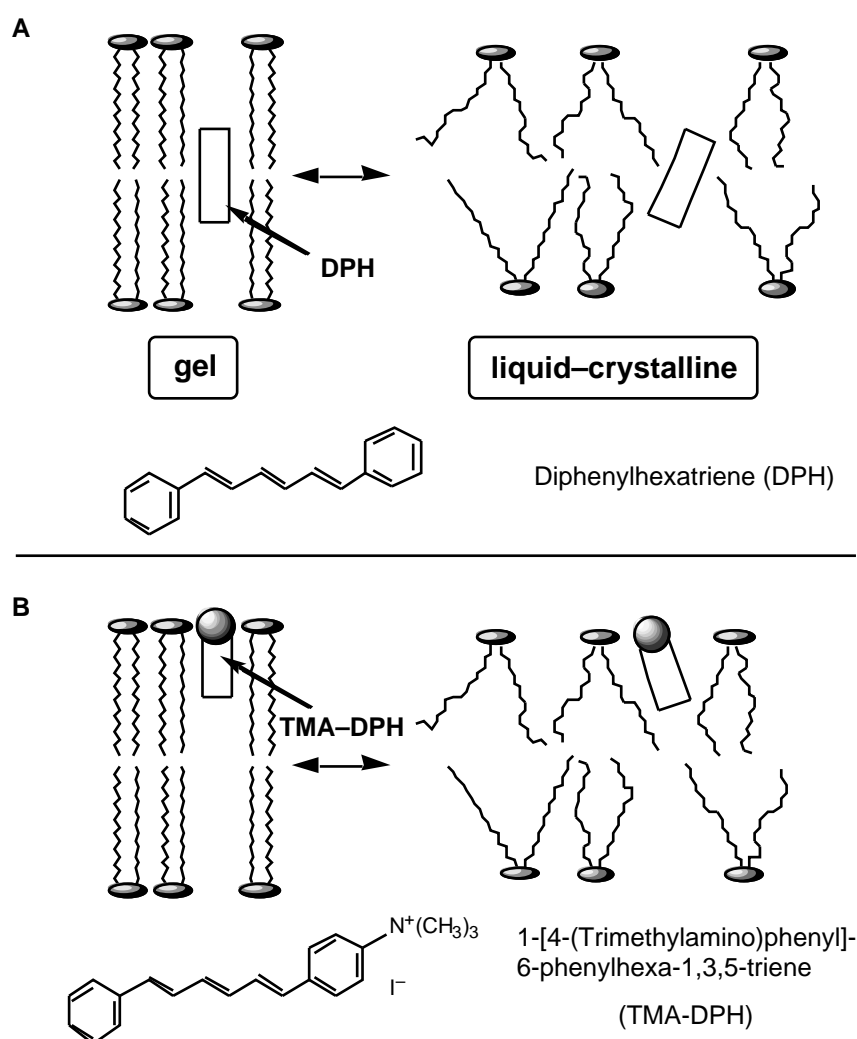


Figure 4-19 蛍光プローブの脂質膜中での模式図

蛍光プローブは DPH (ジフェニルヘキサトリエン) と、DPH にカチオン性極性基を有した TMA-DPH (1-[4-(トリメチルアミノ)-フェニル]-6-フェニルヘキサ-1,3,5-トリエン) を用いた。DPH は脂質分子の疎水基末端から中央部分の流動性、TMA-DPH は脂質分子の極性基付近の流動性を求めるのに各々利用した。

【実験】 蛍光プローブを含む脂質薄膜に緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、超音波処理法により蛍光プローブを膜内に含むリポソームを調製した。励起側、蛍光側に各々偏光板を取り付けた蛍光光度計により蛍光強度 (励起波長 350 nm, 蛍光波長 460 nm) を測定した。またセルホルダーには還流水を流して温度調節をした。

【結果】 疎水部、親水部の膜流動性の測定結果を各々図 4-20 A, B に示す。ゲル状態では環状脂質 160 及び非環状脂質 156 とともに同じ値を示し、流動性に違いがないことが分かった。この傾向は疎水部、親水部の両方でみられた。これは 160, 156 とともに密なパッキングを有しているという分子占有面積での結果と関連している。また r 値は相転移を境に大きく低下した。

液晶状態を比較すると、非環状脂質 156 の方が環状脂質 160 よりも r 値が小さく、流動性が大きいことが分かった。この結果は IR での炭化水素鎖の運動性に関する知見と関連している。非環状脂質はゴーシュ構造を多くとることで脂質分子の自由運動が活発になり、その結果蛍光プローブの蛍光偏光解消の度合いも大きくなったと考えられる。また、両者の r 値の相対的差は疎水部、親水部のどちらでもほぼ同じであった。これは炭化水素鎖末端の結合が、疎水部の流動性のみならず分子全体の流動性をも低下させていることを示している。

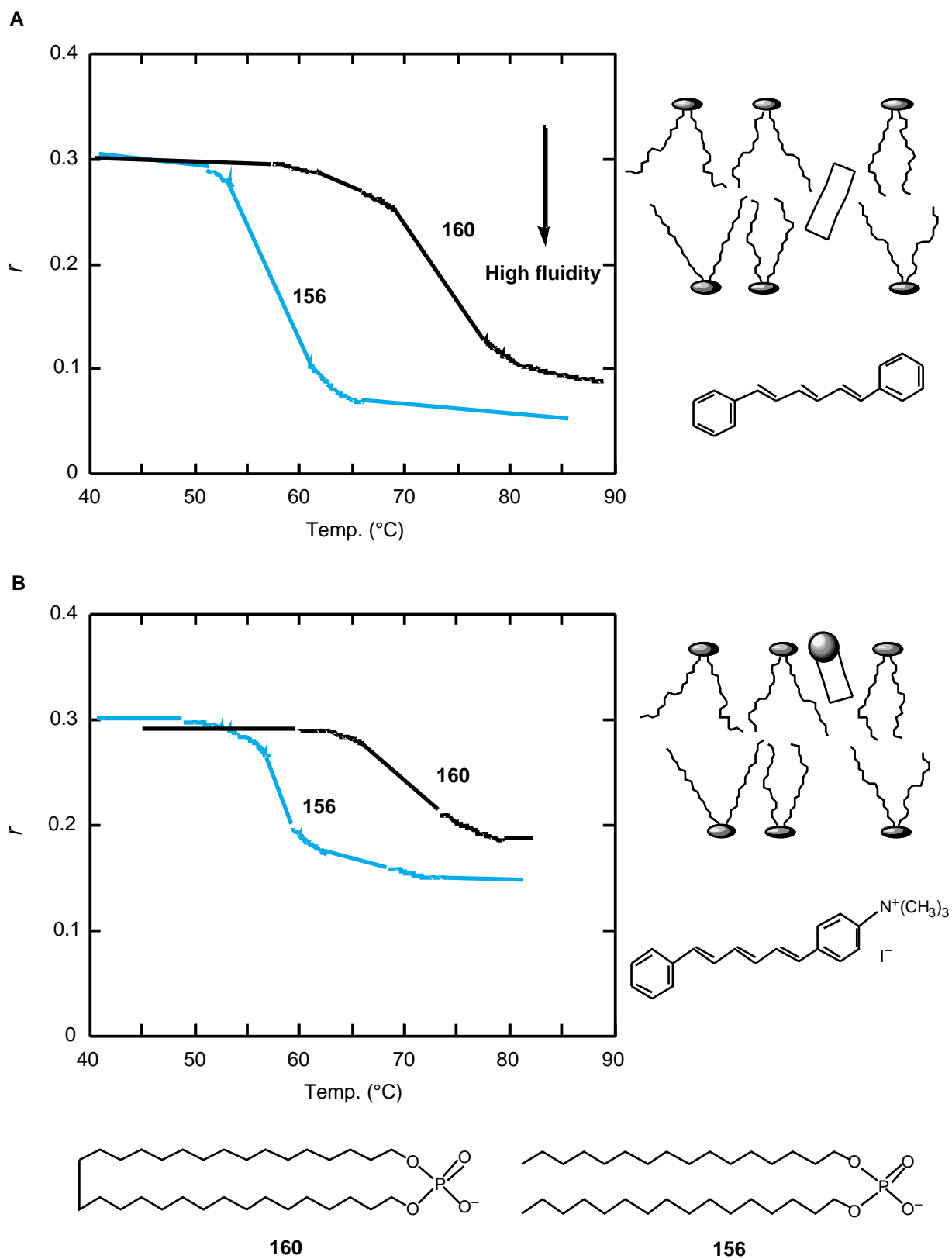


Figure 4-20 リン酸ジエステルモデル化合物の膜流動性 **A)** 疎水部, **B)** 親水部

[The concentration of lipids and probe in 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) were 0.1 mM and 0.5 μ M, respectively.]

4-4 まとめ

以上の測定結果を総合すると、脂質の炭化水素鎖末端が結合して大環状構造をとる効果は次の3点にまとめられる。

- 1) ゲル状態から液晶状態への相変化における、相転移温度 T_c の上昇および相転移エンタルピー H_c 、エントロピー S_c の低下
- 2) 液晶状態でのゴーシュ構造の数の低下
- 3) 液晶状態での脂質二重膜の流動性低下

ゲル状態では、環状脂質と非環状脂質との間に顕著な違いはみられなかった。IRにおいて、環状脂質 **160** とその重水素標識体 **161** との比較で **160** の方が高波数シフトしたため、ゴーシュ構造がその重水素化された部位にあることが分かった。このことは単分子膜の分子占有面積が環状、非環状のどちらも同じであることから支持される。また、IRからは重水素化される部位以外の炭化水素鎖は同じトランス構造をとっているという推測もできる。蛍光偏光解消の実験では環状、非環状のどちらでも同じ様な r 値をとったことから、ゲル状態では脂質膜の流動性に影響を及ぼさないことが分かった。

ゲル状態から液晶状態への相転移においては環状脂質の方が T_c は高く、 H_c 、 S_c は小さいことが DSC 測定より分かった。 T_c が上昇したのは相転移時により大きな熱運動を必要としたためであり、 H_c 、 S_c が低下したのは炭化水素鎖末端の結合により各々トランス - ゴーシュ変換をし得る部位の低下、分子の自由運動の抑制が生じたためと考えられる。

液晶状態では、両者に大きな違いが生じた。まず、IRでは非環状脂質に大きな高波数シフトがみられ、その値は環状脂質よりも大きなものであった。これは非環状脂質において、相転移を境に高エネルギーなゴーシュ構造が増加したことを示す。 H_c が相対的に大きいことも、IRでの結果を支持している。また、膜流動性も非環状脂質の方が高いことが示され、脂質分子の高い運動性で蛍光プローブも活発にブラウン運動していることが分かった。

環状脂質は液晶状態において、その炭化水素鎖の運動性が非環状脂質と比べて低下し、その膜の運動性、流動性に変化を生じさせることが明らかとなった。本章の結果より、環状脂質のもたらす役割をまず見出すことが出来た⁵⁶⁾。これらの性質は生体膜のバリアー能に大きく影響を及ぼすものであると考えられる。次章では本章での結果をふまえ、天然型古細菌 36 員環脂質からなるリポソームのバリアー能を評価したことについて述べる。

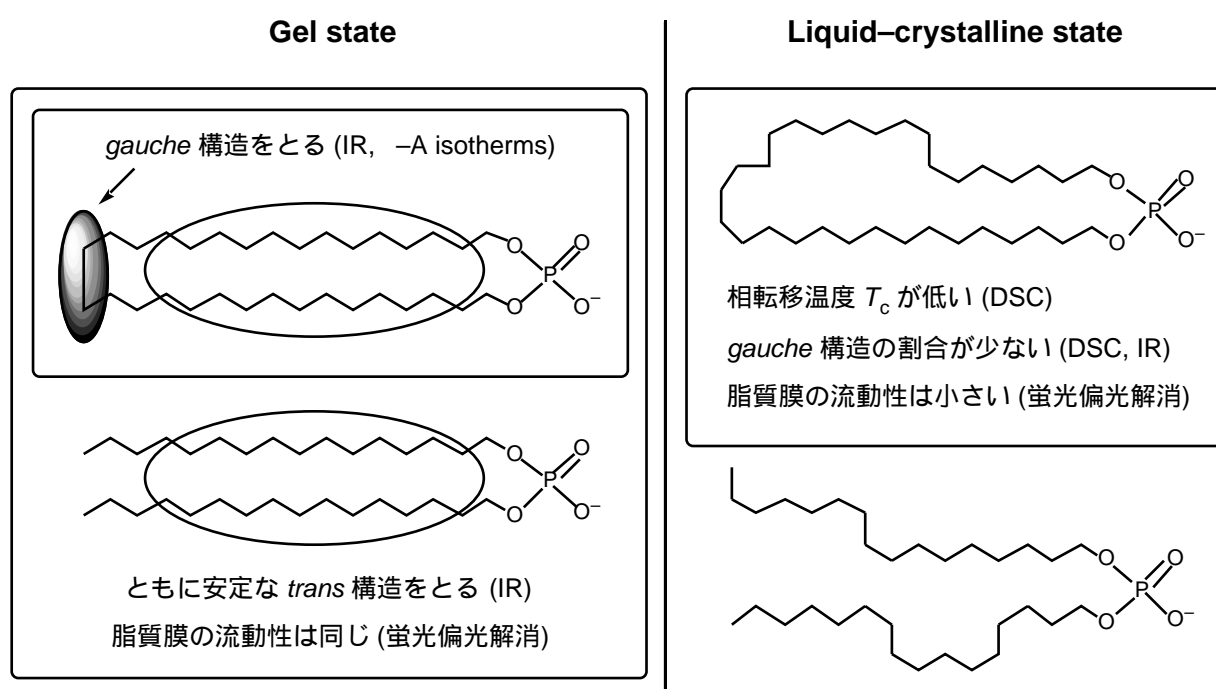


Figure 4-21 まとめ

第5章 古細菌 36 員環脂質の脂質膜の性質

5-1 はじめに

36 員環ジエーテル型脂質 5 は至適生育温度 85 °C のメタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii*^{6m,n)} など計 3 種のメタン菌から見出されている。特に *M. jannaschii* は水深 2,600 m の海底火山熱水湧出孔付近 (図 5-1) から単離された、高温・高圧環境を好んで生育する古細菌である。この菌体は 5 を有する数少ない一種であることもさることながら、いち早く全ゲノム配列が決定された微生物群の一つ (表 5-1) であり⁵⁷⁾、生物進化や耐熱性酵素の研究など様々な分野で注目を浴びている。



Figure 5-1 熱水湧出孔の写真 (C&EN より)

生物種	発表年	ゲノムサイズ (Mb)	
<i>Haemophilus influenzae</i>	インフルエンザ菌	1995	1.83
<i>Mycoplasma genitalium</i>	マイコプラズマ	1995	0.58
<i>Methanococcus jannaschii</i>	メタン生成古細菌	1996	1.66
<i>Synechocystis</i> sp.	藍藻類	1996	3.57
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	肺炎マイコプラズマ	1996	0.81
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	出芽酵母	1997	14
<i>Helicobacter pylori</i>	ピロリ菌	1997	1.66
<i>Escherichia coli</i>	大腸菌	1997	4.64
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	メタン生成古細菌	1997	1.70
<i>Bacillus subtilis</i>	枯草菌	1997	4.21
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	好熱性硫黄古細菌	1997	1.66

Table 5-1 全ゲノム配列が決定された微生物 (発表年順)

36員環ジエーテル型脂質は古細菌の高温・高圧環境への適応に何らかの寄与を果たしているのだろうか。これを支持するいくつかのデータがある。

実際に *M. jannaschii* では表 5-2 のように培養温度が上がるにつれて 36員環脂質 **5** , 72員環脂質 **7a** の割合が増大するという報告がある⁵⁸⁾。また好熱好酸菌において、培養温度が上がるとシクロペンタン環の数が増大すること知られており⁵⁹⁾、大環状脂質やシクロペンタン環が高温環境で生きていく上で何らかの必然性があるとも考えることができる。

Incubation temperature	Content (%)		
	5	7a and 7b	1
50 °C	19	21	60
70 °C	43	42	15

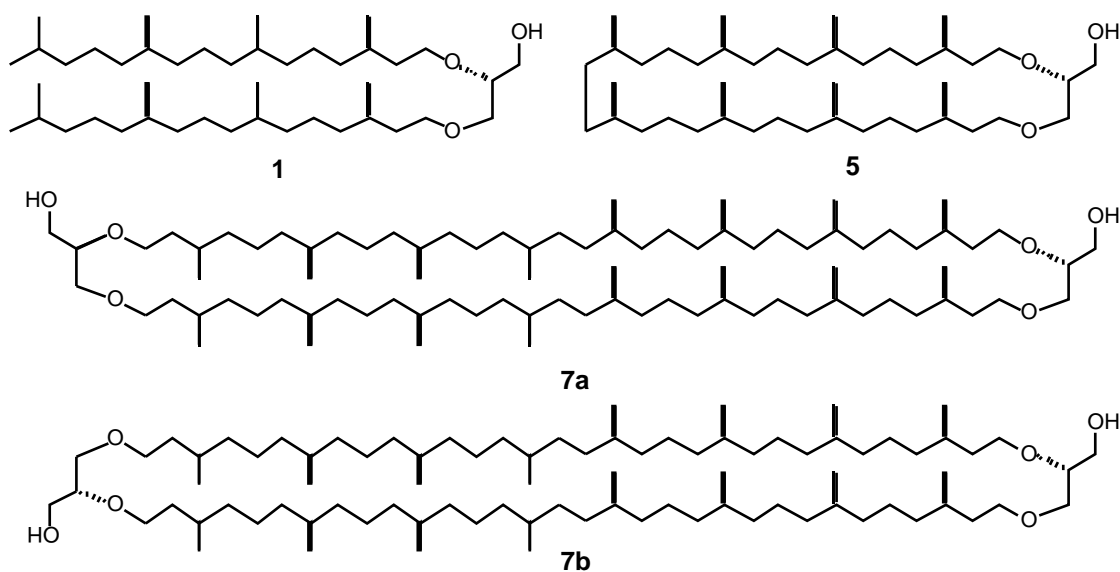


Table 5-2 & Figure 5-2 *M. jannaschii* 培養温度と得られるコア脂質の割合

また一部の真正細菌では脂肪酸末端が結合した二量化型脂質 **174** の存在が知られている。これは二分子の脂質が疎水部末端付近で結合して生合成されと考えられている (結合して得られたジカルボン酸 **175** はジアボリン酸 diabolic acid と命名されている)^{60,61})。

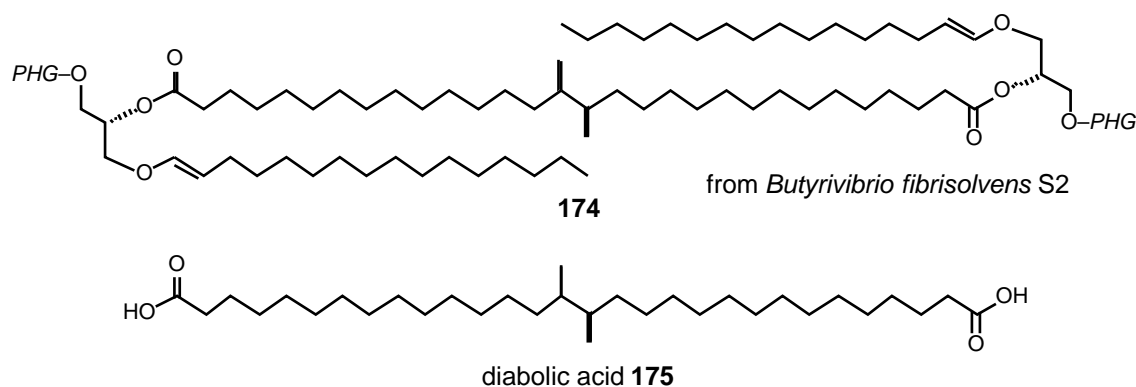


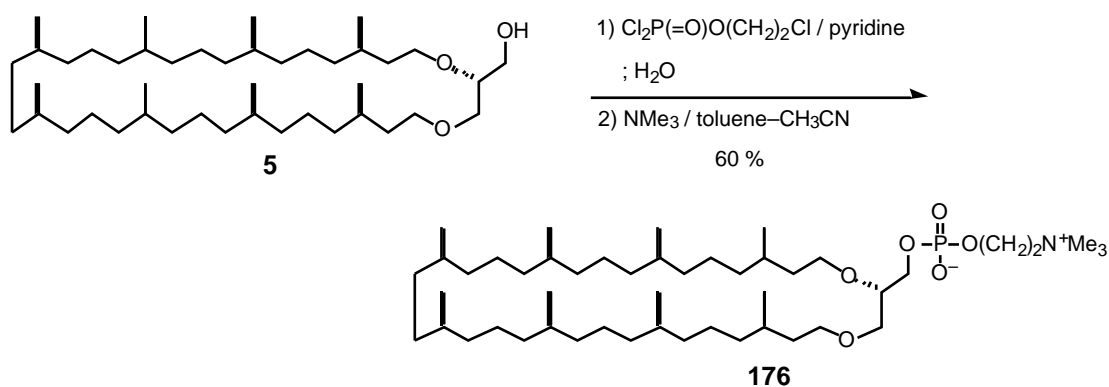
Figure 5-3 嫌気性真正細菌で見出された特異な脂質及び diabolic acid の構造

175 は菌体培地への有機溶媒及び抗生物質の添加, 培養温度の上昇などの外的ストレスで生成量が増大することが知られている⁶⁰)。すなわち橋かけ構造をした脂質が細胞膜の安定化に寄与していると考えられる。

これらのことから古細菌にみられる大環状脂質が高温環境で生育するために何らかの役割をしていると考えられる。

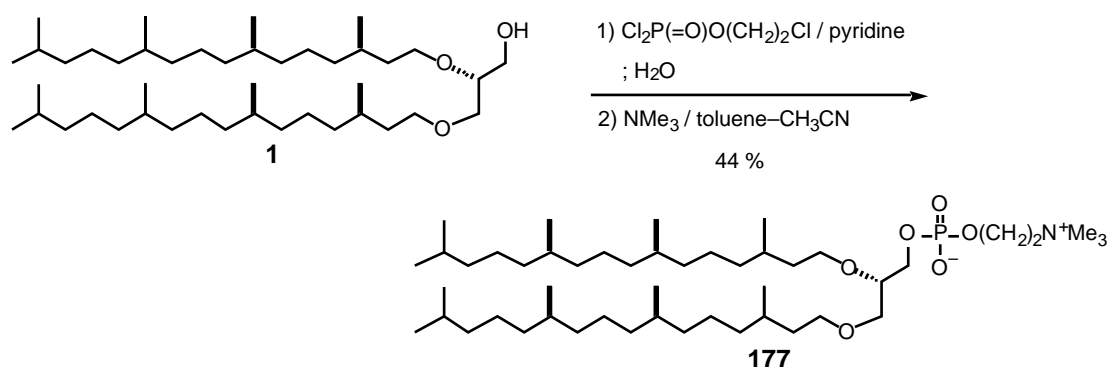
すでに第4章のモデル化合物での知見から、脂質分子における環状構造が脂質膜の性質や集合状態に影響を及ぼすことを明らかにしている。

そこで本章ではこのことをふまえ、古細菌の高温環境への適応に対する大環状脂質の寄与を見出すべく、実際古細菌 36 員環ジエーテル型脂質からなるリポソームの性質を種々の測定法を用いて総合的に調べた。それらの経緯について述べる。



Scheme 5-1 古細菌 36 員環リン脂質 176 の合成

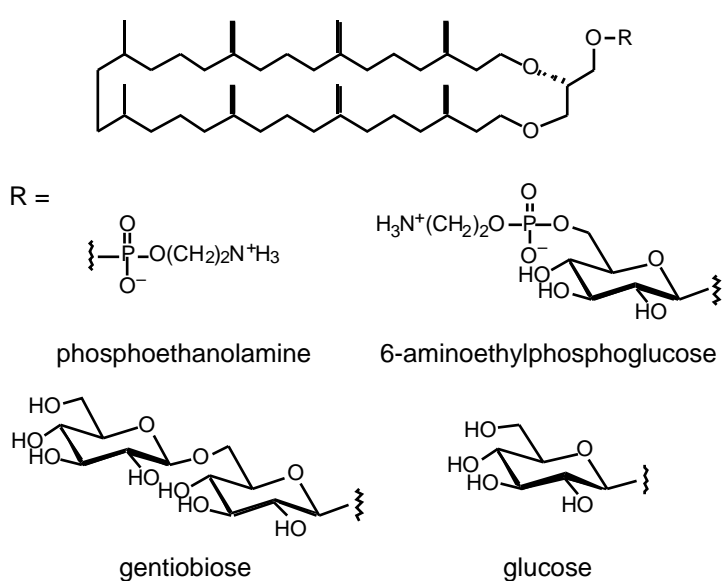
対応する非環状脂質 1 も同様にホスホコリン誘導体 177 へと導いた。



Scheme 5-2 古細菌非環状リン脂質 177 の合成

5-2-2 糖脂質誘導体化

糖脂質はおもに細胞膜外層に配置し、真核生物において細胞間認識などを司っている。また糖脂質は生体膜の安定化も担っていると考えられている。好熱性真正細菌 *Thermus* 属では培養温度が上昇すると糖脂質の割合が増加するという報告がある⁶²⁾。このように興味深い性質をもつ糖脂質であるが、リポソームの研究はさほど進展していない。糖

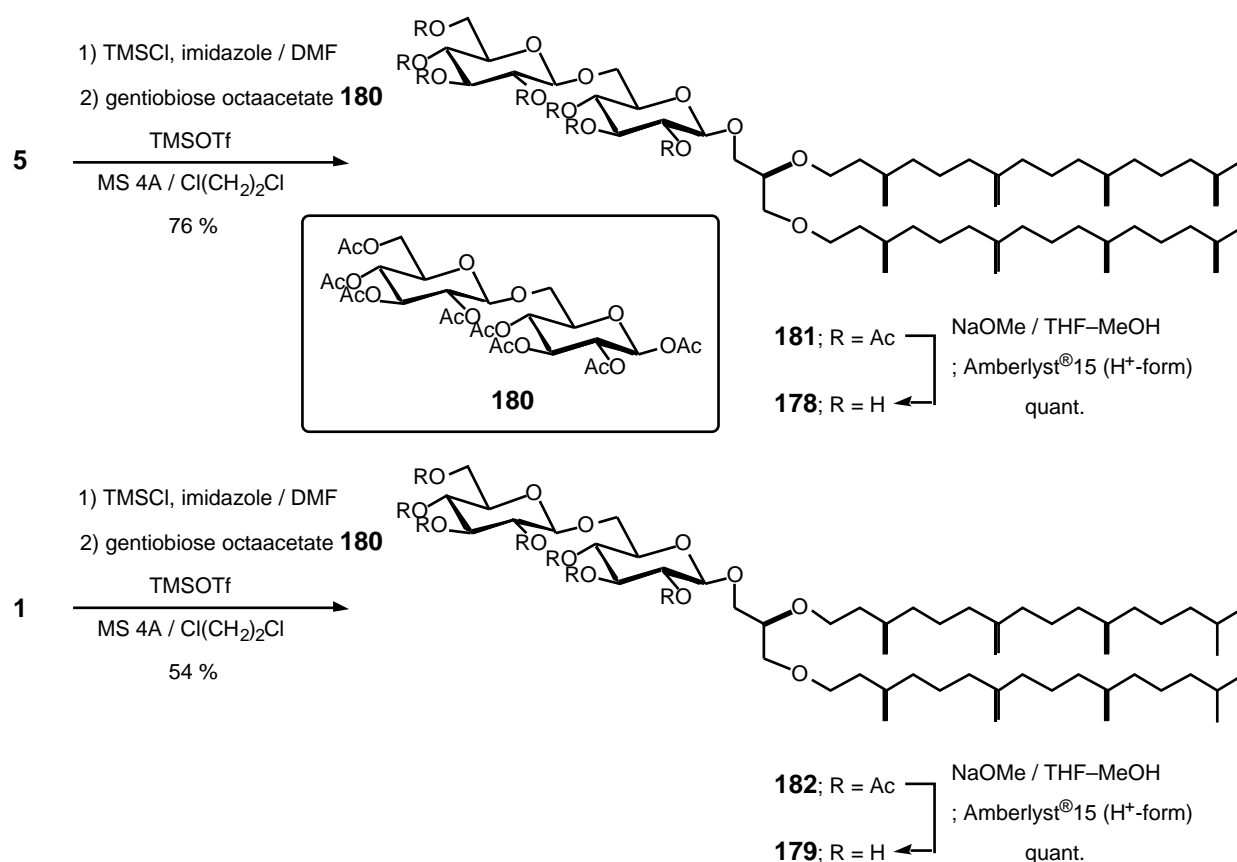
Figure 5-5 *M. jannaschii*で見出される極性脂質の構造

脂質単独ではリポソーム形成能が低いためである。

M. jannaschii における 36 員環ジエーテル型脂質の極性基成分を図 5-5 に示す^{60,t)}。グリセロ糖脂質が広く分布していることが分かる。そこでゲンチオビオースを極性基とした糖脂質 **178** 及び非環状糖脂質 **179**⁶³⁾ を合成してリポソームの性質を調べ、古細菌脂質における糖脂質の役割を追究することとした。

グリコシル供与体にはゲンチオビオース オクタアセタート **180**⁶⁴⁾ を用いた。アルコール **5**, **1** を各々 TMS エーテルへと変換し、Ogawa らの方法⁶⁵⁾ に従いルイス酸にトリメチルシリル トリフルオロメタンスルホナート(TMSOTf) を用いて **180** とのグリコシル化を行ったところ 76 %, 54 % の収率でグリコシル成績体 **181**, **182** を得ることが出来た。アノマー位の立体化学は 体のみであった。

その後アセチル基の脱保護, 続いて Amberlyst® 15-イオン交換樹脂 (H⁺-form) で中和することで目的の糖脂質 **178**, **179** を得ることが出来た。



Scheme 5-3 古細菌ジエーテル型糖脂質 **178**, **179** の合成

5-3 脂質膜の性質

本節で述べる古細菌ジエーテル型リン脂質の膜としての性質を検討するにあたり、通常生物のエステル型脂質との比較も行った。本研究で用いたエステル型脂質はニワトリの卵黄レシチン (eggPC) 及びジミリストイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンとコレステロール (2:1) の混合脂質 (DMPC-cholesterol) の二種類である。

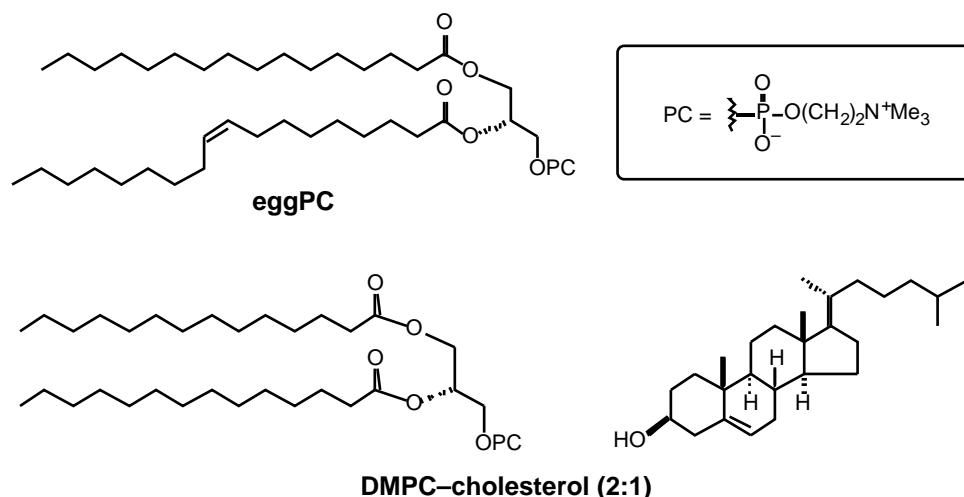


Figure 5-6 本研究で用いたエステル型脂質の構造

eggPC

ニワトリの卵黄に存在する膜脂質のホスファチジルコリン成分であり、図 5-6 に示した構造 (C18:1,[*cis*]-9/C16:0) に代表される、様々な鎖長の脂質で構成されている。その脂肪酸組成は 16:0 (38%), 16:1 (3%), 18:0 (9%), 18:1 (33%), 18:2 (17%) であると分析されている⁶⁶⁾。不飽和脂肪酸を多く含んでいるために相転移温度は低く、 $-15 \sim -7$ °C である。また室温付近では流動性に富んだ液晶状態を単一相としてとるため、エステル型脂質の基準物質として利用した。

DMPC-cholesterol

動物細胞で広く見出されるコレステロールは脂質分子の炭化水素鎖と疎水性相互作用して、液晶状態での脂質分子の運動性を抑制する働きがある。その傾向は特に DMPC 程度の鎖長をもつ脂質に対して強く、さらに単分子膜を用いた実験から 2:1 のモル比で混合したとき分子占有面積の低下する割合が最も大きいこと

が報告されている¹⁰⁾。つまり密なパッキングをとることで脂質膜の安定性が增强されると考えられる。そこでヒトに代表される動物細胞の生体膜モデルとして、DMPC とコレステロールとを 2:1 で混合した脂質を用いた。

合成した 36 員環脂質 **176**, **178** 及び非環状脂質 **177**, **179** の脂質膜の性質を 1) 光学顕微鏡によるリポソームの観察, 2) 熱分析 (DSC), 3) 単分子膜の分子占有面積, 4) 炭化水素鎖の運動性, 5) 蛍光偏光解消, 6) リポソームの水透過性, 7) リポソームのプロトン透過性, 8) リポソームの熱安定性, の各種測定で分析した。

5-3-1 光学顕微鏡によるリポソームの観察^{12h)}

【原理】リポソームの形成確認は顕微鏡観察で行うのが直接的で確実である。SUV や LUV 程度の大きさは電子顕微鏡でしか確認できないが、GUV ほどの大きさとなると光学顕微鏡でも観察可能である。光学顕微鏡にも様々な種類があるが、リポソームの観察には位相差顕微鏡, 蛍光顕微鏡がよく利用される。前者はごくわずかの屈折率の違いを明暗の差に変換できる顕微鏡である。これは無色透明な生体試料を固定染色なしで測定できるメリットがある。後者は試料に励起光を入射し、発生する蛍光を視野に収めるように工夫した装置である。最近のビデオカメラ, CCD カメラなどの画像解析システムの進歩で撮像を明瞭に得ることが出来るようになった。本節では蛍光顕微鏡での結果を示す。

【実験】GUV は静置水和法を用いて調製した。まず脂質 1 mg をクロロホルム-メタノール 360 μL (2:1) に溶解し、そのうちの 1.5 μL をカバーガラス上に滴下する。10 分間乾燥させて得たラメラ状のサンプルを顕微鏡上に載せ、50 μL の緩衝液で希釈する。そうするとサンプルが緩衝液に浸ったところから巨大ベシクルの形成がみられるようになる。なお、染色剤には脂質二重膜に取り込まれる蛍光物質 Nile Red を用い、脂質二重膜の発光イメージを逐一観察した (励起波長 485 nm, 蛍光波長 525 nm)。

【結果】36 員環リン脂質 **176** の蛍光顕微鏡像の写真を図 5-7 に示す。明らかに **176** は単独で巨大リポソーム (GUV) を形成していることが分かる。しかも

そのベシクルの形状は経時的に変化し、非常に”柔らかい”ベシクル、すなわち流動性の高い膜を形成することが分かった。分岐鎖を有さないエステル型脂質リポソームは図 5-8 のようにほとんど形状変化を示さず、イソブレン鎖からなるものと比べて対照的であった。

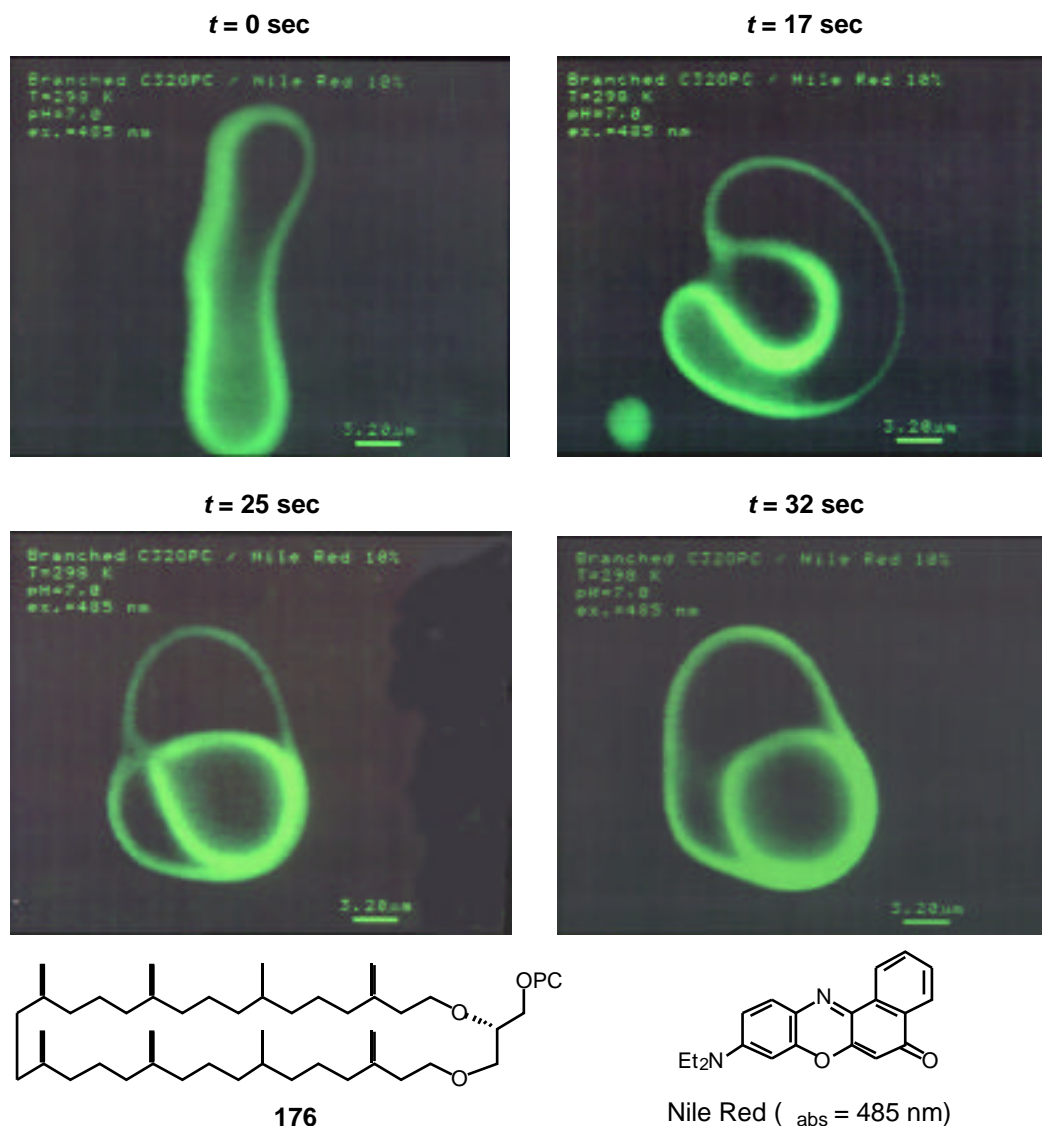


Figure 5-7 36員環リン脂質176の顕微鏡写真

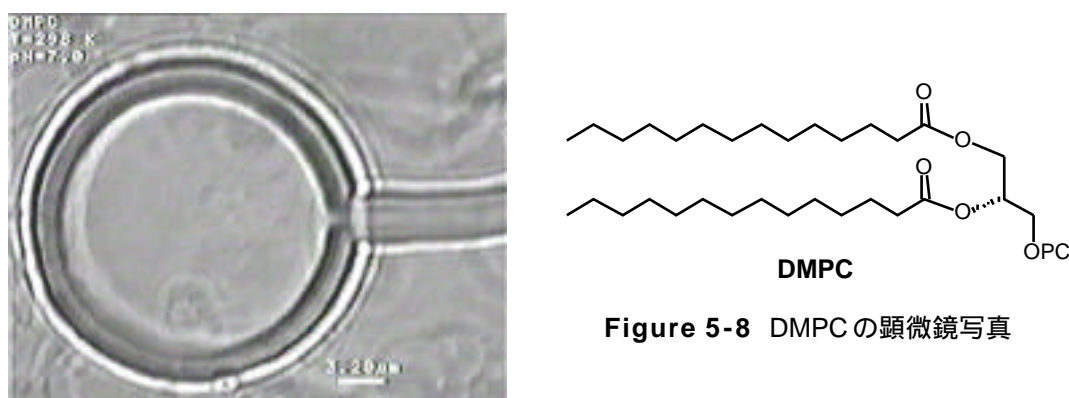


Figure 5-8 DMPCの顕微鏡写真

5-3-2 熱分析 (DSC)

古細菌型リン脂質 176, 177 の水分散液及びコア脂質 5, 1 の乾燥試料の DSC を測定した。

【実験】リン脂質分散液：脂質 (7 mg) をエチレングリコール - 水 (50 mg; 4:1 v/v) に溶かし、70 μl のアルミニウム製パンに入れ、何度か昇温，降温を繰り返した後 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で走査した (-40~60 $^{\circ}\text{C}$)。

コア脂質乾燥試料：脂質 (ca. 10 mg) をそのまま 20 μl のパンに入れ、何度か昇温，降温を繰り返した後 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で走査した (-120~0 $^{\circ}\text{C}$)。

【結果】古細菌型リン脂質 176, 177 の DSC を図 5-9 に示す。水 - エチレングリコール (4:1) 中に分散させた非環状脂質 177 は、測定温度範囲では相転移温度の存在は見出せなかった。おそらく多数の分岐メチル基のために相転移温度がかなり低下していると思料される。これは Yamauchi らのモデル化合物での実験結果^{12d)} と一致した。一方、環状脂質 176 についても同様に -40 $^{\circ}\text{C}$ から 60 $^{\circ}\text{C}$ の範囲で測定したが、相転移の存在は見出せなかった。つまり常温では液晶状態をとっていることがわかる。なお、-5 $^{\circ}\text{C}$ 付近のピークは水の融解熱によるものである。

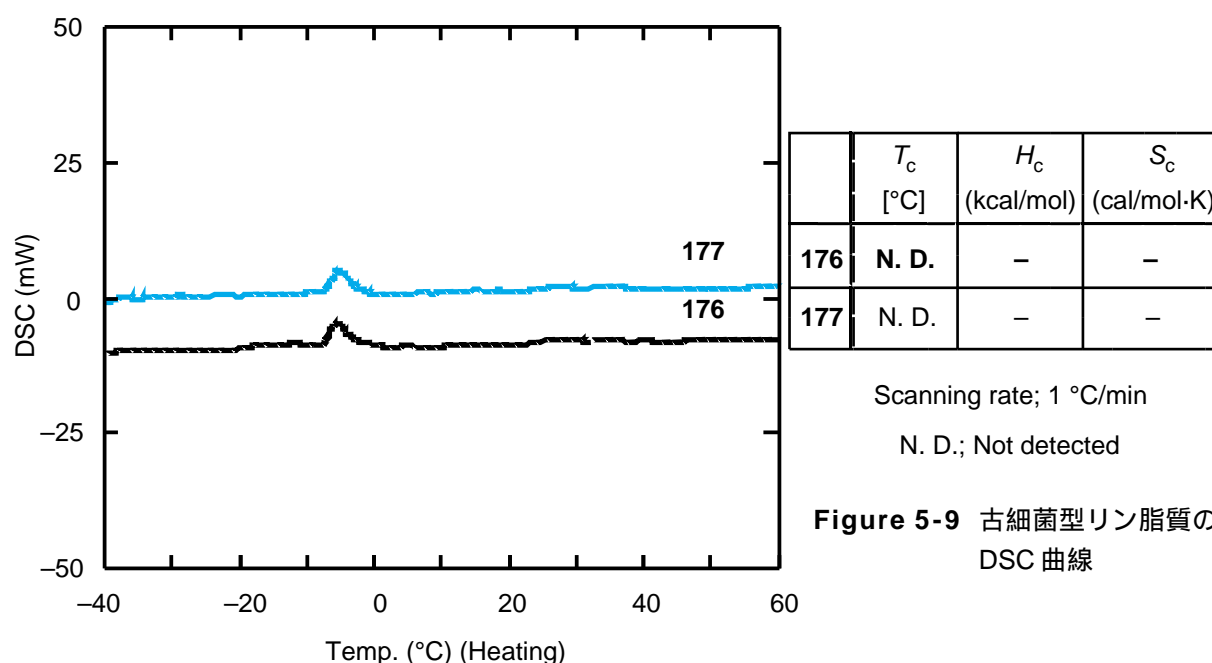
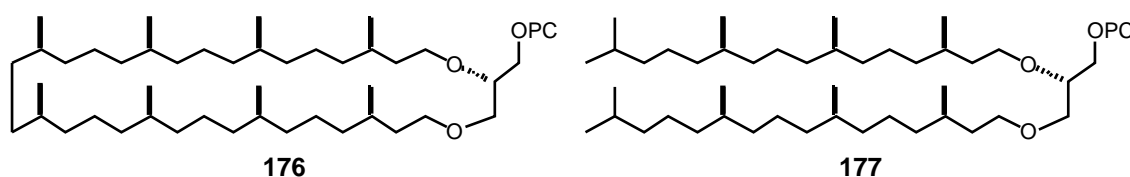


Figure 5-9 古細菌型リン脂質の DSC 曲線



古細菌型コア脂質 5, 1 の DSC を図 5-10 に示す。古細菌 72 員環テトラエーテル型コア脂質の乾燥試料では -53°C 付近にラメラ相の融解と思われる吸熱ピークが観測されたが、ジエーテル型コア脂質でも同様に低温領域に吸熱ピークが観測された。その熱力学的データについて、環状脂質 5 の方が非環状脂質 1 に比べて T_c は高く、 H_c 、 S_c は小さいことが分かった。この傾向は第 4 章で述べたリン酸ジエステル型モデル化合物⁵⁶⁾ 及び Menger らのジエーテル型モデル化合物^{13b)} での結果と同じものであった。すなわち環状脂質における T_c の上昇は相転移により大きな熱運動を必要としたためであり、 H_c 及び S_c の低下は各々相転移前後でのトランス - ゴーシュ変化が生じる部位の減少, 炭化水素鎖の自由運動の抑制に起因すると考えられる。これら観測された相転移は層状に重なったラメラ相の融解によるものと考えられる。

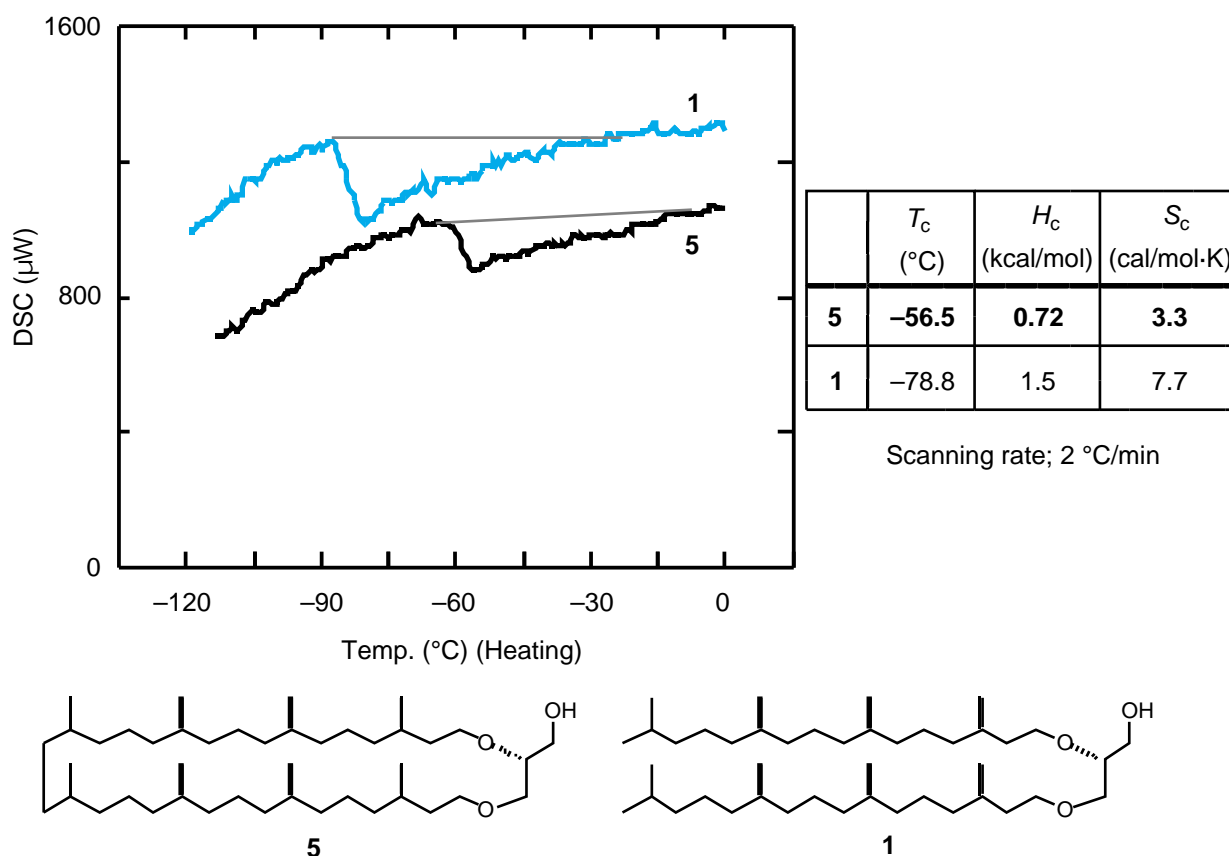


Figure 5-10 古細菌型コア脂質の DSC 曲線

5-3-3 単分子膜の分子占有面積

【実験】20 °C の蒸留水上に脂質溶液を滴下して 10 分間静置した後、0.32 mm/sec の一定速度で可動バリアを押し進め、 π -A 曲線を得た。

【結果】測定結果を図 5-11 に示す。常温で液晶状態にある古細菌型脂質 176, 177 の分子占有面積は、分岐メチル基を有さないジエーテル脂質 183, 184 (参考データ) 及び第 4 章のリン酸ジエステル型モデル化合物⁵⁶⁾ と比較して大きな値をとっていた。分岐メチル基を有さない化合物は測定温度でゲル状態にあるため一概には比較できないが、古細菌型脂質での大きな値はイソペン鎖のかさ高さに起因するものといえる。環状脂質 176 と非環状脂質 177 との比較では 176 の方が分子占有面積が小さいことが分かった。すなわち炭化水素鎖末端が結合していることにより単分子膜面での広がりが 177 よりも抑制されていると考えられ、図 5-12 の模式図に示したように環状脂質は非環状脂質よりも密なパッキングを有した単分子膜を形成することが分かった。

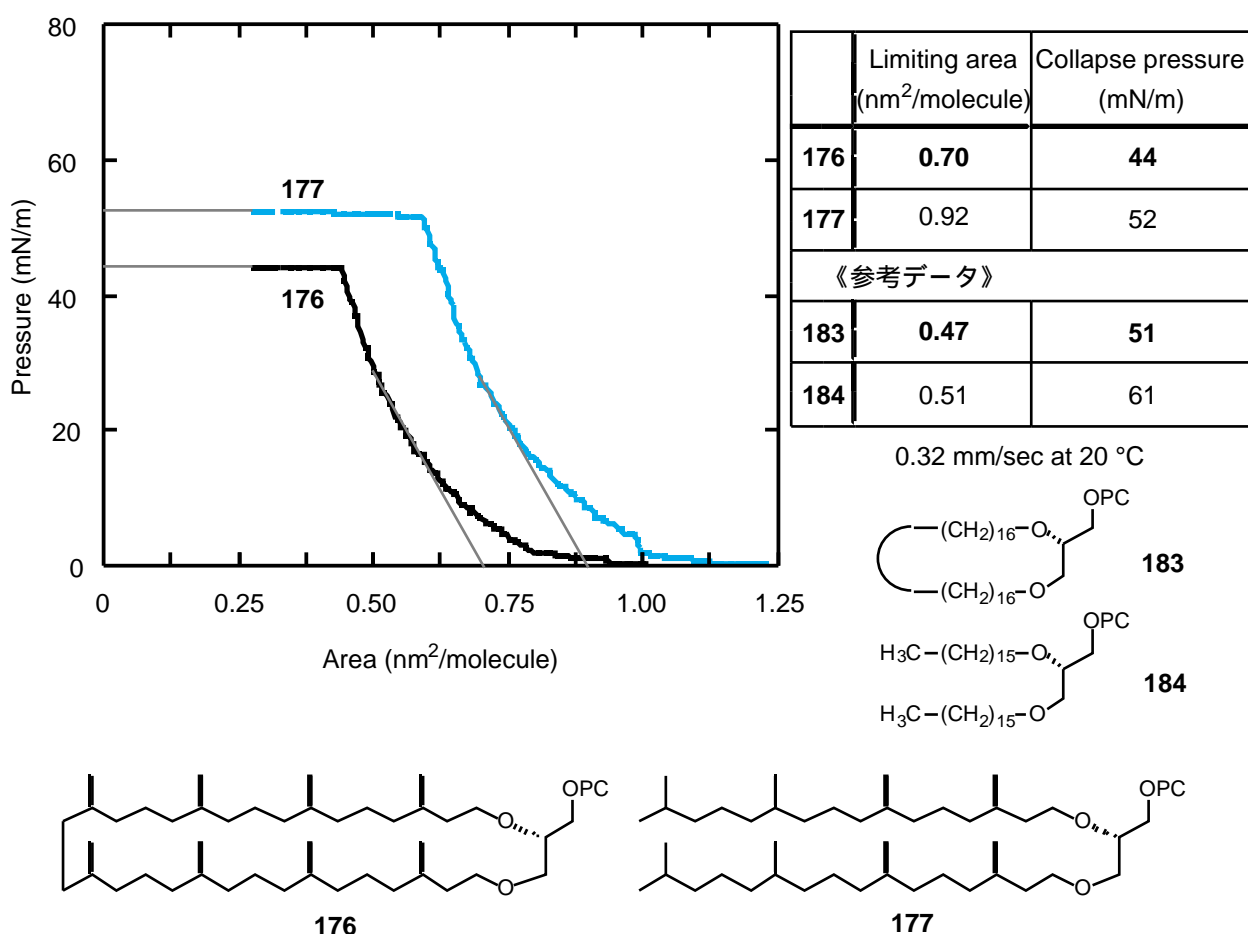


Figure 5-11 古細菌型リン脂質の π -A 曲線

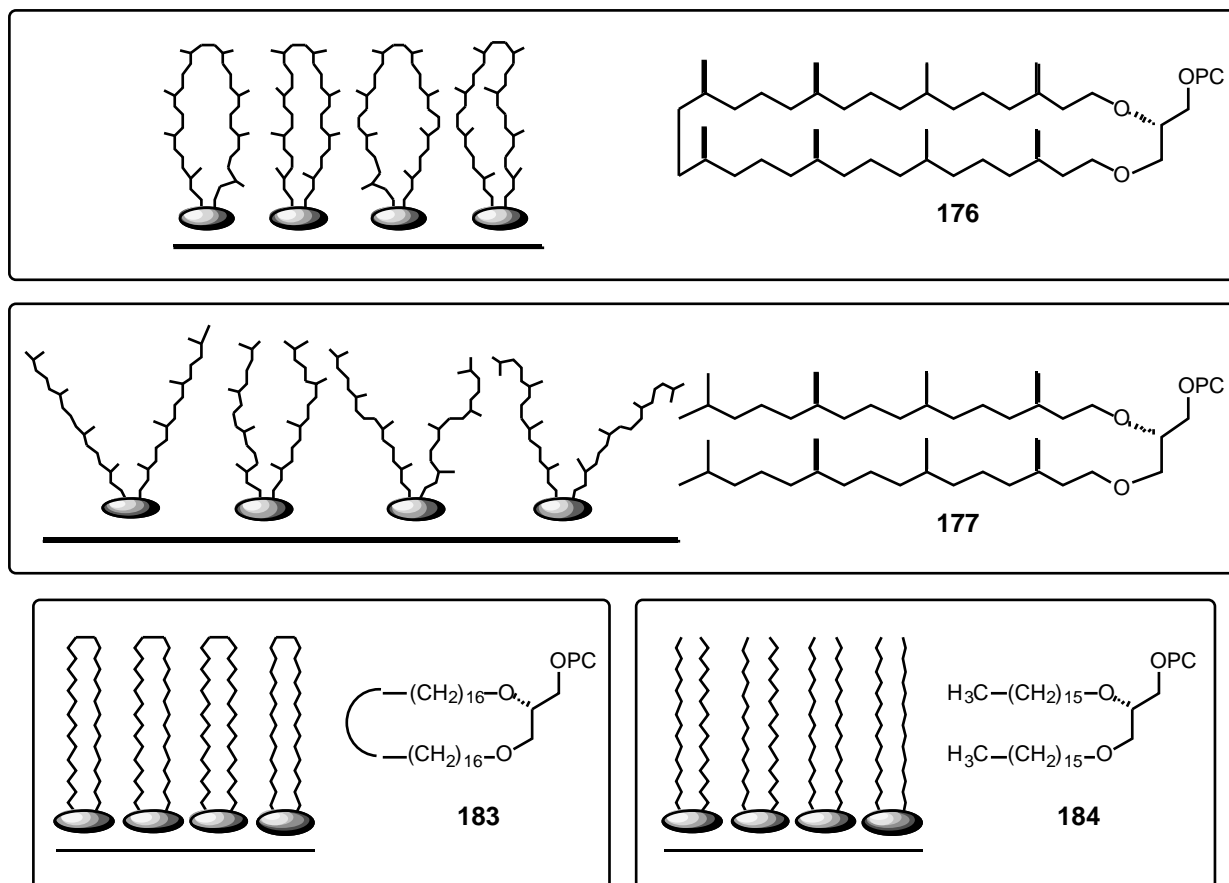


Figure 5-12 古細菌型リン脂質から得られる単分子膜の広がり

5-3-4 炭化水素鎖の運動性^{47,67)}

【原理】²H-NMR ではスペクトルは外部磁場に対する C-D 結合の配向によって影響を受ける。局部磁場と外部磁場とがベクトル的に加算された結果が重水素核によって感知されるからである。この際、ある一定方向に配向した膜では分子の等方運動が起こらず、²H 核のスピン量子数が 1 であることにより核四重極相互作用が零にならない。つまり図 5-13 の $m = +1$ から $m = 0$, $m = 0$ から $m = -1$ 間のエネルギーに差が生

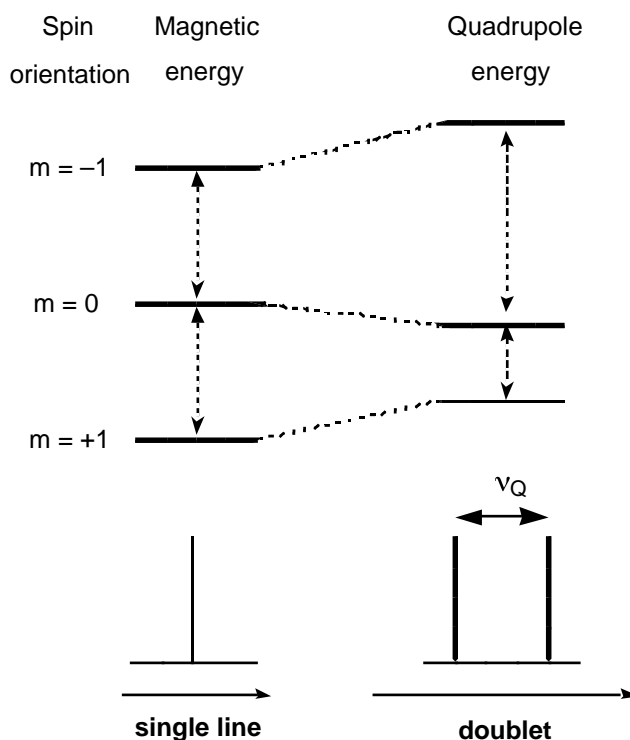


Figure 5-13 核四重極相互作用のエネルギーダイアグラム

じ、その結果スペクトルは分裂を起こす。その核四重極分裂の間隔 (ν_Q) は式 5-1 で与えられる。

$$\nu_Q = (3/2) \cdot (e^2qQ/h) \cdot S_{C-D} \cdot (3\cos^2\theta - 1)/2 \quad (\text{式 5-1})$$

ここで e^2qQ/h は核四重極結合定数 (メチレン基の C-D 結合では 168 Hz), S_{C-D} は C-D 結合のオーダーパラメータ, θ は多重膜平面と外部磁場との間の角度である。
 S_{C-D} は結合の秩序さを表す数値なので、 S_{C-D} が大きいほど、すなわち分裂幅 ν_Q が大きいほどその部分の運動性が小さいことを示す。

図 5-14 に DMPC- d_{27} 配向膜の $^2\text{H-NMR}$ を示す ($\theta = 0$)。炭化水素鎖末端にいくほど

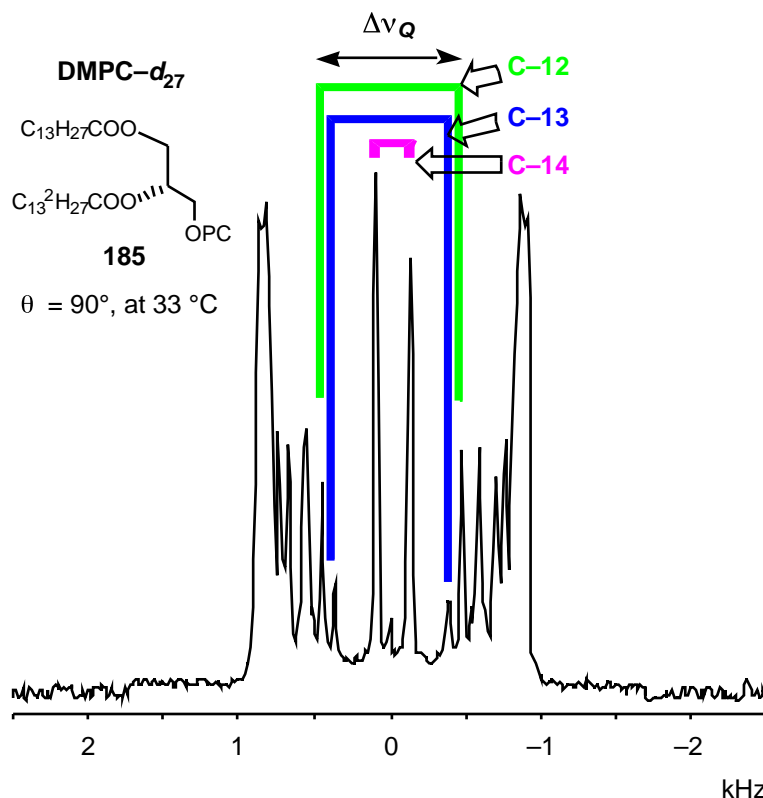


Figure 5-14 DMPC- d_{27} 配向膜の $^2\text{H-NMR}$ スペクトル

ν_Q が小さい、すなわち運動性が大きくなっていることが分かる。以上の性質を利用し、重水素標識体の配向膜の広幅 $^2\text{H-NMR}$ を測定することで炭化水素鎖の運動性を見積もることが出来る。

古細菌脂質に関する研究例を図 5-15 A^{12b)}, B^{11a)} に示す。

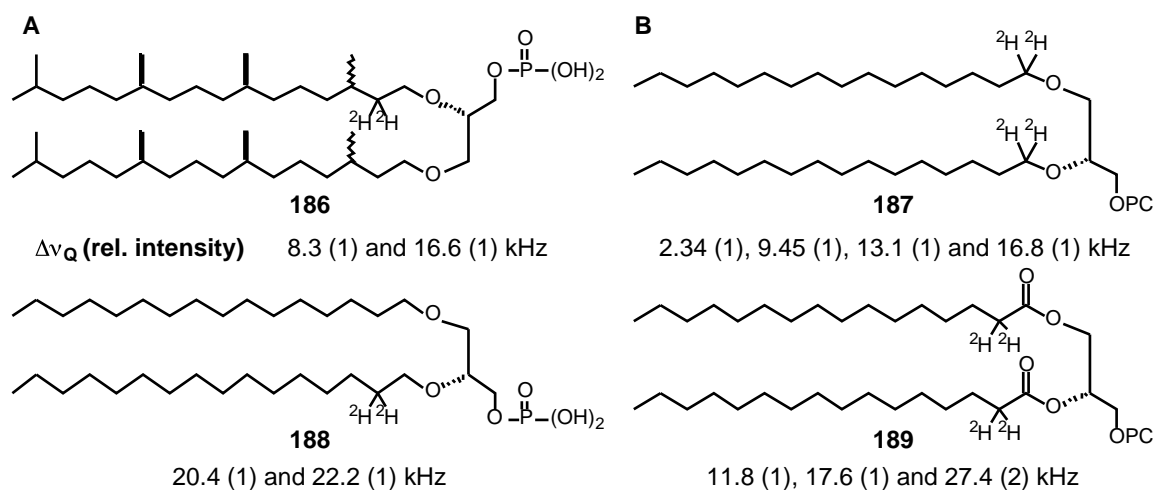


Figure 5-15 古細菌型脂質の重水素標識体と ν_Q

これらの実験より、直鎖アルキル基よりもイソブレン鎖の方が運動性が高いこと、グリセロール付近ではエステル型よりもエーテル型の方が高い運動性を有していることが見出されている。

そこで環状脂質の炭化水素鎖の運動性を見出すべく、1) 各炭素位置のシグナルの帰属がついている標識プローブ DMPC- d_{27} ⁶⁷⁾ との混合膜の $^2\text{H-NMR}$ 測定 (5-3-4-1 節)、2) 部位特異的重水素化脂質単独での $^2\text{H-NMR}$ 測定を行った。

5-3-4-1 DMPC- d_{27} 混合配向膜の NMR 解析

【実験】配向膜の作成法を図 5-16 に示す。濃硝酸、超純水及びアセトンで入念に洗浄したカバーガラスに脂質の 2-プロパノール溶液 (10 mg/900 μl) を滴下し、デシケーター中で減圧乾燥した。同様の操作を行い、直径 10 mm の NMR チューブに入るように適当にカットしたカバーガラスを約 50 枚積層する。50 μl の軽水を加え、35 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間水和させた。

得られた配向膜を NMR プローブにいれ、測定を行った。この際、膜平面と磁場とが垂直 ($\theta = 90^{\circ}$) になるように設置した。

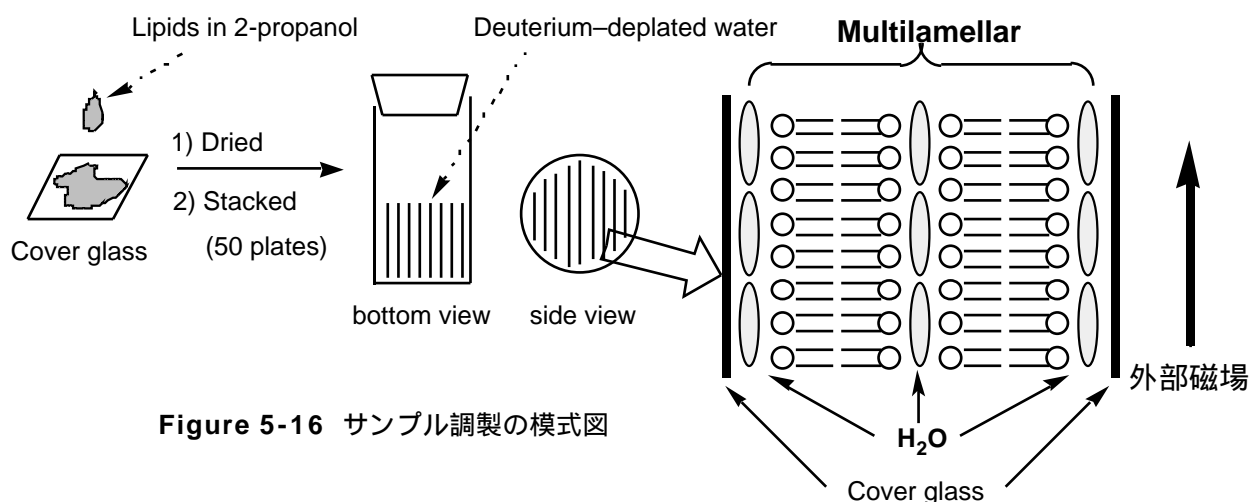


Figure 5-16 サンプル調製の模式図

【結果】得られたスペクトルを図 5-17 に、炭化水素鎖各部位のオーダーパラメーター S_{mol} のグラフを図 5-18 に示す。 S_{mol} は式 5-2,3 で表される。

$$S_{\text{mol}} = -2 \cdot S_{\text{C-D}} \quad (\text{for } \text{CH}_2 \text{ group}) \quad (\text{式 5-2})$$

$$S_{\text{mol}} = -6 \cdot S_{\text{C-D}} \quad (\text{for } \text{CH}_3 \text{ group}) \quad (\text{式 5-3})$$

コレステロール添加時のような顕著な違い (C vs D) はみられないものの、環状脂質 176 は非環状脂質 177 と比べて DMPC- d_{27} の炭化水素鎖の運動性を低

下させることが分かった。すなわち間接的ながら 176 は 177 よりも運動性が低いことが分かった。

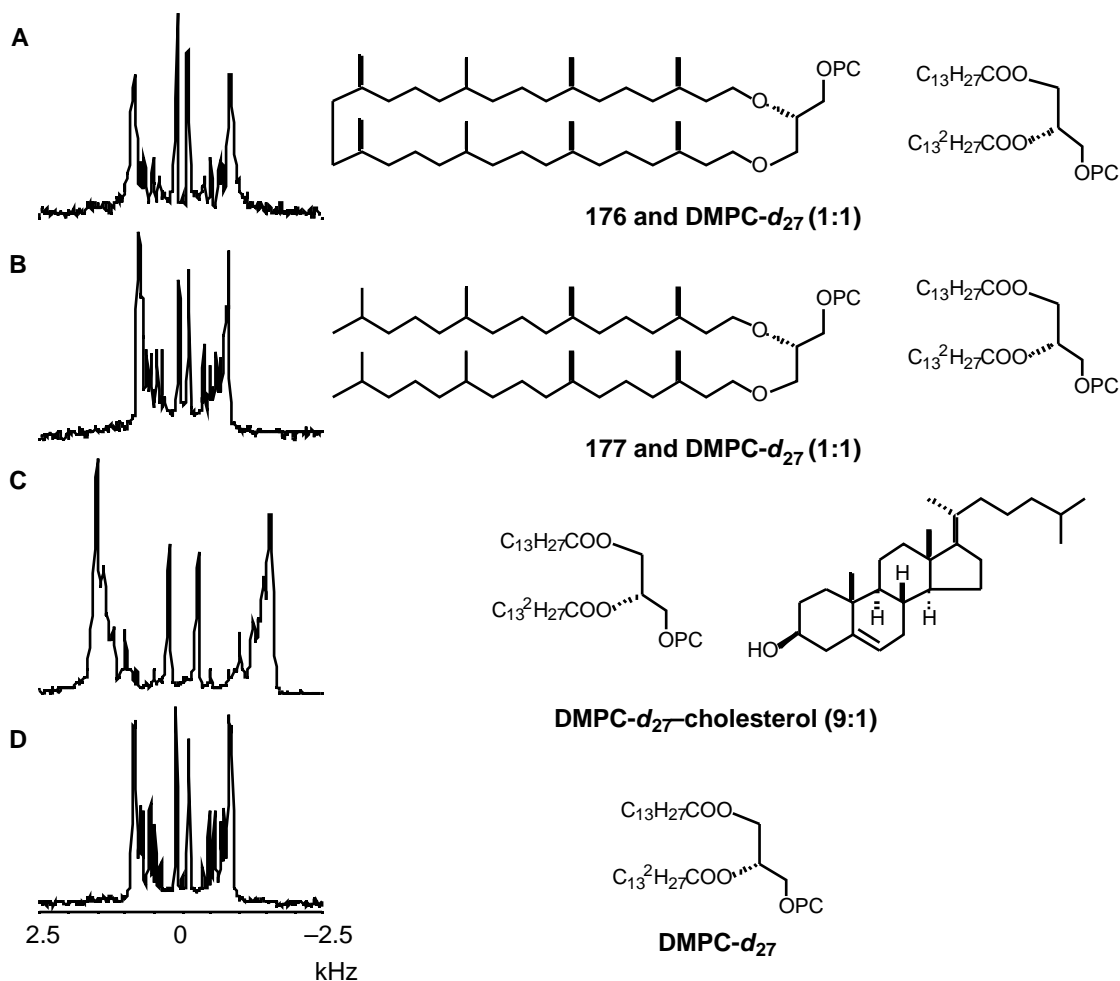


Figure 5-17 DMPC- d_{27} 混合配向膜のスペクトル

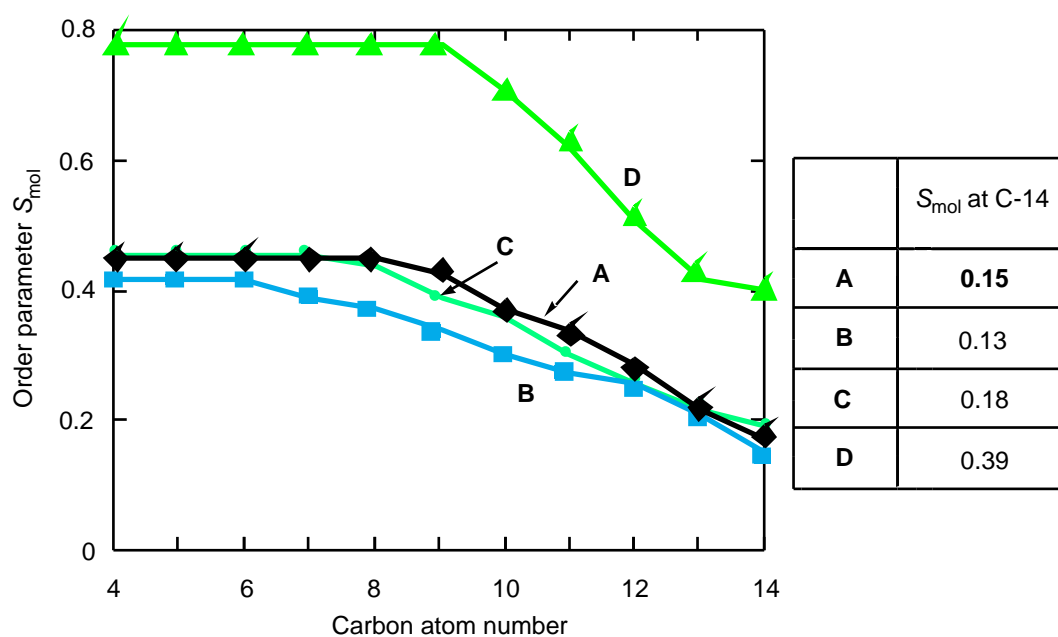


Figure 5-18 オーダーパラメーター

5-3-4-2 重水素化ジエーテル型リン脂質の合成

先の 5-3-4-1 節で得た結果はあくまでもプローブとして用いた重水素標識 DMPC のオーダーパラメーターであり、古細菌型脂質の運動性を間接的に見積もったものである。そこで環状脂質、非環状脂質の炭化水素鎖の運動性を ^2H -NMR で直接観測するために重水素標識化ジエーテル型脂質を合成することとした。環状構造をとることによる炭化水素鎖の運動性の違いは、環状脂質の炭化水素鎖中央部と非環状脂質の炭化水素鎖末端付近とを標識した基質で比較するのが最も顕著に現れると考えられるので、重水素標識の比較的容易な部位に導入した環状脂質 **190** 及び対応する非環状脂質 **191** の合成を行った (図 5-19)。

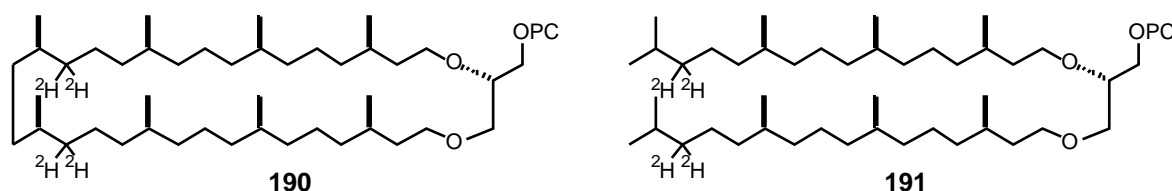
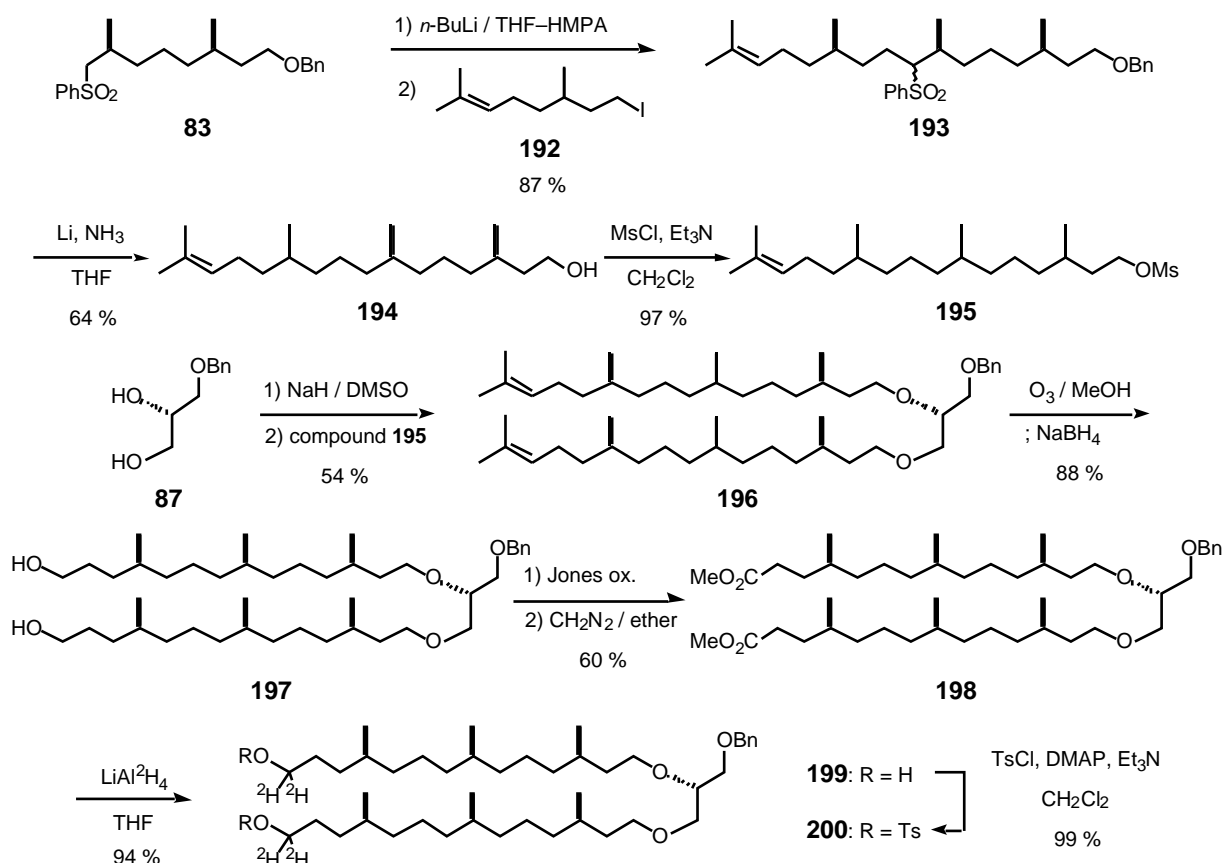
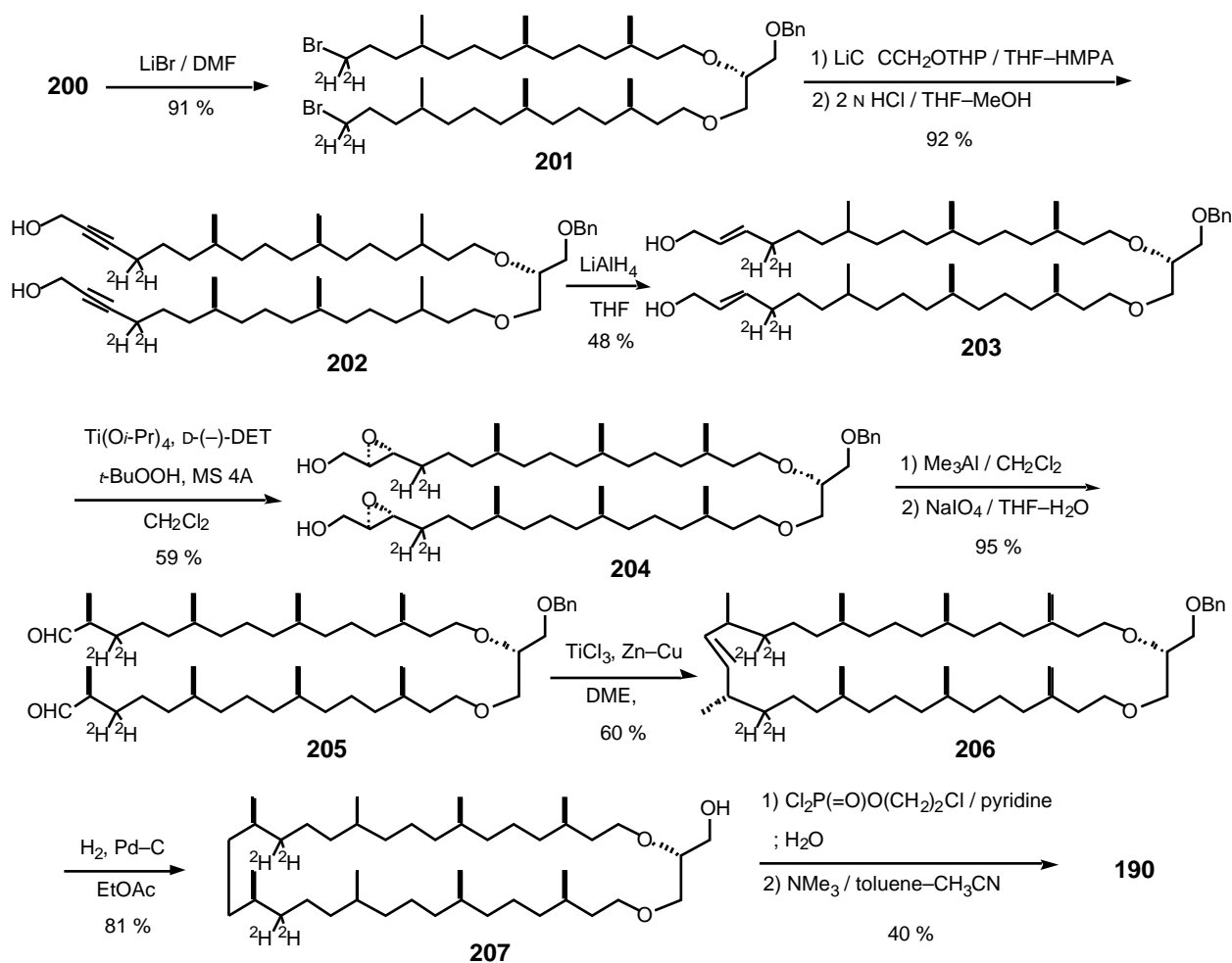


Figure 5-19 合成ターゲット

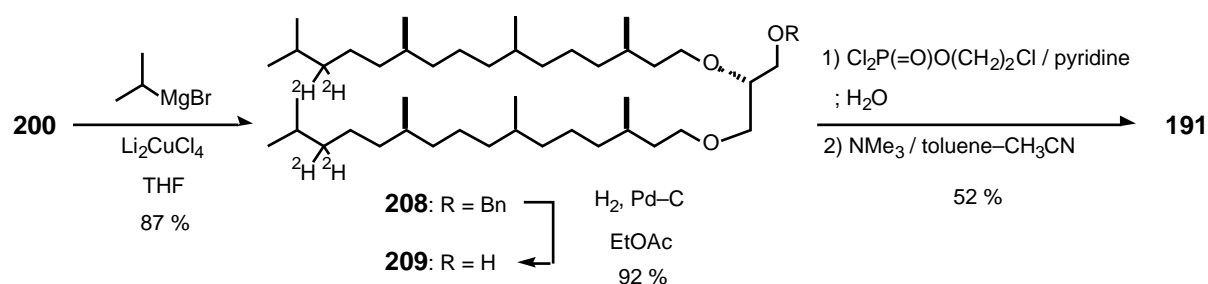
スルホン **83** 及び (*R*)-ヨウ化シトロネリル **192**⁶⁸⁾ から 7 段階で構築したジエステル **198** に重水素化リチウムアルミニウムを作用させ重水素を導入した。

Scheme 5-4 ジトシラート- d_4 **200** の合成

得られたジトシラート **200** は **190**, **191** の共通前駆体として用いた。まず環状脂質 **190** は第2章で述べたルートに従い、環化反応には McMurry 反応を用いて合成した⁶⁹⁾。

Scheme 5-5 環状脂質- d_4 **190** の合成

一方、非環状脂質 **191** はスキーム 5-6 に示したようにジトシラート **200** へのクロスカップリング⁷⁰⁾ を行い、その後接触還元，ホスホコリン化を経て合成した。

Scheme 5-6 非環状脂質- d_4 **191** の合成

5-3-4-3 配向膜の NMR 解析

【実験】サンプルは 5-3-4-1 節に示した要領で調製した。

【結果】測定結果を図 5-20 に示す。重水素が 4 箇所入った基質のため、理論的には計 4 対の四重極分裂が現れるはずであるが、環状脂質 **190** では半値幅約 10 kHz の非常に幅の広いシグナルを、一方非環状脂質 **191** では 5~6 対の四重極分裂を与えた。

191 で 5~6 対以上も四重極分裂が生じた原因としては、**191** が配向膜上で 2 種類以上のコンフォメーションをとっていた可能性が考えられる。また **190** で幅広いシグナルが得られた原因としては、非環状脂質と比べて炭化水素鎖の運動性が非常に遅いことを示しているとも考えることが出来る。

この測定から非環状脂質の炭化水素鎖末端 (環状脂質では中央部) は多くのコンフォメーションをとっていること、環状脂質は非環状脂質と比べて炭化水素鎖の運動性が低いことを見出すことが出来た。

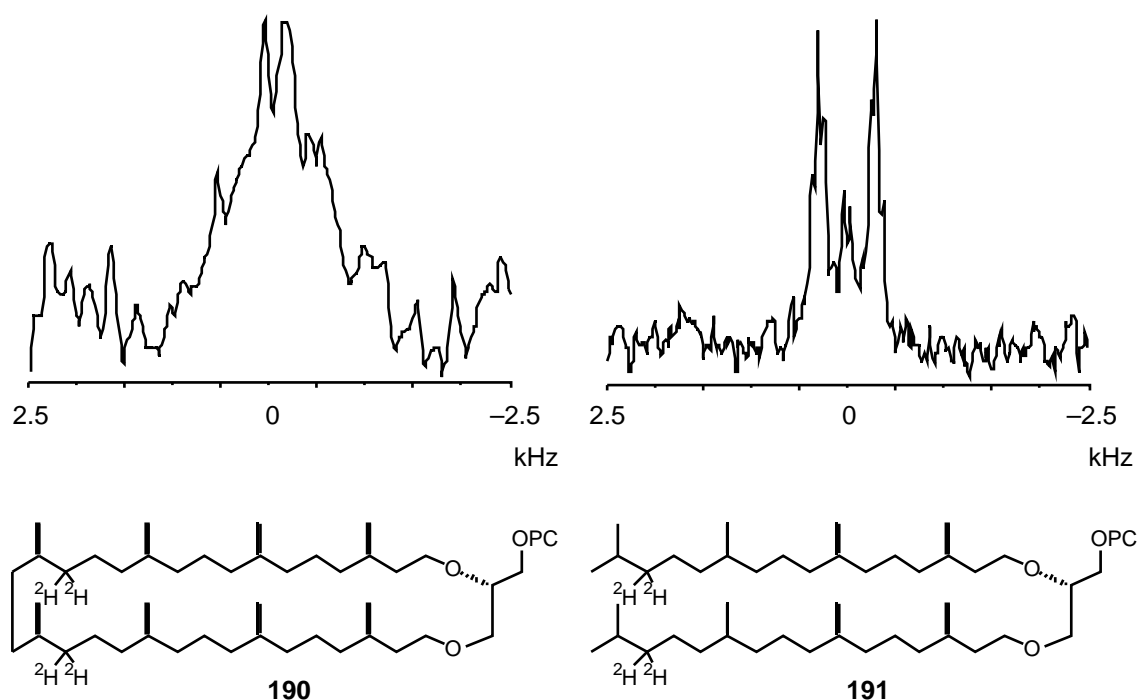


Figure 5-20 重水素標識体 190, 191 の配向膜のスペクトル

5-3-5 蛍光偏光解消

【実験】脂質 3~4 mg に緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5) 9 ml を加え、超音波処理法で SUV 分散液を調製した。得られた分散液 3ml に 3 μ l の DPH 及び TMA-DPH (ともに 0.5 mM in DMF) を各々加えた。前者は脂質二重膜中にプローブを取り込ませるため、1 時間室温でインキュベーションしてから、後者はそのまま直ちに蛍光セルに移した。測定法は 4-3-6 節に従った。

測定したサンプルは 36 員環リン脂質 **176** , 36 員環糖脂質 **178** , 非環状リン脂質 **177** , 非環状糖脂質 **179** , DMPC-cholesterol (2:1) , 及び eggPC の計 6 種類である。これらは全て測定温度範囲で液晶状態をとっている。

【結果】測定結果を表 5-3 及び図 5-21 に示す。グラフをみると明らかであるが、ほとんどのサンプルについて温度が上昇するにつれて r 値が減少、すなわち流動性が向上している。

まずリン脂質について比較する。環状脂質 **176** は非環状脂質 **177** と比べてあらゆる温度で流動性が低かった。疎水部でその差が大きかったことを考えると、炭化水素鎖末端の結合が脂質二重膜の流動性低下に大きく寄与していることを示しているといえる。また親水部でもその傾向がみられたことは、環状構造が疎水部のみでなく脂質分子全体の流動性、運動性を低下させていることを示している。eggPC はこれらの中でもっとも流動性が高かった。屈曲した炭化水素鎖を有する eggPC では脂質分子の間隔が疎となっていて、そのために蛍光プローブが活発なブラウン運動をすることが出来たと考えられる。コレステロールで膜を補強したりポソームは逆にもっとも流動性が低かった。エステル脂質とコレステロールとが強固に疎水性相互作用をしていることで蛍光プローブの運動が抑制されたと考えられる。以上のことを考えると古細菌型脂質はイソブレン鎖の分岐メチル基により分子同士で適度に疎水性相互作用をし、その結果 eggPC よりも流動性が低くなったと考えられる。

糖脂質でも環状脂質 **178** の方が非環状脂質 **179** よりも流動性が低かった。この傾向はリン脂質での知見と一致する。またリン脂質と糖脂質とを比較すると、若干ではあるものの糖脂質の方が流動性が低いことが分かった。極性基のゲンチオビオースが水素結合を介して相互作用をしているために膜流動性が低下したと

考えられる。また親水部の高温領域における r 値は、蛍光強度の測定限界のため求めることが出来なかった。この理由としては糖脂質がラメラ相，リポソームのような脂質二重膜構造をとりにくいためと考えられる。

以上より環状脂質は非環状脂質と比べて流動性が低いことが分かった。疎水部，親水部の両者で同様の傾向を示したことにより、環状構造をとることで脂質分子全体の運動性，流動性が低下することを明らかに出来た。

	r value at hydrophobic region			r value at hydrophilic region		
	25 °C	50 °C	70 °C	25 °C	50 °C	70 °C
176	0.204	0.133	0.104	0.247	0.223	0.216
177	0.128	0.0906	0.0694	0.222	0.210	0.194
178	0.216	0.139	0.111	0.257	–	–
179	0.162	0.101	0.0886	0.259	0.241	–
DMPC- cholesterol	0.264	0.210	0.158	0.274	0.234	0.213
eggPC	0.0923	0.0699	0.0668	0.186	0.174	0.205

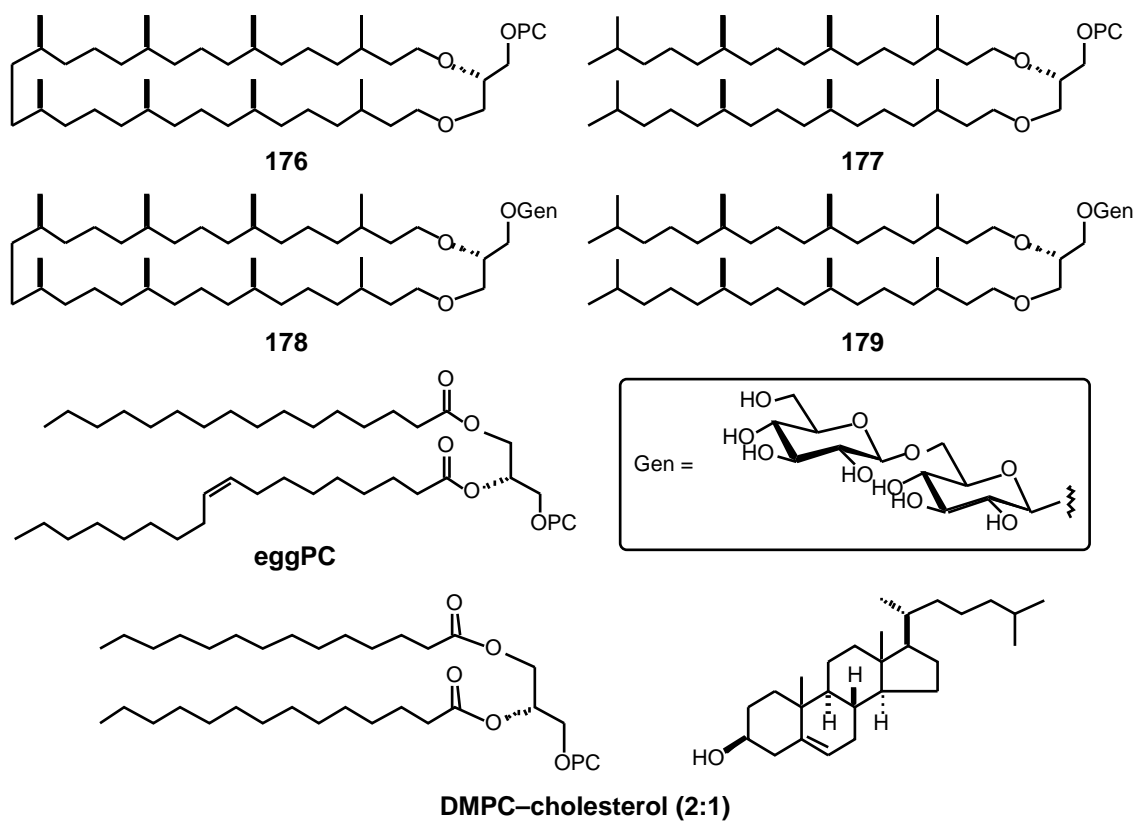


Table 5-3 古細菌型脂質の蛍光偏光解消

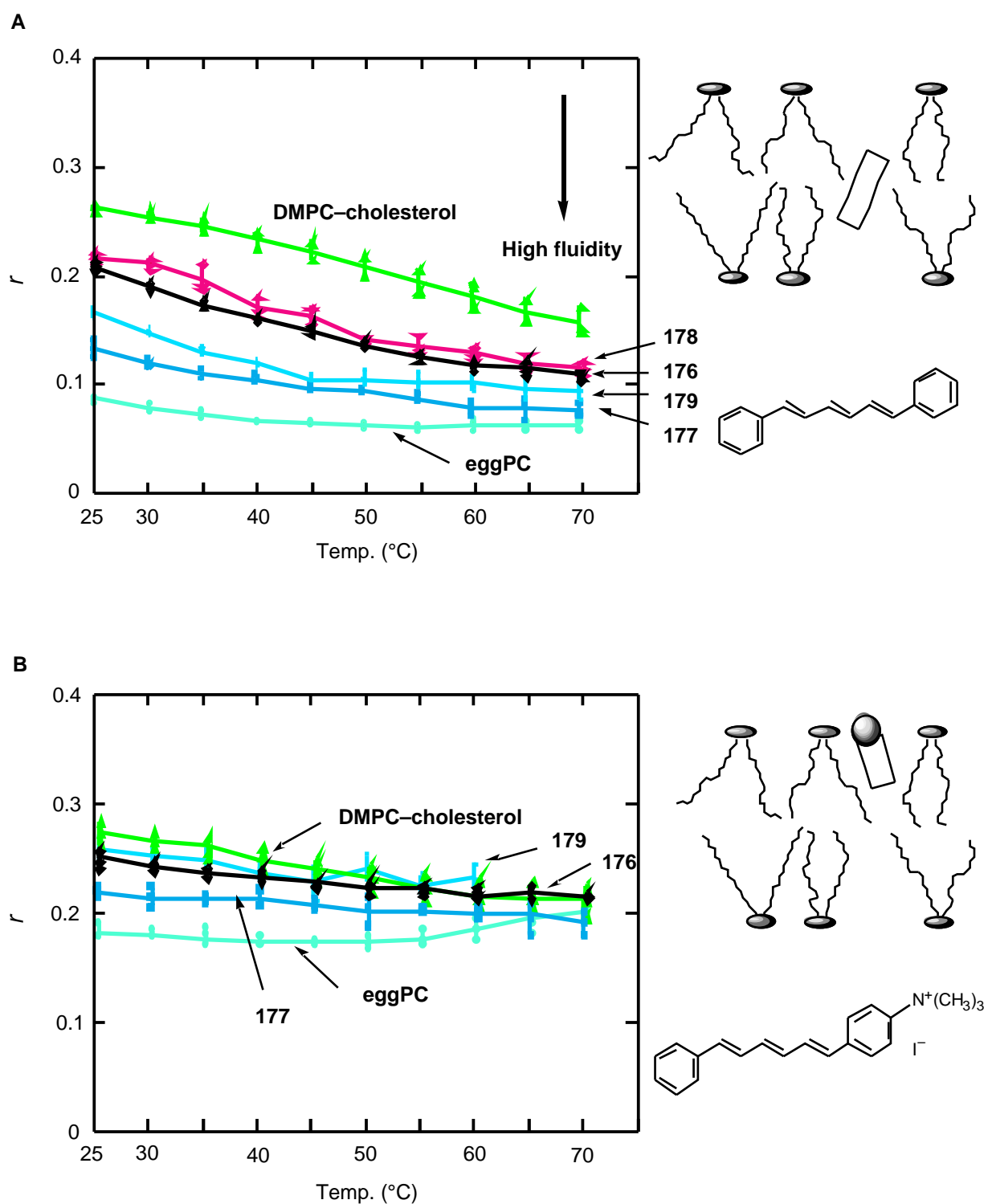


Figure 5-21 古細菌型脂質の蛍光偏光解消 A) 疎水部, B) 親水部

5-3-6 リポソームの水透過性^{47,71)}

リポソームの物質流入・流出といった性質は脂質分子の種類に大きく影響されるのももちろんだが、その粒径の大きさによっても左右される。例えば本節で述べるリポソームの浸透圧膨脹であるが、粒径が大きくなるほど水透過速度が低下することが知られている。そこで調製した LUV 分散液をエクストルーダーを通してリポソームの均一化を図り、検討することとした。本節及び 5-3-7, 5-3-8 節で述べる実験は全てこのようにリポソーム粒径を揃えて行ったものである。

5-3-6-1 エクストルーダーによるサイジング処理⁷²⁾

エクストルーダーはカナダの Cullis らが考案した装置である。その構造を図 5-22 A に示すが、一定サイズの孔 (ポア) を有するメンブランフィルターを高圧窒素 (約 8 ~ 10 kgf/cm²) で強制的に通過させ、その過程で膜を再編成させることでリポソームのサイズを均一化させるものである。フィルターにはポリカーボネート製の Nucleopore® (孔径; 200 nm) を用い、計 10 回通過させた。

サイジング処理を施した後の粒径分布の評価には動的光散乱法を用いた。リポソーム懸濁液にレーザー光を照射すると粒子のブラウン運動により散乱光のゆらぎが観測されるのだが、このゆらぎは粒子径が小さいほど (拡散速度が大きいほど) 大きくなる。このゆらぎの統計的処理により

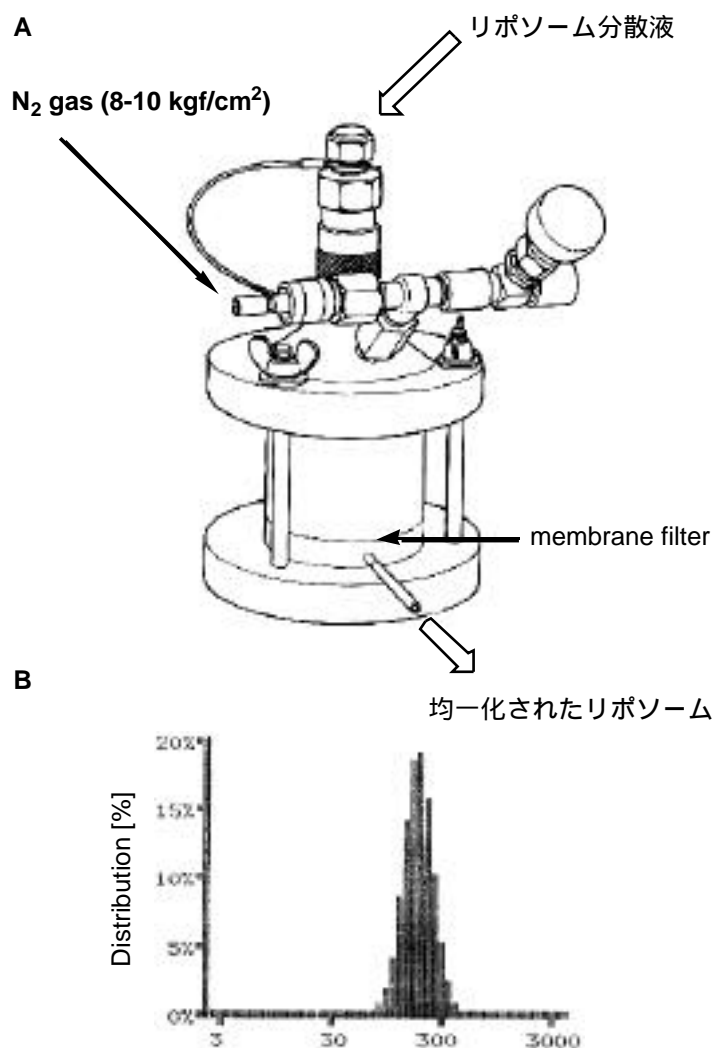


Figure 5-22 A) エクストルーダー, B) 粒径分布のヒストグラム

粒子径を求めるのが動的光散乱法である。4 ~5 mW のヘリウム - ネオンレーザー光を入射光として Coulter® model N4SD 粒径分析機で求めたのが図 5-22 B のヒストグラムである。測定値は 185 nm (SD 65 nm) であり、200 nm 付近でよい正規分布をしていることが分かる。

5-3-6-2 リポソームの水透過性

【原理】リポソーム二分子膜は浸透圧応答を示し、低張下では膨脹 (swelling) し、高張下では収縮 (shrinking) する。この浸透圧応答の程度はリポソームの構成脂質や粒径に依存している。粒径をほぼ一定にすると、構成脂質による浸透圧応答の大小を求めることができる。この浸透圧の差による粒径の増減の度合いは、リポソームの水透過速度の大小を反映するものである。なお、測定は図 5-23 に示すストップフロー装置によって行った⁷¹⁾。

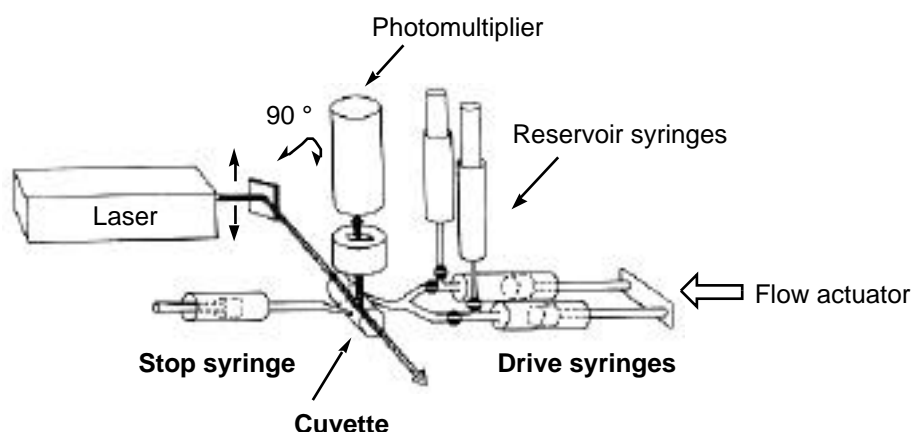


Figure 5-23 ストップフロー装置の模式図

リポソームの水透過性は、高張緩衝液 A, 低張緩衝液 B で調製したリポソーム分散液を各々逆に同量の B, A と混合したときの、ベシクル内への水の出入に伴うベシクル粒径の増大 (swelling), 減小 (shrinking) で評価した。浸透圧膨脹の測定模式図を図 5-24 に示す。混合することにより塩濃度勾配が生じベシクル内に水が流入して膨脹する。この粒径の増大を光散乱強度 I_t の減少値としてモニターした。水の流入・流出が一次反動的に進行しているとすると I_t は式 5-4 で示される時間 t の指数関数として表せ、また光強度の変化値 $I - I_0$ が半分になる時間が半減期 $t_{1/2}$ に相当する。この $t_{1/2}$ 及び式 5-5 より初期の水透過速度 k

を求めることが出来る。

$$I_t = I_0 - (I_0 - I_\infty) \cdot e^{-kt} \quad (\text{式 5-4})$$

$$t_{1/2} = (\ln 2)/k \quad (\text{式 5-5})$$

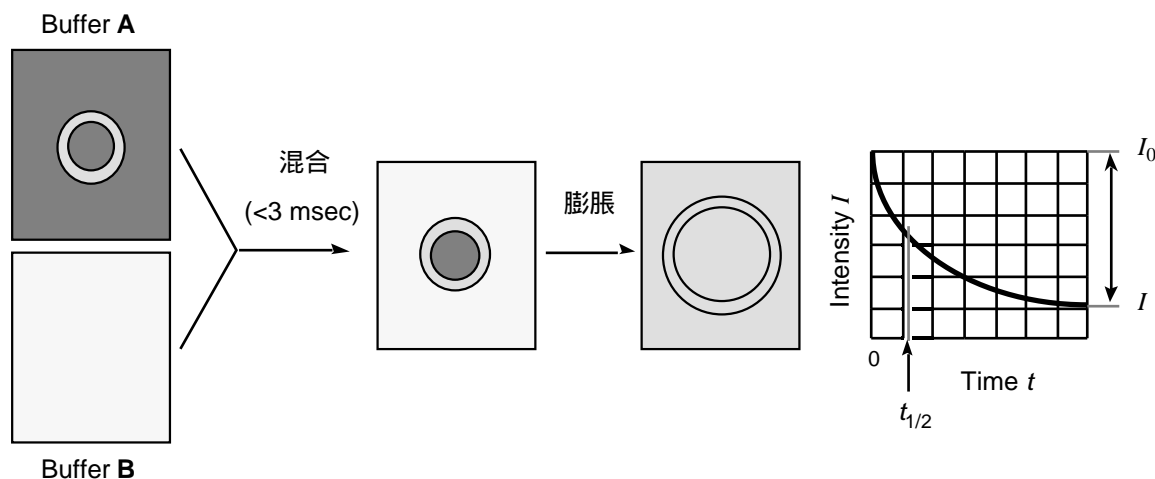


Figure 5-24 浸透圧膨脹 (swelling) の模式図

【実験】一枚膜リポソーム (LUV) は凍結融解法で調製した。5 mg の脂質薄膜に 1 ml の高張緩衝液 A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM NaN₃, 1 mM EDTA, pH 7.95) または低張緩衝液 B (10 mM Tris-HCl, 5 mM NaN₃, 1 mM EDTA, pH 7.95) を加え、凍結, 融解, 振り混ぜ (vortexing) を 5 回繰り返すことによって大きな一枚膜リポソーム (LUV) 分散液を得た。緩衝液 A で調製した LUV 分散液は膨脹 (swelling), 緩衝液 B のそれは収縮 (shrinking) 実験に各々使用した。この分散液はエクストルーダーにより粒径 200 nm にサイジング処理を行った。

高張緩衝液 A 及び低張緩衝液 B で調製したリポソーム分散液を、各々 B 及び A と同量ずつ 3 msec 以内の速度で注射筒から混合槽 (cuvette) に流し込み、その後の LUV 粒径の経時変化を、光散乱強度 I_t の増減の値としてモニターした。測定は Applied Photophysics 製のストップフロー (Biosequential DX-17MV) の光散乱モード ($\lambda = 400$ nm, slit width 4 mm) で 33 ± 0.2 °C で行った。データは混合後 2~10 秒程度までとり、Bio-kine Analysis Ver. 3.14 ソフトウェア (Bio-Logic company 製) で解析した。

【結果】結果を表 5-4 及び図 5-25 に示す。環状脂質 176 リポソームの水透過は、膨脹 (swelling), 収縮 (shrinking) のどちらも一次反応で進行した。その粒径

変化の半減期 $t_{1/2}$ は非環状脂質 177 の約 3~4 倍であることが分かった。すなわち環状脂質 176 は非環状脂質 177 よりも水透過速度の遅いリポソームを形成することを示す。

ここでイソプレン鎖を有する脂質、すなわち 176, 177 と参考データのエステル型脂質の水透過性を比較すると興味深い知見が得られた。古細菌型脂質ではリポソームの膨脹, 収縮ともに同程度の速度で進行するが、エステル型脂質では膨脹の速度が収縮と比べて 7~8 倍速い。本実験は混合比が異なるため一概に比較は出来ないが、前節の実験から DMPC-cholesterol は古細菌型脂質よりも流動性の低い、rigid な脂質膜を形成することが分かっているが、水の流入に対してはバリアー能が働かなかった。これらのことから、直鎖状炭化水素鎖を有するエステル型脂質では膨脹に伴う、脂質膜分子間隔の広がりを埋め合わせることができず、水の流入が容易に進行したと考えられる。一方、古細菌型脂質では分子間隔の広がりを嵩高いイソプレン鎖で補うことが出来るため、水の流入に対しても高いバリアー能を示すことが出来たのだろう。

	Swelling			Shrinking		
	d_{av} (SD) (nm)	k (sec ⁻¹)	$t_{1/2}$ (msec)	d_{av} (SD) (nm)	k (sec ⁻¹)	$t_{1/2}$ (msec)
176	179 (narrow)	3.0 ± 0.1	228.0 ± 9.0	181 (39)	2.0 ± 0.1	351.9 ± 3.6
177	193 (52)	10.2 ± 0.3	68.1 ± 1.7	178 (47)	7.0 ± 0.1	99.0 ± 1.1
《参考データ》						
DMPC	234 (52)	49.5	14	220 (43)	6.3	110
DMPC- cholesterol	253 (66)	23	~30	220 (46)	3.3	210

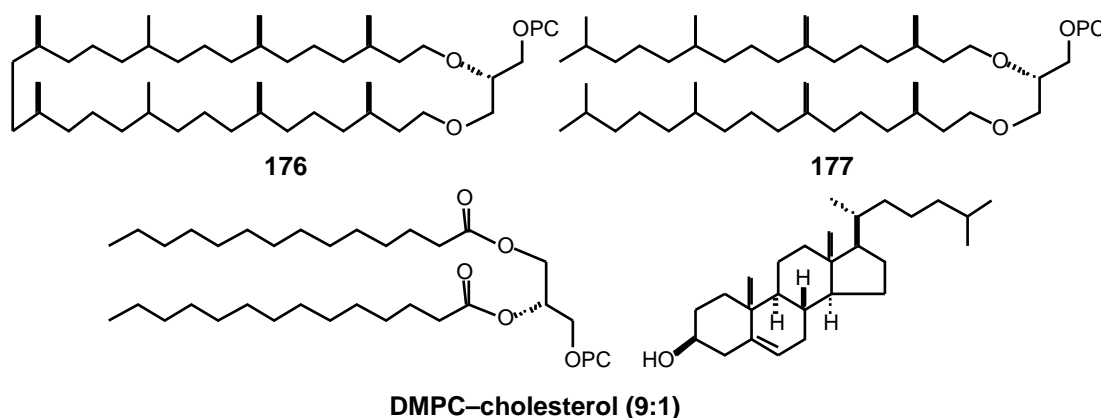


Table 5-4 浸透圧応答の結果

以上、水透過性の測定から、環状脂質 176 は、その非環状脂質 177 と比べて水透過速度の遅いリポソームを形成することが見出された。さらにエステル型脂質との比較から、古細菌型脂質はその嵩高いイソプレレン鎖により分子間隔の広がりを補償することが出来たと考えられる。これらのことより古細菌環状脂質が浸透圧変化に高い抵抗性を示す脂質膜を形成することを明らかに出来た。

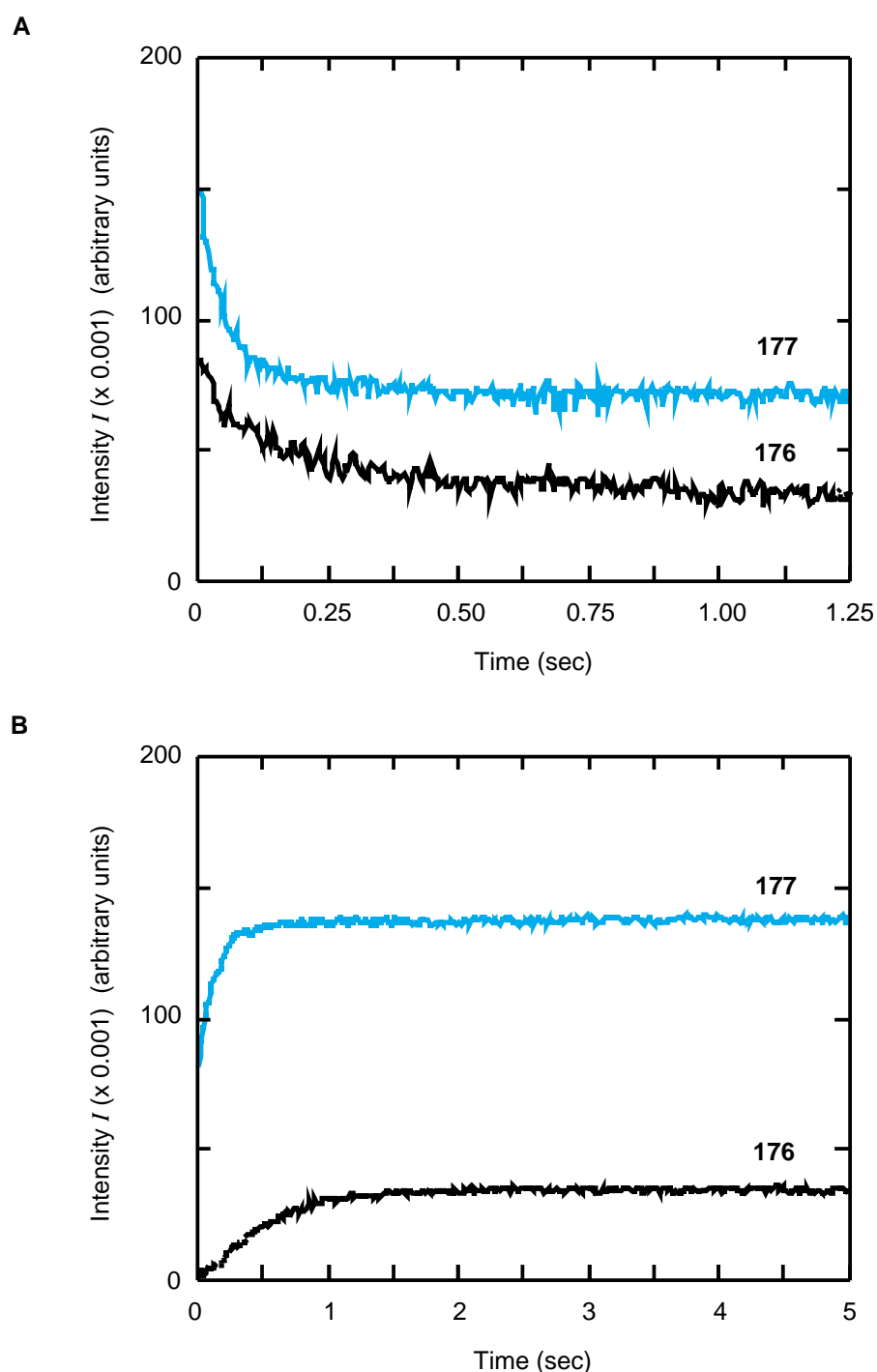


Figure 5-25 古細菌型脂質リポソームの浸透圧応答 A) swelling , B) shrinking

5-3-7 リポソームのプロトン透過性^{15f,47,73)}

小型の水溶性物質である 6-カルボキシフルオレセイン (CF) (図 5-26) は 490 nm 付近に励起波長を、520 nm 付近に蛍光波長をもつ蛍光色素である。これは低濃度でも蛍光を検出可能なだけでなく、pH 感受性であり、また高濃度では自己消光 (self-quenching) という現象を生じ、蛍光を発しないという性質ももっている。そこで CF をリポソーム内水相に封入したリポソームを調製し、リポソームのプロトン透過性、熱安定性の評価を行った。

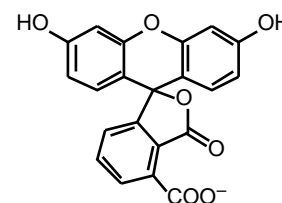


Figure 5-26 CFの構造

【原理】CF は pH 感受性であり、pH が低下するにつれてその蛍光強度も減少する (図 5-27)^{73a)}。そこでこの性質を利用し、リポソームのイオン透過性について検討した。模式図を図 5-28 に示す。pH 7-8 付近で調製したリポソーム分散液を酸性緩衝液に浸すとリポソーム内にプロトンが流入する。その結果内水相に封入された CF の蛍光強度が減少するので、その減少の割合を見積もることによりリポソームのプロトン透過性を検討した。

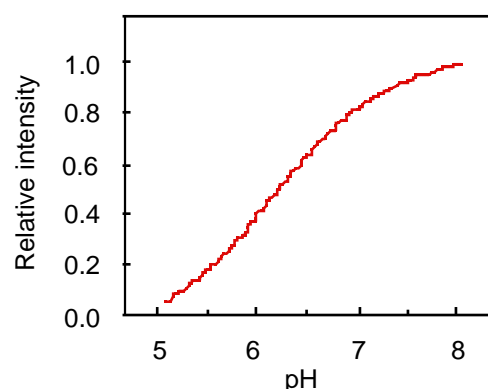


Figure 5-27 蛍光強度と pH との関係

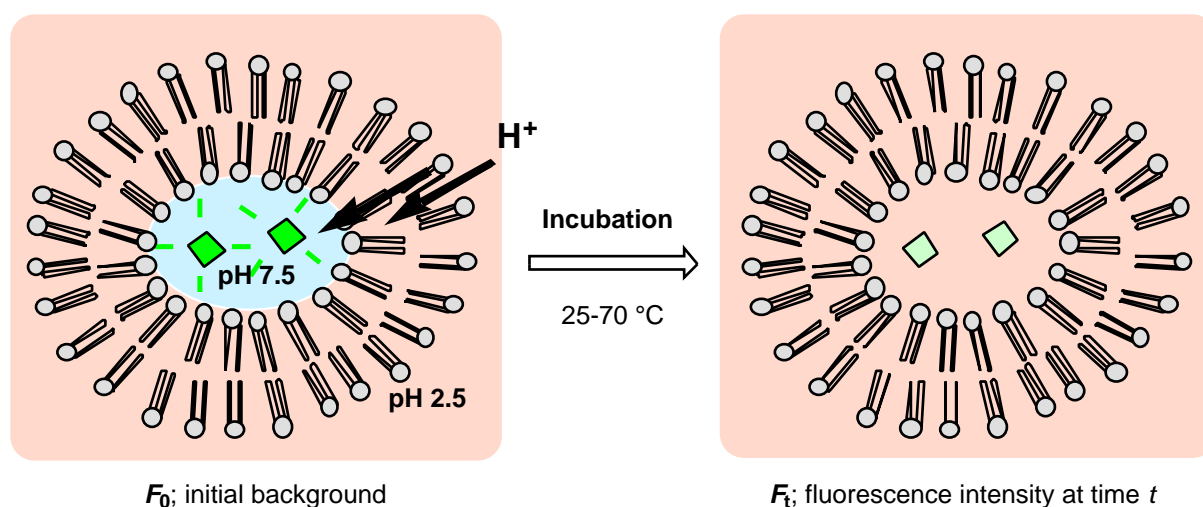


Figure 5-28 リポソームのプロトン透過性測定の様式図

【実験】脂質 3~4 mg に 1 ml の CF 含有緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, 4 mM CF, pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液は現段階では外水相にも CF を含んでいるため、セファデックス G-50 (1.5 x 30~45 cm) 担体を用い、緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, pH 7.5) で溶出してゲル濾過をし、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 ml の酸性緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, pH 2.5) 中に CF 含有 LUV 懸濁液 (20 μl) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を逐次測定した (励起波長; 480 nm, 蛍光波長; 520 nm)。このとき得られる蛍光強度相対比 F_t/F_0 の減少割合はプロトン透過速度を示す。すなわち F_t/F_0 の減少率が高ければプロトン透過速度の高いリポソームであるといえる。

測定したサンプルは 36 員環リン脂質 **176** , 非環状リン脂質 **177** , DMPC-cholesterol (2:1) , 及び eggPC の計 4 種類であり、25, 40, 50, 60, 70 °C で測定した。

【結果】各温度での測定結果を図 5-29,30,31,32,33 に示す。リポソームへのプロトン透過は非常に速く、数分以内で平衡に達した。

まず古細菌型脂質の比較で、環状脂質 **176** は非環状脂質 **177** と比べてあらゆる温度で F_t/F_0 の減少率が小さい、すなわちプロトン透過速度が遅いリポソームを形成することが分かった。DMPC-cholesterol は特に低温・中温領域において、プロトン流入に強い抵抗性を示した。高温領域 (>60 °C) では **176** 及び DMPC-cholesterol とともに瞬間的にプロトン流入が進行した。

また **177** は eggPC リポソームに匹敵するプロトン透過速度を有しており、この結果プロトン透過にイソプレン鎖は全く影響しないことが分かった。つまり **176** におけるプロトン流入速度の低下は純粋に環状構造によるものといえる。

プロトン透過はどのようなメカニズムで進行しているのだろうか。単純にプロトン単独で膜を透過するとは考えにくく、水分子などの担体を介して透過すると思われる。また内水相、外水相のイオン強度はほぼ同じなため、浸透圧応答によ

る影響は考えにくい。そこで水分子とプロトンとがオキソニウムイオンを形成して内水相に流入し、逆に他のイオンが水和イオンの形で外水相に流出すると考えるのが妥当であろう。4種類のリポソームの測定結果から、177とeggPCとの比較でイソプレン鎖は透過性低下に参与しないこと、及びコレステロールがプロトン透過に強い抵抗性を示すことが明らかとなった。これらのことを考え合わせると、プロトン透過性には膜流動性が大きな影響因子となっているのであろう。

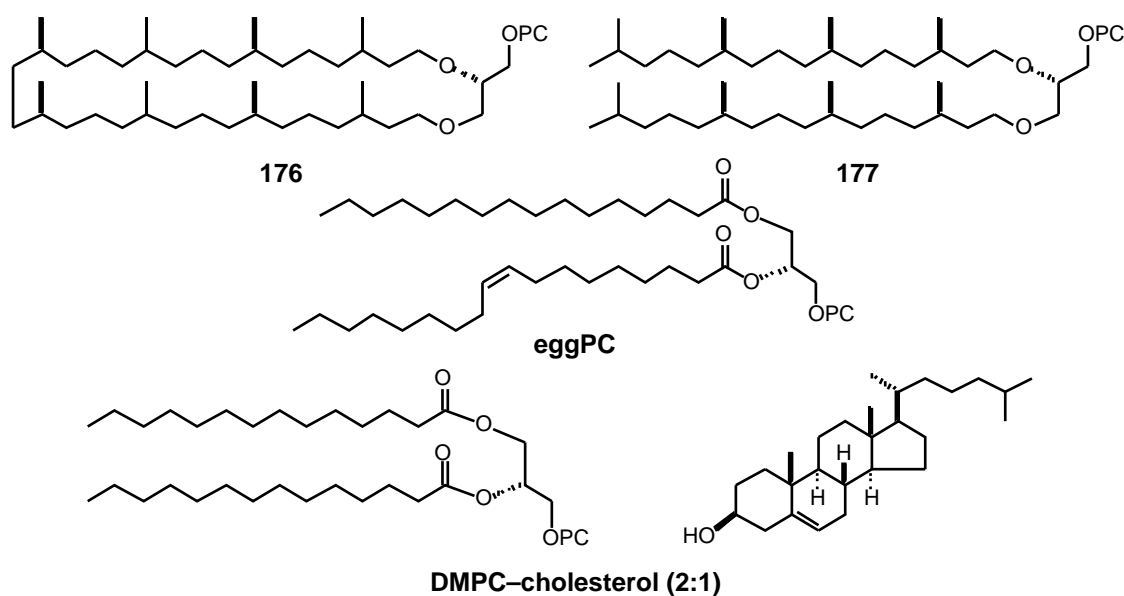
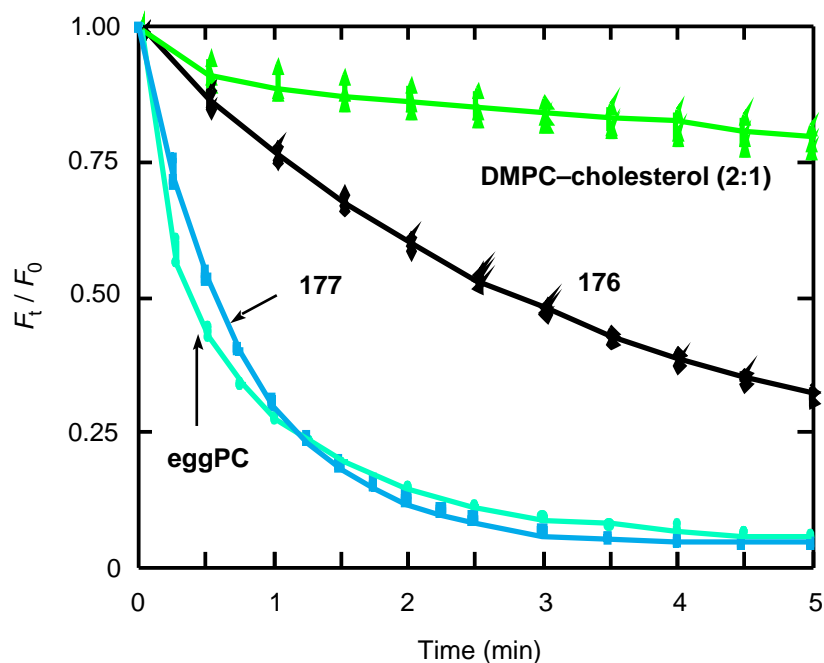


Figure 5-29 古細菌型脂質リポソームのプロトン透過性 (25 °C)

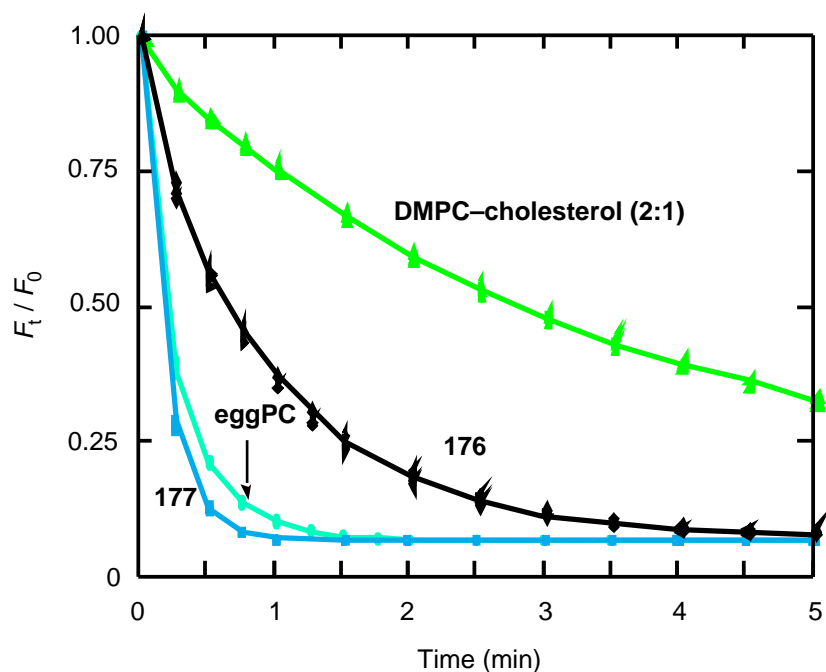


Figure 5-30 古細菌型脂質リポソームのプロトン透過性 (40 °C)

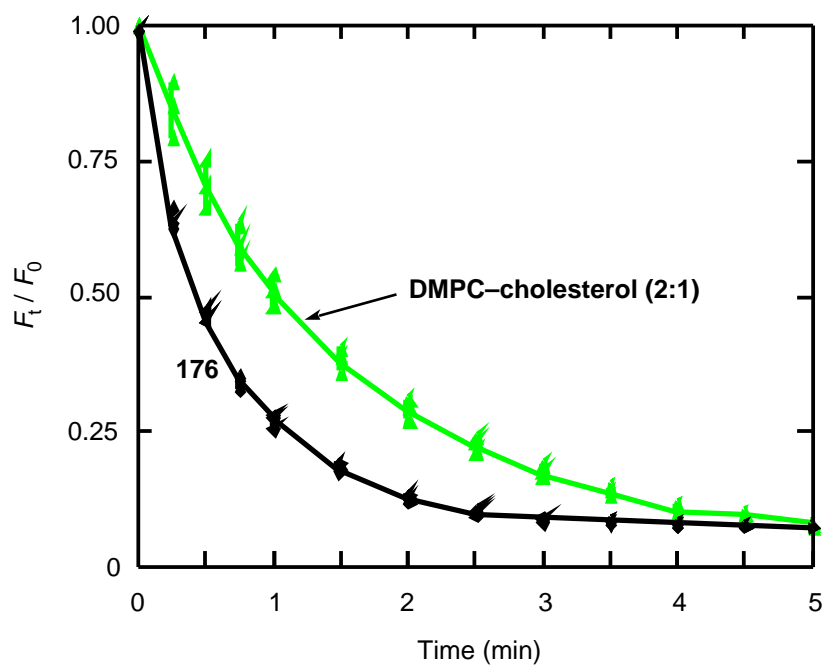


Figure 5-31 古細菌型脂質リポソームのプロトン透過性 (50 °C)

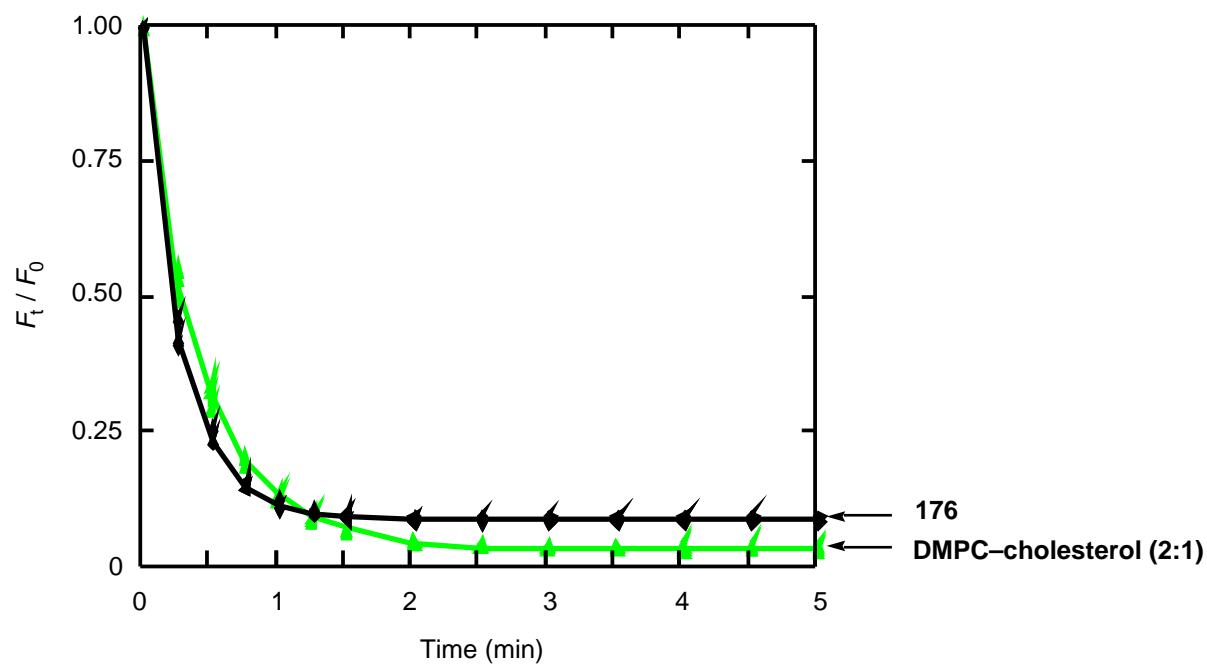


Figure 5-32 古細菌型脂質リボソームのプロトン透過性 (60 °C)

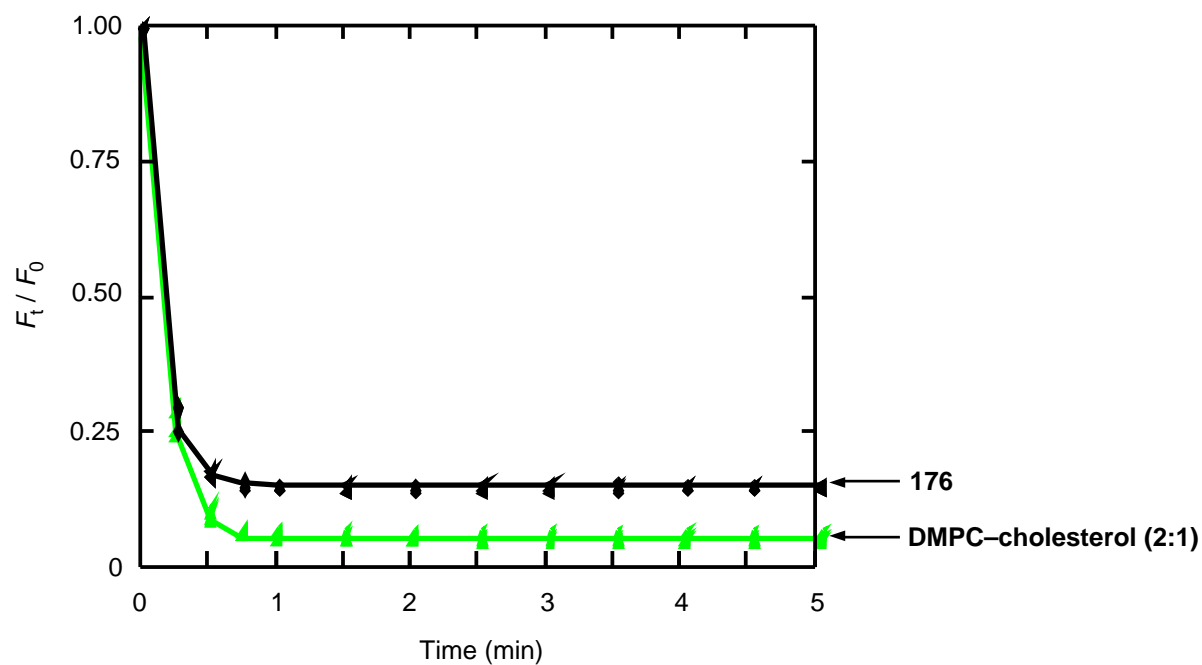


Figure 5-33 古細菌型脂質リボソームのプロトン透過性 (70 °C)

5-3-8 リポソームの熱安定性^{12d,g,14b,15,47)}

好熱性古細菌で幅広く見出される大環状脂質の、熱に対する寄与を見出すべく、リポソームの熱安定性について検討した。また本節では高度好熱性古細菌 *Methanococcus jannaschii* から抽出した極性脂質で再構成膜を形成させ、そのリポソームの熱安定性についても評価を行った。

5-3-8-1 メタン菌の培養及び極性脂質の抽出

M. jannaschii (JCM 10045) は絶対嫌気性細菌であるため、その培養も嫌気性条件で行う必要がある。そこで図 5-34 に示した装置を用いて還元銅カラムを通して完全に酸素を除去した水素 - 二酸化炭素混合ガス (4:1) でブチル栓付き血清瓶を置換し、さらに植菌などの操作も数回ガス置換したシリンジで行った⁷⁴⁾。

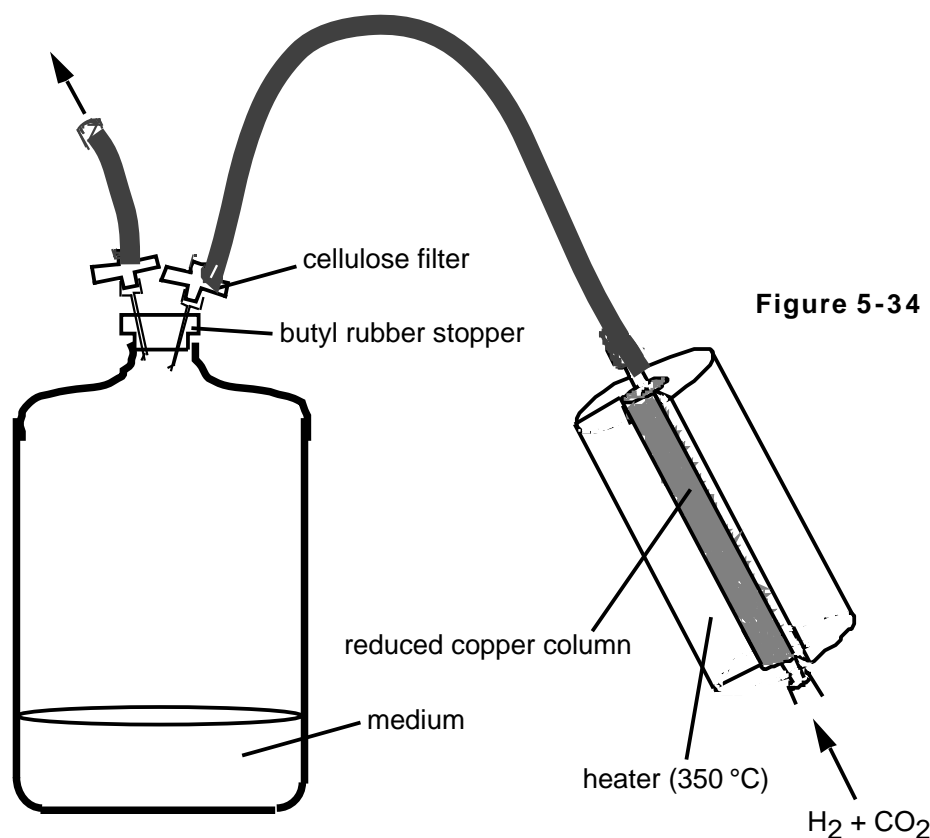


Figure 5-34 嫌気性菌の培養装置

液体培地は表 5-5 に示した成分で調製し、高压の混合ガス雰囲気下、65 °C で 5~24 時間培養した。得られた菌体をクロロホルム - メタノール - 5 % トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液 (5:10:4) で抽出^{75a)}し、残渣を 1 ml のクロロホルム - メタノール (2:1) に溶かし、20 倍の冷アセトンを加えて極性脂質を再結晶した。3 リットルの液体培地から約 4 mg の極性脂質 (Polar lipid extracts; PLE) を得た^{75b)}。

K_2HPO_4	0.14 g	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	0.01 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.14 g	trace mineral soln.	10 ml
NH_4Cl	0.25 g	vitamin soln.	10 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.4 g	resazurin	1.0 mg
$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	2.7 g	$NaHCO_3$	1.0 g
KCl	0.33 g	cysteine-HCl	0.5 g
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	0.75 mg	$Na_2S \cdot 9H_2O$	0.5 g
$Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$	0.5 mg	distilled water	
NaCl	30 g	Total volume; 1 liter	pH 6.0

Table 5-5 液体培地の成分

5-3-8-2 リポソームの熱安定性

【原理】蛍光物質はその濃度が 100 mM 以上になると自己消光で蛍光強度は著しく減少する。つまり、リポソーム内に高濃度に封入した CF が温度変化により外水相へ漏れ出してくることで希釈されてはじめて蛍光が検出されるようになるので、この性質を利用して蛍光強度を測定すれば漏出してきた蛍光物質の量を見積もることが出来る (図 5-35)⁷⁶⁾。

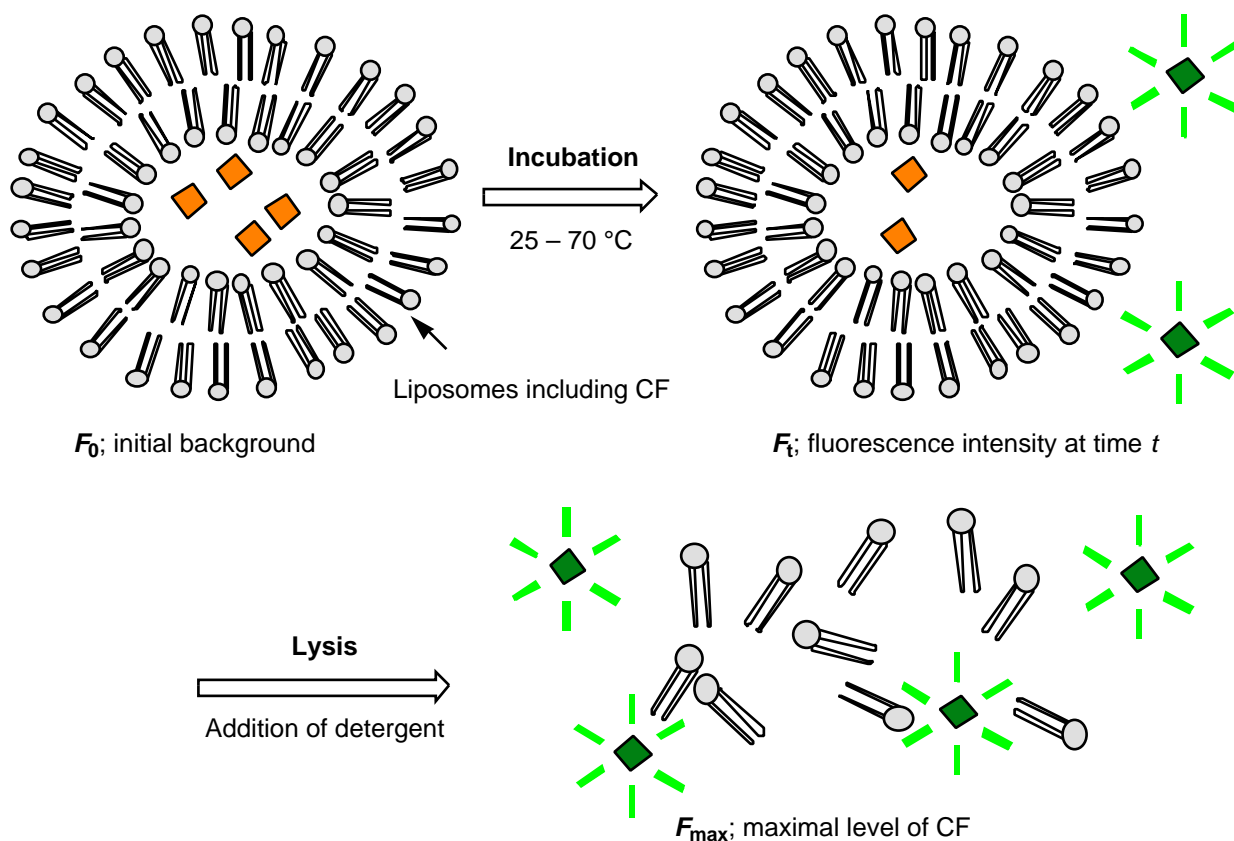


Figure 5-35 リポソームの熱安定性測定の様式図

【実験】脂質 3~4 mg に 1 ml の CF 含有緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 200 mM CF, pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液に対しセファデックス G-50 (1.5 x 30~45 cm) 担体を用い、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5) で溶出してゲル濾過を行い、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 ml の同じ緩衝液中に CF 含有 LUV 懸濁液 (5~20 μ l) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を逐次測定した (励起波長; 480nm, 蛍光波長; 520nm)。一定時間測定した後、非イオン性界面活性剤 10% Triton X-100 を 10 μ l 加え、蛍光物質の全強度 F_{\max} を測定した。リポソームからの CF の漏出量は式 5-6 から算出できる。

$$\text{Leakage extent of CF [\%]} = (F_t - F_0) / (F_{\max} - F_0) \times 100 \quad (\text{式 5-6})$$

測定したサンプルは 36 員環リン脂質 **176** , 非環状リン脂質 **177** , DMPC-cholesterol (2:1) , eggPC , **176** と 36 員環リン脂質 **178** との混合物 (1:1) , **177** と非環状リン脂質 **179** との混合物 (9:1) , **176** と **177** との混合物 (1:1) , 天然極性脂質 PLE の計 8 種類であり、各々 40, 50, 60, 70 $^{\circ}$ C で測定した。

【結果】各温度における測定結果を図 5-36,37,38,39 に示す。

まず古細菌型リン脂質の比較で、環状脂質 **176** は非環状脂質 **177** と比べてあらゆる温度で蛍光物質の漏出量が少ない、物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。一方、エステル型脂質において、eggPC は測定サンプル中で最も蛍光物質の漏出速度が高いことが分かった。コレステロールで膜を補強した DMPC-cholesterol リポソームは中温領域では非常に高いバリアー能を有していたが、高温になるにつれて蛍光物質の漏出速度が上昇し、**176** よりも物質保持能は低下した。グラフから考察すると、**176** は DMPC-cholesterol と比べて、温度変化による漏出速度の変化量が小さく、高温でも高バリアー能リポソームを形成することが示唆された。古細菌型脂質は中温領域でも測定初期に若干 CF を放出するのだが、これは古細菌型脂質リポソームの高い膜流動性により放出されたものであろうと考えている。

物質保持能に対するイソプレノ鎖の効果に関しては、予測とは異なった結果が

得られた。非環状脂質 177 の物質保持能が高くなく、高温領域では eggPC と同程度のバリアー能しか示さないことが分かった。すなわちリポソームの熱安定性にはイソプレン鎖は関与していないと考えられる。Yamauchi ら^{12b)} 及び Nishikawa ら^{12g)} は、フィタニル基を有した脂質からなるリポソームは高温でも物質保持能に優れていると報告している。一方、好熱好酸菌から抽出した極性脂質の再構成リポソームの性質について研究している Elferink らのグループ¹⁵⁾ は、リポソームの安定性にフィタニル基はさほど重要ではないと報告している。これらのグループ及び本研究の間で決定的に異なる点としては、前者の 2 グループがリポソーム粒径を揃えていないのに対し、後者のグループ及び本研究ではエクストルーダーで 200 nm にサイジング処理をしている点が挙げられる。また前者の 2 グループにおいて、177 の比較対象物質が eggPC や DPPC のエステル型脂質であったことも解釈に影響を及ぼしたと考えられる。

176 と 177 との混合物 (1:1) の物質保持能は、ほぼ 176 と 177 の中間の性質を示した。このことは、物質保持能に重要な因子が環状構造であることを強く示唆する結果であった。

糖脂質リポソームの物質保持能であるが、前節でも述べたとおり、糖脂質単独ではリポソームの形成が困難であったため測定できなかった。そこで対応するリン脂質と混合して分散させたところ、リポソーム形成能は低いものの CF 含有リポソームを得ることが出来た。176 と 178 との混合物 (1:1), 177 と 179 との混合物 (9:1) からなるリポソームは、両者とも各々 176, 177 単独からなるものと比べて熱安定性に富んだりリポソームを形成することが分かった。このことは極性基も膜の性質に影響を与えることを示すものであり、さらに高度好熱性メタン菌で糖脂質が多く含まれている理由への解答の一つになるとも考えられる。糖脂質の混合比が環状脂質、非環状脂質で大きく異なっているのは、非環状脂質で 1:1 に混合したときはリポソームを形成しなかったためである。非環状脂質ではリン脂質の比率を 90 % にあげたところリポソームを形成した。環状脂質、非環状脂質でのリポソーム形成能の違いは、疎水部・親水部のバランスによるものと考えられるが、環状脂質の性質を考える上で興味深い知見である。

また 36 員環脂質を有する高度好熱性メタン生成細菌 *M. jannaschii* から抽出し

た極性脂質の再構成リポソームは、高温領域でも非常に安定なものであることが分かった。これは 72 員環テトラエーテル型脂質を含むため一概にはいえないが、36 員環ジエーテル型大環状脂質が菌体の生体膜の安定化に役立っていることを示すものである。

以上本測定から、環状脂質は非環状脂質と比べて非常に物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。また、高温ではコレステロールで補強したリポソームをも凌駕するバリアー能を有することも見出すことが出来た。さらにリポソームの物質保持能にはイソプレン鎖はあまり重要でなく、また極性基の違いも熱安定性・リポソーム形成能に影響を与えることも分かった。再構成膜も非常に熱安定性に富んでいたことより、大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に寄与していることを明らかにすることが出来た。

	Leakage extent of CF after 5 hr (%)			
	40 °C	50 °C	60 °C	70 °C
176	14.4	32.6	43.4	75.9
177	31.2	83.5	94	100
176 + 178	8.87	9.68	35.7	53.2
177 + 179	34.1	61.6	93.3	97.7
176 + 177	25.4	36.9	64.1	89.6
PLE	7.99	11.8	23.0	40.6
DMPC- cholesterol	<1	10.6	54.5	95.9
eggPC	66.5	98.7	100	100

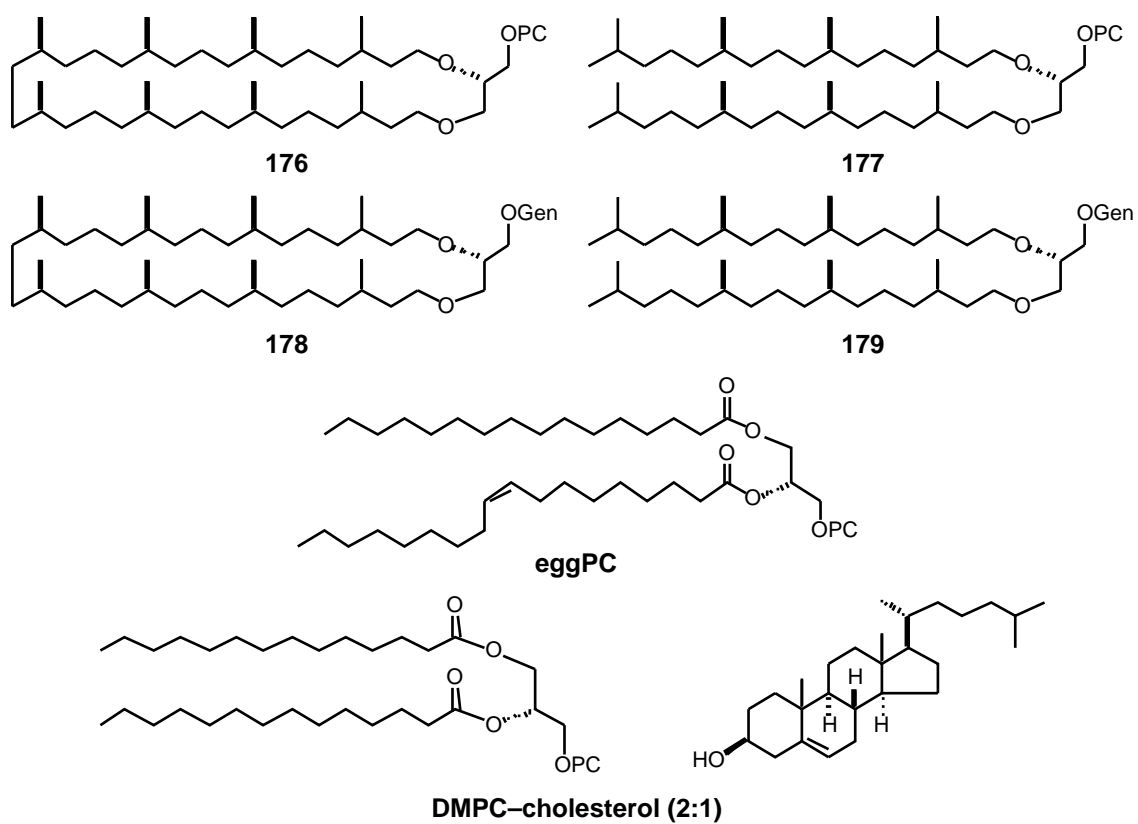


Table 5-6 リポソームの物質保持能

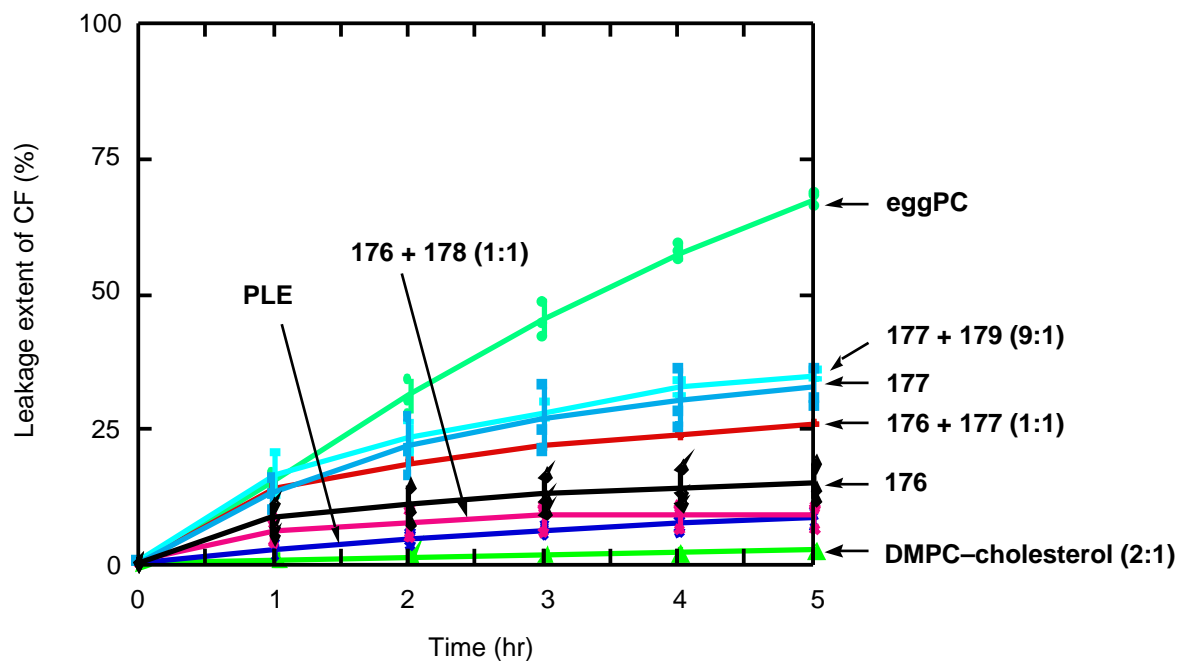


Figure 5-36 古細菌型脂質リポソームの熱安定性 (40 °C)

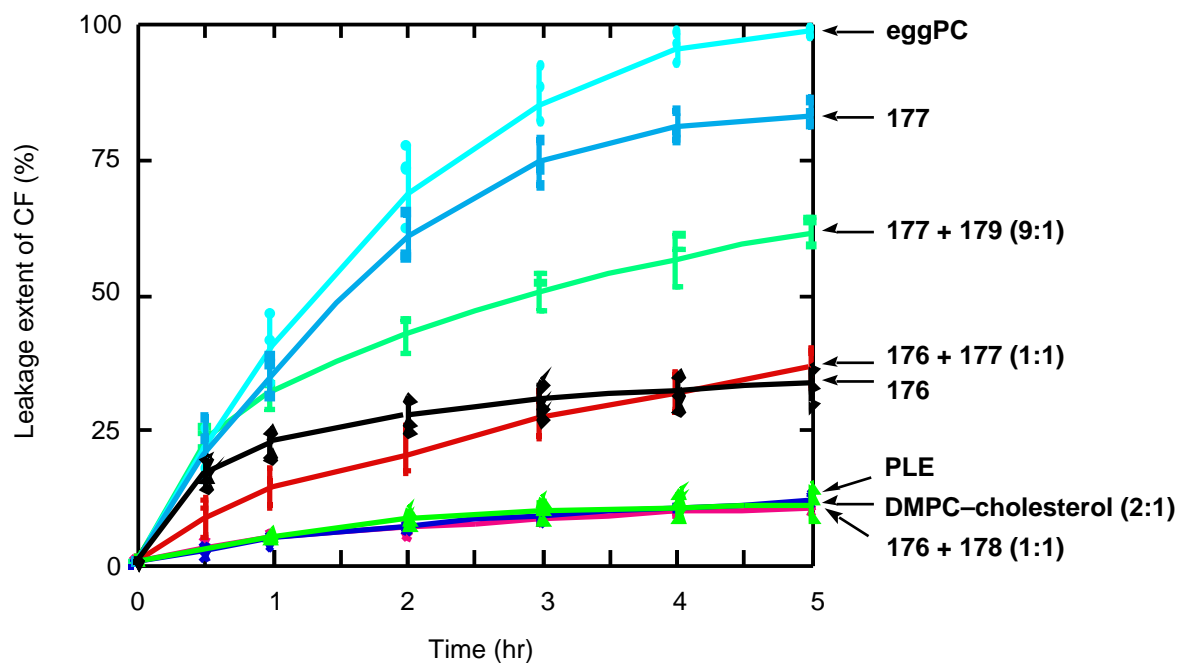


Figure 5-37 古細菌型脂質リポソームの熱安定性 (50 °C)

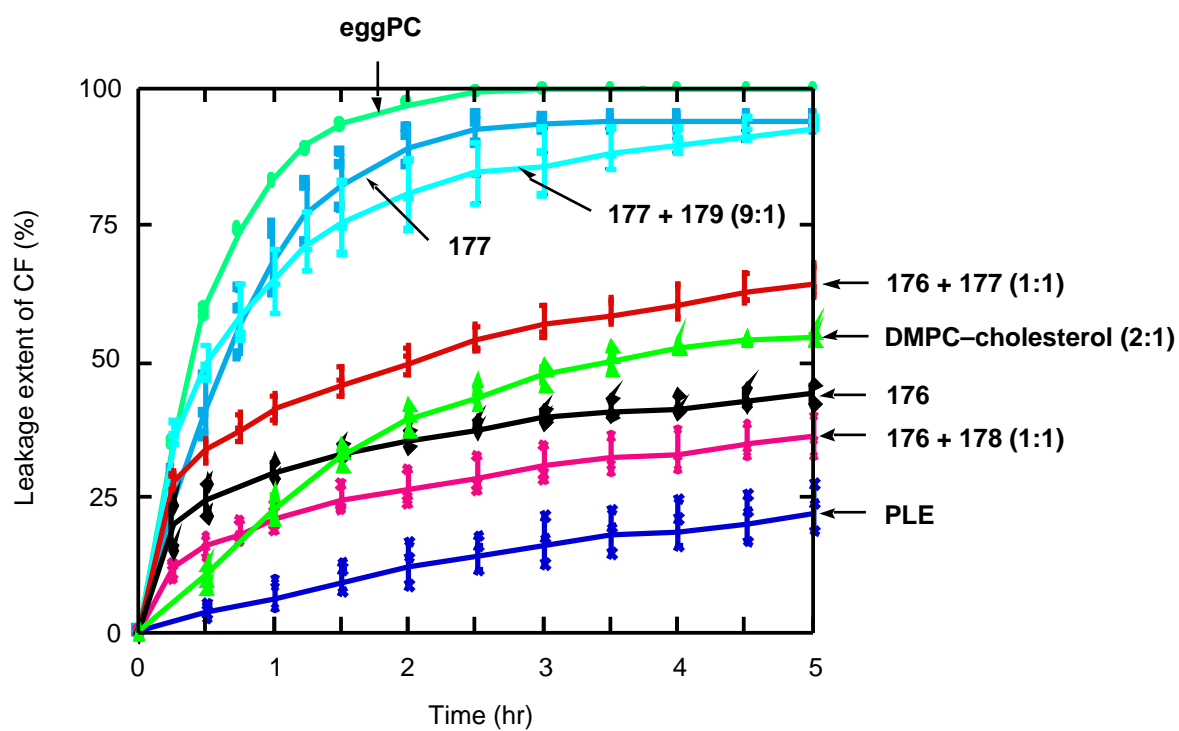


Figure 5-38 古細菌型脂質リポソームの熱安定性 (60 °C)

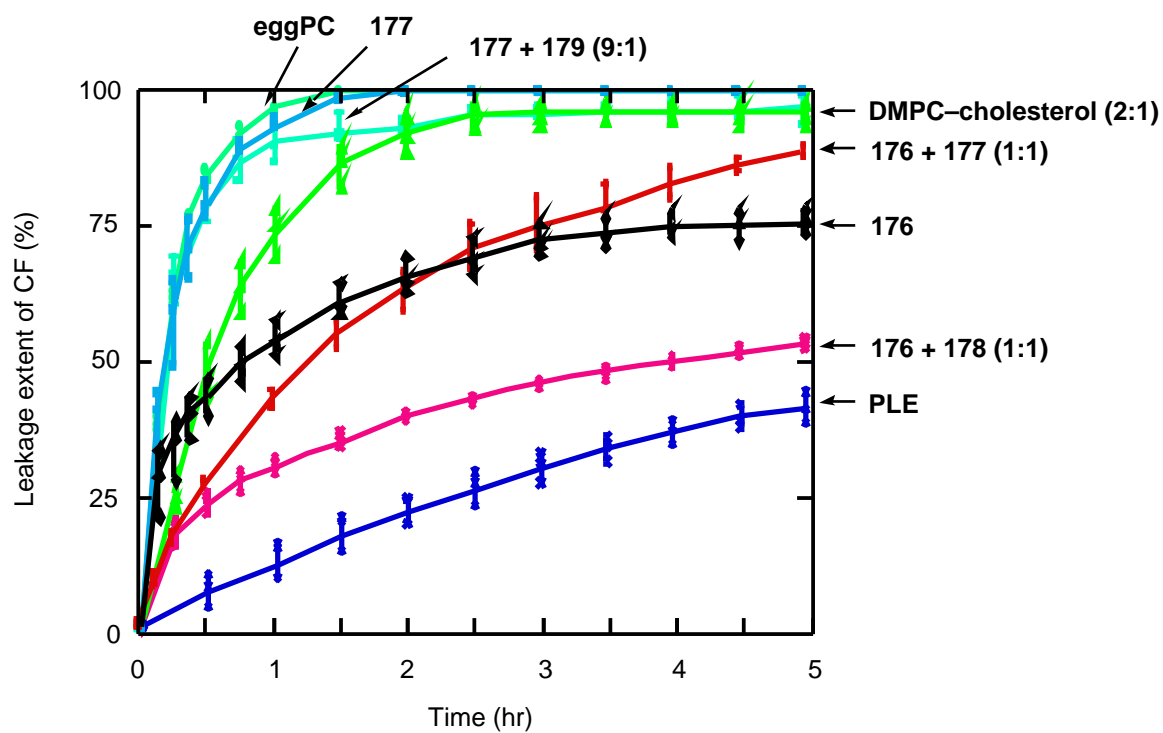


Figure 5-39 古細菌型脂質リポソームの熱安定性 (70 °C)

5-4 まとめ

古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質について得られた知見を総合すると以下のようにまとめられる⁷⁷⁾。

- 1) 様々な形状に変化する、流動性に富んだりリポソームの形成が観察された。
- 2) リン脂質の相転移温度は $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下である。
- 3) コア脂質は低温領域に相転移温度を有し、非環状脂質と比べて高い相転移温度、小さい相転移エンタルピー及びエントロピー値をとる。
- 4) 密なパッキングを有した単分子膜を形成する。
- 5) DMPC- d_{27} の運動性を低下させる。
- 6) 脂質膜の流動性が低い。
- 7) 水透過速度が遅いリポソームを形成する。
- 8) プロトン透過速度が遅いリポソームを形成する。
- 9) 高温でも安定なりポソームを形成する。

まず 1) であるが、通常のエステル型脂質ではみられないほど活発な形状変化が認められた。これはイソプレン鎖が柔軟性の高いリポソーム形成に役立っていることを示すものであり、7) の浸透圧応答にも関わる現象であると考えられる。

2),3) から古細菌型脂質は常温で液晶状態をとっていることが分かり、また 3) の傾向は第 4 章のモデル化合物分散液での知見と同じであることも分かった。

4) において、環状脂質は非環状脂質よりも密なパッキングを有していたが、それでも図 5-40 に示した DMPC-cholesterol (2:1)¹⁰⁾ や eggPC^{12f)} よりは広がりをもった単分子膜を形成していることが分かった。

	Limiting area ($\text{nm}^2/\text{molecule}$)
DMPC-cholesterol (2:1)	0.46
eggPC	0.62

Figure 5-40 DMPC-cholesterol (2:1) 及び eggPC の分子占有面積

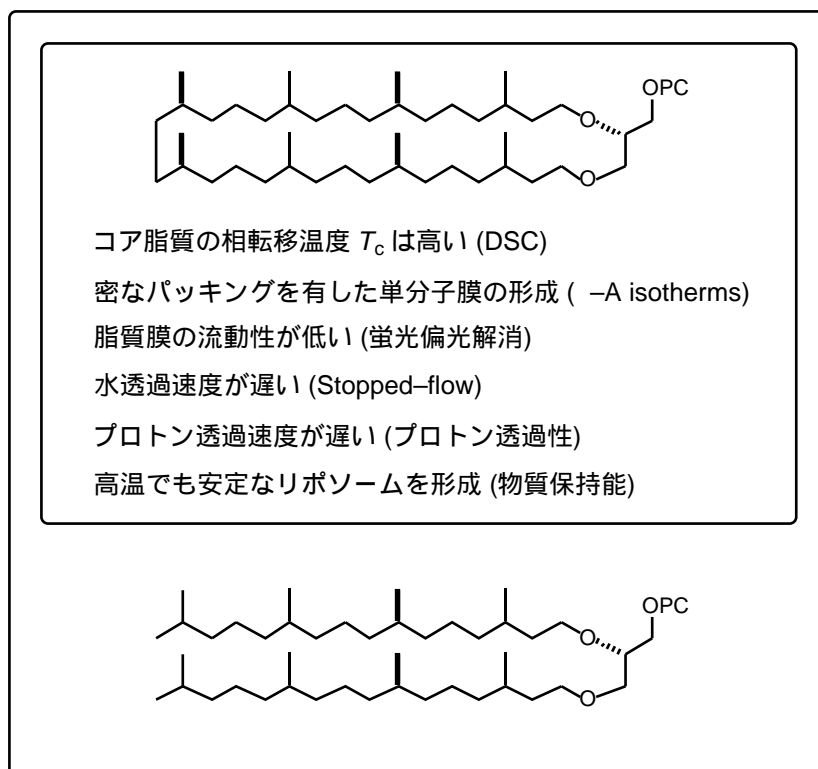
5) の運動性の低下は 3) で得られた知見、すなわちコンフォメーション変化部位の低下及び自由運動の抑制と関連しており、さらに 6) の流動性低下にも関連している。DMPC-cholesterol が最も小さい値を示し、ついで環状脂質、非環状脂質と並んでいく傾向にある。

7) の浸透圧応答、特に膨脹は今までの運動性、流動性で説明できない問題であった。これには脂質分子の柔軟さが深く関わっていると考えられる。膨脹による脂質分子間の広がりに対して、嵩高いイソプレレン鎖が space filling の役割を担っていると考えられる。

8) の結果は、イソプレレン鎖よりも環状構造及びコレステロールの存在がプロトン透過に高い抵抗性を示したことを表している。つまり 5), 6) の性質が大きく関わったものである。

9) についても 8) と同様に脂質分子の流動性、運動性が大きく関わって得られた結果であろう。しかしながら高温領域では DMPC-cholesterol よりも環状脂質の方が高いバリアー能を示していた。つまり高温では大きい分子運動により生じる脂質分子間間隔の広がりを補う、脂質分子の柔軟性がバリアー能の維持に必要となってくると考えられる。

このように古細菌 36 員環脂質は非環状脂質と比べて密なパッキングをとり、炭化水素鎖の運動性が低下することで膜流動性を低下させ、高温でも非常にバリアー能の高いリポソームを形成することを明らかにすることが出来た。このことが、大環状脂質を有した古細菌の、高温環境への適応を可能にする原動力ではないかと考えることが出来る。



流動性に富んだリポソームの形成 (光学顕微鏡)
 常温で液晶状態 (DSC)

Figure 5-41 まとめ

第6章 古細菌 72員環モデル化合物のリン脂質誘導体化及びその性質

6-1 はじめに

72員環テトラエーテル型脂質は分子の両端に極性基を有した構造をしており、それ自身で脂質二重膜に相当する一分子膜を形成しうると考えられている。図6-1のように膜貫通型コンフォメーションをとることでくさびの役割を果たし、脂質二重膜中の側方拡散(矢印)が抑制され、脂質膜の流動性の低下、物質透過性の向上が見込まれる。

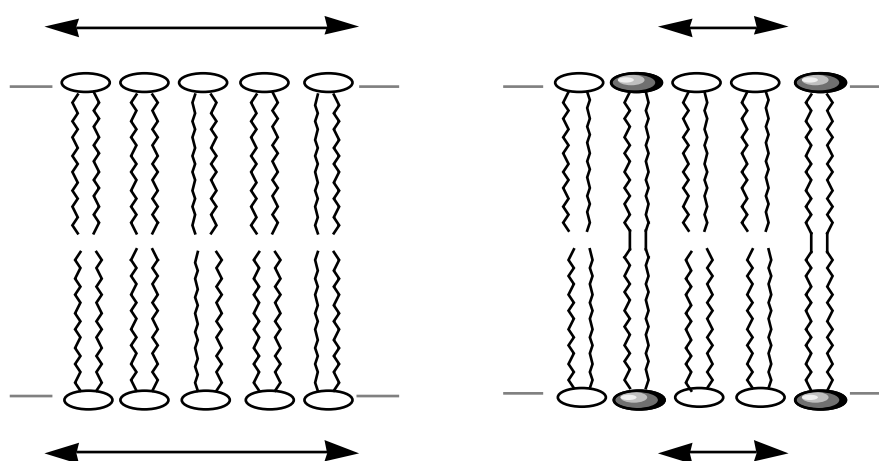
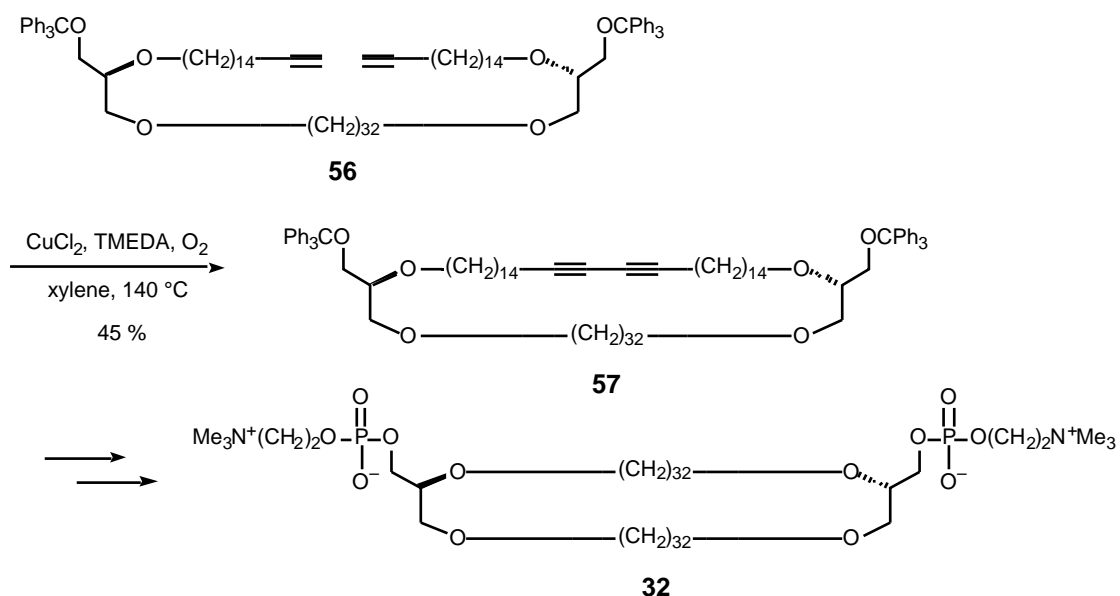


Figure 6-1 テトラエーテル脂質の"くさび作用"の模式図

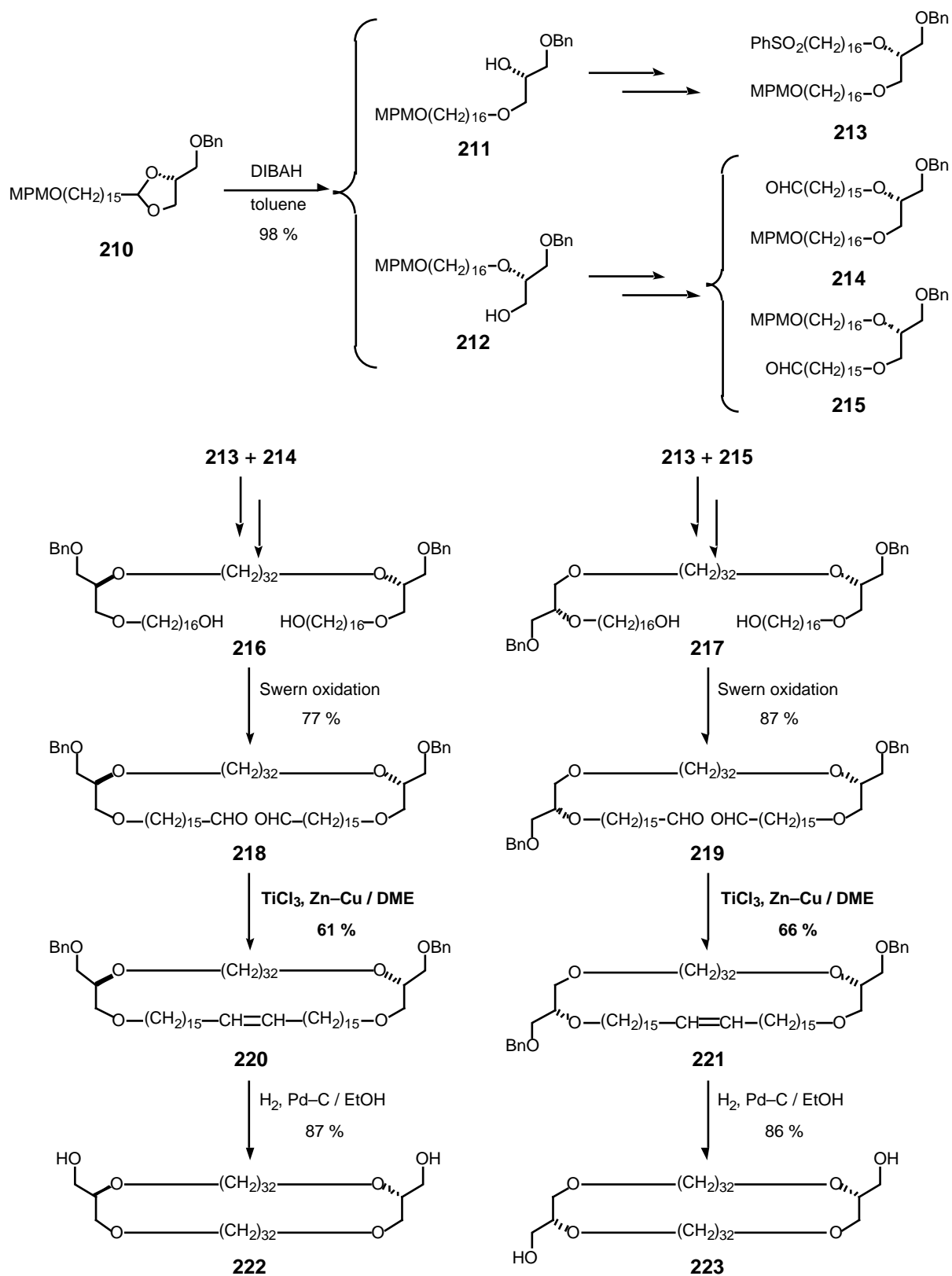
古細菌脂質で最も特徴的な構造である 72員環テトラエーテル型脂質に関する研究としては、好熱好酸菌 *Sulfolobus acidocaldarius* などから抽出した脂質の再構成膜の物性研究が行われている¹⁵⁾。しかしながらこの天然抽出物はジエーテル型脂質及びテトラエーテル型脂質(シクロペンタン環も含めて)の混合物であり、さらに極性基についても非常に多くの種類で構成されているため、必ずしも72員環テトラエーテル型脂質の性質を言い表しているとはいえない。そこで古細菌 36員環ジエーテル型脂質のときと同様に、純粋な形で72員環構造及びテトラエーテル型構造を有した化合物を入手し、その脂質膜の性質を調べることがまず先決である。

環状構造・テトラエーテル構造両者を併せ持ったモデル化合物の研究はスキーム 6-1 に示した Menger らの合成研究のみであった^{13d)}。しかしながら得られたビスホスホコリン体はあらゆる溶媒に溶解困難で、膜としての性質を検討するには至っていない。



Scheme 6-1 Menger らの 72 員環リン脂質

当研究室では天然型 72 員環テトラエーテル型脂質全合成に先立ち、直鎖状炭化水素鎖で置き換えた 72 員環テトラエーテル型モデル化合物の両位置異性体 **222**, **223** の合成を完了している (スキーム 6-2)。すなわち、16-ヒドロキシパルミチン酸および *sn*-1-*O*-ベンジルグリセロールを出発原料としてアセタール **210** へと導き、DIBAH 還元, アルキル化, 官能基変換を経てジアルキル置換グリセロール **213**, **214**, **215** を調製し、それらの適切な組み合わせで両異性体の環化前駆体であるジアルデヒド **218**, **219** を得た。そのジアルデヒドを McMurry 反応で環化し、接触還元を付すことで 72 員環モデル脂質 **222**, **223** を得ることに成功している³⁵⁾。しかしながら膜の性質を検討するのに必要不可欠な極性基の導入には至っていなかった。



Scheme 6-2 72 員環テトラエーテル型モデルコア脂質の合成

本章では 72 員環テトラエーテル型モデル化合物のリン脂質誘導体化及びその脂質膜としての性質を各種測定法で検討したことについて述べる。

6-2 リン脂質誘導体化

極性基としてはまず、本研究で主に利用したホスホコリンがジエーテル型脂質との比較を行う上で好ましいと考えられる。しかしながら Menger らの結果を考えあわせるとビスホスホコリン体は溶解性の問題から不適當である。そこでホスホコリンのような双性イオンでなく、酸性リン脂質ならばアルカリ性緩衝液に分散し得るのではないかという予測の下、極性基の検討を行った。極性基としては比較対照の調製が容易で、かつ比較的簡便に誘導できると考えられるリン酸エステルとし、**224**, **225** の合成を行った。⁷²員環テトラエーテル型モデルリン脂質の、環状構造の性質をよりよく理解するために非環状テトラエーテル型モデルリン脂質 **226**, **227** の合成も行った (図 6-2)。

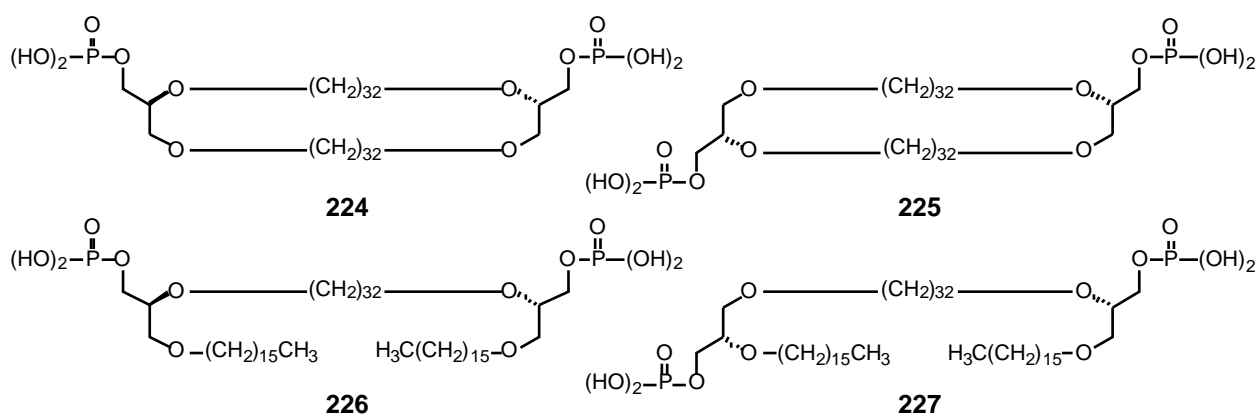


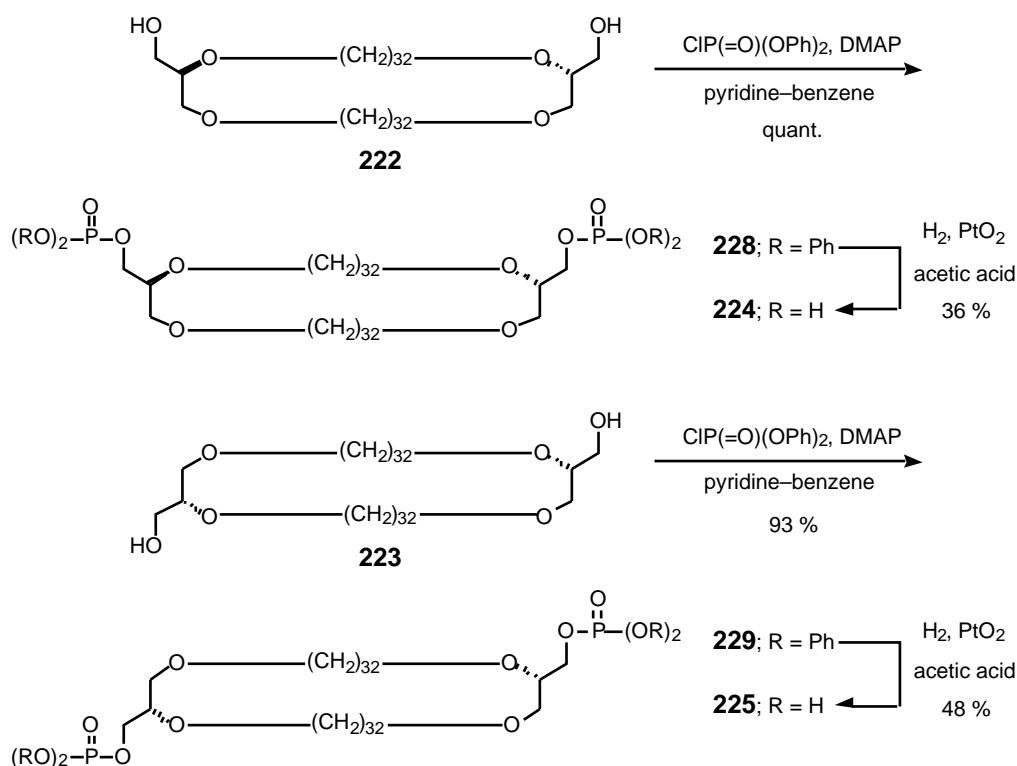
Figure 6-2 合成ターゲット

⁷²員環モデル化合物は室温の有機溶媒に対して著しく溶解性が乏しいため、加熱して反応を行う必要がある。つまりそのような温度でも安定なリン酸化試薬の選択が重要である。そこでリン酸化試薬として、熱に安定なジフェニルリン酸クロリドを用いることとした⁷⁸⁾。合成経路をスキーム 6-3 に示す。⁷²員環モデル化合物 **220** および約 5 当量の DMAP をベンゼン - ピリジン混合液中に加え、室温で約 20 当量のジフェニルリン酸クロリドを加えた。その後 60 °C で 80 時間程反応させると目的のビスリン酸トリエステル **228** が定量的に得られた。構造の確認は ¹H-NMR において *sn*-1 位のメチレンプロトンの低磁場シフト (約 3.6 ppm 約 4.3 ppm) およびフェニル基のピーク (約 7.3 ppm) が確認されたこと、¹³C-NMR において *sn*-2 位のシグナルのリンとのカップリング (約 77 ppm,

$J = 8.0$ Hz) およびフェニル基のピーク (約 120~130, 150 ppm) が確認されたこと、 ^{31}P -NMR においてシグナル (約 -12 ppm) が確認されたことおよび元素分析等を行った。

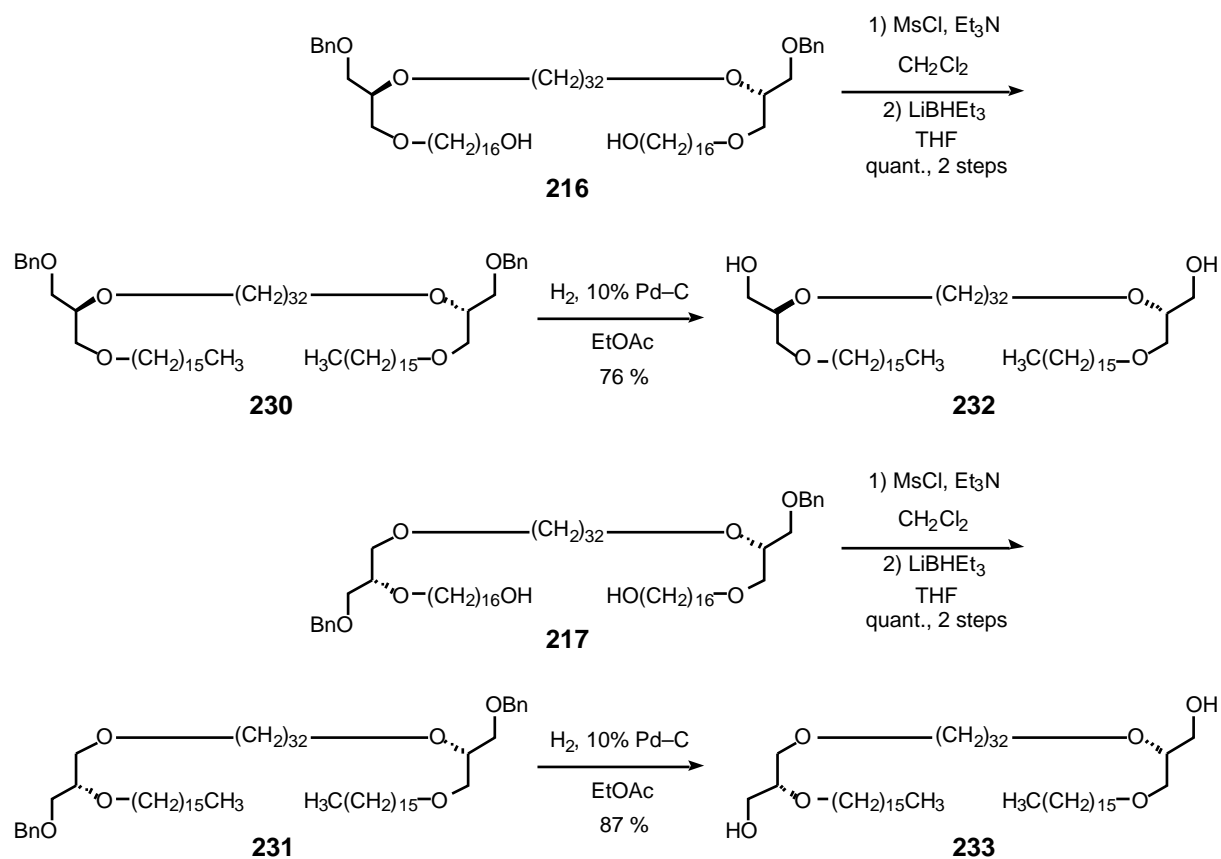
このビスリン酸トリエステル **228** の保護基を酢酸中、白金触媒による接触還元で除去を試みたところ、再結晶により 36% という収率ながらビスリン酸エステル **224** が得られた。このリン脂質は熱クロロホルムに溶解するので NMR 測定が可能であり、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR におけるフェニル基のピークの消失、 ^{31}P -NMR におけるリン酸のシグナルの低磁場シフト (約 -12 ppm 約 1.8 ppm)、および元素分析の結果などからこの構造を確認した。

また、その異性体 **223** についても同様の操作で **225** へと変換できた。

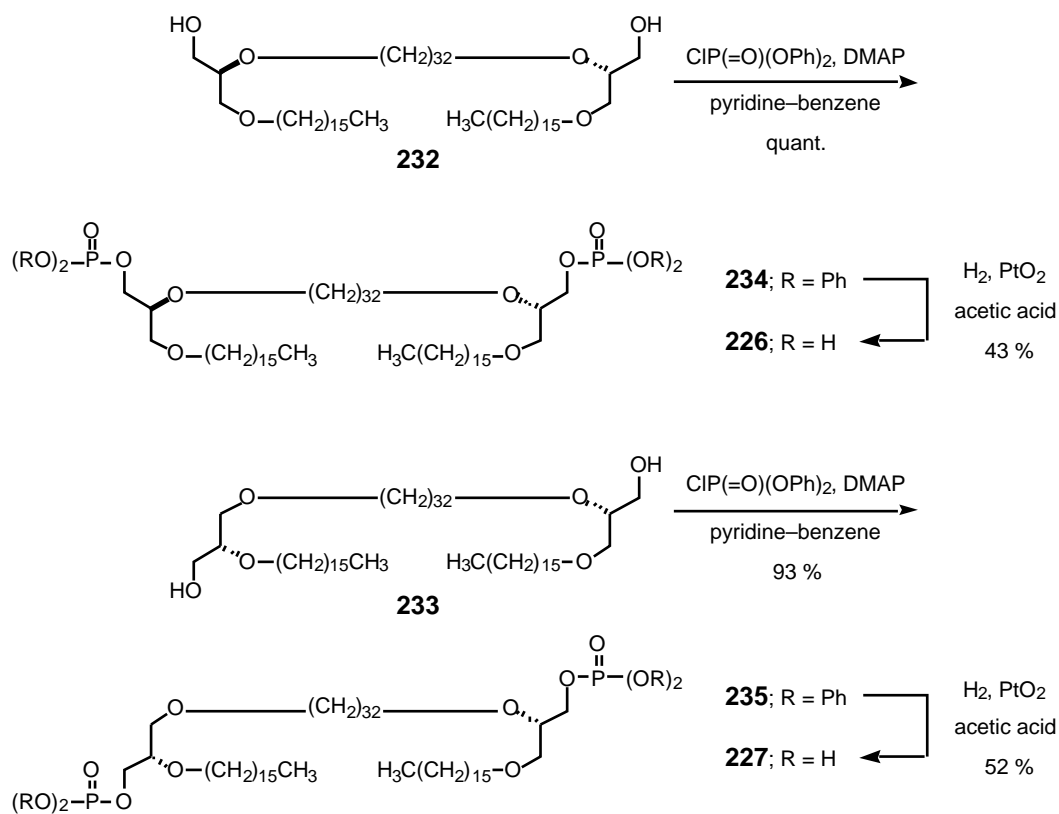


Scheme 6-3 72 員環テトラエーテルモデルリン脂質の合成

非環状テトラエーテル型モデルリン脂質 **226**, **227** の合成は、72 員環モデル合成の合成中間体であるジオール **216**, **217** を変換させることで得ることにした。すなわち水酸基を還元的に除去し、続く接触還元でジオール **232**, **233** とした (スキーム 6-4)。極性基の導入は **224**, **225** の合成と同様の手法で行い、非環状テトラエーテル型モデルリン脂質 **226**, **227** を得た (スキーム 6-5)。



Scheme 6-4 非環状テトラエーテルモデルコア脂質の合成



Scheme 6-5 非環状テトラエーテルモデルリン脂質の合成

6-3 脂質膜の性質

合成した 72 員環リン脂質の性質を 1) 熱分析 (DSC), 2) 分散液の ^{31}P -NMR, 3) 電子顕微鏡観察で分析した。

6-3-1 熱分析 (DSC)

【実験】計 4 種のモデル脂質を各々秤量 (*ca.* 7 mg) し、エチレングリコール (*ca.* 50 mg) とともにアルミニウム製パンに入れ、1 回室温から 130 °C まで昇温, 降温を行った。その後 50 °C から 130 °C まで、2 °C/min の速度で走査した。

【結果】72 員環モデルリン脂質 224, 225 およびそれらの非環状脂質 226, 227 の結果を図 6-3 に示す。対応するジエーテル型モデルリン脂質 183, 184 の熱力学的パラメーターも併せて示す。

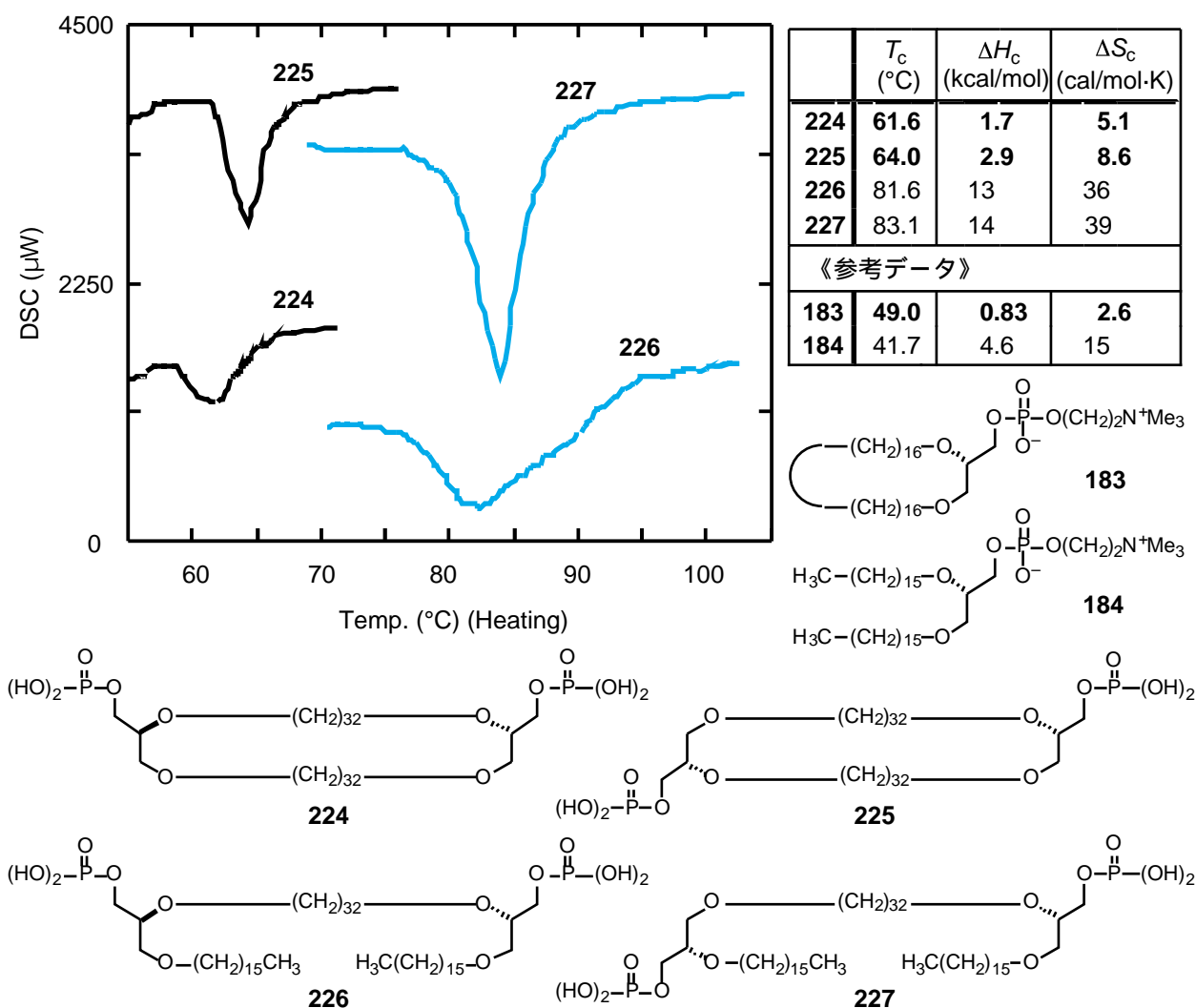


Figure 6-3 テトラエーテルモデルリン脂質の DSC 曲線

まず、相転移温度 (T_c) であるが、環状脂質 224, 225 は対応する非環状脂質 226, 227 と比較して T_c が約 20 °C 低くなっていた。興味深いことに、これはジエーテル型脂質で得られた知見とは正反対である。すなわち環状ジエーテル型脂質は非環状ジエーテル型脂質と比べて T_c が 8 °C 高い値を示し、このことは Menger らの結果^{13b)}、及び第 4 章で述べたリン酸ジエステル型モデル化合物⁵⁶⁾ で得られた知見とも一致する。すでに第 4 章で考察したが、ジエーテル、ジエステル型環状脂質においては、炭化水素鎖末端が炭素 - 炭素結合により結びついて分子運動の自由度が抑制されており、その結果液晶状態をとるのにより大きな熱運動を必要としたためであろう。テトラエーテル型脂質においてもこの考察が当てはまると思われたが、結果は相反するものだった。

この理由には相転移前後の相構造が、環状脂質、非環状脂質の両方で全く異なっている可能性が考えられる。すなわち、テトラエーテル型脂質では、どちらか、もしくは両者がジエーテル、ジエステル型脂質で観測されるゲル (L) - 液晶 (L) 相転移とは異なる状態変化を起こすと思われる。実際どのような脂質集合体の形状をとっているかについては次節で述べる。

相転移エンタルピー変化 (ΔH_c)、相転移エントロピー変化 (ΔS_c) については、環状脂質 224, 225 の方が非環状脂質 226, 227 よりも小さい値であることが分かった。これはジエーテル脂質での結果と同じ傾向であった。これはすなわち環状脂質の方が、相転移の際にトランスゴーシュ変換しうる部位が少ないこと、及び炭化水素鎖の運動性が抑制されていることによる、分子運動の自由度の低下に起因しているといえる。

また、グリセロール位置異性体間 (224 と 225、及び 226 と 227) での熱力学的パラメーターに顕著な違いを見出すことは出来なかった。このことは、水に分散しうるリン脂質系でも分光学的性質のみならず、脂質集合体としての性質にも違いがみられないことを示すものであった。両異性体が物性上全く区別出来ないものであることは、実際の天然体でも生合成的に区別されず、1:1 の位置異性体混合物で存在していることとも符合する³⁸⁾。

6-3-2 分散液の ^{31}P -NMR⁷⁹⁾

脂質集合体の構造解析は、X線小角散乱で解析する方法⁸⁰⁾、直接的に電子顕微鏡で観察する方法、及び ^{31}P -NMR のスペクトルパターンで分析する方法の3通りがある。本研究では ^{31}P -NMR 及び電子顕微鏡観察を行った。まず本節で ^{31}P -NMR、次節で電子顕微鏡の測定結果について示す。

【原理】リン脂質分散液は、図 6-4 のような相構造をとると各々典型的な ^{31}P -NMR スペクトルを示す。このように、相構造によってリンの NMR スペクトルが大きく変化するのには、リンの化学シフトの異方性が他の核種に比べて著しく大きいことに起因する。化学シフトの異方性で生じる 3本のテンソル主値は分子の運動場の状態によって部分的に平均化され、図 6-4 のようなスペクトルパターンへと変化する。例えばラメラ構造では対称軸の垂直方向のテンソル主値の強度がその平行成分よりも大きいため、Aのようなパターンが得られ、ミセルや一枚膜ベシクル構造といった等方的な集合体の場合には 3本のテンソル主値が平均化されるために Cのような鋭いピークを与える。Cのシグナルを与える脂質集合体にはミセル、一枚膜ベシクルの他に逆ミセル、ロンビック、キュービック構造などがある(図 6-5)。このように等方的なシグナルを与える構造体は何種類もあり、必ずしも脂質集合体の構造を表現するとは限らないが、全体的にラメラ構造(A)、ヘキサゴナル構造(B)、等方的構造(C)、のどれをとっているかの目安を知る上では有力な手段である。

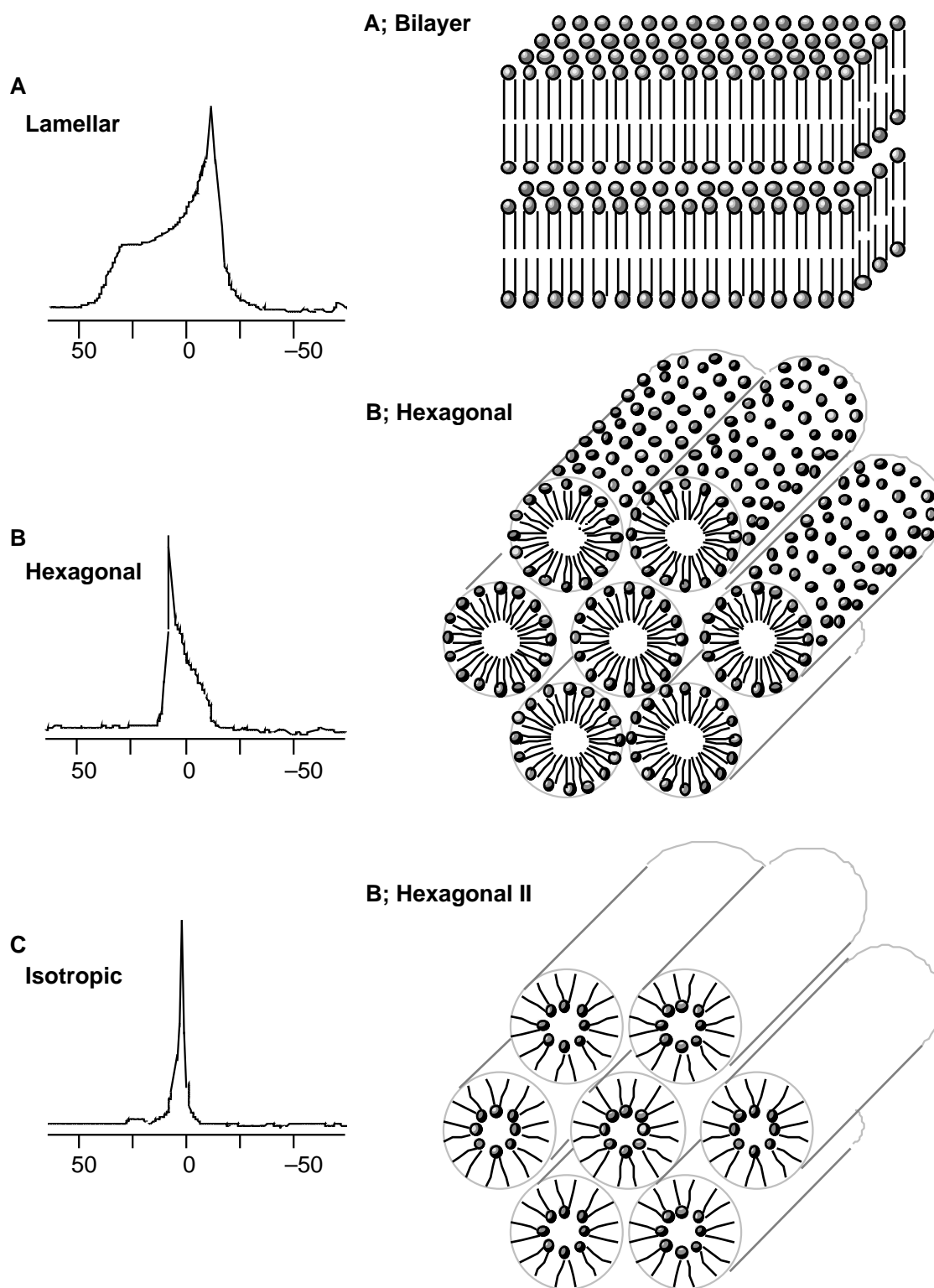


Figure 6-4 脂質分散液の³¹P-NMRと対応する相構造

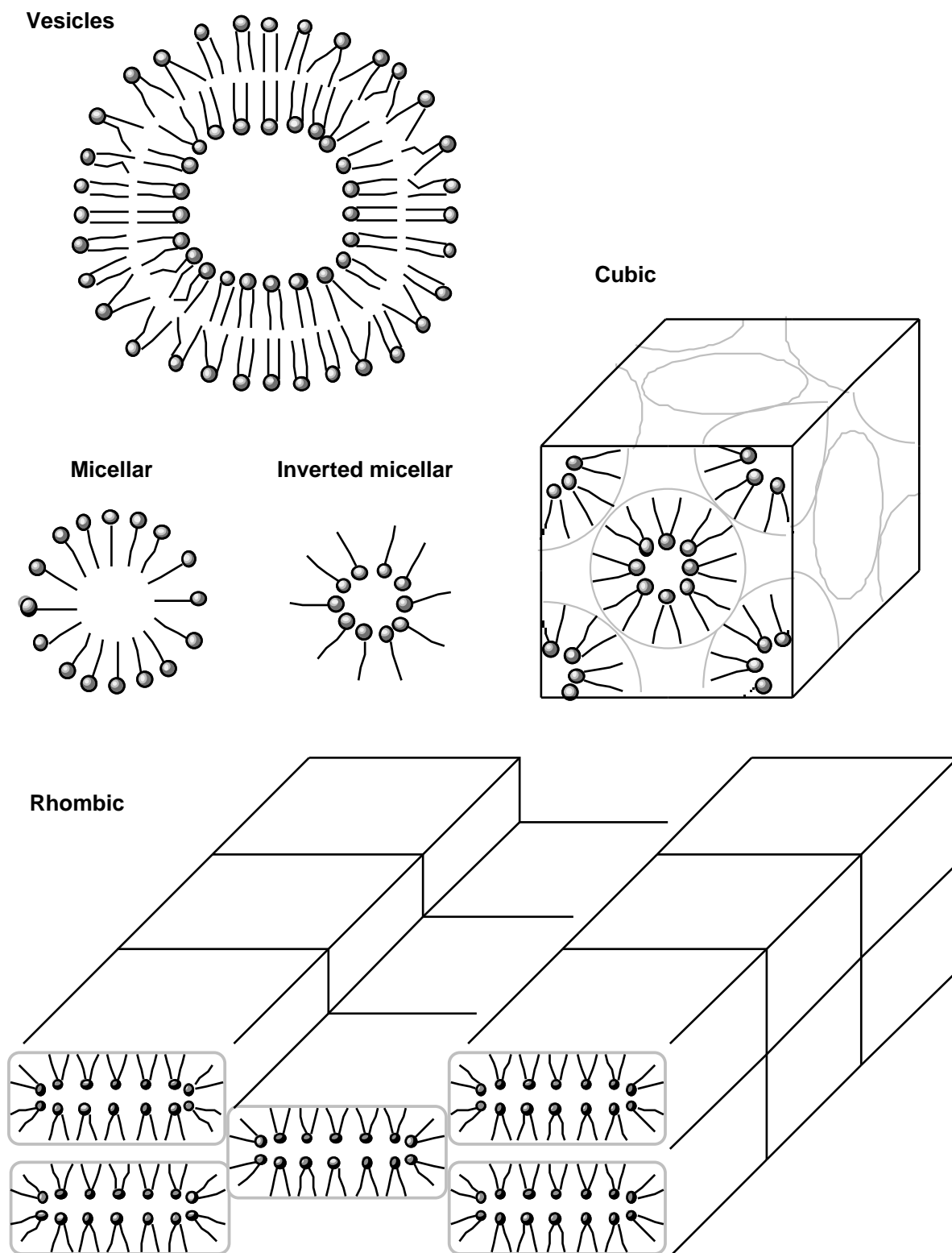


Figure 6-5 スペクトルC に相当する等方的構造

【実験】この ^{31}P -NMR を利用することによって、分子両端に極性基を有した 72 員環テトラエーテルモデルリン脂質の、水中での集合構造を吟味することとした。サンプルは凍結融解法で調製した。すなわち、脂質 10 mg にエチレングリコール (0.5 ml) を加え、 T_c 以下 (20°C) 及び T_c 以上 (224, 225 は 75°C , 226, 227 は 100°C) で 10 分間ボルテックス処理し、各々 NMR サンプルを調製した。測定もボルテックス処理と同じ温度に設定して行った。

【結果】72 員環モデルリン脂質 225 およびその非環状脂質 227 の ^{31}P -NMR スペクトルを図 6-6 に示す。それらの位置異性体 224, 226 についても、各々 225, 227 と同じ形状のスペクトルが得られた (図は省略)。

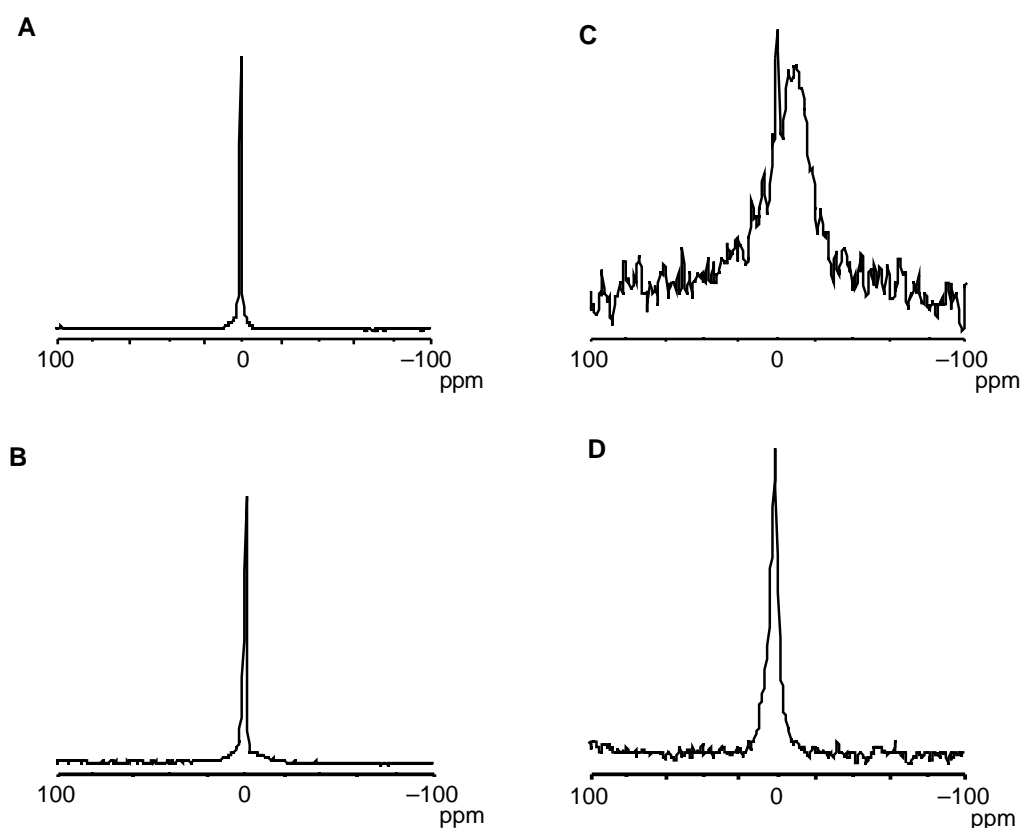


Figure 6-6 環状脂質 225 (A; 20°C , B; 75°C) 及び非環状脂質 227 (C; 20°C , D; 100°C) の ^{31}P -NMR

環状脂質では T_c 以下, T_c 以上の両者において、半値幅 150 Hz の鋭い等方的なシグナルが現れた (各々図 6-6 A, B)。この結果から、観測された相転移は、明瞭な構造変化 (ラメラ ベシクル, ラメラ ヘキサゴナルなど) に起因するものではなく、図 6-5 に示したミセル状会合体などの等方的構造体の、アルキル鎖の単純なコンフォメーション変化由来と考えられる。

一方、非環状脂質では T_c 以下で図 6-6 C のような粉末パターンが得られ、 T_c 以上では半値幅 500 Hz の等方的シグナル (図 6-6 D) を与えた。このスペクトルの形状変化は、ジエーテル型脂質の、ラメラ構造からベシクル構造へのゲル (L) - 液晶 (L) 相転移と同様の形状変化であった。

以上のことから、熱分析での予測通り、相転移における構造変化が環状脂質、非環状脂質の両方で全く異なっていることが裏付けられ、特に環状脂質はジエーテル、ジエステル型脂質で観測されるゲル (L) - 液晶 (L) 相転移とは異なる状態変化を起こしていることが分かった。

6-3-3 電子顕微鏡観察

【実験】測定法としては 4-3-2 節で紹介したネガティブ染色法を用いた。これは電子線に対して透過性の悪い、すなわち電子密度の大きい染色液で生体高分子粒子をつつみこむと粒子の方が電子線の透過がよいため、負のコントラストで現れることを示したものである。

脂質 (1 mg) に 2 ml の緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) を加え、凍結、融解、そしてボルテックス処理 (at 100 °C) を 5 回繰り返し、得られた分散液を試料として用いた。

【結果】72 員環モデルリン脂質 **224**, **225** およびそれらの非環状脂質 **226**, **227** の電子顕微鏡写真を図 6-7 に示す。写真中に示したスケールバーは 1 μm に相当する。

環状脂質 **224**, **225** では大部分が 1~2 mm の大きな不規則シート状構造体であり、ところどころに直径 50~100 nm の小粒子がみられることがわかった。

^{31}P -NMR での結果と考えあわせると、不規則シート状構造体が等方的シグナルを与えるとは考えにくく、これは秩序だった構造体でないために ^{31}P -NMR でシグナルとして現れなかったものと考えられる。一方非環状脂質 **226**, **227** では主に直径 50-100 nm の小粒子がみられ、他に直径 500 nm の大きな粒子も観測できた。このことから **226**, **227** はベシクルのような閉鎖小胞を形成することが明らかになった。

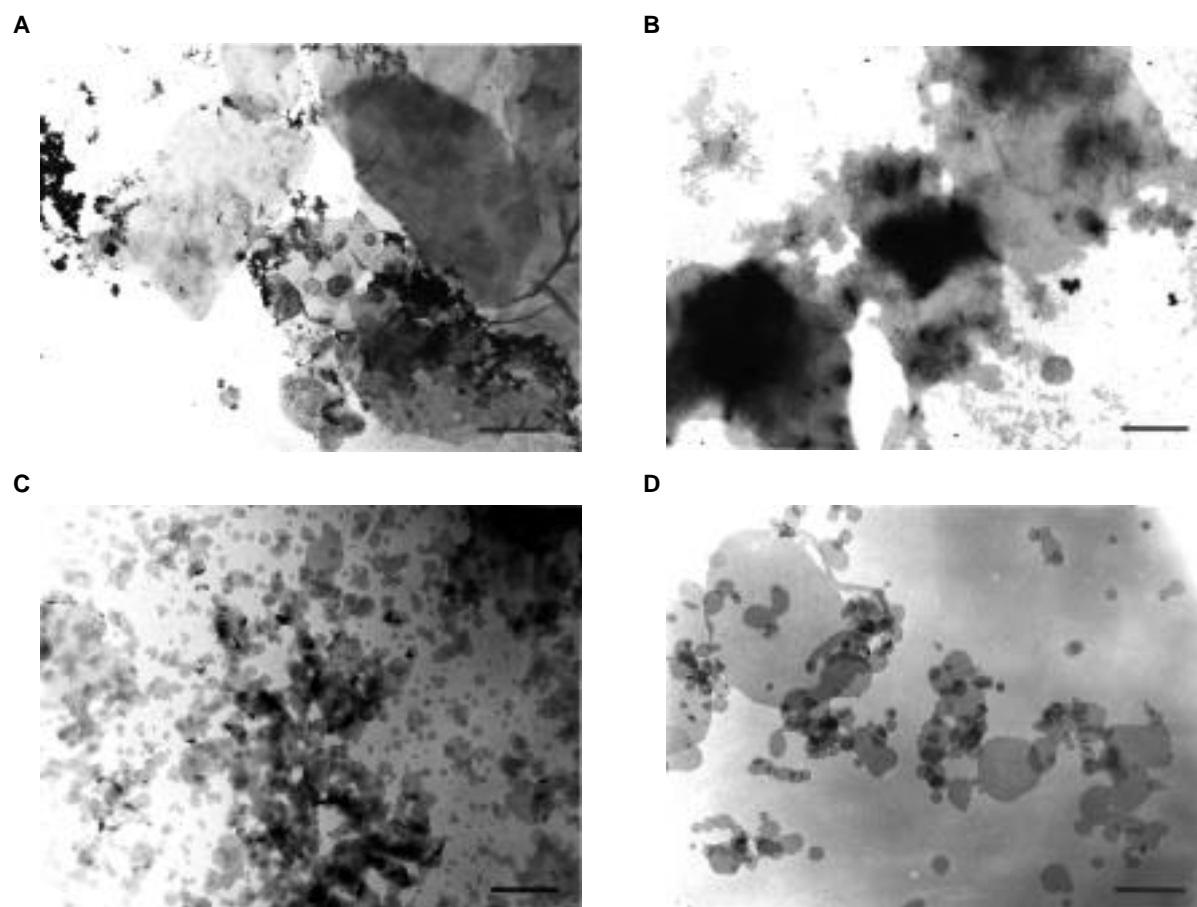


Figure 6-7 環状脂質 (A; 224, B; 225) 及び非環状脂質 (C; 226, D; 227) の電子顕微鏡写真

6-4 まとめ

まず非環状脂質についてベシクル様の球状構造体を得られた要因について考察する。Yamauchi らは非環状テトラエーテル化合物のビスホスホコリン誘導体(第1章の図1-11)が、蒸留水でベシクル構造でなく、シート状構造をとることを見出している^{14a)}。しかしながら直鎖アルキル基を嵩高いフィタニル基で置換したモデル(第1章の図1-11)ではベシクル構造をとっていると報告している^{14b)}。また、Moss らはカチオン性極性基を有した非環状テトラエーテル化合物が単独でもリポソームを形成すること、及び極性基の加水分解から見積もった、脂質の分布比は $\text{outer:inner} = \sim 85:15$ であったと報告している^{14d)}。これらのことから、非環状テトラエーテル化合物のベシクル形成には極性基・炭化水素鎖の種類が密接に絡んでおり、ベシクルの曲率は外層に U 字型コンフォメーションをとることで補っていると考えられる。

今回用いた非環状テトラエーテル化合物 226, 227 も T_c 以下では図 6-8 A のようなラメラ構造をとっており、 T_c 以上になると膜貫通型コンフォメーションをとっていた脂質が図 6-8 B のような U 字型コンフォメーションをとって曲率を補い、小粒子を形成したと考えられる。

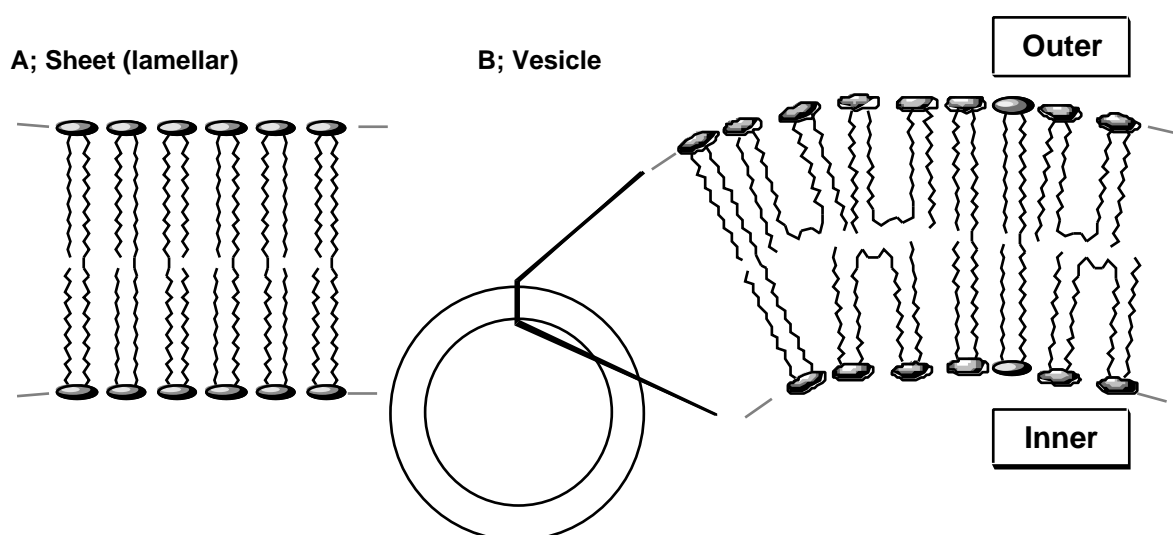


Figure 6-8 非環状テトラエーテル脂質のとりうる構造体の一例

次に環状脂質集合体の成因について考察する。当初は 72 員環モデルリン脂質 224, 225 は球状化せず図 6-9 のようなシート状ラメラ構造をとると予測して

いたが、スペクトルの形状から粉末パターンは観察されず、ラメラ構造が存在していない可能性が高いと考えられた。しかし実際には電子顕微鏡写真でシート状構造体が確認出来た。この原因としては、不規則シート状構造体が秩序だった構造でなかったため、NMR スペクトルでは観測されなかったと考えられる。

^{31}P -NMR で得られた等方的シグナルは電子顕微鏡写真における小粒子に相当すると考えられるが、これはどのような構造であろうか。等方的シグナルを与える構造体としてテトラエーテル脂質が一分子膜となったベシクル構造やテトラエーテル脂質の疎水部が屈曲した擬ミセル構造が考えられる。しかしながら環状脂質は非環状脂質とは異なり、曲率を補う U 字型コンフォメーションの形成が困難と考えられるので、ベシクルのような球状構造をとることが出来なかったと思われる。電子顕微鏡で観察された小粒子はミセル状会合体であろう。

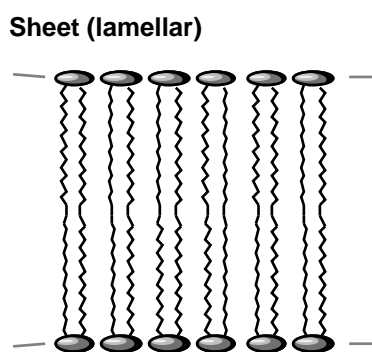


Figure 6-9 環状テトラエーテル型脂質のとりうる構造体の一例

また環状脂質の相転移について、DeRosa らは天然から得たテトラエーテル型脂質の極性基を除去したコア脂質乾燥試料の相転移現象について、DSC 及び X 線小角散乱を用いて調べている⁸¹⁾。それによると、テトラエーテル型脂質は -19°C から 19°C まで

の間は斜めに規則正しく配列した構造 (L_{β} ; 図 6-10) をとっており、それ以上になると炭化水素鎖のコンフォ

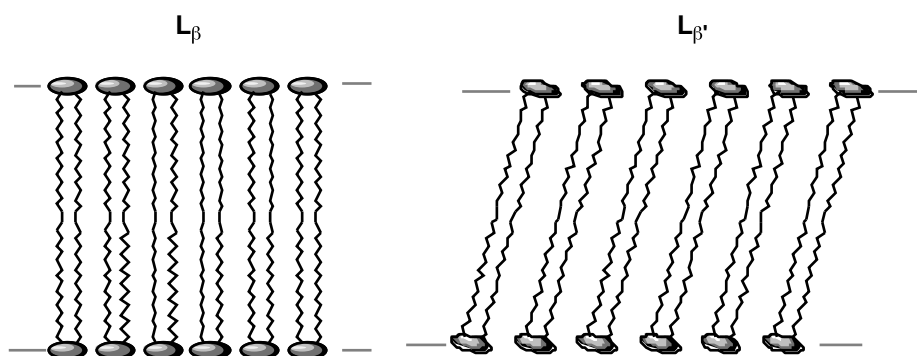
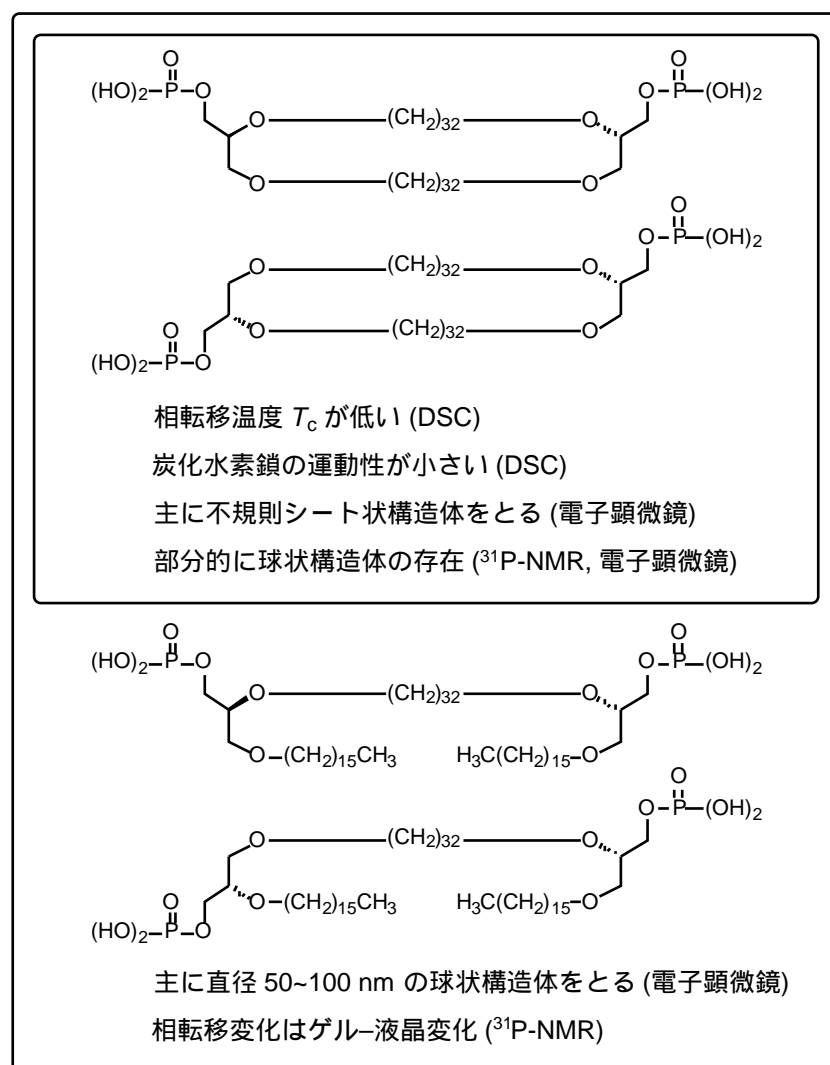


Figure 6-10 2種のラメラ構造

メーション変化によりラメラ構造が融解すると報告している。環状脂質 224, 225 の場合もこの変化と同じ現象によるもの、もしくは L から L' への相転移とも考えられる。

以上テトラエーテル型モデル脂質の脂質膜の性質について得られた知見を図6-11にまとめる。72員環モデル化合物環状テトラエーテル型脂質は非環状脂質と比べてベシクルのような閉鎖小胞をとることが困難であることが分かった。またテトラエーテル型脂質はジエーテル型脂質とは異なり、環状構造をとることで、脂質集合体の形状にも大きな違いが生じることを見出すことが出来た⁸²⁾。



グリセロール位置異性体間の性質に違いなし

Figure 6-11 まとめ

第7章 総括

本研究は古細菌にみられる特異な大環状脂質の膜機能の解明を究極の目標として、大環状脂質を先ず化学的に合成し、それから調製される脂質膜の性質を各種測定法を用いて詳細な検討を行ったものである。

第2章では古細菌脂質の炭化水素鎖となるイソブレン鎖の効率的合成法を確立し、McMurry 反応を環化反応に用いることで古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の全合成を達成することが出来た。第3章ではオレフィンメタセシス反応を用いた古細菌大環状脂質、とりわけ 72 員環テトラエーテル型脂質の効率的合成ルートを確立することが出来た。第4章では古細菌大環状脂質のモデルとして大環状リン酸ジエステル型化合物を合成し、その脂質膜の性質について検討して環状脂質のもたらす影響を見出すことが出来た。第5章では古細菌 36 員環ジエーテル型脂質からなるリポソームの諸性質について検討したところ、環状構造をとることでその膜流動性、運動性を調節し、浸透圧応答・プロトン透過に抵抗性を示す、高温でも物質保持能に優れたリポソームの形成を見出すことが出来た。第6章では 72 員環テトラエーテル型モデル化合物をリン脂質誘導体化し、その脂質膜の性質を検討したところ、72 員環テトラエーテル化合物は脂質膜の物理学的性質のみならず、脂質集合体としての性質にも変化を及ぼすことを明らかに出来た。

古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質については、モデル化合物での知見及び非環状脂質との比較から環状構造のもたらす影響を総合的に評価できたと考えている。運動性、流動性、充填度、リポソームの浸透圧応答・プロトン透過性・熱安定性といった諸性質が密接に絡み合うことで、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の興味深い膜機能を発現していることが明らかとなった。

第一に脂質分子における環状構造が、膜機能へ多大な影響を与えていることを明らかに出来た。環状構造が脂質分子の運動性を低下させることで膜流動性の低下が生じ、その結果物質透過・熱に対する高いバリアーを発現したと考えられる。

第二に古細菌脂質に特徴的なイソブレン鎖は、リポソームの安定性に関与しな

いことが見出せた。このことは古細菌 36 員環脂質からなるリポソームの安定性が環状構造に由来することを強く示唆するものである。

メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* において培養温度が上昇するにつれて環状脂質の割合が増加すること⁵⁸⁾、好熱性古細菌において培養温度が上昇するにつれてシクロペンタン環の数が増大すること⁵⁹⁾、絶対嫌気性真正細菌の脂質膜においても温度及び有機溶媒・抗生物質の添加などの外的ストレスで橋かけ構造をした脂質や大環状脂質が生成すること⁶⁰⁾などを考え合わせると、古細菌大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に大きな役割を果たしているといえる。

このように高バリアー能かつ安定なリポソームを形成する古細菌 36 員環脂質は、機能性リポソームへの応用も期待できる。Nishikawa らは癌転移抑制作用をもつ Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドを飽和イソプレノ鎖と担持させた誘導体 236 を合成し、それを含む修飾リポソームの癌転移率を調べている⁸³⁾。その結果 236 を含むリポソームは、RGD ペプチド単独及び直鎖炭化水素鎖の誘導体 237 を含むリポソーム (ともに 100 %) と比べ、転移率が約 40 % に抑制されていることが分かった。イソプレノ鎖が安定にペプチドを担持していたためであろうと考えられている。単純なイソプレノ鎖より更なる高バリアー能かつ膜安定化作用を有する古細菌 36 員環脂質についても、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や生理作用のあるペプチド、糖鎖で修飾した機能性リポソームの開発など、将来的に医学・材料科学分野への幅広い利用価値を見出すことが出来よう。

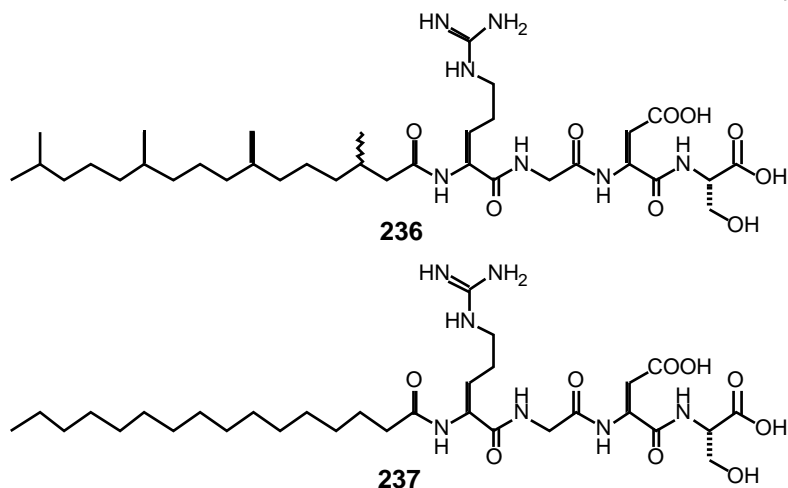


Figure 7-1 Nishikawa らのイソプレノイド-RGD ペプチド誘導体

また古細菌脂質のもう一つの特徴である、72員環テトラエーテル型脂質の膜機能に関する研究は、第6章で述べた分岐メチル基をもたないモデル化合物におけるもののみである。

古細菌72員環テトラエーテル型脂質の脂質膜の性質を検討するにあたり、特有な構造上の問題点を解決する必要がある。それは、脂質分子が膜貫通型コンフォメーションをとっているのか、天然脂質の両極性基は何故必ず異なるもので構成されているのか^{61,36)}の2点である。

Kogaらは天然脂質の再構成リポソームの極性基について、内側にホスホエタノールアミンのような比較的小さな極性基、外側にゲンチオビオシル基のような荷電をもたない比較的大きな極性基が分布した非対称分布をしていることを見出している^{84d)}。すなわちベシクル構造の曲率を補うために両極性基が異なるとも考えられるが、その詳細については不明である。テトラエーテル型脂質からなるリポソームの曲率に関して、テトラエーテル型脂質を含む極性脂質抽出物と卵黄レシチンとの混合リポソームを調製したところ、卵黄レシチンの割合が少なくなるほど粒径の大きなリポソームを形成したという報告がある^{84b)}。すなわちジエステル型脂質がリポソームの曲率を補っているといえる。天然抽出物が再構成リポソームを形成する成因が、極性基の非対称分布によるものなのか、はたして抽出物に含まれているジエーテル型脂質によるものなのか、興味のもたれる問題である⁸⁴⁾。

以上、本研究により古細菌大環状脂質が浸透圧・熱などの外的変化に抵抗性のあるリポソームを形成し、極限環境における生体膜としての機能維持に大きな役割を果たしていた可能性を見出すことが出来た。

実験の部

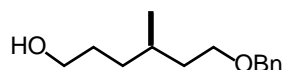
融点は柳本製作所 BT-1 微量融点測定器 (未補正) を用いた。赤外吸収スペクトルは日立 285 型赤外分光光度計または堀場 FT-710 型赤外分光光度計を用いた。旋光度は日本分光 DIP-360 デジタル旋光計を用いて測定した。 ^1H 及び ^{13}C NMR スペクトルは日本電子 GSX-270, EX-270, LA-300 及び LA-400 を用い、特に注釈のない限り、溶媒には CDCl_3 (99.8 atom% enriched, Merck) を用いて測定した。化学シフトに関しては、 ^1H -NMR ではテトラメチルシラン (TMS) ($\delta_{\text{H}} = 0.00$) を内部標準とし、 ^{13}C -NMR では CDCl_3 の中心シグナル ($\delta_{\text{C}} = 77.0$) を基準とした。 ^2H -NMR は LA-400 を用い、化学シフトに関してはクロロホルム中の天然に存在する重水素同位体の重水素シグナル ($\delta_{\text{D}} = 7.26$) を内部標準として測定した。 ^{31}P -NMR は EX-270, LA-400 を用い、化学シフトに関してはリン酸 ($\delta_{\text{P}} = 0.00$) を外部標準として測定した。EI-MS 及び FAB-MS スペクトルは日本電子 AX-505HA 質量分析装置を用いて測定した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーは Kiesel gel 60 (70-230 mesh or 230-400 mesh, Merck) を用い、ゲル濾過クロマトグラフィーは Sephadex[®] LH-20 及び Sephadex[®] G-50 fine (Pharmacia) を用いた。

反応は、接触水素添加反応及び Glaser 反応以外はアルゴンガスあるいは窒素ガス雰囲気下で行った。テトラヒドロフラン (THF) 及びジメトキシエタン (DME) は使用する直前にナトリウムベンゾフェノンケチルを用いて蒸留した。ピリジン及びトリエチルアミンは水酸化カリウムを乾燥剤として用いて蒸留した。キシレンは五酸化ニリンを用いて蒸留した。ジクロロメタンは塩化カルシウムで前乾燥をし、五酸化ニリンを用いて蒸留した。ジメチルホルムアミド (DMF) は硫酸カルシウムを用いて減圧蒸留した。ジメチルスルホキシド (DMSO) 及びヘキサメチルリン酸トリアミド (HMPA) は水素化カルシウムを用いて減圧蒸留した。ベンゼン、トルエン及びアセトニトリルは水素化カルシウムを用いて蒸留した。メタノールはマグネシウムメトキシドを用いて蒸留した。

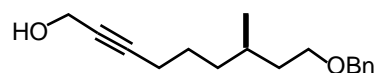
蒸留水はヤマト科学 WG25 型オートスチール純水製造装置を用いて製造した。

第 2 章

(4R)-6-Benzyloxy-4-methylhexanol (77)

オゾンガスを (6R)-8-ベンジルオキシ-2,6-ジメチルオクト-2-エン **76**²⁷⁾ (17.9 g, 72.6 mmol) のメタノール溶液 (30 ml) に $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 10 時間通じた。反応終了後溶液中のオゾンガスをアルゴンガスで 10 分間置換し、水素化ホウ素ナトリウム (3.00 g, 79.3 mmol) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で注意深く加えた。室温までゆっくりと昇温し、溶媒を留去した。得られた残渣をエーテル及び 2N HCl で希釈し、水層をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1-2:1, v/v)) で精製し、アルコール **77** (15.1 g, 93 %) を無色油状物で得た。

[$^{30}\text{D} + 1.41^{\circ}$ (c 0.920, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.90 (d, $J = 6.6$, 3H), 1.10-1.75 (m, 7H), 3.50 (t, $J = 6.8$, 1H), 3.51 (dd, $J = 6.8, 6.1$, 1H), 3.62 (t, $J = 6.6$, 2H), 4.50 (s, 2H), 7.26-7.35 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.46, 29.51, 29.98, 32.82, 36.53, 62.94, 68.43, 72.79, 127.43, 127.56, 128.25, 138.37. IR (neat): 698, 737, 1099, 1365, 1454, 2866, 2931, 3373 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_2$: C, 75.63; H, 9.97. Found: C, 75.35; H, 10.04.

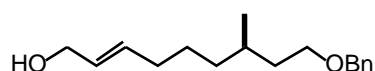
(7R)-9-Benzyloxy-7-methyl-2-nonyn-1-ol (78)

アルコール **77** (32.0 g, 144 mmol) をピリジン (60 ml) に溶解し、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で塩化トシル (35.5 g 186 mmol) を加えた。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 3.5 時間攪拌した後、水を加えて反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、トシラート (52.5 g) を無色油状物で得た。ヘキサンで予め洗浄した水素化ナトリウム (5.20 g, 217 mmol) を DMSO (104 ml) に溶かし、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱

した。得られた溶液を室温まで冷却し、テトラヒドロ *-2-(2-プロピニルオキシ)-2H-ピラン* (30.5 g, 217 mmol) を加えて 25 分間室温で攪拌した。先ほど得たトシラート (52.5 g) の DMSO 溶液 (35 ml) を 10 °C で 15 分間かけてゆっくりと滴下し、そのままの温度で 5 分間攪拌した。水を加えて反応を停止し、反応液をヘキサンで 4 回抽出した。有機層を合わせて水で洗浄し、抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、アルキニルエーテルを粗精製物で得た。得られた残渣を THF - メタノール (1:1, 200 ml) に溶かし、2N HCl (16 ml) を加えて室温で 24 時間反応させた。溶媒を除去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (5:1-2:1, v/v)) で精製し、アルコール **78** (26.7 g, 71 %, 3 step) を黄色油状物で得た。

[^{28}D]+6.21° (*c* 1.10, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (d, $J= 6.3$, 3H), 1.22 (m, 1H), 1.34-1.72 (m, 6H), 2.10 (br, 1H), 2.18 (tt, $J= 2.2, 7.1$, 2H), 3.49 (t, $J= 6.8$, 1H), 3.50 (dd, $J= 6.8, 6.1$, 1H), 4.20 (dt, $J= 5.5, 2.0$, 2H), 4.50 (s, 2H), 7.25-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 18.94, 19.50, 25.94, 29.38, 36.18, 36.58, 51.34, 68.48, 72.87, 78.39, 86.46, 127.49, 127.60, 128.33, 138.54. IR (neat): 698, 737, 1016, 1097, 1365, 1454, 2224, 2285, 2864, 2927, 3386 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$: C, 78.42; H, 9.29. Found: C, 78.12; H, 9.03.

(2*E*,7*R*)-9-Benzoyloxy-7-methyl-2-nonen-1-ol (79)

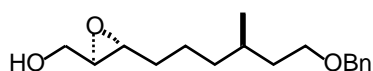


水素化リチウムアルミニウム (4.10 g, 108 mmol) を THF (130 ml) に懸濁させ、プロパルギルアルコール **78** (27.0 g, 104 mmol) の THF 溶液 (40 ml) を 10 °C で 20 分間かけて滴下した。室温で 3 時間攪拌後、50 °C で 4.5 時間攪拌した。水をゆっくりと加え、エーテル及び 2N HCl で希釈した。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1, v/v)) で精製し、アリルアルコール **79** (25.6 g, 94 %) を無色油状物で得た。

[^{28}D]+3.63° (*c* 1.17, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.87 (d, $J= 6.6$, 3H), 1.07-1.20 (m,

1H), 1.24-1.67 (m, 6H), 2.02 (m, 2H), 3.49 (t, $J=6.8$, 1H), 3.50 (dd, $J=6.8, 6.1$, 1H), 4.08 (d, $J=4.9$, 2H), 4.50 (s, 2H), 5.62 (dt, $J=4.9, 15.3$, 1H), 5.69 (dt, $J=5.6, 15.1$, 1H), 7.26-7.35 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.56, 26.42, 29.67, 32.41, 36.53, 36.68, 63.80, 68.59, 72.85, 127.46, 127.59, 128.32, 128.87, 133.42, 138.61. IR (neat): 698, 737, 970, 1003, 1095, 1365, 1454, 1670, 2858, 2927, 3383 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_2$: C, 77.82; H, 9.99. Found: C, 77.53; H, 10.01.

(2R,3R,7R)-9-Benzoyloxy-2,3-epoxy-7-methylnonanol (80)

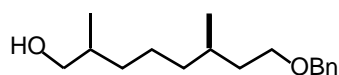


200 °C で加熱乾燥したモレキュラーシーブ 4A 粉末 (22.9 g) に、直前に蒸留したジクロロメタン (390 ml) を加え、さらにオルトチタン酸テトライソプロピル (14.0 ml, 47.8 mmol) 及び D-(-)-酒石酸ジエチル (10.0 ml, 58.4 mmol) を -25 °C で加えてそのままの温度で 55 分間攪拌した。その中にアリルアルコール 79 (12.3 g, 46.9 mmol) のジクロロメタン溶液 (50 ml) を -25 °C で 15 分間かけて加えた。20 分後、*t*-ブチルヒドロペルオキシド (5.5 M in decane, 18.0 ml, 99.0 mmol) を -25 °C で 10 分間かけて滴下し、そのままの温度で 1.5 時間攪拌した。10% 酒石酸溶液 (200 ml) を加えて反応を停止し、室温で 1 時間攪拌した。不溶物を吸引濾過で除去し、濾液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られた残渣をエーテル (160 ml) 及び 10% NaOH (80 ml) で溶かし、0 °C で 1 時間攪拌した。反応液をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (2:1, v/v)) で精製し、エポキシド 80 (11.9 g, 91 %) を無色油状物で得た。

[$^{26}\text{D}+22.2^\circ$ (c 1.50, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (d, $J=6.3$, 3H), 1.10-1.73 (m, 9H), 2.46 (t, $J=6.3$, 1H), 2.90 (m, 2H), 3.49 (t, $J=6.8$, 1H), 3.50 (dd, $J=6.8, 6.1$, 1H), 3.57 (ddd, $J=12.5, 6.5, 4.7$, 1H), 3.85 (ddd, $J=12.5, 5.9, 2.5$, 1H), 4.49 (s, 2H), 7.23-7.38 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.38, 23.14, 29.59, 31.62, 36.49, 36.56, 55.87, 58.49, 61.67,

68.41, 72.73, 127.35, 127.48, 128.19, 138.42. IR (neat): 698, 739, 1028, 1099, 1365, 1454, 2862, 2929, 3423 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$: C, 73.35; H, 9.41. Found: C, 73.25; H, 9.61.

(2*S*,6*R*)-8-Benzyloxy-2,6-dimethyloctanol (73)

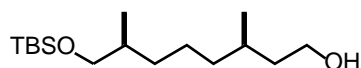


エポキシド **80** (14.7 g, 52.8 mmol) を直前に蒸留したジクロロメタン (190 ml) に溶かし、トリメチルアルミニウムのヘキサン溶液 (1 M, 165 ml, 165 mmol) を 0°C で 15 分間かけて加え、そのままの温度で 3.5 時間撹拌した。メタノール (30 ml) を注意深く加えて反応を停止し、反応液をエーテル及び 2N HCl で希釈した。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、1,2-ジオールを粗精製物で得た。得られた残渣を THF - 水 (60 ml, 2:1) に溶かし、過ヨウ素酸ナトリウム (14.1 g, 65.9 mmol) を加えて室温で 2.5 時間反応した。酢酸エチル及び飽和食塩水で希釈し、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、アルデヒドを粗精製物で得た。得られた残渣をメタノール (75 ml) で溶解し、水素化ほう素ナトリウム (2.10 g, 55.5 mmol) を 0°C で加えた。 0°C で 1 時間撹拌後、溶媒を留去し、得られた残渣をエーテル及び 2N HCl で希釈した。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1-5:1, v/v)) で精製し、アルコール **73** (11.8 g, 84 %, 3 steps) を無色油状物で得た。

[^{28}D] -4.81° (c 1.10, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.86 (d, $J=6.6$, 3H), 0.88 (d, $J=6.6$, 3H), 0.96-1.73 (m, 10H), 2.73 (br, 1H), 3.31 (dd, $J=10.2, 6.6$, 1H), 3.41 (dd, $J=10.2, 5.9$, 1H), 3.47 (t, $J=7.1$, 1H), 3.48 (dd, $J=7.1, 6.0$, 1H), 4.47 (s, 2H), 7.22-7.32 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 16.58, 19.66, 24.21, 29.81, 33.35, 35.71, 36.67, 37.33, 68.27, 68.69, 72.86, 127.44, 127.58, 128.30, 138.64. IR (neat): 1100, 1460, 2860, 2940, 3380 cm^{-1} . Anal.

Calcd for C₁₇H₂₈O₂: C, 77.22; H, 10.67. Found: C, 77.48; H, 10.94.

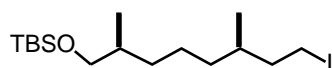
(3R,7S)-8-tert-butyldimethylsilyloxy-2,6-dimethyloctane (74)



アルコール **73** (10.0 g, 37.8 mmol), *tert*-ブチルジメチルクロロシラン (7.00 g, 46.4 mmol) 及びイミダゾール (6.50 g, 95.5 mmol) を DMF (80 ml) に溶解し、室温で 1.5 時間攪拌した。水を加えて反応を停止し、反応液をヘキサンで数回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去してシリルエーテル (14.1 g) を粗精製物で得た。得られた残渣 (14.1 g, 37.2 mmol) を酢酸エチル (200 ml) に溶かし、10% Pd-C (1.35 g) を加えて水素雰囲気下、室温で 50 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、アルコール **74** (11.0 g, 97 %, 2 steps) を無色油状物で得た。

[^{27}D] -0.490° (*c* 1.73, CHCl₃). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.04 (s, 6H), 0.87 (d, *J* = 6.6, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.4, 3H), 0.90 (s, 9H), 1.00-1.67 (m, 10H), 3.35 (dd, *J* = 9.8, 6.4, 1H), 3.44 (dd, *J* = 9.8, 5.5, 1H), 3.68 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): -5.36, 16.76, 18.35, 19.64, 24.26, 25.94, 29.45, 33.40, 35.73, 37.43, 39.91, 61.21, 68.37. IR (neat): 840, 1100, 2860, 2940, 2960, 3350 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₆H₃₆O₂Si: C, 66.60; H, 12.58. Found: C, 66.52; H, 12.86.

(2S,6R)-1-tert-Butyldimethylsilyloxy-8-iodo-2,6-dimethyloctane (82)

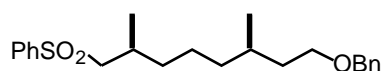


アルコール **74** (1.57 g, 5.44 mmol), イミダゾール (0.92 g, 13.5 mmol), トリフェニルホスフィン (3.55 g, 13.5 mmol) 及びヨウ素 (2.75 g, 10.8 mmol) をベンゼン (60 ml) に溶かし、室温で 30 分間攪拌した。飽和 Na₂S₂O₃ を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマ

トグラフィー (hexane-EtOAc (50:1, v/v)) で精製し、ヨウ化物 **82** (2.00 g, 92 %) を無色油状物で得た。

[^{28}D] -9.08° (c 1.44, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.04 (s, 6H), 0.86 (d, $J=6.8$, 3H), 0.87 (d, $J=6.4$, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.95-1.43 (m, 7H), 1.55 (br, 1H), 1.63 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 3.16 (ddd, $J=9.8, 7.8, 7.1$, 1H), 3.25 (ddd, $J=9.8, 7.8, 5.4$, 1H), 3.35 (dd, $J=9.8, 6.3$, 1H), 3.44 (dd, $J=9.8, 5.9$, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): $-5.34, 5.40, 16.77, 18.36, 18.74, 24.14, 25.96, 33.35, 33.83, 35.71, 36.55, 40.90, 68.35$. IR (neat): 780, 840, 1090, 1250, 1460, 2850, 2930 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{35}\text{OSi}$: C, 48.23; H, 8.85. Found: C, 48.03; H, 8.99.

(2S,6R)-8-Benzyloxy-1-phenylsulfonyl-2,6-dimethyloctane (83)

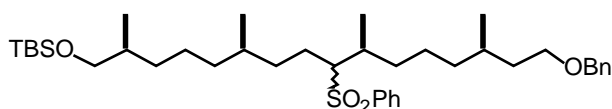


アルコール **73** (11.0 g, 41.6 mmol) をピリジン (30 ml) に溶かし、塩化メタン
スルホニル (4.00 ml, 51.6 mmol) を 0°C で加え、そのままの温度で 3.5 時間攪
拌した。水を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合
わせて 2N HCl , 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナ
トリウムで乾燥後、溶媒を留去し、メシラートを粗精製物で得た。得られた残渣
を DMF (100 ml) に溶かし、チオフェノール (5.20 ml, 51.0 mmol) 及び炭酸カリ
ウム (5.90 g, 42.7 mmol) を加えて室温で 4 時間攪拌した。反応液に水を加え、
ヘキサンで 4 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫
酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、チオエーテルを粗精製物で得た。得られ
た残渣をジクロロメタン (120 ml) に溶かし、メタクロロ過安息香酸 (25.0 g (85
%), 123 mmol) を加えて 0°C で 7 時間攪拌した。飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (150 ml) を加え
て反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 10% NaOH 及び飽
和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残
渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1, v/v)) で精製し、
スルホン **83** (15.4 g, 95 %, 3 steps) を無色油状物で得た。

[^{30}D] $+3.49^\circ$ (c 1.69, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.83 (d, $J=6.6$, 3H), 1.06 (d, $J=6.6$,

3H), 1.14-1.43 (m, 7H), 1.46-1.73 (m, 2H), 2.07 (m, 1H), 2.91 (dd, $J=14.1, 7.8$, 1H), 3.07 (dd, $J=14.1, 4.6$, 1H), 3.47 (t, $J=6.9$, 1H), 3.48 (dd, $J=6.9, 5.7$, 1H), 4.48 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H), 7.52-7.63 (m, 3H), 7.89-7.92 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.48, 19.84, 23.54, 28.44, 29.60, 36.52, 36.72, 36.81, 62.38, 68.46, 72.78, 127.38, 127.49, 127.72, 128.23, 129.15, 133.42, 138.52, 140.03. IR (neat): 534, 567, 600, 1088, 1147, 1306, 1446, 2858, 2927 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{S}$: C, 71.09; H, 8.30. Found: C, 70.93; H, 8.48.

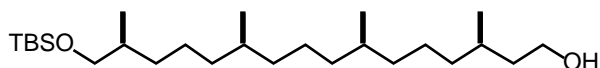
(2*S*,6*R*,10*S*,14*R*)-16-Benzyloxy-1-*tert*-butyldimethylsilyloxy-2,6,10,14-tetramethyl-8-phenylsulfonylhexadecane (84)



300 ml シュレンク中にスルホン **83** (3.30 g, 8.49 mmol) 及び脱気した THF (50 ml) を加えた。 *n*-ブチルリチウム (1.57 M in hexane, 5.60 ml, 8.79 mmol) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で滴下し、同じ温度で 15 分間攪拌した。反応温度を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ にして 15 分間攪拌し、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却した。HMPA (20 ml) を加え、5 分後にヨウ化物 **82** (3.38 g, 8.49 mmol) の脱気 THF 溶液 (25 ml) を 10 分かけて滴下した。 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 1 時間攪拌後、飽和 NH_4Cl で反応を停止した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1-10:1, v/v)) で精製し、スルホン **84** (4.89 g, 87 % as a mixture of diastereomers) を無色油状物で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.04 (s, 6H), 0.77 (d, $J=6.3$, 3H), 0.82 (d, $J=6.3$, 3H), 0.85 (d, $J=6.6$, 3H), 0.90 (s, 9H), 1.01 (d, $J=7.1$, 3H), 0.93-1.90 (m, 22H), 2.87 (dt, $J=1.7, 5.6$, 1H), 3.34 (dd, $J=9.8, 6.6$, 1H), 3.42 (dd, $J=9.8, 5.7$, 1H), 3.48 (m, 2H), 4.49 (s, 2H), 7.22-7.37 (m, 5H), 7.58 (m, 3H), 7.88 (m, 2H). IR (neat): 840, 1080, 1140, 1250, 1300, 1460, 2850, 2920 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{66}\text{O}_4\text{SSi}$: C, 71.07; H, 10.09. Found: C, 71.29; H, 10.29.

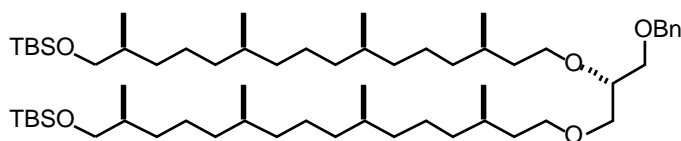
(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-16-*tert*-Butyldimethylsilyloxy-3,7,11,15-tetramethylhexadecanol (85)



エチルアミン (10 ml) に $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ でスルホン **84** (130 mg, 0.20 mmol) の THF (5 ml) 溶液を加え、さらにリチウム片 (80 mg, 10 mmol) を加え、得られた青色溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 時間撹拌した。イソブレン及びメタノールを加えて反応を停止し、エーテルで希釈した。反応液に飽和食塩水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、**85** (50 mg, 59 %) を無色油状物で得た。

[^{28}D]+0.450° (c 1.38, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.04 (s, 6H), 0.82-0.91 (m, 12H), 0.90 (s, 9H), 1.00-1.68 (m, 24H), 3.35 (dd, $J=9.8, 6.6$, 1H), 3.45 (dd, $J=9.8, 5.8$, 1H), 3.69 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): $-5.36, 16.79, 18.34, 19.66, 19.76, 24.35, 24.39, 24.43, 25.95, 29.51, 32.73, 32.78, 33.50, 35.74, 37.30, 37.36, 37.48, 39.93, 61.18, 68.43$. IR (neat): 760, 840, 1090, 1250, 1460, 2850, 2920, 3340 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{56}\text{O}_2\text{Si}$: C, 72.83; H, 13.16. Found: C, 72.55; H, 13.14.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-16-*tert*-butyldimethylsilyloxy-3,7,11,15-tetramethylhexadecanyl]-*sn*-glycerol (88**)**



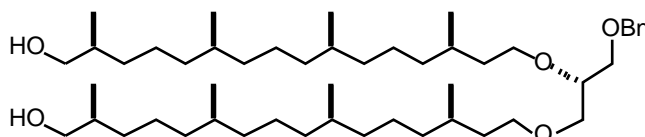
アルコール **85** (4.42 g, 10.3 mmol) をピリジン (25 ml) にとかし、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で塩化メタンスルホニル (1.00 ml, 12.9 mmol) を加え、同じ温度で 2.5 時間撹拌した。水 (60 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去してメシラート **86** を粗精製物で得た。

ヘキサンで予め洗浄した水素化ナトリウム (104 mg, 4.33 mmol) を DMSO (2 ml) に溶かし、1-*O*-ベンジル-*sn*-グリセロール **87** (213 mg, 1.17 mmol) の

DMSO 溶液 (3 ml) を室温で加えた。室温で 1 時間攪拌後、メシラート **86** (1.24 g, 2.45 mmol) の DMSO 溶液 (14 ml) を室温でゆっくりと加えた。2 日間攪拌し、水で反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1, v/v)) で精製し、**88** (656 mg, 56 %) を無色油状物で得た。

[^{26}D]+0.680° (*c* 1.56, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.04 (s, 12H), 0.83-0.90 (m, 24H), 0.89 (s, 18H), 0.94-1.73 (m, 48H), 3.32-3.64 (m, 13H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (67.5 MHz): -5.34, 16.81, 18.35, 19.69, 19.71, 19.76, 24.39, 24.48, 25.97, 29.81, 29.90, 29.94, 32.76, 32.82, 33.52, 35.76, 36.64, 37.10, 37.41, 37.53, 68.42, 68.87, 69.97, 70.31, 70.78, 73.35, 77.95, 127.48, 127.57, 128.29, 138.42. IR (neat): 780, 840, 1090, 1250, 1460, 2850, 2920 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{62}\text{H}_{122}\text{O}_5\text{Si}_2$: C, 74.18; H, 12.25. Found: C, 74.31; H, 12.27.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-16-hydroxy-3,7,11,15-tetramethylhexadecanyl]-*sn*-glycerol (89**)**

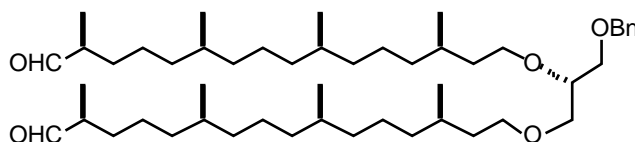


シリルエーテル **88** (2.18 g, 2.17 mmol) を THF (25 ml) に溶かし、テトラブチルアンモニウムフルオリド (1.0 M solution in THF, 6.60 ml, 6.60 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1-2:1, v/v)) で精製し、ジオール **89** (1.68 g, quant.) を無色油状物で得た。

[^{28}D]-2.45° (*c* 0.86, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.84 (d, *J* = 6.8, 6H), 0.85 (d, *J* = 6.3, 6H), 0.87 (d, *J* = 6.6, 6H), 0.91 (d, *J* = 6.8, 6H), 0.96-1.70 (m, 48H), 1.80 (br, 2H), 3.36-3.64 (m, 13H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 16.61, 19.64, 19.66, 19.72, 24.31, 24.35, 24.37, 29.75, 29.83, 32.69, 32.73, 33.44, 35.71, 36.56, 37.02, 37.26, 37.31, 37.46, 37.47, 68.22, 68.82, 69.91, 70.23, 70.72, 73.29, 77.88, 127.44, 127.53, 128.24,

138.33. IR (neat): 1040, 1120, 1380, 1460, 2850, 2920, 3400 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{94}\text{O}_5$: C, 77.46; H, 12.22. Found: C, 77.41; H, 12.51.

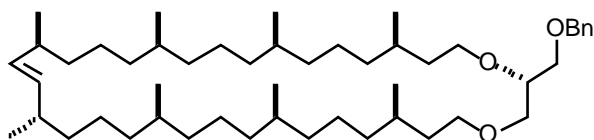
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-15-formyl-3,7,11,15-tetramethylpentadecanyl]-*sn*-glycerol (70)



オキザリルクロリド (2 M in CH_2Cl_2 , 1.90 ml, 3.80 mmol) をジクロロメタン (20 ml) に溶かし、 -78°C で DMSO (350 μl , 4.93 mmol) を滴下し、同じ温度で 30 分間攪拌した。さらにジオール **89** (571 mg, 0.737 mmol) のジクロロメタン溶液 (12 ml) を -78°C で滴下し、 -78°C で 20 分間、 -30°C で 4 時間攪拌した。反応液を -78°C に再び冷却し、系中にトリエチルアミン (1.70 ml, 12.2 mmol) をゆっくり滴下し、反応温度を徐々に室温まで昇温した。水を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、ジアルデヒド **70** (542 mg, 95 %) を無色油状物で得た。

[^{26}D +10.8° (c 1.30, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.84 (d, $J=7.8$, 6H), 0.85 (d, $J=6.3$, 6H), 0.87 (d, $J=6.1$, 6H), 1.09 (d, $J=7.1$, 6H), 0.99-1.75 (m, 46H), 2.34 (m, 2H), 3.44-3.65 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H), 9.61 (d, $J=2.0$, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 13.34, 19.63, 19.66, 19.70, 19.73, 24.34, 24.39, 24.43, 29.67, 29.80, 29.87, 30.84, 32.63, 32.78, 36.61, 36.98, 37.07, 37.31, 37.35, 37.41, 37.50, 46.33, 68.86, 69.94, 70.28, 70.76, 73.32, 77.92, 127.47, 127.55, 128.27, 138.40, 205.40. IR (neat): 1120, 1380, 1460, 1730, 2850, 2930 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{90}\text{O}_5$: C, 77.87; H, 11.76. Found: C, 77.78; H, 11.81.

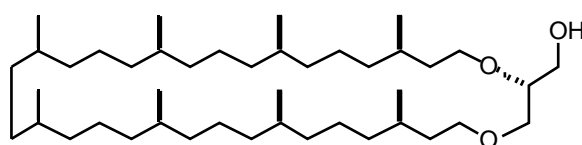
(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-2-Benzylloxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxacyclohexatriacont-20-ene (71)



アルゴン気流下、アトモスバック中で三塩化チタン (2.1 g, 14 mmol) 及び Zn-Cu (2.1 g, 32 mmol) を 200 ml のシュレンク管に入れた。シュレンク管中に DME (80 ml) を加え、2.5 時間加熱還流した。加熱還流した系中にジアルデヒド **70** (513 mg, 0.664 mmol) の DME 溶液 (50 ml) を電動シリンジポンプで 48 時間かけて滴下した。滴下終了後、さらに 18 時間加熱還流し、その後室温まで冷却した。反応系中に 20% K_2CO_3 水溶液 (80 ml) を加え、室温で 4.5 時間攪拌し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1, v/v)) で精製し、36 員環閉環体 **71** (321 mg, 65 %) を無色油状物で得た。

[^{23}D +6.66° (*c* 1.16, $CHCl_3$). 1H -NMR (300 MHz): 0.83 (d, J = 6.3, 6H), 0.84 (d, J = 6.3, 6H), 0.87 (d, J = 6.6, 6H), 0.94 (d, J = 6.8, 6H), 0.98-1.70 (m, 46H), 2.02 (br, 2H), 3.45-3.65 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 5.11 (m, 2H), 7.25-7.34 (m, 5H). ^{13}C -NMR (75 MHz): 19.77, 19.85, 21.82, 24.48, 25.05, 29.60, 29.72, 32.75, 32.83, 32.87, 36.64, 36.98, 37.23, 37.36, 37.46, 37.47, 37.76, 68.58, 69.70, 70.28, 71.43, 73.35, 77.94, 127.50, 127.57, 128.30, 134.97, 138.37. IR (neat): 696, 733, 968, 1117, 1377, 1462, 2858, 2925 cm^{-1} . EI-MS: m/z 738 (M^+), 647, 632, 555. High resolution EI-MS: Calcd for $C_{50}H_{90}O_3$, 738.6890. Found: 738.6918. Anal. Calcd for $C_{50}H_{90}O_3$: C, 81.24; H, 12.27. Found: C, 81.31; H, 12.49.

(2*R*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-2-hydroxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxacyclohexatriacontane (5)

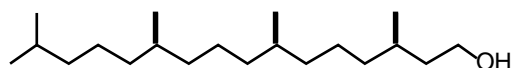


ベンジルエーテル **71** (80 mg, 0.11 mmol) を酢酸エチル (5 ml) に溶かし、10% Pd-C (80 mg) を加えて水素雰囲気下、室温で 3 日間攪拌した。触媒をセライト

濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、36 員環コア脂質 **5** (68 mg, 96 %) を無色油状物で得た。

[^{26}D +8.17° (*c* 1.16, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.84-0.89 (m, 24H) 1.00-1.68 (m, 52H), 2.20 (br, 1H), 3.46-3.73 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.76, 19.85, 19.93, 19.97, 20.02, 20.08, 23.96, 24.26, 24.34, 24.42, 29.72, 29.77, 32.41, 32.46, 32.50, 32.59, 32.66, 32.77, 33.03, 33.56, 34.16, 36.53, 36.67, 36.90, 36.99, 37.17, 37.19, 37.26, 63.02, 68.52, 70.00, 71.18, 71.23, 78.37. IR (neat): 1050, 1110, 1380, 1460, 2850, 2920, 3440 cm^{-1} . EI-MS: *m/z* 650 (M^+), 620, 557. High Resolution EI-MS: Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{86}\text{O}_3$, 650.6577. Found: 650.6603. Anal. Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{86}\text{O}_3$: C, 79.32; H, 13.31. Found: C, 79.60; H, 13.31.

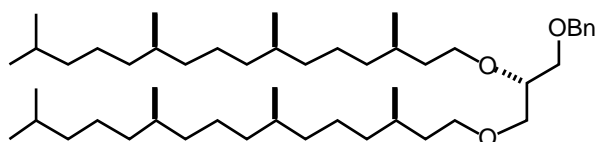
(3R,7R,11R)-3,7,11,15-Tetramethylhexadecan-1-ol (phytanol) (94)



アルゴン雰囲気下、フィトール **93** (12.9 g, 43.5 mmol) 及び [(*S*)-(-)-2,2'-ビス(ジフェニルホスフィノ)-1,1'-ビナフチル]クロロ(*p*-シメン)-ルテニウムクロリド (97 mg) を脱気したメタノール (40 ml) に溶かし、ステンレス製耐圧チューブに封入した。高純度水素ガス (99.99999 % purity) を反応容器に封入 (90 kgf/cm^2) し、室温で 4 日間攪拌した。注意深く容器を開封し、溶媒を留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、アルコール **94** (11.9 g, 92 %) を無色油状物で得た。

[^{29}D +2.29° (*c* 1.02, CHCl_3) (lit^{6a}), +2.4°). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.84-0.91 (d, *J*= 6.6, 15H) 1.00-1.67 (m, 25H), 3.62-3.75 (m, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.66, 19.74, 19.76, 22.62, 22.72, 24.35, 24.44, 24.78, 27.96, 29.49, 32.78, 37.26, 37.29, 37.36, 37.42, 37.47, 39.34, 39.93, 61.24. IR (neat): 737, 760, 1009, 1057, 1365, 1377, 1464, 2870, 2925, 2954, 3330 cm^{-1} .

1-O-Benzyl-2,3-di-O-[(3R,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethylhexadecanyl]-sn-glycerol (97)

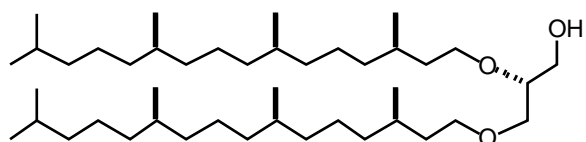


アルコール **94** (2.12 g, 7.12 mmol) をピリジン (10 ml) にとかし、0 °C で塩化メタンスルホニル (720 μ l, 9.26 mmol) を加え、同じ温度で 2 時間攪拌した。水 (10 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去してメシラート **96** を粗精製物で得た。

ヘキサンで予め洗浄した水素化ナトリウム (252 mg, 10.5 mmol) を DMSO (3 ml) に溶かし、1-*O*-ベンジル-*sn*-グリセロール **87** (580 mg, 3.18 mmol) の DMSO 溶液 (3 ml) を室温で加えた。室温で 1 時間攪拌後、メシラート **96** (2.46 g, 6.52 mmol) の DMSO 溶液 (7 ml) を室温でゆっくりと加えた。67 時間 40 °C で攪拌し、飽和 NH₄Cl (15 ml) で反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (50:1, v/v)) で精製し、化合物 **97** (1.49 g, 63 %) を無色油状物で得た。

[28 D] +2.85° (*c* 0.640, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz): 0.83-0.88 (10xd, 30H), 1.00-1.68 (m, 48H), 3.41-3.67 (m, 9H), 4.56 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (67.5 MHz): 19.75, 22.63, 22.72, 24.37, 24.48, 24.78, 27.96, 29.80, 29.89, 32.80, 36.62, 37.09, 37.27, 37.40, 37.45, 37.50, 39.36, 68.86, 69.94, 70.30, 70.78, 73.33, 77.93, 127.48, 127.57, 128.28, 138.42. IR (neat): 1115, 1380, 1376, 1460, 2860, 2920, 2950 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₅₀H₉₄O₃: C, 80.79; H, 12.75. Found: C, 80.59; H, 12.82.

2,3-Di-*O*-[(3*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl]-*sn*-glycerol (**1**)

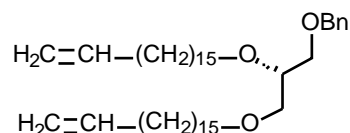


ベンジルエーテル **97** (2.03 g, 2.74 mmol) を酢酸エチル (20 ml) に溶かし、10% Pd-C (1.11 g) を加えて水素雰囲気下、40 °C で 29 時間攪拌した。触媒を

セライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1, v/v)) で精製し、非環状ジエーテル型コア脂質 **1** (1.63 g, 92 %) を無色油状物で得た。

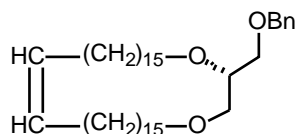
[α]_D²⁵ +8.66° (*c* 1.07, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz): 0.83-0.89 (m, 30H) 1.00-1.69 (m, 48H), 2.21 (t, *J*= 6.0, 1H), 3.44-3.76 (m, 9H). ¹³C-NMR (75 MHz): 19.66, 19.69, 19.76, 22.62, 22.72, 24.34, 24.46, 24.79, 27.96, 29.83, 29.86, 32.78, 36.57, 37.05, 37.27, 37.34, 37.38, 37.44, 37.48, 39.36, 63.08, 68.63, 70.14, 70.94, 78.28. IR (neat): 1051, 1117, 1365, 1376, 1464, 2868, 2925, 2952, 3471 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₄₃H₈₈O₃: C, 79.07; H, 13.58. Found: C, 78.91; H, 13.57.

第 3 章

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-heptadec-16-enyl-*sn*-glycerol (139)

メチルトリフェニルホスホニウムブロミド (1.71 g, 4.79 mmol) を THF (80 ml) に懸濁させ、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で *n*-ブチルリチウム (1.59 M in hexane, 3.00 ml, 4.77 mmol) を滴下した。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌し、次いで室温で 30 分間攪拌した。反応液を再び $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ にし、1-*O*-ベンジル-2,3-ビス-*O*-15-ホルミルペンタデカニル-*sn*-グリセロール **67**²⁷⁾ (630 mg, 0.957 mmol) の THF 溶液 (15 ml) を加えた。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分間攪拌し、さらに室温で 5 時間攪拌した。飽和 NH_4Cl (50 ml) で反応を停止し、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィ (hexane-EtOAc (50:1, v/v)) で精製し、ジエン **135** (521 mg, 83%) を白色粉末で得た。

mp $53\text{--}56\text{ }^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 1.25 (br, 48H), 1.55 (m, 4H), 2.04 (dt, $J = 6.8, 7.6, 4\text{H}$), 3.41-3.63 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 4.93 (ddt, $J = 2.2, 10, 1.2, 2\text{H}$), 4.99 (ddt, $J = 2.2, 17, 1.5, 2\text{H}$), 5.81 (ddt, $J = 10, 17, 6.7, 2\text{H}$), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 26.10, 26.13, 28.95, 29.16, 29.51, 29.64, 29.68, 30.11, 33.81, 70.33, 70.61, 70.75, 71.66, 73.35, 77.93, 114.06, 127.48, 127.56, 128.29, 138.47, 139.26. IR (KBr pellet): 696, 721, 737, 910, 1109, 1134, 1466, 1641, 2850, 2918 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{78}\text{O}_3$: C, 80.67; H, 12.00. Found: C, 80.69; H, 12.22.

(2*S*)-2-Benzylloxymethyl-1,4-dioxacyclohexatriacont-20-ene (140)

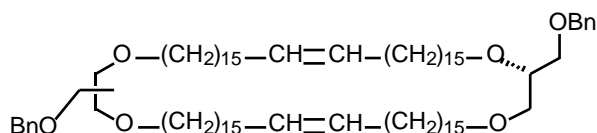
ルテニウムカルベン 触媒 $\text{RuCl}_2(=\text{CHPh})\text{PCy}_3$ **113** (29 mg, 0.036 mmol, 20 mol%) のジクロロメタン溶液 (40 ml) にジエン **139** (116 mg, 0.176 mmol) のジ

クロロメタン (20 ml) 溶液を加え、15 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、36 員環閉環体 **139** (83 mg, 75 %; *E/Z*=*ca.* 4:1) を白色粉末で得た。

mp 72-73 °C. ¹H-NMR (400 MHz): 1.25 (br, 48H), 1.55 (m, 4H), 1.99 (m, 4H), 3.40-3.65 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 5.35 (m, 2H), 7.25-7.33 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 26.10, 26.17, 26.93 (*Z*), 28.46, 28.98, 29.16, 29.33, 29.44, 29.54, 29.60, 29.65, 29.68, 30.06, 32.25 (*E*), 70.20, 70.58, 71.42, 71.51, 73.34, 78.01, 127.52, 127.57, 128.30, 130.00 (*Z*), 130.58 (*E*), 138.36. IR (CHCl₃): 670, 725, 1105, 1210, 2855, 2930 cm⁻¹. EI-MS: *m/z* 626 (*M*⁺), 535 (*M*⁺-CH₂Ph), 517, 443, 91. Anal. Calcd for C₄₂H₇₄O₃: C, 80.45; H, 11.90. Found: C, 80.60; H, 12.08.

(2*S*,39*S*)-2,39-bis(benzyloxymethyl)-1,4,37,40-tetraoxacycloheptacont-20,56-diene (142a)

(2*S*,38*S*)-2,38-bis(benzyloxymethyl)-1,4,37,40-tetraoxacycloheptacont-20,56-diene (142b)

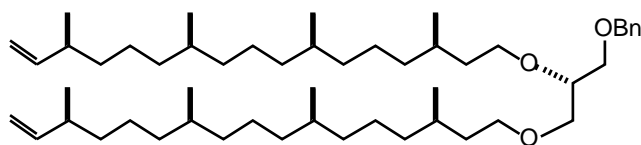


触媒 **113** (18 mg, 0.022 mmol, 20 mol%) のジクロロメタン溶液 (4 ml) に 36 員環閉環体 **140** (65.0 mg, 0.104 mmol) のジクロロメタン (20 ml) 溶液を加え、48 時間室温で攪拌した。反応液を濃縮後、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、72 員環閉環体 **142** (8.0 mg, 12 %; *E/Z*=*ca.* 4:1) を白色粉末で得た。

mp 82-85 °C. ¹H-NMR (400 MHz): 1.25 (br, 96H), 1.55 (m, 8H), 1.99 (m, 8H), 3.41-3.64 (m, 18H), 4.55 (s, 4H), 5.38 (m, 4H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 26.07, 26.12, 27.18 (*Z*), 29.08, 29.27, 29.46, 29.49, 29.60, 29.65, 30.07, 32.57 (*E*), 70.27, 70.60, 71.00, 71.60, 73.35, 77.96, 127.50, 127.57, 128.30, 129.90 (*Z*), 130.36 (*E*), 138.42. IR (KBr pellet): 696, 721, 962, 1120, 1468, 1734, 2850, 2918 cm⁻¹. EI-MS: *m/z* 1253 (*M*⁺), 1162 (*M*⁺-CH₂Ph), 1056. Anal. Calcd for C₈₄H₁₄₈O₆: C, 80.45; H, 11.90. Found: C, 80.18; H,

12.06.

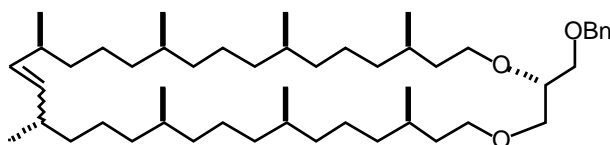
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-3,7,11,15-tetramethylheptadec-16-enyl]-*sn*-glycerol (135)



メチルトリフェニルホスホニウムブロミド (331 mg, 0.927 mmol) を THF (8 ml) に懸濁させ、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で *n*-ブチルリチウム (1.59 M in hexane, 0.580 ml, 0.922 mmol) を滴下した。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌し、次いで室温で 30 分間攪拌した。反応液を再び $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ にし、ジアルデヒド **70** (139 mg, 0.180 mmol) の THF 溶液 (5 ml) を加えた。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 15 分間攪拌し、さらに室温で 1 時間攪拌した。飽和 NH_4Cl (10 ml) で反応を停止し、反応液をエーテルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (50:1, v/v)) で精製し、ジエン **135** (131 mg, 95 %) を無色油状物で得た。

[^{21}D] +6.63° (*c* 0.89, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84 (d, J = 6.6, 9H), 0.86 (d, J = 6.6, 9H), 0.98 (d, J = 6.6, 6H), 1.50-1.70 (m, 46H), 2.10 (m, 2H), 3.42-3.66 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 4.93 (ddd, J = 1.7, 2.0, and 10, 2H), 4.94 (ddd, J = 1.2, 1.7, and 17, 2H), 5.69 (ddd, J = 7.6, 10, and 17, 2H), 7.25-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.68, 19.72, 19.76, 20.24, 24.36, 24.48, 24.62, 29.80, 29.88, 32.74, 32.80, 36.63, 36.97, 37.09, 37.39, 37.46, 37.51, 37.76, 68.87, 69.95, 70.30, 70.78, 73.34, 77.93, 112.20, 127.48, 127.56, 128.29, 138.42, 144.98. IR (neat): 696, 733, 908, 1115, 1377, 1462, 1639, 2860, 2925, 2952 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{52}\text{H}_{94}\text{O}_3$: C, 81.40; H, 12.35. Found: C, 81.15; H, 12.61.

(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-2-Benzylloxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxacyclohexatriacont-20-ene (136)



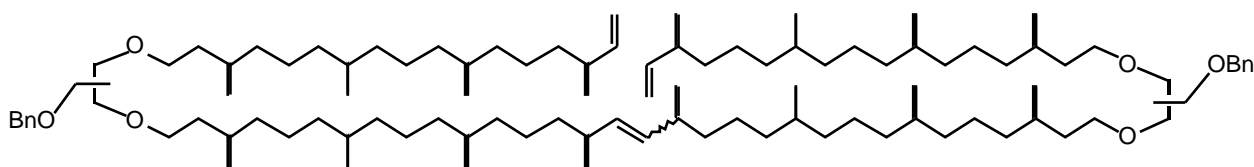
ジエン **135** (32 mg, 0.042 mmol) をジクロロメタン (5 ml) に溶かし、加熱還流した系中に触媒 **113** (10 mg, 0.012 mmol, 29 mol%) のジクロロメタン溶液 (6 ml) を加え、22.5 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、36 員環閉環体 **136** (24 mg, 79 %; *E/Z*=ca. 7:1) を無色油状物で得た。

¹H-NMR (400 MHz): 0.83 (d, *J*= 6.4, 6H), 0.84 (d, *J*= 6.4, 6H), 0.87 (d, *J*= 6.6, 6H), 0.94 (d, *J*= 6.6, 6H), 1.50-1.70 (m, 46H), 2.01 (m, 2H), 3.46-3.64 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 5.10 (dd, *J*= 2.4 and 5.1, 1.75H), 5.22 (dd, *J*= 2.0 and 4.2, 0.25H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 19.78, 19.85, 21.82, 24.50, 25.06, 29.61, 29.74, 32.85, 32.87, 36.65, 36.98, 37.23, 37.33, 37.36, 37.46, 37.49, 37.77, 68.59, 69.71, 70.30, 71.45, 73.36, 77.94, 127.52, 127.58, 128.31, 134.18, 134.98, 138.38. IR (neat): 696, 733, 968, 1115, 1377, 1462, 1736, 2858, 2925, 2951 cm⁻¹. EI-MS: *m/z* (rel. intensity) 739 (*M*⁺, 7%), 648 (*M*⁺-CH₂Ph, 100%), 633 (43%), 556 (20%). Anal. Calcd for C₅₀H₉₀O₃: C, 81.24; H, 12.27. Found: C, 81.02; H, 12.46.

2,3'-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*,18*S*,22*S*,26*R*,30*R*)-3,7,11,15,18,22,26,30-Octamethyldotriacont-16-ene-1,32-diyl]-2',3-bis-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-3,7,11,15-tetramethylheptadec-16-ene-1-yl]bis(1-*O*-Benzyl-*sn*-glycerol) (137a)

2,2'-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*,18*S*,22*S*,26*R*,30*R*)-3,7,11,15,18,22,26,30-Octamethyldotriacont-16-ene-1,32-diyl]-3,3'-bis-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-3,7,11,15-tetramethylheptadec-16-ene-1-yl]bis(1-*O*-Benzyl-*sn*-glycerol) (137b)

3,3'-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*,18*S*,22*S*,26*R*,30*R*)-3,7,11,15,18,22,26,30-Octamethyldotriacont-16-ene-1,32-diyl]-2,2'-bis-O-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-3,7,11,15-tetramethylheptadec-16-ene-1-yl]bis(1-*O*-Benzyl-*sn*-glycerol) (137b')



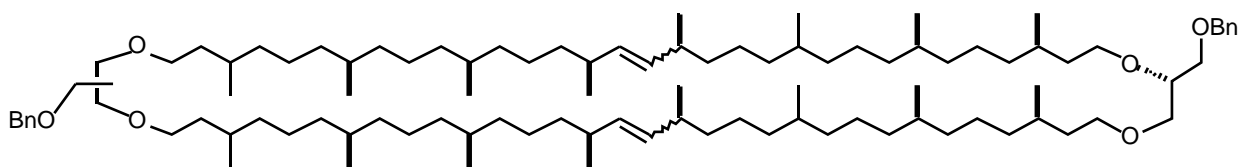
ジエン **135** (25 mg, 0.032 mmol) をジクロロメタン (0.2 ml) に溶かし、室温の系中に触媒 **113** (5.4 mg, 6.6 mmol) のジクロロメタン溶液 (0.10 ml) を加え、9

時間室温で攪拌した。反応液を濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、トリエン **137** (8.4 mg, 35 %) 及び原料回収ジエン **135** (14.3 mg, 57 %) を無色油状物で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.83 (d, $J=6.4$, 6H), 0.84 (d, $J=6.6$, 12H), 0.86 (d, $J=6.4$, 12H), 0.87 (d, $J=6.8$, 6H), 0.95 (d, $J=6.8$, 6H), 0.98 (d, $J=6.8$, 6H), 1.00-1.70 (m, 92H), 1.95-2.20 (br, 4H), 3.42-3.66 (m, 18H), 4.55 (s, 4H), 4.89 (ddd, $J=1.7, 2.0$, and 10, 2H), 4.94 (ddd, $J=1.2, 2.0$, and 17, 2H), 5.10 (dd, $J=2.4$ and 5.4, 0.4H), 5.17 (dd, $J=2.2$ and 4.6, 1.6H), 5.81 (ddd, $J=7.6, 10$, and 17, 2H), 7.26-7.34 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.68, 19.72, 19.75, 20.23, 21.17, 24.37, 24.48, 24.51, 24.63, 24.73, 29.69, 29.83, 29.91, 32.75, 32.82, 36.65, 36.70, 36.98, 37.11, 37.40, 37.47, 37.54, 37.75, 68.89, 69.97, 70.34, 70.80, 73.35, 77.95, 112.20, 127.48, 127.57, 128.29, 134.40, 134.57, 138.44, 145.01. IR (neat): 696, 735, 908, 1115, 1377, 1462, 1734, 2858, 2925, 2952 cm^{-1} . EI-MS: m/z (rel. intensity) 1505 (M^+ , 4%), 1414 ($M^+-\text{CH}_2\text{Ph}$, 100%), 1308 (55%). Anal. Calcd for $\text{C}_{102}\text{H}_{184}\text{O}_6$: C, 81.32; H, 12.31. Found: C, 81.19; H, 12.61.

(2S,7R,11R,15S,19S,22S,26S,30R,34R,38S,43R,47R,51S,55S,58S,62S,66R,70R)-2,38-Bis(benzyloxymethyl)-7,11,15,19,22,26,30,34,43,47,51,55,58,62,66,70-hexadecamethyl-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacont-20,56-diene (138a)

(2S,7R,11R,15S,19S,22S,26S,30R,34R,39S,43R,47R,51S,55S,58S,62S,66R,70R)-2,39-Bis(benzyloxymethyl)-7,11,15,19,22,26,30,34,43,47,51,55,58,62,66,70-hexadecamethyl-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacont-20,56-diene (138b)

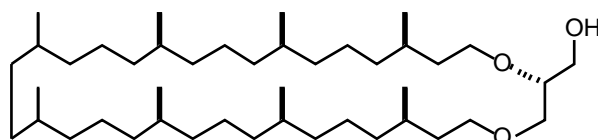


トリエン **137** (68.2 mg, 45.3 mmol) をジクロロメタン (42 ml) に溶かし、加熱還流した系中に触媒 **113** (13.3 mg, 36 mol%) のジクロロメタン溶液 (3.0 ml) を

加え、72 時間加熱還流した。反応液を濃縮後、得られた残渣をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、72 員環閉環体 **138** (31 mg, 46 %) 及び原料回収トリエン **137** (27 mg, 40 %) を無色油状物で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.83 (d, $J= 6.4$, 12H), 0.84 (d, $J= 6.6$, 12H), 0.87 (d, $J= 6.6$, 12H), 0.94 (d, $J= 6.8$, 12H), 0.98-1.70 (m, 92H), 2.02 (br, 4H), 3.45-3.66 (m, 18H), 4.55 (s, 4H), 5.15 (dd, $J= 2.2$ and 4.6, 3.7H), 5.19 (dd, $J= 2.0$ and 4.6, 0.3H), 7.26-7.34 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.75, 19.81, 21.37, 24.39, 24.50, 24.80, 29.70, 29.76, 29.86, 32.77, 32.82, 36.64, 36.87, 37.10, 37.40, 37.44, 37.48, 37.51, 37.60, 68.81, 69.91, 70.32, 70.96, 73.35, 77.95, 127.49, 127.57, 128.30, 134.67, 138.42. IR (neat): 696, 733, 968, 1115, 1377, 1462, 1743, 2856, 2925, 2952 cm^{-1} . EI-MS: m/z (rel. intensity) 1477 (M^+ , 4%), 1386 ($M^+-\text{CH}_2\text{Ph}$, 100%), 1280 (57%). Anal. Calcd for $\text{C}_{100}\text{H}_{180}\text{O}_6$: C, 81.24; H, 12.27. Found: C, 81.24; H, 12.42.

(2R,7R,11R,15S,19S,22S,26S,30R,34R)-2-Hydroxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxacyclohexatriacontane (5)



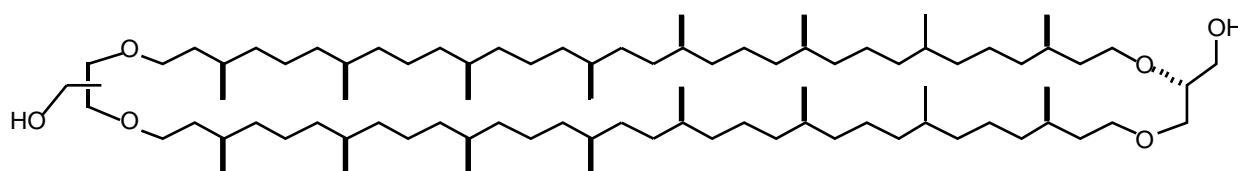
ベンジルエーテル **136** (15 mg, 21 mmol) を酢酸エチル (5 ml) に溶かし、10% Pd-C (17 mg) を加えて水素雰囲気下、室温で 21 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、36 員環コア脂質 **5** (10 mg, 75 %) を無色油状物で得た。

[^{20}D] +8.22° (c 1.01, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.85 (d, $J= 6.6$, 12H), 0.88 (d, $J= 6.6$, 6H), 0.89 (d, $J= 6.3$, 6H), 1.00-1.70 (m, 52H), 2.15 (br, 1H), 3.46-3.71 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.85, 19.93, 20.03, 20.09, 23.97, 24.27, 24.42, 29.72, 29.77, 32.41, 32.47, 32.60, 32.67, 32.77, 33.03, 33.58, 34.16, 36.54, 36.68, 37.00, 37.26, 63.03, 68.53, 70.00, 71.19, 78.38. IR (neat): 804, 1051, 1115, 1377, 1462, 2858, 2925, 2951, 3446 cm^{-1} .

EI-MS: m/z (rel. intensity) 651 (M^+ , 100%), 633 ($M^+ - H_2O$, 60%), 621 (59%). Anal. Calcd for $C_{43}H_{86}O_3$: C, 79.32; H, 13.31. Found: C, 79.03; H, 13.40.

(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*,38*S*,43*R*,47*R*,51*S*,55*S*,58*S*,62*S*,66*R*,70*R*)-2,38-Bis(hydroxymethyl)-7,11,15,19,22,26,30,34,43,47,51,55,58,62,66,70-hexadecamethyl-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (7a)

(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*,39*S*,43*R*,47*R*,51*S*,55*S*,58*S*,62*S*,66*R*,70*R*)-2,39-Bis(hydroxymethyl)-7,11,15,19,22,26,30,34,43,47,51,55,58,62,66,70-hexadecamethyl-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (7b)

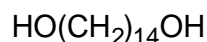


ベンジルエーテル **138** (7.4 mg, 5.0 mmol) を酢酸エチル (5 ml) に溶かし、10% Pd-C (9.4 mg) を加えて水素雰囲気下、室温で 34 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1, v/v)) で精製し、72 員環コア脂質 **7ab** (5.1 mg, 78 %) を無色油状物 (混合物) で得た。

[^{22}D] +7.31° (c 0.51, $CHCl_3$). 1H -NMR (400 MHz): 0.85 (d, J = 6.4, 24H), 0.88 (d, J = 6.6, 12H), 0.89 (d, J = 6.6, 12H), 1.00-1.70 (m, 104H), 2.17 (br, 2H), 3.46-3.75 (m, 18H). ^{13}C -NMR (100 MHz): 19.76, 19.83, 19.85, 24.37, 24.46, 29.79, 29.84, 32.79, 33.06, 34.30, 36.57, 37.06, 37.37, 37.51, 63.08, 68.59, 70.09, 71.06, 78.34. IR (neat): 1041, 1109, 1377, 1462, 2856, 2925, 2952, 3435 cm^{-1} . EI-MS: m/z (rel. intensity) 1301 (M^+ , 76%), 1283 ($M^+ - H_2O$, 54%), 1271 (61%), 650 (100%). Anal. Calcd for $C_{86}H_{172}O_6$: C, 79.32; H, 13.31. Found: C, 79.02 H, 13.59.

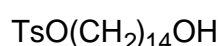
第 4 章

1,14-Tetradecanediol (164)



1,14-テトラデカン二酸 **163** (16.5 g, 63.9 mmol) を 5 % 硫酸 - メタノール 溶液 (200 ml) に溶かし、50 °C で 2.5 時間反応させた。反応液を氷冷水 (500 ml) に注ぎ込み、生じた白色固体を吸引濾過で集めて 2 回水で洗浄し、デシケーターで乾燥させジエステルを粗生成物 (22.2 g) で得た。それを THF (340 ml) に溶かし、0 °C で水素化リチウムアルミニウム (5.20 g, 137 mmol) をゆっくりと加えた。5.5 時間室温で攪拌後、反応物をエーテルで希釈し、2N HCl を加えた。水相をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をアセトンから再結晶し、ジオール **164** (13.6 g, 93 %) を白色粉末として得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 10:1): 1.27 (br, 20H), 1.51-1.60 (m, 4H), 3.59 (t, *J* = 6.6, 4H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃:CD₃OD = 10:1): 25.68, 29.38, 29.53, 32.45, 62.38.

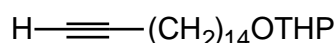
14-*p*-Toluenesulfonyloxytetradecanol (165)

ジオール **164** (8.2 g, 36 mmol) をピリジン (120 ml) - ジクロロメタン (60 ml) に溶解し、0 °C で塩化 *p*-トルエンスルホニル (6.8 g, 36 mmol) を加え、そのままの温度で 1 時間攪拌した。水 (50 ml) を加え反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl、飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (benzene-EtOAc = 10:1 to CHCl₃) で精製し、モノトシラート **165** (5.7 g, 41 %), 未反応ジオール (3.5 g, 43 %) 及びジトシラート (2.8 g, 15 %) を各々得た。

¹H-NMR (300 MHz): 1.21 (br, 20H), 1.50-1.67 (m, 4H), 2.45 (s, 3H), 3.64 (t, *J* = 6.6, 2H),

4.01 (t, $J= 6.6$, 2H), 7.35 (d, $J= 8.0$, 2H), 7.79 (d, $J= 8.3$, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 21.59, 25.23, 25.66, 28.70, 28.84, 29.31, 29.36, 29.40, 29.50, 29.53, 32.70, 62.97, 70.68, 127.81, 129.75, 132.97, 144.60.

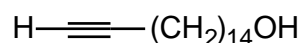
2-(15-Hexadecyloxy)-tetrahydro-2H-pyran (166)



トシラート **165** (13.4 g, 34.8 mmol) をジクロロメタン (25 ml) に溶かし、3,4-ジヒドロ-2H-ピラン (4.00 ml, 44.2 mmol), *p*-トルエンスルホン酸 (62 mg) を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。飽和 NaHCO_3 (15 ml) を加え、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、粗生成物を得た。それを DMF (40 ml) に溶かし、臭化リチウム (21.1 g, 243 mmol) を加えて 50 °C で 3 時間攪拌した。水 (50 ml) を加え、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1)) で精製し、臭化物 (12.3 g, 92 %) を得た。

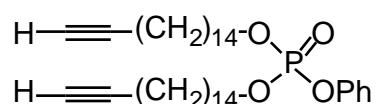
臭化物 (12.3 g, 32.6 mmol) を DMSO (30 ml) に溶かし、リチウムアセチリド・エチレンジアミン錯体 (15.0 g, 163 mmol) を一気に加え、室温で 4.5 時間攪拌した。水 (50 ml) を加え反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl、飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1)) で精製し、アセチレン **166** (9.4 g, 89 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 1.25-1.45 (br, 20H), 1.48-1.90 (m, 10H), 1.94 (t, $J= 2.7$, 1H), 2.18 (dt, $J= 2.7$, 6.9, 2H), 3.34-3.42 (dt, $J= 6.7$, 9.5, 1H), 3.46-3.54 (m, 1H), 3.69-3.76 (dt, $J= 6.7$, 9.5, 1H), 3.84-3.91 (m, 1H), 4.56-4.59 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 18.39, 19.70, 25.50, 26.23, 28.48, 28.75, 29.10, 29.49, 29.59, 29.62, 29.74, 30.78, 62.34, 67.70, 68.00, 84.81, 98.83. IR (CHCl_3): 640, 720, 1025, 1080, 1125, 1140, 1460, 2860, 2935, 3320 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_2$: C, 78.20; H, 11.88. Found: C, 78.47; H, 12.02.

15-Hexadecyn-1-ol (167)¹¹ⁿ⁾

化合物 **166** (9.4 g, 29.1 mmol) を THF (30 ml) - メタノール (30 ml) に溶解し、2N HCl (10 ml) を加えて室温で 16 時間攪拌した。反応物を濃縮し、得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1)) で精製し、アルコール **167** (6.4 g, 93 %) を白色粉末で得た。

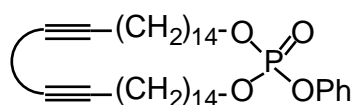
¹H-NMR (300 MHz): 1.26 (br, 20H), 1.48-1.59 (m, 4H), 1.94 (t, *J* = 2.7, 1H), 2.18 (dt, *J* = 2.7, 7.1, 2H), 3.64 (t, *J* = 6.6, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz): 18.37, 25.72, 28.47, 28.74, 29.08, 29.40, 29.47, 29.58, 29.60, 32.78, 63.06, 68.00, 84.81.

Di-15-hexadecynyl phenyl phosphate (168)

アルコール **167** (931 mg, 3.90 mmol), トリエチルアミン (710 μl, 5.10 mmol) 及び 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) (25 mg, 5.2 mol%) をベンゼン (10 ml) に溶解し、フェニルリン酸ジクロリド (290 μl, 2.00 mmol) を 0 °C でゆっくり滴下し、そのままの温度で 15 時間攪拌した。水を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl、飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1, v/v)) で精製し、リン酸トリエステル **168** (1.12 g, 93 %) を得た。

¹H-NMR (400 MHz): 1.25-1.40 (br, 40H), 1.48-1.57 (m, 4H), 1.63-1.72 (m, 4H), 1.93 (t, *J* = 2.7, 2H), 2.18 (dt, *J* = 7.1, 2.7, 4H), 4.09-4.17 (m, 4H), 7.14-7.36 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 18.35, 25.34, 28.45, 28.72, 28.88, 29.07, 29.47, 29.51, 29.58, 30.13, 30.20, 68.00, 68.51 (d, *J* = 5.5), 84.74, 119.92 (d, *J* = 3.6), 124.84, 129.60, 150.76 (d, *J* = 7.3). ³¹P-NMR (109 MHz): -6.22. IR (CHCl₃): 630, 950, 1020, 1270, 1460, 1485, 1590, 2850, 2925, 3300 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₃₈H₆₃O₄P: C, 74.23; H, 10.33. Found: C, 74.07; H, 10.10.

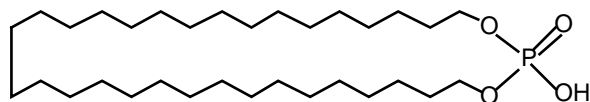
15,17-Dotriacontadiyne-1,32-diylphenyl phosphate (170)



N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TMEDA) (510 μ l, 3.40 mmol) 及び塩化銅 (I) (319 mg, 3.23 mmol) を加えたキシレン (250 ml) を、酸素ガスを通じながら 2 時間加熱還流した後、ジイン 168 (793 mg, 1.29 mmol) のキシレン溶液 (40 ml) を電動シリンジポンプで 5 時間かけて滴下した。滴下終了後、さらに 30 分加熱還流した。反応液を室温まで冷ました後酸素ガスを止め、溶媒を除去した。残渣に酢酸エチル及び 2*N* HCl を加え、さらに水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1, v/v)) で精製し、閉環体 170 (363 mg, 46%) を白色結晶で得た。

mp 64-65 $^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 1.20-1.46 (br, 40H), 1.46-1.55 (m, 4H), 1.64-1.73 (m, 4H), 2.26 (t, $J=6.7$, 4H), 4.08-4.21 (m, 4H), 7.14-7.36 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.04, 25.25, 27.93, 28.38, 28.88, 28.91, 29.18, 29.22, 29.27, 29.32, 29.36, 30.02, 30.11, 65.36, 68.43 (d, $J=6.8$), 77.35, 119.84 (d, $J=5.0$), 124.80, 129.55, 150.67 (d, $J=7.5$). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): -6.20. IR (CHCl_3): 955, 1030, 1275, 1465, 1490, 1600, 2850, 2925 cm^{-1} . EI-MS: m/z 612 (M^+), 438, 175. Anal. Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{61}\text{O}_4\text{P}$: C, 74.47; H, 10.03. Found: C, 74.64; H, 10.20.

Dotriacontane-1,32-diyl phosphate (160)

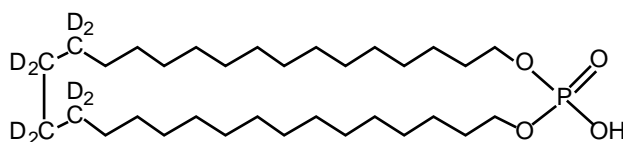


リン酸トリエステル 170 (310 mg, 0.506 mmol) をエタノール (40 ml) に溶かし、酸化白金 (IV) (100 mg) を加えて水素雰囲気下 48 時間室温で攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、クロロホルム - エタノール (1:1) でセライトを数回

洗淨した。濾液を濃縮し、残渣をヘキサンより再結晶して環状リン酸ジエステル **160** (213 mg, 79 %) を白色固体で得た。

mp 87-88 °C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 1.25-1.45 (br, 56H), 1.64-1.72 (br, 4H), 3.96-4.03 (br, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD} = 2:1$): 25.12, 28.23, 28.28, 28.41, 28.52, 28.68, 28.72, 28.83, 28.94, 29.09, 29.12, 29.84, 29.89, 66.84 (d, $J = 5.4$). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): 0.98. IR (CHCl_3): 955, 1030, 1275, 1465, 1490, 1600, 2850, 2925 cm^{-1} . Negative FAB-MS: m/z 543 (M^+-1), 79. Anal. Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{65}\text{O}_4\text{P}$: C, 70.54; H, 12.03. Found: C, 70.78; H, 12.00.

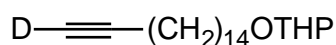
[15,16,17,18- $^2\text{H}_2$]Dotriacontane-1,32-diyl phosphate (161)



リン酸トリエステル **170** (106 mg, 0.506 mmol) をエタノール- d (4.0 ml) に溶かし、酸化白金 (IV) (31 mg) を加えて重水素雰囲気下 64 時間室温で攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、クロロホルム - エタノール (1:1) でセライトを数回洗淨した。濾液を濃縮し、残渣をヘキサンより再結晶して環状リン酸ジエステル- d_8 **161** (55 mg, 57 %) を白色固体で得た。

mp 84-85 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD} = 2:1$): 1.25-1.40 (br, 48H), 1.63-1.72 (br, 4H), 3.96-4.03 (br, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD} = 2:1$): 25.18, 28.24, 28.57, 28.78, 28.79, 28.91, 29.01, 29.12, 29.15, 29.20, 29.25, 29.26, 29.31, 66.90 (d, $J = 3.2$ Hz). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): 1.23 IR (CHCl_3): 1020, 1220, 1460, 2080, 2180, 2850, 2925 cm^{-1} . Negative FAB-MS: m/z 551 (M^+-1). HR negative FAB-MS: Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{56}^2\text{H}_8\text{O}_4\text{P}$: 551.5044. Found: 551.5058.

[16- $^2\text{H}_1$]2-(15-Hexadecyloxy)tetrahydro-2H-pyran (171)

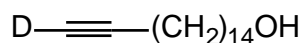


予め調製しておいた臭化エチルマグネシウムの THF 溶液 (13.0 ml, 1.90 M,

24.7 mmol) を、化合物 **166** (1.28 g, 4.03 mmol) の THF 溶液 (15 ml) に 0 °C でゆっくりと加え、室温で 2.5 時間撹拌した。再び 0 °C に冷却し、系中に重水 (3.00 ml, 148 mmol) を滴下して 2.5 時間室温で撹拌した。反応液をエーテルで希釈し、2N HCl を手早く加えた。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、THP-エーテル-*d*₁ **171** (1.25 g, 98 %) をワックス状固体で得た。

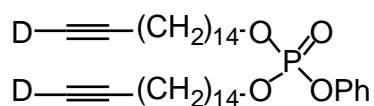
¹H-NMR (300 MHz): 1.25-1.45 (br, 20H), 1.48-1.90 (m, 10H), 2.18 (t, *J*= 6.9, 2H), 3.34-3.42 (dt, *J*= 6.7, 9.5, 1H), 3.46-3.54 (m, 1H), 3.69-3.76 (dt, *J*= 6.7, 9.5, 1H), 3.84-3.91 (m, 1H), 4.56-4.59 (m, 1H). ¹³C-NMR (75 MHz): 18.29, 19.62, 25.46, 26.19, 28.44, 28.70, 29.05, 29.43, 29.44, 29.54, 29.58, 29.69, 30.72, 62.21, 67.60, 67.74 (t, *J*= 37.5), 84.18 (t, *J*= 7.5), 98.73. IR (CHCl₃): 1025, 1075, 1120, 1135, 1460, 2590, 2850, 2920 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₂₁H₃₇²H₁O₂: C, 77.96; H+²H, 11.84. Found: C, 77.77; H+²H, 11.86.

[16-²H₁]15-hexadecyn-1-ol (**172**)



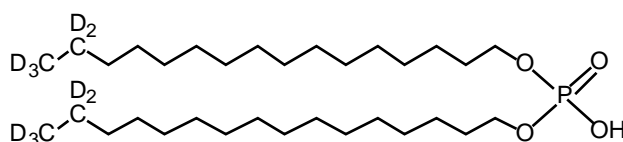
化合物 **171** (1.25 g, 3.86 mmol) を THF - メタノール (1:1, 10 ml, v/v) に溶解し、2N HCl (1 ml) を加えて室温で 17 時間撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1, v/v)) で精製し、アルコール-*d*₁ **172** (919 mg, 99 %) を白色粉末で得た。

mp 48-50 °C. ¹H-NMR (300 MHz): 1.25-1.47 (br, 20H), 1.48-1.61 (m, 4H), 2.18 (t, *J*= 6.9, 2H), 3.64 (t, *J*= 6.6, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz): 18.35, 25.72, 28.48, 28.75, 29.09, 29.41, 29.49, 29.58, 29.61, 32.78, 63.07, 67.76 (t, *J*= 37.5), 84.34 (t, *J*= 7.5). IR (CHCl₃): 1460, 2590, 2850, 2920 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₆H₂₉²H₁O: C, 80.27; H+²H, 12.63. Found: C, 80.30; H+²H, 12.63.

Di-[16-²H₁]15-hexadecynylphenyl phosphate (173)

アルコール-*d*₁ **172** (654 mg, 2.73 mmol), トリエチルアミン (500 μl, 3.55 mmol) 及び DMAP (29 mg, 8.8 mol%) をベンゼン (15 ml) に溶解し、0 °C でフェニルリン酸ジクロリド (210 μl, 1.37 mmol) をゆっくり滴下した。室温で 11 時間攪拌後、水を加えて反応を停止した。水層を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて 2N HCl、飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1, v/v)) で精製し、リン酸トリエステル -*d*₂ **173** (622 mg, 74 %) を得た。

¹H-NMR (300 MHz): 1.25-1.40 (br, 40H), 1.48-1.57 (m, 4H), 1.63-1.72 (m, 4H), 2.17 (t, *J* = 7.1, 4H), 4.09-4.17 (m, 4H), 7.14-7.36 (m, 5H). ¹³C-NMR (75 MHz): 18.31, 25.32, 28.44, 28.70, 29.04, 29.06, 29.44, 29.45, 29.49, 29.57, 30.12, 30.21, 67.76 (t, *J* = 36.8), 68.50 (d, *J* = 6.2), 84.23 (t, *J* = 7.4), 119.92 (d, *J* = 5.0), 124.84, 129.58, 150.78 (d, *J* = 6.8). ³¹P-NMR (109 MHz): -6.14. IR (CHCl₃): 950, 1020, 1280, 1460, 1490, 1590, 2590, 2850, 2920 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₃₈H₆₁²H₂O₄P: C, 73.99; H+²H, 10.29. Found: C, 73.71; H+²H, 10.48.

Di-[15-²H₂,16-²H₃]Hexadecyl phosphate (162)

リン酸トリエステル -*d*₂ **173** (452 mg, 0.733 mmol) をメタノール -*d* (4.0 ml) に溶かし、酸化白金 (IV) (70 mg) を加えて重水素雰囲気下 46 時間室温で攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、クロロホルム - メタノール (1:1) でセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をヘキサンより再結晶して環状リン酸ジエステル-*d*₁₀ **162** (207 mg, 51 %) を白色固体で得た。

mp 70-71 °C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 2:1): 1.25-1.45 (br, 48H), 1.64-1.73 (br, 4H), 3.96-4.02 (br, 4H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 2:1): 25.00, 28.66, 28.79, 29.03, 29.06, 29.12, 29.15, 29.74, 29.83, 31.11, 66.71 (d, *J* = 6.2). ³¹P-NMR (109 MHz): -0.22. IR (CHCl₃): 1020, 1230, 1460, 2200, 2850, 2925 cm⁻¹. Negative FAB-MS: *m/z* 555 (*M*⁺-1). Anal. Calcd for C₃₂H₅₇²H₁₀O₄P: C, 69.03; H+²H, 12.13. Found: C, 69.30; H+²H, 12.25.

非環状脂質 156 は市販品 (Fluka) を用いた。重水 (99.9 atom% enriched), DPH, TMA-DPH についても市販品 (各々 Aldrich, ナカライテスク, 同仁化学) を用いた。

電子顕微鏡観察

サンプル調製 : 3 mg の脂質薄膜に緩衝液 (250 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、超音波処理法で SUV 分散液を得た。

測定 : まず SUV 分散液をカーボン膜が載った銅メッシュ上に少量滴下する。数分後に余分な水滴を濾紙で吸い取り、グリッドを液体エタン中で急速冷却し、得られたガラス状グリッドを試料室に入れ -70 °C で観測した。

熱分析 (DSC)

サンプル調製 : 脂質薄膜に当量の 1M NaOH 及び緩衝液 (30 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、凍結融解法で LUV 分散液を調製した。

測定 : 脂質分散液を 70 μl のアルミニウム製パンに入れ、何度か昇温, 降温を繰り返した後、セイコー電子 2000 型示差走査熱量計により 1 °C/min の速度で走査した。

赤外吸収スペクトル

サンプル調製 : 脂質薄膜に当量の濃 NaOH 及び緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、5 分間ボルテックス処理した。分散液を凍結乾燥し、得られた粉末

を再び同量の重水に分散させ MLV 分散液を得た。

測定：脂質分散液を、窓材にフッ化カルシウムを用いたセルに入れ、パーキン・エルマー 2000 型フーリエ変換赤外吸収分光計 (積算回数 100 回) で測定した。セルホルダーには還流水を流して温度調節した。

単分子膜測定

測定：23 °C の緩衝液 (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) で満たした KSV2200 トラフ (164 x 270 mm, Surface Barostat) 上に脂質のクロロホルム溶液 (1 mg/ml) を滴下して 5 分間静置した後、0.25 mm/sec の一定速度で可動バリアを押し進めていき -A 曲線を得た。

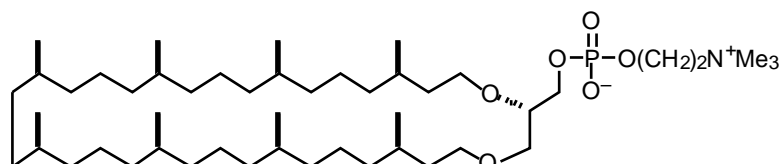
蛍光偏光解消

サンプル調製：蛍光プローブを含む脂質薄膜に緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 8.0) を加え、超音波処理法により蛍光プローブを膜内に含む SUV リポソームを調製した。

測定：励起側，蛍光側に各々偏光板を取り付けた島津 RF5300PC 蛍光分光光度計により励起波長 350 nm，蛍光波長 460 nm で蛍光強度を測定した (バンド幅は各々 3 nm, 5 nm)。またセルホルダーには還流水を流して温度調節をした。

第 5 章

(2*R*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-
2-*N,N,N*-trimethylaminoethylphosphonylmethyl-1,4-dioxacyclohexatriacontane
(176)

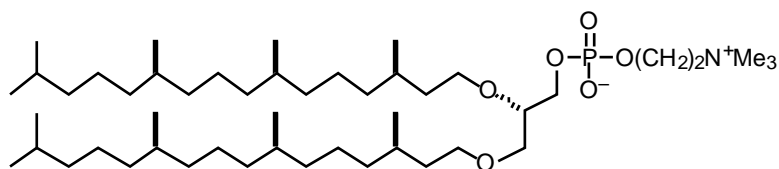


アルコール **5** (113 mg, 0.173 mmol) をピリジン (1 ml) に溶かし、0 °C で 2-クロロエチルリン酸ジクロリド (40 μ l, 0.31 mmol) を加えた。室温で 2.5 時間攪拌後、水 (5 ml) を加えて 1 時間攪拌した。反応液に 2*N* HCl を加えて酸性にし、クロロホルムで 4 回抽出した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH (20:1-7:1, v/v)) で精製し、リン酸ジエステル (172 mg) をワックスで得た。得られたリン酸ジエステルをトルエン (10 ml) 及びアセトニトリル (5 ml) に溶解し、ガラス製の耐圧チューブに移した。反応液を -78 °C に冷却し、蒸留したトリメチルアミン (10 ml) を加えた。封管し、50-60 °C で 3 日間攪拌した。-78 °C に冷却して開封し、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH (8:1, v/v)) to CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4)) で精製し、次いで Sephadex® LH-20 (CHCl₃-MeOH (2:1, v/v)) でさらに精製してホスホコリン **176** (85 mg, 60 %) をワックスで得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 8:1): 0.85-0.90 (m, 24H), 1.00-1.50 (m, 44H), 1.53-1.67 (m, 8H), 3.23 (s, 9H), 3.45-3.56 (m, 3H), 3.58-3.66 (m, 6H), 3.88 (t, *J* = 5.6, 2H), 4.26 (br, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 4:1): 19.29, 19.34, 19.44, 19.47, 19.53, 19.57, 19.63, 19.67, 19.81, 23.58, 23.63, 23.77, 23.82, 23.95, 24.00, 24.14, 29.36, 29.40, 29.44, 29.60, 31.85, 31.87, 32.07, 32.09, 32.15, 32.30, 32.34, 32.38, 32.50, 32.69, 32.96, 32.98, 33.70, 33.73, 36.20, 36.25, 36.39, 36.46, 36.49, 36.56, 36.63, 36.74, 36.76, 36.80, 36.89, 36.94, 36.98, 37.01, 37.07, 37.13, 37.18, 53.92, 58.70 (d, *J* = 4.4), 64.86 (d, *J* = 5.6), 66.18, 66.23, 66.26, 68.41, 69.72, 70.54, 77.67 (d, *J* = 8.6). High Resolution FAB-MS: Calcd

for $C_{48}H_{99}O_6NP$ ($M^{++}H$): 816.7210. Found: 816.7210.

2,3-Di-*O*-[(3*R*,7*R*,11*R*)-3,7,11,15-tetramethylhexadecyl]-*sn*-glycero-1-phosphocholine (177)

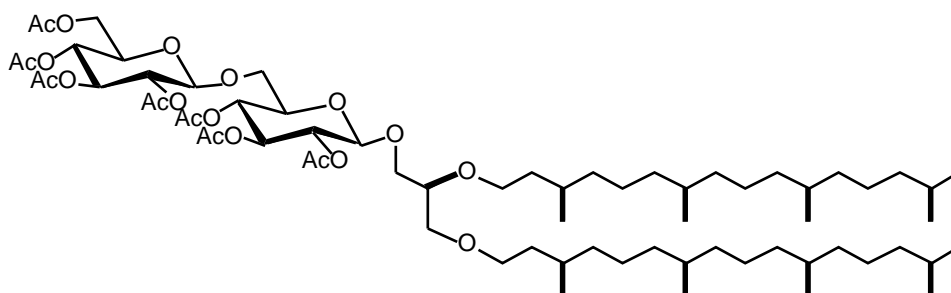


アルコール **1** (206 mg, 0.315 mmol) を、ホスホコリン **176** の合成と同様の方法で処理して、ホスホコリン **177** (109 mg, 44 %) をワックスで得た。

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$ - CD_3OD = 8:1): 0.83-0.88 (m, 30H), 1.00-1.41 (m, 40H), 1.46-1.64 (m, 8H), 3.24 (s, 9H), 3.45-3.50 (m, 3H), 3.54-3.66 (m, 6H), 3.88 (t, J = 6.0, 2H), 4.25 (br, 2H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$ - CD_3OD = 8:1): 19.39, 19.47, 22.36, 22.45, 24.15, 24.24, 24.55, 27.71, 29.60, 29.71, 32.54, 32.71, 36.44, 36.88, 37.04, 37.19, 37.32, 39.13, 53.98, 58.71 (d, J = 3.6), 64.81 (d, J = 5.4), 66.14, 68.61, 69.87, 70.49, 77.77 (d, J = 7.3).

High Resolution FAB-MS: Calcd for $C_{48}H_{101}O_6NP$ ($M^{++}H$): 818.7367. Found: 818.7385.

[(2'*R*,7'*R*,11'*R*,15'*S*,19'*S*,22'*S*,26'*S*,30'*R*,34'*R*)-7',11',15',19',22',26',30',34'-octamethyl-1',4'-dioxacyclohexatriacontan-2'-yl]methyl 6-*O*-(2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside (181)

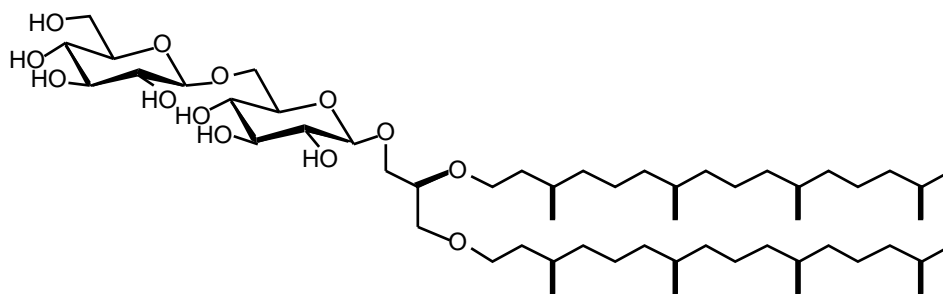


アルコール **5** (56.8 mg, 87.2 μ mol) 及びイミダゾール (55.5 mg, 815 μ mol) を DMF (4 ml) に溶かし、0 $^{\circ}C$ でトリメチルシリルクロリド (80 μ l, 0.63 mmol) を加えた。室温で 1.5 時間攪拌後、水 (10 ml) を加えてヘキサンで抽出した。有機層を水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られたシリルエー

テル, オクタアセチルゲンチオビオース **180**⁶⁴⁾ (91.2 mg, 134 μmol) 及びモレキュラーシーブス 4A (196 mg, flame dried for 4 hr) を 1,2-ジクロロエタン (8 ml) に溶解し、室温で 15 分間攪拌した。トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホナート (16.0 μl , 88.5 μmol) を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。トリエチルアミン (18.0 μl , 129 μmol) を加えて反応を停止し、不溶物をセライト濾過で除去し、クロロホルムでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3) で精製し、ヘプタアセチルグリコシド **181** (84 mg, 76%) をワックスで得た。

[^{28}D]-6.92° (c 0.760, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84-0.88 (m, 24H), 1.00-1.75 (m, 52H), 1.99-2.10 (7xs, 21H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 3.37-3.70 (m, 11H), 3.89 (m, 2H), 4.12 (dd, $J=2.2$ and 12.2, 1H, H-6'), 4.27 (dd, $J=4.6$ and 12.2, 1H, H-6'), 4.55 (d, $J=7.8$, 1H, H-1'), 4.59 (d, $J=8.1$, 1H, H-1), 4.90 (t, $J=9.5$, 1H, H-4), 4.96 (dd, $J=7.8$ and 9.5, 1H, H-2'), 4.99 (t, $J=8.1$ and 9.5, 1H, H-2), 5.07 (t, $J=9.5$, 1H, H-4'), 5.18 (t, $J=9.5$, 2H, H-3,3'). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.77, 19.81, 19.84, 19.86, 20.00, 20.04, 20.15, 20.56, 20.60, 20.64, 20.65, 20.71, 24.13, 24.17, 24.41, 29.70, 29.84, 32.61, 32.65, 32.79, 32.99, 33.33, 34.05, 34.08, 36.59, 37.12, 37.19, 37.25, 37.29, 37.33, 37.35, 37.39, 37.42, 61.80, 68.16, 68.27, 69.07, 69.15, 69.95, 70.35, 70.84, 71.04, 71.32, 71.95, 72.76, 72.85, 73.23, 77.92, 100.77, 100.85, 169.19, 169.28, 169.37, 169.57, 170.11, 170.21, 170.60. IR (CHCl_3): 1039, 1230, 1377, 1462, 1755, 2858, 2927, 2954 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{69}\text{H}_{120}\text{O}_{20}$: C, 65.27; H, 9.53. Found: C, 65.39; H, 9.74.

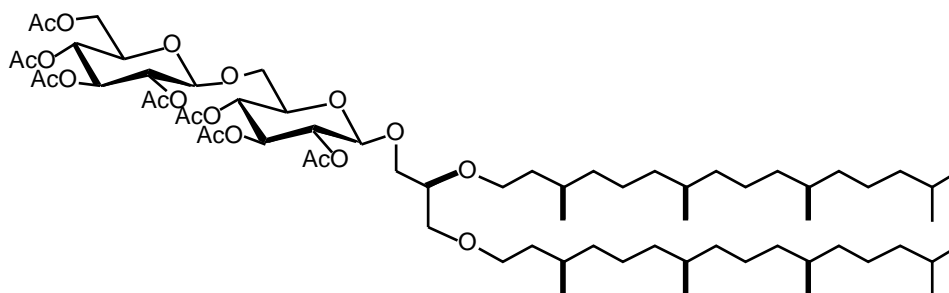
[(2'*R*,7'*R*,11'*R*,15'*S*,19'*S*,22'*S*,26'*S*,30'*R*,34'*R*)-7',11',15',19',22',26',30',34'-octamethyl-1',4'-dioxacyclohexatriacontan-2'-yl]methyl 6-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (**178**)



ヘプタアセチルグリコシド **181** (38.2 mg, 30.1 μmol) を THF (2 ml) 及びメタノール (2 ml) に溶かし、ナトリウムメトキシド (0.1 M in methanol, 305 μl , 30.5 μmol) を加えて室温で 21 時間攪拌した。反応系をメタノール (3 ml) で希釈し、Amberlyst® 15-イオン交換樹脂 (H^+ -form) (51 mg) を加えて中和した。樹脂をセライト濾過で除去し、クロロホルムでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣を Sephadex® LH-20 (CHCl_3 -MeOH (2:1, v/v)) で精製して糖脂質 **178** (30 mg, quant.) をワックスで得た。

[^{27}D] -22.4° (*c* 0.710, CHCl_3) (lit.⁶⁰ [^{27}D] -18.16°). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - $\text{CD}_3\text{OD} = 7:1$): 0.85-0.89 (8xd, 24H), 1.00-1.70 (m, 52H), 3.25-4.15 (m, 21H), 4.28 (d, $J = 7.8$, 1H, H-1), 4.33 (d, $J = 6.8$, 1H, H-1'). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, C_6D_6 - $\text{CD}_3\text{OD} = 7:1$): 19.84, 19.91, 20.02, 20.20, 20.24, 20.42, 24.54, 24.59, 24.91, 30.12, 30.25, 33.03, 33.08, 33.22, 33.25, 33.44, 34.38, 34.43, 37.13, 37.45, 37.48, 37.53, 37.55, 37.65, 37.77, 37.81, 37.84, 37.90, 61.93, 68.76, 68.85, 69.77, 70.02, 70.11, 70.49, 71.38, 74.10, 74.17, 75.74, 76.84, 76.88, 76.96, 78.49, 103.96, 104.21. IR (CHCl_3): 1072, 1377, 1464, 2870, 2927, 2954, 3384 cm^{-1} . High Resolution FAB-MS: Calcd for (M^+ +Na) 997.7531, found 997.7485.

2',3'-Bis{[(3'*R*,7'*R*,11'*S*)-3',7',11',15'-tetramethylhexadecyl]oxy}propyl 6-*O*-(2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl)-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside (182**)**

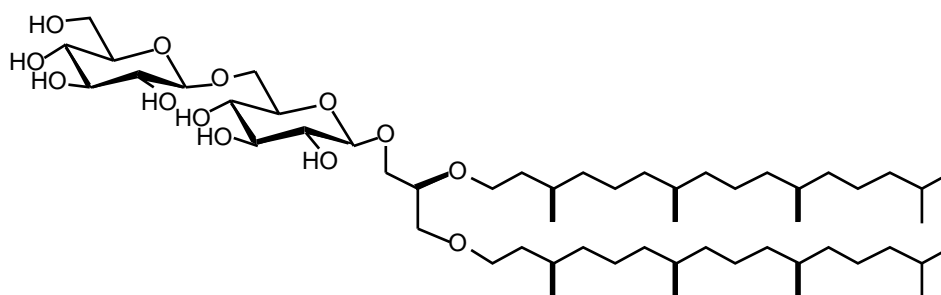


アルコール **1** (54.5 mg, 83.4 mmol) を、ヘプタアセチルグリコシド **181** の合成と同様の方法で処理して、ヘプタアセチルグリコシド **182** (58 mg, 54 %) をワックスで得た。

[^{26}D] -5.04° (*c* 0.413, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84-0.87 (10xd, 30H), 1.00-1.70 (m, 48H), 1.99-2.09 (7xs, 21H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 3.38-3.70 (m, 11H), 3.89 (m, 2H), 4.12 (dd, $J =$

2.2 and 12.2, 1H, H-6'), 4.27 (dd, $J= 4.6$ and 12.2 , 1H, H-6'), 4.56 (d, $J= 7.8$, 1H, H-1'), 4.60 (d, $J= 8.0$, 1H, H-1), 4.90 (t, $J= 9.5$, 1H, H-4), 4.96 (dd, $J= 7.8$ and 9.5 , 1H, H-2'), 4.99 (t, $J= 8.1$ and 9.5 , 1H, H-2), 5.07 (t, $J= 9.5$, 1H, H-4'), 5.18 (t, $J= 9.5$, 2H, H-3,3'). ^{13}C -NMR (100 MHz): 19.68, 19.73, 20.57, 20.60, 20.65, 20.72, 22.61, 22.71, 24.36, 24.46, 24.77, 27.95, 29.85, 29.92, 32.78, 32.80, 36.62, 37.16, 37.27, 37.41, 37.44, 37.49, 37.54, 39.34, 61.76, 68.15, 68.23, 69.14, 69.18, 70.07, 70.29, 70.48, 71.01, 71.32, 71.93, 72.76, 72.85, 73.21, 77.95, 100.75, 100.87, 169.17, 169.28, 169.37, 169.57, 170.12, 170.21, 170.61. IR (CHCl_3) 1039, 1230, 1377, 1466, 1755, 2871, 2927, 2958 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{69}\text{H}_{122}\text{O}_{20}$: C, 65.17; H, 9.67. Found: C, 64.88; H, 9.95.

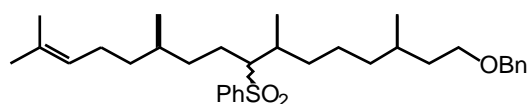
2',3'-Bis{[(3'R,7'R,11'S)-3',7',11',15'-tetramethylhexadecyl]oxy}propyl 6-O- β -D-glucopyranosyl- β -D-glucopyranoside (179)



ヘプタアセチルグリコシド **182** (30.7 mg, 24.1 mmol) を、糖脂質 **178** の合成と同様の方法で処理して、糖脂質 **179** (24 mg, quant.) をワックスで得た。

[^{26}D]-20.4° (c 0.523, CHCl_3) (lit.⁶³ [^{26}D]-25.10°). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 - CD_3OD = 7:1): 0.82-0.89 (10xd, 30H), 1.00-1.70 (m, 48H), 3.25-4.15 (m, 21H), 4.28 (d, $J= 7.6$, 1H, H-1), 4.33 (d, $J= 7.6$, 1H, H-1'). ^{13}C -NMR (100 MHz, C_6D_6 - CD_3OD = 8:1): 19.81, 19.85, 19.94, 22.76, 22.86, 24.89, 24.98, 25.26, 28.33, 30.14, 30.25, 30.35, 33.22, 33.27, 33.29, 37.19, 37.52, 37.72, 37.93, 38.02, 39.74, 61.94, 68.93, 69.79, 69.96, 70.25, 70.45, 71.21, 74.10, 74.15, 75.67, 76.80, 76.90, 78.51, 104.03, 104.31. IR (CHCl_3): 1072, 1377, 1458, 2858, 2927, 2952, 3396 cm^{-1} . High Resolution FAB-MS: Calcd for ($M^{++}\text{Na}$) 999.7688, found 999.7629.

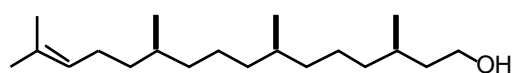
(3R,7S,11R)-1-Benzoyloxy-3,7,11,15-tetramethyl-8-phenylsulfonyl-14-hexadecene (193)



100 ml のシュレンク中にスルホン **83** (1.50 g, 3.87 mmol) 及び脱気した THF (15 ml) を加えた。 *n*-ブチルリチウム (1.59 M in hexane, 2.55 ml, 4.05 mmol) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で滴下し、同じ温度で 20 分間攪拌した。反応温度を $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ にして 15 分間攪拌し、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却した。 HMPA (6 ml) を加え、25 分後に (*R*)-ヨウ化シトロネリル **192** (1.18 g, 4.42 mmol) の脱気 THF 溶液 (11 ml) をゆっくり滴下した。 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 4 時間攪拌後、飽和 NH_4Cl で反応を停止した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、スルホン **193** (1.78 g, 87% as a mixture of diastereomers) を無色油状物で得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.79 (d, $J=6.4$, 3H), 0.82 (d, $J=6.6$, 3H), 1.01 (d, $J=6.6$ Hz, 3H), 1.00-1.70 (m, 15H), 1.58 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.75-1.95 (m, 3H), 2.10-2.25 (m, 1H), 2.82-2.89 (dt, $J=1.7$ and 5.6 , 1H), 3.42-3.52 (m, 2H), 4.49 (s, 2H), 5.04 (tt, $J=1.2$ and 7.1 , 1H), 7.26-7.35 (m, 5H), 7.53-7.64 (m, 3H), 7.87-7.89 (m, 2H). IR (neat) 692, 733, 1086, 1099, 1146, 1304, 1446, 2856, 2925, 2956 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{S}$: C, 75.24; H, 9.57. Found: C, 75.54; H, 9.69.

(3R,7R,11S)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-14-en-1-ol (194)

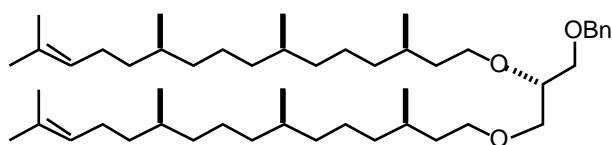


$-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ の液体アンモニア (300 ml) にリチウム片 (3.0 g, 0.43 mol) を加えて 3.5 時間攪拌後、さらにスルホン **193** (4.18 g, 7.93 mmol) の THF (60 ml) 溶液を 10 分間かけて加えた。得られた青色溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 25 分間、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2 時間攪拌した。再び $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却し、メタノール及び塩化アンモニウムを加えて反応を停止し、一晚室温で放置した。反応液にエーテル及び飽和 NH_4Cl を加え、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶

媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1, v/v)) で精製し、アルコール **194** (1.50 g, 64%) を無色油状物で得た。

[^{27}D +0.31° (c 0.43, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84 (d, $J=6.4$, 3H), 0.86 (d, $J=6.1$, 3H), 0.90 (d, $J=6.4$, 3H), 1.00-1.70 (m, 18H), 1.75-1.85 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 1.88-2.03 (m, 2H), 3.63-3.73 (m, 2H), 5.10 (tt, $J=1.2$ and 7.1, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 17.60, 19.64, 19.67, 19.76, 24.36, 24.40, 25.58, 25.70, 29.53, 32.44, 32.79, 37.10, 37.31, 37.37, 37.49, 39.97, 61.25, 125.10, 130.91. IR (neat) 1057, 1377, 1462, 2858, 2925, 2952, 3330 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}$: C, 81.01; H, 13.60. Found: C, 81.25; H, 13.36.

1-O-Benzyl-2,3-bis-O-[(3R,7R,11S)-3,7,11,15-tetramethylhexadec-14-enyl]-sn-glycerol (196)

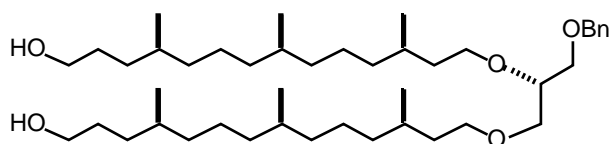


アルコール **194** (1.51 g, 5.10 mmol) 及びトリエチルアミン (2.15 ml, 15.4 mmol) をジクロロメタン (15 ml) にとかし、0 °C で塩化メタンスルホニル (480 μl , 6.20 mmol) を加え、同じ温度で 1 時間攪拌した。水 (10 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、メシラート **195** (1.86 g, 97%) を無色油状物で得た。

ヘキサンで予め洗浄した水素化ナトリウム (186 mg, 7.77 mmol) を DMSO (10 ml) に溶かし、1-O-ベンジル-sn-グリセロール **87** (443 mg, 2.43 mmol) の DMSO 溶液 (9 ml) を室温で加えた。室温で 2 時間攪拌後、メシラート **195** (1.78 g, 4.75 mmol) の DMSO 溶液 (14 ml) を室温でゆっくりと加えた。2 日間室温で攪拌し、水 (20 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて brine で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (100:1-20:1, v/v)) で精製し、化合物 **196** (964 mg, 54%) を無色油状物で得た。

[^{26}D] -0.50° (c 0.350, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.85 (d, $J=7.6$, 6H), 0.86 (d, $J=6.6$, 6H), 0.87 (d, $J=6.6$, 6H), 1.00-1.70 (m, 34H), 1.60 (s, 6H), 1.68 (s, 6H), 1.75-1.88 (m, 4H), 1.90-2.10 (m, 4H), 3.44-3.66 (m, 9H), 4.56 (s, 2H), 5.10 (tt, $J=1.2$ and 7.1 , 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 17.62, 19.64, 19.68, 19.71, 19.76, 24.36, 24.42, 25.58, 25.72, 29.82, 29.90, 32.44, 32.81, 36.64, 37.11, 37.32, 37.39, 37.54, 68.88, 69.97, 70.32, 70.79, 73.35, 77.94, 125.10, 127.49, 127.57, 128.29, 130.92, 138.43. IR (neat) 698, 733, 1115, 1377, 1454, 1745, 2858, 2925, 2956 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{90}\text{O}_3$: C, 81.24; H, 12.27. Found: C, 81.51; H, 12.50.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-14-hydroxy-3,7,11-trimethyltetradecyl]-*sn*-glycerol (197)

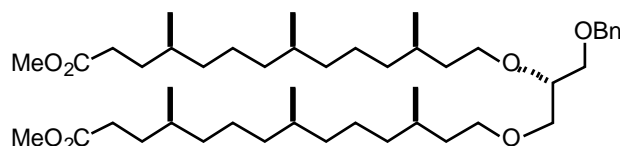


オゾンガスをジエン **196** (800 mg, 1.08 mmol) のメタノール溶液 (20 ml) に -78°C で 1.5 時間通じた。反応終了後溶液中のオゾンガスをアルゴンガスで 10 分間置換し、水素化ホウ素ナトリウム (120 mg, 3.17 mmol) を -78°C で注意深く加えた。室温までゆっくりと昇温し 5 時間攪拌後、溶媒を留去した。得られた残渣をエーテル及び 2N HCl で希釈し、水層をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1-2:1, v/v)) で精製し、ジオール **197** (655 mg, 88%) を無色油状物で得た。

[^{20}D] $+2.16^\circ$ (c 0.970, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.84 (d, $J=7.1$, 6H), 0.86 (d, $J=7.1$, 6H), 0.87 (d, $J=6.6$, 6H), 1.50-1.85 (m, 42H), 3.38-3.64 (m, 13H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.60, 19.66, 19.71, 19.76, 24.34, 24.38, 29.79, 29.86, 30.32, 32.59, 32.61, 32.74, 32.77, 32.87, 32.96, 36.59, 36.67, 37.05, 37.13, 37.19, 37.24, 37.29, 37.37, 37.41, 37.45, 37.48, 63.39, 68.87, 69.95, 70.28, 70.77, 73.33, 77.92, 127.48, 127.57, 128.28, 138.38. IR (neat) 698, 735, 752, 1061, 1113, 1377, 1462, 2860, 2925, 2951,

3356 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{O}_5$: C, 76.47; H, 11.96. Found: C, 76.57; H, 12.26.

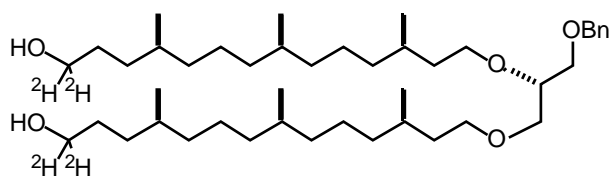
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-13-methoxycarbonyl-3,7,11-trimethyltridecyl]-*sn*-glycerol (198)



ジオール **197** (397 mg, 0.575 mmol) をアセトン (25 ml) に溶かし、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で Jones 試薬を液色が赤色になるまでゆっくりと滴下した。 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 4 時間攪拌後、2-プロパノールを加えて反応を停止した。緑色沈殿物をセライト濾過で除去し、エーテルでセライトを数回洗浄した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、ジカルボン酸を粗精製物で得た。得られたジカルボン酸を、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で過剰のジアゾメタン - エーテル溶液で 3 時間処理した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-ether (4:1, v/v)) で精製し、ジエステル **198** (258 mg, 60%) を無色油状物で得た。

[^{20}D] +3.35° (*c* 0.873, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.83-0.88 (d, J = 6.6, 18H), 1.00-1.85 (m, 38H), 2.29 (dt, J = 9.2 and 6.1, 4H), 3.66 (s, 6H), 3.44-3.66 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 19.22, 19.29, 19.60, 19.66, 19.70, 19.71, 24.33, 29.81, 29.90, 31.88, 31.97, 32.42, 32.78, 36.63, 36.72, 36.96, 36.99, 37.10, 37.18, 37.27, 37.29, 37.36, 37.45, 37.50, 51.44, 68.87, 69.96, 70.34, 70.79, 73.34, 77.95, 127.47, 127.56, 128.28, 138.44, 174.56. IR (neat) 698, 735, 1115, 1169, 1377, 1462, 1741, 2860, 2925, 2952 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{82}\text{O}_7$: C, 73.95; H, 11.06. Found: C, 73.66; H, 11.29.

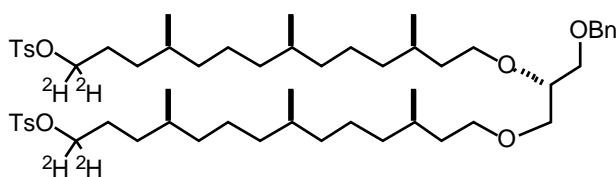
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-14-hydroxy-3,7,11-trimethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]tetradecyl]-*sn*-glycerol (199)



ジエステル **198** (258 mg, 0.345 mmol) の THF 溶液 (20 ml) に重水素化リチウムアルミニウム (61 mg, 1.5 mmol, 99 atom% enriched, Merck) を 0 °C で懸濁させ、0 °C で 12 時間攪拌した。2N HCl (10 ml) をゆっくりと加え反応を停止し、反応液をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (1:1, v/v)) で精製し、ジオール-*d*₄ **199** (225 mg, 94%) を無色油状物で得た。

[²⁸D +1.31° (c 0.410, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz): 0.84 (d, *J*= 7.1, 6H), 0.86 (d, *J*= 7.1, 6H), 0.87 (d, *J*= 6.3, 6H), 1.50-1.85 (m, 42H), 3.43-3.65 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (75 MHz): 19.68, 24.34, 24.39, 29.80, 29.87, 30.13, 32.60, 32.63, 32.77, 32.83, 32.93, 36.61, 36.68, 37.06, 37.14, 37.31, 37.42, 37.45, 37.49, 62.65 (quintet, *J*= 21), 68.87, 69.96, 70.31, 70.79, 73.34, 77.94, 127.48, 127.57, 128.28, 138.40. ²H-NMR (61.3 MHz, CHCl₃): 3.60. IR (neat) 698, 735, 968, 1113, 1377, 1462, 2090, 2191, 2860, 2925, 2951, 3415 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₄₄H₇₈²H₄O₅: C, 76.03; H+²H, 11.89. Found: C, 75.76; H+²H, 12.03.

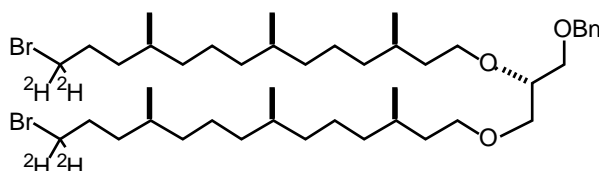
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-3,7,11-trimethyl-14-tosyloxy-[14,14-²H₂]tetradecyl]-*sn*-glycerol (200)



ジオール-*d*₄ **199** (220 mg, 0.316 mmol), DMAP (20 mg, 0.16 mmol) 及びトリエチルアミン (440 ml, 3.16 mmol) をジクロロメタン (10 ml) に溶かし、塩化 *p*-トルエンスルホン (300 mg, 1.57 mmol) を 0 °C で加え、そのままの温度で 5 時間攪拌した。水 (10 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロ

マトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、ジトシラート $-d_4$ **200** (315 mg, 99%) を無色油状物で得た。

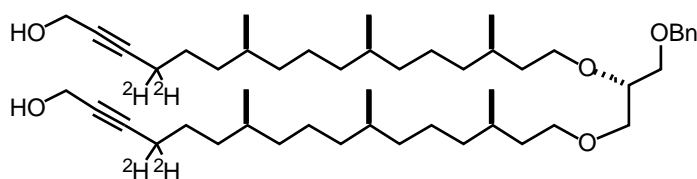
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-14-bromo-3,7,11-trimethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]tetradecyl]-*sn*-glycerol (201)



ジトシラート $-d_4$ **200** (215 mg, 0.214 mmol) を DMF (8 ml) に溶かし、臭化リチウム (300 mg, 3.45 mmol) を加えて 50 °C で 11 時間攪拌した。水 (10 ml) を加え、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (20:1)) で精製し、臭化物 $-d_4$ **201** (159 mg, 91%) を無色油状物で得た。

[$^{26}\text{D} + 3.98^\circ$ (c 0.67, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84 (d, $J = 6.6$, 6H), 0.86 (d, $J = 6.6$, 6H), 0.87 (d, $J = 6.4$, 6H), 1.00-1.95 (m, 42H), 3.44-3.66 (m, 9H), 4.56 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.62, 19.68, 19.72, 19.75, 24.37, 29.80, 29.88, 30.28, 32.22, 32.79, 33.87 (quintet, $J = 23$), 35.38, 36.62, 37.08, 37.18, 37.30, 37.35, 37.50, 37.52, 68.86, 69.95, 70.30, 70.78, 73.34, 77.93, 127.48, 127.56, 128.29, 138.42. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 3.38. IR (neat) 698, 758, 995, 1113, 1377, 1462, 2156, 2868, 2925, 2951 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{44}\text{H}_{76}^2\text{H}_4\text{Br}_2\text{O}_3$: C, 64.38; $\text{H}+^2\text{H}$, 9.82. Found: C, 64.35; $\text{H}+^2\text{H}$, 9.86.

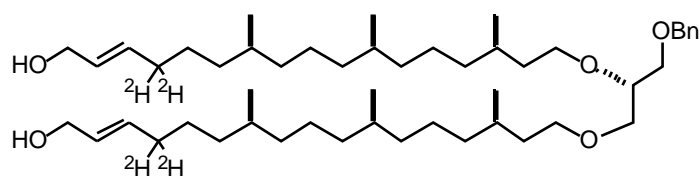
1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-17-hydroxy-3,7,11-trimethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]heptadec-15-yn-1-yl]-*sn*-glycerol (202)



テトラヒドロ -2-(2-プロピニルオキシ)-2*H*-ピラン (540 μ l, 3.84 mmol) の THF 溶液 (8 ml) 中に *n*-ブチルリチウム (1.59 M in hexane, 2.40 ml, 3.82 mmol) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で滴下し、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 30 分間攪拌した。反応液を再び $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却し、HMPA (4 ml) を加えた。25 分間攪拌後、臭化物 $-d_4$ **201** (300 mg, 0.365 mmol) の THF 溶液 (16 ml) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ でゆっくり滴下した。 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 20 分間、 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ で 1 時間攪拌した後、飽和 NH_4Cl (10 ml) を加えて反応を停止した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、得られた残渣を THF - メタノール (1:1, 40 ml) に溶かし、2*N* HCl (5 ml) を加えて室温で 12 時間反応させた。溶媒を除去後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1-2:1, v/v)) で精製し、プロパルギルアルコール $-d_4$ **202** (258 mg, 92%) を黄色油状物で得た。

[^{26}D] +2.83 $^{\circ}$ (*c* 0.670, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84 (d, $J=6.4$, 6H), 0.86 (d, $J=6.1$, 6H), 0.87 (d, $J=6.6$, 6H), 1.00-1.70 (m, 42H), 1.87 (br, 2H), 3.42-3.66 (m, 9H), 4.24 (br, 4H), 4.56 (s, 2H), 7.27-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 18.45 (quintet, $J=20$), 19.61, 19.65, 19.68, 19.74, 24.32, 24.36, 25.98, 29.77, 29.84, 32.38, 32.76, 36.123, 36.56, 37.02, 37.21, 37.31, 37.46, 37.48, 51.29, 68.86, 69.94, 70.23, 70.73, 73.31, 77.90, 78.31, 86.49, 127.47, 127.56, 128.26, 138.33. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 2.15. IR (neat) 698, 756, 1043, 1111, 1377, 1462, 1739, 2098, 2193, 2245, 2866, 2925, 3417 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{82}^2\text{H}_4\text{O}_5$: C, 77.87; H+ ^2H , 11.24. Found: C, 77.99; H+ ^2H , 11.45.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*E*)-17-hydroxy-3,7,11-trimethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]heptadec-15-en-1-yl]-*sn*-glycerol (203)

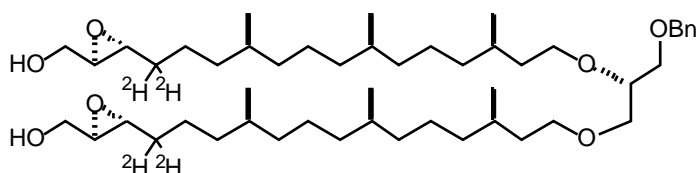


水素化リチウムアルミニウム (133 mg, 3.52 mmol) を THF (5 ml) に懸濁させ、プロパルギルアルコール $-d_4$ **202** (241 mg, 0.313 mmol) の THF 溶液 (10 ml) を

0 °C で 15 分間かけて滴下した。室温で 20 時間攪拌後、水 (3 ml) をゆっくりと加え、エーテル及び 2N HCl で希釈した。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (2:1, v/v)) で精製し、ビスアリルアルコール -*d*₄ **203** (117 mg, 48%) を無色油状物で得た。

[²⁶D] -0.58° (c 0.49, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz): 0.84 (d, *J* = 7.1, 6H), 0.85 (d, *J* = 5.6, 6H), 0.87 (d, *J* = 6.3, 6H), 1.00-1.75 (m, 42H), 3.44-3.64 (m, 9H), 4.08 (d, *J* = 4.9, 4H), 4.55 (s, 2H), 5.64 (dt, *J* = 15.4 and 4.9, 2H), 5.70 (d, *J* = 15.4, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (75 MHz): 19.68, 19.76, 24.35, 24.43, 26.45, 29.80, 29.88, 31.78 (m, *J* = 21), 32.66, 32.78, 36.48, 36.61, 37.07, 37.35, 37.50, 63.81, 68.87, 69.96, 70.29, 70.77, 73.34, 77.93, 127.48, 127.57, 128.28, 128.85, 133.46, 138.39. ²H-NMR (61.3 MHz, CHCl₃): 2.02. IR (neat) 698, 735, 754, 976, 1028, 1109, 1377, 1462, 2096, 2185, 2858, 2925, 2951, 3415 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₅₀H₈₆²H₄O₅: C, 77.47; H+²H, 11.70. Found: C, 77.36; H+²H, 11.87.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*R*,16*R*)-15,16-epoxy-17-hydroxy-3,7,11-trimethyl-[14,14-²H₂]heptadecyl]-*sn*-glycerol (204)

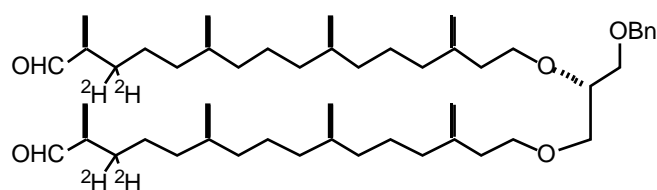


200 °C で加熱乾燥したモレキュラーシーブ 4A 粉末 (211 mg) に、直前に蒸留したジクロロメタン (4 ml) を加え、さらにオルトチタン酸テトライソプロピル (400 μl, 1.37 mmol) 及び D-(-)-酒石酸ジエチル (250 μl, 1.46 mmol) を -25 °C で加えてそのままの温度で 25 分間攪拌した。その中にビスアリルアルコール -*d*₄ **203** (180 mg, 0.232 mmol) のジクロロメタン溶液 (4 ml) を -25 °C で 5 分間かけて加えた。25 分後、*t*-ブチルヒドロペルオキシド (5.5 M in decane, 400 μl, 2.20 mmol) を -25 °C で滴下し、そのままの温度で 3 時間攪拌した。10% 酒石酸溶液 (5 ml) を加えて反応を停止し、室温で 1 時間攪拌した。不溶物を吸引濾過で除

去し、濾液をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られた残渣をエーテル (8 ml) 及び 10% NaOH (5 ml) で溶かし、0 °C で 30 分間攪拌した。反応液をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (2:1, v/v)) で精製し、ジエポキシド $-d_4$ **204** (111 mg, 59%) を無色油状物で得た。

[^{23}D] +13.5° (c 0.480, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84 (d, $J=7.3$, 6H), 0.86 (d, $J=6.8$, 6H), 0.87 (d, $J=6.4$, 6H), 1.00-1.90 (m, 42H), 2.92 (m, 2H), 2.95 (d, $J=2.0$, 2H), 3.42-3.65 (m, 11H), 3.91 (d, $J=12.0$, 2H), 4.56 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.61, 19.67, 19.70, 19.75, 23.23, 24.35, 24.42, 29.79, 29.87, 31.09 (m, $J=21$), 32.71, 32.78, 36.60, 36.65, 37.06, 37.27, 37.35, 37.49, 37.51, 55.87, 58.37, 61.67, 68.86, 69.95, 70.27, 70.76, 73.33, 77.91, 127.48, 127.56, 128.29, 138.38. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 1.55. IR (neat) 698, 737, 752, 1030, 1105, 1377, 1462, 2110, 2195, 2860, 2925, 2951, 3440 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{86}^2\text{H}_4\text{O}_7$: C, 74.40; H+ ^2H , 11.24. Found: C, 74.27; H+ ^2H , 11.29.

1-*O*-Benzyl-2,3-bis-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*,15*S*)-15-formyl-3,7,11,15-tetramethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]pentadecyl]-*sn*-glycerol (205)

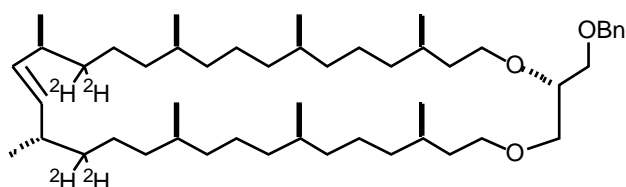


ジエポキシド $-d_4$ **204** (109 mg, 0.136 mmol) を直前に蒸留したジクロロメタン (4 ml) に溶かし、トリメチルアルミニウムのヘキサン溶液 (1.00 M, 1.40 ml, 1.41 mmol) を 0 °C で 5 分間かけて加え、そのままの温度で 2 時間攪拌した。メタノール (1.5 ml) を注意深く加えて反応を停止し、反応液をエーテル及び 2N HCl で希釈した。水層をエーテルで抽出し、有機層を合わせて飽和 NaHCO_3 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、テトラオールを粗精製物で得た。得られた残渣を THF - 水 (5 ml, 1:1) に溶かし、

過ヨウ素酸ナトリウム (156 mg, 0.731 mmol) を加えて室温で 2 時間反応した。酢酸エチル及び飽和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ で希釈し、水層を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (4:1, v/v)) で精製し、ジアルデヒド $-d_4$ **205** (100 mg, 95%) を無色油状物で得た。

[^{26}D +7.32° (c 0.39, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.82-0.87 (m, 18H), 1.09 (d, $J=7.1$, 6H), 1.00-1.75 (m, 42H), 2.33 (m, 2H), 3.44-3.66 (m, 9H), 4.56 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H), 9.62 (d, $J=2.0$, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 13.27, 19.63, 19.66, 19.70, 19.73, 24.19, 24.34, 24.43, 29.67, 29.81, 29.85, 29.89, 30.29, 32.64, 32.79, 36.62, 36.93, 37.09, 37.32, 37.36, 37.52, 46.17, 68.86, 69.94, 70.33, 70.79, 73.33, 77.95, 127.46, 127.54, 128.27, 138.43, 205.32. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 1.32, 1.66. IR (neat) 698, 735, 1115, 1377, 1458, 1728, 2094, 2183, 2858, 2925, 2954 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{86}^2\text{H}_4\text{O}_5$: C, 77.47; H+ ^2H , 11.70. Found: C, 77.77%; H+ ^2H , 11.66.

(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-2-Benzoyloxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxa-[18,18,23,23- $^2\text{H}_4$]cyclohexatriacont-20-ene (**206**)

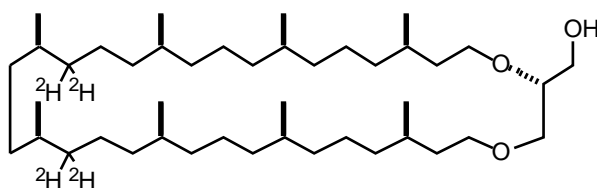


アルゴン気流下、アトモスバック中で三塩化チタン (0.5 g, 3.3 mmol) 及び Zn-Cu (0.5 g, 7.7 mmol) を 100 ml のシュレンク管に入れた。シュレンク管中に DME (30 ml) を加え、2 時間加熱還流した。加熱還流した系中にジアルデヒド $-d_4$ **205** (91 mg, 0.12 mmol) の DME 溶液 (3 ml) を電動シリンジポンプで 44 時間かけて滴下した。滴下終了後、さらに 18 時間加熱還流し、その後室温まで冷却した。反応系中に 20% K_2CO_3 水溶液 (25 ml) を加え、室温で 3.5 時間攪拌し、反応液をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (25:1, v/v)) で精製し、36 員環閉環体 $-d_4$ **206** (52 mg,

60%) を無色油状物で得た。

[^{26}D] +3.77° (*c* 0.470, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.83 (d, $J=5.6$, 6H), 0.84 (d, $J=5.6$, 6H), 0.87 (d, $J=6.4$, 6H), 0.94 (d, $J=6.6$, 6H), 0.98-1.75 (m, 42H), 2.02 (br, 2H), 3.46-3.64 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 5.10 (m, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.76, 19.85, 21.76, 24.48, 24.86, 29.60, 29.71, 32.86, 36.62, 36.96, 37.16, 37.35, 37.47, 68.58, 69.69, 70.26, 71.42, 73.34, 77.92, 127.51, 127.57, 128.30, 134.94, 138.36. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 1.16, 1.19. IR (neat) 698, 733, 968, 1115, 1377, 1456, 1732, 2098, 2175, 2864, 2924, 2952 cm^{-1} . EI-MS: m/z 743 (M^+), 727, 652 ($M^+-\text{CH}_2\text{Ph}$), 637, 560. Anal. Calcd for $\text{C}_{50}\text{H}_{86}^2\text{H}_4\text{O}_3$: C, 80.80; $\text{H}+^2\text{H}$, 12.21. Found: C, 80.52; $\text{H}+^2\text{H}$, 12.45.

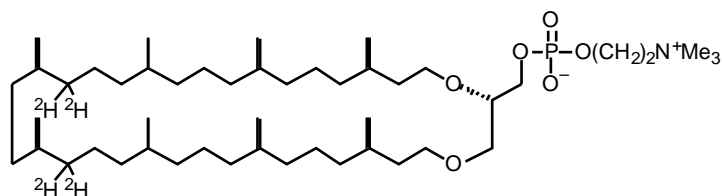
(2R,7R,11R,15S,19S,22S,26S,30R,34R)-2-hydroxymethyl-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-1,4-dioxa-[18,18,23,23- $^2\text{H}_4$]cyclohexatriacontane (207)



ベンジルエーテル- d_4 **206** (50 mg, 66.6 μmol) を酢酸エチル (10 ml) に溶かし、10% Pd-C (52 mg) を加えて水素雰囲気下、室温で 17.5 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、36 員環コア脂質- d_4 **207** (35 mg, 81%) を無色油状物で得た。

[^{28}D] +8.17° (*c* 0.78, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.85 (d, $J=6.6$, 12H), 0.88 (d, $J=6.6$, 6H), 0.89 (d, $J=6.3$, 6H), 1.00-1.75 (m, 48H), 2.17 (br, 1H), 3.46-3.72 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.85, 19.93, 19.97, 20.03, 24.06, 24.14, 24.41, 29.72, 29.77, 32.67, 32.76, 32.85, 33.54, 34.12, 36.53, 37.00, 37.12, 37.26, 63.03, 68.53, 70.00, 71.18, 78.38. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 1.07, 1.21. IR (neat) 1055, 1117, 1377, 1462, 1732, 2092, 2173, 2856, 2925, 2956, 3444 cm^{-1} . EI-MS: m/z 655 (M^+), 637 ($M^+-\text{H}_2\text{O}$), 624, 607. Anal. Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{82}^2\text{H}_4\text{O}_3$: C, 78.84; $\text{H}+^2\text{H}$, 13.23. Found: C, 78.57; $\text{H}+^2\text{H}$, 13.16.

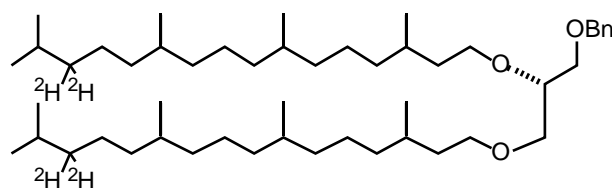
(2*S*,7*R*,11*R*,15*S*,19*S*,22*S*,26*S*,30*R*,34*R*)-7,11,15,19,22,26,30,34-octamethyl-2-[2-(trimethylammonio)ethoxyphosphinatomethyl-1,4-dioxo-[18,18,23,23-²H₄]cyclohexatriacontane (190)



アルコール-*d*₄ **207** (34 mg, 52 μmol) をピリジン (2 ml) に溶かし、0 °C で 2-クロロエチルリン酸ジクロリド (75 μl, 0.58 mmol) を加えた。0 °C で 4 時間攪拌後、水 (10 ml) を加えて 30 分間攪拌した。反応液に 2*N* HCl を加えて酸性にし、クロロホルムで 4 回抽出した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH (15:1-7:1, v/v)) で精製し、リン酸ジエステル (30 mg) をワックスで得た。得られたリン酸ジエステルをトルエン (5 ml) 及びアセトニトリル (3 ml) に溶解し、ガラス製の耐圧チューブに移した。反応液を -78 °C に冷却し、蒸留したトリメチルアミン (15 ml) を加えた。封管し、50-60 °C で 3 日間攪拌した。-78 °C に冷却して開封し、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃-MeOH (8:1, v/v)) to CHCl₃-MeOH-H₂O (65:25:4)) で精製し、次いで Sephadex® LH-20 (CHCl₃-MeOH (2:1, v/v)) でさらに精製してホスホコリン-*d*₄ **190** (17 mg, 40%) をワックスで得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 5:1): 0.85-0.89 (m, 24H), 1.00-1.70 (m, 48H), 3.22 (s, 9H), 3.49 (m, 3H), 3.55-3.70 (m, 6H), 3.88 (br, 2H), 4.23 (br, 2H). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃-CD₃OD = 4:1): 19.33, 19.45, 19.47, 19.52, 19.57, 19.62, 19.67, 19.75, 23.56, 23.60, 24.13, 29.39, 29.55, 32.29, 32.34, 32.38, 32.49, 33.64, 36.35, 36.70, 36.80, 36.87, 36.93, 36.97, 37.04, 37.10, 37.17, 53.89, 58.56, 64.78 (d, *J* = 4.9), 66.21, 68.40, 69.68, 70.58, 77.66 (d, *J* = 8.2). High Resolution FAB-MS: Calcd for C₄₈H₉₅²H₄NO₆P (*M*⁺+H) 820.7461. Found: 820.7460.

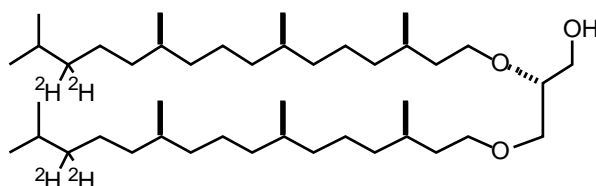
1-*O*-Benzyl-2,3-di-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-3,7,11,15-tetramethyl-[14,14-²H₂]hexadecyl]-*sn*-glycerol (208)



調製した Schlosser 触媒⁷⁰⁾ (2.70 ml, 0.05 M Li₂CuCl₄ in THF, 0.135 mmol) を臭化イソプロピルマグネシウムの THF 溶液 (20.0 ml, 1.58 M, 31.6mmol) に 0 °C で加え、次いでジトシラート -*d*₄ **200** (315 mg, 0.314 mmol) の THF 溶液 (15 ml) を加えた。反応液を 0 °C で 10 分間攪拌し、飽和 NH₄Cl (10 ml) で反応を停止し、反応液をエーテルで抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、**208** (204 mg, 87%) を無色油状物で得た。

[²⁴D +2.44° (c 0.830, CHCl₃). ¹H-NMR (400 MHz): 0.83-0.87 (m, 30H), 1.00-1.70 (m, 44H), 3.42-3.66 (m, 9H), 4.55 (s, 2H), 7.26-7.34 (m, 5H). ¹³C-NMR (100 MHz): 19.75, 22.55, 22.64, 24.38, 24.48, 24.59, 27.79, 29.83, 29.91, 32.81, 36.66, 37.12, 37.25, 37.42, 37.47, 37.53, 38.49 (quintet, *J*= 19), 68.89, 69.98, 70.37, 70.83, 73.36, 77.98, 127.53, 127.58, 128.28, 138.46. ²H-NMR (61.3 MHz, CHCl₃): 1.12. IR (neat) 696, 733, 1115, 1377, 1462, 2087, 2173, 2866, 2925, 2952 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₅₀H₉₀²H₄O₃: C, 80.37; H+²H, 12.68. Found: C, 80.07; H+²H, 12.67.

2,3-Di-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-3,7,11,15-tetramethyl-[14,14-²H₂]hexadecyl]-*sn*-glycerol (209)

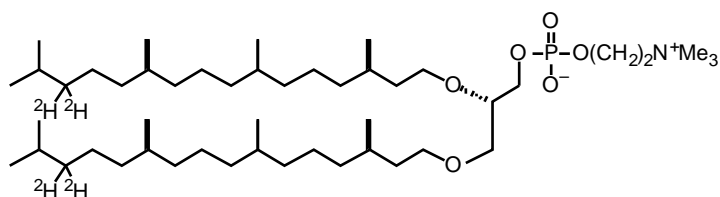


ベンジルエーテル -*d*₄ **208** (176 mg, 0.235 mmol) を酢酸エチル (30 ml) に溶かし、10% Pd-C (116 mg) を加えて水素雰囲気下、室温で 20 時間攪拌した。触媒

をセライト濾過で除去し、酢酸エチルでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、非環状ジエーテル型コア脂質 $-d_4$ **209** (142 mg, 92%) を無色油状物で得た。

[^{26}D +8.37° (c 0.430, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz): 0.84-0.89 (m, 30H) 1.00-1.70 (m, 44H), 2.17 (t, $J=6.3$, 1H), 3.44-3.75 (m, 9H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz): 19.68, 19.70, 19.75, 19.76, 22.57, 22.66, 24.36, 24.47, 24.59, 27.79, 29.88, 29.92, 32.81, 36.61, 37.10, 37.26, 37.37, 37.41, 37.47, 37.51, 37.52, 38.49 (m, $J=19$), 63.13, 68.66, 70.18, 70.98, 78.32. $^2\text{H-NMR}$ (61.3 MHz, CHCl_3): 1.11. IR (neat) 1051, 1117, 1365, 1377, 1462, 2087, 2173, 2868, 2925, 2952, 3442 cm^{-1} . EI-MS: m/z 657 (M^+), 615. Anal. Calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{84}^2\text{H}_4\text{O}_3$: C, 78.59; $\text{H}+^2\text{H}$, 13.50. Found: C, 78.44; $\text{H}+^2\text{H}$, 13.49.

2,3-Di-*O*-[(3*R*,7*R*,11*S*)-3,7,11,15-tetramethyl-[14,14- $^2\text{H}_2$]hexadecyl]-*sn*-glycero-1-phosphocholine (191)



アルコール $-d_4$ **209** (130 mg, 0.198 mmol) を、ホスホコリン $-d_4$ **190** の合成と同様の方法で処理して、ホスホコリン $-d_4$ **191** (83 mg, 52%) をワックスで得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD} = 8:1$): 0.83-0.87 (m, 30H), 1.00-1.41 (m, 36H), 1.46-1.64 (m, 8H), 3.23 (s, 9H), 3.47 (m, 3H), 3.616 (br, 6H), 3.90 (br, 2H), 4.24 (br, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD} = 8:1$): 19.36, 19.45, 22.27, 22.36, 24.15, 24.24, 24.35, 27.55, 29.64, 29.74, 32.57, 36.46, 36.88, 37.01, 37.21, 37.34, 38.25 (quintet, $J=19$), 54.03, 58.70 (d, $J=5.0$), 64.89 (d, $J=5.8$), 66.29, 68.67, 69.92, 70.45, 77.78 (d, $J=8.3$). High Resolution FAB-MS: Calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{97}^2\text{H}_4\text{NO}_6\text{P}$ ($M^++\text{H}$) 822.7618. Found: 822.7662.

ジミリストイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DMPC), ジパルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DPPC), 卵黄レシチン (eggPC) 及び軽水は市販品

(Sigma) を用いた。DPH, TMA-DPH についても市販品 (各々東京化成工業, 同仁化学) を用いた。6-カルボキシフルオレッセイン (CF; Eastman Kodak 製) は、文献記載の方法^{11d)}に従って精製したものをを用いた。

光学顕微鏡によるリポソームの観察

サンプル調製 : GUV は静置水和法を用いて調製した。脂質 1 mg 及び蛍光染色剤 Nile Red 0.1 mg をクロロホルム - メタノール 360 μ L (2:1) に溶解し、そのうちの 1.5 μ L をカバーガラス上に滴下する。10 分間乾燥させて得たラメラ状のサンプルを顕微鏡上に載せ、50 μ L の緩衝液で希釈した。

測定 : CCD カメラ及び Argus 20 画像解析システム (浜松ホトニクス) などを備え付けた Axiovert 135 位相差顕微鏡 (Carl Zeiss) を用い、脂質二重膜の発光イメージを逐一観察した (励起波長 485 nm, 蛍光波長 525 nm)。

熱分析 (DSC)

サンプル調製及び測定 :

[リン脂質分散液] 脂質 (7 mg) をエチレングリコール - 水 (50 mg; 4:1 v/v) に分散させ、70 μ l のアルミニウム製パンに入れ、何度か昇温, 降温を繰り返した後セイコー電子 SSC-5200 型示差走査熱量計により 1 $^{\circ}$ C/min の速度で走査した (-40 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)。

[コア脂質乾燥試料] 脂質 (ca. 10 mg) をそのまま 20 μ l のパンに入れ、何度か昇温, 降温を繰り返した後 2 $^{\circ}$ C/min の速度で走査した (-120 $^{\circ}$ C~0 $^{\circ}$ C)。

単分子膜測定

測定 : 20 $^{\circ}$ C の蒸留水で満たした FSD-20 トラフ (150 x 500 mm, SAN-ESU) 上に脂質のクロロホルム溶液 (1 mmol/l) を滴下して 10 分間静置した後、0.32 mm/sec の一定速度で可動バリアを押し進め -A 曲線を得た。

配向膜の 2 H-NMR 測定

サンプル調製 : 濃硝酸, 超純水及びアセトンで入念に洗浄したカバーガラスに

脂質の 2-プロパノール溶液 (10 mg/900 μ l) を滴下し、デシケーター中で減圧乾燥した。同様の操作を行い、直径 10 mm の NMR チューブに入るように適当にカットしたカバーガラスを約 50 枚積層する。50 μ l の軽水を加え、35 $^{\circ}$ C で 24 時間水和させた。

測定：得られた配向膜を膜平面と磁場とが垂直 ($\theta = 90^{\circ}$) になるように NMR プローブに設置し、ブルカー製 NMR MSL-300 で測定した (33 $^{\circ}$ C, 46.1 MHz)。

蛍光偏光解消

サンプル調製：脂質 3~4 mg に緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5) 9 ml を加え、超音波処理法で SUV 分散液を調製した。得られた分散液 3ml に 3 μ l の DPH 及び TMA-DPH (ともに 0.5 mM in DMF) を各々加えた。前者は脂質二重膜中にプローブを取り込ませるため、1 時間室温でインキュベーションしてから、後者はそのまま直ちに蛍光セルに移した。

測定：励起側，蛍光側に各々偏光板を取り付けた日本分光 FP-750 蛍光分光光度計により励起波長 350 nm，蛍光波長 460 nm で蛍光強度を測定した (バンド幅はともに 5 nm)。またセルホルダーには還流水を流して温度調節をした。

リポソームの水透過性

サンプル調製：5 mg の脂質薄膜に 1 ml の高張緩衝液 A (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM NaN_3 , 1 mM EDTA, pH 7.95) または低張緩衝液 B (10 mM Tris-HCl, 5 mM NaN_3 , 1 mM EDTA, pH 7.95) を加え、凍結融解を 5 回繰り返すことによって LUV 分散液を得た。緩衝液 A で調製した LUV 分散液は膨脹 (swelling), 緩衝液 B のそれは収縮 (shrinking) 実験に各々使用した。これら分散液はエクストルーダーを用い、ポリカーボネート製の Nucleopore[®] (孔径; 200 nm) を計 10 回通過させ粒径 200 nm にサイジング処理を行った。

測定：高張緩衝液 A 及び低張緩衝液 B で調製したリポソーム分散液を、各々 B 及び A と同量ずつ 3 msec 以内の速度で注射筒から混合槽 (cuvette) に流し込み、その後の LUV 粒径の経時変化を、光散乱強度 I_t の増減の値としてモニターした。測定は Applied Photophysics 製のストップフロー (Biosequential DX-

17MV) の光散乱モード ($\lambda = 400 \text{ nm}$, slit width 4 mm) で $33 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ で行った。データは混合後 2~10 秒程度までとり、Bio-kine Analysis Ver. 3.14 ソフトウェア (Bio-Logic company 製) で解析した。

リポソームのプロトン透過性

サンプル調製：脂質 3~4 mg に 1 ml の CF 含有緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, 4 mM CF, pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液をセファデックス G-50 (1.5 x 30~45 cm) 担体を用い、緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, pH 7.5) で溶出してゲル濾過をし、外水相の CF を除去した。

測定：蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 ml の酸性緩衝液 (50 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸, 150 mM NaCl, pH 2.5) 中に CF 含有 LUV 懸濁液 (20 μl) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を日本分光 FP-750 蛍光分光光度計を用いて励起波長 480nm, 蛍光波長 520nm で逐次測定した (バンド幅はともに 5 nm)。

メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* の培養及び極性脂質の抽出

液体培地を表 5-5 に示した成分で調製し、*Methanococcus jannaschii* (JCM 10045) を培地の 5% になるように植菌した。高圧の水素 - 二酸化炭素混合ガス (還元銅カラムを通して脱酸素済) (4:1) 雰囲気下、 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ で 5~24 時間培養した。得られた菌体をクロロホルム - メタノール - 5% トリクロロ酢酸 (TCA) 水溶液 (5:10:4) で抽出し、残渣を 1 ml のクロロホルム - メタノール (2:1) に溶かし、20 倍の冷アセトンを加えて極性脂質を再結晶した。

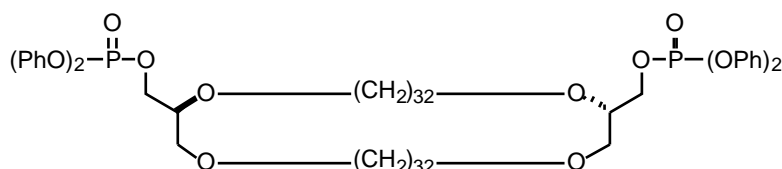
リポソームの熱安定性

サンプル調製：脂質 3~4 mg に 1 ml の CF 含有緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 200 mM CF, pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液に対しセファデックス G-50 (1.5 x 30~45 cm) 担体を用い、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl,

pH 7.5) で溶出してゲル濾過を行い、外水相の CF を除去した。

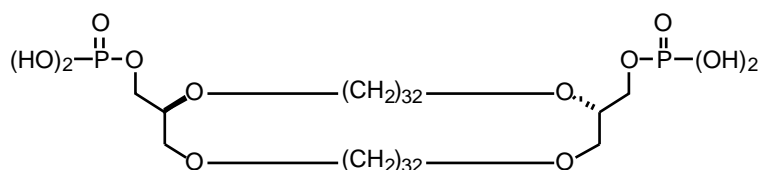
測定：蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 ml の同じ緩衝液中に CF 含有 LUV 懸濁液 (5~20 μl) を加えたとき ($t = 0$) の蛍光強度を F_0 とし、各時間 t での蛍光強度 F_t を日本分光 FP-750 蛍光分光光度計を用いて励起波長 480nm, 蛍光波長 520nm で逐次測定した (バンド幅はともに 5 nm)。一定時間測定した後、非イオン性界面活性剤 10 % Triton X-100 を 10 μl 加え、蛍光物質の全強度 F_{max} を測定した。

第 6 章

(2*S*,39*S*)-2,39-bis(diphenylphosphorylmethyl)-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (228)

(2*S*,39*S*)-2,39-ビス(ヒドロキシメチル)-1,4,37,40-テトラオキサシクロドヘプタコンタン **222**³⁵⁾ (125 mg, 0.116 mmol), ピリジン (12 ml) 及び DMAP (67.2 mg, 0.550 mol) をベンゼン (24 ml) に溶解し、ジフェニルリン酸クロリド (510 μ l, 2.45 mmol) を室温でゆっくり滴下し、60 °C で 80 時間攪拌した。2*N* HCl (30 ml) を加えて反応を停止し、反応液をジクロロメタンで抽出した。有機層を合わせて飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (benzene-EtOAc (10:1, v/v)) で精製し、ビスリン酸トリエステル **228** (156 mg, quant.) をワックスで得た。

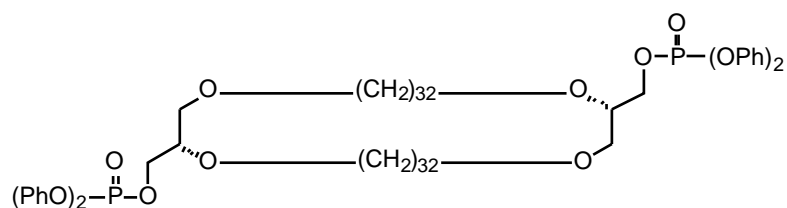
¹H-NMR (300 MHz): 1.25 (br, 112H), 1.50-1.61 (br, 8H), 3.37-3.67 (m, 14H), 4.21-4.39 (m, 4H), 7.16-7.36 (m, 20H). ¹³C-NMR (75 MHz): 25.97, 26.05, 29.41, 29.57, 29.65, 29.90, 68.29 (d, *J* = 6.8), 69.62, 70.71, 71.73, 77.11 (d, *J* = 8.0), 120.07 (d, *J* = 5.0), 120.10 (d, *J* = 5.0), 125.31, 129.72, 150.54 (d, *J* = 7.5). ³¹P-NMR (109 MHz): -12.00. IR (KBr pellet): 955, 1051, 1190, 1220, 1292, 1464, 1473, 1489, 1591, 1738, 2848, 2918 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₉₄H₁₅₈O₁₂P₂: C, 73.21; H, 10.33. Found: C, 73.16; H, 10.27.

(2*S*,39*S*)-2,39-bis(dihydrophosphorylmethyl)-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (224)

リン酸トリエステル **228** (158 mg, 0.102 mmol) を氷酢酸 (50 ml) に溶かし、酸化白金 (IV) (204 mg) を加えて水素雰囲気下 100 °C で 60 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、熱クロロホルムでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をクロロホルムより再結晶してジリン酸 **224** (46 mg, 36 %) を白色粉末で得た。

mp 113-116 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 1.25 (br, 112H), 1.50-1.60 (br, 8H), 3.40-3.62 (m, 14H), 4.02-4.20 (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 26.06, 26.13, 29.44, 29.49, 29.58, 29.65, 29.72, 30.03, 64.16, 70.64, 70.68, 71.79, 76.75. $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): 1.76. IR (KBr pellet): 719, 729, 951, 1055, 1120, 1246, 1464, 1473, 2848, 2918, 3465 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{70}\text{H}_{142}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 67.92; H, 11.56. Found: C, 67.89; H, 11.74.

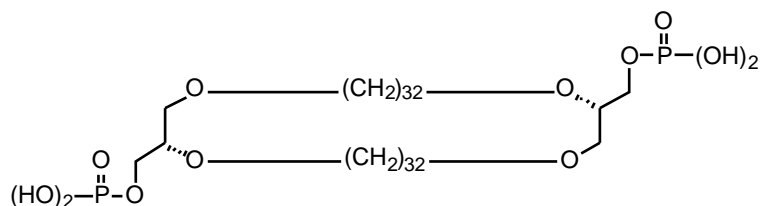
(2*S*,38*S*)-2,38-bis(diphenylphosphorylmethyl)-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (229)



(2*S*,38*S*)-2,38-ビス(ヒドロキシメチル)-1,4,37,40-テトラオキサシクロドヘプタコンタン **223**³⁵⁾ (99.2 mg, 92.0 μmol) を、ビスリン酸トリエステル **228** の合成と同様の方法で処理して、ビスリン酸トリエステル **229** (132 mg, 93 %) をワックスで得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 1.25 (br, 112H), 1.50-1.61 (br, 8H), 3.37-3.66 (m, 14H), 4.21-4.39 (m, 4H), 7.16-7.36 (m, 20H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 25.97, 26.06, 29.42, 29.58, 29.66, 29.92, 68.31 (d, $J=6.2$), 69.66, 70.72, 71.74, 77.13 (d, $J=7.4$), 120.08 (d, $J=5.0$), 120.12 (d, $J=5.0$), 125.30, 129.72, 150.57 (d, $J=7.5$). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): -12.03. IR (KBr pellet): 955, 1053, 1190, 1221, 1292, 1464, 1473, 1489, 1591, 1739, 2848, 2918 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{94}\text{H}_{158}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 73.21; H, 10.33. Found: C, 72.92; H, 10.56.

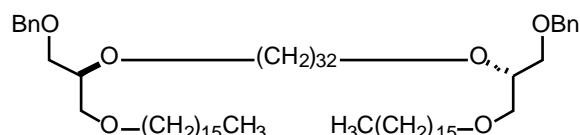
(2*S*,38*S*)-2,38-bis(dihydrophorylmethyl)-1,4,37,40-tetraoxacyclodoheptacontane (225)



ビスリン酸トリエステル **229** (163 mg, 0.106 mmol) を、ジリン酸 **224** の合成と同様の方法で処理して、ジリン酸 **225** (63 mg, 48 %) を白色粉末で得た。

mp 111-113 °C. ¹H-NMR (300 MHz): 1.26 (br, 112H), 1.51-1.57 (br, 8H), 3.39-3.65 (m, 14H), 4.03-4.37 (m, 4H). ¹³C-NMR (75 MHz): 26.06, 26.13, 29.44, 29.58, 29.65, 29.71, 30.03, 64.16, 70.64, 70.67, 71.79, 76.74. ³¹P-NMR (109 MHz): 1.93. IR (KBr pellet): 719, 729, 962, 1051, 1124, 1244, 1464, 1473, 2848, 2918, 3452 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₇₀H₁₄₂O₁₂P₂: C, 67.92; H, 11.56. Found: C, 68.06; H, 11.54.

2,2'-*O*-(1,32-dotriacontanediyl)-1,1'-*di-O*-benzyl-3,3'-*di-O*-hexadecanyl-*sn*-diglycerol (230)

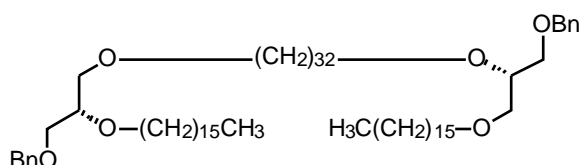


2,2'-*O*-(1,32-ドトリアコンタンジイル)-1,1'-ジ-*O*-ベンジル-3,3'-ジ-*O*-ヘキサデカニル-*sn*-ジグリセロール **216**³⁵⁾ (355 mg, 0.274 mmol) 及びトリエチルアミン (300 μl, 2.16 mmol) をジクロロメタン (20 ml) にとかし、0 °C で塩化メタンシルホニル (85 μl, 1.1 mmol) を加え、同じ温度で 3 時間攪拌した。水 (10 ml) を加えて反応を停止し、反応液を酢酸エチルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去してジメシラートを粗精製物で得た。得られた残渣を THF (15 ml) に溶かし、0 °C で super hydride® (1 M in THF, 2.40 ml, 2.40 mmol) を滴下し、室温で 5 時間攪拌した。0 °C に冷却後、水 (10 ml) を加えて反応を停止し、反応液をエーテルで抽出した。有機層を合わせて 2N HCl, 飽和 NaHCO₃ 及び飽和食塩水

で順次洗浄した。抽出液を硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (7:1, v/v)) で精製し、化合物 **230** (348 mg, quant.) を白色粉末で得た。

mp 45-46 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (t, $J=7.1$, 6H), 1.25 (br, 108H), 1.50-1.61 (m, 8H), 3.40-3.62 (m, 18H), 4.55 (s, 4H), 7.25-7.33 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.09, 22.67, 26.09, 26.11, 29.35, 29.49, 29.64, 29.70, 30.09, 31.91, 70.29, 70.58, 70.72, 71.63, 73.32, 77.91, 127.44, 127.53, 128.26, 138.43. IR (KBr pellet): 696, 719, 737, 1115, 1454, 1469, 2856, 2914 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{154}\text{O}_6$: C, 80.06; H, 12.32. Found: C, 80.22; H, 12.43.

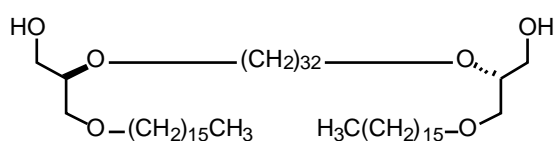
2,3'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-1,1'-di-O-benzyl-2',3-di-O-hexadecanyl-*sn*-diglycerol (231)



2,3'-O-(1,32-ドトリアコンタンジイル)-1,1'-ジ-O-ベンジル-2',3-ジ-O-ヘキサデカニル-*sn*-ジグリセロール **217**³⁵⁾ (680 mg, 0.526 mmol) を、化合物 **230** の合成と同様の方法で処理して、化合物 **231** (669 mg, quant.) を白色粉末で得た。

mp 41-42 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (t, $J=7.1$, 6H), 1.25 (br, 108H), 1.50-1.61 (m, 8H), 3.40-3.63 (m, 18H), 4.55 (s, 4H), 7.25-7.34 (m, 10H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.10, 22.68, 26.11, 29.35, 29.49, 29.64, 29.71, 30.09, 31.91, 70.26, 70.58, 70.70, 71.62, 73.32, 77.89, 127.44, 127.53, 128.26, 138.42. IR (KBr pellet): 696, 721, 733, 1119, 1454, 1468, 2848, 2914 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{84}\text{H}_{154}\text{O}_6$: C, 80.06; H, 12.32. Found: C, 79.97; H, 12.62.

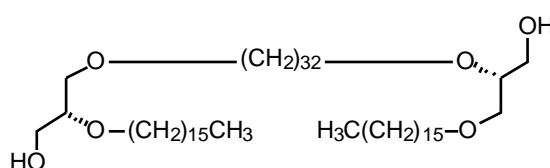
2,2'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-3,3'-di-O-hexadecanyl-*sn*-diglycerol (232)



ベンジルエーテル **230** (293 mg, 0.232 mmol) を酢酸エチル (40 ml) に溶かし、10% Pd-C を加えて水素雰囲気下、60 °C で 24 時間攪拌した。触媒をセライト濾過で除去し、クロロホルムでセライトを数回洗浄した。濾液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane-EtOAc (5:1, v/v) to CHCl₃) で精製し、ジオール **232** (190 mg, 76 %) を白色粉末で得た。

mp 66-67 °C. ¹H-NMR (300 MHz): 0.88 (t, *J* = 7.1, 6H), 1.25 (br, 108H), 1.51-1.60 (m, 8H), 3.41-3.65 (m, 18H). ¹³C-NMR (75 MHz): 14.13, 22.69, 26.10, 29.36, 29.47, 29.62, 29.72, 30.07, 31.93, 63.09, 70.39, 70.90, 71.85, 78.19. IR (KBr pellet): 719, 1119, 1471, 2846, 2929, 3415 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₇₀H₁₄₂O₆: C, 77.86; H, 13.25. Found: C, 77.56; H, 13.50.

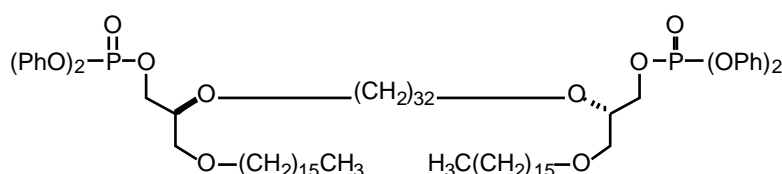
2,3'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-2',3-di-O-hexadecanyl-*sn*-diglycerol (233)



ベンジルエーテル **231** (576 mg, 0.457 mmol) を、ジオール **232** の合成と同様の方法で処理して、ジオール **233** (430 mg, 87 %) を白色粉末で得た。

mp 79-81 °C. ¹H-NMR (300 MHz): 0.88 (t, *J* = 7.1, 6H), 1.25 (br, 108H), 1.51-1.60 (m, 8H), 3.41-3.65 (m, 18H). ¹³C-NMR (75 MHz): 14.13, 22.69, 26.10, 29.36, 29.47, 29.62, 29.72, 30.07, 31.93, 63.09, 70.39, 70.90, 71.85, 78.19. IR (KBr pellet): 723, 1115, 1466, 2850, 2918, 3492 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₇₀H₁₄₂O₆: C, 77.86; H, 13.25. Found: C, 77.65; H, 13.21.

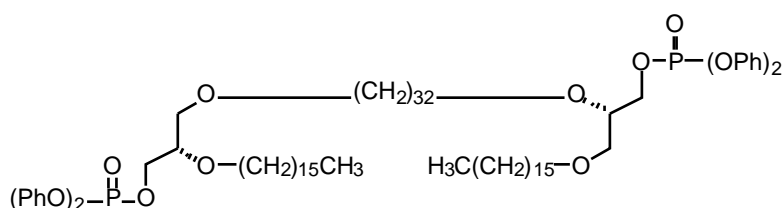
2,2'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-3,3'-di-O-hexadecanyl-1,1'-bis-O-(diphenylphosphoryl)-*sn*-diglycerol (234)



ジオール **232** (226 mg, 0.209 mmol) を、ビスリン酸トリエステル **228**, **229** の合成と同様の方法で処理して、ビスリン酸トリエステル **234** (325 mg, quant.) をワックスで得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (t, $J = 6.8$, 6H), 1.25 (br, 108H), 1.48-1.54 (m, 8H), 3.36-3.67 (m, 14H), 4.22-4.42 (m, 4H), 7.16-7.37 (m, 20H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.12, 22.68, 25.99, 26.06, 29.35, 29.49, 29.58, 29.62, 29.65, 29.70, 29.72, 29.95, 31.91, 68.34 (d, $J = 6.8$), 69.36, 70.74, 71.79, 77.01 (d, $J = 7.5$), 120.07 (d, $J = 5.0$), 120.11 (d, $J = 5.0$), 125.27, 129.71, 150.55 (d, $J = 6.8$). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): -12.06. IR (KBr pellet): 953, 1051, 1192, 1221, 1294, 1458, 1469, 1489, 1591, 2848, 2914 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{94}\text{H}_{160}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 73.11; H, 10.44. Found: C, 72.88; H, 10.55.

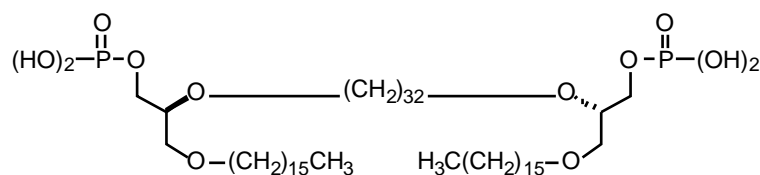
2,3'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-2',3-di-O-hexadecanyl-1,1'-bis-O-(diphenylphosphoryl)-sn-diglycerol (235)



ジオール **233** (389 mg, 0.360 mmol) を、ビスリン酸トリエステル **228**, **229**, **234** の合成と同様の方法で処理して、ビスリン酸トリエステル **235** (529 mg, 93 %) をワックスで得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.88 (t, $J = 6.8$, 6H), 1.26 (br, 108H), 1.48-1.54 (m, 8H), 3.36-3.67 (m, 14H), 4.23-4.43 (m, 4H), 7.14-7.36 (m, 20H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.04, 22.60, 25.92, 25.99, 29.29, 29.40, 29.50, 29.53, 29.56, 29.64, 29.86, 31.84, 68.24 (d, $J = 6.2$), 69.25, 70.60, 71.66, 76.93 (d, $J = 7.5$), 119.98 (d, $J = 5.0$), 120.02 (d, $J = 5.0$), 125.18, 129.60, 150.47 (d, $J = 6.8$). $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): -11.92. IR (KBr pellet): 957, 1051, 1190, 1221, 1294, 1469, 1489, 1591, 2850, 2918 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{94}\text{H}_{160}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 73.11; H, 10.44. Found: C, 73.04; H, 10.70.

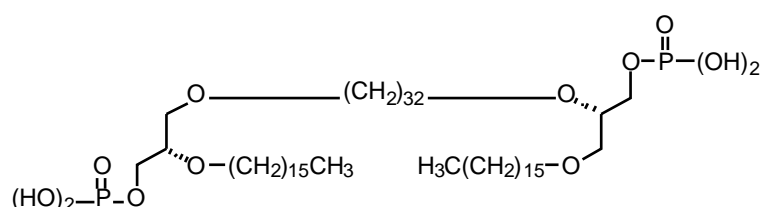
2,2'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-3,3'-di-O-hexadecanyl-*sn*-diglycero-1,1'-diphosphoric acid (226)



ビスリン酸トリエステル **234** (325 mg, 0.210 mmol) を、ジリン酸 **224**, **225** の合成と同様の方法で処理して、ジリン酸 **226** (113 mg, 43 %) を白色粉末で得た。

mp 93-95 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.8 δ , $J=6.8$, 6H), 1.2 δ (br, 108H), 1.5 δ (br, 8H), 3.4 δ -3.7 δ (m, 14H), 3.9 δ -4.1 δ (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.07, 22.71, 26.10, 26.19, 29.47, 29.53, 29.59, 29.73, 29.78, 31.99, 64.70, 70.49, 71.94, 72.05, 77.22. $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): 0.95. IR (KBr pellet): 721, 950, 1070, 1113, 1469, 2850, 2918, 3427 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{70}\text{H}_{144}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 67.81; H, 11.71. Found: C, 67.60; H, 11.87.

2,3'-O-(1,32-dotriacontanediyl)-2',3-di-O-hexadecanyl-*sn*-diglycero-1,1'-diphosphoric acid (227)



ビスリン酸トリエステル **235** (386 mg, 0.250 mmol) を、ジリン酸 **224**, **225**, **226** の合成と同様の方法で処理して、ジリン酸 **227** (160 mg, 52 %) を白色粉末で得た。

mp 80-82 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): 0.8 δ , $J=6.8$, 6H), 1.2 δ (br, 108H), 1.5 δ (br, 8H), 3.4 δ -3.7 δ (m, 14H), 3.9 δ -4.1 δ (m, 4H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz): 14.04, 22.69, 26.07, 26.16, 29.36, 29.39, 29.61, 29.72, 29.78, 31.97, 66.13, 70.25, 71.07, 72.07, 77.98. $^{31}\text{P-NMR}$ (109 MHz): 1.37. IR (KBr pellet): 719, 1020, 1061, 1122, 1471, 2850, 2918, 3421 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{70}\text{H}_{144}\text{O}_{12}\text{P}_2$: C, 67.81; H, 11.71. Found: C, 67.56; H, 11.86.

熱分析 (DSC)

サンプル調製及び測定：

脂質を各々秤量 (*ca.* 7 mg) し、エチレングリコール (*ca.* 50 mg) とともにアルミニウム製パンに入れ、1 回室温から 130 °C まで昇温，降温を行った。その後セイコー電子 SSC-5200 型示差走査熱量計により 50 °C から 130 °C まで、2 °C/min の速度で走査した。

分散液の ³¹P-NMR

サンプル調製：脂質 10 mg にエチレングリコール (0.5 ml) を加え、相転移温度 T_c 以下 (20 °C) 及び T_c 以上 (**224**, **225** は 75 °C, **226**, **227** は 100 °C) で 10 分間ボルテックス処理し、各々 NMR サンプルを調製した。

測定：パルス幅は 19 μ sec (90°), delay time は 100 μ sec に設定し、ボルテックス処理と同じ温度に設定して行った。

電子顕微鏡観察

サンプル調製：1 mg の脂質薄膜に緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) 2 ml を加え、凍結融解法で脂質分散液を得た。

測定：脂質分散液及び 2 % リン - タングステン酸水溶液 (pH 7.0) をホルムバーで覆われたグリッドに少量滴下し、日立 H-7000 型透過型電子顕微鏡 (加速電圧 75 kV) で観測した。

参考文献

- 1) (a) Woese, C. R.; Fox, G. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1977**, *74*, 5088. (b) Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87*, 4576. (c) Delong, E. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5685. (d) Kjems, J.; Larsen, N.; Dalgaard, J. Z.; Garrett, R. A.; Stetter, K. O. *Syst. Appl. Microbiol.* **1992**, *15*, 203. (e) Benachenhou, L. N.; Forterre, P.; Labedan, B. *J. Mol. Evolution.* **1993**, *36*, 335. (f) Klenk, H. P.; Schleper, C.; Schwass, V.; Brudler, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1174*, 95. (g) Barns, S. M.; Fundyga, R. E.; Jeffries, M. W.; Pace, N. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1609. (h) Stein, J. L.; Simon, M. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 6228.
- 2) (a) 古賀 洋介, 「古細菌」, 東京大学出版会 (1988). (b) 大島 泰郎, 「生命は熱水から始まった」, 東京化学同人 (1995). (c) 古賀 洋介, 亀倉 正博, 「古細菌の生物学」, 東京大学出版会 (1998). (d) Takashina, T.; Hamamoto, T.; Otozai, K.; Grant, W. D.; Horikoshi, K. *Syst. Appl. Microbiol.* **1990**, *13*, 177.
- 3) Gorter, E.; Greudel, F. *J. Exp. Med.* **1925**, *41*, 439.
- 4) (a) Singer, S. J.; Nicolson, G. R. *Science* **1972**, *175*, 720. (b) Singer, S. J. *Ann. Rev. Biochem.* **1974**, *43*, 805.
- 5) For reviews of archaeal membrane lipids, see: (a) Kates, M. In *The Biochemistry of Archaea(Archaeobacteria)*, Kates, M., Kushner, D. J., Matheson, A. T., Eds.; Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, 1993; pp.261. (b) Yamauchi, K.; Kinoshita, M. *Prog. Polym. Sci.* **1993**, *18*, 763. (c) Gambacorta, A.; Gliozzi, A.; De Rosa, M. *World J. Microbiol. Biotech.*, **1995**, *11*, 115. (d) 古賀 洋介, *日本油化学会誌*, **1997**, *46*, 485. (e) 山内 清, *日本油化学会誌*, **1997**, *46*, 539.
- 6) (a) Kates, M.; Joo, C. N.; Shier, T. *Biochemistry* **1967**, *6*, 3329. (b) Joo, C. N.; Shier, T.; Kates, M. *J. Lipid Research* **1968**, *9*, 782. (c) Zeius, J. G.; Wolfe, R. S. *J. Bacteriol.* **1972**, *109*, 707. (d) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Minale, L.; Bu'Lock, J. D. *J. Chem. Soc., Chem., Commun.* **1974**, 543. (e) Mayberry-Carson, K.J.; Langworthy, T. A.; Mayberry, W. R.; Smith, P. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *360*, 217. (f) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Bu'Lock, J. D. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 143. (g) Langworthy, T. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *487*, 37. (h) De Rosa, M.; De Rosa, S.; Gambacorta, A.; Minale, L.; Bu'Lock, J. D. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1961. (i) Tornabene, T. G.; Langworthy, T. A. *Science* **1979**, *203*, 51. (j) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.; Sodano, S.; Bu'Lock, J. D. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 833. (k) Zillig, W.; Stetter, K. O.; Wunderl, S.; Schulz, Priess, H.; Scholz, I. *Arch.*

- Microbiol.* **1980**, *125*, 259. (l) Kushwaha, S. C.; Kates, M.; Sprott, G. D.; Smith, I. C. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *664*, 156. (m) Comita, P. B.; Gagosian, R. B. *Science* **1983**, *222*, 1329. (n) Comita, P. B.; Gagosian, R. B.; Pang, H.; Costello, C. E. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 15234. (o) Ferrante, G.; Richards, J. C.; Sprott, G. D. *Biochem. Cell Biol.* **1990**, *68*, 274. (p) Nichols, P. D.; Franzmann, P. D. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *98*, 205. (q) Hafenbradl, D.; Keller, M.; Thiericke, R.; Stetter, K. *Syst. Appl. Microbiol.* **1993**, *16*, 165. (r) Nishihara, M.; Koga, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1254*, 155. (s) Swain, M.; Brisson, J. -R.; Sprott, G. D.; Cooper, F. P.; Patel, G. B. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1345*, 56. (t) Koga, Y.; Morii, H.; Akagawa-Matsushita, M.; Ohga, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 230. (u) Morii, H.; Eguchi, T.; Nishihara, M.; Kakinuma, K.; König, H.; Koga, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1390*, 339.
- 7) (a) Taguchi, H.; Ohta, T. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 12588. (b) Nishihara, M.; Koga, Y. *J. Biochem.* **1995**, *117*, 933. (c) Nishihara, M.; Koga, Y. *J. Biochem.* **1997**, *122*, 572. (d) Noguchi, S.; Maeda, M.; Nishihara, M.; Koga, Y.; Sone, N. *J. Ferment. Bioeng.* **1998**, *86*, 266. (e) Nishihara, M.; Yamazaki, T.; Oshima, T.; Koga, Y. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1330.
- 8) (a) 香川 靖雄,「生体膜と生体エネルギー」, 東京大学出版会 (1975). (b) 野島 庄七, 砂本 順三, 井上 圭三,「リポソーム」, 南江堂 (1988). (c) 野澤 義則,「生体膜に学ぶ」, 共立出版 (1989). (d) Marsh, D. *CRC Handbook of Lipid Bilayers*, CRC Press: Boca Raton, FL, 1990; pp 136, 149.
- 9) (a) Menger, F. M.; Wood, M. G., Jr.; Zhou, Q. Z.; Hopkins, H. P.; Fumio, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6804. (b) Morr, M.; Fortamp, J.; Rühle, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2460.
- 10) (a) Demel, R. A.; Van Deenen, L. L. M.; Pethica, B. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1967**, *135*, 11. (b) Joos, P.; Demel, R. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1969**, *183*, 447. (c) Demel, R. A.; de ruyff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *457*, 109. (d) Nakatani, Y.; Yamamoto, M.; Diyizou, Y.; Warnock, W.; Dollè, V.; Hahn, W.; Milon, A.; Ourisson, G. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 129.
- 11) (a) Ruocco, M. J.; Makriyannis, A.; Siminovitch, D. J.; Griffin, R. G. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4844. (b) Moss, R. A.; Gangli, S.; Okumura, Y.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6391. (c) Brezesinski, G.; Dietrich, A.; Struth, B.; Böhm, C.; Bouwman, W. G.; Kjaer, K.; Möhwald, H. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *76*, 145.
- 12) (a) Lazrak, T.; Milon, A.; Wolff, G.; Albrecht, A.-M.; Miehé, M.; Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *903*, 132. (b) Stewart, L. C.; Kates, M.; Ekiel, I. H.; Smith, I. C. P. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *54*, 115. (c) Moss, R. A.; Fujita, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**,

- 31, 7559. (d) Yamauchi, K.; Doi, K.; Kinoshita, M.; Kii, F.; Fukuda, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1110*, 171. (e) Yamauchi, K.; Doi, K.; Yoshida, Y.; Kinoshita, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1146*, 178. (f) Yamauchi, K.; Togawa, K.; Kinoshita, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2097. (g) Nishikawa, N.; Mori, H.; Ono, M. *Chem. Lett.* **1994**, 767. (h) Pozzi, G.; Birault, V.; Werner, B.; Dannenmuller, O.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Terakawa, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 177. (i) Birault, V.; Pozzi, G.; Plobeck, N.; Eifler, S.; Schmutz, M.; Palanché, T.; Raya, J.; Brisson, A.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 789.
- 13) (a) Hébert, N.; Beck, A.; Lennox, R. B.; Just, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1777. (b) Menger, F. M.; Chen, X. Y.; Brocchini, S.; Hopkins, H. P.; Hamilton, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6600. (c) Ladika, M.; Fisk, T. E.; Wu, W. W.; Jons, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12093. (d) Menger, F. M.; Chen, X. Y. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 323.
- 14) (a) Yamauchi, K.; Moriya, A.; Kinoshita, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1003*, 151. (b) Yamauchi, K.; Sakamoto, Y.; Moriya, A.; Yamada, K.; Hosokawa, T.; Higuchi, T.; Kinoshita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3188. (c) Yamauchi, K.; Yamada, K.; Kinoshita, M.; Kamikawa, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 2088. (d) Moss, R. A.; Fujita, T.; Okumura, Y. *Langmuir* **1991**, *7*, 2415. (e) Thompson, D. H.; Wong, K. F.; Humphry-Baker, R.; Wheeler, J. J.; Kim, J.-M.; Rananavare, S. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9035. (f) Kim, J.-M.; Thompson, D. H. *Langmuir* **1992**, *8*, 637. (g) Moss, R. A.; Li, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9227. (h) Lecollinet, G.; Auzély-Velty, R.; Benvegna, T.; Mackenzie, G.; Goodby, J. W.; Plusquellec, D. *Chem. Commun.* **1998**, 1571. (i) Auzély-Velty, R.; Benvegna, T.; Plusquellec, D.; Mackenzie, G.; Haley, J. A.; Goodby, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2511. (j) Lecollinet, G.; Auzély-Velty, R.; Danel, M.; Benvegna, T.; Mackenzie, G.; Goodby, J. W.; Plusquellec, D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3139.
- 15) (a) Elferink, M. G. L.; de Wit, J. G.; Demel, R.; Driessen, A. J. M.; Konings, W. N. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1375. (b) Kao, Y. L.; Chang, E. L.; Chong, P. L. -G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 1241. (c) Elferink, M. G. L.; de Wit, J. G.; Driessen, A. J. M.; Konings, W. N. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1193*, 247. (d) Relini, A.; Cassinadri, D.; Mirghani, Z.; Brandt, O.; Gambacorta, A.; Trincone, A.; De Rosa, M.; Gliozzi, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1194*, 17. (e) Chang, E. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *202*, 673. (f) Komatsu, H.; Chong, L. -G. *Biochemistry* **1998**, *37*, 107.

- 16) (a) Heathcock, C. H.; Finkelstein, B. L.; Aoki, T.; Poulter, C. D. *Science* **1985**, 229, 862. (b) Heathcock, C. H.; Radel, P. A. *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 4322. (c) Heathcock, C. H.; Finkelstein, B. L.; Jarvi, E. T.; Radel, P. A.; Hadley, C. R. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 1922.
- 17) For reviews of macrocyclization, see: (a) Nicolaou, K. C. *Tetrahedron* **1977**, 33, 683. (b) Masamune, S.; Bates, G. S.; Corcoran, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 585. (c) 「中・大員環天然物合成の新展開」, *化学総説*, **1981**, 31. (d) Paterson, I.; Mansuri, M. M. *Tetrahedron*, **1985**, 41, 3569. (e) 高橋孝志, 土井隆行, 根本尚夫, *有機合成化学協会誌*, **1989**, 47, 135. (f) Yonemitsu, O., *有機合成化学協会誌*, **1994**, 52, 946.
- 18) (a) Nicolaou, K. C.; Chakraborty, T. K.; Piscopio, A. D.; Minowa, N.; Bertinato, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4419. (b) Romo, D.; Meyer, S. D.; Johnson, D. D.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7906. (c) Hayward, C. M.; Yohannes, D.; Danishefsky, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9345. (d) Smith, III, A. B.; Condon, S.M.; McCauley, J. A.; Leazer, Jr., J. L.; Leahy, J. W.; Maleczka, Jr., R.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5407.
- 19) (a) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Uenishi, J.; Li, W. S.; Papatjjs, D. P.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4672. (b) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Chakraborty, T. K.; Ogawa, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4685. (c) Nicolaou, K. C.; Daines, R. A.; Ogawa, Y.; Chakraborty, T. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4696.
- 20) Schill, G.; Zürcher, C.; Fritz, H. *Chem. Ber.* **1978**, 111, 2901.
- 21) (a) Glaser, C. *Berichte* **1869**, 2, 422. (b) Hay, A. S. *J. Org. Chem.* **1962**, 27, 3320. (c) Sonogashira, K. "Comprehensive Organic Synthesis," Vol.3, Pergamon Press, Oxford, 1991, p.551.
- 22) Yamauchi, K.; Yamamoto, I.; Kinoshita, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 938, 51.
- 23) (a) McMurry, J. E.; Kees, K. L. *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2655. (b) McMurry, J. E.; Rico, J. G. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1169. (c) McMurry, J. E.; Dushin, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6942. (d) Li, Y.; Li, W.; Li, Y. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1225. (e) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renauld, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E. J. *Nature* **1994**, 367, 630.
- 24) For reviews of McMurry reaction for macrocyclization, see: (a) McMurry, J. E. *Acc. Chem. Res.* **1983**, 16, 405. (b) McMurry, J. E. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1513. (c) Lenoir, D. *Synthesis* **1989**, 883. (d) Fürstner, A.; Bogdanovi'c, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2442.
- 25) Eguchi, T.; Terachi, T.; Kakinuma, K. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2175.
- 26) (a) Eguchi, T.; Terachi, T.; Kakinuma, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 137. (b) Eguchi, T.; Arakawa, K.; Terachi, T.; Kakinuma, K. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1924.

- 27) Patel, D. V.; VanMiddlesworth, F.; Donaubaueer, J.; Gannett, P.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4603.
- 28) (a) Katsuki, T.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974. (b) Gai, Y.; Robert, M. H.; Klunder, J. M.; Ko, S. Y.; Masamune, H.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- 29) Suzuki, T.; Saimoto, H.; Tomioka, H.; Oshima, K.; Nozaki, H. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3597.
- 30) Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543.
- 31) Takano, S.; Seya, K.; Goto, E.; Hiram, M.; Ogasawara, K. *Synthesis* **1983**, 116.
- 32) Sita, L. R. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5285.
- 33) (a) Takaya, H.; Ohta, T.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akutagawa, S.; Inoue, I.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1596. (b) Takaya, H.; Ohta, T.; Mashima, K.; Noyori, R. *Pure App. Chem.* **1990**, *62*, 1135. (c) Heiser, B.; Broger, E. A.; Carameri, Y. *Tetrahedron Asymmetry* **1991**, *1*, 51. (d) Kitamura, M.; Tokunaga, M.; Ohkuma, T.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4163. (e) Kitamura, M.; Tokunaga, M.; Noyori, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4053.
- 34) Eguchi, T.; Ibaragi, K.; Kakinuma, K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2689.
- 35) (a) Eguchi, T.; Kano, H.; Kakinuma, K. *Chem. Commun.* **1996**, 365. (b) Eguchi, T.; Kano, H.; Arakawa, K.; Kakinuma, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, *70*, 2545.
- 36) (a) Ferrante, G.; Eikel, I.; Sprott, G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *921*, 281. (b) Nishihara, M.; Morii, H.; Koga, Y. *Biochemistry* **1989**, *28*, 95.
- 37) (a) Poulter, C. D.; Aoki, T.; Daniels, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2620. (b) Zhang, D. - L.; Daniels, L.; Poulter, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1264. (c) Zhang, D.; Poulter, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1270. (d) Zhang, D.; Poulter, C. D. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3919. (e) Chen, A.; Zhang, D.; Poulter, C. D. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21701.
- 38) Gräther, O.; Arigoni, D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 405.
- 39) Warwel, S.; Kätker, H. *Synthesis* **1987**, 935.
- 40) (a) Schaverien, C. J.; Dewan, J. C.; Schrock, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2771. (b) Schrock, R. R.; Feldman, J.; Cannizzo, L. F.; Grubbs, R. H. *Macromolecules* **1987**, *20*, 1172. (c) Schrock, R. R.; Krouse, S. A.; Knoll, K.; Feldman, J.; Murdzek, J. S.; Yang, D. C. *J. Mol. Catal.* **1988**, *46*, 243. (d) Schrock, R. R.; DePue, R. T.; Feldman, J.; Schaverien, C. J.; Dewan, J. C.; Liu, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1423. (e) Schrock, R. R. *Acc. Chem. Res.*

- 1990, 23, 158. (f) Schrock, R. R.; Murdzek, J. S.; Bazan, G. C.; Robbins, J.; DiMare, M.; O'Regan, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3875.
- 41) (a) Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9858. (b) Schwab, P.; France, M. B.; Ziller, J. W.; Grubbs, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2039. (c) Grubbs, R. H.; Miller, S. J.; Fu, G. C. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446. (d) Schwab, P.; Grubbs, R. H.; Ziller, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 100. (e) Dias, E. L.; Nguyen, S. T.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3887. (f) Schneider, M. F.; Lucas, N.; Velder, J.; Blechert, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 257.
- 42) For reviews of olefin metathesis, see: (a) Grubbs, R. H., *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol 5; Pergamon Press: Oxford, 1991, p 1115. (b) Schuster, M.; Blechert, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2036. (c) 辻二郎, *有機合成化学協会誌*, **1997**, *55*, 1101. (d) Armstrong, S. K. *Perkin Trans. 1* **1998**, 371. (e) Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413.
- 43) For examples of the ring closing metathesis methodology of natural product synthesis, see: (a) Fürstner, A.; Langemann, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3942. (b) Fürstner, A.; Langemann, K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8746. (c) Xu, Z.; Johannes, C. W.; Salman, S. S.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10926. (d) Nicolaou, K. C.; He, Y.; Vourloumis, D.; Vallberg, H.; Yang, Z. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 166. (e) Nicolaou, K. C.; He, Y.; Vourloumis, D.; Vallberg, H.; Roschangar, F.; Sarabia, F.; Ninkovic, S.; Yang, Z.; Trujillo, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7960. (f) Fürstner, A.; Langemann, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9130. (g) Meng, D.; Bertinato, P.; Balog, A.; Su, D. -S.; Kamenecka, T.; Sorensen, E. J.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10073. (h) Xu, Z.; Johannes, C. W.; Houry, A. F.; La, D. S.; Cogan, D. A.; Hofilena, G. E.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10302. (i) Fürstner, A.; Müller, T. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 424.
- 44) Kinoshita, A.; Mori, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8356.
- 45) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4741.
- 46) Bangham, A. D.; Horne, R. W. *J. Mol. Biol.*, **1964**, *8*, 660.
- 47) (a) 寺田 弘, 吉村 哲郎, 「ライフサイエンスにおけるリポソーム 実験マニュアル」, シュプリンガー・フェアラーク東京 (1992). (b) 村上 幸人, 「超分子化学の基礎と応用」, エヌ・ティー・エス (1996).
- 48) (a) Kunitake, T.; Okahata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 3860. (b) Kunitake, T.; Okahata, Y.; Tamaki, K.; Kumamaru, F.; Takayanagi, M. *Chem. Lett.* **1977**, 387. (c) Kunitake, T.; Okahata, Y.; Shimomura, M.; Yasunami, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *103*, 5401. (d)

- Kunitake, T.; Okahata, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1978**, *51*, 1877. (e) Kunitake, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 709.
- 49) (a) Plobeck, N.; Eifler, S.; Brisson, A.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5249. (b) Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 11. (c) ギイ ウリソン, 中谷 陽一, *蛋白質 核酸 酵素*, **1998**, *43*, 1953.
- 50) Penney, C. L.; Belleau, B. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 2396.
- 51) (a) Szoka, Jr., F. C.; Papahadjopoulos, D. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1980**, *9*, 467. (b) Lichtenberg, D.; Barenholz, Y. *Methods Biochem. Anal.* **1988**, *33*, 337. (c) Woodle, M. C.; Papahadjopoulos, D. *Methods Enzymol.* **1989**, *171*, 193.
- 52) Lepault, J.; Pattus, F.; Martin, N. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, *820*, 315.
- 53) Shimada, I.; Ishida, H.; Ishitani, A.; Kunitake, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *120*, 523.
- 54) (a) Rakshif, A. K.; Zografis, G.; Jalal, I. M.; Gunstone, F. D. *J. Colloid Int. Sci.* **1981**, *80*, 466. (b) Rolandi, R.; Schindler, H.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *Eur. Biophys. J.* **1986**, *14*, 19. (c) Tomoaia-Cotisel, M.; Zsako, J.; Mocanu, A.; Chifu, E.; Quinn, P. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *942*, 295. (d) Quinn, P. J.; Kates, M.; Tocanne, J. -F.; Tomoaia-Cotisel, M. *Biochem. J.* **1989**, *261*, 377. (e) Tomoaia-Cotisel, M.; Chifu, E.; Zsako, J.; Mocanu, A.; Quinn, P. J.; Kates, M. *Chem. Phys. Lipids* **1992**, *63*, 131. (f) Kamino, A.; Ariga, K.; Kunitake, T.; Birault, V.; Pozzi, G.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Coll. Surf. A* **1995**, *103*, 183.
- 55) (a) Prendergast, F. G.; Haugland, R. P.; Callaha, P. J. *Biochemistry* **1981**, *20*, 7333. (b) Kubina, M.; Lanza, F.; Cazenave, J. -P.; Laustriat, G.; Kuhry, J. -G. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *901*, 138. (c) Kitagawa, S.; Matsubayashi, M.; Kotani, K.; Usui, K.; Kametani, F. *J. Membrane Biol.* **1991**, *119*, 221.
- 56) Taguchi, K.; Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *New J. Chem.* **1998**, *22*, 63.
- 57) Bult, C. J.; White, O.; Olsen, G. J.; Zhou, L.; Fleischmann, R. D.; Sutton, G. G.; Blake, J. A.; FitzGerald, L. M.; Clayton, R. A.; Gocayne, J. D.; Kerlavage, A. R.; Dougherty, B. A.; Tomb, J.-F.; Adams, M. D.; Reich, C. I.; Overbeek, R.; Kirkness, E. F.; Weinstock, K. G.; Merrick, J. M.; Glodek, A.; Scott, J. L.; Geoghagen, N. S. M.; Weidman, J. F.; Fuhrmann, J. L.; Nguyen, D.; Utterback, T. R.; Kelley, J. M.; Peterson, J. D.; Sadow, P. W.; Hanna, M. C.; Cotton, M. D.; Roberts, K. M.; Hurst, M. A.; Kaine, B. P.; Borodovsky, M.; Klenk, H. -P.; Fraser, C. M.; Smith, H. O.; Woese, C. R.; Venter, J. C. *Science* **1996**, *273*, 1058.

- 58) (a) Sprott, G. D.; Meloche, M.; Richards, J. C. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 3907. (b) Choquet, C. G.; Patel, G. B.; Beveridge, T. J.; Sprott, G. D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *42*, 375.
- 59) De Rosa, M.; Esposito, E.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.; Bu'Lock, J. D. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 827.
- 60) (a) Clarke, N. G.; Hazlewood, G. P.; Dawson, R. M. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 561. (b) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Huber, R.; Lanzotti, V.; Nicolaus, B.; Stetter, K. O.; Trincone, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1300. (c) Carballeira, N. M.; Reyes, M.; Sostre, A.; Huang, H.; Verhagen, M. F. J. M.; Adams, M. W. W. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2766. (d) Lee, J.; Jung, S.; Lowe, S.; Zeikus, J. G.; Hollingsworth, R. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5855.
- 61) (a) Fitz, W.; Arigoni, D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1992**, 1533. (b) Gräther, O. *ETH Dissertation*, **1994**.
- 62) Prado, A.; Da Costa, M. S.; Madeira, V. M. C. *J. Gen. Microbiol.* **1988**, *134*, 1653.
- 63) Ferrante, G.; Ekiel, I.; Sprott, G. D. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 17062.
- 64) Hashimoto, H.; Kawanishi, M.; Yuasa, H. *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 556.
- 65) Ogawa, T.; Beppu, K.; Nakabayashi, S. *Carbohydrate Res.* **1981**, *93*, C6.
- 66) Singleton, W. S.; Gray, M. S.; Brown, M. L.; White, J. L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1965**, *42*, 53.
- 67) (a) Seelig, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4839. (b) Seelig, J. *Q. Rev. Biophys.* **1977**, *10*, 353. (c) Seelig, J.; Seelig, A. *Q. Rev. Biophys.* **1980**, *13*, 19. (d) Smith, I. C. P.; Jarrell, H. C. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 266. (e) Davis, J. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *737*, 117. (f) DeRopp, J. S.; Knudsen, M. J.; Troy, F. A. *Chemica Scripta* **1987**, *27*, 101. (g) Krajewski-Bertrand, M. -A.; Milon, A.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1105*, 213. (h) DeBoeck H.; Zidovetzki, R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 623. (i) Macdonard, P. M. *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 196.
- 68) Cane, D. E.; Yang, G. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5794.
- 69) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 2419.
- 70) a) Tamura M.; Kochi, J. *Synthesis* **1971**, 303. (b) Eguchi, T.; Sai, H.; Takatsuto, S.; Hara, N.; Ikekawa, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2303.
- 71) (a) Milon, A.; Lazrak, T.; Albrecht, A. -M.; Wolff, G.; Weill, G.; Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *859*, 1. (b) Sun, S. -T.; Milon, A.; Tanaka, T.; Ourisson, G.; Nakatani, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *860*, 525.

- 72) (a) Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 812, 55.
(b) Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 858, 161.
- 73) (a) Szoka, Jr., F. C.; Jacobson, K.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 551, 295. (b) Barchfeld, G. L.; Deamer, D. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 819, 161.
- 74) (a) Balch, W. E.; Wolfe, R. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, 32, 781. (b) Breuil, C.; Patel, G. B. *Can. J. Microbiol.* **1980**, 26, 577. (c) Sowers, K. R., Schreier, H. J., Eds. *Archaea: A Laboratory manual: Methanogens*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 1995.
- 75) (a) Nishihara, M.; Koga, Y. *J. Biochem.* **1987**, 101, 997. (b) Choquet, C. G.; Patel, G. B.; Beveridge, T. J.; Sprott, G. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, 58, 2894.
- 76) Weinstein, J. N.; Yoshikami, S.; Henkart, P.; Blumenthal, R.; Hagins, W. A. *Science* **1977**, 195, 489.
- 77) (a) Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. *Chem. Lett.* **1998**, 901. (b) Dannenmuller, O., Arakawa, K., Eguchi, T., Kakinuma, K., Blanc, S., Albrecht, A. -M., Schmutz, M., Nakatani, Y., Ourisson, G. In *Giant Vesicles*; Luisi, P. L., Walde, P., Eds.; John Wiley: Sussex, 1999; p 385.
- 78) (a) Baer, E. *J. Biol. Chem.* **1951**, 189, 235. (b) Stewart, L. C.; Kates, M. *Chem. Phys. Lipids* **1989**, 50, 23.
- 79) (a) Cullis, P. R.; De Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 507, 207. (b) Cullis, P. R.; De Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, 559, 399. (c) Seelig, J. *NATO ASI. Ser., Ser. A* **1985**, 71, 27.
- 80) (a) Tabony, J.; Llor, A.; Drifford, M. *Colloid Polym. Sci.* **1983**, 261, 938. (b) Lin, T. -L.; Liu, C. C.; Roberts, M. F.; Chen, S. H. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 6020.
- 81) (a) Gliozzi, A.; Paoli, G.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 735, 234. (b) Gulik, A.; Luzzati, V.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *J. Mol. Biol.* **1985**, 182, 131. (c) Gulik, A.; Luzzati, V.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *Syst. Appl. Microbiol.* **1986**, 7, 258. (d) Gliozzi, A.; Buruno, S.; Basak, T. K.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *Syst. Appl. Microbiol.* **1986**, 7, 266. (e) Gulik, A.; Luzzati, V.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *J. Mol. Biol.* **1988**, 201, 429. (f) Cavagnetto, F.; Relini, A.; Mirghani, Z.; Gliozzi, A.; Bertoia, D.; Gambacorta, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1106, 273.
- 82) Arakawa, K.; Kano, H.; Eguchi, T.; Nishiyama, Y.; Kakinuma, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, 72, 1575.
- 83) Oku, N.; Tokudome, Y.; Koike, C.; Nishikawa, N.; Mori, H.; Saiki, I.; Okada, S. *Life Sci.* **1996**, 58, 2263.

- 84) (a) Gliozzi, A.; Rolandi, R.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *J. Membrane Biol.* **1983**, 75, 45. (b) Lelkes, P. I.; Goldenberg, D.; Gliozzi, A.; De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Miller, I. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 732, 714. (c) Mirghani, Z.; Bertoia, D.; Gliozzi, A.; De Rosa, M.; Gambacorta, A. *Chem. Phys. Lipids* **1990**, 55, 85. (d) Morii, H.; Koga, Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10492.

謝 辞

本研究を行なうにあたり終始御指導御鞭撻を賜りました本学教授 柿沼 勝己 先生ならびに本学助教授 江口 正 先生に厚く感謝致します。

本研究の第 2 章の結果は通商産業省工業技術院物質工学工業技術研究所 田口 和宏 博士との共同研究によって得られた成果であります。深く感謝致します。

第 5 章の結果はルイ・パスツール大学のギィ ウリソン 教授，中谷 陽一 教授との共同研究によって得られた成果であります。この場を借りて深謝いたします。

単分子膜測定でお世話になりました本学教授 柿本 雅明 先生ならびにジョン チョルス 氏に深く感謝致します。

TEM 測定でお世話になりました帝京大学医真菌センター 西山 彌生 先生に深謝致します。

DSC 測定及び粒径測定でお世話になりました日本サーファクタント工業株式会社に感謝致します。

元素分析を行なって下さいました本学技官 久保 幸代 女史に深謝致します。

合成原料を提供して下さいました高砂香料工業株式会社及びダイソー株式会社に感謝致します。

また、常なる御助言激励をいただきました元本学助手（現九州大学助教授）山内 敬明 先生，本学助手 松島 芳隆 博士ならびに本学助手 為我井 秀行 博士に感謝致します。

本研究に関連して、多くの有益な知見を残して下さいました寺地 拓己 氏，狩野 弘樹 氏，茨木 和也 氏ならびに森田 幹雄 氏に感謝致します。

最後に、有益な御指摘、御討論、御助力を頂きました柿沼・江口研究室の皆様がこの場を借りて深く感謝致します。

平成 11 年 9 月