

光で透過制御可能な人工ベシクルを形成する新規多鎖型両親媒性化合物の開発

大阪大学大学院 工学研究科分子化学専攻

中 辻 洋 司

In order to develop novel type of artificial vesicles which can regulate the release ability of entrapped substances by light, four cinnamic acid-derived amphiphiles **1-4** were prepared, and their photoreactivity and aggregation behavior in the solution, the aqueous dispersion, and the DPPC (L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine) bilayer matrix were examined. Although 4-hexadecyloxycinnamic acid (**3**) was converted to the *syn* head to head dimer in the DPPC bilayer matrix by irradiation at above 280 nm light with formation of *cis* isomer, the corresponding 3-bromo-4-hexadecyloxycinnamic acid (**4**) dimerized without formation of the *cis* isomer. The release of entrapped glucose from the vesicle composed of a 1:1 mixture of cinnamic acid-derived amphiphile **1** (or **2**) and DPPC was suppressed by irradiation at above 280 nm light and the extent of suppression was much larger in the case of **2**. The formation of *cis* isomer accelerated the leakage of the entrapped glucose. In addition, the release of entrapped glucose from the vesicle containing **2** was accelerated by irradiation at 254 nm, which can convert the dimer to the monomer.

1. 緒 言

生体膜の構成成分であるホスファチジルコリン等のリン脂質は水中で分散させるとベシクルと呼ばれる小胞体を形成する。このベシクルは二分子膜によって外水相から隔てられた内水相をもつためその中に水溶性物質を保持させることができ、マイクロカプセルとしての利用が考えられる。そのため、ドラッグデリバリーシステムの構築など特に医療分野で注目されている。一方、化粧品素材としても既に利用されているが、リン脂質のみからなるベシクルでは、水溶性物質の容物としての機能を果たしているにすぎず、その利用は自ずと限定される。従って、この機能に加えて内包物の透過速度を自在に制御することができればさらに利用範囲が拡大され、新しい化粧品素材の開発に大きな可能性を提供するものと期待される。

最近、著者らは、スチリルピラジン型両親媒性化合物が光により単量体と二量体間を可逆的に変換できること、さらに当該化合物とジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)で調製した混合ベシクルでは、光制御により内包物の完全な抑制-促進が行えることを見いだした¹⁻⁴⁾。このような光応答性を示す機能性分子は数多く知られており⁵⁾、それぞれ固有の機能を示すことが期待されるので、さらなる高性能化を指向して新しい構造を有する両親媒性化合物を開発することは極めて重要な課題といえる。その一つに桂皮酸誘導体があるが、光反応に関する研究⁶⁻⁸⁾も

古くから行われており、*cis-trans* 異性化の他に、[2+2]付加環化(以下、光二量化と呼ぶ)することが知られている。固体状態での光反応はその結晶構造に依存した光反応生成物を与えるが、溶液中の光反応においては *cis-trans* 異性化が優先的に進行する。また最近では、桂皮酸誘導体をミセルやLB膜中に導入することで分子間の配向を変化させ、光反応生成物を制御する研究が盛んに行われている⁹⁻¹³⁾。

そこで本研究では、光により自在に内包物の透過制御ができる新規な人工ベシクルの構築を目的として、光応答部位に桂皮酸ユニットをもつ二鎖型リン脂質類縁体 (**1**, **2**) 並びに対応する一鎖型類縁体 (**3**, **4**) を新たに設計合成し、その光反応性、会合状態、並びに光による内包物の透過制御について検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 合成

市販の 3-bromo-4-methoxybenzaldehyde (**7**) から二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 (**2**) の合成方法を Scheme 1 に示す。化合物 **1** は同様の方法により合成した。

2.1.1 化合物 **8** の合成

ナスフラスコに、**7** (5.00 g, 23.3 mmol)、マロン酸 (4.84 g, 46.5 mmol)、ピリジン 10 mL、ピペリジン 4 滴を入れ、100℃で 24 時間加熱した。反応終了後、氷 20 g - 濃塩酸 20 mL 中に投入した。析出した固体をろ別し、水洗後乾燥した。さらにこの固体をクロロホルムで洗浄し、メタノールから再結晶して白色固体を得た。収量 4.5 g (74%)。

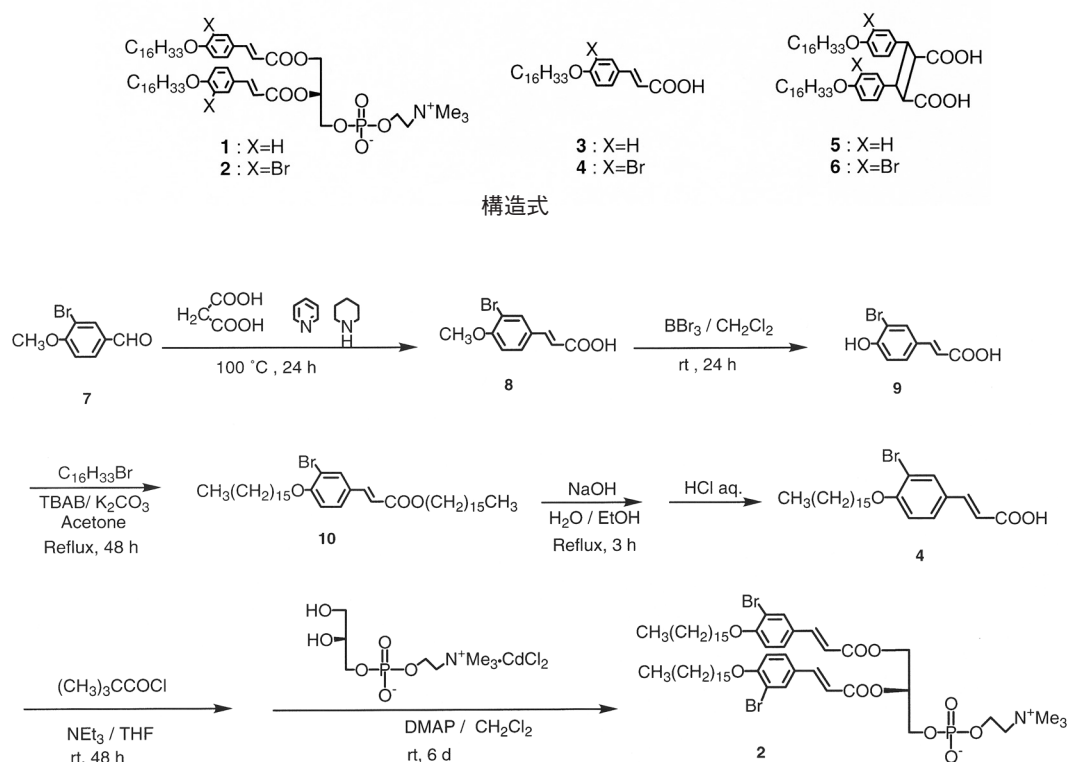
¹H-NMR (400MHz, d₆-acetone) : δ 7.91 (d, 1H, $J=2.2$ Hz, aromatic), 7.67 (dd, 1H, $J=8.4, 2.2$ Hz, aromatic), 7.58 (d, 1H, $J=16.1$ Hz, CH=CH), 7.14 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, aromatic), 6.45 (d, 1H, $J=16.1$ Hz, CH=CH), 3.95 (s, 3H, ArOCH₃) .



Development of Novel Amphiphilic Compounds with Multiple Hydrophilic Groups Forming Artificial Photoresponsive Vesicles

Yohji Nakatsuji

Department of Molecular Chemistry,
Graduate School of Engineering, Osaka
University



Anal. Found: H, 3.42; C, 46.43; Br, 30.97. Calcd. for $C_{10}H_9BrO_3$: H, 3.53; C, 46.72; Br, 31.08.

2.1.2 化合物 9 の合成

化合物 8 (2.34 g, 9.1mmol) を二口ナスフラスコに入れ、Ar 置換を行った後、ジクロロメタン 18mL を反応容器へ加えた。そこへ三臭化ホウ素 (0.1M ジクロロメタン溶液) (18mL, 18mmol) を加えた。室温で 24 時間反応後、反応溶液に水 10mL を加え三臭化ホウ素を失活した後、さらに水 40mL を加えて酢酸エチル (100mL×2) で抽出した。得られた有機層を飽和食塩水 (100mL×3) で洗浄後、NaOH 水溶液 (100mL) で有機層を抽出した。この水層を塩酸水溶液で酸性にした後、水層を酢酸エチル (100mL×2) にて抽出した。無水硫酸マグネシウムで脱水した後、溶媒を完全に留去し淡黄色固体を得た。

収量 1.97 g (収率 89%)

1H -NMR (400 MHz, d_6 -acetone): δ 7.85 (d, 1H, J = 2.2 Hz, aromatic), 7.59-7.50 (m, 2H, $CH=CH$, aromatic), 7.05 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 6.39 (d, 1H, J = 16.1 Hz, $CH=CH$).

2.1.3 化合物 10 の合成

化合物 9 (1.30g, 5.35mmol)、臭化セチル (6.53g, 21.4 mmol)、炭酸カリウム (5.90g, 42.8mmol)、触媒量の tetrabutylammonium bromide (TBAB) を二口ナスフラスコに入れ、Ar 置換を行った。この反応容器にアセトン 20

mL を Ar バブリングしながら加えた後、48 時間加熱還流した。放冷後、析出した固体をろ別して白色固体を得た。

収量 3.29g (収率 89%)

mp 140-141 °C .

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.75 (d, 1H, J = 2.2Hz, aromatic), 7.56 (d, 1H, J = 16.1 Hz, $CH=CH$), 7.41 (dd, 1H, J = 8.4, 2.2 Hz, aromatic), 6.87 (d, 1H, J = 8.4 Hz, aromatic), 6.31 (d, 1H, J = 16.1Hz, $CH=CH$), 4.19 (t, 2H, J = 6.6Hz, $ArCOOCH_2R$), 4.06 (t, 2H, J = 6.6 Hz, $ArOCH_2R$), 1.85 (m, 2H), 1.75-1.21 (m, 54H), 0.89 (t, 6H, J = 6.8 Hz).

Anal. Found : H, 10.24; C, 70.79; Br, 11.68. Calcd. for $C_{41}H_{71}BrO_3$: H, 10.34; C, 71.17; Br, 11.55.

2.1.4 化合物 4 の合成

ナスフラスコに化合物 10 (3.30 g, 4.77 mmol) を入れ、2.5 N 水酸化ナトリウム水溶液 4 mL、エタノール 8 mL を加えて、3 時間加熱還流した。放冷後、析出した固体をメンブランフィルターで吸引ろ過し、水 (4 mL) とエタノール (4 mL) で洗浄した (白色固体 2.2 g / 収率 94%)。得られた固体 0.40 g に 10 % 塩酸 (100 mL) を加えて、クロロホルム (100 mL×3) により抽出を行った。この有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水し、溶媒を留去した (白色固体)。

収量 0.32 g (収率 84%)

mp 50-51 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 4/1$): δ 7.73 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, aromatic), 7.42-7.34 (m, 2H, aromatic, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.85 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, aromatic), 6.57 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz, $\text{CH}=\text{CH}$), 4.03 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, ArOCH_2R), 1.82 (m, 2H, $\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{R}$), 1.51-1.16 (m, 26H), 0.89 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz).

2.1.5 化合物 2 の合成

二口反応管に化合物 4 (ナトリウム塩) (49 mg, 0.10 mmol) を入れて Ar 置換を行い、トリエチルアミン (90 μL , 0.64 mmol)、THF 4 mL を加えた。これを -78°C に冷却してトリメチルアセチルクロライド (40 μL , 0.32 mmol) をゆっくり加えた。その後室温に戻し、さらに 48 時間攪拌した。溶媒を留去して得られた白色固体に、 L - α -グリセロホスファチジルコリン (GPC) (13 mg, 0.03 mmol)、ジメチルアミノピリジン (DMAP) (13 mg, 0.10 mmol) を加え、Ar 置換を行い、ジクロロメタン 4 mL を加えて室温で 6 日間攪拌した。溶媒を留去して得られた淡黄色固体を CHCl_3 に溶解し、陽イオン交換樹脂 DOWEX-50W を詰めたカラム (展開溶媒: CHCl_3) を通すことにより Cd を除去し、トリエチルアミンを数滴加えて攪拌した後、溶媒を留去した。次に、シリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=7/3/0 \rightarrow 65/25/4$) を行い、白色固体を得た。

収率 17 mg (収率 50%)

FAB-MASS (m/z , %): 1156 ($[M^+ + 1]$, 7), 184 (100). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$): δ 7.57 (m, 2H, aromatic), 7.40 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7.27 (m, 2H, aromatic), 6.72 (m, 2H, aromatic), 6.15 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 5.24 (m, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.10 (m, 2H), 3.98 (m, 2H), 3.89 (m, 4H), 3.43 (m, 2H), 3.05 (s, 9H, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), 1.73-1.07 (m, 56H), 0.71 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz).

Anal. Found: H, 8.09; C, 57.39; N, 1.27; Br, 12.84. Calcd. for $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{Br}_2\text{NO}_{10}\text{P} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: H, 8.33; C, 57.56; N, 1.16; Br, 13.20.

2.2 DPPC 二分子膜中における化合物 3, 4 の光反応

Pyrex 製試験管に、両親媒性化合物 10 μmol (3 : 3.89 mg, 4 : 4.67 mg)、DPPC 10 μmol (7.34 mg) を入れ、クロロホルムを加えて溶解した。ロータリーエバポレータで溶媒を留去した後、デシケーター内で一晩減圧乾燥させ、試験管内壁に薄膜を形成させた。ここに、超純水 2.0 mL を加え、 80°C の水浴中で加温し、振とう、膨潤によって、試験管内壁から剥離させた後、 80°C の水浴中で、25 W プローブ型ソニケーターを用いて、5 分間断続的 (10 秒 ON、10 秒 OFF の繰り返し) に超音波照射した。放冷後、この分散液に超純水 4.0 mL を加えて、6.0 mL とし、こ

の分散液を 9 つに分取した。それぞれの分散液は Ar バブリングを行い空気を除去した後、Xe 灯光 (波長 >280 nm) で所定時間照射した。光照射後、 $^1\text{H-NMR}$ により光反応生成物の同定を行った。

2.3 化合物 1, 2/DPPC 混合ベシクルにおける内包物流出実験

化合物 10 μmol (1 : 9.98 mg, 2 : 11.56 mg)、DPPC 10 μmol (7.34 mg) を Pyrex 製の試験管に入れ、クロロホルムを加えて溶解した。ロータリーエバポレータで溶媒を留去した後、デシケーター内で一晩減圧乾燥させ、試験管内壁に薄膜を形成させた。ここに、グルコース水溶液 (20 mM Tris-HCl Buffer, 300 mM グルコース, pH7.5) 2.0 mL を加え、 80°C の水浴中で加温し、振とう、膨潤によって、試験管内壁から剥離させた後、 80°C の水浴中で、25 W プローブ型ソニケーターを用いて、5 分間断続的 (10 秒 ON、10 秒 OFF の繰り返し) に超音波照射した。3 時間後、分散液を 2 分し、一方に Ar 置換を行い、波長 >280 nm の光を 1 時間照射した。2 つのベシクル分散液は、そのまま一晩静置した。その後、各分散液 1 mL を、バッファー水溶液 (20 mM Tris-HCl Buffer, 300 mM スクロース, pH 7.5) を溶離液として、ゲル濾過 (Sephadex G-50, 2 g, 15×100 mm) し、ベシクルフラクション 3.0 mL を集めた。このベシクル分散液を 25°C の恒温槽中で静置し、所定時間ごとにサンプリングして相対蛍光強度の測定を行った。流出性の測定は酵素法を用いて行った¹⁴⁾。

3. 結果と考察

3.1 一鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 3, 4 の光反応性

化合物 3, 4 とともにジクロロメタン均一溶液系で光照射 (>280 nm) すると、*cis* 体への異性化が優先するが、水分散系では対応する β 二量体 5, 6 をそれぞれ選択的に与える。化合物 3 の構造で、ヘキサデシル基をメチル基に置き換えた誘導体では水分散系で光二量化は進行しないが、長鎖誘導体により光二量化が起こることは興味深い。3-プロモ置換体ではメチル基でも光二量化が優先する。化合物 3, 4 単独系ではベシクルを形成しないことがわかったので、化合物 3, 4 と DPPC の 1:1 混合ベシクルを調製し、カルボキシルオレセインを内包物とする取り込み実験を行い、ベシクルを形成していることを確認した。この混合ベシクルの光反応の結果を Fig. 1 に示す。興味深いことに、化合物 3 では光二量体に加えて *cis* 体の生成が観測されたのに対して、プロモ置換基をもつ化合物 4 では *cis* 体を形成することなく対応する光二量体を与えていることがわかった。

3.2 二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 1, 2 の光反応性

クロロホルム均一溶液中では、UV スペクトルから化合

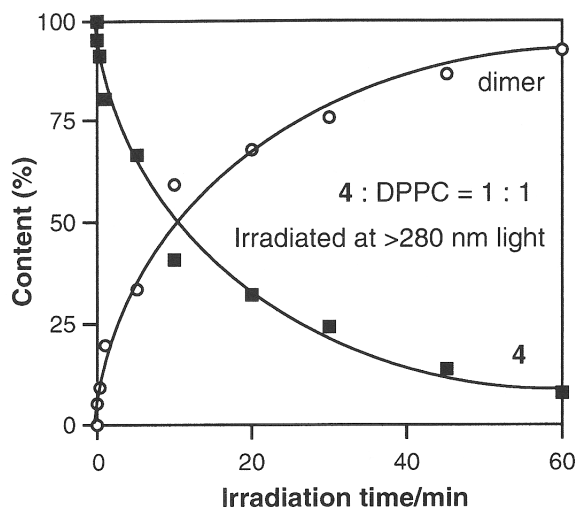
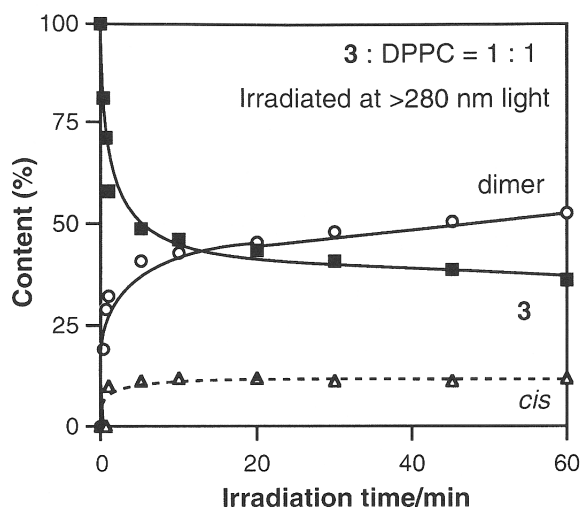


Fig.1

物 **1**, **2** ともに二量化反応の進行が示唆されたが、¹HNMR からいずれも二量体に加えて *cis* 体が生成していることを確認した。各生成物を GPC 並びに MALDI-TOF MASS を用いて分析したところ、GPC ではともに原料よりも遅い保持時間にピークが観測され、また MALDI-TOF MASS でも、ともに分子内二量化反応生成物の分子イオンピークしか観測されなかった。一方、水分散系では、UV スペクトルから化合物 **1**, **2** ともに二量化反応が進行していることが示唆されたが、溶液中とは異なり両化合物で顕著な違いが見られた。化合物 **2** では光照射直後に UV スペクトルにおいて短波長側へのシフトが起こった。これは *cis* 体の生成が考えられる。一方、化合物 **2** ではそのような変化はなく、また光照射とともに極大吸収波長 (295nm) のピークが単量体の濃度に換算して二次速度式に従って減少し、定量的に光二量化反応が進行していることがわかった。化合物 **1** ではこの速度式に当てはめて直線関係が得られないことから *cis* 体の生成が支持される。光を 1 時間照射したサンプルを GPC により分析したところ、いずれも原料よりも保持時間の早いピークが観測され、分子間二量化反応が起こっていることがわかった。MALDI-TOF MASS でも分子間二量体の存在を確認した。同様の光照射実験を DPPC との 1:1 混合ベシクルを用いて行った。この場合には水分散系と同様に、化合物 **1** では *cis* 体の生成が認められたが、化合物 **2** では *cis* 体の生成は認められなかった。

以上の結果から、二鎖型両親媒性化合物 **1**, **2** は溶液中においては分子内光二量化反応と *cis* 体への異性化が進行すること、また水分散系においては分子間二量化反応も進行し、特に化合物 **2** では *cis* 体への異性化が殆ど起こらないという興味深い知見を得た。

3.3 二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 **1**, **2**/DPPC 混合

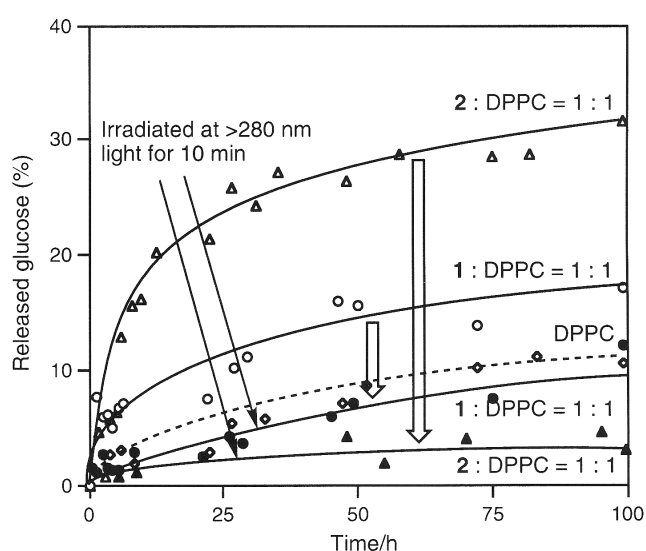


Fig.2

ベシクルの内包物流出性

化合物 **1** あるいは **2**/DPPC 混合ベシクルからのグルコースの流出実験の結果を Fig. 2 に示す。**2**/DPPC 混合ベシクルは **1**/DPPC 混合ベシクルに比べ流出性が高いことがわかった。しかし、光を照射することで、**2**/DPPC 混合ベシクルは流出の少ない安定なベシクルを形成することが示された。この光照射による流出性の変化は、光照射により DPPC 二分子膜中で桂皮酸ユニットが二量化して膜がタイトになることによると考えられるが、その二量化反応が分子内よりも分子間で進行することで膜がよりタイトになっていることがわかった。**2**/DPPC 混合ベシクルは、光照射による流出性抑制の効果が大きいことから、分子間での反応が **1**/DPPC 混合ベシクルに比べて進行しやすいことが考えられる。また光反応の結果から明らかになったように **1** での *cis* 体への異性化もこの結果に影響していると思われる。

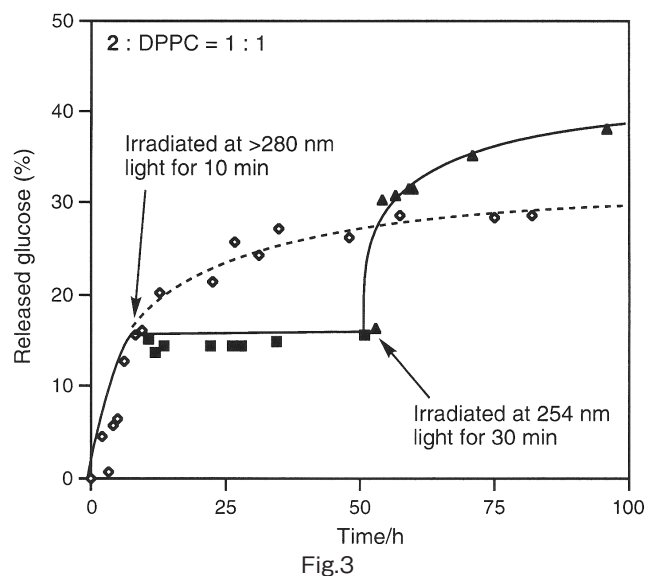
二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物が分子間で光二量化し、膜の高分子化が期待できること、またプロモ基を導入することで光照射による流出性の変化が大きいことから、次に、異なる波長の光照射による **2**/DPPC 混合ベシクル膜からの内包物の流出制御実験を行った。その結果を Fig. 3 に示す。**2**/DPPC 混合ベシクルに波長 >280 nm の光を照射することで流出が抑制されるが、この混合ベシクルに波長 254 nm の光を照射すると流出の促進が認められた。このことから、異なる波長の光照射による内包物の流出制御が可能ながことが明らかとなった。

4. 総 括

本研究では、桂皮酸ユニットを有する両親媒性化合物の光反応性と二分子膜挙動について検討した。水分散系における光反応性を調べたところ、一鎖型桂皮酸系両親媒性化合物 **3**, **4** ではほぼ定量的に二量化反応が進行することがわかった。一方、DPPC 二分子膜中では、Br 基を導入した **4** は *cis* 異性化を伴わずに二量化反応だけが進行するが、**3** では *cis* 異性化を伴うことが明らかになった。*cis* 体の生成は膜の安定化に不利なことから、Br 基を導入した化合物は、DPPC との混合ベシクルにおける内包物流出制御に適した化合物であることが示唆された。次に、二鎖型桂皮酸系両親媒性化合物であるホスファチジルコリン誘導体 **1**, **2** の光反応性と二分子膜挙動について検討した。溶液中では、どちらの化合物も二量化反応と *cis* 異性化がともに進行することが確認された。水分散系での光反応では Br 基を導入した化合物 **2** が *cis* 体への異性化を伴わずに二量化反応のみが進行していることがわかった。これらのホスファチジルコリン誘導体 **1**, **2** と DPPC との混合ベシクルからの内包物の流出性を検討したところ、Br 基の導入により流出性が増加すること、また光照射による流出性抑制の効果が大きいことがわかった。Br 基を導入した化合物 **2** と DPPC との混合ベシクルの内包物流出制御を検討したところ、波長 >280 nm の光照射により流出の抑制、波長 254 nm の光照射により流出の促進が観測され、異なる波長の光照射による内包物の流出制御に成功した。

(参考文献)

- 1) J. Park, W. Zhang, Y. Nakatsuji ほか 2 名, *Chem. Lett.*, **1999**, 1309.
- 2) J. Park, W. Zhang, Y. Nakatsuji ほか 2 名, *Chem. Lett.*, **2000**, 182.
- 3) J. Park, S. Aoyama, W. Zhang ほか 2 名, *Chem. Commun.*, (3), 231-232 (2000).
- 4) J. Park, S. Aoyama, W. Zhang ほか 2 名, *J. Jpn. Oil*



Chem. Soc., **49**, (3), 271-274 (2000).

- 5) D. G. Whitten, *Acc. Chem. Res.*, **26**, 502 (1993).
- 6) P. Venugopalan, T. Bharati, and K. Venkatesan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1991**, 981-987.
- 7) M. D'Auria, and A. Vantaggi, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 2523-2528.
- 8) D. Stewart, G. W. Robertson, and I. M. Morrison, *Rapid Communication Mass Spectrometry*, **1992**, 6, 46-53.
- 9) T. Nakamura, K. Takagi, M. Itoh ほか 4 名, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1997**, 2751-2755.
- 10) M. Yamamoto, N. Furuyama, and K. Itoh, *J. Phys. Chem.*, **1996**, 100, 18483-18490.
- 11) T. Imae, T. Tsubota, H. Okumura ほか 4 名, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 6046-6053.
- 12) H. Koch, A. Laschewsky, H. Ringsdorf ほか 1 名, *Makromol. Chem.*, **1986**, 187, 1843-1853.
- 13) M. Sugimoto, K. Shibahara, K. Kuroda ほか 3 名, *Langmuir*, **1996**, 12, 2785-2790.
- 14) I. Miwa, J. Okuda, K. Maeda ほか 1 名, *Clin. Chim. Acta*, **37**, 538 (1972).