最近のイオノフォアの展望*

木 村 栄 一**

広島大学医学部総合薬学科活性構造化学教室 〒734 広島市南区霞 1-2-3

抗生物質あるいは合成イオノフォアを用いた研究は、今や生化学、化学、薬学、医学、農学と考えられ得るあらゆる分野にまたがり、現在最もはなばなしく脚光をあびている学問領域の一つといっても過言ではない。化学的観点から興味ある最近の話題をいくつか拾ってみると、(1) カチオン輸送に及ぼすアニオンの影響、(2) イオノフォアによる生体有機アミンの取込み、(3) Gramicidin 等直鎖ペプチドイオノフォアのチャネル機構の確立、(4) キャリアーカチオンの親水性鎖体構造と疎水性錯体構造、等があげられよう。今回これら化学的トピックスについて簡単に紹介し解説してみたいと思う。これらの情報は、他の関連分野への応用展開が期待されるのみならず、生体膜が日常営む最も重要な一つの機能、カチオン輸送の化学的機構を理解する上で、極めて意義深いと思われるからである。なお本稿でとりあげるイオノフォアの予備的な事柄については、文献 1, 2 を参照されれば幸いである。

1. カチオン輸送に及ぼすアニオン効果
2. イオノフォアの生体有機アミンの取込み
3. チャネル機構の確立
4. イオノフォアの親水性鎖体と疎水性鎖体
5. おわりに

1. カチオン輸送に及ぼすアニオン効果

解離して(一)に荷電したカルボン酸イオノフォアとカチオンは直接相互作用をもつが、中性イオノフォアがカチオンを捕捉する時対アニオンがついてくる。比較的最近までは、イオノフォアのカチオン取込み、膜輸送といえば、イオノフォア-カチオンの相互作用だけで説明されることが多かったが、共存する対アニオンの効果が場合によっては無視できないほど大きいことが判ってきた。

最も構造が簡単な合成イオノフォアであるクラウンエーテル(1)で説明しよう³⁾。

Fig. 1 の液体モデルを用いた実験で、 CHCl_3 層(1を含む)を介してカチオンの水層 1 → 2 移行速度はアニオン種を変えただけで数桁もかわることが Table 1 から明らかであろう。

アニオンの効果はサイズや荷電数で決まるようである。ハロゲンイオンで比較すると、 $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$ の順

Fig. 1 液体膜モデル装置

である；同じ 1 価アニオンであっても、picrate, PF_6^- , ClO_4^- , H_2PO_4^- , NO_3^- , BF_4^- 等はより小さな OH^-

* Recent Topics in Ionophores

** Eiichi Kimura: Department of Medicinal Chemistry, Hiroshima University, School of Medicine, Kasumi, Hiroshima 734

Table 1 (1) による各種カチオン輸送速度³⁾

塩	濃度 (mol/l)	輸 送 速 度 (mol/hr) · 10 ⁷	塩	濃度 (mol/l)	輸 送 速 度 (mol/hr) · 10 ⁷
NaCl	1.0	0.31	KClO ₄	0.1	123
NaBr	"	1.6	K acetate	1.0	1.4
NaI	"	15	K benzoate	1.0	10
KF	"	0.85	K picrate	0.002	510
KCl	"	6.1	K ₃ PO ₄	1.0	<1
KBr	"	88	K ₂ HPO ₄	1.0	<1
KI	"	620	KH ₂ PO ₄	1.0	290
KNO ₃	"	250	K BF ₄	0.02	31
KOH	"	2.1	K PF ₆	0.02	6.6

やハロゲンイオンよりも輸送速度をはやめる；多価リン酸イオンはほとんど移動させない，等の事実は，アニオンの脱水和エネルギーが小さいほどカチオンの膜移動をはやめることを示唆する。脱水和が容易なほど M^{+} -クラウン錯体とイオン対を形成しやすくカチオン錯体の膜移動を有利にするのであろう。また K picrate と KNO₃ の混合物を(1)で膜輸送させ，移行した $[K^{+}]$, $[picrate^{-}]$ 濃度を各々原子吸光法，比色法によって測定したところ同じモル濃度であった。このことは水溶液中に2つ以上のアニオンが共存していても有機層に移りやすいアニオンのみがカチオン錯体にくっついて行くことを意味する。液体膜実験ではアニオン選択性に注意しなくてはならないことが明らかであろう。

中性イオノフォアの典型である Valinomycin (2) の通常いわれる膜輸送のカチオン選択性 $K^{+} \gg Na^{+}$ は，有機アニオンの Trinitro-*m*-cresol (TNC⁻) を共存させると消失する⁴⁾。適当なアニオンや溶媒を用いると脂溶性イオン対が形成され，特に Na^{+} -(2) 錯体のみに有利に働き相対的に K^{+} 選択性を減少させるのであろうと説明された⁵⁾。以下に述べるように Nmr 法でこの説明は支持された⁶⁾。

M⁺-Valinomycin (2)

1:1 K^{+} -(2) 錯体では，アニオン種 (Br^{-} , SCN^{-} , TNC^{-} , $B(C_6H_5)_4^{-}$) や溶媒種 ($CHCl_3$, アセトン) を変えても，(2) の conformation (A_2 型-図 2.3 参照) は変化がない。それに対して 1:1 Na^{+} -(2) 錯体は， $CHCl_3$ 溶液中 $B(C_6H_5)_4^{-}$ アニオンのときだけ K^{+} 錯体に近い conformation をとるが，アニオンが他のときは A_2 型と free (2) (A_2 型よりも分子内水素結合が3つも少ない開放 B 型 conformation) の中間と見なせるような conformation をとっている。いいかえれば， Na^{+} 錯体はいくらか解離している状態にあるといえよう。この状態で

Fig. 2 (2) 分子内水素結合の溶媒による conformation 変化⁷⁾
矢印は分子内水素結合を表わす。

Fig. 3 K^+ -(2) 錯形成の際の conformation 変化⁷⁾
(A_2 型は 6 つの分子内水素結合によって錯体を安定化している)

Na^+ は, (2) の 6 つのカルボニル酸素ドナー原子のうちわずか 3 つと配位し (比較的小さな Na^+ イオンを環内に収容するのに 6 つの酸素と配位すると conformation に無理が生ずる), 残り 3 つの Na^+ 配位座は Br^- , SCN^- , TNC^- 等のアニオンとイオン対 (または弱い配位結合) を形成している. アニオンがかさ高い $B(C_6H_5)_4^-$ のときそのようなイオン対相互作用は立体的に無理がある. したがってそのあきをうるためにやむをえず残り 3 つのカルボニル酸素が配位し (正八面体配位となる), A_2 型 conformation をとるが, K^+ 錯体の A_2 型と比べ不安定な状態にあると考えられる.

最初に挙げた 1:1 18-crown-6 金属錯体の場合, すべてほぼ平面配位であるので, その上下があいており, そこで対アニオンと強い相互作用や溶媒和が起こったりするわけである⁸⁾. これが環サイズと酸素ドナー数の多い Crown になると (例 Dibenzo-30-crown-10)⁸⁾, カチオンはすっぽりとつつみこまれるので対アニオンや溶媒からしゃへいされ, したがってそれらの影響は少なくなる. 同じような大環状であっても, (2) の場合, 30-crown-10 と異なって, 分子内水素結合が環 conformation の安定化に大きく寄与するので溶媒やアニオンとの相互作用が強く起こる.

M^+ -(2) 錯体とイオン対を形成して膜透過しやすくなることに着目して, 有機アニオンを膜輸送させた実験例が報告されている⁹⁾. Trinitrobenzenesulfonate 塩 (M^+ TNBS-) はそのままでは赤血球膜を透過できないが, (2) を添加すると透過するようになった. これは (M^+ -(2))...TNBS- というイオン対三重複合体を形成したためと解釈される. M^+ の効果は $Rb^+ > K^+ > Cs^+$ の順であった. 他の有機アニオンはしばしば拮抗的に働き, picrate や 1-anilino-8-naphthalenesulfonate 等は TNBS- の膜透過を阻害することも容易に理解できよう.

中性イオノフォア-カチオン錯体は (+) 荷電をもつので膜透過性は当然膜の性質によって影響される. (-) 荷電した phosphatidylglycerol と (+) 荷電の lysylphosphatidylglycerol の膜を比べると, (2) による Rb^+ や K^+ の透過性は前者で促進されるが後者では効果がないこと

が報告されている¹⁰⁾.

脂質膜のカチオン透過は応々にして対アニオンを伴わなくとも可能である⁸⁾ことに注意したい. 元来 M^+ と中性イオノフォアの結合は, イオン-双極子相互作用によるものであって, イオノフォアはいわばアニオンの代用をしているわけである. したがって, 膜中で, 錯体は荷電を持ち, 水和エネルギーも高いアニオンと対をつくるよりも, 他の free の脂溶性イオノフォアと一緒にした方が手とりばやい, さらに膜中には不特定のアニオン種が存在することもこの傾向を助けよう. 事実, K^+ -(2) のサンドイッチ様 1:2 錯体が生体膜輸送との関連で注目されている¹¹⁾. Enniatin (3) の K^+ , Cs^+ 脂質二分子膜輸送の場合も, 1:2 あるいは 2:3 錯体として関与する¹²⁾. 単環状のペプチドである (3) のサンドイッチ錯体は, Gramicidin ペプチドチャネル (3 章に後述) モデルとも考えられ興味深い.

K^+ -Enniatin B (3) 1:1 錯体

2. イオノフォアの生体有機アミンの取込み

カルボン酸イオノフォア X537A (別名 lasalocid A) (4) は, 筋小胞体膜の Ca^{2+} 透過性を促進するのみならずカテコールアミンも放出させるので, 生体アミン-(4) 脂溶性複合体の形成が考えられた¹³⁾. (4) はその化学構

Table 2 Ca^{2+} および生体アミン脂質二分子膜透過性と生物活性¹⁴⁾

	脂質二分子膜透過性					抗菌活性比		生理活性 HA ^c
	Ca^{2+} ^a	セロトニン ^b	ドーパミン ^b	ノルアドレナリン ^b	アドレナリン ^b	bacillus E	bacillus TA	
(4)	200	1300	750	190	18	100%	100%	$1.05 \cdot 10^{-7}$
(4-2)	420	1300	750	190	18	67	124	$1.11 \cdot 10^{-7}$
(4-3)	360	3.8	<0.5	<0.5	<0.5	—	5	$>10^{-5}$
(4-4)	5.9	14	4.8	2.2	<0.5	2	1	$3.92 \cdot 10^{-6}$
(4-5)	15	210	160	100	<0.5	10	10	$2.43 \cdot 10^{-6}$
Control		1.4	<0.5	<0.5	<0.5			

^a 単位は $10^{-11} \text{ ohm}^{-1}$ ^b 単位 $10^{-3} \mu\text{sec}^{-1}$ ^c ネコ心臓収縮力を50%増強させるに必要なモル濃度

造が容易に修飾できるので、構造-生体アミン膜透過性-生物活性の相関性が調べられた¹⁴⁾。その結果を Table 2 にまとめる。(4) と (4-2) は、同じ生体アミン透過効果をもつが、他の誘導体はそれらより劣ること、生体アミンに対する親和性は、カチオン親和性よりもはるかに高く両者間には相関性がないことなどわかった。しかし別の実験によると相関性がみられる¹⁵⁾ということも添えておきたい。生体アミンと Ca^{2+} イオンの膜透過性の(4)濃度依存性から、(4) は生体アミンとは 1:1 複合体を、 Ca^{2+} とは 2:1 錯体を形成していることが推定され、したがって各々異なった構造をもつ複合体をつくり別個に膜輸送されたと考えられた。(4) 誘起のノルアドレナリン膜透過は、カチオンが共存しないとき最大で、 Ca^{2+} や K^{+} 存在下ではむしろ低下するという結果も得られたが、この事実、アミン膜透過とカチオン膜透過が共役するという考えを否定し、かつカチオンの拮抗阻害効果を示す。

Table 2 から生体アミン透過性と拮菌活性に相関性がありそうに思われるが、これは多分偶然の結果と解釈された。生体アミンはバクテリアの代謝にほとんど影響を与えないことから、イオノフォアが非選択的にバクテリア代謝物を透過させるためではないかと推察された。

Table 2 から(4)のネコの心臓収縮作用と生体アミンの膜透過性との間に関連がありそうに見える。そこでレセルピンで貯蔵ノルアドレナリンを低下させておき、(4)を与えると予想通り収縮作用はみられなかった。したがって(4)の収縮作用は、アドレナリン作動線維末端からノルアドレナリンの遊離を誘引する点にあると考えられた。この事実は脂質人工膜で(4)によるノルアドレナリン輸送が高いことと一致する。(4-3)が、収縮効果のないこととアミンの脂質透過能の低いことにもよく対応する。

ノルアドレナリンと Ca^{2+} 透過性に対する濃度依存性の違いに呼応して、(4)の心臓に及ぼす興奮効果は、低濃度では生体アミンが高濃度では Ca^{2+} による刺激が引き起こすことがわかった。

先の膜透過実験から生体アミンと X537A (4) の 1:1 複合体存在が示唆されたが、実際にドーパミンやノルアドレナリンの 1:1 複合体結晶が得られた¹⁶⁾。Table 2 から予想されたように、アドレナリンからは結晶が得られなかった。(4) はノルアドレナリン (R 体) と enantio-selective に複合体をつくることが X 線解析から示されたので、類似アミン (5)~(7) ラセミ体の光学分割に応用

ドーパミン: $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ ノルアドレナリン: $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{H}$ アドレナリン: $\text{R}_1=\text{OH}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$ (5-1) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{H}$ (5-2) $\text{R}_1=\text{H}$, $\text{R}_2=\text{CH}_3$ (5-3) $\text{R}_1=\text{R}_2=\text{CH}_3$

(6)

(7)

Table 3 (4) によるアミンラセミ体の光学分割¹⁶⁾

アミン	分別 結晶 回数	結 晶 化 溶 媒 系					
		CH ₂ Cl ₂ /n-ヘキサン		酢酸エチルエステル		エタノール	
		%収率	% R : S	%収率	% R : S	%収率	% R : S
(5-1)	1	37	89 : 11	22	84 : 16	70	56 : 44
	2	20	92 : 8				
(5-3)	1	63					
	2	50	10 : 90				
(6)	1	66	72 : 28	45	86 : 14	62	80 : 20
	2	29	92 : 8	18	89 : 11	38	87 : 13
(7)	1	76	34 : 66	43	23 : 77	77	35 : 65
	2	56	24 : 76	23	15 : 85	28	10 : 90

Table 4 有機アミンカチオン透過性の比較¹⁷⁾

アミン (X)	透 過 係 数 比 (P_x/P_{Na})				
	脂質二分子膜				
	カエル胆のう	神経膜	Nonactin	Valinomycin	Gramicidin
NH ₄ ⁺	1.73	0.16	1111	1000	5.45
CH ₃ NH ₃ ⁺	0.80	~0	≤0.14	8.8	0.73
(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	0.35	~0	≤0.011	≤0.75	0.02
(CH ₃) ₃ NH ⁺	~0		≤0.004	≤0.125	
(NH ₂) ₂ C=NH ₂ ⁺	0.94	0.13	≤14	≤17.5	0.08

してみたところかなり選択的に 1:1 複合体結晶を析出させることがわかった (Table 3 参照). アドレナリン同様 N-CH₃ 基をもつ (5-2) は複合体結晶ができなかった. 分割複合体を弱酸で処理するとアミンと (4) が回収されるので実用性も考えられる.

カルボン酸イオノフォアのみならず中性イオノフォアも有機アミンカチオンの脂質二分子膜透過性を高める¹⁷⁾. 一般に, アミンのプロトン数の多いほど, また立体的障害の少ないほど, 透過性は増大する. 興味深いのは胆のうのイオンチャネルや神経細胞膜の Na⁺ チャネルのアミン透過性と同じパターンを示すことである (Table 4 参照). 中性イオノフォアと有機アミンカチオン相互作用についてはクラウンエーテルを用いてその本質が明らかになりつつある¹⁸⁾. 1:1 複合体構造が明らかになったが¹⁹⁾, アミンカチオンは環の外にあってエーテル酸素と水素結合体を形成する (Fig. 4).

複合体生成 (1 式) の平衡定数 K およびその parameter が精密に測定され (表 5), その K の順序, (CH₃)₃NH⁺ < (CH₃)₂NH₂⁺ < CH₃NH₃⁺ は丁度中性イオノフォ

Table 5 18-crown-6-アミンカチオン複合体生成定数とその parameter¹⁸⁾
(in MeOH, 25°C)

アミン カチオン	log K	-ΔH kcal/mol	-TΔS kcal/mol
NH ₄ ⁺ I ⁻	4.27	9.27	3.5
CH ₃ NH ₃ ⁺ I ⁻	4.25	10.7	4.7
i-Pr NH ₃ ⁺ I ⁻	3.56	9.65	4.8
t-Bu NH ₃ ⁺ I ⁻	2.9	7.76	3.8
(NH ₂) ₂ C=NH ₂ ⁺ I ⁻	1.7	2.41	0.1
(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺ I ⁻	1.76	6.67	4.27
NH ₂ ⁺ I ⁻	1.98	7.36	4.66
NH ⁺ I ⁻	—	—	—

$$\text{amine} + 18\text{-crown-6} \xrightleftharpoons{K} (18\text{-crown-6-amine})^+ \quad (1)$$

アヤカチオンチャネルのアミン透過性の順序に一致する. また水素結合に利用できるプロトン数の多いほど安定な

Fig. 4

1級アンモニウムカチオン-
18-crown-6 複合体

(脂溶性) 複合体をつくることは、イオノフォアやチャネルの場合も Fig. 4 類似構造をもつことが考えられよう。アニオンをかえても複合体生成定数にはほとんど変化がないことから、アニオンとのイオン対形成は無視される (1 章で述べた金属カチオン-crown 錯体の場合と異なることに注意したい)。

プロトン数による複合体安定性順序は、エンタルピー項 (ΔH) によって決定され (水素結合エネルギーを反映する), エントロピー項 (ΔS) はほとんど一定でその寄与は無視できる。

グアニジニウムカチオンも 2 級アンモニウムカチオンとはほぼ同じ位安定な複合体をつくることがわかったが、この関係は Table 4 の膜透過性のデータとはほぼ一致する。

Tetrodotoxin (8) や Saxitoxin (9) はグアニジン基を持ち、神経細胞膜の Na^+ チャネルを選択的にふさぎ神経毒として働くことはよく知られているが²⁰⁾, crown-グアニジン複合体は入口をふさがれた Na^+ チャネルのモデルとみなすことができよう。特に (9) の Na^+ チャネルの blocking が stoichiometric である²¹⁾ 点は 1:1 複合体生成を推測させよう。

クラウンエーテルが有機アミンカチオンと 1:1 の相

Tetrodotoxin (8)

Saxitoxin (9)

互作用をもつことに着目して, Cram らは立体的にかさ高で chiral な置換基の入ったクラウン化合物を多数合成し, それらを用いてラセミアミンやアミノ酸の光学分割を行いかなりの成功をおさめている²²⁾. 例えば, 光学活性 (*S,S*)-クラウンエーテル (10) は (*R*)-Phenylalanyl-ester の HPF_6 塩と 1:1 複合体をつくるが, その結晶 X 線解析から (10) の chiral 認識の様子が明らかにされた²³⁾.

(10)

5. チャネル機構の確立²⁴⁾

あるイオノフォアがキャリア機構, チャネル機構 (Fig. 5 参照), いずれをとってカチオン輸送するのか区別することは容易ではないが, 一般にキャリアは膜の一方から他方へ拡散移動するので, 膜に固定したチャネルに比べ膜流動性に左右されやすい。したがって膜を相転移温度以下にすると, キャリアは比較的機能しにくくなる²⁵⁾。一方, チャネルは膜が厚すぎると機能がおとろえるのに比べ, キャリアはさほど影響されない等で区別する²⁶⁾。キャリア機構とチャネル機構の違いの別の物差しはイオン輸送速度にある²⁷⁾。キャリアの場合, 例えば K^+ -valinomycin (2) の膜拡散速度定数は $2 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$, 膜表面における K^+ 錯体の解離速度定数はほぼ同じ $5 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ である²⁸⁾ のに対し, Gramicidin (11) チャネルの場合カチオン輸送速度定数は 10^7 sec^{-1} 以上²⁷⁾ もあり, 水中の拡散律速度定数に近い。チャネル機構の方が効率的で短い時間でたくさんのカチオン輸送にあたることが

Fig. 5 キャリア機構とチャネル機構の模式図²⁷⁾

Gramicidin A (11)

Fig. 6 脂質二分子膜の(11)による電気伝導の振動パターン (電圧 100mV)²⁹⁾

できるのである (神経細胞の Na^+ チャンネルの場合 10^8 sec^{-1} であるので同じような輸送機構が考えられる)。

Gramicidin A (11) はキャリアでなくチャンネルとしてイオン輸送に関与するらしいことは、上述の観察以外に、脂質二分子膜の電気伝導の“switching on”, “switching off” 現象の観察 (Fig. 6)^{29,30)} (各々の電流ピークはチャンネル形成, イオン透過, チャンネル消失を意味すると解釈された) や、液体膜モデル (Fig. 1) ではカチオン輸送しない (つまり安定な脂溶性錯体を形成しない) という観察³¹⁾ などからも推察されはば間違いないとされている。Fig. 5 に示されたように、カチオンは Gramicidin チャンネルの入口で弱い相互作用をうけてとりこまれ、トンネル内でカチオンドナー原子相互作用を繰り返しながら (その際チャンネル conformation も変わるだろう)、反対側へ拡散移動すると考えられる。カチオンはチャンネルを移動するとき、完全に水和水がのぞかれるのではなく、一部水和した状態 (したがってのこりが (2) と配位) であると考えられている³²⁾。先にも触れたように環状ペプチド (例, Enniatin B (3)) キャリアは、直鎖ペプチドチャンネルの1ラセン回転でおわったものと見なすことができる。したがってカチオン-キャリア相互作用 (K^+ (3) 錯体構造を見よ) をチャンネル内で繰り返すと考えることもできる。

Gramicidin チャンネルは、2分子からできていることが2次 kinetic プロセスから示唆された³³⁾。二量体説を支持するものとして、2つの Gramicidin A (11) 各々の

N-末 formyl 基をのぞき代わりにマロン酸で共有結合させた二量体 (malonyl desformyl Gramicidin) は、Gramicidin そのものと同じイオン透過性を示し、かつチャンネルの消失がほとんどないという報告がある³⁴⁾。その他次に述べるような諸事実も合わせて、現在では (11) の二量体チャンネル機構によるカチオン透過という説は広く受け入れられている。

さて、この二量体チャンネル構造について、二つの説がある (Fig. 7 参照)。1つ (a) は Urry らによる2つのモノマーが head-to-head (すなわち N-formyl to N-formyl) 会合した一重ラセンモデル^{35,36)} であり、他方 (b, c) は Veatch らの二重ラセンモデルである^{37,38)}。Urry モデルは、最大数の分子内水素結合によって安定化され、外側は脂溶性でかつ長さが約 $30\text{\AA}$ というチャンネルである。すべてL-アミノ酸からなる通常のペプチドのラセン

Fig. 7

二量体 Gramicidin チャンネル²⁴⁾
(A は C-末の $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ を)
(B は N-末の $-\text{CHO}$ を表わす)

Fig. 8 $\pi^4\text{L}, \text{D}$ (a) および $\pi^6\text{L}, \text{D}$ (b) ラセンモデル

構造では、アミドカルボニルが平行に並ぶが、(11)では逆平行に配列している。L-とD-アミノ酸が交互に並んでいるからである (“ $\pi_{L,D}$ ”と名づけた。ただし、2番目のGlyをD体と考える)。このようなラセン構造で最大限の水素結合数が期待される。 $\pi_{L,D}$ ラセン構造は“head-to-head”または“tail-to-tail”の2分子会合をするとき、分子間水素結合に有利であり安定な二重体ができると考えられた。可能な $\pi_{L,D}$ モデルのうち $\pi^6_{L,D}$ (6員環ラセン)が実験事実にも最もよく適合する (Fig. 8 参照)。 $\pi^8_{L,D}$ (8員環)とか $\pi^{10}_{L,D}$ (10員環)ではチャネル直径は大きい (6~8 Å) が長さが短い (14~25 Å), $\pi^4_{L,D}$ (4員環)では直径が小さすぎて (1.4 Å) K^+ 等の通過が説明できない上、長さが35~39 Åもあって長すぎると計算された。 $\pi^6_{L,D}$ だと直径4 Åで少なくとも2分子 H_2O 水和したアルカリイオンの通過が可能である。また Et_4N^+ イオン (直径約7 Å)は(11)透過しないという事実にも適合する。

Veatchの二重ラセンモデルは、 $\pi_{L,D}$ モデルと異なっており分子内水素結合はない代わりに分子間水素結合によってチャネルが安定化されている。しかし(11)のconformationは溶媒 (あるいは環境) 次第で $\pi_{L,D}$ 逆平行二重ラセン (Fig. 7b) 等多様な構造変化するという報告もあり^{39,40)}、物理化学的手段だけでははっきりした結論がでていないようである。

平行二重ラセン構造 (Fig. 7c) も含めて3つの二量体チャネルモデルを区別すべく、別のアプローチがBambergらによって行われた⁴¹⁾。彼らは、(-)荷電をもつかさ高いpyromellityl基で(11)のN-末、O-末を修飾すれば脂質膜の中に入って一方から反対側へチャネル貫通することは困難だろうと考えた。O-pyromellitylやN-pyromellitylは電子的、立体的理由で膜の表面に留まっていると予想された。したがって(13)を用いた場合、Fig. 7の3つのモデルのうちどれをとってもカチオン透過可能であり、(12)を用いた場合、head-to-headモデルでは透過不可能のはずである。実験結果は、1) (13)は膜の両側から適用したときだけカチオン透過性を示した。

2) (12)は事実上透過性を示さなかった。これらの事実は、 $\pi_{L,D}$ チャネル説を支持する。さらに(11)からN-formyl基を取りのぞくとカチオン透過性が消失することがわかったが、これはformyl基によってhead-to-head会合しているという説に矛盾しない。もし平行あるいは逆平行二重ラセン構造ならば、formyl基欠除はそれほど劇的な効果をもたらさないだろうと思われた。

(11)のN-formyl基を $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ で置換すれば(11) (6つの分子間水素結合数をもつことが分子モデルから考えられる) より多くの分子間水素結合の可能性が考えられる。Apellらは⁴²⁾、チャネル形成、イオン輸送のkineticsおよびチャネルのイオン選択性は n 数に依存することを示した (Table 6)。(11)はイオン選択性が比較的低い⁴³⁾、N-Glutaryl体やN-Adipyl体では Cs^+/Na^+ 比が増大する。(2)式のKinetics実験から、二量体チ

カルボン酸二量体

Table 6 ジカルボン酸置換(11)のイオン選択性^{*42)}

	$A(\text{NaCl})$	$A(\text{KCl})$	$A(\text{CsCl})$
	PS	$A(\text{NaCl})$	$A(\text{NaCl})$
(11)	25	2.0	3.6
N-Succinyl 体 ($n=2$)	2.8	2.2	4.5
N-Glutaryl 体 ($n=3$)	3	3	10
N-Adipyl 体 ($n=4$)	3.8	1.6	10.5

*オレイン酸/n-ヘキサデカン 二分子膜

チャネル寿命 τ^* ($=1/k_D$)は、 $n=3$ (N-Glutaryl体)のとき(11)の30倍以上にも伸びることがわかった。 τ^* (≥ 60

sec) は、先の共有結合でドッキングしている malonyl-bisgramicidin³⁴⁾ に匹敵するほど極めて安定な分子間水素結合が考えられる。 $n=3$ のとき、カルボン酸二量体会合が head-to-head 会合安定化に寄与しているためと思われる。はたして、その free カルボン酸をエステル化したら τ^* ($=0.4\text{sec}$) ははるかに短くなったのである。

(11) の N-末、O-末をさらに化学修飾した実験があり⁴³⁾、head-to-head 会合説をより強固にしている。すなわち、(14) はカルボン酸が解離して(－)荷電を帯びるにもかかわらず、(11) とほぼ同じイオン透過性を示した。(15)、(16) および (17) では、透過性は $\text{pH}<5$ のとき高く、 $\text{pH}>7$ のとき著しく低下または消失する。N-Succinyl 体透過性の pH 依存は、2 量体会合が N 末で起こっていることを強く支持するもので、end-to-end 会合説⁴⁴⁾を否定すると解釈された。さらに (17) は膜の両側から適用したときだけ透過性を示したこともこの解釈に一致する。先の (2) 式の kinetic parameter は (11)、(15)の間で驚くほど類似している。ことに、二量体解離エネルギーは、ともに 17kcal/mol で、水素結合 1 つ当り $\sim 3\text{kcal/mol}$ と考えると、6 個の分子間水素結合による会合が説明でき、head-to-head 分子モデルと合致したのである。

N-Formyl 基を N-Acetyl 基で化学修飾した (11) に

についても調べられた⁴⁵⁾。脂質 2 分子膜中のイオン透過チャネルの寿命が 2 けたも短くなっていることが観察され、head-to-head 6 個の分子間水素結合がメチル基の立体効果によって 4 個に減ったためと説明された (N-Acetyl 体は抗菌性が大分残っている⁴⁶⁾ことを附記する)。

(11) の特別なアミノ酸配列が、膜のイオン活性にいかん重要であるか知るために、L, D アミノ酸交互の構造をもつ類似体 (18)、(19) が調べられた²⁴⁾。いずれも疎水基を多く含み脂溶性である。脂質二分子膜で、ともにカチオン選択性をもつチャネルを形成するが、二量体の平均寿命は (11) の約半分と考えられた。

最後に、本章で紹介したチャネルは単純化されたモデルであることを断っておきたい。実際には、例えばカチオン高濃度のときイオン透過に飽和現象がみられたりあるいは減少する、あるいはアニオン効果があるといった具合で³²⁾、もっと複雑な構造、機能をもつチャネルであろう。最近ではそのようなモデルも理論的に考えられている⁴⁷⁾。

最近、牛心臓ミトコンドリアから分子量約 3000 の Ca^{2+} イオノフォアペプチドが分離されたが、液体膜でイオン輸送 (Ca^{2+} , $\text{Sr}^{2+}>\text{Mn}^{2+}>\text{Mg}^{2+}$) すること等から、(2) や (3) のようにキャリア機構で膜輸送すると結論された⁴⁸⁾。通常生体膜のイオン輸送はチャネル機構が考え

られているのに、比較的小分子のキャリアタンパクが存在するという報告は大いに関心がもたれる。

4. イオノフォアの親水性錯体と疎水性錯体

イオノフォアは、膜表面でまず親水性錯体をつくり、膜を通過するときは疎水性錯体にかわるという考えが一般的であり、カチオン選択性はその前者から後者に移る処で起るとされている。(2)ではよく調べられているが⁴⁹⁾、カルボン酸イオノフォア(4)でも同じパターンらしいことが錯体の結晶X線解析から憶測されるようになった。

(4)のNa⁺錯体を極性溶媒(MeOH)から再結晶した場合、Na⁺-MeOH-(4) 1:1:1錯体が得られ、その結晶構造を、MeOH-(4) (1:1)結晶のX線結果と比較すると(4)の構造はほとんど変わっていないことがわかった⁵⁰⁾。すなわち、(4)はNa⁺と親水性錯体をつくってもそのconformationは、freeの場合とあまり差はないと考えられる。一方、無極性溶媒から再結晶されたNa⁺錯体はすべて2:2 Na⁺-(4)組成であり、その錯体の外側は疎水性基でおおわれ、Na⁺は完全に内側にあって、2つのイオノフォアのO原子でとりかこまれている⁵⁰⁾。

Na⁺-(4) 1:1の親水性錯体と2:2の疎水性錯体のいわば中間というべきNa⁺-H₂O-(4) 2:2:2錯体が95% EtOHから得られ、その結晶X線解析を行ったところ⁵¹⁾、2つのNa⁺と2つのH₂Oは2つの(4)アニオン分子で形成されるcavityの中にとりかこまれていることが明らかとなった。2つのNa⁺は各々別々の(4)アニオン分子と配位していることから、先の1:1親水性錯体2つが会合したものとみることができる。2つの1:1の錯体は水と相互作用をもつことによって安定なconformationとなり会合が有利になっている。

5. おわりに

以上、最近のイオノフォアの化学的話題を若干拾ってみた。個々の報告は一見こまかいようだが、着実に大きな流れに入ってきたように思われる。カチオンとの相互作用機構が除々に明らかにされる。そのこと自体イオノフォア発見以来の課題であり興味深い、それにも増して意義深いのは、機構研究を通じて応用、実用の無限の可能性の基礎を築きつつあること、およびカチオン輸送という極めて複雑かつ重要な生体膜における化学を少しずつときあかしている点であり、イオノフォア研究は第2期を迎えたという感が強い。今後ますますの発展が期待され注目したい。

文 献

- 1) 木村栄一: “クラウン関連化合物の生理作用と毒性”, 化学増刊74, 化学同人, pp.167 - 182 (1978)
- 2) 木村栄一: “金属イオンの識別” in “ホスト-ゲストの化学”, 共立化学ライブラリー 18, 共立出版, pp. 63-95 (1979)
- 3) J. J. Christensen, J. D. Lamb, S. R. Izatt, S. E. Starr, G. C. Weed, M. S. Astin, B. D. Stitt, R. M. Izatt: *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 3219 (1978)
- 4) D. G. Davis, D. C. Tosteson: *Biophys. J.*, **11**, 310 (1971)
- 5) M. C. Rose, R. E. Henkins: *Biochim. Biophys. Acta*, **372**, 426 (1974)
- 6) D. G. Davis, D. C. Tosteson: *Biochemistry*, **14**, 3962 (1975)
- 7) YU. A. Ouchinnikov, V. T. Ivanov, A. M. Shkrob: “Membrane-Active Complexones”, Elsevier Scientific Publishing Comp., New York, 120 及び 129 (1974)
- 8) D. Live, S. I. Chan: *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 3769 (1976)
- 9) G. V. Marinetti, A. Sharin, P. Whitman: *J. Membr. Biol.*, **40**, 143 (1978)
- 10) L. L. M. VanDeenen, et al.: *Annal. New York Acad. Sci.*, **264**, 124 (1975)
- 11) V. T. Ivanov: *Annal. New York Acad. Sci.*, **264**, 221 (1975)
- 12) V. T. Ivanov, et al.: *FEBS Lett.*, **36**, 65 (1973); Yu. A. Ovchinnikov: *FEBS Lett.*, **44**, 1 (1974)
- 13) J. V. Levy, J. A. Cohen, G. Inesi: *Nature*, **242**, 461 (1973)
- 14) M. Schadt, G. Haensler: *J. Membr. Biol.*, **18**, 277 (1974)
- 15) B. C. Pressman: *Fed. Proc.*, **32**, 1698 (1973)
- 16) J. W. Westley, R. H. Evans, Jr., J. F. Blout: *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 6057 (1977)
- 17) J. H. Moreno, J. M. Diamond: “Membranes”, Vol. 3; G. Eisenman Ed; Marcel Dekker, New York, pp. 466-484 (1975)
- 18) R. M. Izatt, J. D. Lamb, N. E. Izatt, B. E. Rossiter, Jr., J. J. Christensen, B. L. Haymore: *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 6273 (1979); *Science*, **199**, 994 (1978)
- 19) I. Goldberg: *Acta Cryst. Sect B*, **31**, 2592 (1975); *ibid.*, **33**, 472 (1977)
- 20) K. A. Rubinson: *J. Chem. Educ.*, **54**, 345 (1977)
- 21) D. F. Martin, B. B. Martin: *J. Chem. Educ.*, **53**, 614 (1976) 及び引用文献
- 22) D. J. Cram and J. M. Cram: *Science*, **183**, 803 (1974); J. M. Girdreau, J. M. Lehn and J. P. Sauvage: *Angew. Chem.*, **14**, 764 (1975)
- 23) I. Goldberg: *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 6049 (1977)
- 24) 総説として, E. Bamberg, H. J. Apell, H. Alpes, E. Gross, J. L. Morrell, J. F. Harbaugh, K. Janko,

- P. Läuger: *FED Proc.*, **37**, 2633 (1978)
- 25) S. Krane, G. Eisenman, G. Szabo: *Science*, **174**, 412 (1971)
- 26) D. A. Haydon: *Annal. New York Acad. Sci.*, **264**, 1 (1975)
- 27) E. Grell, T. Funck, F. Eggers: "Membranes" Vol.3; G. Eisenman Ed.: Marcel Dekker, New York, p.1 (1975)
- 28) G. Stark, B. Ketterer, R. Benz, P. Läuger: *Biophys. J.*, **11**, 981 (1971)
- 29) S. B. Hladky, D. A. Haydon: *Nature*, **225**, 451 (1970)
- 30) E. Bamberg, K. Noda, E. Gross, P. Länger: *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 223 (1976),
- 31) B. C. Pressman: *Annual Rev. Biochem.*, **45**, 501 (1976)
- 32) S. B. Hladky, D. A. Haydon: *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 294 (1972)
- 33) E. Bamberg, P. Langer: *J. Membr. Biol.*, **11**, 177 (1973)
- 34) E. Bamberg, K. Janko: *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 486 (1977)
- 35) D. W. Urry: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 672 (1971)
- 36) D. W. Urry: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **69**, 1610 (1972); *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 115, (1972)
- 37) W. R. Veatch, T. E. Fossel, E. R. Blout: *Biochemistry*, **13**, 5249 (1974)
- 38) W. R. Veatch, E. R. Blout: *Biochemistry*, **13**, 5257 (1974)
- 39) B. Lotz, F. Colonna-Cesari, F. Heiz, G. Spach: *J. Mol. Biol.*, **106**, 915 (1976)
- 40) F. Heitz, G. Spach: *Macromolecules*, **10**, 520 (1977); F. Heitz, P. D. Cary, C. Crane-Robinson: *ibid.*, **10**, 526 (1977)
- 41) E. Bamberg, H. J. Apell, H. Alpes: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2402 (1977)
- 42) H. J. Apell, E. Bamberg, H. Alpes: *J. Membr. Biol.*, **50**, 271 (1979)
- 43) E. Bamberg, H. Alpes, H. J. Apell, R. Bradley, B. Härter, M. J. Quelle, D. W. Urry: *J. Membr. Biol.*, **50**, 257 (1979)
- 44) R. J. Bradley, D. W. Urry, K. Okamoto, R. Rapaka: *Science*, **200**, 435 (1978)
- 45) G. Szabo and D. W. Urry: *Science*, **203**, 55 (1979)
- 46) YU. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. M. Shkrob: "Membrane-Active Complexones", Elsevier Scientific Publishing Comp., New York, p.28 (1974)
- 47) 例えば, E. Neher, J. Sandblom, G. Eisenman: *J. Membrane Biol.*, **40**, 97 (1978); G. Eisenman, J. Sandblom, E. Neher: *Biophys. J.*, **22**, 307 (1978)
- 48) A. Y. Jeng, T. E. Ryan, A. E. Shamoo: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2125 (1978)
- 49) D. H. Haynes, T. Wiens, B. C. Pressman: *J. Membr. Biol.*, **18**, 23 (1974) および引用文献
- 50) C. C. Chian, I.C. Paul: *Science*, **196**, 1441 (1977)
- 51) C. D. Smith, W. L. Duax, S. Fortier: *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 6725 (1978)

第3回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム予告 (II)

1. と き 昭和55年11月17日 (月), 18日 (火)
2. と ころ 学士会館本館 (東京都千代田区神田錦町3-28)
(Tel. 03-292-3931)
3. 交 通 地下鉄都営三田線・都営新宿線神保町駅下車 (徒歩1分), 地下鉄東西線竹橋駅下車 (徒歩6分), 国電御茶の水駅下車 (徒歩15分)
4. 主 催 日本薬学会
共 催 日本膜学会, 日本生化学会, 日本化学会, 日本薬理学会
5. プログラム
第1日 (11月17日) 10:00-12:05, 13:00-18:00
A会場 (202号室) 膜モデル, 脂質膜
1A-1 帯電モデル表面における数種の薬物の吸着挙動—光反射法による検討— (東薬大) 楠文代,

- 高村喜代子
- 1A-2 平面多重層膜の分子状態と透過性 (帝京大・薬) 瀬高守夫
 - 1A-3 脂質の運動と蛋白質 (理研¹, 京大・医²) 池上明¹, 木下一彦¹, C. スタブス¹, 神山勉¹, 折井豊²
 - 1A-4 ¹⁴N-NMR によるリン脂質二層膜中の並進拡散係数—薬物の効果 (九大・薬) 高野律子, 古賀けい子, 金沢洋子
 - 1A-5 リジンのレシチン単分子膜への侵入 (京大・薬) 中垣正幸, 岡村恵美子
 - 1A-6 脂質二層膜上でのイノシトール磷脂質と Ca⁺⁺ の相互作用 (阪大・人間科学¹, 神大・教養²) 曾我部正博¹, 林文夫²

(以下pp.303へつづく)