テトラナクチンのイオン選択性

上野雅晴, 宮田政明, 岸本 博,^{1a)} 京極好正^{1b)}
名古屋市立大学薬学部,^{1a)} 大阪大学蛋白質研究所^{1b)}

Ion-Selectivity of Tetranactin

MASAHARU UENO, MASAOKI MIYATA, HIROSHI KISHIMOTO^{1a)}
and YOSHIMASA KYOGOKU^{1b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,^{1a)} and
Institute for Protein Research, Osaka University^{1b)}

(Received July 15, 1976)

The complex formation of tetranactin with Na, K, Rb, and Cs thiocyanates in methanol and acetone-*d*₆ was examined by infrared and ¹H-nuclear magnetic resonance spectra measurements. The equilibrium constants of complex formation were obtained from the analysis of the spectra and were compared with each other with respect to the kind of cation and solvent. The ion-selectivity of tetranactin was explained mainly by the difference among ionic species with respect to the changes of ionic solvation and tetranactin conformation due to complex formation.

Keywords—tetranactin; ionophore; equilibrium constant; ion-selectivity; complex formation

Fig. 1. Chemical Structure of Tetranactin

緒 言

抗生物質には、生体膜のイオン輸送に関与する作用を示すものがある。これはいわゆる「イオノフォア」と称される一群の化合物²⁻⁹⁾で、特定のイオンと化学量論的な複合体を形成して、外側が強い親油性となるような構造をとって膜を通しイオンを運ぶと考えられている。イオノフォアには種々の化合物があるが、共通した特徴は、いずれも環状²⁻⁷⁾であるか、またはイオンと複合体を形成する際環状となり得る^{8,9)}。構造を有している。その立体構造は、環境により容易に変換し得ることが

知られている⁷⁾。我々もテトラナクチン (Fig. 1) の溶液構造¹⁰⁾ およびそのイオン複合体形成に伴う構造変換¹¹⁾ について既に報告した。

- 1) Location: a) Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya, 467, Japan; b) Suita, Osaka, 565, Japan.
- 2) B.T. Kilbourn, J.D. Dunitz, L.A.R. Pioda, W. Simon, *J. Mol. Biol.*, **30**, 559 (1967).
- 3) M. Dobler, J.D. Dunitz, J. Krajewski, *J. Mol. Biol.*, **42**, 603 (1969).
- 4) M.M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V.T. Ivanov, V.K. Antonov, E.I. Vinogradova, A.M. Shkrob, G.G. Malenkov, A.V. Evstratov, I.A. Laine, E.I. Melnik, I.D. Ryabova, *J. Memb. Biol.*, **1**, 402 (1969).
- 5) Y. Nawata, T. Sakamaki, Y. Iitaka, *Acta Cryst.*, **B30**, 1047 (1974).
- 6) a) J.H. Prestegard, S.I. Chan, *Biochemistry*, **8**, 3921 (1969); b) J.H. Prestegard, S.I. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 4440 (1970).
- 7) D.J. Patel, A.E. Tonelli, *Biochemistry*, **12**, 486 (1973).
- 8) A. Agtarap, J.W. Chamberlin, M. Pinkerton, L.K. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 5737 (1967).
- 9) T. Kubota, S. Matsutani, *J. Chem. Soc. (C)*, **1970**, 695.
- 10) Y. Kyogoku, M. Ueno, H. Akutsu, Y. Nawata, *Biopolymers*, **14**, 1049 (1975).
- 11) 上野雅晴, 京極好正, 縄田喜治 “生体分子の構造に関する討論会” 講演要旨集, 東京, 1975, p. 45.

イオノフォアのイオン選択性は極めて特異的¹²⁾である。イオノフォアによるイオンの選択的膜透過は、主としてイオノフォアと種々イオンの複合体形成の平衡定数に支配されることが、Eisenman らにより明らかにされている。¹³⁾しかし平衡定数に及ぼす溶媒の効果は重要であるにもかかわらず、それを調べた例は少い。⁶⁾本報ではテトラナクチンと種々のカチオンとの複合体形成の平衡定数を二種（アセトン、メタノール）の溶媒系で求め、イオンおよび溶媒系について比較検討した。

理 論

赤外線吸収 (IR) 測定による平衡定数の算出

赤外スペクトルにおいてテトラナクチンのカルボニルの伸縮振動の吸収位置が非複合体とイオン複合体で異なることから (Fig. 2), ピーク強度が Lambert-Beer の法則に従うと仮定し、イオン濃度を変えて定量的に扱えば、複合体形成の平衡定数が算出される。テトラナクチン 1 分子はカチオン 1 個と結合することが知られているので、 M^+ をカチオン、 T をテトラナクチン、 TM^+ をテトラナクチン-カチオン複合体を表すとすると次式を得る。

ここで K は複合体形成の平衡定数である。[] はすべて濃度を表すものとすれば、稀薄、溶液では次式が成立する。

$$K = \frac{[TM^+]}{[M^+][T]} \quad (2)$$

カルボニル吸収帯の吸光度を A_ν とすれば、

$$A_\nu = a_\nu[TM^+]l + b_\nu[T]l \quad (3)$$

ここで a_ν は複合体の観測波数 ν での分子吸光係数、 b_ν は波数 ν での非複合体の分子吸光係数（複合体の吸収ピークに非複合体のピークの肩が重なるため）である。 l は層長（セルの厚さ）である。なお、テトラナクチン 1 分子には 4 個のカルボニル基があるが、溶液構造から 1 個のカチオンに 4 個のカルボニル基全部が配位していることが明らかにされている。¹⁰⁾ テトラナクチンの投込み濃度を C_T 、チオシアン塩の投込み濃度を C_{M^+} とすると、

$$C_T = [T] + [TM^+] \quad (4)$$

$$C_{M^+} = [M^+] + [TM^+] \quad (5)$$

(2), (3), (4), (5) 式より次式を得る。

$$\frac{C_{M^+}}{A_\nu - b_\nu C_T l} = \frac{1}{K} \frac{1}{a_\nu C_T l - A_\nu} + \frac{1}{(a_\nu - b_\nu)l} \quad (6)$$

(6) 式によると、種々の C_{M^+} に応じて、縦軸に $C_{M^+}/(A_\nu - b_\nu C_T l)$ 、横軸に $1/(a_\nu C_T l - A_\nu)$ をとれば、勾配より $1/K$ が、従って K が求まる。

核磁気共鳴 (NMR) による平衡定数の算出

¹H-NMR スペクトルにおいて、テトラナクチンの各プロトンの化学シフト (TMS 基準) が非複合体と複合体で異なることから (Fig. 3), 速い交換を仮定し、イオン濃度を変え化学シフトを解析すれば、複合体形成の平衡定数が算出される。観測される化学シフト δ_0 は次式のように非複合体の化学シフトと複合体の化学シフトの重量平均で表される。

12) a) B.C. Pressman, *Fed. Proc.*, **27**, 1283 (1968); b) P. Läuger, *Science*, **178**, 24 (1972).

13) a) G. Eisenman, S.M. Ciani, G. Szabo, *Fed. Proc.*, **27**, 1289 (1968); b) S.M. Ciani, G. Eisenman, G. Szabo, *J. Memb. Biol.*, **1**, 1 (1969); c) G. Eisenman, S.M. Ciani, G. Szabo, *J. Memb. Biol.*, **1**, 249 (1969); d) G. Szabo, G. Eisenman, S.M. Ciani, *J. Memb. Biol.*, **1**, 346 (1969).

$$\delta_0 = \frac{\delta_f[T] + \delta_c[TM^+]}{C_T} \quad (7)$$

ここで δ_f は非複合体の化学シフト, δ_c は複合体の化学シフトである. (2), (4), (5), (7) 式より次式が得られる.

$$\frac{1}{C_{M^+} - XC_T} = K \left(\frac{1}{X} - 1 \right) \quad (8)$$

ここで $X = (\delta_0 - \delta_f)/(\delta_c - \delta_f)$ である. (8) 式より種々の C_{M^+} に応じて, 縦軸に $1/(C_{M^+} - XC_T)$ をとり横軸に $1/x - 1$ をとれば, 勾配より K が求まる.

Fig. 2. Infrared Spectra of Tetranactin and K^+ -Tetranactin Complex in the Region 1800—1600 cm^{-1} (Carbonyl Stretching) at the Concentration of $5 \times 10^{-3}M$ in Methanol

—: free form of tetranactin
 ---: fully complexed form of tetranactin
 ...: all other lines: partially complexed form of tetranactin

Fig. 3. The 100 MHz Proton Magnetic Resonance Spectra of Tetranactin (Upper) and its K^+ Complex (Lower) in the Acetone- d_6 Solution (25 mg/0.5 ml)

実験の部

試料 テトラナクチンは, 中外製薬 K.K. から共与されたマクロライドアクチン (粗テトラナクチン) から安藤ら¹⁴⁾ の方法により分離し, 薄層クロマトグラフィーによりテトラナクチン以外の他のマクロライドアクチン (例えばトリナクチン) の混在しないことを確認した. 分離されたテトラナクチンは, アセトンから 2 回再結晶して精製した. NaSCN, KSCN, RbSCN (名古屋片山試薬特級) はさらに精製することなく用いた. CsSCN (名古屋片山試薬一級) はメタノールより 1 回再結晶して用いた. アセトン- d_6 (CEA フランス) はさらに精製することなく用いた. メタノール, アセトン (いずれも名古屋片山試薬特級) は 1 回蒸留して用いた.

方法 メタノールを溶媒とした時は, 解析は IR 測定により, 複合体のカルボニルの吸収ピークに注目して行なった. アセトンを溶媒とした時は, IR スペクトルでカルボニルの吸収ピークが溶媒の吸収帯と重なるため, 1H NMR の 18 位のシグナルに注目して行なった.

IR 測定—IR 測定は, JASCO IRA-2 型 (日本分光) により, 固定セル (KRS-5 0.2 mm) を用いて行なった. 測定濃度は, Na 塩に関してはテトラナクチンが $4.84 \times 10^{-3}M$ (初濃度), NaSCN が 0.399×10^{-3} — $14.9 \times 10^{-3}M$, K 塩に関してはテトラナクチンが $3.03 \times 10^{-3}M$, KSCN が 0.642×10^{-3} — $16.05 \times 10^{-3}M$, Rb 塩に関してはテトラナクチンが $4.00 \times 10^{-3}M$, RbSCN が 0.778×10^{-3} — $19.4 \times 10^{-3}M$, Cs 塩に関してはテトラナクチンが 4.60

14) K. Ando, H. Oishi, S. Hirano, T. Okutomi, K. Suzuki, H. Okazaki, M. Sagawa, T. Sawada, *J. Antibiot.*, **24**, 347 (1971).

$\times 10^{-3}\text{M}$, CsSCN が 0.784×10^{-3} — $19.6 \times 10^{-3}\text{M}$ である。測定はすべて室温で行なった。

^1H NMR 測定— ^1H NMR スペクトルの測定は、JEOL PFT100 パルス・クーリエ変換 NMR (日本電子) で、5 mm 管を用い、D-Lock により行なった。テトラナクチンおよびチオシアン塩の濃度と積算 (FID で) 回数は以下の通りである。Na 塩に関しては、テトラナクチンが $1.263 \times 10^{-3}\text{M}$, NaSCN が 1.200×10^{-3} — $15.05 \times 10^{-3}\text{M}$, K 塩に関しては、テトラナクチンが $4.949 \times 10^{-4}\text{M}$, KSCN が 4.940×10^{-4} — $8.230 \times 10^{-3}\text{M}$, Rb 塩に関しては、テトラナクチンが $4.949 \times 10^{-4}\text{M}$, RbSCN が 5.780×10^{-4} — $8.499 \times 10^{-3}\text{M}$, Cs 塩に関しては、テトラナクチンが $6.187 \times 10^{-4}\text{M}$, CsSCN が 7.913×10^{-4} — $1.165 \times 10^{-2}\text{M}$ である。積算回数はそれぞれ 1000, 2000, 1500, 1500 回である。

蒸気圧降下測定—蒸気圧降下測定は、サーミスター法による分子量測定装置 (日立製作所 115 形) を用いて行なった。

結 果

蒸気圧降下測定

平衡定数が (2) 式で定義されるためには、チオシアン塩が溶媒中で完全解離していることが前提である。そのことを確認するために、各チオシアン塩によるメタノールおよびアセトンの蒸気圧降下測定を行なった。メタノール溶媒の結果を Fig. 4 に示す。溶質濃度に対して蒸気圧降下に比例する変数 ΔR がプロットされてある。各チオシアン塩の勾配が検量線の勾配の 2 倍のことから、チオシアン塩は実験精度範囲で完全解離していると言える。またアセトン溶媒に対しては、高濃度でチオシアン塩は非解離になるが、平衡定数の算出に用いた低濃度域 (3 mm 以下) ではほぼ完全解離とみなせる。

IR 測定 Fig. 5 には、 $1/(a_\nu C_{\text{TL}} - A_\nu)$ に対して $C_{\text{M}^+}/(A_\nu - b_\nu C_{\text{TL}})$ がプロットされている。この勾配からメタノール中における複合体形成の平衡定数が算出された。なお結果は Table I に示す。

^1H NMR 測定 非複合体と複合体で化学シフトが異なれば、どのピークを用いても平衡定数の算出は可能であるが、ここでは比較的両者で化学シフトの差が大きく、ピークが強く鋭い 18 位のメチルのプロトンのピークに注目して解析を行なった。Cs イオンの濃度に対し、化学シフトをプロットしたものを Fig. 6 に示す。Fig. 7 には $1/x-1$ に対し $1/(C_{\text{M}^+} - XC_{\text{T}})$ がプロットされている。この勾配から、アセトン- d_6 中における Cs イオン複合体形成の平衡定数が算出される。なお結果は他のイオンの複合体形成に関する値とともに Table I に示した。またイオン選択性の構造との関係を見るため、各イオン複合体の ^1H NMR の化学シフト値を比較してみた (Fig. 8)。

なお、IR による複合体の分子吸光係数 a_ν および ^1H NMR による複合体の化学シフト δ_c の決定は、それぞれチオシアン塩濃度の逆数 ($1/C_{\text{M}^+}$) に対する吸光度の逆数 ($1/A$) および $1/(\delta_0 - \delta_c)$ のプロットよりチオシアン塩の濃度を無限大 (従って $1/C_{\text{M}^+} \rightarrow 0$) に外挿して行なった。

Fig. 4. Thermister Bridge Reading (ΔR) vs. Solute Concentration in Methanol at 25°

- : benzil as solute
- : NaSCN as solute
- ◐: KSCN as solute
- ◑: RbSCN as solute
- ◒: CsSCN as solute

Fig. 5. $(C_{\text{M}^+}/(A_\nu - b_\nu C_{\text{TL}})) \times 10^3$ vs. $1/(a_\nu C_{\text{TL}} - A_\nu)$ in Methanol (see Context regarding Fig. 5)

- : Na⁺-tetranactin complex
- ◐: K⁺-tetranactin complex
- ◑: Rb⁺-tetranactin complex
- ◒: Cs⁺-tetranactin complex

Fig. 6. Chemical Shift (δ_0) vs. Cs^+ Concentration in Acetone- d_6

Fig. 7. $(1/(C_M^+ - XC_T)) \times 10^{-3}$ vs. $1/X$ in Acetone- d_6 (See Context regarding Fig. 7)

考 察

Table I によると、メタノール中、アセトン- d_6 中いずれにおいても K イオン複合体で平衡定数が最も大きく、K イオンよりもイオン半径の大きいイオンでも小さいイオンでも平衡定数は小さくなる。即ちテトラナクチンは K イオンに最も親和性が強い、Table II には、イオン半径¹⁵⁾ および配位に関与する酸素原子（カルボニルおよびフラン環の酸素原子）と中心イオンとの距離¹⁶⁾ を示してある。大きなイオン（例えば Cs イオン）との複合体は環の膨張を伴い、¹¹⁾ その結果配位に関与する酸素原子と中心イオンとの距離は遠くなり引力的相互作用（イオン-双極子相互作用）を弱くする方向に働く、しかし他方、Fig. 8 に示すようにに、¹H NMR おいて各イオン複合体の各プロトンの化学シフトをイオン半径に対してプロットした時、配位に関与する酸素原子の近傍のプロトン (H_7 , H_8 , H_9) が、K イオンのところで極小をもつ下に凸な曲線を描く、この傾向はテトラナクチンのイオン選択性と平行にあり、化学シフトがイオンとの結合の強さを間接的に反映している（イオンによる複合体の構造の違いも含め）ものと思われ興味深い。

TABLE I. Association Constant (1/M)

Solvent	Acetone- d_6 (NMR)	Methanol (IR)
Na^+ -Complex	3×10^4	5×10^3
K^+ -Complex	1×10^5	2×10^4
Rb^+ -Comple	3×10^4	1×10^4
Cs^+ -Complex	3×10^3	3×10^3

TABLE II. Ionic Radius¹⁵⁾ and Ion to Oxygen Distance¹⁶⁾ (Å)

	Ionic radius	$\text{M}^+ \text{---} \text{O} =$	$\text{M}^+ \text{---} \text{O} \begin{smallmatrix} \diagup \\ \diagdown \end{smallmatrix}$
Na^+ -Complex	0.95 (Å)	2.435 (Å)	2.820 (Å)
K^+ -Complex	1.33	2.781	2.883
Rb^+ -Complex	1.48	2.909	2.940
Cs^+ -Complex	1.69	3.101	3.063

15) L. Pauling, "The Nature of the Chemical Bond," Cornell University Press, N.Y., 1960 (邦訳：小泉正夫訳, "化学結合論" 共立出版).

16) Y. Iitaka, T. Sakamaki, Y. Nawata, *Chem. Lett.*, 1972, 1225.

次にメタノール中の平衡定数とアセトン- d_6 中の平衡定数を比較すると、溶媒和の小さいと考えられる大きいイオン（例えば Cs イオン）に関しては、両溶媒で平衡定数にあまり差はみられないが、溶媒和の大きいと考えられる小さいイオン（例えば Na イオン）では両溶媒で平衡定数に顕著な違いが見られる。これは、複合体を形成する際溶媒和したイオンが溶媒をはずしてテトラナクチンの環内に入る結果、溶媒和の強いイオン程その効果は強く、両溶媒で平衡定数に大きな違いが現れたものと考えられる。Prestegard と Chan⁹⁾ はノナクチンを用いて、アセトン- d_6 中およびアセトン- $d_6 + D_2O$ 中でカチオン複合体形成の平衡定数を算出し、両溶媒で平衡定数の違いを議論している。K イオン複合体に関しては両溶媒で差はないが、Na イオン複合体に関しては、アセトン- $d_6 + D_2O$ 中で平衡定数は著しく小さくなる。これは我々のテトラナクチン-カチオン複合体に関する結果と同じ傾向を示している。しかし彼らはまた Cs イオン複合体に関する結果も両溶媒で大きな平衡定数の違いを得ている。これは我々のテトラナクチンに関する結果と異なる。このことは、Cs イオンのような大きいイオンでは、テトラナクチンまたはノナクチンの環内に入る時、環の対応がテトラナクチンとノナクチンで異なり、構造的に両者に差異のある歪が伴うことによるのかもしれない。この場合、単純に溶媒和の考慮だけで両者の比較は出来なくなる。

IR による平衡定数の算出に際し、非複合体のピークの肩が複合体の吸収ピークに重なる (Fig. 2) ため誤差は大きくなるが、その誤差を考慮しても、上で行なった議論は十分有意であると解釈される。Fig. 2 をみれば、等吸収点が明確に現れている。この場合等吸収点を利用して解析することが可能であり¹⁷⁾ それを行なったが、結果には大差がなく同程度の誤差が伴った。

Fig. 8. Chemical Shift of Each Proton of Tetranactin vs. Ionic Radius

●: cation complexed form of tetranactin
○: free form of tetranactin as a comparison

17) R. Mecke, R. Mutter, *Z. Elektrochem.*, **58**, 1 (1954).