

課題番号：2005A0258-NL1-np

ビームライン：BL38B1

課題名：カリックスアレーンを鋳型としたペプチド複合体およびそのカリウムイオン包接体の X 線結晶構造解析

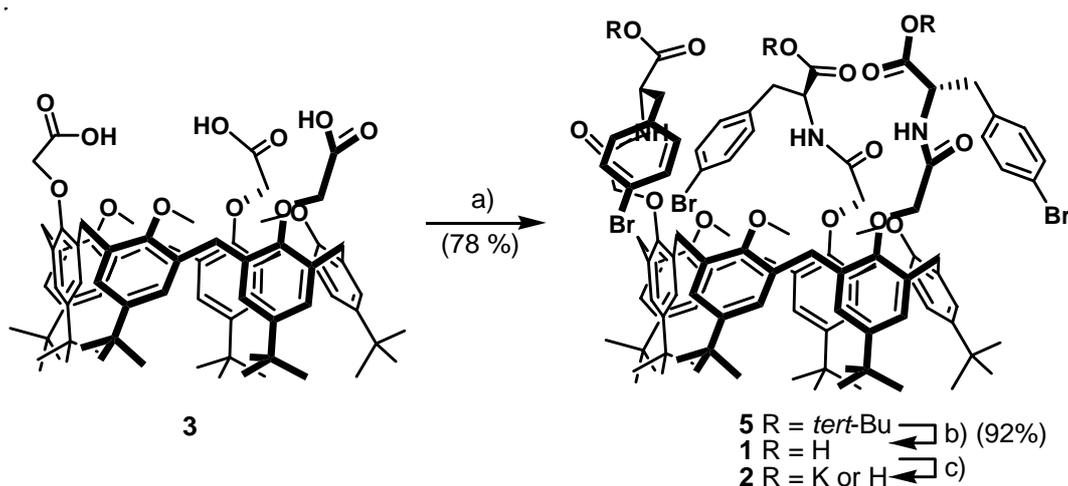
細胞膜中にイオンを通過させるイオンチャネルは生命にとって必要不可欠なタンパク質である。イオンチャネルの異常は、てんかんや麻痺、筋緊張症などのチャネル病を引き起こす。<sup>[1]</sup>それゆえ、イオンチャネルの機能の詳しいメカニズムの解明はチャネル病治療の発展に重要である。<sup>[2]</sup>MacKinnon らは *Streptomyces lividans* 由来の KcsA K<sup>+</sup>チャネルの立体構造を X 線結晶構造解析により解明し、カリウムイオンの輸送メカニズムを明らかにした。<sup>[3]</sup>そのようなイオンチャネル研究の進展に伴い、人工イオンチャネルの開発にも大きな興味注がれ、これまでにさまざまな人工イオンチャネルが作られてきた。<sup>[4,5]</sup>しかしながら、そのような研究はまだ始まったばかりで、それらの人工チャネルは機能的に天然のものにはまだ及んでいない。

カリックスアレーンはフェノールがメチレンで架橋された大環状分子である。カリックスアレーンは化学修飾が容易であり、これまでもホスト-ゲスト化学においてホスト分子として広く用いられてきた。<sup>[6]</sup>そして、これまでにさまざまなカリックスアレーン誘導体がカリウムチャネル、<sup>[4a,7a]</sup>クロライドチャネル、<sup>[7b]</sup>アクアチャネル<sup>[7c]</sup>などのチャネル分子として合成されてきた。Lippard らはカリックス[4]アレーン-ペプチド複合体を KcsA K<sup>+</sup> channel selectivity filter モデル<sup>[3]</sup>として合成し、そのカリウムイオンとの相互作用を <sup>1</sup>H NMR と IR スペクトルにより解明した。<sup>[4a]</sup>その他のグループでは、非ペプチド型のチャネルモデルのイオン移動を分子動力学計算や生化学的、電気化学的手法などにより示している。<sup>[7]</sup>これらのチャネルモデルでは、X 線結晶構造解析がなされている。X 線解析はチャネルの立体構造や、イオンや水との相互作用を分子レベルで明らかにできる数少ない強力な解析法であり、チャネル構造の構築原理やイオン輸送原理の解明に役立っている。以上のモデルは全てカリックス[4]アレーンを用いたものであり、カリックス[6]アレーンを用いたチャネルモデルがつくられた例はない。カリックス[6]アレーンはカリックス[4]アレーンと比べて環の大きさが大きくフレキシビリティが高いため、カリックス[4]アレーンでは構築できないような複雑な構造を創り出すことが可能である。<sup>[8]</sup>よってカリックス[6]アレーン-イオンチャネルは新たな人工チャネルの創製に繋がり、生体内チャネルの構造的および機能的メカニズムを明らかにしたり、生体内チャネルの部分構造や機能を有した人工チャネルの設計に役立つと期待される。

今回われわれは、カリックス[6]アレーンにアミノ酸を結合させたカリックス[6]アレーン

-*p*-bromophenylalanine 複合体 **1** およびそのカリウム塩 **2** を合成、結晶化し、それらの立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにした。われわれの知る限り、カリックス[6]アレーン-アミノ酸複合体の X 線解析はこれが初めてである。結晶中において、両親媒性の **1** は脂質膜のような層状構造を有しており、各分子に対称性は見られなかった。しかしながら、**2** はカリウムイオンによって、内部が親水性の空間を有する 8 量体の自己集合体を形成しており、4 つの *p*-bromophenylalanine 残基が KcsA K<sup>+</sup> channel selectivity filter におけるイオンへの配位のように、4 方向からカリウムイオンへ結合しているチャンネル様の部分構造が 6 箇所にあった。

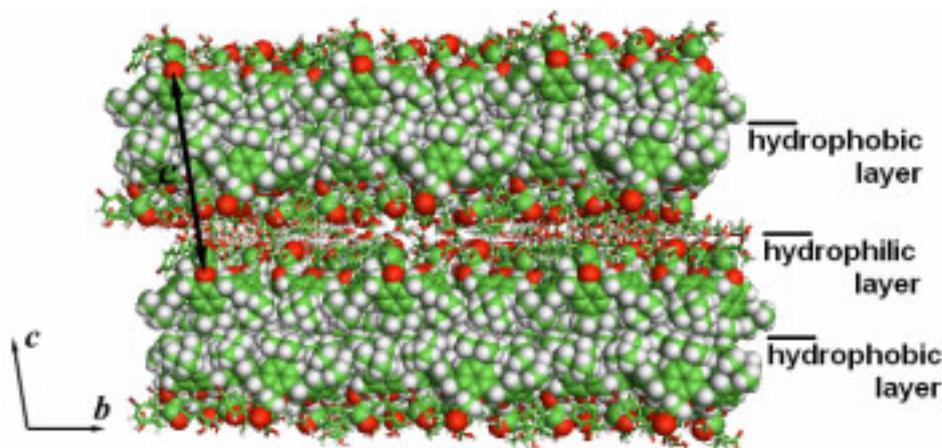
カリックス[6]アレーン-*p*-bromophenylalanine 複合体 **1** は、既知物質であるカリックス[6]アレーン誘導体 **3**<sup>[9]</sup> に *p*-bromophenylalanine *tert*-butyl ester を縮合させたのちに 'Bu 基を脱保護することによって合成した (Scheme 1)。また、カリウム塩 **2** は **1** を 1.5 当量の炭酸カリウムで中和することにより得たが、マスペクトル測定の結果、カルボキシル基が 1 つ、2 つおよび 3 つ中和されたものの分子イオンピークが観測され、**2** はこれら 3 つの塩の平衡状態で存在していることが示唆された。



**Scheme 1.** **1** および **2** の合成。 Reagents and conditions: a) *p*-bromo-L-phenylalanine *tert*-butyl ester **4**, PyBroP<sup>®</sup>, <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>EtN, DMF, RT; b) TFA; c) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5 eq), MeOH, reflux. PyBroP<sup>®</sup> = bromotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate, DMF = *N,N*-dimethylformamide.

**1** および **2** を aqueous MeOH から結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。しかしながら、非対称単位中の総分子量がそれぞれ 8000 以上と 5000 以上で非常に大きかったため、直接法による位相決定がうまくいかなかった。そこで位相決定を 4 波長の放射光で X 線回折データを収集して、臭素原子の異常散乱を利用した多波長異常分散(MAD)法<sup>[10]</sup>により行った結果、正しい位相が求まった。**1** の結晶中では、**1** が親水性の *p*-bromophenylalanine の面と疎水性のカリックスアレーンの面の 2 つの面を持った層状構造を形成しており、2 つの面が

向かい合わせになっていた (Figure 1)。非対称単位中の 4 分子の 1 の *p*-bromophenylalanine 部分はさまざまな方向を向いており、対称性が見られなかった。非対称単位中の *p*-bromophenylalanine 残基は、1 ケ所の分子内水素結合を除いて、全て溶媒分子と水素結合していた。すなわち、親水性の面同士は親水性の溶媒分子を介して水素結合していた。

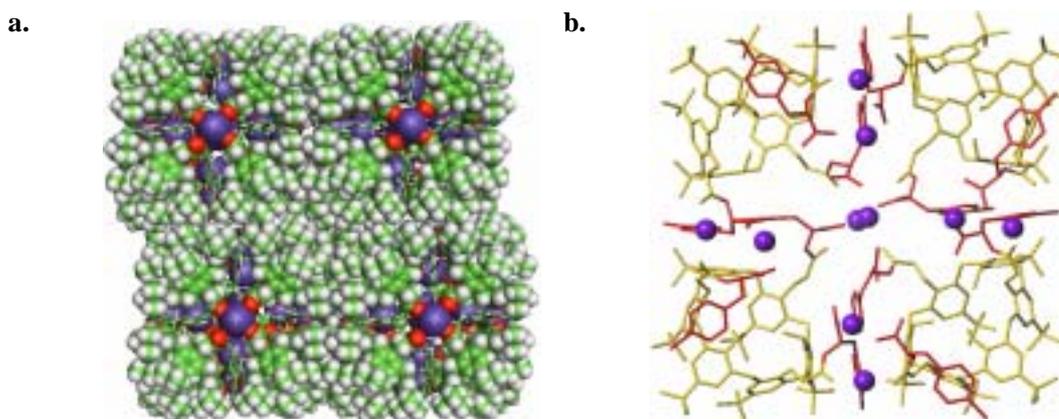


**Figure 1.** *bc* 平面から見た 1 のパッキング図。2 つの二重層が描かれている (green: carbons; white: hydrogens; red: oxygens; brown: bromines; nitrogens are hidden behind space-filling models)。stick モデルは *p*-bromophenylalanine 残基と溶媒を示し、space-filling モデルはその他のものを示している。

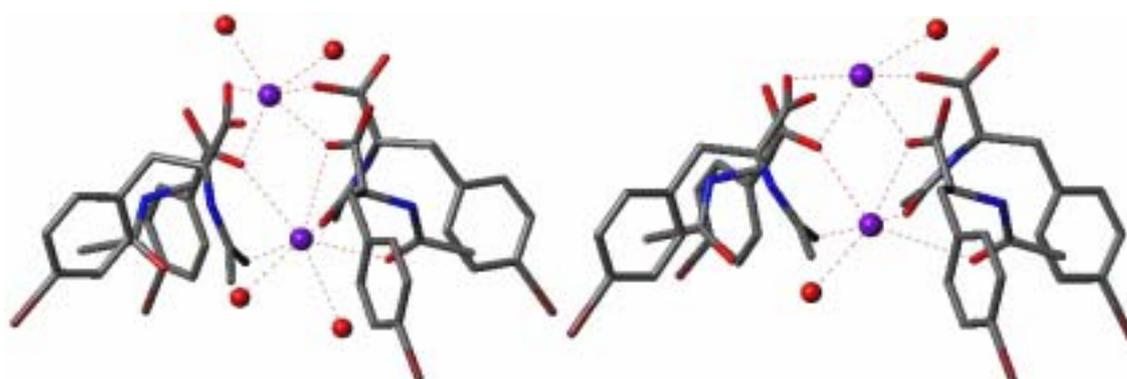
その構造とは全く異なり、カリウム塩とした 2 の結晶構造は  $C_3$  対称を有する 8 量体のケージ構造を形成していた (Figure 2)。1 の場合と異なり各分子が高い対称性を有しており、 $C_3$  対称を有する 2 分子と pseudo $C_3$  対称を有する 6 分子が規則的に集合して 8 量体を形成していた。親水性の *p*-bromophenylalanine 残基を内側に向けて、各分子がちょうど正方形の角を占領するように配置していた。その内部は親水性の空間になっており、溶媒分子で満たされていた。そして、8 量体に 6 ケ所存在する 4 分子の接点では、2 つのカリウムイオンを中心として 4 つの *p*-bromophenylalanine 残基が集合していた。3 回対称であるからこのアミノ酸集合サイトは 2 種類になる。そのどちらにおいても、4 つの *p*-bromophenylalanine 残基に対し 2 つのカリウムイオンがイオン結合および配位結合を形成していた (Figure 3)。どちらのアミノ酸集合サイトにおいても、2 つのカリウムイオンのうち一方は、4 つのカルボキシル酸素および水分子に結合していることが分かった。もう一方のカリウムについては、2 つのカルボキシル基と 3 つのアミド結合のカルボニル基、および水分子が結合していることが確認できた。これらのアミノ酸集合サイトは KcsA  $K^+$  channel selectivity filter に似ている点がある。すなわち、2 の構造中でカリウムイオンに対し 4 方向からアミノ酸が配位してイオンを取り込む孔を形成している点、イオンに対しカルボニル基やカルボキシル基が結合している点、複数のカリウムイオンがアミノ酸と並行して縦に並んでいる点である。1 の層

状構造に対して 2 が 8 量体構造を取るのは、カリウムイオンの正電荷を鋳型として負電荷が豊富なカルボキシル基やカルボニル基を有するアミノ酸残基が集合するからと考えられる。このようなカチオンを内部に配位させることができる孔は、イオンを取り込み通過させるイオンチャネルのイオン輸送機構に重要であり、本構造の解明は今後の人工イオンチャネルの開発に大いに役立つと考えられる。

今回の報告内容は、現在論文にまとめ投稿中である。



**Figure 2.** a) 2 のパッキング図 (green: carbons; white: hydrogens; red: oxygens; purple: potassiums). 図には 4 つの 8 量体構造を示しており、溶媒分子は省略している。stick モデルは *p*-bromophenylalanine 残基を示し、space-filling モデルはその他のものを示している。b) 2 の 8 量体構造の半分 (red: *p*-bromophenylalanine residues; yellow: calixarenes; purple: potassiums). 簡単のため、8 量体構造の約半分 (4 つのカリックスアレーン分子と 2 つのカリウムイオン) を省略している。カリウムイオンペアが各々 4 つのカリックスアレーンおよび 4 つの *p*-bromophenylalanine 残基に囲まれて配位している。



**Figure 3.** 2 種類のアミノ酸集合サイト (gray: carbons; blue: nitrogens; red: oxygens; brown: bromines). 互いの構造は非常によく似ている。

## 参考文献

- [1] G. G. Celesia, *Clin. Neurophysiol.* **2001**, *112*, 2–18.
- [2] A. D. Wickenden, *Neuropharmacology* **2002**, *43*, 1055–1060.
- [3] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon, *Science* **1998**, *280*, 69–77; Y. Zhou, J. H. Morais-Cabral, A. Kaufman, R. MacKinnon, *Nature* **2001**, *414*, 43–48.
- [4] a) J. C. M. Rivas, H. Schwalbe, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 9478–9483; b) S. Fernandez-Lopez, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *412*, 452–455; c) C. C. Harrell, P. Kohli, Z. Siwy, C. R. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15646–15647; d) Y. J. Jeon, H. Kim, S. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, I. Seo, C.-S. Park, S. R. Jung, D.-S. Koh, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15944–15945; e) N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79–87.
- [5] For the reviews of artificial ion channels, see: S. G. W. Gokel, A. Mukhopadhyay, *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 274–286; Matile, A. Som, N. Sordé, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 6405–6435.
- [6] For the reviews of calixarenes, see: V. Böhmer, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 785–818; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 713–745; A. Ikeda, S. Shinkai, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713–1734.
- [7] a) S. E. Matthews, P. Schmitt, V. Felix, M. G. B. Drew, P. D. Beer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1341–1353; b) V. Sidorov, F. W. Kotch, G. Abdokhmanova, R. Mizani, J. C. Fetting, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2267–2278; c) A. Lazar, E. D. Silva, A. Navaza, C. Barbey, A. W. Coleman, *Chem. Commun.* **2002**, 2162–2163.
- [8] H.-S. Yuan, Y. Zhang, Y.-J. Hou, X.-Y. Zhang, X.-Z. Yang, Z.-T. Huang, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9611–9617.
- [9] a) A. Casnati, P. Minari, A. Pochini, R. Ungaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1413–1414; b) R. G. Janssen, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, A. Casnati, M. Freriks, A. Pochini, F. Ugozzoli, R. Ungaro, P. M. Nieto, M. Carramolino, F. Cuevas, P. Prados, J. de Mendoza, *Synthesis* **1993**, 380–386.
- [10] W. A. Hendrickson, *Science* **1991**, *254*, 51–58.