



Title	機能的分子構造体の研究
Author(s)	小山, 富康; 荒磯, 恒久; 金城, 政孝; 神, 隆
Citation	電子科学研究, 2, 23-31
Issue Date	1995-01
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/24302">http://hdl.handle.net/2115/24302</a>
Type	bulletin (article)
File Information	2_P23-31.pdf



[Instructions for use](#)

# 機能的分子構造体の研究

細胞機能素子研究分野 小山 富康, 荒磯 恒久, 金城 政孝, 神 隆

当研究分野に於いて進行中の三つの研究をここに紹介する。何れの研究も細胞の有する優れた機能素子の分子レベルでの解明と類似の分子構造体の開発につながるものと期待される。

(1) パルスレーザーを光源とし、蛍光偏光解消法を利用すると、生体膜や平面膜の磷脂質二重層の、親水性頭部、骨格部や脂質鎖部の分子運動について、揺動拡散、揺動運動角などを測定することが出来ることを示した。平面膜については二次元分子膜に適用するための新たな測定法と解析法を提案した。吸収偏光解消を用いて、バクテリオロドプシンを例にとり、タンパク質の動的性質を解析できることを示した。

(2) CWレーザーと自己相関顕微蛍光測定法を用いて、極微量の蛋白や核酸の並進拡散運動速度を測定し、分子量を決定する方法も開発された。蛍光標識した分子の低濃度浮遊液の一滴をこの装置の対物レンズ上にのせれば、視野内を動く蛍光を捉え、蛍光の自己相関を求めることにより、分子の運動速度と動的性質を求め、分子量と形状を決定することができる。

(3) 錯体形成能を持つ疎水性化合物である環状オリゴマー、カリックスアレン化合物について、環の大きさを適当に選ぶことにより、ナトリウムイオンやカリウムイオンに選択的な親和性もった化合物を合成することができた。これを磷脂質二重層に組み込むことによって選択的イオンキャリアーとなることを示した。

## 1. はじめに

生命を支える分子構造体は、ナノメートルの空間領域に於いてナノ秒の時間領域で活動している。しかもその働きはイオンや分子一個を的確に識別し一個の光子をも逃がさず捉え、効率よくエネルギーに変換するなど、現在の科学技術が未だ到達していない優れた機能を多数有している。一方でその基本設計は遺伝子の核酸によって少なくとも数千万年に亘って継承される。本研究分野では、このような分子構造体の機能を演出するタンパク質、脂質、核酸の特性を種々の方法で解き明かそうとしている。この方向に焦点を合わせた三つの研究をここに紹介することにした。第一は、ナノ秒領域に於ける分子構築の変化をピコ秒パルスレーザーを用いて解析し機能発現の機序を明らかにすることである。第二はCWレーザーと自己相関蛍光法による核酸の分子量と形状の決定、第三は生体膜イオン選択性輸送装置に近い機能分子を開発することである。

## 1.1 蛍光偏光及び吸収偏光を利用した生体機能性分子の運動測定

### 1.1.1 測定法

#### 蛍光偏光解消法

蛍光偏光解消測定装置は、アルゴン・色素レーザーにより580~800 nmのパルス光を得、その第2高調波として290~400 nmの紫外パルスレーザー光を得る。試料が縦方向の偏光パルス光で励起されたときの縦方向の蛍光強度の時間変化を $I_{||}(t)$ 、横方向のものを $I_{\perp}(t)$ と表す。蛍光の偏光性は次に示す蛍光異方性比、 $r(t)$ で表される。

$$r(t) = [I_{||}(t) - I_{\perp}(t)] / [I_{||}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)] \quad (1)$$

$r(t)$ は最初に減衰し、その後一定値をとる。このような分子運動は、ある角度を持った円錐の中で首振り運動をする「円錐内揺動運動」モデルを用いて次のように解析される。 $r(t)$ は実験的に

$$r(t) = (r_0 - r_{\infty}) \exp(-t/\phi) + r_{\infty} \quad (2)$$

で表される<sup>[1]</sup>。ここで $r_\infty$ は十分時間がたった後の $r(t)$ であり、このときの分子の揺動角 $\theta_c$ と次の関係にある。

$$r_\infty/r_0 = \{\cos\theta_c(1 + \cos\theta_c)\}^2/4 \quad (3)$$

一方、減衰の定数 $\phi$ は分子運動の速さを表し、揺動拡散速度( $D_w$ )と次のように結び付けられる<sup>[2]</sup>。

$$D_w\phi(r_0 - r_\infty)/r_0 = -\chi^2(1 + \chi)^2 \{ \ln[(1 + \chi)/2 + (1 - \chi)/2] / [2(1 - \chi)] + (1 - \chi)(6 + 8\chi - \chi^2 - 12\chi^3 - \chi^4)/24 \} \quad (4)$$

ここで $\chi = \cos\theta_c$ である。これらの式を用いると、プローブ分子の揺動拡散速度 $D_w$ は先に示した偏光解消の実験結果から求められ、さらにStokes-Einstein式( $D_w = kT/6\cdot\eta\cdot V_{eff}$ ;  $k$ , Boltzmann 定数;  $T$ , 絶対温度;  $\eta$ , 粘性;  $V_{eff}$ , 実効体積)を適用すると周囲の粘性 $\eta$ が求められる。

#### レーザーフラッシュ吸収偏光解消

光吸収についても同様な取り扱いができる。最もよく用いられる方法は、偏光パルスレーザーで瞬間的にプローブを三重項状態へ励起するとか、系内で光反応を起こすなどして、ある特定の偏光を吸収する分子を選択的につくり、偏光モニター光の吸収度の変化から分子運動の速度を測定するものである。試料を透過した光の偏光吸収度の変化を $A_V(t)$ 及び $A_H(t)$ とすると、吸収異方性比 $r_A(t)$ は

$$r_A(t) = [A_V(t) - A_H(t)] / [A_V(t) + 2A_H(t)] \quad (5)$$

として定義され<sup>[3]</sup>、この時間変化を解析することにより、蛍光偏光と同様に分子運動の情報を得ることができる。

#### 1.1.2 リン脂質二重層の動的構造

生体膜は、リン脂質が互いに脂質鎖部を向けあい、水と接する部分が常に極性頭部となる脂質二重層を基本構造とし、その中に機能性タンパク質が埋め込まれて多彩な機能を発現している。脂質二重層の中でリン脂質分子は共有結合をしていないためさまざまな分子運動が可能となる<sup>[4]</sup>。分子内部の運動は分子の回転運動、側方拡散運動を規定する運動でありその速度はピコ秒からナノ秒にわたる速い運動となる。リン脂質人

工膜(DPPC)について炭化水素鎖と親水性頭部の運動を独立に測定したところ、膜が液晶状態にある45°Cでは脂質鎖の揺動拡散度( $D_w$ )が $5.1 \times 10^7 s^{-1}$ 、揺動角( $\theta_c$ )が40度であり親水頭部については $D_w$ が $2.7 \times 10^9 s^{-1}$ 、 $\theta_c$ が64度であった<sup>[5]</sup>。これは脂質鎖部が約2 nsecで運動しているのに対し親水性頭部は0.1 nsecで運動していることを示し、頭部の運動速度が尾部に較べ20倍程度速く、その運動範囲も大きいことが明らかとなった。

グリセロール骨格部は構造が硬く側方拡散を阻害する可能性があるため、膜における分子の側方拡散と分子運動の関係を知るためにはグリセロール骨格部に挿入された物質の運動性の測定が必要となる。この目的のためグリセロール骨格部に蛍光発光部を挿入できる蛍光性リン脂質NBD-PE<sup>[6]</sup>を前述のDPPC人工膜に導入し、時間分解蛍光偏光解消法を適用して蛍光発光部の分子運動を測定した(図1)<sup>[7]</sup>。その結果グリセロール骨格に挟まれた分子も炭化水素鎖と同等の運動速度を持つことが示された(表I)。従って脂質二重膜での分子の側方拡散に対してグリセロール骨格部は大きな障害にならないことが明らかとなった。

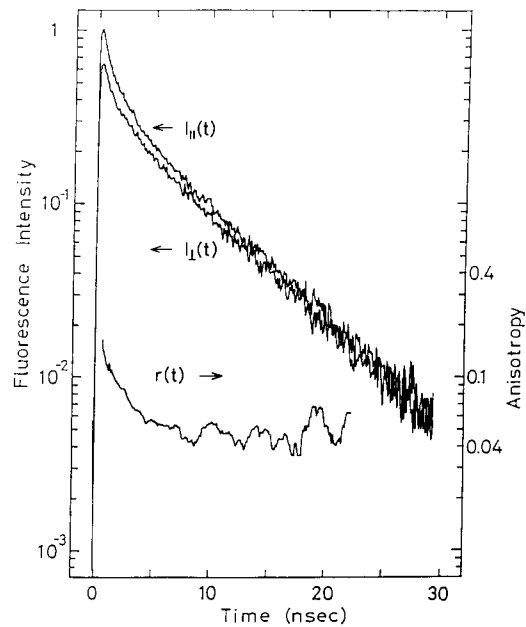


図1 リン脂質(DPPC)二重層に導入されたNBD-PEの偏光蛍光と蛍光異方性比の時間変化。pH=7.0, 45°C。

表 I

DPPC 二重層膜の各部位に導入された蛍光プローブの揺動拡散速度 ( $D_w$ ) 及び揺動角 ( $\theta_c$ )						
(部 位) (プローブ)	炭化水素鎖 DPH <sub>v</sub> PC		グリセロール骨格 NBD-PE		頭部 DPPU	
温度	$D_w$ ( $10^7\text{s}^{-1}$ )	$\theta_c$ ( $^\circ$ )	$D_w$ ( $10^7\text{s}^{-1}$ )	$\theta_c$ ( $^\circ$ )	$D_w$ ( $10^7\text{s}^{-1}$ )	$\theta_c$ ( $^\circ$ )
25°C	~1	15	0.9	28	150	58
37°C	~1	18	3.0	37	230	62
45°C	5.1 (0.3 poise)	40	10.0 (0.1~0.5 poise)	50	270 (0.02 poise)	64

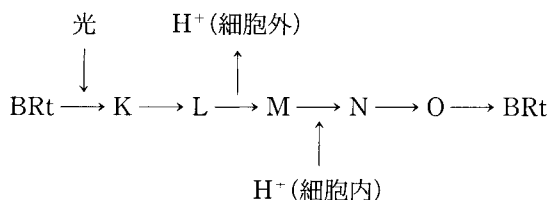
最下段 ( ) 内の数値は 45°C における粘性を見積ったもの

### 1.1.3 膜タンパク質の運動

#### — バクテリオロドプシンの回転運動 —

バクテリオロドプシン (BR) は、光エネルギーを用いてプロトン ( $\text{H}^+$ ) を一定の方向へ (細胞の内から外へ) 輸送するタンパク質である。BR タンパク質の内部には一定の向きに配置された、光を捕獲する分子レチナールが存在する。

BR のプロトン輸送機構は、レチナールの光異性化をはじめとする分子 (タンパク質を含む) の conformation change により、つぎのようなフォトサイクルで表される。



ここで、K, L, M 等は反応中間体であり吸収スペクトルにより区別できる。

BR タンパク質が機能の変化に特徴的な運動性を示すのであれば、反応の途中で出現する中間体の運動がそれぞれ異なることが予想される。BR タンパク質の膜中における回転をフラッシュフォトリスと吸収偏光法を組み合わせ測定したところ、通常の懸濁液では異方性比の変化の測定波長による相違はみられず、膜片の回転によるものと思われる緩やかな減少が測定されたのみであったが、少量のアルコールを添加することで測定波長により異なった吸収異方性比の変化が起こることが見いだされた (図 2)<sup>[6]</sup>。このような吸収異方性の波長依存性を与える分子運動は O → オリジ

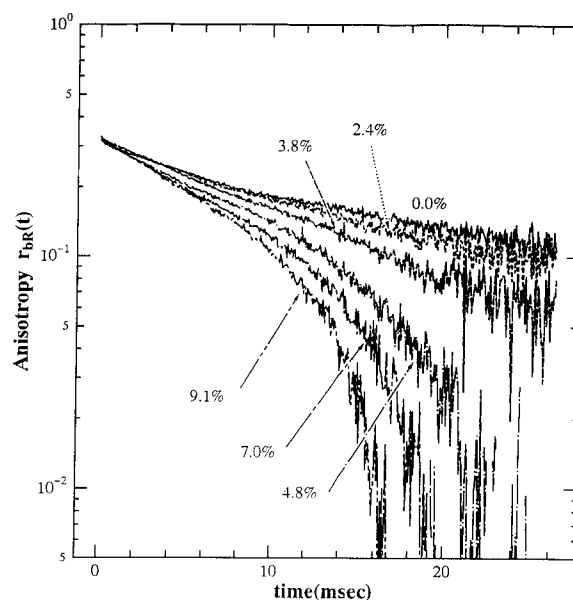


図 2 フォトサイクルを経て再生された BR<sub>2</sub> の吸収偏光異方性比 ( $r_{BR}(t)$ ) の時間変化。アルコール添加により異方性比の変化が大きくなる。

ナル BRt の間で起こっていると考えられた。一方、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を蛍光プローブとして膜内に挿入し蛍光偏光解消による紫膜の流動性を測定したところ、アルコール存在下では膜の流動性が著しく増大していることが見いだされた。そこでこのような特異的な吸収異方性の変化は、膜の流動性の上昇によって顕在化した BR の本来有している動的性質に由来するものであると結論された。これは BR タンパク質の 3 量体形成と膜の動的性質との間に相互作用の存在することを示唆している。

(なお、吸収偏光測定装置作製に当たりご協力を頂いた北海道大学電子科学研究所田村守教授、西村吾朗博士、ならびに井上久遠教授、山中明夫博士に感謝致します。)

## 1.2 平面分子膜の運動測定

### 1.2.1 二次元分子膜に対する蛍光偏光の新しい解析法

生物物質を用いた機能性人工膜を構築する上で、脂質膜 (基板) 中に蛋白質を最適な配向で組み込むことは基本的な問題となる。また活性発現に際して必要となる蛋白質・脂質の分子運動の範囲や速度が保持され

るかといった点も人工膜設計上考慮されなければならない。このような分子の配向や運動性を検討する上で、蛍光偏光解消法や吸収偏光解消法など偏光の時間変化を追跡する方法が有効な手段となる。ここで平面膜の動的構造を時間分解偏光解消法によって評価する新たな方法を定式化した<sup>[9]</sup>。

従来、蛍光偏光測定は縦・横二方向から測定される蛍光強度を基礎としていたが、二次元分子膜に適用するためには、直交する3つの偏光成分 ( $I_x(t)$ ,  $I_y(t)$ ,  $I_z(t)$ ) を独立に測定する必要がある。そのため平面膜に対する励起光の入射角を変化させて2回の測定を行いそれぞれについて直交する2つの偏光成分の時間変化を測定した。得られた2組の偏光蛍光のデータを解析することによって直交する3偏光成分を求めた。 $\mu$  を蛍光プローブ分子の方向ベクトル,  $X$  を  $X$  軸の単位ベクトル,  $n$  を励起分子の時刻  $t$  における配向確立分布,  $I_T(t)$  を全蛍光強度とすると各偏光成分は次に示すように蛍光寿命による項と分子の揺動運動による項に分けることができる。

$$I_x(t) = I_T(t) \cdot \int d\mu n(\mu; t) (\mu \cdot X)^2 \quad (6)$$

$$I_T(t) = I_x(t) + I_y(t) + I_z(t) \quad (7)$$

( $Y \cdot Z$  についても同様)

3方向の座標軸にそった蛍光偏光度合は、次式に示す「偏光率」(fraction of polarization;  $M_x(t)$ ,  $M_y(t)$ ,  $M_z(t)$ )<sup>[10]</sup> を新たに定義して用いた。

$$M_x(t) = I_x(t) / I_T(t) = \int d\mu n(\mu; t) (\mu \cdot X)^2 \quad (8)$$

( $Y \cdot Z$  についても同様)

これは偏光した蛍光強度の時間変化の中から分子運動に関する項のみを抽出したものであり、これを基に分子の配向角度、揺動運動の範囲、揺動運動の速度を見積ることができる。

### 1.2.1 実験結果

ステアリン酸を主成分とし、成膜性を持ちステアリン酸と類似した蛍光プローブである DPH プロピオン酸 1% を含む一層の分子膜を石英基板上に累積した。基板に  $20^\circ$  の傾きで励起光を照射して得られる蛍光の各方向成分に対する「偏光率」の時間変化を図 3 A に示す。基板上的分子の配向角を図 3 B に示すようにとり、データのシミュレーションを行うことにより揺動

角  $\theta_c \sim 20^\circ$ , 配向角は極角  $\delta \sim 20^\circ$ , 方位角  $\gamma \sim -35^\circ$  あるいは  $-145^\circ$  であることが示された。また、「偏光率」の初期勾配を基礎として分子運動の速度の指標となる揺動拡散速度定数 ( $D_w$ ) が計算され,  $20^\circ\text{C}$  において  $4 \sim 5 \times 10^7 \text{s}^{-1}$  という値が得られた。これはパルミチン酸リン脂質膜 (DPPC 膜) の液晶相 ( $45^\circ\text{C}$ ) における脂質鎖の揺動拡散速度  $D_w = 5.1 \times 10^7 \text{s}^{-1}$  と同等であ

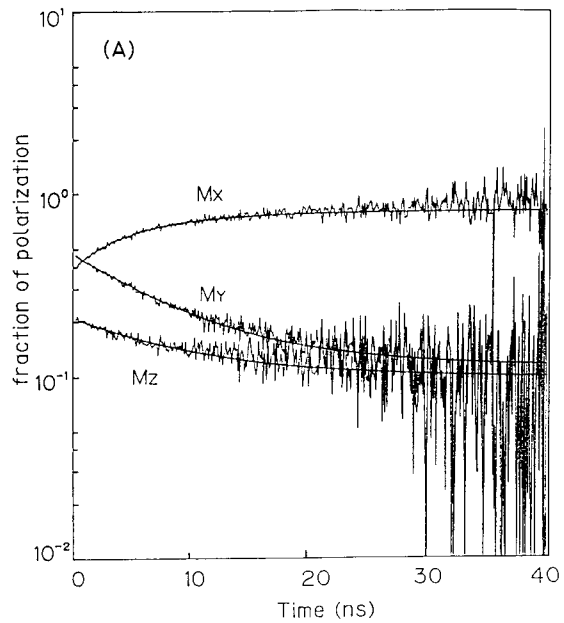


図 3 (A) ステアリン酸+DPH プロピオン酸 (1%) LB 膜の偏光率の時間変化。

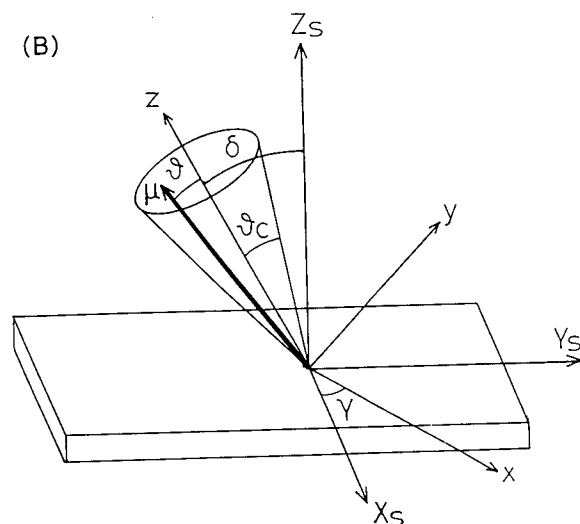


図 3 (B) 配向角 ( $\gamma$ ,  $\delta$ ) および揺動角 ( $\theta_c$ )。

り、基板上に配列したステアリン酸も大きな運動性を持つことが示された。これをさらに発展させ、成膜装置を組み合わせることにより人工細胞膜構造解析とそれを基にした構造制御が可能となろう。

## 2. 並進拡散測定による生体高分子の構造解析 — レーザー自己相関蛍光測定法の開発 —

細胞内を物質が漂い目的の場所に移動する時、あるいは膜の中を2次元的に漂ってある場所に行き着く時、それを運ぶベルトコンベヤーのような装置がなければそれは拡散現象に従って進行する。この時の拡散は並進拡散 (Translational Diffusion) と呼ばれ、その時定数を並進拡散定数と呼ぶ。その大体の値は水中においては分子量 500 ぐらいの物質で  $3 \times 10^{-1} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ , 13,000 程度の蛋白質で  $1 \times 10^{-6} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$  である。また、生体膜のリン脂質が横方向に拡散する時には  $10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ , 生体膜中の蛋白質は  $10^{-9}$  のオーダーにあ

る。細胞膜を横切る分子の時定数を  $10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$  であるとする、 $100 = (10^{-6} \text{cm})$  の厚さを持つ細胞膜を横切って運ばれる時間は  $50 \mu$  秒である。細胞内のこのような拡散と時間領域の現象を明らかにするために自己相関測定法による装置の開発を行っている。

自己相関蛍光測定法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) は蛍光分子から発せられる蛍光強度の揺らぎから、蛍光分子の数と分子の運動 (拡散速度) を測定する方法である。また得られた拡散速度から分子の形状や分子量などの情報を得ることができ

る。自己相関蛍光測定法 (FCS) の装置の概略図は図 4 に示す。光源には連続発振アルゴンレーザー (Spectra Physics 社 Model 165), 検出器はアバランシェフォトダイオード (EG&G 社, SPCM-100 PQ) を光子カウンティングモードで使用した。デジタルオートコリレータは ALV-5000 (ALV 社) を使用した。顕微鏡は落射型蛍光顕微鏡を使用した。レーザー光線をレ

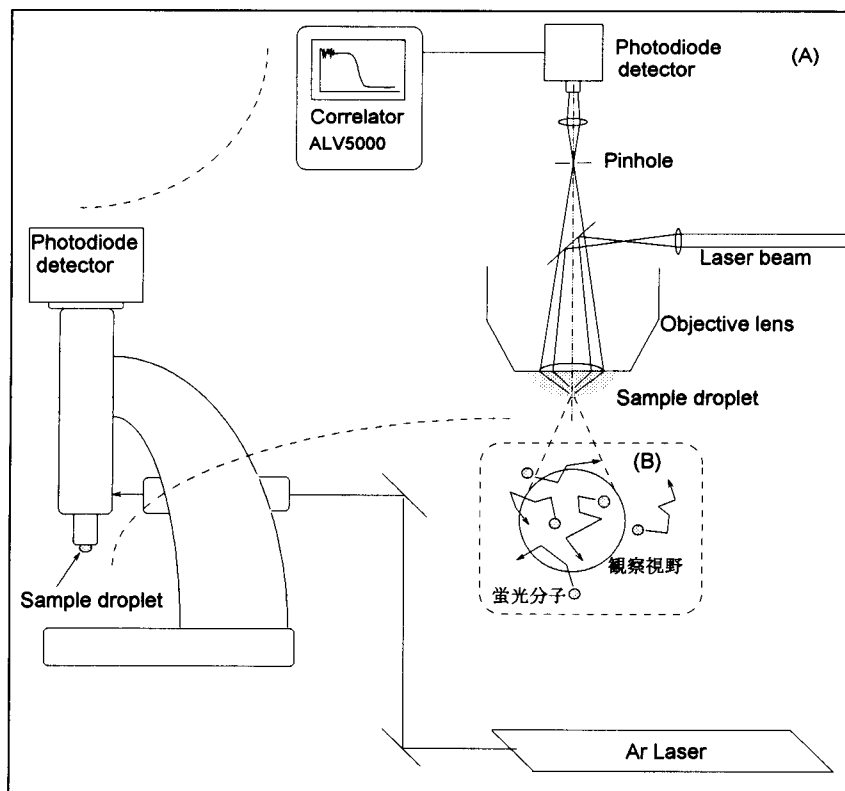


図 4 A : 自己相関蛍光分光測定装置の概略。  
アルゴンレーザーのパワーは 514.5 nm で 500  $\mu$ W。  
B : 顕微鏡視野のレーザー光の中を動きまわる蛍光分子の模式図。観察視野は実際には円柱形の立体構造をしている。

レンズで絞り、対物レンズの中に導くと検出器手前の共焦点位置にあるピンホール( $\phi$  15  $\mu\text{m}$ )により、半径約 200 nm、軸長約 2,000 nm の範囲からだけの光を観察する事ができる。その容積は約  $0.24 \times 10^{-15} \text{l}$  である<sup>[11]</sup>。これは大腸菌の体積  $2 \times 10^{-15} \text{l}$  や哺乳類の細胞の平均体積  $4 \times 10^{-12} \text{l}$  と比較していかに小さな領域であるか明らかである。

そのような極微小領域中(極微小容量)において 0.01  $\mu\text{M}$  程度の蛍光物質が発する蛍光発光はどのような振る舞いとして観測されるのか考えてみると。

その領域に存在する平均分子数は  
アボガドロ数  $\times$  モル濃度  $\times$  容積である。すると、

$$6 \times 10^{23} \times 0.1 \times 10^{-7} \times 0.24 \times 10^{-15} = 1.44$$

平均 1~2 分子が観察視野の中を出入りすることになる。その様な時、分子からの蛍光を観察すると、視野の中を出入りする蛍光分子の動き(図 4 B)に伴って蛍光強度の揺れが観察される。その時の蛍光強度の自己相関をもとめると一般に次のように示される。

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle = \langle I(0)I(\tau) \rangle \quad (9)$$

並進拡散定数と自己相関関数の関係については、近年より現実的な 3 次元モデルも研究され、それによると式(10)のようになることが示されている<sup>[12]</sup>。

$$C(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + 4D\tau/w_{xy}^2} \right) \left( \frac{1}{1 + 4D\tau/w_z^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

ここで D は並進拡散定数、 $W_{xy}$ ,  $W_z$  は観測視野の半径と軸長をそれぞれ示す。N は平均分子数である。また、分子を球と仮定した時、その半径 r と拡散定数 D はアインシュタイン-ストークスの式として次のように示される。

$$D = \frac{\kappa_B T}{6 \pi \eta \gamma} \quad (11)$$

$\kappa_B$ , T,  $\eta$  はそれぞれボルツマン定数、絶対温度、及び溶媒の粘性である。

この装置で測定される数値の信頼性を検討するために DNA の水中での拡散速度を検討した。

結果を図 5 に示す。但し、ここでは観測視野を通過

する平均の時間として表示している(図 5 の■)。観測結果と数値計算から導いた結果はよく一致していることが分かる。この装置の測定方法が十分実用的である事が証明された。

DNA や RNA などの核酸の検出と分子量の測定は、生化学や分子生物学の研究において最も重要な分析手段であるだけでなく、現代の医療現場においても重要な方法となりつつある。例えば PCR 法においても、その最終産物の検出はゲル電気泳動法を用いて鎖長(分子量)に従って分画、検出される場合がほとんどである。この測定で用いた DNA の濃度は  $3.7 \times 10^{-9} \text{M}$  であった。サンプルの全量は 10  $\mu\text{l}$  必要としたがこれはサンプルのピッペティング操作のためとサンプルの蒸発を考慮したためであり、この条件を克服すれば理論的には視野の容量さえあれば測定出来る。この事から自己相関測定法を用いた新しい核酸の分子量決定法が

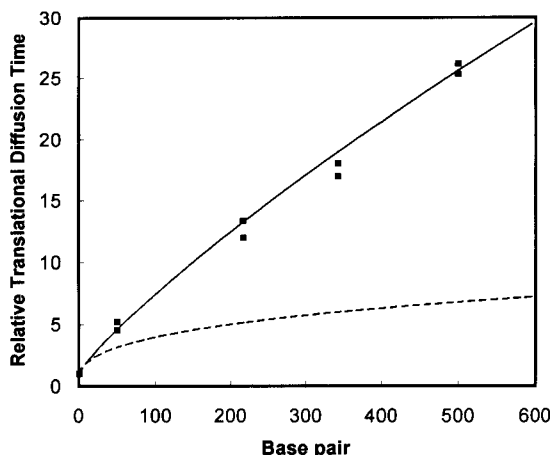


図 5 DNA 鎖長と拡散時間の関係, モデルとの比較検討

試料; PCR 法を用いて 50, 217, 343 と 500 塩基対の長さの蛍光標識 DNA を合成

モデル: DNA の分子量から球又は棒状分子としての拡散速度を数値計算した

——: 棒状分子, - - - : 球状分子

溶液中の物質の摩擦係数 ( $f_0$ ) と拡散定数は

$$D = \kappa_B T / f_0 \quad (12)$$

の関係にある。 $\kappa_B$  はボルツマン定数, T は絶対温度である。回転楕円形をした鋼体状分子の溶液中での摩擦係数 ( $f$ ) は次のような式で表わせる事を Perrin は 1930 年代に報告している(2)。

$$f = \frac{(\rho^2 - 1)^{1/2}}{\rho^{1/2} 1 n [\rho + (\rho^2 - 1)^{1/2}]} \quad (13)$$

ここで,  $f_0$  は同じ容積を持つ球の摩擦係数,  $\rho$  は回転楕円体の軸比(である。この式に従って, DNA の直径 2 nm, 塩基対の間隔を 0.034 nm として計算した結果を図 2 の実線として示した。

測定条件; ■ : 試料 10  $\mu\text{l}$ , 測定時間 60 秒,

示唆された。

一般に並進拡散速度は分子量の変化に鈍感であると言われている。それは式(11)からも明らかのように球の体積がたとえ1,000倍変化したとしても半径 $r$ は10倍程度の変化にとどまり、従って、拡散速度も10倍程度の変化しか見込めないためである。これは蛋白質の会合、蛋白質の相互作用や酵素と基質の反応などの研究を考えるといかにも非力な感じがする。しかしそれは分子をあくまでも球と仮定したからであり、棒状分子においてはまた違った振る舞いを見せてくれる。この測定法は、桁外れの系、すなわち生きている細胞表面とリガンド（抗体、抗原、イオン、ホルモン、神経伝達物質など）などの研究をにおいても、十分に有効であると考え現在研究を進めている。

### 3. 二分子膜系で選択的イオン輸送をおこなう人工イオノフォア（イオン輸送担体）の研究

細胞膜でみられるようなチャネルあるいはキャリアーによるイオンの選択輸送系は、分子レベルで情報の認識、変換、増幅を担う系として、二分子膜を利用した分子機能素子（デバイス）開発の観点から関心がもたれている。人工イオノフォアとしては、クラウンエーテルやクリプタンド系の化合物が有名であるが、これまでこれらの化合物を用いたイオンの輸送実験のほとんどは、液膜を利用して行われてきており、二分子膜系での研究はあまり行われてこなかった。この理由と

しては、実験的な困難さを別とすれば、これらポリエーテル系の化合物の疎水性が比較的低いため、二分子膜にドープすることが難しかったことがあげられる。この問題は疎水的な側鎖を化学修飾することにより解決されるがイオンの選択性が低下するという欠点をもっている。

我々は、極めて高いイオン選択輸送系を二分子膜で人工的に実現するため、新規なホスト化合物であるカリックスアレンを用いて研究を進めている。カリックスアレンはフェノールとホルムアルデヒドとの脱水縮合反応から得られる環状オリゴマーで、アルカリ金属イオンに対し高い錯形成能を示す疎水性の高い化合物である<sup>[14]</sup>。これまでの非水溶媒中での錯形成反応の研究から、イオン選択性は、環の大きさに依存し、カリックス<4>アレンではナトリウムイオンにまたカリックス<6>アレンではセシウムイオンに親和性を持ち、さらに環径の大きなカリックス<8>アレンではイオン選択性が低下することが知られているが<sup>[15-17]</sup>、二分子膜中でのイオン輸送特性については明らかとなっていなかった。我々は、これら化合物を大豆リン脂質から作成した平面二分子膜にドープし、イオン輸送に伴い発生するpAレベルの電流測定から、イオノフォアとしての機能、イオン選択性について評価した。

図6には、実験で使用した平面二分子膜による電流測定装置の簡略図を示した。二分子膜は電解質溶液（100 mM）で満たした二つのチャンパー（シスとトラ

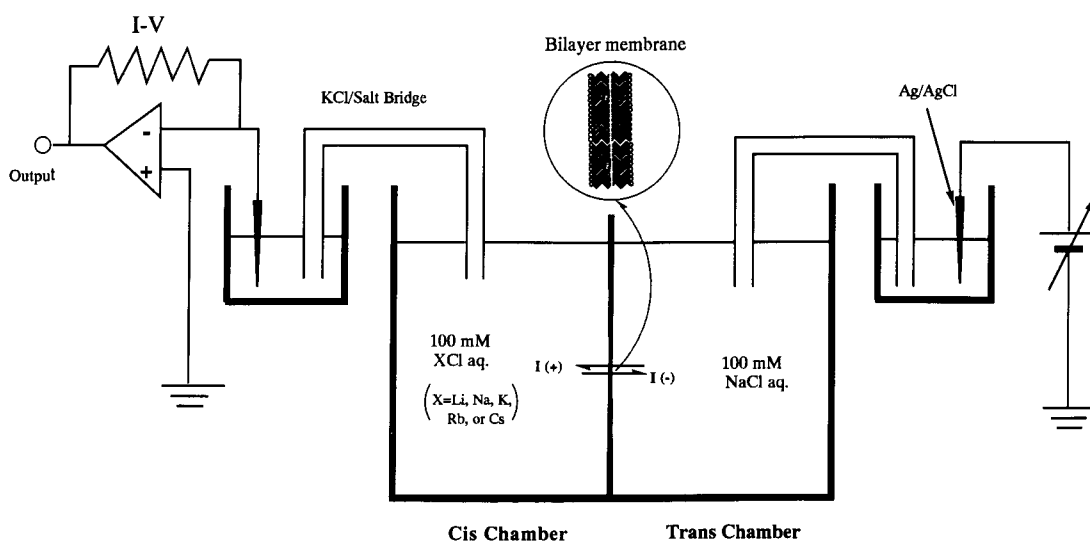


図6 平面膜実験装置の概略図



ンス)を仕切るテフロン膜にあけた直径0.2 mmの穴に高木-Montal法<sup>[18]</sup>により作成した。カリックスアレンは膜作成後、シス側からDMSO溶液(100 mM)として加えた。この時の、脂質に対するカリックスアレンの分子数比は、約1,000:1である。シス側は0 Vに落としてあり、トランス側から+100 mV~-100 mVまでの可変電圧を加え、この時、発生する電流を観測した。イオン選択性は、シスとトランス側の電解質溶液の組み合わせを変え、そのとき得られた逆転電位より、評価した。図7には、カリックス<4>アレンのエチルカルボニルメチルエーテル誘導体(a)で得られた電流-電圧曲線を示した。塩化ナトリウム溶液(100 mM)で両方のチャンバーを満たした場合、電位差に応じ、ナトリウムイオンの透過に伴う電流が観測された。それに対しナトリウム以外のアルカリ金属イオンを満たして透過実験をした場合には、最大で100 mVの電位差をかけた場合でも1 pA以下の電流しか観測されなかった。このことは、ドーブしたカリックス<4>アレンが2分子膜中でナトリウムイオンを選択的に輸送する能力があることを示している。逆転電位から見積もったイオンの透過率は、ナトリウムイオンに対して1と仮定すると他のアルカリ金属イオンでは0.02以下となった。我々の知る限り、二分子膜中でこれほ

どのナトリウムイオン選択性を持つ人工イオノフォア-はカリックス<4>アレンが初めてである。カリックス<6>アレンのエーテル誘導体(b)もカリックス<4>アレン同様イオン輸送能があり、選択性は非水溶媒中での錯形成能と関連し、セシウムイオンに対して選択的なイオノフォア-であると結論できた。一方、カリックス<8>アレンのエーテル誘導体(c)では、イオン輸送に伴う電流を全く観測できなかった。おそらく膜界面での錯形成能の低さが原因となっているものと考えられる。

天然のナトリウムイオノフォア-として知られるモネンシンとカリックス<4>アレンとの輸送能をイオン輸送速度から比較するため、リポソームの二分子膜を介したナトリウムイオンの交換反応を<sup>23</sup>Na NMRにより測定した。その結果、カリックス<4>アレンによるナトリウムイオンの輸送速度は、モネンシンに比べ約1/4程度であり、一秒間に一個のカリックス<4>アレン分子が20個程度のイオンを輸送する能力があることがわかった。また、ドーブしたカリックス<4>アレンの濃度に対して、輸送速度は一次に増加する傾向があり、動力学的な解析から、膜中で1:1の錯体を形成していることも明らかとなった。以上のことから、カリックス<4>アレンのエーテル誘導体(a)はナトリウムイオンに極めて選択的な人工キャリア-であると結論づけることができる。

最近、人工イオンチャンネルとして、チャンネル機能をもった二分子膜系が注目されてきており、環状ポリペプチドやエーテル結合を導入した脂質分子の集合体が二分子膜中でチャンネル機能を示すことが報告されている<sup>[19, 20]</sup>。しかしながら現在のところ、天然のチャンネル蛋白のように一分子で機能を発現するようなチャンネル分子の化学合成までは到っていない。カリックスアレンのエーテル誘導体は二分子をカラム状に連結することにより、膜を貫通するようなチャンネル型の構造を形成

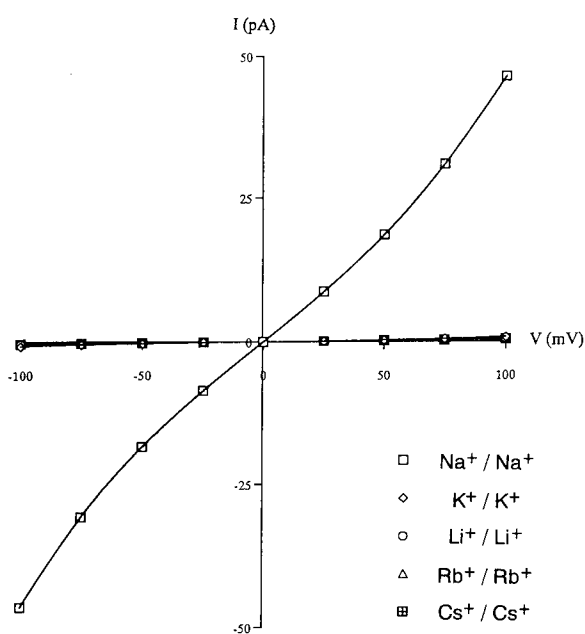
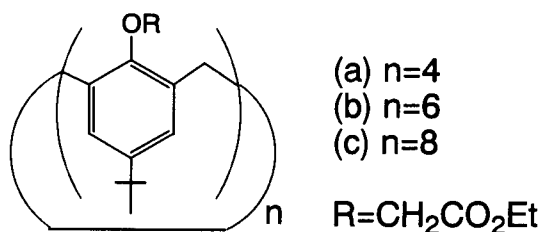


図7 カリックス<4>アレンで観測された電流-電圧曲線



することが予想される。そのため、カリックスアレンはキャリアーとしてだけでなく、人工イオンチャネル

の分子設計に上においても興味深い化合物であり、チャネル分子としての応用も期待できるものと考えられる。

#### 【参考文献】

- [1] K. Kinoshita, Jr., S. Kawato, A. Ikegami: *Biophys. J.*, 20, 289 (1977).
- [2] Lipari, G. and Szabo, A. *Biophys. J.*, 30, 489 (1980).
- [3] 川戸 佳, 月刊フィジクス, 7, 458 (1986).
- [4] 荒磯恒久, 小山富康, 日本生理学雑誌, 49, 1 (1987).
- [5] Saito, H., Araiso, T., Shirahama, H., Koyama, T., *J. Biochem.*, 109, 559 (1991).
- [6] Chattopadhyay, A., London, E., *Biochemistry*, 26, 39 (1987).
- [7] 荒磯恒久, 小山富康, 病態生理, 6, 637 (1990).
- [8] 菊川峰志, 荒磯恒久, 下澤楯夫, 武笠幸一, 加茂直樹, 生物物理, 33, s 148 (1993).
- [9] Kimura, N., Tsuneta, R., Araiso, T., Koyama, T., Hasegawa, N., Ishii, T. and Mukasa, K. *Chem. Phys. Lipid*, 57, 39 (1991).
- [10] Mukasa, K., Araiso, T. and Kimura, N. in "New Functionality Materials", vol. C, ed. by Tsuruta, T., Douyama, M. and Seno, M. Elsevier Science Publishers B. V. pp. 705 (1993).
- [11] R. Rigler U. Mets J. Windengren & P. Kask (1993) *Eur Biophys J* 22: 169-175.
- [12] R. Rigler, J. Windengren, J. & U. Mets, (1992) in: *Fluorescence Spectroscopy* (Wolfbeis ed) 13-21, Springer-Verlag,
- [13] C. R. Cantor, and P. R. Schimmel (1980) *Biophysical chemistry part II*, pp. 555-590, W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- [14] C. D. Gutsche, *Prog. Macrocyclic. Chem.* 1987, 3, 93.
- [15] F. Arnaud-Neu, E. M. Collins, M. Deasy, G. Ferguson, S. J. Harris, B. Kaitner, A. J. Lough, M. A. MacKervey, E. Marques, B. L. Ruhl, M. J. Schwing-Weill, and E. M. Seward, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8681.
- [16] T. Jin and K. Ichikawa, *J. Phys. Chem.* 1991, 95, 2601
- [17] T. Jin, T. Koyama, and K. Ichikawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992, 499.
- [18] M. Montal and P. Mueller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1972, 69, 3561.
- [19] Y. Kokube, K. Ueda, and M. Sokabe, *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7618.
- [20] M. Reza Ghadiri, J. R. Granja and L. K. Buehler, *Nature*, 1994, 369, 301.