

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01995

研究課題名(和文) 金属錯体多面体を用いた外場応答型人工イオンチャネルの創製

研究課題名(英文) Stimuli-Responsive Synthetic Ion Channels Based on Metal-Organic Polyhedra

研究代表者

古川 修平 (Furukawa, Shuhei)

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：90452276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年の膜タンパク質結晶構造解析によって明らかになってきた、天然イオンチャネルに見られる脂質膜内のタンパク質の複合化、開閉運動などの動的構造に注目した。すなわち、一義構造を持つ分子(超分子)をサブユニットとして捉え、イオンを流す「細孔部位」と、外場応答によりイオン伝導を制御する「応答部位」を段階的に複合化させることで、外場応答性の人工イオンチャネル創出を行った。分子レベルの細孔を有する物質として、金属錯体多面体を、応答部位として酵素応答性を示すペプチドを用いた。配位結合を用いた複合化を達成し、実際に平面脂質膜中に埋め込み、酵素に応答してイオン電流を変化させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、酵素反応に応答した人工イオンチャネルの創成に成功した。現在、人工チャネルの研究では、脂質膜を介してイオンを選択的に流す、水を高速で流す、光に応答してイオン電流を変化させる、特別な分子に応答してイオン電流を変化させる、など少しずつ高度なイオン電流の制御が可能になってきている。本研究では、これらに加え、酵素反応、すなわち化学反応に応答してイオン電流を変化させる系の創出に成功した。天然の膜受容体の多くが、酵素反応によりその応答性を変化させていることを踏まえると、本研究は天然の膜受容体を再現することに一歩近づいたといえる。また、人工分子により細胞機能を操作することが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we fabricated a synthetic ion channel in response to chemical reaction. The strategy is to hybridize two chemically distinct molecules by supramolecular chemistry approach. We used metal-organic polyhedra (MOP) as a porous unit that allows ion flux and peptide as a responsive unit that changes chemical structures in response to chemical reaction. Through the coordination bond formation, these two units were successfully hybridized to form a MOP-peptide supramolecule. This supramolecule was further incorporated into planar lipid bilayers device. We successfully confirmed the change of ion conductance in response to chemical reaction.

研究分野：錯体化学

キーワード：人工イオンチャネル 金属錯体多面体 酵素 ペプチド

1. 研究開始当初の背景

生体機能を模倣する分子を創造する研究は、「バイオメテック化学」として有機化学分野を中心に1980-90年代に盛んに研究が行われてきた。その中でも、膜タンパク質の機能を人工的に再現する研究は、化学者にとって最も挑戦的な課題であった。その理由として、(a) 膜タンパク質の構造解析の困難さ故に構造—物性相関が不明であったこと、(b) 脂質膜への再構成を含めた巨視的(メゾスコピック的)視点による分子設計がないこと、が挙げられる。一方で、近年になり新しい材料設計の下、分子レベルの細孔を有する材料を用いた人工イオンチャネルの研究が報告され(DNA ナノチューブ: Simmel, et al. *Science* **2012**, 338, 932、カーボンナノチューブ: Noy, et al. *Nature* **2014**, 514, 612)、まさに人工系による研究が再び盛んになりつつある。しかしながら、天然イオンチャネルに見られるような、基質分子などの化学刺激応答型(グルタミン酸受容体など)、光などの物理刺激応答型(ロドプシンなど)の、人工イオンチャネルを構築する一般的な分子設計は未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、近年の膜タンパク質結晶構造解析によって明らかになってきた、天然イオンチャネルに見られる脂質膜内のタンパク質の複合化、開閉運動などの動的構造に注目した。すなわち、一義構造を持つ分子(超分子)をサブユニットとして捉え、イオンを流す「細孔部位」と、外場応答によりイオン伝導を制御する「応答部位」を段階的に複合化させることで、外場応答性の人工イオンチャネル創出を行う(図1)。

分子レベルの細孔を有する物質として、金属錯体多面体(Metal-Organic Polyhedra: MOP)を用いる。MOPは金属イオンと有機配位子のジオメトリーを巧みに制御することで得られる超分子金属錯体である。その多面体的構造から本質的に内部に空間を有し、ゲストとなりうる分子やイオンを内包することが可能であるため、「細孔部位」として機能する。我々は以前、立方八面体構造を有するMOPを脂質膜中に埋め込み、単分子レベルでイオン電流測定を行うことで、MOPが人工イオンチャネルになりうること、立方八面体構造の特徴に基づく(正方形窓と正三角形窓)二種類のイオン電流発現、脂質膜中での構造ダイナミクスの発現を見出した(Kawano, Furukawa, et al. *Chem* **2017**, 2, 393-403.)。本研究ではこの知見を活かし、「細孔部位」を有するMOPへ「応答部位」を複合化させ、外場によりイオン電流を制御可能な、より高機能な人工イオンチャネルの創出と目的とする。

金属錯体の配位子交換反応を制御することで、多面体構造を構築した後においても、他の分子を配位結合により複合化することが可能である。本提案では、このMOPに特徴的な段階的錯形成反応を利用することで、新たに設計した化学刺激に対し動的構造変化を起こす「応答部位」を複合化し、外場応答性の人工イオンチャネルの合成を行う。

本研究を提案後、実際に分子化学分野では人工イオンチャネルの創成に関する研究が一気に発展した(総説: Barboiu, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 566-597.)。様々な人工分子、超分子、自己集合体がイオンチャネルとして機能することが報告されはじめ、その中には天然のチャネル(アクアポリン)よりも高速で水を透過させるチャネルが極最近報告された(Aida, et al. *Science* **2022**, 376, 738-743.)。しかしながら、化学刺激に応答する人工イオンチャネルは未だ実現されていない。生体内の情報伝達は酵素反応に応答する膜受容体などにより制御おり、その実現は単に化学的なチャレンジのみならず、細胞生物学的な応用が期待できる。本研究では、特に酵素反応に応答してイオン伝導性を制御する「酵素応答型人工イオンチャネルの創成」を目指した。

3. 研究の方法

酵素活性部位を有する MOP-kemptide 複合体の合成: 本研究において、イオンチャネル部位としてはMOPを用いた。その中でも、立方八面体構造を有し、より安定な金属であるロジウムイオンを含む $[Rh_2(C_{12}\text{-bdc})_2]_{12}$ (C12-RhMOP)を用いた。このMOPは、周辺に炭素鎖12のアルコキシ基を有しており、脂質膜への溶解性が高く融合が可能である。酵素としては生体内でも情報伝達系において重要な役割を担っているリン酸化酵素であるプロテインキナーゼA(PKA1)を選択した。このPKA1によりリン酸化を受けるペプチドはKemptideとして知られており、

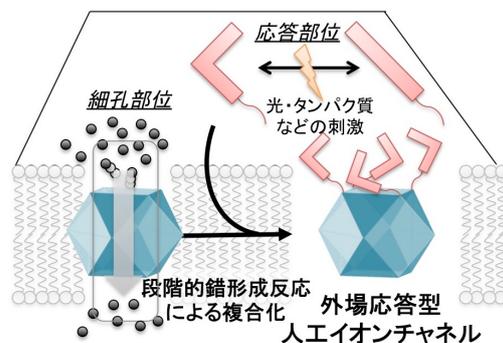


図1. 外場応答型人工イオンチャネル

L-R-R-A-S-L-G のアミノ酸配列を有している。この Kemptide のセリン (S) 部位が PKA1 にリン酸化を受けることが知られている。そこで、Kemptide を C12-RhMOP ヘサブユニットとして複合化することを試みた。C12-RhMOP の表面には、合計 12 の Rh パドルホイール錯体のアキシャル位が存在し、一般的には溶媒分子が配位子している。この溶媒分子をターゲットとしたアミノ酸との配位子交換反応をスクリーニングしたところ、プロリン (P) が安定にアキシャル位に配位することを確認した。そのため、末端にプロリンを配置し、さらに脂質膜との相互作用を踏まえてβアラニン (βA) を 4 つ配置した kemptide である、P-βA-βA-βA-βA-L-R-R-A-S-L-G の配列を有するプロリン末端 Kemptide を複合化に用いた。

プロリン末端との複合化は、紫外可視分光測定から判断した。実際に、青緑色の C12-RhMOP の溶液 ($\lambda_{\max} = 618 \text{ nm}$) にプロリン末端 kemptide を加えたところ、紫色へと変化し ($\lambda_{\max} = 596 \text{ nm}$) プロリンのアミン末端がロジウムに配位していることが確認された。これは Rh パドルホイール錯体の金属-金属間結合中における $\pi^*-\sigma^*$ 遷移がアキシャル位への配位に対して敏感であり、配位している元素が酸素から窒素に変わったことを意味している。これにより、MOP-kemptide 複合体 (kMOP) の合成に成功したことを確認した。

MOP-kemptide 複合体の平面脂質膜への融合とイオン計測：合成した MOP-kemptide 複合体を平面脂質膜デバイス中への融合を試みた。脂質は DOPC を使い、液滴間に平面脂質膜を形成する手法を用いた。イオンとしては 1M KCl と 10 mM MOPS バッファーをもちいた。実際に、kemptide へのリン酸化が単分子イオン電流に及ぼす影響を調べるため、すでにリン酸化された kemptide である P-kemptide も合成した。その配列は、P-βA-βA-βA-βA-L-R-R-A-pS-L-G である。この p-kemptide も MOP と同様に複合化 (PkMOP) し、平面脂質膜内へ融合した。

実際に、イオン電流測定を行った結果を図 2 に示す。kMOP および PkMOP は異なるイオン電流特性を示し、測定時間における平均電荷束 (Charge Flux) が 2 桁以上、大きく異なることがわかった (kMOP: 0.23 pA/s, PkMOP: 22.85 pA/s)。これにより、Kemptide がリン酸化されると、MOP を介したイオン流入が大きくなる、すなわち流れやすくなることが示された。

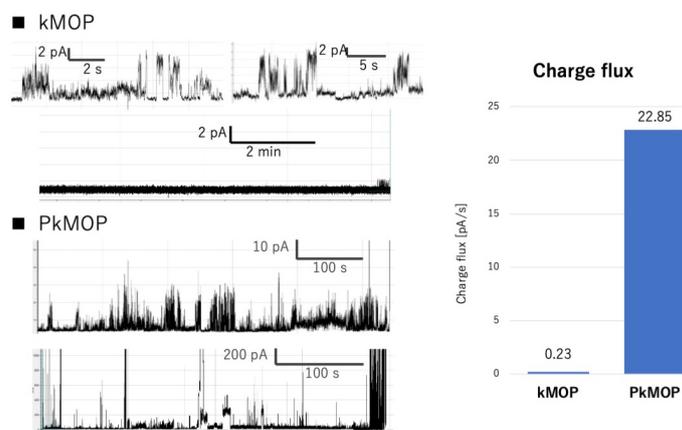


図 2. kMOP と PkMOP の単分子イオン電流測定

最後に、PKA1 の添加によりイオン電流の制御が可能かを試みた。kMOP を脂質膜中に埋め込んだ状態でイオン電流測定を行い、その水相液滴中へ PKA1 を添加した。その添加前後のイオン電流の変化を調べた。イオン電流の平均電荷束、平均のシグナル開口時間 (Duration of Signals)、平均開口頻度 (Appearance rate of signals) とともに、PKA1 の添加前に比べて、添加後の方がより大きくなることが明らかになった (図 3)。これは前述した、リン酸化された PkMOP の方がより大きな平均電荷束を有していることと合致しており、PKA1 によるリン酸化のため、イオン電流がより流れるようになったことを表している。

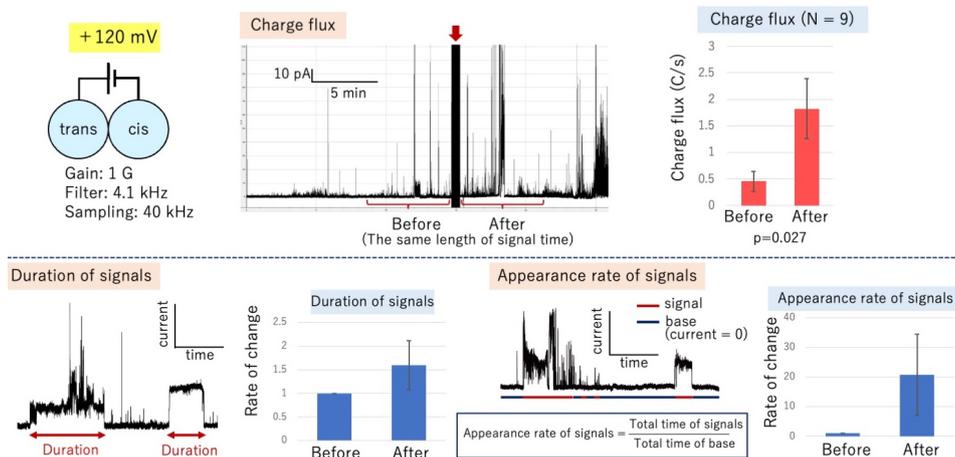


図 3. kMOP の PKA1 添加前後におけるイオン電流の変化

以上のように、本研究において、リン酸化酵素に応答してイオン電流を変化させる人工イオンチャネルの創成に成功した。その鍵は、イオンを流す細孔部位である MOP に対し、リン酸化応答部位である *kemptide* を複合化させる分子設計を用いたことである。この例のように、MOP の周辺部位へは様々な応答部位を導入することが可能であると考えられ、今後より高度な人工イオンチャネルの設計指針を開拓したと言える。

4. 研究成果

本研究で得られた成果は、現在論文執筆中である。一方で、本研究を進めるにあたり、様々な MOP の合成、さらには MOP 集合体の合成に成功し論文を発表した。以下に、その論文を示す。

[1] “Postsynthetic Covalent and Coordination Functionalization of Rhodium(II)-Based Metal–Organic Polyhedra” Arnau Carné-Sánchez, Jorge Albalad, Thais Grancha, Inhar Imaz, Judith Juanhuix, Patrick Larpent, Shuhei Furukawa, Daniel Maspocho. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 4094–4102.

[2] “A Coordinative Solubilizer Method to Fabricate Soft Porous Materials from Insoluble Metal–Organic Polyhedra” Arnau Carné-Sánchez, Gavin A. Craig, Patrick Larpent, Vincent Guillerm, Kenji Urayama, Daniel Maspocho, Shuhei Furukawa. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6347–6350.

[3] “Directional asymmetry over multiple length scales in reticular porous materials” Alexandre Legrand, Zaoming Wang, Javier Troyano, Shuhei Furukawa. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 18–33.

[4] “Spatiotemporal Control of Supramolecular Polymerization and Gelation of Metal–Organic Polyhedra” Alexandre Legrand, Li-Hao Liu, Philipp Royla, Takuma Aoyama, Gavin A. Craig, Arnau Carné-Sánchez, Kenji Urayama, Jan J. Weigand, Chia-Her Lin, Shuhei Furukawa. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 3562–3570.

[5] “Mechanoresponsive Porosity in Metal–Organic Frameworks” Javier Troyano, Alexandre Legrand, Shuhei Furukawa. *Trends Chem.* **2021**, *3*, 254–265.

[6] “Porous Colloidal Hydrogels Formed by Coordination-Driven Self-Assembly of Charged Metal–Organic Polyhedra” Zaoming Wang, Gavin A. Craig, Alexandre Legrand, Frederik Haase, Saori Minami, Kenji Urayama, Shuhei Furukawa. *Chem. Asian J.* **2021**, *16*, 1092–1100.

[7] “Multiscale Structural Control of Linked Metal–Organic Polyhedra Gel by Aging-Induced Linkage-Reorganization” Zaoming Wang, Christian Villa Santos, Alexandre Legrand, Frederik Haase, Yosuke Hara, Kazuyoshi Kanamori, Takuma Aoyama, Kenji Urayama, Cara M. Doherty, Glen J. Smales, Brian R. Paww, Yamil J. Colon, Shuhei Furukawa. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 12556–12563.

[8] “Rhodium-Based Metal–Organic Polyhedra Assemblies for Selective CO₂ Photoreduction” Ashta C. Ghosh, Alexandre Legrand, Rémy Rajapaksha, Gavin A. Craig, Capucine Sassoie, Gábor Balázs, David Farrusseng, Shuhei Furukawa, Jérôme Canivet, Florian M. Wisser. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 3626–3636.

[9] “Assembling metal–organic cages as porous materials” Elí Sánchez-González, Min Ying Tsang, Javier Troyano, Gavin A. Craig, Shuhei Furukawa. *Chem. Soc. Rev.* **2022**. in press. DOI: 10.1039/D1CS00759A.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Carne-Sanchez Arnau, Albalad Jorge, Grancha Thais, Imaz Inhar, Juanhuix Judith, Larpent Patrick, Furukawa Shuhei, Maspoch Daniel	4. 巻 141
2. 論文標題 Postsynthetic Covalent and Coordination Functionalization of Rhodium(II)-Based Metal?Organic Polyhedra	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 4094 ~ 4102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.8b13593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Carne Sanchez Arnau, Craig Gavin A., Larpent Patrick, Guillerm Vincent, Urayama Kenji, Maspoch Daniel, Furukawa Shuhei	4. 巻 58
2. 論文標題 A Coordinative Solubilizer Method to Fabricate Soft Porous Materials from Insoluble Metal?Organic Polyhedra	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6347 ~ 6350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201901668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Legrand Alexandre, Wang Zaoming, Troyano Javier, Furukawa Shuhei	4. 巻 12
2. 論文標題 Directional asymmetry over multiple length scales in reticular porous materials	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 18 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SC05008C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Legrand Alexandre, Liu Li-Hao, Royla Philipp, Aoyama Takuma, Craig Gavin A., Carne-Sanchez Arnau, Urayama Kenji, Weigand Jan J., Lin Chia-Her, Furukawa Shuhei	4. 巻 143
2. 論文標題 Spatiotemporal Control of Supramolecular Polymerization and Gelation of Metal?Organic Polyhedra	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3562 ~ 3570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c00108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Troyano Javier、Legrand Alexandre、Furukawa Shuhei	4. 巻 3
2. 論文標題 Mechanoresponsive Porosity in Metal-Organic Frameworks	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Chemistry	6. 最初と最後の頁 254 ~ 265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trechm.2021.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Zaoming、Craig Gavin A.、Legrand Alexandre、Haase Frederik、Minami Saori、Urayama Kenji、Furukawa Shuhei	4. 巻 16
2. 論文標題 Porous Colloidal Hydrogels Formed by Coordination Driven Self Assembly of Charged Metal Organic Polyhedra	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry ? An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 1092 ~ 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202100080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Zaoming、Villa Santos Christian、Legrand Alexandre、Haase Frederik、Hara Yosuke、Kanamori Kazuyoshi、Aoyama Takuma、Urayama Kenji、Doherty Cara M.、Smales Glen J.、Pauw Brian R.、Colon Yamil J.、Furukawa Shuhei	4. 巻 12
2. 論文標題 Multiscale structural control of linked metal?organic polyhedra gel by aging-induced linkage-reorganization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 12556 ~ 12563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1SC02883A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ghosh Ashta C.、Legrand Alexandre、Rajapaksha Remy、Craig Gavin A.、Sassoye Capucine、Balazs Gabor、Farrusseng David、Furukawa Shuhei、Canivet Jerome、Wisser Florian M.	4. 巻 144
2. 論文標題 Rhodium-Based Metal?Organic Polyhedra Assemblies for Selective CO ₂ Photoreduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3626 ~ 3636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c12631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sanchez-Gonzalez Eli、Tsang Min Ying、Troyano Javier、Craig Gavin A.、Furukawa Shuhei	4. 巻 -
2. 論文標題 Assembling metal?organic cages as porous materials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Society Reviews	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CS00759A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	臼井 健二 (Usui Kenji) (70543792)	甲南大学・フロンティアサイエンス学部・准教授 (34506)	
研究分担者	坂口 怜子 (Sakaguchi Reiko) (80723197)	産業医科大学・医学部・講師 (37116)	
研究分担者	川野 竜司 (Kawano Ryuji) (90401702)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関