

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23624

研究課題名（和文）バリノマイシンのカリウムイオン選択性の水和効果の解明

研究課題名（英文）Elucidating hydration effect on potassium ion selectivity of valinomycin

研究代表者

平田 圭祐（Hirata, Keisuke）

東京工業大学・理学院・助教

研究者番号：80845777

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、バリノマイシンのカリウムイオン選択性の起源を明らかにするために、バリノマイシン-金属錯体とその水和クラスターの構造を気相赤外分光法により調べた。その結果、親和性が高いカリウムとの錯体では対称性の高いコンフォメーションが水和されても維持されるのに対して、親和性の低いナトリウムでは水分子が一つ付加しただけで対称性が崩れ構造が歪むことがわかった。このことから、バリノマイシンのみならず、他のイオン選択性を示す他の分子においても水和効果が重要な因子であることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、水和効果が分子のイオン選択性に大きな影響を及ぼしていることが示された。これは気相環境下で分子の組成・水分子の個数を精密に規定したことにより初めて示されたものであり、気相赤外分光法の威力を物語る。精密な分光測定に裏打ちされたイオン選択性の構造論を展開した本研究は、イオン選択性を示す多様な分子の原理を解明するだけでなく、イオン選択性分子の創出にも寄与するものと考えられ、イオン分離や創薬にも展開されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the origin of the potassium selectivity of valinomycin, the molecular structures of valinomycin-metal complexes and their hydrated clusters were investigated by gas-phase infrared spectroscopy. It was found that the highly symmetric conformation of the complex with the high-affinity ion potassium is retained after hydration, whereas the molecular structure is distorted in the complex with the low-affinity sodium by the addition of a single water molecule. This strongly suggests that the hydration effect is an important factor in other molecules that exhibit ion selectivity.

研究分野：分子分光学

キーワード：イオン選択性 バリノマイシン 赤外分光法 冷却イオントラップ分光法 気相分光法

1. 研究開始当初の背景

生体内では、ある特定の分子やイオンと特異的に結合する生体分子が存在する。イオノフォアはそうした分子の一種であり、特定の金属イオンと選択的に結合し、金属イオンを細胞内外に透過させる機能を持つ。この機能を最大限生かすことで、耐性菌フリーの抗生物質としてイオノフォアが活用できる可能性が示されている。これまで、生体でのイオン認識機構は「鍵と鍵穴モデル」に代表されるように静的な形状適合性の観点から説明されてきた。しかし、認識する分子に着目すると、単結合を多く構造がフレキシブルに変化しうることが多く、単純な「鍵と鍵穴」モデルには疑問が残る。

バリノマイシンはエステル結合とアミド結合からなるデプシペプチドであり、 K^+ と選択的に結合するイオノフォアである。X線結晶構造解析[Neupert-Laves, K. and Dobler, M. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*, 432.]から、バリノマイシンはエステルカルボニル基の酸素原子を使って K^+ に八面体六配位型に結合することが分かっている(図1)。さらに、 K^+ に配位しないアミドカルボニル基はアミドNHと β ターン型の水素結合を形成している。この構造様式はBracelet型と呼ばれている(図1b)。バリノマイシンの K^+ との結合能は Na^+ に比べて約 10^{34} 倍強いとされているが、実はバリノマイシンは Na^+ と結合したほうがエネルギー的に安定であることが量子化学計算で示されている[Varma, S. *et al. J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 13.]。この矛盾を解消するためには、バリノマイシンの構造に加えて、生体内での水分子の効果を取り込むことが必要である。すなわち、アルカリ金属イオンは生体中では水和されているため、脱水和によるエネルギーロスとバリノマイシンとの錯形成によるエネルギーゲインのトレードオフで選択性が決定されている。バリノマイシンのイオン選択性についてこの観点から理論計算による研究がなされてきた[Varma, S. *et al. J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 13.]が、気相中で安定な構造をもとに議論を進めているため、果たしてその構造が溶液中で安定なのか疑問がもたれる。実際、溶液中の構造と気相中の構造が異なっている可能性が示唆されている。さらに、脱水和のエネルギーの見積もりはいまだに困難であり、計算手法により脱水和エネルギーが異なる。それゆえ、バリノマイシンの K^+ 選択性に対して水がどのような影響を与えるのかという問いに実験的に答えることは非常に重要である(図2)。

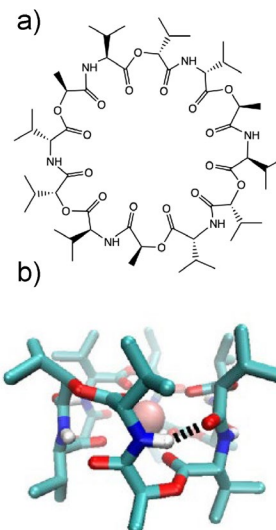


図1. バリノマイシンの a) 構造式と b) Bracelet型構造。

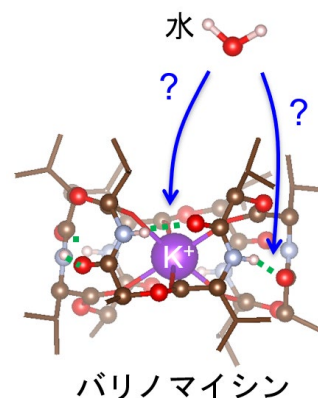


図2. バリノマイシンのイオン選択性における水和効果。

2. 研究の目的

このように、バリノマイシンの K^+ 選択性における水和効果を実験的に検証することは重要である。しかし、溶液中の研究では、見たい錯体だけでなく、溶媒や多核錯体由来のシグナルが重畳するため、構造決定が困難であった。そこで本研究では、エレクトロスプレー・冷却イオントラップ分光技術[Ishiyuchi, S. *et al. J. Mol. Spectrosc.* **2017**, *332*, 45.]に着目して、バリノマイシンと金属イオンの錯体を真空中に取り出し、この錯体に段階的に水分子を付加することで水和による構造変化を明確に解明することを着想した。決定した構造からバリノマイシンとアルカリ金属イオンの錯体 (M^+VM) に水が与える影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

エレクトロスプレーイオン化法を用いてバリノマイシンとアルカリ金属イオンの複合体 (M^+VM) を真空中に導入し、四重極質量分析器 (QMS) で質量選別したのち、極低温冷却イオントラップ (QIT) で 10 K まで冷却する(図3)。ここに波長可変赤外 (IR) レーザーを照射し、光吸収によって生じた解離物を後段の飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) で検出する。解離物のイオン量を波長掃引しながらモニターすることで M^+VM の赤外スペクトルを測定した。

つづいて、 M^+VM に水分子が付加した水和クラスターの赤外スペクトルの測定を行った。QMS で質量選別した

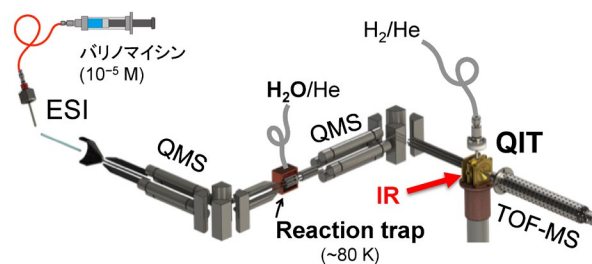


図3. 実験装置. ESI: エレクトロスプレーイオン化源、QMS: 四重極質量分析器、QIT: 四重極イオントラップ、TOF-MS: 飛行時間型質量分析器。

M⁺VM を 80 K に冷却した反応トラップに導入した。反応トラップに水を導入することで、複合体 M⁺VM に水を付加させ、水和クラスター (M⁺VM(H₂O)₁) を生成した。後段の QMS で特定のサイズの水和クラスターのみを選別し、QIT に導入した。IR 照射により生じる解離物を TOF-MS で検出することで赤外スペクトルを測定した。

4. 研究成果

図 4 にバリノマイシン-アルカリ金属錯体(M⁺VM)の赤外スペクトルと計算で得られた最適化構造・赤外スペクトルを示す。3200–3400 cm⁻¹ 付近に現れるバンドは N-H 伸縮振動 (アミド A)、2900–3100 cm⁻¹ のバンドは C-H 伸縮振動と帰属した。バリノマイシンには 6 つの N-H が存在するが、Li⁺錯体を除く Na⁺~Cs⁺錯体で、アミド A 領域にバンドが一本のみ観測された。これは Na⁺~Cs⁺錯体が対称性の高いコンフォメーションを有しているためだと推測される。また、N-H 伸縮振動のバンドはイオン半径が大きくなるにつれ、高波数シフトすることがわかった。これは、NH…O の水素結合距離の伸長、すなわち、バリノマイシンの環が

拡がることを示唆している。これを確かめるために量子化学計算を行った。その結果、これらの錯体において、金属イオンがバリノマイシンのキャビティの中心に位置する対称性の高い Bracelet 構造が最安定であることが分かった。このコンフォマーの赤外スペクトルは実測のスペクトルと良い一致を示したことから、Bracelet 構造が気相中で安定に存在すると結論した。一方、Li⁺錯体では、N-H 伸縮振動のバンドが複数本に分裂している。これは、分子構造の対称性が崩れたためだと考えられる。この解釈は量子化学計算の結果とも整合している。

バリノマイシンのアルカリ金属錯体に対する親和性は Li⁺ (<0.7), Na⁺(0.67) << Cs⁺(4.4), K⁺(4.90), Rb⁺(5.26) (in MeOH, 25°C, ()内の数字は結合定数の対数を表す)である。Li⁺のバリノマイシンに対する親和性の低さは、Li⁺がバリノマイシンに結合すると Bracelet 構造が崩れ、対称性が低下することに起因するものと考えられる。また、K⁺, Rb⁺, Cs⁺の高い親和性はイオンと結合しても対称性の高い Bracelet 構造が保持されることにあるといえる。イオンサイズが変わっても Bracelet 構造が保持されるのは、非共有結合的な水素結合に由来する構造柔軟性があるためだと解釈される。一方、Na⁺はバリノマイシンに対する親和性が低いにもかかわらず、バリノマイシンと対称性の高い Bracelet 構造を形成する。

そこで、バリノマイシン-Na⁺錯体に水分子を付加し、水和効果を検証することにした。バリノマイシン-Na⁺錯体に水分子が一つ付加した水和クラスター (Na⁺VM(H₂O)) の赤外スペクトルを測定した (図 5)。得られた赤外スペクトルでは N-H 伸縮振動のバンドが複数本に分裂していた。これは水分子の付加により錯体の対称性が低下したことを強く示唆している。量子化学計算の結果から、水分子がバリノマイシンのケージに入り込み、Na⁺

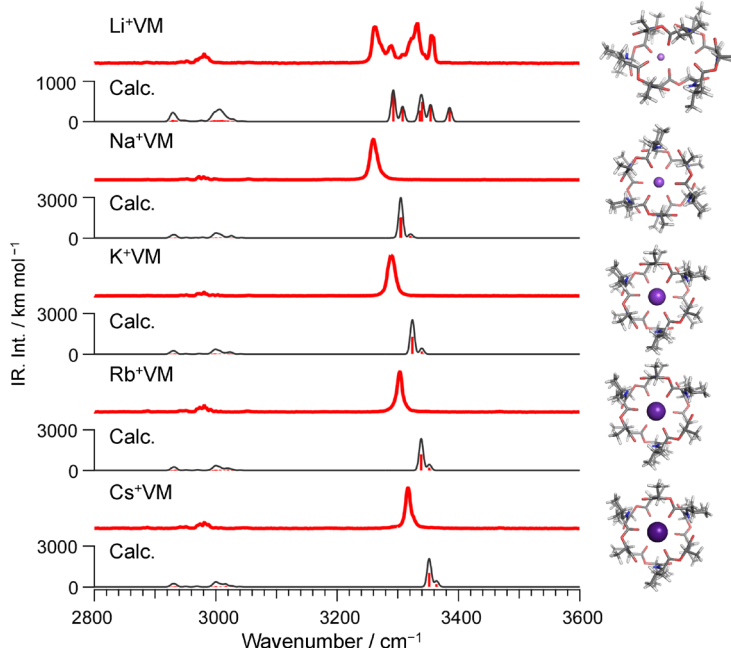


図 4. バリノマイシン-アルカリ金属錯体の赤外スペクトル。

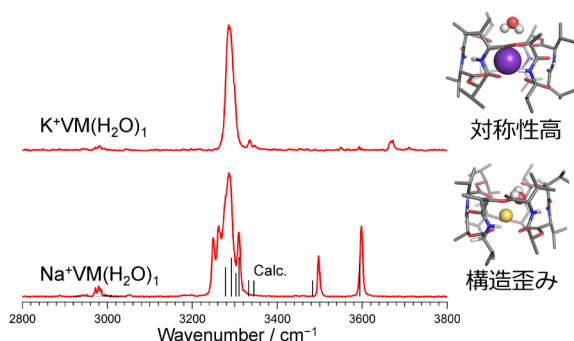


図 5. バリノマイシン-アルカリ金属水 1 クラスターの赤外スペクトル。



図 6 Supplementary Cover.

と直接結合することで対称性が低下していることがわかった。バリノマイシン-K⁺錯体についても同様に水分子を付加し、赤外スペクトルを測定した (図 5)。K⁺VM(H₂O)では、水分子を付加しても N-H 伸縮振動バンドは一本のままであり、対称性が保たれていることが示唆された。量子化学計算との比較から、水分子がバリノマイシンのケージ外にとどまり、バリノマイシンのカルボニル酸素と水素結合を形成していることが分かった。以上より、Na⁺はバリノマイシンに対する低い親和性は錯体が溶媒和されることにより構造歪みが生じるためだと結論された。さらに解析を進めると、K⁺VM(H₂O)で見られた構造は、水が付加していない K⁺VM 錯体と比較してもよりコンパクトな構造をしていることが明らかになった。これは水分子が一つ付加することでバリノマイシンがよりコンパクトになり、脂質膜中での透過性が向上することを示唆している。この成果は *The Journal of Physical Chemistry Letters* 誌に掲載され、Supplementary Cover に選出されている (図 6) [Sato, E. *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **2021**, *12*, 1754.]。

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 9件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Eiko, Hirata Keisuke, Lisy James M., Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Rethinking Ion Transport by Ionophores: Experimental and Computational Investigation of Single Water Hydration in Valinomycin-K ⁺ Complexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1754 ~ 1758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcclett.0c03372	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 Hirata Keisuke, Mori Yuta, Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki, Zehnacker Anne	4. 巻 22
2. 論文標題 Chiral discrimination between tyrosine and α -cyclodextrin revealed by cryogenic ion trap infrared spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 24887 ~ 24894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP02968H	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 Otsuka Remina, Hirata Keisuke, Sasaki Yuta, Lisy James M., Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Alkali and Alkaline Earth Metal Ions Complexes with a Partial Peptide of the Selectivity Filter in K ⁺ Channels Studied by a Cold Ion Trap Infrared Spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 712 ~ 724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cphc.202000033	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 Dezalay Jordan, Broquier Michel, Soorkia Satchin, Hirata Keisuke, Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki, Gregoire Gilles	4. 巻 22
2. 論文標題 Excited-state proton transfer in protonated adrenaline revealed by cryogenic UV photodissociation spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 11498 ~ 11507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP01127D	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 Negoro Takumi, Hirata Keisuke, Lisy James M., Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Potassium and sodium ion complexes with a partial peptide of the selectivity filter in K ⁺ channels studied by cold ion trap infrared spectroscopy: the effect of hydration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 12045 ~ 12050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CP00936B	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 Suzuki Yukina, Hirata Keisuke, Lisy James M., Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 125
2. 論文標題 Double Ion Trap Laser Spectroscopy of Alkali Metal Ion Complexes with a Partial Peptide of the Selectivity Filter in K ⁺ Channels Temperature Effect and Barrier for Conformational Conversions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 9609 ~ 9618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.1c06440	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 Hirata Keisuke, Kasai Ken-ichi, Gregoire Gilles, Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 155
2. 論文標題 Hydration-controlled excited-state relaxation in protonated dopamine studied by cryogenic ion spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 151101 ~ 151101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0066919	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 Takeda Naoya, Hirata Keisuke, Tsuruta Kazuya, Santis Garrett D., Xantheas Sotiris S., Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Gas phase protonated nicotine is a mixture of pyridine- and pyrrolidine-protonated conformers: implications for its native structure in the nicotinic acetylcholine receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 5786 ~ 5793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CP05175J	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 Hirata Keisuke, Haddad Fuad, Dopfer Otto, Ishiuchi Shun-ichi, Fujii Masaaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Collision-assisted stripping for determination of microsolvation-dependent protonation sites in hydrated clusters by cryogenic ion trap infrared spectroscopy: the case of benzocaineH ⁺ (H ₂) ₀	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 5774 ~ 5779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CP05762F	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

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Keisuke Hirata
2. 発表標題 Cryogenic Ion Spectroscopy of Valinomycin-Metal Complexes: Effect of Water on Potassium Selectivity
3. 学会等名 Gordon Research Conferences: Molecular and Ionic Clusters 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤映虹
2. 発表標題 冷却イオントラップ法によるバリノマイシノーアルカリ金属イオン水和クラスターの赤外分光
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kien Vo, Keisuke Hirata, James M. Lisy, Shun-ichi Ishiuchi, Masaaki Fujii
2. 発表標題 Cold ion trap infrared spectroscopy of Beauvericin metal complexes - Ionic radius dependence of conformations
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Keisuke Hirata, Eiko Sato, Shun-ichi Ishiuchi, Masaaki Fujii
2. 発表標題 Vibrational spectroscopy of hydrated clusters of valinomycin-metal complexes: Watching single water hydration
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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

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