

博士論文

FM0 法を用いたリガンド-タンパク質間の相互作用解析とそのドラッグデザイン分子への応用

FM0 analysis of the ligand-protein interaction and its application to the drug designed molecules

横浜国立大学大学院

工学府

小澤基裕

Motoyasu Ozawa

2017 年 6 月

目次

第1章 緒言.....	1
第2章 計算手法についての概説	2
2-1 CH/II 相互作用解析について	2
2-2 FMO 計算について	3
2-3 PIEDA 解析について.....	4
2-4 SZMAP 解析について.....	4
2-5 計算座標について	5
引用文献.....	5
第3章 STREPTAVIDIN-BIOTIN の相互作用解析	7
3-1 序論	7
3-2 ストレプトアビジン-ビオチン複合体の立体構造について	9
3-3 ストレプトアビジン-ビオチン複合体の CH/II相互作用解析.....	10
3-4 TRP 変異タンパク質での CH/II相互作用解析.....	12
3-5 ビオチン結合サイトの FMO 計算結果.....	13
3-6 TRP 変異たんぱく質の FMO 計算結果	15
3-7 ユニット間の相互作用に関する FMO 計算結果	16
3-8 CH/II相互作用ネットワークについて.....	18
3-9 結論	20
引用文献.....	23
第4章 プロモドメイン阻害剤のリガンド-タンパク質相互作用解析.....	25
4-1 序論	25
4-2 分子量と活性値について	26
4-3 HTS と FBDD について	27
4-4 プロモドメインについて	28

4-5 アセチル化リジンペプチド(EAC-LYS)のFMO計算	29
4-6 フラグメント最適化プロセスの分析.....	32
4-6-1 化合物2に関するFMO計算.....	32
4-6-2 化合物4に関するFMO計算.....	34
4-6-3 化合物6に関するFMO計算.....	36
4-6-4 IC ₅₀ とIFIEの相関	38
4-6-5 電荷のIFIEに対する寄与.....	38
4-6-6 フラグメントヒット化合物からリード化合物へのIFIEの変化.....	39
4-6-7 化合物6のPIEDA解析.....	40
4-6-8 PIEDA解析によるFBDDプロセスの追跡	40
4-7 別母核の化合物に対する解析.....	41
4-8 CH/II相互作用の比較	43
4-9 水分子の関与	44
4-10 結論	45
4-11 引用文献	55
第5章 総括.....	57
謝辞.....	59

第1章 緒言

医薬品は標的タンパク質に結合する事によりその薬効を発現する。低分子医薬品開発においては、リード化合物（薬物候補化合物）の発見から始まり、化学構造最適化を経て医薬品へと仕上げられる。一般的には低分子医薬品開発において、平均約3万程度の有機合成化合物の検討が必要といわれている。リード化合物の発見やその化学構造最適化の方法は種々あるが、X線結晶構造解析などによって立体構造が明らかとなったターゲット蛋白質においては、化合物合成と並行して、計算化学を用いた Structure based drug design (SBDD) 手法を用いた薬物候補化合物のデザインが可能になってきている。

構造に基づく SBDD における医薬分子設計は、ターゲットとなる生体高分子との結合親和性が強いリード化合物（リガンド）を探すことである。これは、生体高分子とリガンドとの分子認識を探求する課題であり、分子認識においては分子間相互作用の詳細を知ることが重要であると考えられる。SBDD におけるバーチャルスクリーニングやドッキングスタディなどは、計算コストとの兼ね合いから、リガンド-タンパク質の分子間相互作用の計算に分子力場（MM: Molecular Mechanics）が多く用いられている。分子力場は、それを基盤とした分子動力学計算において高分子の時間依存的な動的解析を可能とし、多くの有益な情報が得られる手法として多用されてきているが、一方で、分子間相互作用という観点で結合親和性の精度向上のためには、分子力場では不十分なケースもあり、高分子計算への量子論的計算の適応が必要である。

計算化学は、近年、その実用性が著しく向上し、量子化学計算を用いた構造や物性の研究が大きな注目を集めている。なかでも、FMO法 (Fragment molecular orbital method) は、従来は比較的low分子に適応されていた分子軌道計算を、タンパク質という巨大な分子系に対して適応可能としたものであり、薬物候補化合物とターゲットタンパク質との相互作用の解析に有用な手法となっている。また、近年、CH/ π 相互作用という概念による弱い相互作用がリガンド-タンパク質間の相互作用に関与しているとの報告が多数なされている。CH/ π 相互作用は、従来の水素結合相互作用とは異なり、主にCHと π 電子との分散力による相互作用であると報告されている。しかしながら、CH/ π 相互作用を定量的に議論している報告は少なく、またCH/ π 相互作用の役割を意識したドラッグデザインの報告も少ない。

本論文は、ドラッグデザインにおける主要なリガンド-タンパク質の分子間相互作用に関する知見を得ることを目的として、streptavidin-biotin およびプロモドメイン-阻害剤の2つの系において、計算化学を用いた分子間相互作用の検討結果を述べたものである。

第2章 計算手法についての概説

2-1 CH/ π 相互作用解析について

CH/ π 相互作用¹は、従来の水素結合とは異なり、主にCHと π 電子との分散力による相互作用である。HSBA則で定義される柔らかい酸としてのCHとHSBA則で定義される柔らかい塩基である π 電子系との間の分子間引力であり、具体的には芳香族や脂肪族のCHがプロトンドナーとして関与し、芳香環などの π 電子系がプロトンアクセプターとして関与する²(図1.1)。その強さはおよそ-1.5~-2.5 kcal/molと報告されている^{3,4,5}。

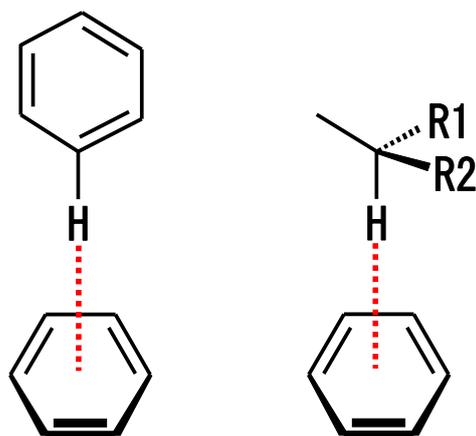


図 1.1 CH/ π 相互作用の模式図

梅澤・西尾ら⁶によって提唱されているCH/ π 相互作用の検出方法を図1.2に示す。 D_{ATM} はプロトンドナーの水素原子とプロトンアクセプターの原子との距離を示し、平均的には炭素と水素のファンデルワールス半径の合計である2.9Å付近の値になる。 D_{PLN} はプロトンドナーの水素原子とプロトンアクセプターの π 平面との垂線の距離を示す。

CH/ π 相互作用を検出する上記方法論はプログラム化され、CHPIプログラムとしてFMO計算支援ソフトウェアBioStation Viewr(ver12.0)⁷に実装されている。

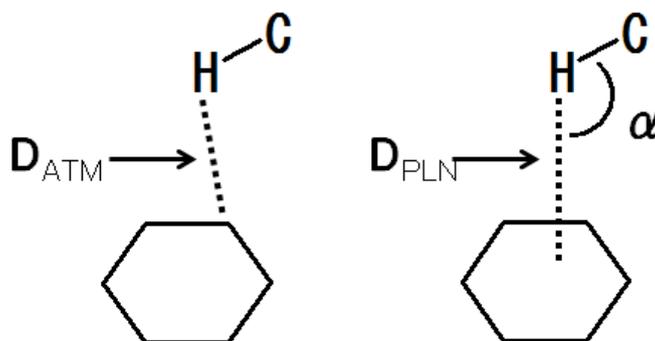


図 1.2 CH/ π 相互作用の検出

2-2 FMO 計算について

FMO (フラグメント分子軌道) 法は、タンパク質構造やポリマー構造などの巨大な分子系を、数十原子程度の小さな N 個のフラグメントに分割し、フラグメント (モノマー) とフラグメントペア (ダイマー) について、通常の *ab initio* MO 法とほぼ同様の計算を行うことで、分子の全エネルギーやフラグメント間の相互作用などのプロパティを計算する方法である^{8,9,10,11}。

本研究の FMO 計算においては、基本的には図 1.3 に示すように、タンパク質をアミノ酸ごとのフラグメントに分割して実施した。

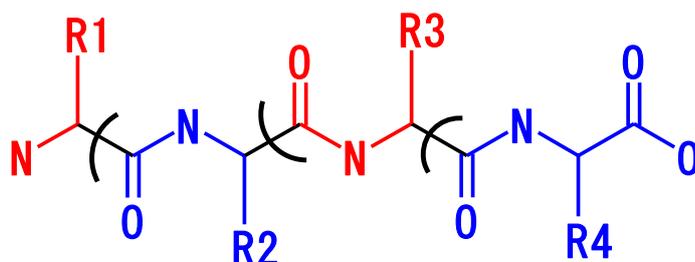


図 1.3 フラグメント化の模式図

FMO 計算の流れは、まずモノマーの初期電子密度を計算し、その電子密度を用いて周辺 ($M-1$) モノマー (V_I) による静電ポテンシャル環境下で、各モノマーの状態を全モノマーが self-consistent になるまで繰り返し計算する。次に、収束したモノマーの電子密度を用いて、周囲 ($M-2$) のモノマー (V_{IJ}) からの静電ポテンシャル中でダイマーのエネルギーと電子密度を計算する。最後に全エネルギーおよび全電子密度を計算する (式 1)。また、フラグメント間の相互作用 (IFIE: Inter Fragment Interaction Energy) は式 2 で計算される。

$$E = \sum_{I>J}^M E_{IJ} - (M-2) \sum_I^M E_I \quad (1)$$

$$\Delta E_{IJ} = (E'_{IJ} - E'_I - E'_J) + Tr(\Delta P_{IJ} V_{IJ}) \quad (2)$$

式 2 で、第 1 項はフラグメント I と J の直接相互作用エネルギーを示し、第 2 項はモノマー間で電荷移動などにより変化した電子分布が環境静電ポテンシャルで安定化または不安定化されるエネルギーを示している。

本研究では基本的に上記に記したダイマー計算による IFIE 値を解析に用いた。

第3章の一部のFMO計算では、側鎖のみの相互作用を見るために、図1.4に示す主鎖/側鎖分割でのFMO計算を実施した。主鎖/側鎖分割では、フラグメントの原子数が少なくなり計算誤差が大きくなるため、式3および式4による4体項の多体補正を加えた^{12,13}。この4体項の多体補正を加えたFMO計算を“FMO4”と称する。

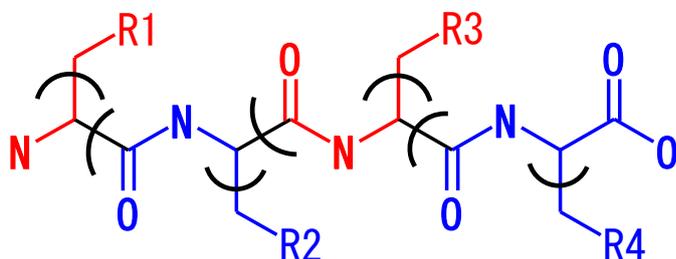


図 1.4 主鎖/側鎖分割でのフラグメント化の模式図

$$E_{Total}^{FMO4} = \sum_I E'_I + \sum_{I>J} \Delta E_{IJ} + \sum_{I>J>K} \Delta E_{IJK} + \sum_{I>J>K>L} \Delta E_{IJKL} \quad (3)$$

$$\Delta E_{IJ}^{FMO4} = \Delta E_{IJ} + \frac{1}{3} \sum_K \Delta E_{IJK} + \frac{1}{6} \sum_{KL} \Delta E_{IJKL} \quad (4)$$

FMO計算とその解析は、ABINIT-MPver6, 20130314⁷ およびBiostationViewr(ver12.0)⁷を使用した。またFMO計算の基底関数は、MP2/6-31G*を用いた。

2-3 PIEDA 解析について

北浦・諸熊ら¹⁴によって開発されたエネルギー分割法がFMO法にも適用されペアー相互作用エネルギー分割法(PIEDA)として利用できる^{15,16}。PIEDAでは相互作用エネルギーを静電力(ΔE^{ES})、交換反発力(ΔE^{EX})、電荷移動力(ΔE^{CT})、分散力(ΔE^{D1})に分割し分子間力の詳細な解析を可能としている。PIEDA解析のFMO計算は、MP2/6-31G*で実施した。

2-4 SZMAP 解析について

第4章で議論する水分子の安定性については、OpenEye社のSZMAPツール¹⁷を使用した。

2-5 計算座標について

計算座標には、Protein Data Bank (PDB)^{18,19}に登録されているリガンド-タンパク質複合体構造を用いた。

構造モデリングは次のように実施した。まず、PDB から取得した立体構造に対して、Discovery Studio (BIOVIA San Diego, CA, USA)²⁰で水素原子を付与した。リジン側鎖とアルギニン側鎖はプロトネーション状態に、アスパラギン酸側鎖とグルタミン酸側鎖は非プロトネーション状態とした。次に、Discovery Studio の CHARMM 力場で構造最適化を行った。その際、水素以外の原子には $10\text{kcal/mol}\text{\AA}^2$ の拘束をかけ、誘電率 4R の環境下で実施した。構造最適化後の座標を FMO 計算で使用した。また、CH/ π 相互作用解析には、PDB 座標に水素原子を付与した状態のものを使用した。

引用文献

- ¹ M. Nishio, M. Hirota, Y. Umezawa, *The CH/ π Interaction. Evidence, Nature, and Consequences*, Wiley-VCH, New York, (1998).
- ² S. Sakaki, K. Kato, T. Miyazaki, Y. Musashi, K. Ohkubo, H. Ihara, C. Hirayama, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89 (1993) 659-664; S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 3746-3753; S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 104-112.
- ³ For comparison with other weak hydrogen bonds, see: Nishio, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2011, 13, DOI:10.1039/C1CP20404A, Table 2.
- ⁴ S. Tsuzuki, T. Uchimaru, *Curr. Org. Chem.* 10 (2006) 745-762.
- ⁵ M. Nishio, *Cryst. Eng. Commun.* 6 (2004) 130-158.
- ⁶ Y. Umezawa, S. Tsuboyama, K. Honda, J. Uzawa, M. Nishio, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 71 (1998) 1207-1213.
- ⁷ http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/riss/dl/download/index.php#download_2
- ⁸ K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayashi, *Chem. Phys. Lett.* 312 (1999) 319-324.
- ⁹ T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayashi, K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.* 318 (2000) 614-618.
- ¹⁰ D. G. Fedorov, K. Kitaura, *The Fragment Molecular Orbital Method Practical Application to Large Molecular Systems*; CRC Press: New York, (2009).
- ¹¹ D. G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 7562-7577.
- ¹² T. Nakano, Y. Motizuki, K. Yamashita, C. Watanabe, K. Fukuzawa, K. Segawa, Y. Okiyama, T. Tsukamoto, S. Tanaka, *Chemical Physics Letters* 523 (2012) 128-133.
- ¹³ C. Watanabe, K. Fukuzawa, Y. Okiyama, T. Tsukamoto, A. Kato, S. Tanaka, Y. Mochizuki, T. Nakano, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 41 (2013) 31-42.
- ¹⁴ K. Kitaura, K. Morokuma, *J. Quantum. Chem.* 10 (1976) 325.
- ¹⁵ S. Tanaka, Y. Mochizuki, Y. Komeiji, Y. Okiyama, K. Fukuzawa, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 10310-10344.

¹⁶ T. Tsukamoto, K. Kato, A. Kato, T. Nakano, Y. Mochizuki, K. Fukuzawa, J. Comp. Chem., Japan 14 (2015) 1-9.

¹⁷ <http://www.eyesopen.com/szmap>

¹⁸ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

¹⁹ <https://pdbj.org/>

20

<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>

第3章 Streptavidin-biotinの相互作用解析

3-1 序論

ビオチンはビタミンB群に属する水溶性ビタミンの一種であり、ブドウ糖のリサイクル、脂肪酸の合成、アミノ酸の代謝に関わるカルボキシラーゼの補酵素としてなど、生体内で多岐に渡って機能する物質である。また、ストレプトアビジンはストレプトマイセスの一種 *Streptomyces avidinii* によって作られるタンパク質であり、分子量 53,000 ダルトンの4量体を形成し、各モノマーがビオチン1分子を結合する。ビオチンの結合能は非常に強く、その結合の解離定数(Kd)は約 10^{-15} mol/L で、図 3.1 で示されている通り、非共有結合の中では最も強い部類に属する¹。

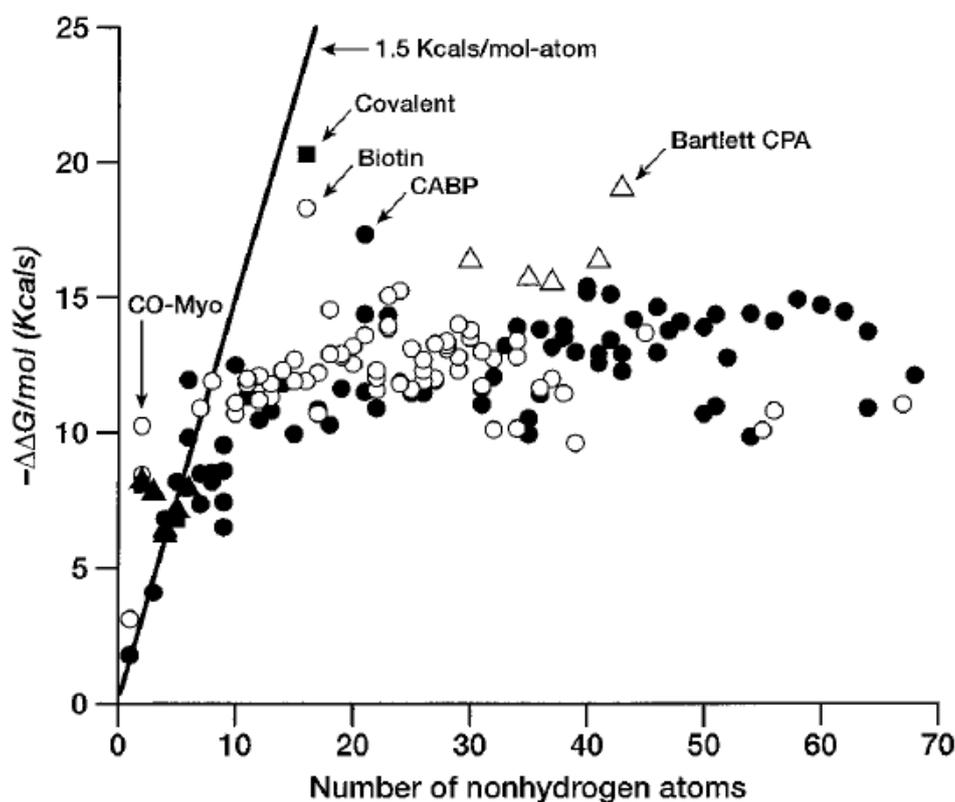


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle , small anions; \circ , natural ligands; \bullet , enzyme inhibitors.

図 3.1 リガンドの原子数と結合自由エネルギーの関係図
(Proc. Ntl. Acad. Sci の論文¹から引用添付)

ストレプトアビジン-ビオチン複合体は、1989年にWeber²やHendrickson³らによってX線結晶構造解析でその立体構造が明らかとなり、以降多数のX線結晶構造解析座標が報告されている。結晶構造解析によるビオチンの結合に関しては主に水素結合について論じられており、ストレプトアビジンとビオチンの疎水的な相互作用に関する詳細な議論はなされていない。また、宮本・Kollman⁴らは、ストレプトアビジン-ビオチンの分子動力学 (Molecular dynamics) 計算から結合には -15 kcal/mol の分散力が寄与しており、また、ビオチンはその結合サイトにおいて多くの非極性アミノ酸とファンデルワールス接触していることで、強い結合能を有していると報告している。このように、ストレプトアビジン-ビオチンの強固な結合力に関する研究事例はいくつか報告されているが、水素結合やファンデルワールス接触、疎水結合 (hydrophobic interaction) といった概念で議論されていることが多い。

ストレプトアビジン-ビオチン 4 量体において、ビオチンの結合サイト近傍には4つのトリプトファン (Trp79, Trp92, Trp108, Trp129) が存在している。Chilkoti らは、熱力学解析⁵やアミノ酸変異によるタンパク質解析⁶から、トリプトファンの芳香環の相互作用がストレプトアビジン-ビオチン間のギブスエネルギー生成に関係していることを示している。各トリプトファンをフェニルアラニンに変えることで、ストレプトアビジン-ビオチンの安定性が低下するという実験結果を示しているが、その安定性低下の理由についてはまだ十分に議論されているとは言えない。

CH/ π 相互作用⁷は、従来の水素結合とは異なり、主にCHと π 電子との分散力による相互作用であり、HSBA則による柔らかい酸としてのCHと柔らかい塩基である π 電子系との間の分子間引力であり、具体的には芳香族や脂肪族のCHがプロトドナーとして関与し、芳香環などの π 電子系がプロトンアクセプターとして関与するもので⁸、その強さはおよそ-1.5~-2.5 kcal/mol と報告されている⁹。1つの相互作用は弱いものであるが、複数個のCH/ π 相互作用が協働することで分子間の相互作用として十分な大きさを獲得することから、リガンド-タンパク質間の相互作用においてCH/ π 相互作用の役割が重要であるとの報告例が増えつつある^{10,11,12,13,14,15,16}。低分子医薬品開発におけるSBDD (Structure based drug discovery) でのリガンド-タンパク質間の相互作用の理解は重要であり、CH/ π 相互作用を考慮した報告例が増えつつある^{17,18}。

以上のように、これまでのストレプトアビジン-ビオチンにおいては、水素結合や疎水相互作用といった概念での研究が進められてきたが、CH/ π 相互作用や分子軌道計算による相互作用解析の例はない。本研究では、ストレプトアビジン-ビオチンの相互作用特性と4量体の構造特性について、分子軌道計算を取り入れたCH/ π 相互作用の観点で明らかにすることを目的として、複合体構造に対してCH/ π 相互作用解析およびFMO (fragment molecular orbital) 計算を実施した。主に得られた知見は以下のことである。

1. CH/ π 相互作用解析で計測された CH/ π 相互作用を FMO 計算によるエネルギー値で表現することにより、CH/ π 相互作用の理解がより深くなる。
2. 結合サイトでビオチンは7つの親水性アミノ酸および3つの疎水性アミノ酸と相互作用しており、相互作用の内訳は静電力：分散力=5：1である。
3. 4量体のうち、ビオチンが関与している鎖と鎖の間の相互作用の内訳は静電力：分散力=3：2である。
4. ビオチンが関与している鎖と鎖の間の相互作用には CH/ π ネットワークがあり、単体および鎖と鎖の間の結合に CH/ π 相互作用が深く関与している。

3-2 ストレプトアビジン-ビオチン複合体の立体構造について

ストレプトアビジン-ビオチンは4量体で機能することが知られており、4量体でのX線結晶構造解析座標が多数報告されている。Staytonら¹⁹や佐野ら²⁰は、ストレプトアビジン-ビオチン4量体において、ビオチン結合サイトが鎖と鎖の間に位置していて、鎖間の相互作用に Trp120 が関与していることを報告している。本研究に用いた pdb1swe の立体構造を図 3.2 に示す。

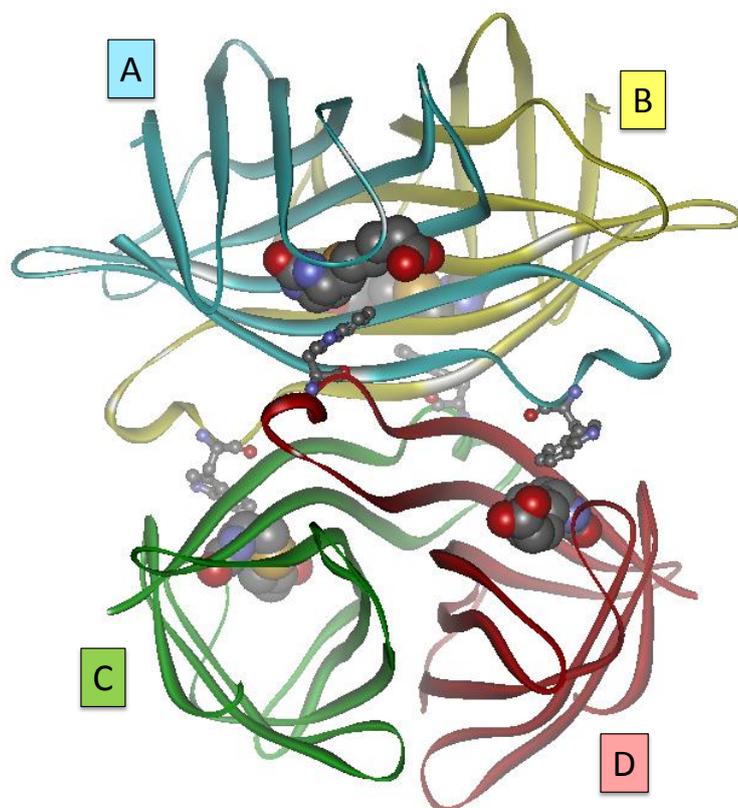


図 3.2 ストレプトアビジン-ビオチン4量体の立体構造
A鎖：Cyan, B鎖：Yellow, C鎖：Green, D鎖：Red

X線結晶構造解析による立体構造で確認してみると、ビオチン結合サイトを、隣接の Trp120 がフタをしているような形状であるため、ビオチンは、A-D 鎖間および B-C 鎖間で隣接鎖の Trp120 と相互作用している、すなわち鎖と鎖の間の相互作用に参与していることが推測できる。

本研究はリガンド-タンパク質間の相互作用解析が目的の1つであるため、ビオチンが相互作用に参与している A-D 鎖に着目して検討を進めた。また、A 鎖や D 鎖といった単鎖をユニットと呼ぶこととする。

3-3 ストレプトアビジーン-ビオチン複合体の CH/ π 相互作用解析

1swe の座標を用い、A 鎖および D 鎖について CHPI プログラムによる CH/ π 相互作用を CHPI プログラムで計測した。全 CH/ π 相互作用については、章末の表 3-S に示す。ユニット (A や D) 中には、16 個の芳香族アミノ酸が含まれているが、そのうち 6 個のトリプトファン (Trp21, Trp75, Trp79, Trp92, Trp108, Trp120)、5 個のチロシン (Tyr22, Tyr43, Tyr54, Tyr60, Tyr96)、2 個のフェニルアラニン (Phe29, Phe130) において CH/ π 相互作用が計測された。

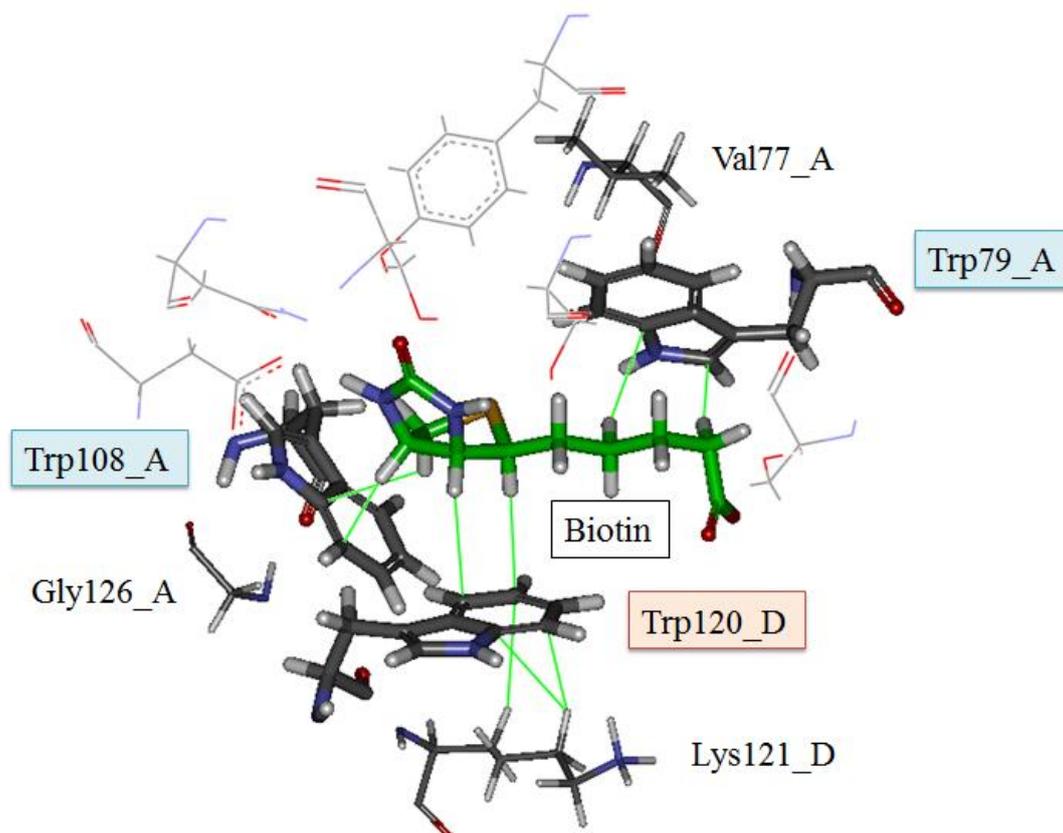


図 3.3 結合サイトにおけるビオチンと周辺アミノ酸の CH/ π 相互作用

ビオチン結合サイトでは、Trp79, Trp108 と隣接鎖の Trp120 の計 3 アミノ酸がビオチンと CH/ π 相互作用をしており (図 3.3)、Trp92 はビオチンと CH/ π 相互作用はしていないことが示された。

トリプトファンに着目すると、Trp120 は Lys121 と CH/ π 相互作用をしており、ビオチン-Trp120-Lys121 といった CH/ π ネットワークが形成されていることが示された (図 3.3)。また、CH/ π 相互作用は、疎水性アミノ酸間のみではなく、親水性アミノ酸の側鎖 CH と疎水性アミノ酸の芳香環との間でも計測され、表 3.1 に示す通り、Asn23、Ser62、Asn81、Thr90、Lys121、Lys132 にも CH/ π 相互作用が存在することが示された。

表 3.1 親水性アミノ酸の CH/ π 相互作用

π -Residue	π -Atom	Donor-Residue	CH	D_{ATM}	D_{PLN}
Trp21	C ζ 3	Lys132	CH γ 1	2.61	2.56
Trp21	C ϵ 2	Lys132	CH ϵ 2	2.43	2.42
Trp120	C ζ 3	Lys121	CH β 2	2.74	2.58
Trp120	C ζ 2	Lys121	CH ϵ 1	2.89	2.39
Tyr54	C δ 2	Asn81	CH β 2	3.01	2.81
Tyr60	C ϵ 2	Ser62	CH β 2	2.88	2.64
Trp92	C ζ 2	Thr90	CH γ 2	3.03	2.98
Trp92	C ϵ 3	Thr90	CH γ 2	2.95	2.91
Phe130	C ϵ 2	Asn23	CH β 2	2.51	2.43
Phe130	C ζ	Asn23	NH δ 2	2.83	2.47

以上の結果から、ストレプトアビジン-ビオチン複合体には多くの CH/ π 相互作用が存在し、立体構造の維持に関与していることが推察された。

3-4 Trp 変異タンパク質での CH/ π 相互作用解析

ビオチンと相互作用している3つのトリプトファンについて、変異体タンパク質でのビオチン結合能は、天然型, W108F 変異体, W79F 変異体, W120F 変異体の順に減少することが Chilkoti ら⁵によって報告されている。そこで、W79F、W108F、W120F の変異体タンパク質の立体構造²¹を用いて CH/ π 相互作用を計測し、天然型のタンパク構造との比較を行った。3つのトリプトファンとビオチンとの CHPI プログラムによる計測結果を表 3.2 に示す。

W108F 体と W120F 体では、ビオチンとの CH/ π 相互作用が減数していることが示された。また W79F では総じて CH/ π 結合長が wild-type よりもやや長いことが示された。これらの結果は、Chilkoti らの熱力学的な実験結果とはきれいに相関するものではないものの、CH/ π 相互作用の減少が結合能の低下に関係していることを示唆していると考えられる。

表 3.2 天然型および Trp 変異体におけるビオチンと周辺トリプトファンとの CH/ π 相互作用

mutant protein (PDB ID)	天然型 (1SWE)	W79F 変異体 (1SWK)	W108F 変異体 (1SWN)	W120F 変異体 (1SWP)
	CH/ π close contacts to biotin (Å)			
Trp(or Phe)79	2.63, 2.85	2.77, 2.61	2.92, 2.97	2.53, 2.31
Trp(or Phe)108	2.87, 2.94	2.93, 3.00	2.94	3.00
Trp(or Phe)120_D	2.87, 2.94	2.82, 3.00		3.01

以上のように、ストレプトアビジン-ビオチン複合体の CHPI プログラムによる CH/ π 相互作用解析から、ビオチンの結合やユニット間の相互作用に CH/ π 相互作用の存在と関与が示唆されたことから、相互作用の特性をより深く調べるために、FMO (fragment molecular orbital) 法による相互作用エネルギー解析を実施した。

3-5 ビオチン結合サイトの FMO 計算結果

ビオチンの結合特性を調べるために、最初に天然型構造 (pdb1swe) の A-D 鎖ダイマー構造で FMO 計算を実施した。ビオチンと周辺アミノ酸との IFIE (inter fragment interaction energy) および PIEDA (pair interaction energy decomposition analysis) を表 3.3 に示す。

表 3.3 天然型でのビオチン結合サイトの FMO 結果

Chain	Residue	IFIE (kcal/mol)	PIEDA (kcal/mol)			
			ES ^a	EX ^b	CT ^c	DI ^d
A	Asn23	-7.9	-8.4	4.6	-1.9	-2.3
A	Ser27	-12.6	-14.5	7.9	-3.1	-2.8
A	Tyr43	-16.4	-16.3	8.1	-4.0	-4.1
A	Asn49	-8.6	-9.8	6.7	-1.5	-4.1
A	Ser45	-4.6	-3.4	4.5	-2.0	-3.7
A	Trp79	-10.4	-5.5	7.5	-2.7	-9.8
A	Ser88	-3.9	-5.9	6.1	-1.9	-2.1
A	Trp108	-6.5	-2.5	2.8	-1.4	-5.4
A	Asp128	-25.7	-23.8	5.6	-3.7	-3.8
D	Trp120	-5.5	-1.8	2.7	-1.3	-5.1

^a 静電力 (ΔE^{ES}) ^b 交換反発力 (ΔE^{EX}) ^c 電荷移動力 (ΔE^{CT}) ^d 分散力 (ΔE^{DI})

ビオチン結合サイトでは、ビオチン近傍に Asn23, Ser27, Tyr43, Ser45, Asn49, Trp79, Ser88, Trp108, Asp128, D_Trp120 の 10 個のアミノ酸が存在する (図 3.4)。Trp120_D は隣接ユニットのアミノ酸である。ビオチン周辺の 10 個のアミノ酸について、FMO 計算による総 IFIE 値は-102 kcal/mol であった。また、PIEDA の総 DI 値は-43kcal/mol であった。これは、全相互作用の約 40%が分散力によるものであるという結果である。

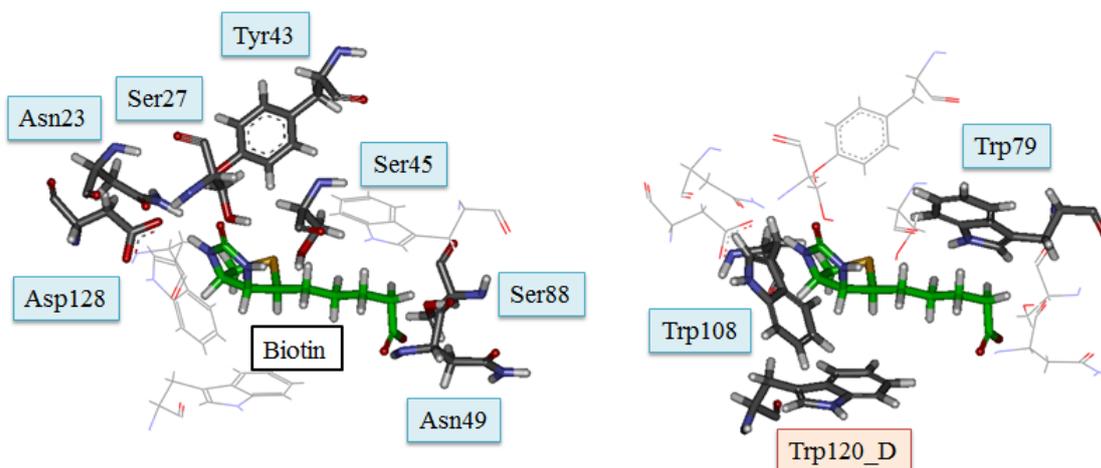


図 3.4 ビオチン周辺のアミノ酸 (左図：親水性アミノ酸, 右図：疎水性アミノ酸)

相互作用をアミノ酸の性質別に見てみると、ビオチンと水素結合を形成している Asn23, Ser27, Tyr43, Ser45, Asn49, Ser88, Asp128 の7つの親水性アミノ酸 (図 3.4 の左図) の IFIE は -80 kcal/mol であった。PIEDA から静電項 (ES) の寄与が大きいことが示され、これは水素結合を支持する結果である。一般的に水素結合は $-5\sim-10$ kcal/mol といわれており、ビオチンは水素結合によってストレプトアビジンと強固に結合していることが分かる。一方、疎水性アミノ酸 (図 3.4 の右図) である3つのトリプトファンとの IFIE の和は -22 kcal/mol であり、PIEDA による DI 値の和は -20 kcal/mol であることから、これらトリプトファンとビオチンとの相互作用の主体は分散力であり、3-3 項で述べた CH/ π 相互作用をエネルギー計算値で表現したことになる。これらの結果から、ストレプトアビジン-ビオチンの相互作用は、総分散力の約半分、全相互作用の約 20% が、3つのトリプトファンによる CH/ π 相互作用であることが明らかとなった。

以上の結果は、水素結合による強固なビオチン固定に加えて、CH/ π 相互作用が約 20% 加わることで、ストレプトアビジン-ビオチンの非常に強固な結合能が発揮されていることを示唆するものである。

3-6 Trp 変異たんぱく質の FMO 計算結果

次に、ビオチンと相互作用している3つのトリプトファンに着目して、各トリプトファンの変異タンパク質における FMO 計算を実施し、変異の影響について検討した。計算座標は前述した3-4項と同じ物を用いた。計算結果を表 3.4 に示す。

表 3.4 天然型, Trp 変異体におけるビオチンとその周辺 Trp との IFIE 値

mutant protein (PDB ID)	天然型 (1SWE)	W79F 変異体 (1SWK)	W108F 変異体 (1SWN)	W120F 変異体 (1SWP)
Total-IFIE	-134.4	-126.4	-122.4	-121.9
IFIE value between biotin and Trp (or Phe) (kcal mol ⁻¹)				
	Trp79: -10.4	Phe79: -7.4	Trp79: -9.8	Trp79: -9.6
	Trp108: -6.5	Trp108: -6.6	Phe108: -4.6	Trp108: -6.5
	Trp120_D: -5.5	Trp120_D: -5.6	Trp120_D: -5.1	Phe120_D: -3.2

天然型でのビオチン - Trp79 の IFIE は-10.4 kcal/mol であるのに対し、W79F 変異体でのビオチン - Phe79 の IFIE は-7.4 kcal/mol で、3.0 kcal/mol 減少した。また、天然型でのビオチン - Trp108 の IFIE は-6.5 kcal/mol であるのに対し、W108F 変異体でのビオチン - Phe108 の IFIE は-4.6 kcal/mol で、1.9 kcal/mol 減少した。更に、天然型でのビオチン - Trp120 の IFIE は-5.5 kcal/mol であるのに対し、W120F 変異体でのビオチン - Phe120 の IFIE は-3.2 で、2.3 kcal/mol 減少した。また、天然型、W79F 変異体、W108F 変異体、W120F 変異体でのビオチンの Total-IFIE は、それぞれ-134.4, -126.4, -122.4, -121.9 kcal/mol であった。

Chilkoti ら⁵は、天然型を基準とした各変異体の結合自由エネルギー $\Delta\Delta G^0$ を熱力学の実験で測定し、W79F:+0.9 kcal/mol, W108F:+0.6 kcal/mol, W120F:+2.3 kcal/mol と報告している。結合自由エネルギーの低下が最も少なかった（言い換えれば、天然型の次にビオチンの結合能が強い）W108F 変異体では FMO 計算でも変異アミノ酸の IFIE 値の変化が最も小さいという一致はあったが、Chilkoti らの $\Delta\Delta G^0$ と相関する IFIE 結果は得られなかった。しかしながら、Total-IFIE 値や各変異アミノ酸 (W→F) との IFIE 値は天然型と比べて小さく、ビオチンの相互作用がすべての Trp 変異体において天然型よりも低下していることを示していることから、Trp 変異による CH/ π 相互作用の変化が結合能の変化に関係していることを示していると考えられる。また、ビオチンと Trp120 はユニット間で相互作用しており、W120F 変異体で最も total-IFIE 値が小さいという結果は、ビオチン自身の結合能の低下と、4 量体を形成するためのユニット間の相互作用に Trp120 が重要な役割を果たしているという点で興味深い結果であると考えられる。そこで、Trp120 に着目し、Trp120 を含めたユニット間での相互作用様式について調べた。

3-7 ユニット間の相互作用に関する FMO 計算結果

A 鎖と D 鎖のユニット間相互作用にビオチンと Trp120 が関係していることについては前述したが、さらに別のアミノ酸に関するユニット間相互作用について調べた。A-D 鎖のユニット間で近接しているアミノ酸を図 3.5 に示す。図 3.5 より、ビオチンと隣接 Trp120 はユニット接合面の両サイドに位置しており、ユニット接合面の中央には A 鎖, D 鎖の Thr123 と Val125 がそれぞれ向かい合って位置している。

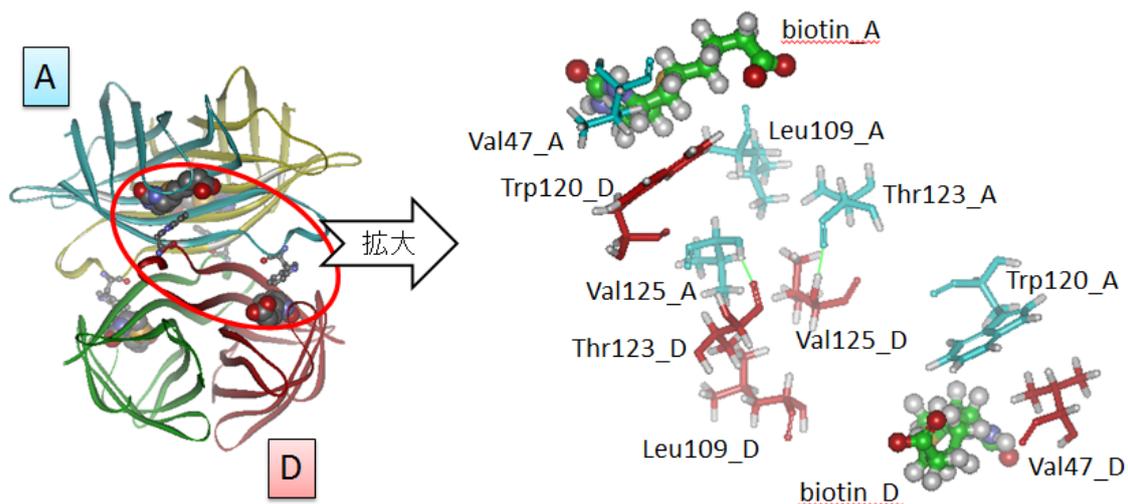


図 3.5 ユニット間 (A-D 鎖間) で近接しているアミノ酸
A 鎖 : 水色, D 鎖 : 赤色

まず、CHPI プログラムで CH/ π 相互作用を計測したところ、Val47-Trp120 とビオチン - Trp120 の 2 つの CH/ π 相互作用が 2 組計測された (表 3.5)。

表 3.5 ユニット間の CH/ π 相互作用

π Residue	π Atom	CH Donor	CH	Distance/Å
Trp120_A	C ϵ 2	Val47_D	CH β	2.86
Trp120_A	C δ 2	Val47_D	CH γ 2	3.01
Trp120_A	C η 2	Biotin_D		2.84
Trp120_A	C ϵ 3	Biotin_D		2.91
Trp120_D	C ϵ 2	Val47_A	CH β	2.92
Trp120_D	C ϵ 2	Val47_A	CH γ 2	3.01
Trp120_D	C ϵ 3	Biotin_A		2.87

次に、FMO 計算でユニット間の主な IFIE 値を算出し、表 3.6 の結果を得た。Thr123(A 鎖) - Val125(D 鎖) と Val125(A 鎖) - Thr123(D 鎖) の IFIE はそれぞれ -12.5, -12.2 kcal/mol であり、PIEDA の ES 値からも静電項優位の水素結合であり、その総和は -24 kcal/mol であった。ビオチン(A 鎖) - Trp120(D 鎖)、Val47(A 鎖) - Trp120(D 鎖)、Trp120(A 鎖) - ビオチン(D 鎖)、Trp120(A 鎖) - Val47(D 鎖) の 4 つの IFIE はそれぞれ -5.5, -4.4, -5.5, -4.5 であり、PIEDA の DI 値からそれらの相互作用はほぼ分散力であることと、前述の CHPI プログラムによる計測結果から、CH/ π 相互作用であることが示された。その総和は約 -20 kcal/mol であり、ユニット間相互作用の約 4 割が CH/ π 相互作用であることが分かった。CH/ π 相互作用の比率は、前述したビオチン結合サイトでの相互作用よりも高く、ユニット間、言い換えるとタンパク質 - タンパク質相互作用においては CH/ π 相互作用の寄与率がより高くなっていることが示された。また、前述した W120F 変異体での著しい結合能の低下 (Chilkoti らの $\Delta\Delta G^0$) は、Trp120-ビオチンおよび Trp120-Val47 の CH/ π によるユニット間の相互作用が低下することによってもたらされるものと推察した。

表 3.6 ユニット間の FMO 結果

Fragment pair		IFIE	ES ^a	EX ^b	CT ^c	DI ^d	q(I => J) ^e
Biotin_A	Trp120_D	-5.5	-1.8	2.7	-1.3	-5.1	0.0050
Val47_A	Trp120_D	-4.4	-1.3	2.1	-1.0	-4.2	-0.0087
Leu124 ^f _A	Val125_D	-12.5	-13.9	4.9	-0.5	-2.9	0.0296
Val125_A	Leu124 ^f _D	-12.2	-14.8	5.5	0.1	-3.0	-0.0303
Trp120_A	Biotin_D	-5.5	-1.9	3.5	-1.5	-5.6	0.0071
Trp120_A	Val47_D	-4.5	-1.2	2.2	-1.1	-4.4	0.0092

^a 静電力 (ΔE^{ES}) ^b 交換反発力 (ΔE^{EX}) ^c 電荷移動力 (ΔE^{CT}) ^d 分散力 (ΔE^{DI})

^e フラグメント I から J への電荷移動量

^f フラグメント分割の都合で、Thr123 のカルボニル基を含む

一般的にタンパク質 - タンパク質相互作用は疎水的な相互作用が多いといわれているが、本結果は FMO によって定量的に寄与率を示した結果であり、タンパク質 - タンパク質相互作用を考察する上で重要な情報の 1 つになると考えられる。

3-8 CH/ π 相互作用ネットワークについて

ビオチン結合ポケットでのビオチンの相互作用やユニット間での相互作用において、CH/ π 相互作用が関与していることを議論してきた。再度、CHPI プログラムによるビオチンやA-D鎖におけるCH/ π 相互作用を体系的にまとめてみたところ、ストレプトアビジン-ビオチン複合体ではCH/ π 相互作用による各アミノ酸のつながりがネットワーク状に形成されていることが示された。CH/ π 相互作用ネットワークに関与しているアミノ酸とビオチンを図3.6に示す。多くのアミノ酸がCH/ π 相互作用ネットワークに関与していることが示唆される。

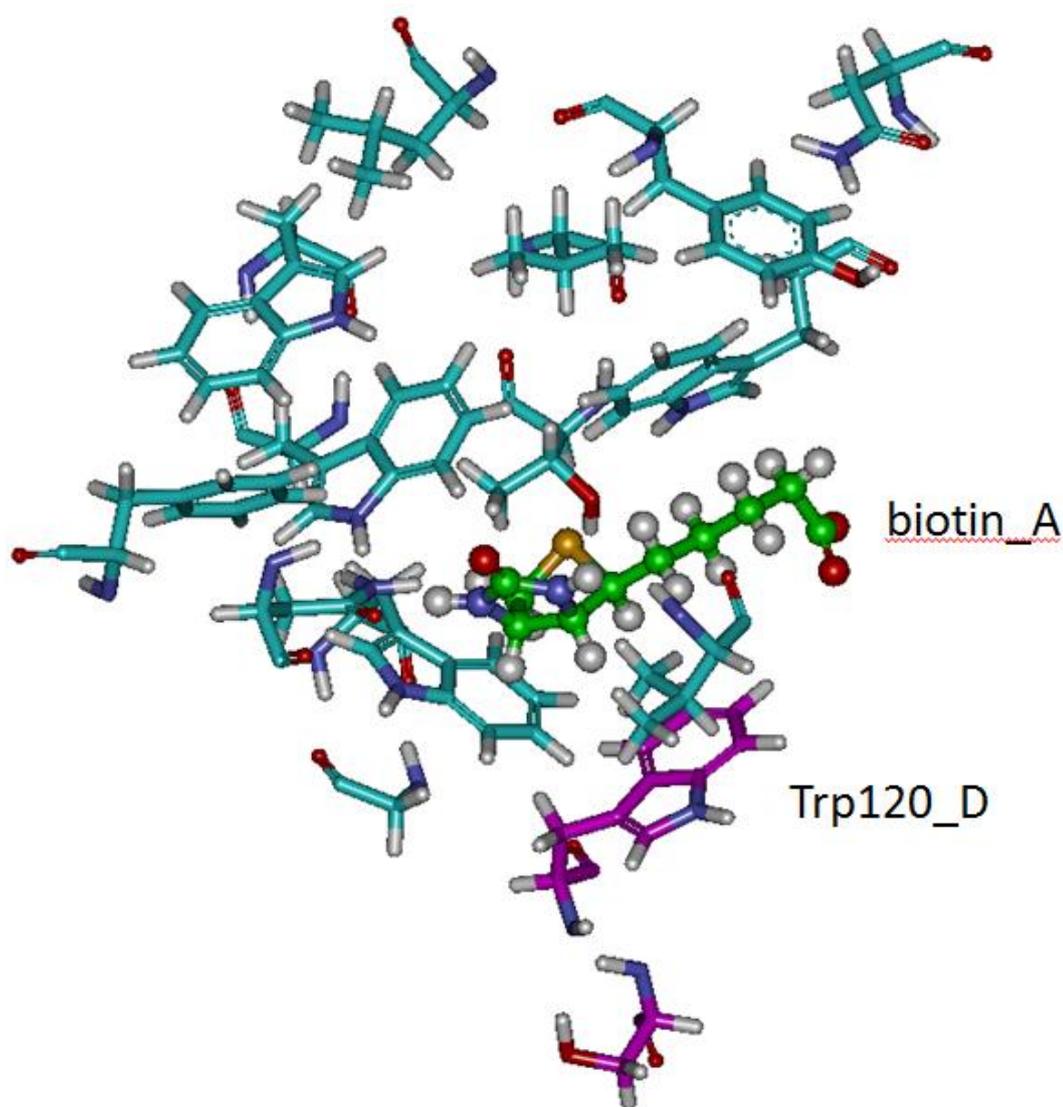


図 3.6 A-D 鎖での CH/ π 相互作用ネットワークに関与しているアミノ酸

そこで、このネットワークを評価するために、主鎖/側鎖分割による FM04 計算を実施し、各アミノ酸側鎖による IFIE 値すなわち CH/ π 相互作用を調べた。図 3.7 に CH/ π ネットワークの模式図を示す。各アミノ酸側鎖間で相互作用に十分な IFIE 値が確認できたことから、ビオチンと Trp120 との CH/ π 相互作用を中心とした、隣接ユニット間に渡る大きな CH/ π ネットワークの存在を FM04 計算で確認できた。前述の W120F 変異体においてビオチンの結合能が低下するのは、この CH/ π ネットワークがユニット間の部分で弱まることに起因して、4 量体としての構造を維持する力が低下したと考えることができる。以上より、streptavidin-biotin 複合体構造においては、CH/ π 相互作用ネットワークが単体およびユニット間の構造維持に重要な役割を果たしていると推察した。

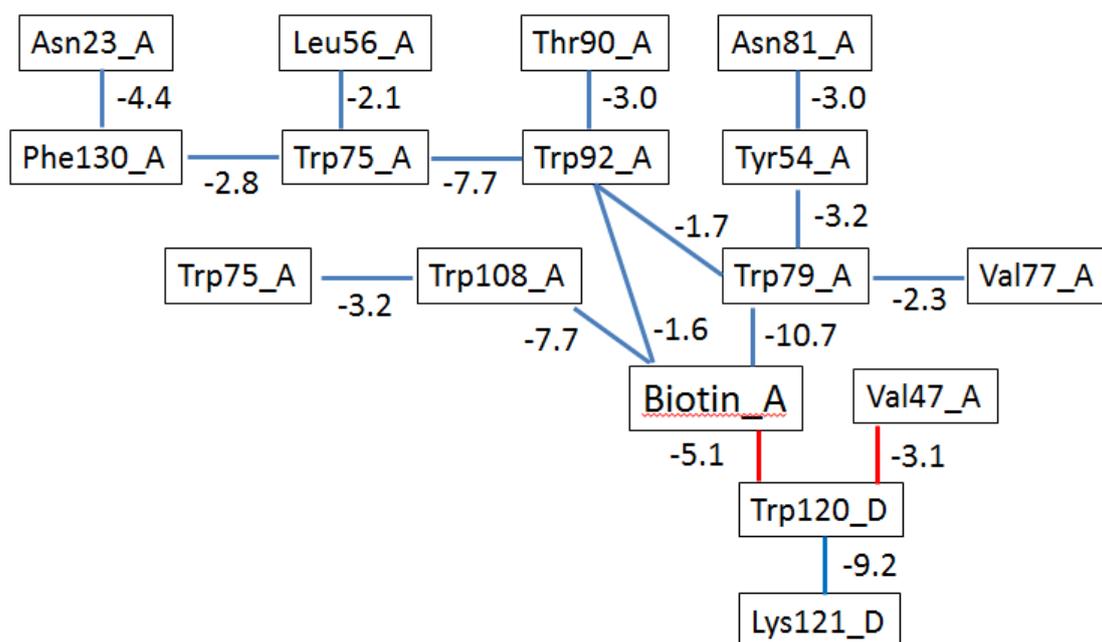


図 3.7 CH/ π ネットワークの模式図と各アミノ酸側鎖間の IFIE 値 (kcal/mol)
(ユニット間の相互作用を赤線で示す)

3-9 結論

ストレプトアビジン-ビオチン複合体に対して CH/ π 相互作用解析および FMO 計算を行った。リガンド-タンパク質間相互作用とユニット間相互作用について定量的な評価を行い、以下の結果を得た。

1. 結合サイトにおいて、ビオチンは7つの親水性アミノ酸および3つの疎水性アミノ酸と相互作用しており、相互作用の内訳が静電力：分散力=5：1であることが分かった。
2. 4量体のうち、ビオチンが関与しているユニット間の相互作用の内訳は静電力：分散力=3：2であることが分かった。
3. ビオチンが関与しているユニット間の相互作用には CH/ π ネットワークがあり、単体およびユニット間の結合に CH/ π 相互作用が深く関与していることが示唆された。

これらの結果は、今後のドラッグデザインにおいて、リガンド-タンパク質間相互作用やタンパク質-タンパク質相互作用を考察する上で重要な知見の1つになると考えられる。

表 3-S ストレプトアビジン-ビオチン複合体 (pdb1sew) の A, D 鎖の CH/ π 相互作用

unit	π -Residue	π -Atom	unit	Donor-Residue	CH	D _{ATM}	D _{LIN}
A	Trp21	C ζ 3	A	Ile104	CH γ 1	2.91	2.82
A	Trp21	C ζ 3	A	Lys132	CH γ 1	2.61	2.56
A	Trp21	C ϵ 2	A	Lys132	CH ϵ 2	2.43	2.42
A	Phe29	C ϵ 1	A	Val31	CH β	2.82	2.78
A	Tyr43	C ϵ 2	A	Phe29	CH β 1	2.97	2.43
A	Tyr54	C δ 2	A	Trp79	CH α	2.93	2.72
A	Tyr54	C ϵ 1	A	Trp79	CH ϵ 3	2.80	2.66
A	Tyr54	C δ 2	A	Asn81	CH β 2	3.01	2.81
A	Tyr60	C ϵ 1	A	Ala33	CH β 1	2.50	2.42
A	Tyr60	C ϵ 1	A	Gly37	CH α 1	2.48	2.47
A	Tyr60	C ϵ 2	A	Ser62	CH β 2	2.88	2.64
A	Trp75	C δ 2	A	Trp92	CH β 1	3.01	2.91
A	Trp79	C ζ 3	A	Val77	CH γ 1	3.04	2.97
A	Trp79	C δ 1	A	Biotin_A		2.63	2.50
A	Trp79	C ϵ 2	A	Biotin_A		2.85	2.64
A	Trp92	C ζ 2	A	Thr90	CH γ 2	3.03	2.98
A	Trp92	C ϵ 3	A	Thr90	CH γ 2	2.95	2.91
A	Trp92	C δ 1	A	Trp108	CH β 2	2.87	2.82
A	Tyr96	C γ	A	Ile17	CH γ 1	3.08	3.03
A	Tyr96	C ζ	A	Gly98	CH α 1	2.94	2.65
A	Arg103	C ζ	A	Glu101	CH γ 1	2.52	2.36
A	Trp108	C ζ 2	A	Gly126	CH α 2	2.67	2.59
A	Trp108	C ϵ 2	A	Biotin_A		2.87	2.60
A	Trp108	C ζ 2	A	Biotin_A		2.94	2.70
A	Trp120	C ζ 3	A	Lys121	CH β 2	2.74	2.58
A	Trp120	C ζ 2	A	Lys121	CH ϵ 1	2.89	2.39
A	Trp120	N ϵ 1	D	Val47	CH β	2.96	2.56
A	Trp120	C δ 2	D	Val47	CH γ 2	3.03	2.90
A	Trp120	C ζ 3	D	Biotin_D		2.86	2.29
A	Trp120	C ϵ 3	D	Biotin_D		3.04	2.98
A	Phe130	C ϵ 2	A	Asn23	CH β 2	2.51	2.43
A	Phe130	C ζ	A	Asn23	NH δ 2	2.83	2.47
A	Phe130	C ζ	A	Trp75	CH ζ 2	3.02	2.74
A	Phe130	C ϵ 1	A	Trp75	CH η 2	3.02	2.76

D	Trp21	Cζ3	D	Ile104	CHγ1	2.71	2.67
D	Trp21	Cε2	D	Ile104	CHδ1	2.91	2.89
D	Trp21	Cζ3	D	Lys132	CHγ1	2.84	2.81
D	Trp21	Ne1	D	Lys132	NHζ3	2.99	2.80
D	Tyr22	Cζ	D	Thr20	CHγ2	3.01	2.41
D	Tyr22	Cζ	D	Thr20	CHγ2	2.69	2.65
D	Phe29	Cε2	D	Val31	CHγ2	2.81	2.71
D	Phe29	Cε1	D	Val31	CHγ2	2.50	2.46
D	Tyr43	Cε2	D	Phe29	CHβ1	2.90	2.40
D	Tyr54	Cε2	D	Trp79	CHα	2.66	2.44
D	Tyr54	Cε1	D	Trp79	CHζ3	2.57	2.46
D	Tyr54	Cδ1	D	Trp79	CHζ3	2.88	2.54
D	Tyr54	Cδ2	D	Asn81	CHβ2	2.76	2.61
D	Arg59	Nη2	D	Gly37	CHα2	2.94	2.78
D	Tyr60	Cζ	D	Ala33	CHβ1	2.50	2.35
D	Tyr60	Cε2	D	Ser62	CHα	2.88	2.42
D	Trp75	Cδ1	D	Leu56	CHδ2	2.75	2.54
D	Trp75	Cε2	D	Trp92	CHβ1	3.02	2.94
D	Trp79	Cζ3	D	Val77	CHγ1	3.06	2.93
D	Trp79	Ne1	D	Biotin_D		2.41	2.32
D	Trp79	Cζ2	D	Biotin_D		2.55	2.53
D	Trp92	Cε3	D	Thr90	CHγ2	2.93	2.89
D	Trp92	Cδ1	D	Trp108	CHβ2	2.77	2.74
D	Arg103	Nη2	D	Val97	CHγ1	2.93	2.66
D	Trp108	Cζ2	D	Gly126	CHα2	2.84	2.75
D	Trp108	Cε2	D	Biotin_D		2.77	2.48
D	Trp108	Cζ2	D	Biotin_D		2.86	2.57
D	Trp120	Ne1	A	Val47	CHβ	2.92	2.53
D	Trp120	Cε2	A	Val47	CHγ2	3.15	3.02
D	Trp120	Cζ3	D	Lys121	CHβ2	2.98	2.93
D	Trp120	Cε2	D	Lys121	CHδ2	2.68	2.64
D	Trp120	Cζ2	D	Lys121	CHδ2	2.34	2.27
D	Trp120	Cζ3	A	Biotin_A		2.87	2.28
D	Trp120	Cε3	A	Biotin_A		2.94	2.91
D	Phe130	Cδ1	D	Asn23	CHβ2	2.35	2.20
D	Phe130	Cζ	D	Trp75	CHζ2	2.87	2.39

引用文献

- ¹ I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 (1999) 9997-10002.
- ² P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendroski, F. R. Salemme, *Science*, 243 (1998) 85-88.
- ³ W. A. Hendrickson, A. Pähler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2190-2190.
- ⁴ S. Miyamoto, P. A. Kollman, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 16 (1993) 226-245; S. Miyamoto, P. A. Kollman, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8402-8406.
- ⁵ A. Chilkoti, P. S. Stayton, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 10622-10628.
- ⁶ A. Chilkoti, P. H. Tan, P. S. Stayton, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 1754-1758.
- ⁷ M. Nishio, M. Hirota, Y. Umezawa, *The CH/ π Interaction. Evidence, Nature, and Consequences*, Wiley-VCH, New York, (1998).
- ⁸ S. Sakaki, K. Kato, T. Miyazaki, Y. Musashi, K. Ohkubo, H. Ihara, C. Hirayama, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 89 (1993) 659-664; S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 3746-3753; S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 104-112.
- ⁹ For comparison with other weak hydrogen bonds, see: M. Nishio, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 13873-13900, DOI:10.1039/C1CP20404A, Table 2.
- ¹⁰ Review: M. Nishio, *CrystEngComm* 6 (2004) 130-156.
- ¹¹ Review: M. Nishio, Y. Umezawa, K. Honda, S. Tsuboyama, H. Suezawa, *CrystEngComm* 11 (2009) 1757-1788.
- ¹² Review: O. Takahashi, Y. Kohno, M. Nishio, *Chem. Rev.* 110 (2010) 6049-6076.
- ¹³ P. Chakrabarti, U. Samanta, *J. Mol. Biol.* 251 (1995) 9-14; M. Brandi, M. S. Weiss, A. Jabs, J. Sühnel, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 357-377.
- ¹⁴ F. Zsila, Z. Bikadi, M. Simonyi, *Biochem. Pharmac.* 64 (2002) 1651-1660; N. Taieb, N. Yahi, J. Fantini, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 779-794; N. Yahi, J. Fantini, M. Henry, C. Tourres, C. Tamalet, *J. Biochem. Sci.* 12 (2005) 701-710; M. Levy, N. Garmy, E. Gazit, J. Fantini, *Biochemistry* 45 (2006) 10957-10962; M. Levy, N. Garmy, E. Gazit, J. Fantini, *FEBS J.* 273 (2006) 5724-5735; J. Fantini, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 2991-2997; M. Maresca, A. Derghal, C. Carravagna, S. Dudin, J. Fantini, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 2792-2800.
- ¹⁵ M. Nishio, Y. Umezawa, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (1999) 2021-2026; M. Nishio, Y. Umezawa, *Biopolymers* 79 (2005) 248-258.
- ¹⁶ T. Nishinaka, Y. Ito, S. Yokoyama, T. Shibata, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94 (1997) 6623-6628; S. H. Chou, Y. Y. Tseng, *J. Mol. Biol.* 285 (1999) 41-48; Y. Umezawa, M. Nishio, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 2643-2650; S. H. Chou, K. H. Chin, C. W. Chen, *J. Biomolec. NMR* 19 (2001) 33-48; Y. Umezawa, M. Nishio, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2183-2192; A. Gil, V. Branchadell, J. Bertran, A. Oliva, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 9372-9379; A. Gil, V. Branchadell, J. Bertran, A. Oliva, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 4907-4914.
- ¹⁷ Review: T. Ozawa, K. Okazaki, M. Nishio, *FMO as a Tool for Structure-Based Drug Design*, Chapter 10 in *The Fragment Molecular Orbital Method: Practical Applications to Large Molecular Systems*. Eds. Fedorov, D. G.; Kitaura, K. CRC Press, New York, (2009).

¹⁸ T. Ozawa, K. Okazaki, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 2656–2666; T. Ozawa, E. Tsuji, M. Ozawa, C. Handa, H. Mukaiyama, T. Nishimura, S. Kobayashi, K. Okazaki, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 10311–10318.

¹⁹ S. Freitag, I. Le Trong, L. A. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Prot. Sci.* 6 (1997) 1157–1166.

²⁰ T. Sano, C. R. Cantor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3180–3184.

²¹ S. Freitag, I. Le Trong, A. Chilkoti, L. A. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *J. Mol. Biol.*, 279 (1998) 211–221.

第4章 プロモドメイン阻害剤のリガンド-タンパク質相互作用解析

4-1 序論

タンパク質-タンパク質相互作用 (PPIs) ネットワークは細胞の生物学的機能の制御に関与しており、そのネットワークの異常は様々な疾患に関与している事が知られている¹。PPIs の制御を狙った医薬品開発は難易度が高く、特に有機低分子による場合はその難易度は格段に高くなる。その原因としては、PPIs を起こすタンパク質とタンパク質の接触面が平面的でかつ広いためである。一方、有機低分子により制御される典型的なタンパク質である酵素・キナーゼ・GPCR (Gタンパク質共役型受容体) では有機低分子は、いわゆる結合ポケットと呼ばれる狭い空間内に特徴的な形状を持つ部分に結合する²。少ない数ではあるが PPIs を標的とする低分子薬が臨床試験を実施している³。その中にはプロモドメインを標的としている物もある⁴。著者は BRDs とその阻害剤の複合体構造に対して、FMO 計算^{5,6}を実施してドラッグデザインに有用な知見を得ることを目的として、本章の研究を実施した。主に得られた知見は以下のことである。

1. ペプチドリガンドと非ペプチドリガンドの相互作用の比較に IFIE が有用であること
2. FBDD 手法の一つであるフラグメントグローイングに FMO 計算に基づく考察が活用できること
3. リガンドとタンパク質の相互作用の結果生じる誘導電荷が阻害活性に寄与すること
4. CH/ π 相互作用が阻害活性に寄与すること
5. 活性部位にある水分子の排除が阻害活性の上昇に関与すること
6. PIEDA 解析から分子間相互作用に関して詳細な考察が得られること

FBDD とは小さな分子量 (一般的には分子量 300 以下) の分子からドラッグデザインを開始する手法でリード探索手法の 1 つとなっている^{7,8,9}。以下 FBDD に関して概略を記す。

フラグメントベースドドラッグデザイン (FBDD) は 1990 年代後半に、初めてその概念が発表された比較的新しいリード化合物探索手法である。医薬品のリード化合物探索手法としては主に 3 種類の方法がある。一つ目は、自然界に存在する化合物 (ペプチド・生体内リガンド・天然物) からリード化合物を得る方法である。二つ目はハイスループットスクリーニング (HTS) により膨大な化合物 (10 万~100 万化合物) をスクリーニングしてリード化合物を得る方法である。三つ目が本章で述べる FBDD である。この三つの手法は、標的の性質・保有している化合物数・精製標的タンパク質の入手容易性等の観点で選択される。これ以降は HTS と FBDD の比較という観点で記述を進める。

4-2 分子量と活性値について

一般に低分子化合物の標的タンパク質に対する親和性は、分子量が大きくなるにつれて親和性は高くなる¹⁰ (図 4.1)。通常の医薬品の親和性は 10^{-8} ~ 10^{-9} レベルである。医薬品はタンパク質への親和性だけでなく、生体内安定性・他タンパク質との選択性・溶解性等考慮すべき項目が多い。そこで活性の向上を容易に達成しようと考えれば、親和性が高い化合物から最適化工程を開始したいのであれば、 10^{-6} ~ 10^{-7} レベルの親和性からスタートすることが理想である。

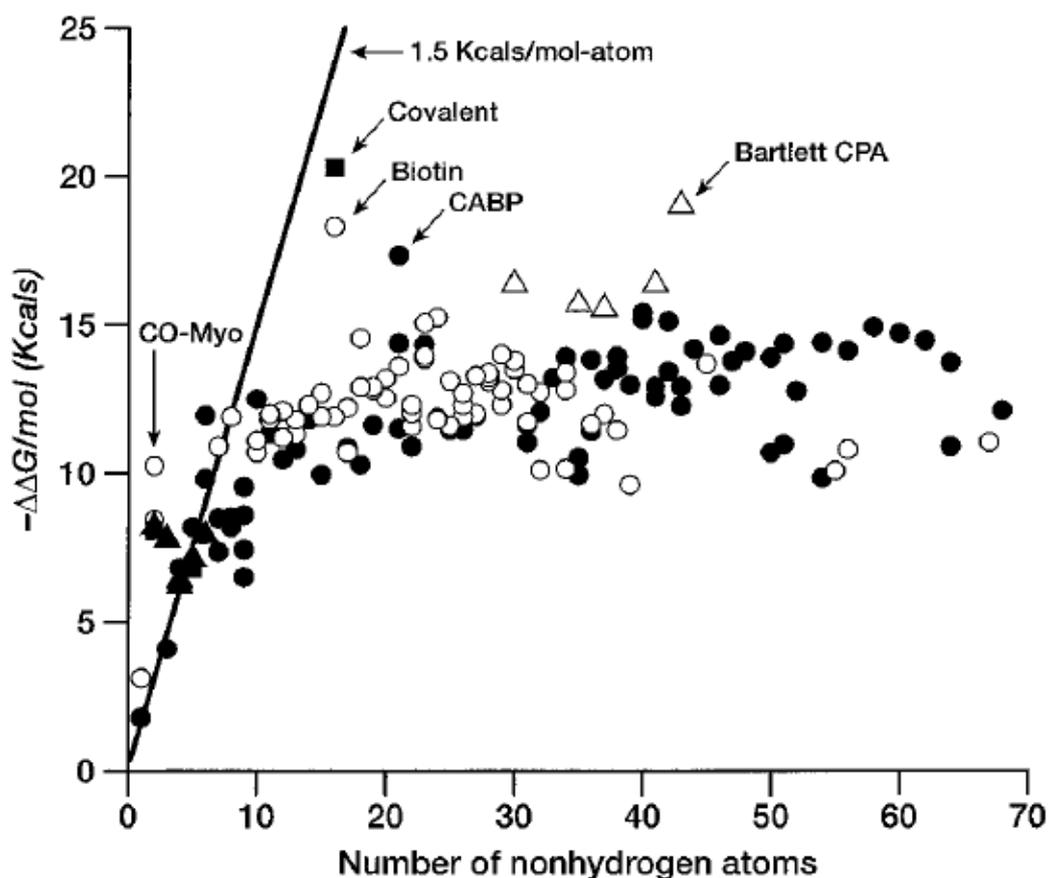


FIG. 1. Free energy of binding (in kcal/mol) for ligands and enzyme inhibitors plotted as a function of the number of nonhydrogen atoms in the ligand. See Table 1. A line with slope of 1.5 kcal/mol and an intercept of 0 is included as a visual aid to analysis. Δ , Metal ions or metalloenzymes; \blacktriangle , small anions; \circ , natural ligands; \bullet , enzyme inhibitors.

図 4.1 リガンドの原子数と結合自由エネルギーの関係図

(Proc. Ntl. Acad. Sci の論文¹⁰から引用添付)

4-3 HTS と FBDD について

FBDD の特徴を明確にするために、HTS に関して説明する。HTS は 2000 年代初頭に基盤が確立された技術である。数百万個の化合物を集積して（化合物ライブラリーと呼ばれる）、それらを機械化された評価方法によりスクリーニングを行い望みの活性のある化合物を選択する。2000 年代に発売された約 30%^{1 1} の医薬品が HTS から見いだされている。HTS はリード探索手法として、確立された技術であるが全ての創薬標的で望みの結果を出せる訳ではない。その理由は、全ての創薬標的に対応しようとすると、揃えるべき化合物が数百万では足りずに、その 10-100 倍必要かもしれない。実際問題として、化合物の管理・スクリーニング費用・発生するデータの量・投資効率等の観点で現実的ではない。HTS の最大の問題点は準備しておくべき化合物空間が広大と言うことである。

一方 FBDD では、HTS に比べて圧倒的に少ない化合物数で必要な化合物空間を満たすことができる。なぜなら最初のスタートになる化合物の分子量が 300 以下であるためである（HTS の場合の分子量は 400 以上のことが多い）。この分子量 100 の違いにより、必要となる化合物数が圧倒的に少なくなる。試算によると 3,000 - 10,000 個で充分であると言われている。ただし分子量が小さいという事は図 4.1 からわかる様に、タンパク質と親和性が弱くなるという事である。分子量が 300 以下だと期待できる親和性は 1mM から 100 μ M である。このレベルの親和性では通常生物学的アッセイ法では検出するのが困難になり、物理化学的手法と言われる NMR・SPR・MS と言ったスペクトルメーターにより、タンパク質とリガンドの直接的な結合を評価する手法が必要となる。

また FBDD の長所としては、スタートとする分子が小さいために、その後のドラッグデザインの自由度が高いことが挙げられる。医薬品は標的タンパク質への親和性だけでなく、適度な溶解度や、標的タンパク質以外のタンパク質に結合しないことも必須の項目であるため、ドラッグデザインの自由度が大きいことは成功確率を高めることにつながる。すでに、FBDD に基づいた医薬品開発の成功事例がいくつか報告されている^{1 2}。

FBDD 手法はスタートとなる化合物の分子量が小さいため、得られるヒット化合物の活性は HTS で得られるヒット化合物より弱くなる。そこで FBDD では X 線結晶構造解析によって求められる立体構造情報がより重要となる。それに加えて計算化学から求まる、ヒット化合物がタンパク質としている分子間相互作用、また相互作用しているアミノ酸残基も重要な情報となる。FMO 法はこれらの情報を提供するのに適した手法であると考え、Fish らによるプロモドメイン阻害剤探索^{1 3}の FBDD 過程を FMO 法により検証した。

4-4 ブロモドメインについて

約 110 個のアミノ酸からなる小さなタンパク質モジュールであるブロモドメインは、アセチル化されたリジン残基と相互作用する¹⁴。アセチル化リジン (ϵ -Ac-Lys もしくは Ac-Lys) は特にヒストンに多く見られる他、クロマチン修復時の巨大分子複合体、DNA が損傷した部分、細胞周期を制御している場所に観測される。ヒトには 61 種類のブロモドメインタンパク質が存在し、それらは 8 種類のファミリーに分類されている。BET ファミリーは 4 つのタンパク質 (BRD2-4 と精巣特異的ブロモドメイン) からなる。その中でもブロモドメイン 4 (BRD4) は癌、炎症、ウイルス感染といった疾患関連遺伝子の発現を制御していることから、医薬品開発の有望標的であると考えられている¹⁵。2010 年に BRD4 選択的阻害剤が発見されると、多くの阻害剤開発プロジェクトが行われ^{16, 17, 18, 19}、いくつかの化合物が臨床試験を実施している⁴。本研究に使用したリガンド-タンパク質複合体構造は全てプロテインデータバンク (PDB) からダウンロードした。その PDB 番号と阻害活性値を表 4.1 に示す。また、リガンドの構造を図 4.1 に示す。

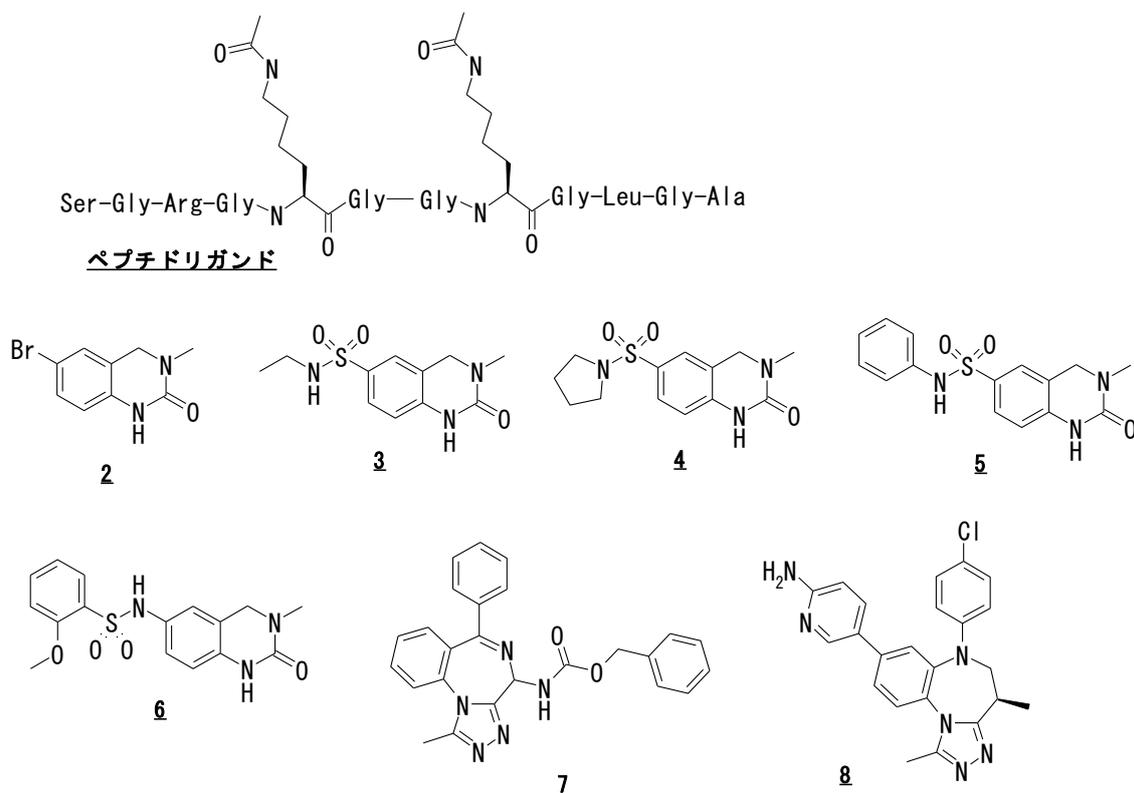


図 4.1 ペプチドリガンドおよび阻害剤の構造

表 4.1 計算に使用したリガンド-タンパク質複合体

化合物	PDB コード	分解能 (Å)	BRD4 の阻害活性 IC ₅₀ (uM)
ペプチド	3UVW	1.37	
2	4HBV	1.63	23
3	4HBW	1.69	4.8
4	4HBX	1.62	1.9
5	4HBY	1.59	4.4
6	4E96	1.92	0.22
7	2YEL	1.65	0.016 ^a
8	4Z1Q	1.40	0.015

4-5 アセチル化リジンペプチド (ϵ Ac-Lys) の FMO 計算

Filippakopoulos らのグループは系統的なヒストンペプチドアレイ・等温滴定カロリメトリー (ITC)・X 線結晶解析を用いて 2 カ所のリジン側鎖の窒素がアセチル化された状態の方が、1 カ所だけアセチル化もしくはアセチル化されていない状態よりもプロモドメインへの結合親和性が強いことを明らかにした¹²。X 線結晶構造解析からは、ペプチドリガンドの ϵ Ac-Lys がプロモドメインの Asn140 (プロモドメインタンパク質で高度に保存されている) と水素結合を形成して、結合におけるアンカーの役割をしている事が示唆されている。

まず始めに、BRD4 タンパク質とジアセチル化ペプチド H4K5acK8ac (SGRGKacGGKacGLGA) 複合体の FMO 計算を実施した。 ϵ Ac-Lys5 および ϵ Ac-Lys8 とその近傍の構造を図 4.2 に示す。フラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) のうち 2 つのアセチル化リジン残基 (ϵ Ac-Lys5 と ϵ Ac-Lys8) の結果を表 4.2 に示す。ペプチドリガンドの他のアミノ酸残基の IFIE は章末の表 4-S に記載した。

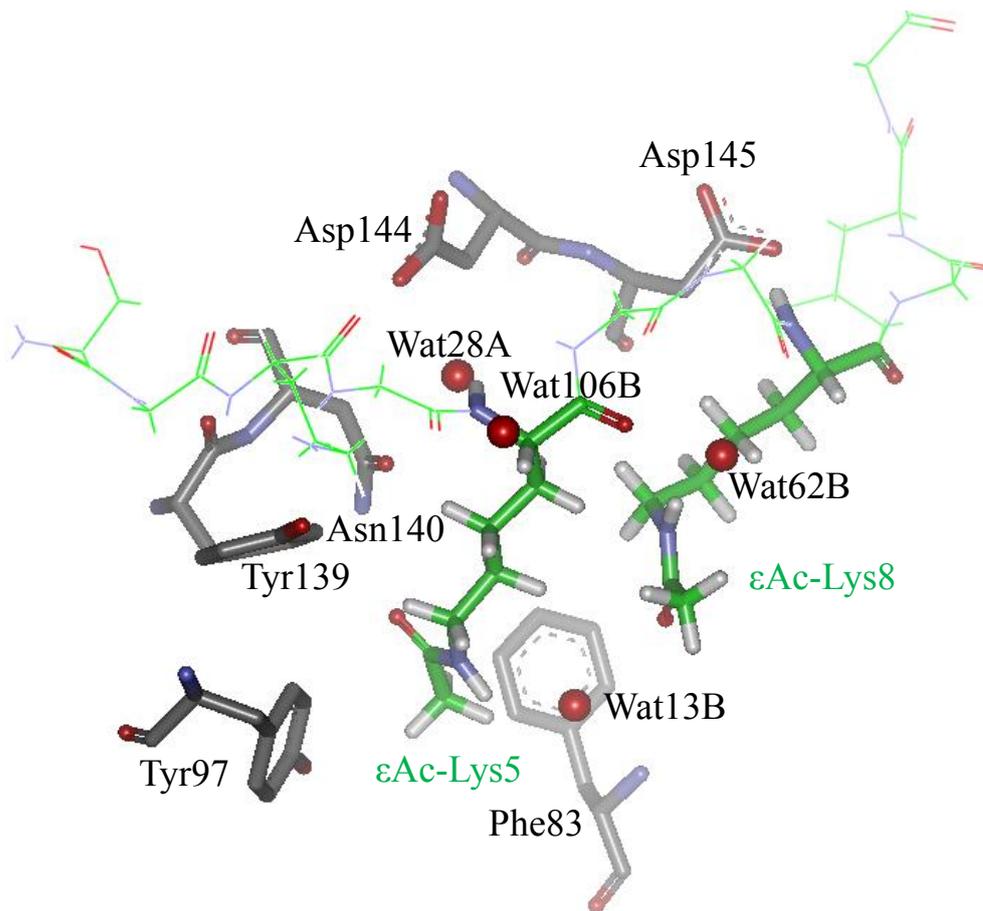


図 4.2 ϵ Ac-Lys5, ϵ Ac-Lys8 とその近傍の構造

表 4.2 ϵ Ac-Lys5 および ϵ Ac-Lys8 の IFIE 値 (kcal/mol)

ϵ Ac-Lys5 の IFIE		ϵ Ac-Lys8 の IFIE	
Asn140	-16.1	Asp145	-27.1
Asp144	-10.7	Water62B	-17.6
Phe83	-5.7	Water13B	-10.0
Water106B	-4.9	Asp144	-6.4
Tyr97	-4.8		
Water13B	-4.4		
Tyr139	-4.2		
Water28A	-3.8		
Water263B	-3.7		

FMO 計算から ϵ Ac-Lys5 とブロモドメインは 5 個のアミノ酸残基 (Asn140, Asp144, Phe83, Tyr97, Tyr139) と 4 個の水分子 (water106B, water13B, water28A, water263B) と相互作用を持つことが示された。最も強い IFIE は Asn140 とであり、その値は -16.1 kcal/mol であり、結晶構造から示唆されていた ϵ Ac-Lys5 と Asn140 の水素結合がペプチドとタンパク質の結合のアンカーになっていることと一致するものである。また ϵ Ac-Lys5 はブロモドメインタンパク質に高度に保存されている 3 つの芳香族アミノ酸残 (Phe83, Tyr97, Tyr139) とともに相互作用している。この 3 つの芳香族アミノ酸との相互作用は、力場や X 線結晶構造解析で得られている構造を観察するだけでは解釈するのは難しいが、FMO 計算によってこのような非古典的な相互作用も見つけることができる。

4 つの水分子も結合に寄与をしているようである。Water106B と water28A はペプチドのアミド結合と相互作用している。Water263B は water106B 水素結合をしている。これら 3 個の水分子は溶媒表面の近くに存在しており、水和層の安定化に寄与していると推定される。一方 water13B はペプチド結合サイトに存在し、かつ ϵ Ac-Lys5 と ϵ Ac-Lys8 分子間水素結合を形成している。この water13B の役割に関しては後ほど詳しく考察する。

FMO 計算から ϵ Ac-Lys8 とブロモドメインは Asp145, Asp144, water62B, water13B と相互作用を持つことが示されている。 ϵ Ac-Lys8 と Asp145 の強い IFIE (-27.1 kcal/mol) は、 ϵ Ac-Lys8 の主鎖を構成するアミド窒素上の水素と Asp145 の側鎖のカルボキシレートとの間の荷電を持つ水素結合と解釈できる。だが、この事はリジン残基のアセチル化の必要性を説明できるものではない。FMO 計算から ϵ Ac-Lys8 と 2 つの水分子 (water62B, water13B) との間の相互作用が示された。これらの水分子は ϵ Ac-Lys8 のアセチル部分と水素結合を形成し、かつ ϵ Ac-Lys5 との間にも水素結合を形成している。すなわち、これら 2 つ水分子はペプチドリガンド内で ϵ Ac-Lys5 と ϵ Ac-Lys8 との水素結合ネットワークを形成している。 ϵ Ac-Lys8 はその役割として、タンパク質との相互作用に加えて、結合サイトにいる水分子を水素結合によって安定する働きも持っている。

ペプチドリガンドにおける ϵ Ac-Lys の相互作用に関してまとめると、 ϵ Ac-Lys5 はブロモドメインタンパク質で広く保存されている Asn140 と水素結合し、 ϵ Ac-Lys8 は結合部位に存在する水分子のネットワークを保持していると思なすことができる。

4-6 フラグメント最適化プロセスの分析

Fish ら¹¹は BRD4 阻害剤のリード化合物創製に FBDD を活用した。創製されたリード化合物は PBMC を使って LPS 刺激を抑制し、細胞レベルでも薬効を出す化合物である。彼らは BRD4 阻害に関する構造活性相関関係 (SAR)、BRD4 阻害剤と BRD4 タンパク質の X 線結晶解析、フラグメント化合物からリード化合物へ化合物を大きくして行く過程を記述している。筆者は彼らのデータを用いて、フラグメント (IC_{50} 23 μ M) からリード化合物 (0.22 μ M) への構造変換の過程を IFIEs により解析した。

4-6-1 化合物 2 に関する FMO 計算

化合物 2 はブロモドメインタンパク質に関しては弱い活性 (23 μ M) であるが、分子量が小さいので FBDD のスタート化合物としては有望であると見なすことが出来る。FMO 計算の結果を表 4.3 に、相互作用の様子を図 4.3 に示す。

表 4.3 FMO 計算による化合物 2 の IFIE および PIEDA (単位: kcal/mol)

	IFIE	PIEDA			
		ES ^a	EX ^b	CT+mix ^c	DI ^d
Water379	-9.6				
Asn140	-9.4	-7.4	0.6	-1.1	-1.5
Phe83	-8.2	-5.7	3.3	-1.6	-4.3
Water309	-5.5				
Tyr97	-4.2	-2.7	0.2	-0.5	-1.2
Ile146	-3.5	-0.2	1.6	-0.9	-3.9
Val87	-3.0	-1.5	2.2	-0.8	-2.9

^a 静電力 (ΔE^{ES}) ^b 交換反発力 (ΔE^{EX}) ^c 電荷移動力 (ΔE^{CT}) ^d 分散力 (ΔE^{DI})

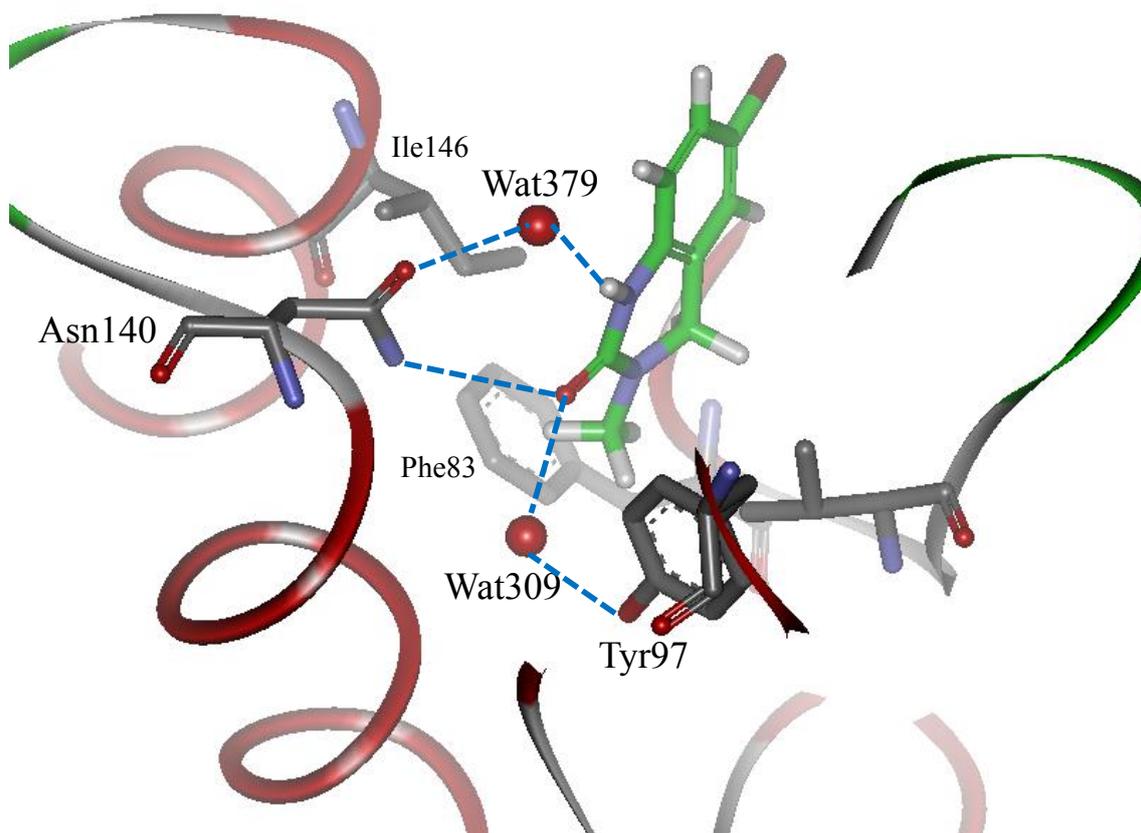


図 4.3 化合物 2 とプロモドメインの相互作用

FMO 計算から化合物 2 と BRD4 タンパク質の間は、5 個のアミノ酸残基 (Asn140, Phe83, Tyr97, Ile146, Val87) と 2 個の水分子 (water379, water309) と相互作用していることが示された。化合物 2 と Asn140 の間の -9.4 kcal/mol の IFIE 値はペプチドリガンドの ϵ Ac-Lys5 と Asn140 との IFIE 値 (-16.1 kcal/mol) に比べて弱くなっている。この IFIE 値の減少は、化合物 2 のウレア部分と Asn140 のカルボニル酸素との相対配置が理想的な水素結合をとれる位置からずれている事が原因だと考えられる。他のアミノ酸残基 (Phe83, Tyr97, Ile146, Val87) に関しては Fish ら¹¹ も相互作用の存在を指摘していた。

IFIEs の結果から 2 個の水分子 (water379, water309) も化合物 2 の結合に関与していることが示唆されている。化合物 2 と water379 の IFIE は -9.6 kcal/mol であり、その値は化合物 2 と Asn140 との IFIE と同等の値である。この水分子は化合物 2 のウレア基と Asn140 の側鎖のカルボニル酸素の間に存在しており、化合物 2 と Asn140 間を水素結合によってブリッジングする役割をしている。一方、他のリガンドでは、リガンドと Asn140 は直接水素結合を形成しているので、化合物 2 におけるこの水分子の役割は重要だと推測できる。Water309 も大きな IFIE 値 (-5.5 kcal/mol) を持っている。この水

分子は Tyr97 ととも分子間水素結合をしており、リガンド-水分子-Tyr97 のネットワークを形成している。このネットワークは他のリガンドでも観測されている。

FMO 計算の結果から、化合物 2 はペプチドリガンドの相互作用の一部を模倣している事が示され、分子間相互作用の観点からも FBDD のスタート構造として相応しい化合物であることが示された。

4-6-2 化合物 4 に関する FMO 計算

化合物 4 は化合物 2 の誘導体であるが BRD4 に対する阻害活性は化合物 2 に比べて 20 倍強い。相互作用の様子を図 4.4 に、FMO 計算の結果を表 4.4 に示す。FMO 計算の結果から活性向上に関する考察を行った。

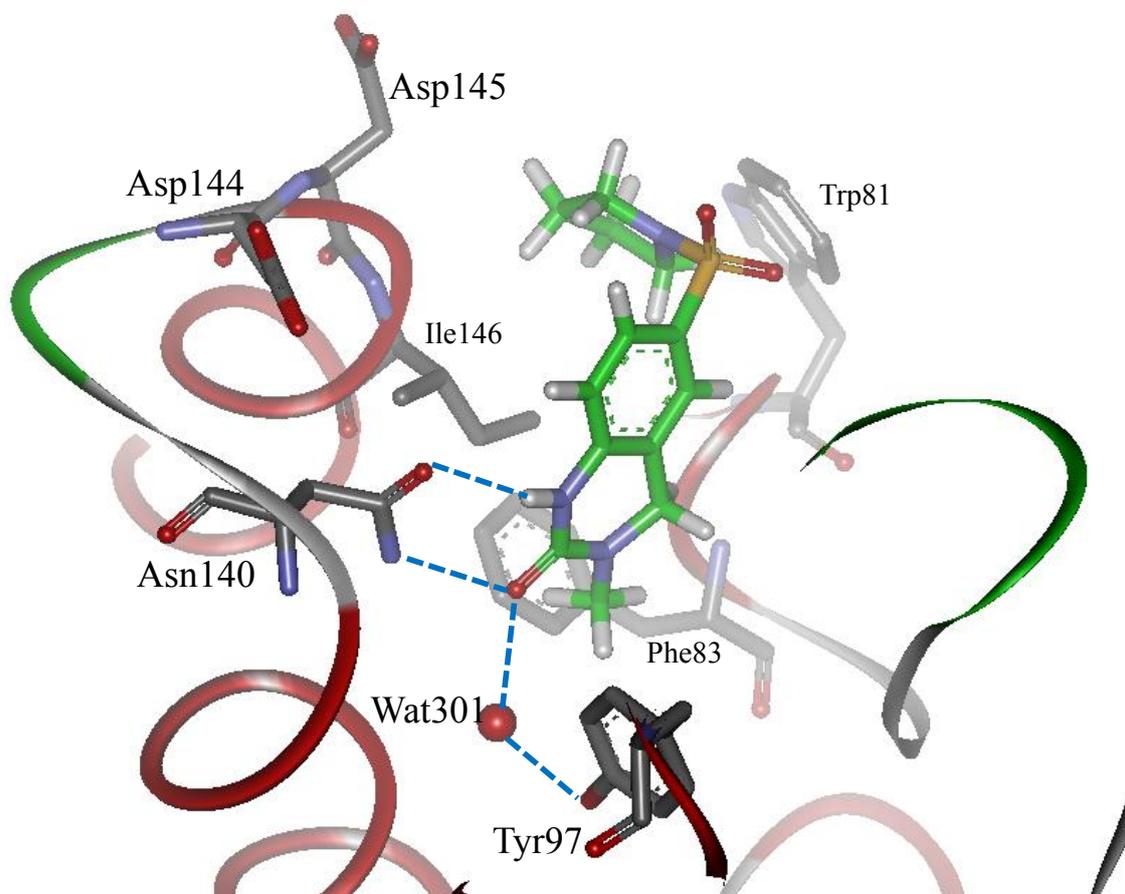


図 4.4 化合物 4 とブロモドメインの相互作用

表 4.4 FMO 計算による化合物 4 の IFIE および PIEDA (単位: kcal/mol)

	IFIE	PIEDA			
		ES ^a	EX ^b	CT+mix ^c	DI ^d
Asn140	-20.9	-21.4	9.7	-4.4	-4.8
Water301	-9.4				
Phe83	-8.3	-4.9	1.2	-1.7	-3.1
Ile146	-6.1	-0.6	4.8	-2.0	-8.2
Water423	-5.4				
Asp145	-5.2	-4.7	0.9	-0.3	-1.0
Trp81	-4.8	-2.5	2.4	-1.0	-3.7
Tyr97	-3.9	-2.4	0.1	-0.6	-1.0
Asp144	-3.8	-3.8	0	0	0
Water303	-3.3				

^a 静電力 (ΔE^{ES}) ^b 交換反発力 (ΔE^{EX}) ^c 電荷移動力 (ΔE^{CT}) ^d 分散力 (ΔE^{DI})

FMO 計算から化合物 4 と BRD4 タンパク質の間には 7 個のアミノ酸残基 (Asn140, Phe83, Ile146, Asp145, Trp81, Tyr97, Asp144) と 3 個の水分子 (water301, water423, water303) との間の相互作用が示された。

Asn140 との IFIE 値は -20.9 kcal/mol であり、化合物 2 に比べて 2 倍強くなっている。この値はペプチドリガンドの ϵ Ac-Lys5 と Asn140 の IFIE とほぼ同じ値である。このことは、化合物 4 のウレア基と Asn140 のカルボニル酸素との分子間水素結合が化合物 2 に比べて強くなっている事を示している。Phe83, Ile146, Tyr97 に関する IFIE 値はほぼ化合物 2 と一致する値となっている。

新しく Asp145 (-5.2 kcal/mol), Trp81 (-4.8 kcal/mol), Asp144 (-3.8 kcal/mol) に IFIE が生じており、フラグメントの拡大が適切に行われたことを支持している。Trp81 の IFIE は主に CH/ π 相互作用に起因する。ペプチドリガンドでは ϵ Ac-Lys8 が主に Asp145 と Asp144 と相互作用をしていた。つまり化合物 4 は、ペプチドリガンドが相互作用しているアミノ酸残基を新たに使うことによって活性が上昇したと考察できる。FBDD の過程において、フラグメントを拡大させた際に新たに適切な相互作用を獲得できたどうかを見極めるのは重要な事である。しかし Asp145 と Asp144 との相互作用については結晶解析結果を観察するだけでは気づくことは困難であり、FMO 計算による Asp145 と Asp144 に関する示唆は FBDD を進めていく上で有用な情報となる。このことは、FBDD において FMO 計算が有用な情報を提供する事を示すものである。なお、化合物 3, 4, 5 はほぼ同じ阻害活性を持ち (3: 4.8 μ M, 4: 1.9 μ M, 5: 4.4 μ M)、IFIE も似たパターンとなっている。

4-6-3 化合物 6 に関する FMO 計算

化合物 6 は BRD4 に対して他の誘導体よりも強い活性を持ち(220nM)、かつ、脂溶性、細胞透過性、細胞活性の点等で、リード化合物として相応しい性質を持っている。相互作用の様子を図 4.5 に、FMO 計算の結果を表 4.5 に示す。

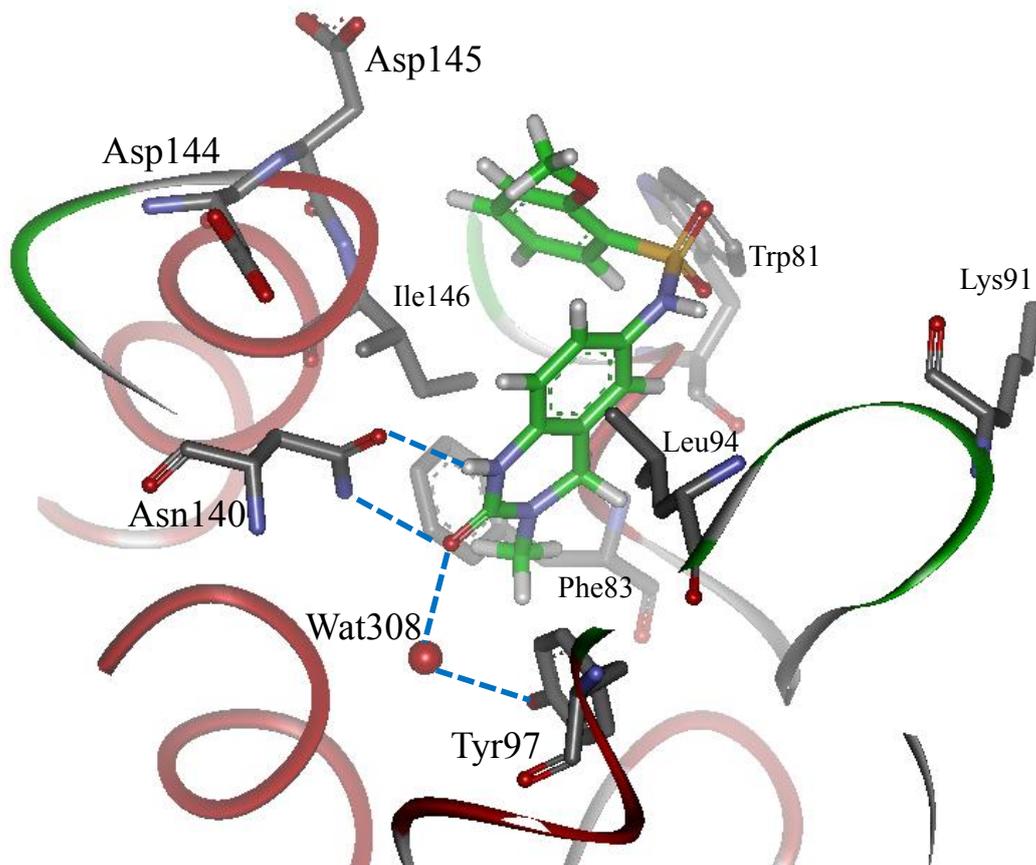


図 4.5 化合物 6 とブロモドメインの相互作用

表 4.5 FMO 計算による化合物 6 の IFIE および PIEDA (単位: kcal/mol)

	IFIE	PIEDA			
		ES ^a	EX ^b	CT+mix ^c	DI ^d
Asn140	-19.9	-18.7	7.7	-4.3	-4.7
Asp145	-10.2	-9.0	0.6	-0.5	-1.3
Water308	-8.4				
Asp144	-7.6	-7.6	0	0	0
Phe83	-7.3	-4.2	1.3	-1.4	-3.0
Ile146	-6.4	-0.8	6.4	-2.5	-9.6
Water313	-5.7				
Lys91	-5.3	-5.3	0	0	0
Trp81	-5.2	-2.0	2.3	-1.1	-4.4
Water306	-3.9				
Leu94	-3.8	-1.1	2.7	-1.0	-4.3
Tyr97	-3.3	-0.1	0.9	-1.5	-2.6
Water328	-3.1				
Tyr139	-3.1	-0.9	0.3	-0.7	-1.7

^a 静電力 (ΔE^{ES}) ^b 交換反発力 (ΔE^{EX}) ^c 電荷移動力 (ΔE^{CT}) ^d 分散力 (ΔE^{DI})

FMO 計算より化合物 6 と BRD4 タンパク質の間には 10 個のアミノ酸残基 (Asn140, Asp145, Asp144, Phe83, Ile146, Lys91, Trp81, Leu96, Tyr97, Tyr139) と 4 個の水分子 (water308, water313, water306, water328) の相互作用が示された。

化合物 6 と Asn140 との IFIE は -19.9 kcal/mol であり、ペプチドリガンドの ϵ Ac-Lys5 と Asn140 の IFIE と同等であった。このことは、6 の環状ウレア部分が ϵ Ac-Lys5 と同様の相互作用をしていることを示している。化合物 6 のスルホンアミドは化合物 5 のスルホンアミドと逆のトポロジーとなっており、活性は 20 倍強くなっている。構造解析の結果を観察すると化合物 5 と化合物 6 の結合モードは同様であり、また水素結合に関しても違いはなく、活性の差を説明しにくい。Fish ら¹¹ も原因については明確に述べていない。化合物 5 と化合物 6 の IFIEs 値を比較すると 3 個のアミノ酸残基に違いがある。Asp145 (5:6 = -10.2 vs -5.5)、Asp144 (5:6 = -7.6 vs -6.6)、Lys91 (5:6 = -5.3 vs 0.1) であり、他のアミノ酸残基では大きな差はない。このことから、この 3 つのアミノ酸残基との相互作用が化合物 6 の活性増強に寄与していると考えることが出来る。Asp145 と Asp144 の IFIE 値に関しては、この 2 つのアスパラギン酸がペプチドリガンドの複合体においても IFIE が観測されている。フラグメント化合物 2 からフラグメント拡大化合物 4、リード化合物 6 という FBDD プロセスにおいてペプチドリガンドの相互作用を真似る方向に進んでいることが分る。

4-6-4 IC₅₀ と IFIE の相関

リガンドとタンパク質の親和性（今回の系では阻害活性である IC₅₀ 値で評価）には様々な効果が影響を与えるが、構造が類似した誘導体である化合物 2 から化合物 6 において親和性は主にエンタルピー項²⁰によって決めると仮説を置くことができる。図 4.6 は IC₅₀ 値とリガンドのトータル IFIE (リガンドとタンパク質中の総アミノ酸残基の IFIE の合計値) に、ある程度の相関性があることを示す。このような相関関係があることは IFIE を使って化合物 2 から 6 までの構造活性相関が考察できる事を示している。

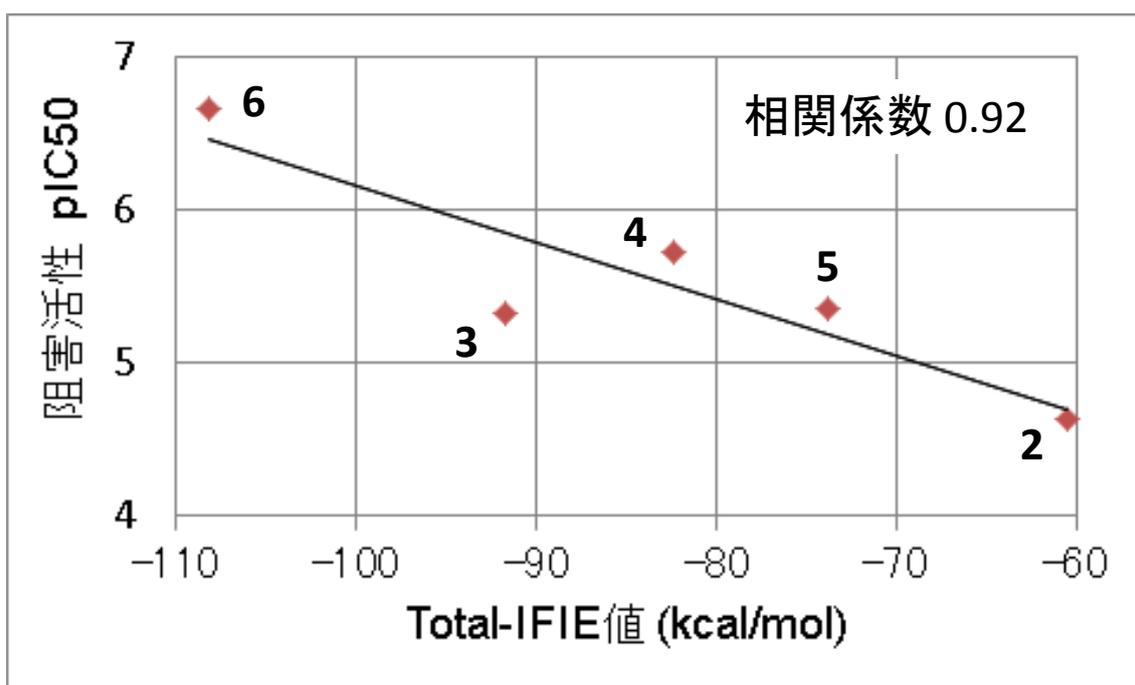


図 4.6 化合物のトータル IFIE 値とプロモドメイン阻害活性との関係

4-6-5 電荷の IFIE に対する寄与

前述した様に、化合物 4 と化合物 6 の活性の違いを結晶構造の観察に基づく考察のみで説明するのは難しい。化合物 2 から 6 の活性変化と各アミノ酸残基の IFIE の相関関係を調べてみると、Asp145 の IFIE と阻害活性の間に相関を見いだした。Asp145 が持つ負電荷は阻害活性が強くなるにつれて多くなっていた (2: -0.84, 4: -0.87, 6: -0.90)。この電荷の変化は、電荷が誘起する双極子相互作用²¹に起因すると考察できる。この誘起相互作用は通常分子力場では評価できないものである。この結果は、量子力学計算に基づく FMO 法が構造活性相関の考察に有用であることを示している。

4-6-6 フラグメントヒット化合物からリード化合物への IFIE の変化

フラグメントヒット化合物 2 からリード化合物 6 への構造変換の過程について、ペプチドリガンドの IFIE と比較しながら検証を行った (図 4.7)。

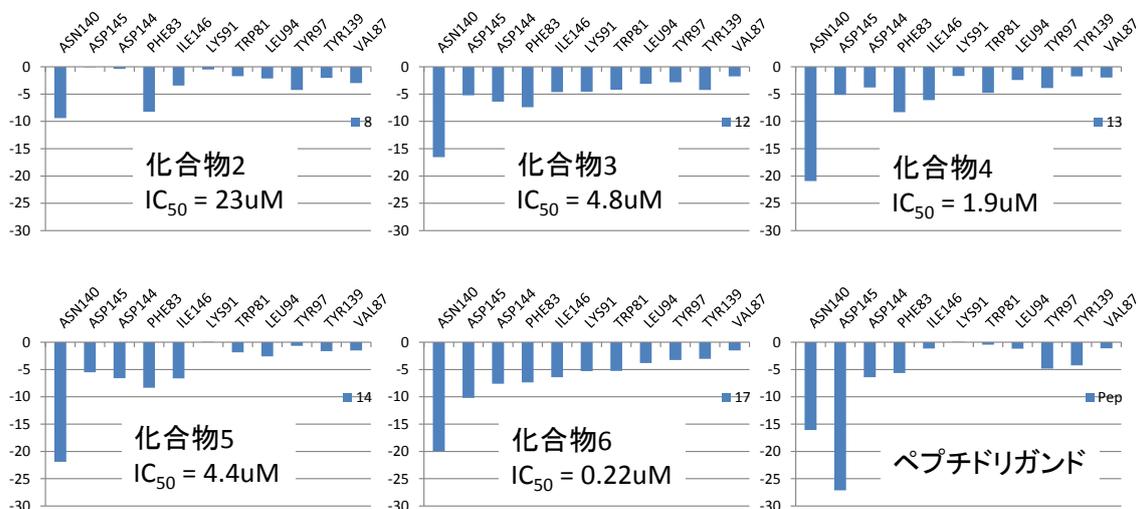


図 4.7 各化合物とアミノ酸との IFIE 値 (各グラフの横軸はアミノ酸を、縦軸は IFIE 値を示す)

ヒットフラグメント 2 の Asn140 との IFIE は -9.4 kcal/mol であり、他の化合物より弱い値となっている。化合物 3 はペプチドリガンドとほぼ同じ IFIE であり (1: -16.1 kcal/mol , 3: -16.5 kcal/mol)、化合物 4, 5, 6 はペプチドリガンドよりやや強い (4: -20.9 kcal/mol , 5: -21.9 kcal/mol , 6: -19.9 kcal/mol)。このように、ペプチドリガンドで見られた $\epsilon \text{ Ac-Lys5}$ と Asn140 の相互作用は FBDD で見いだされたリード化合物でも保持されていた。一方、ペプチドリガンドで見られた $\epsilon \text{ Ac-Lys8}$ と Asp145 は、非ペプチドリガンドでは同程度にはなっていない。Asp145 との IFIE がフラグメントヒット化合物 2 では観測されていないが、化合物 3, 4, 5, 6 では観測されている。かつ、阻害活性が強くなるにつれて IFIE は強くなり、リード化合物 6 ではペプチドリガンドの約 1/2 の IFIE 値となり、活性向上に Asp145 との相互作用が寄与することを示唆している。IFIE の分析から FBDD の過程において、まずは $\epsilon \text{ Ac-Lys5}$ の相互作用を模倣し (Asn140)、構造を拡大していく中で $\epsilon \text{ Ac-Lys8}$ (Asp145) との相互作用を強めていった様子が IFIE の解析により明らかに出来た。

以上をまとめると、ペプチドリガンドの $\epsilon \text{ Ac-Lys5}$ の相互作用は模倣することが出来たが、 $\epsilon \text{ Ac-Lys8}$ の相互作用は完全には模倣できていないと言うことが出来る。FMO 法は FBDD の過程を検証することが可能であり、FBDD を実施する際には、平行して計算を行うことは効率的な FBDD 実施に役立つ物である。

4-6-7 化合物6のPIEDA解析

北浦・諸熊らによって開発されたエネルギー分割法がFMO法にも適用され、ペアー相互作用エネルギー分割法(PIEDA)として利用できる^{2,2}。PIEDAでは相互作用エネルギーを静電力(ΔE^{ES})、交換反発力(ΔE^{EX})、電荷移動力(ΔE^{CT})、分散力(ΔE^{DI})に分割し分子間力の詳細な解析を可能としている。

化合物6は主にAsn140, Asp145, Asp144, Phe83, Ile146と相互作用しているが、PIEDA解析により分子間相互作用に関する詳細な考察を行った。PIEDA解析の結果を表4.5に示す。PIEDA解析より化合物6とAsn140の相互作用は主に静電力で、その分子間力は典型的な水素結合であることを示している。化合物6とAsp144, Asp145のPIEDAの内訳は、ほぼ全て静電力である。この結果と、化合物6とこれらのアスパラギン酸との直接的な相互作用が構造解析の結果から観察できない事実は、化合物6とアスパラギン酸は通常の水素結合やCH/ π 相互作用とは異なる相互作用をしている事を示唆している。静電力のみで相互作用している事と、4-6-5項で述べた各化合物の電荷変化から、化合物6とアスパラギン酸の相互作用は電荷が誘起する双極子相互作用であることを支持している。この事は、タンパク質とリガンドの複合体構造情報をドラッグデザインに活用する際に量子力学計算に基づくFMO法・PIEDA解析が有用であることを示している。

2つの非極性アミノ酸残基(Phe83とIle146)のPIEDA解析を行った。化合物6とIle146の主な結合エネルギーは分散力(ΔE^{DI})であり、CHPIプログラム^{2,3,2,4}から示唆されたCH/ π 相互作用の存在を支持する結果であった。化合物6とPhe83のPIEDAは複雑である。静電力(ΔE^{ES})と分散力(ΔE^{DI})がほぼ同等のエネルギーを持っている。CHPIプログラムからCH/ π 相互作用が計測されていることも合わせると、CH/ π 相互作用も結合に関与していると考えられる。化合物6は中性分子であるが、周辺にはAsn140, Asp144, Asp145といった極性のアミノ酸残基が存在しており、これらの極性残基は化合物6のベンゼン環に電荷を誘導すると考えられる。結果的に化合物6とPhe83には、誘導電荷による静電相互作用が生じる。非極性アミノ酸残基間の相互作用は疎水相互作用であると考察されることが多いが、PIEDA解析を行うと、静電的な力も寄与していることが分かる。非極性アミノ酸残基の相互作用に関して、詳細な解析を行う必要がある事を示す結果である。

4-6-8 PIEDA解析によるFBDDプロセスの追跡

市原らはPIEDA解析によりFBDDの過程を確認して、静電力(ΔE^{ES})と分散力(ΔE^{DI})の割合が重要であることを示した^{2,5}。彼らの報告に従い、静電力(ΔE^{ES})と分散力(ΔE^{DI})の割合を調べるために、静電力を分散力と電荷移動力(ΔE^{CT})で割った値 $\{\Delta E^{ES} / (\Delta E^{DI} + \Delta E^{CT})\}$ を指標として評価を進めることとした。以後、 $\{\Delta E^{ES} / (\Delta E^{DI} + \Delta E^{CT})\}$

は ES/D+CT と記述する。化合物 2-6 の ES/(D+CT) 値は 0.51 (化合物 2), 0.71 (化合物 3), 0.64 (化合物 4), 0.60 (化合物 5), 0.70 (化合物 6) であった。化合物 3, 4, 5, 6 ではそれほど大きな差は無かった、このことは化合物 3, 4, 5, 6 において分散力の観点では最適化が十分でなく、分散力を有活に活用できれば親和性はさらに上がる事を示唆している。BRD4 タンパク質に対して化合物 6 よりも強い活性を持つ別の骨格の化合物が知られているので、それらの中から 2 化合物を選んで解析を行った。

4-7 別母核の化合物に対する解析

いくつかのベンゾジアゼピン誘導体 (BzDs) は、 γ -アミノブチル酸 (GABA) 受容体に結合する薬理メカニズムで、睡眠障害・発作抑制・痙攣抑制・抗不安等の薬として承認されている。2010 年には BzDs がプロモドメインタンパク質に結合することが明らかになり、プロモドメインに関する作用に関して詳細な研究が行われている²⁶。化合物 7 は BzDs 誘導体の中でもプロモドメインに対して高い親和性 (16nM) を持つ化合物である。

FMO 計算から、化合物 7 は 13 個のアミノ酸 (Asn140, Ile146, Phe83, Lys141, Leu92, Pro82, Trp81, Val187, Tyr97, Asp145, Leu94, Tyr139, Leu94, Tyr139) と 7 個の水分子 (water2215, water2177, water2183, water2104, water2095, water2104, water2104) との相互作用が示された。Asn140, Asp145, Asp144 との間の IFIE はそれぞれ -10.9, -4.0, -7.0 kcal/mol であり、化合物 6 よりその値は小さい。一方、Ile146 と Phe83 の IFIE は (6:7 -6.4 vs -10.6, -7.3 vs -9.9) であり、化合物 7 の方が大きな IFIE 値を持つ。また化合物 6 では観測されなかった IFIE が、Leu92, Pro82, Val187 で見られている。これらの相互作用によって、化合物 7 は化合物 6 に比べて高い親和性を持つと考えることが出来る。

化合物 8 はチエノジアゼピンを母核として持つ化合物であり、プロモドメインに対して高い親和性 (15nM) を持つ。FMO 計算より、化合物 8 は 10 個のアミノ酸 (Asn140, Phe83, Trp81, Ile146, Pro82, Tyr97, Val187, Lys141, Leu92, Tyr139) と 4 個の水分子 (water318, water320, water388, water376) との相互作用が示された。化合物 7 と化合物 8 の IFIE は良く似ている (表 4.6)。

ES/(D+CT) は、化合物 7 が 0.29、化合物 8 が 0.35 であり、両化合物共に分散力が高い親和性に関与していることが推測できる。PIEDA 解析より化合物 7 と化合物 8 の親和性向上には非極性アミノ酸残基の相互作用が重要な寄与をしていることが明らかになった。

表 4.6 化合物 7, 8 の IFIE (単位 : kcal/mol)

化合物 7 の IFIE		化合物 8 の IFIE	
Asn140	-10.9	Asn140	-15.0
Ile146	-10.6	Phe83	-11.0
Phe83	-9.9	Water318	-7.6
Water2215	-8.2	Trp81	-6.7
Lys141	-6.6	Ile146	-6.3
Leu92	-6.2	Pro82	-4.9
Water2177	-6.1	Water320	-4.8
Water2183	-5.3	Tyr97	-4.7
Pro82	-5.1	Val87	-3.7
Water2126	-4.7	Water388	-3.5
Water2095	-4.6	Lys141	-3.5
Trp81	-4.4	Leu92	-3.3
Val87	-4.2	Water376	-3.2
Tyr97	-4.1	Tyr139	-3.1
Asp145	-4.0		
Asn93	-3.6		
Water2104	-3.3		
Leu94	-3.2		
Tyr139	-3.0		
Water2101	-3.0		

4-8 CH/ π 相互作用の比較

PIEDA 解析により分散力の寄与が親和性向上に重要であることが分かったので、主に分散力由来の相互作用である CH/ π 相互作用が親和性向上に寄与していると考えて、化合物 6, 7, 8 に関して CHPI プログラムを用いて関与している CH/ π 相互作用を計測した (表 4.7)。

表 4.7 化合物 6, 7, 8 の CH/ π 相互作用

化合物 6	化合物 7	化合物 8
Phe83	Pro82	Trp81
Leu92	Phe83	Pro82
Leu94	Leu92	Phe83
Tyr97	Ile146	Leu92
Ile146		Ile146

その結果、化合物 6 と化合物 7, 8 の間で関与している CH/ π 相互作用が異なっていた。化合物 7 と化合物 8 には化合物 6 に見られる Leu94 と Tyr97 との CH/ π 相互作用が観測されない。一方で、BET-ブロモドメイン中で保存されている WPF モチーフを形成する Pro82 との間に CH/ π 相互作用が観測された。ペプチドリガンドとスルホンアミド誘導体 (化合物 2-6) では Pro82 との IFIE は弱く、Pro82 との相互作用は化合物 7 と化合物 8 に特徴的である。WPF モチーフは Trp81, Pro82, Phe83 によって形成されている。

WPF は連続した 3 つのアミノ酸からなる特徴的な構造を持つモチーフであり、リガンド結合サイトの一部を形成している。Pro82 は Trp81 と Phe83 に挟まれおり、ピロリジン環のアキシャル位の水素は Trp81 と Phe83 の芳香環と CH/ π 相互作用をしている。エカトリアル位の水素は結合サイトを向いており、リガンドの芳香族部分と CH/ π 相互作用をしている。化合物 8 の CH/ π ネットワーク²⁷を CHPI プログラムで調べると、化合物 8 は Trp81, Pro82, Phe83, Leu92, Ile146 に連なる大きな CH/ π 相互作用でつながったネットワークを形成していた。このネットワークは結合サイト全体に広がっており、化合物 7 と化合物 8 の高親和性に影響していると推測している。また WPF モチーフはペプチドリガンドの ϵ Ac-Lys5 と ϵ Ac-Lys8 のアセチル部分の近傍に存在している。

4-9 水分子の関与

化合物7と化合物8においてCH/ π 相互作用をしているベンゼン環の位置は、ペプチドリガンドの構造解析ではwater13Bがいる場所である(図4.8)。

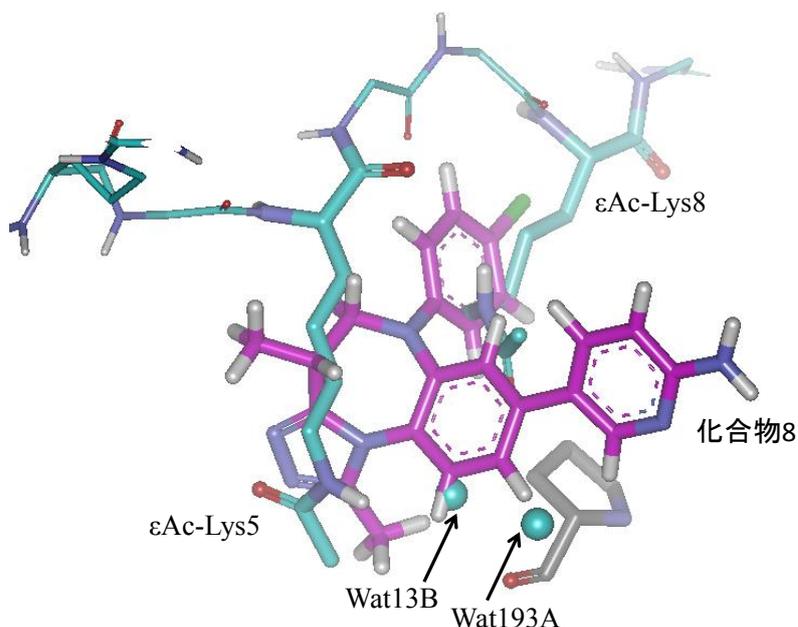


図 4.8 BRD4 複合体構造の重ね合せ図：リガンドペプチド（水色），化合物 8（紫色）

前述したように、Water13Bは ϵ Ac-Lys5と ϵ Ac-Lys8のアセチル部分と水素結合を介したネットワークを形成している。Water13BのプロモドメインとペプチドリガンドのIFIEを調べたところ、 ϵ Ac-Lys5、 ϵ Ac-Lys8、water193AとのIFIEが観測されたが、プロモドメインの間にはIFIEが観測されなかった。Water193Aはタンパク質の表面に存在することから、water13Bは結合部位において ϵ Ac-Lys5と ϵ Ac-Lys8による水素結合によって安定されていると推測できる。つまりwater13Bは結合サイトには ϵ Ac-Lys5と ϵ Ac-Lys8による安定化が無ければ存在できないとみなすことができ、water13Bはリガンドの結合にとって必須でないと考えられる。

結合サイトにおける水分子が安定に存在できる場所を評価できるSZMAP²⁸を使って、さらにwater13Bの性質を調べた。図4.9に示した結果から、water13Bが存在する場所は疎水的な部分構造を好む領域であることが分かる。この結果もwater13Bはリガンドの結合に必須でないことを示唆しており、IFIEからの考察とも一致する。

このように、水分子に対するIFIE解析は結合サイトにおける水分子に関してドラッグデザインに有用な情報を与えることができる可能性を示している。

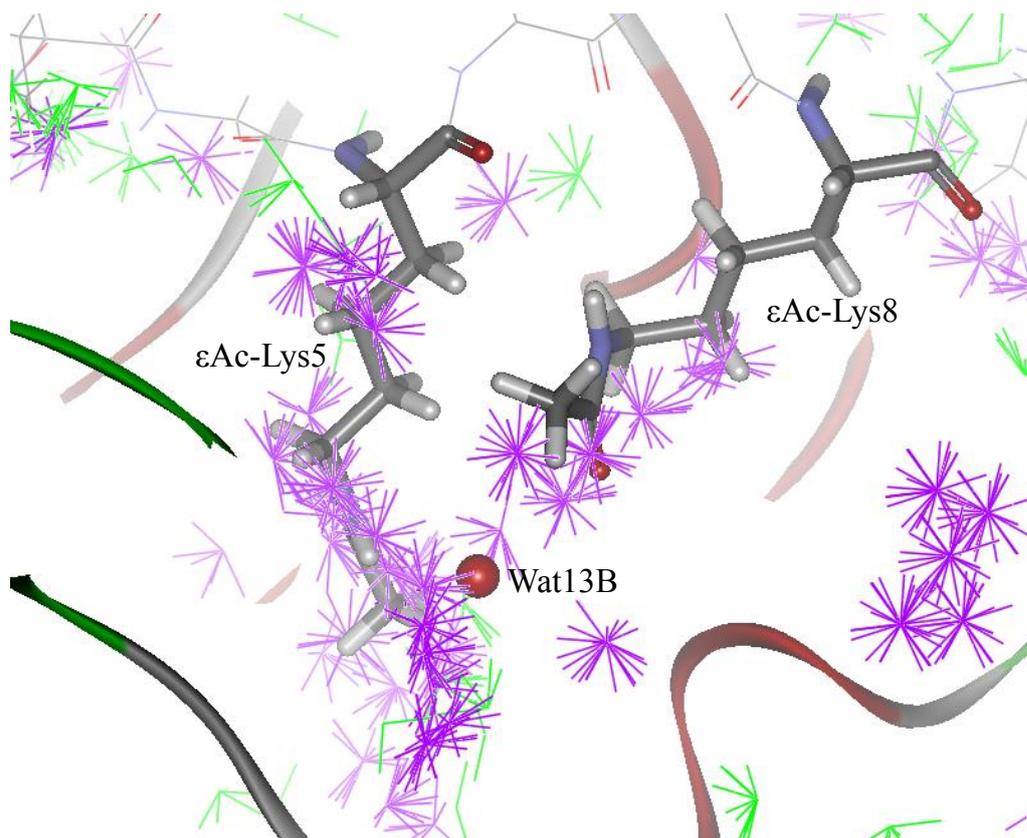


図 4.9 SZMAP 解析結果： 不安定水（紫色），安定水（緑色）

4-10 結論

FMO 計算をブロモドメイン 4 とその阻害剤（ペプチドリガンド 1・FBDD ヒット化合物 2・FBDD 展開化合物 3-6・別の骨格を持った化合物 7,8）に対して行った。FMO 計算によりペプチドと非ペプチド化合物の相互作用を比較することができ、また FBDD の過程を検証することができた。PIDA 解析により骨格毎に相互作用エネルギーの成分が異なることが示された。FMO 計算は水素結合・誘導電荷・CH/ π 相互作用・水分子のタンパク質とリガンドに対する親和性の影響に関して有用な情報を与え、分子間相互作用を考慮しながらドラッグデザインを行う時には、有用な手法となる。

表 4-S ペプチドリガンドの IFIE (単位 : kcal/mol)

BRD4	SER1	GLY2	ARG3	GLY4	ϵ Ac-Lys5	GLY6	GLY7	ϵ Ac-Lys8	
	GLY9	LEU10	GLY11	ALA12					
SER42	17.1	-0.2	29.4	1.0	-1.3	0.0	0.3	-0.6	0.3
	0.4	0.3	-9.6						
MET43	-0.1	-0.1	-1.6	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
ASN44	-1.8	0.0	-3.0	-0.3	0.3	-0.2	0.0	0.0	-0.1
	0.0	0.0	0.4						
PRO45	0.9	0.1	1.2	0.1	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
PRO46	0.1	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.2	0.0
	0.0	0.0	0.2						
PRO47	-0.8	0.0	-0.5	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.2						
PRO48	0.5	0.1	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	-0.2	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
GLU49	-11.4	-0.1	-11.4	-0.3	0.0	-0.1	0.2	0.7	0.0
	0.0	-0.1	7.5						
THR50	-0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.1						
SER51	0.3	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0						
ASN52	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.2						
PRO53	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0						
ASN54	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.2						
LYS55	11.1	0.2	10.2	0.3	0.1	0.1	-0.2	-0.7	-0.1
	0.0	0.1	-7.6						
PRO56	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0						
LYS57	8.7	0.1	8.6	0.2	0.1	0.0	-0.2	-0.6	-0.1
	-0.1	0.1	-6.8						

ARG58	9.3	0.2	8.1	0.2	0.1	0.1	-0.2	-0.4	-0.1
	-0.1	0.0	-7.1						
ALA59	-0.3	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
THR60	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						
ASN61	-0.1	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
GLN62	-0.4	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
LEU63	-0.3	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
GLN64	-0.4	0.0	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
TYR65	-0.2	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
LEU66	-0.2	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.3						
LEU67	-0.4	0.0	-0.4	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.4						
ARG68	9.0	0.2	8.6	0.1	0.2	0.0	-0.3	-0.7	-0.3
	-0.2	0.1	-8.1						
VAL69	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.1						
VAL70	-0.2	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	0.1	0.0	0.4						
LEU71	-0.3	0.0	-0.3	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
	0.1	0.0	0.4						
LYS72	9.7	0.3	9.4	0.1	0.4	-0.1	-0.3	-0.8	-0.4
	-0.4	0.1	-9.4						
THR73	0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
	0.0	0.0	0.1						
LEU74	-0.1	0.0	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	0.1	0.0	0.5						
TRP75	-0.4	0.0	-0.4	0.0	-0.1	0.0	0.1	0.3	0.2
	0.1	-0.1	0.6						

LYS76	9.8	0.3	9.5	0.1	0.4	-0.1	-0.4	-0.7	-0.6
	-0.6	0.0	-10.6						
HIS77	0.6	0.1	0.6	0.0	0.1	0.0	-0.1	-0.4	0.0
	0.2	0.2	0.3						
GLN78	-0.1	0.0	-0.5	0.0	-0.1	0.1	0.0	0.3	0.4
	0.6	-0.2	0.5						
PHE79	-0.2	0.0	-0.3	0.0	-0.1	0.1	0.1	0.3	0.5
	-1.4	-0.2	0.0						
ALA80	-0.9	-0.1	-0.7	0.0	-0.2	-0.1	0.3	0.9	-0.5
	-0.6	-0.1	-0.2						
TRP81	-0.7	-0.1	-0.7	-0.1	-0.5	-0.2	0.1	-0.8	-2.6
	-0.5	0.2	-1.0						
PRO82	0.1	0.0	-0.5	-0.1	-0.5	0.1	-0.3	-1.4	-0.5
	-0.2	0.1	-0.8						
PHE83	-0.9	-0.1	-1.1	-0.2	-5.7	-0.3	-0.3	-1.6	-0.5
	-0.2	0.1	-0.8						
GLN84	0.5	0.1	0.3	0.0	0.7	0.0	-0.2	-1.3	-0.1
	0.0	0.1	-0.6						
GLN85	1.7	0.2	1.8	0.1	1.4	0.0	-0.3	-2.7	0.1
	0.1	0.1	-0.9						
PRO86	-0.8	-0.1	-0.7	-0.1	-0.9	-0.1	0.1	0.8	0.0
	0.0	0.0	0.3						
VAL87	0.7	0.0	-0.3	0.1	-1.1	0.3	0.0	0.5	0.0
	0.0	0.0	0.2						
ASP88	-15.6	-0.3	-24.9	-0.7	1.6	0.7	-0.2	1.1	-0.2
	-0.4	-0.5	10.7						
ALA89	-0.3	-0.1	-2.2	0.0	0.5	0.2	-0.1	-0.2	-0.1
	-0.1	0.0	0.4						
VAL90	-0.1	0.1	-4.7	0.0	0.8	0.1	-0.2	-0.3	-0.1
	0.0	0.0	0.1						
LYS91	13.3	0.3	18.6	0.4	0.1	-0.8	0.1	-1.7	0.1
	0.4	0.5	-10.5						
LEU92	0.3	0.0	-0.2	0.2	-0.7	0.4	-0.2	-0.6	-0.1
	-0.1	0.0	0.3						
ASN93	-1.2	0.0	-10.1	-0.3	2.2	-0.2	-0.2	-0.4	-0.1
	0.0	0.0	0.1						

LEU94	-1.1	0.0	-29.5	-0.3	-1.2	-0.3	-0.2	-0.3	-0.1
	0.0	0.0	0.3						
PRO95	-0.5	0.2	9.0	0.0	-1.7	0.0	0.3	0.2	0.1
	0.1	0.0	-0.4						
ASP96	-39.5	0.0	-70.2	-11.7	3.7	-2.3	-0.3	-0.1	-0.7
	-0.7	-0.5	12.8						
TYR97	-2.6	0.6	4.8	0.4	-4.8	0.1	0.1	0.0	0.1
	0.0	0.0	-0.2						
TYR98	-1.4	0.1	2.4	0.3	-0.3	0.0	0.1	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.0						
LYS99	26.0	-1.6	39.2	2.4	-1.9	0.7	0.3	-0.3	0.5
	0.5	0.3	-10.7						
ILE100	0.0	-0.6	2.9	0.3	-0.3	0.1	0.0	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
ILE101	0.4	-0.3	2.8	0.4	-0.3	0.1	0.0	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.2						
LYS102	26.8	-0.7	22.4	1.4	-1.1	0.7	-0.2	-0.4	0.3
	0.3	0.2	-9.7						
THR103	1.6	0.0	1.0	0.1	-0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
PRO104	-0.6	-0.2	-0.1	0.0	0.0	-0.1	0.1	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
MET105	1.8	0.1	1.2	0.1	-0.1	0.1	-0.1	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.4						
ASP106	-17.0	-0.8	-17.1	-0.6	-1.7	-0.1	0.8	3.3	0.2
	-0.1	-0.4	11.3						
MET107	1.0	0.1	1.0	0.1	0.5	0.0	-0.1	-0.7	0.0
	0.0	0.1	-0.5						
GLY108	0.9	0.1	0.7	0.0	0.2	0.0	-0.1	-0.3	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
THR109	0.7	0.1	0.6	0.0	0.3	0.0	-0.1	-0.4	0.0
	0.0	0.0	-0.5						
ILE110	0.6	0.1	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	-0.2	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
LYS111	11.4	0.4	11.6	0.2	0.6	-0.1	-0.4	-1.6	-0.4
	-0.2	0.2	-9.8						

LYS112	12.6	0.4	13.8	0.4	0.6	-0.2	-0.3	-1.8	-0.2
	0.0	0.3	-9.6						
ARG113	14.2	0.3	13.0	0.4	0.2	0.2	-0.4	-1.2	-0.1
	0.0	0.2	-9.1						
LEU114	0.4	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.3						
GLU115	-9.9	-0.3	-10.1	-0.2	-0.4	0.1	0.3	1.1	0.3
	0.2	-0.2	8.7						
ASN116	0.7	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0
	0.0	0.0	-0.4						
ASN117	0.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.2						
TYR118	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						
TYR119	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0						
TRP120	0.3	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						
ASN121	0.5	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						
ALA122	-0.4	0.0	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
GLN123	-0.9	0.0	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.4						
GLU124	-11.8	-0.2	-10.0	-0.3	-0.1	-0.2	0.3	0.6	0.1
	0.0	-0.1	7.9						
CYS125	-0.5	0.0	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.2						
ILE126	-0.6	0.0	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.3						
GLN127	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
ASP128	-15.9	-0.4	-13.1	-0.5	-0.1	-0.3	0.5	1.1	0.1
	0.0	-0.2	9.5						
PHE129	-0.8	-0.1	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0
	0.0	0.0	0.3						

ASN130	-0.9	-0.1	-0.5	0.0	0.0	-0.1	0.1	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.6						
THR131	-1.0	-0.1	-0.3	0.0	0.1	-0.1	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.2						
MET132	-1.6	-0.1	-1.0	-0.1	0.1	-0.1	0.0	0.2	0.0
	0.0	0.0	0.2						
PHE133	-1.6	-0.3	-1.1	-0.1	0.5	-0.2	0.2	0.3	0.0
	-0.1	-0.1	0.5						
THR134	-2.4	-0.3	-0.9	-0.1	0.6	-0.2	0.1	-0.1	-0.1
	-0.1	0.0	0.4						
ASN135	-4.6	-0.3	-0.8	-0.1	0.2	-0.1	-0.1	-0.4	-0.1
	-0.1	0.0	0.0						
CYS136	-4.3	-0.8	-2.0	-0.3	1.3	-0.4	0.2	0.1	-0.1
	-0.1	-0.1	0.4						
TYR137	-4.3	-1.2	-1.3	-0.1	-0.2	-0.6	0.3	-0.5	-0.2
	-0.1	-0.1	0.8						
ILE138	-7.6	-0.8	-0.3	0.0	-0.6	-0.1	-0.1	-0.2	-0.1
	0.0	0.0	0.1						
TYR139	-27.6	-7.2	-4.5	-3.9	-4.2	-0.4	-0.4	-0.3	-0.1
	-0.1	0.0	0.1						
ASN140	-14.3	-16.0	-5.2	-3.2	-16.1	-2.7	-0.1	-0.8	-0.3
	-0.2	-0.1	0.3						
ALA141	-8.0	-0.4	1.2	-0.7	1.9	1.2	-0.3	0.4	0.2
	0.2	0.1	-0.7						
PRO142	4.4	0.6	-0.4	-0.1	0.0	-0.2	0.6	-0.4	-0.1
	-0.1	-0.1	0.6						
GLY143	0.6	0.2	-0.2	0.3	-0.2	-0.1	-0.3	-0.1	-0.1
	-0.1	0.0	0.6						
ASP144	-33.2	-4.1	-22.8	4.4	-10.7	-8.0	3.2	-6.4	-2.4
	-2.6	-1.0	25.0						
ASP145	-18.2	-1.2	-17.1	0.8	-1.6	-0.4	3.2	-27.1	-6.1
	-21.3	-8.7	30.5						
ILE146	0.9	0.2	1.1	-0.3	-1.1	0.9	-3.0	1.7	1.6
	1.6	0.3	-1.0						
VAL147	0.4	0.1	0.6	-0.3	1.1	0.5	-1.6	2.0	0.7
	0.6	0.2	-1.4						

LEU148	1.3	0.3	0.9	-0.1	0.3	0.4	-0.7	0.9	0.3
	-0.4	0.3	-1.0						
MET149	1.0	0.1	0.3	-0.1	0.0	0.3	-0.1	-0.5	-0.1
	-1.1	0.0	-1.0						
ALA150	1.1	0.2	0.7	-0.1	0.1	0.2	-0.5	0.7	0.1
	0.0	0.2	-1.0						
GLU151	-21.4	-1.3	-13.3	0.2	-0.6	-1.0	1.3	-1.2	0.0
	0.0	0.4	18.9						
ALA152	1.2	0.2	0.7	0.0	0.1	0.1	-0.3	0.1	0.0
	0.0	0.1	-0.8						
LEU153	1.0	0.1	0.6	0.0	0.0	0.1	-0.2	0.2	0.0
	0.0	0.0	-1.0						
GLU154	-19.5	-1.0	-12.8	-0.2	0.0	-0.7	0.9	0.4	0.1
	0.1	0.0	12.7						
LYS155	14.0	0.6	10.6	-0.1	0.4	0.4	-0.9	0.3	-0.4
	-0.7	-0.6	-16.0						
LEU156	0.8	0.1	0.5	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.7						
PHE157	0.7	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0
	-0.1	0.0	-0.7						
LEU158	0.6	0.1	0.4	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.5						
GLN159	0.6	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.4						
LYS160	11.0	0.4	9.5	0.0	0.4	0.1	-0.5	-0.5	-0.5
	-0.6	-0.1	-11.2						
ILE161	0.4	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.4						
ASN162	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.4						
GLU163	-9.7	-0.3	-8.3	0.0	-0.3	-0.1	0.4	0.3	0.4
	0.4	0.1	10.0						
LEU164	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.2						
PRO165	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						

THR166	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0						
GLU167	-9.2	-0.2	-7.8	-0.1	-0.1	-0.1	0.2	0.3	0.1
	0.1	0.0	7.3						
GLU168	-16.0	-0.3	-14.1	-0.2	-0.2	-0.1	0.4	0.6	0.3
	0.2	0.0	13.5						
Water28	1.2	0.3	-1.0	-2.5	-3.8	-2.5	0.6	-0.1	-0.1
	0.0	-0.1	-0.2						
Water172		-0.2	-0.5	-6.1	-1.8	0.3	0.0	0.0	0.1
	0.0	0.0	0.0	-0.1					
Water177		2.4	0.6	-1.9	-2.6	-0.5	-0.8	-0.3	-0.5
	-0.2	-0.1	-0.1	0.6					
Water208		0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.1	-0.1	0.3
	-0.4	-2.0	0.2	-0.6					
Water293		-0.3	0.1	-17.0	-0.5	-1.0	-0.5	0.3	0.1
	0.1	0.1	0.0	-0.3					
Water295		-0.4	0.0	-5.7	-0.1	0.5	-0.3	0.1	0.0
	0.0	0.0	0.0	-0.2					
Water302		0.4	0.1	0.3	-0.1	0.1	0.2	-1.3	2.3
	0.2	-3.0	-5.2	1.2					
Water13	0.0	0.0	0.3	0.0	-4.4	-0.2	-0.2	-10.0	0.1
	0.1	0.1	-0.3						
Water22	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	-0.1	-0.1	0.0	-10.6
	0.9	0.6	-0.6						
Water29	0.3	0.1	0.8	-0.2	0.6	1.4	-9.0	-1.5	0.3
	0.1	0.0	0.0						
Water46	-19.0	-1.1	-0.1	0.0	-0.1	0.0	-0.1	0.0	0.0
	0.0	0.0	-0.1						
Water62	0.0	0.0	-0.4	-0.2	0.1	0.1	-3.3	-17.6	1.4
	0.5	0.2	-0.6						
Water80	1.0	0.2	0.4	-4.0	-2.2	-7.8	0.4	-1.0	-0.3
	-0.2	-0.1	0.4						
Water104		0.4	0.1	1.1	-0.2	-1.3	-12.2	0.5	-0.5
	0.3	0.1	0.0	-0.3					
Water106		0.1	0.1	-2.5	1.6	-4.9	-0.3	-0.5	-0.1
	0.0	0.0	0.0	0.1					

Water147	0.2	-0.1	2.6	-10.0	-2.6	-1.4	-1.5	-0.5
	-0.2	-0.1	-0.1	0.4				
Water154	0.1	0.0	1.0	-0.1	-0.4	-2.3	-4.3	-1.9
	-0.5	-0.4	-0.2	0.8				
Water170	0.0	-4.4	2.2	0.5	0.0	0.1	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	-0.2				
Water174	2.0	0.1	-2.7	0.8	0.0	0.0	-0.1	-0.1
	0.0	0.0	0.0	0.1				
Water188	0.4	0.1	1.8	-0.2	-0.9	-3.4	-1.4	0.3
	-0.3	-0.2	-0.1	0.5				
Water196	0.1	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
	0.4	-0.8	-8.2	-2.6				
Water200	-0.4	1.0	-6.0	0.5	-0.2	-0.4	0.3	-0.2
	-0.1	-0.1	0.0	0.4				
Water247	-19.3	-2.9	1.4	0.2	-0.1	0.0	0.0	0.0
	0.0	0.0	0.0	0.2				
Water253	-11.7	-0.9	0.1	0.0	-0.1	0.1	-0.1	0.0
	0.0	0.0	0.0	-0.2				
Water262	-0.1	-0.9	-3.2	3.0	-1.6	-0.6	0.0	-0.1
	-0.1	-0.1	0.0	0.1				
Water263	0.9	0.2	2.4	-1.6	-3.7	2.0	-1.6	0.1
	-0.1	-0.1	-0.1	0.2				
Water265	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.2
	0.2	0.3	-1.4	-12.8				

4-1 1 引用文献

- ¹ R. R. Thangudu, S. H. Bryant, A. R. Panchenko, T. Madej, *J. Mol. Biol.* 415 (2012) 443-453.
- ² M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chemistry & Biology* 21 (2014) 1102-1114.
- ³ G. Fischer, M. Rossmann, M. Hyvonen, *Current Opinion in Biotechnology* 35 (2015) 78-85.
- ⁴ M. Brand, A. M. Measures, B. G. Wilson, W. A. Cortopassi, R. Alexander, M. Höss, D. S. Hewings, T. P. C. Rooney, R. S. Paton, S. J. Conway, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 22-39.
- ⁵ K. Kitaura, T. Sawai, T. Asada, T. Nakano, M. Uebayasi, *Chem. Phys. Lett.* 312 (1999) 319-324.
- ⁶ T. Nakano, T. Kaminuma, Y. Sato, M. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.* 318 (2000) 614-618.
- ⁷ D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, *Nature Reviews Drug Discovery* 15 (2016) 605-619.
- ⁸ D. E. Scott, M. T. Ehebauer, T. Pukala, M. Marsh, T. L. Blundell, A. R. Venkitaraman, C. Abell, M. Hyvönen, *CHEMBIOCHEM* 14 (2013) 332-342.
- ⁹ E. Barile, M. Pellecchia, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4749-4763.
- ¹⁰ I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 9997-10002.
- ¹¹ M. Ricardo, N. B. Martyn, B. Dejan, J. B. David, A. C. Dragan, G. Tina, V. S. Darren, R. P. H. Green, P. J. William, W. P. Jeff, S. Ulrich, G. S. Sitta, *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (2011) 188-195.
- ¹² A. E. Daniel, W. F. Stephen, E. H. Roderick, J. Wolfgang, J. Harren, *Nature Reviews Drug Discovery* 15 (2016) 605-613.
- ¹³ P. V. Fish, P. Filippakopoulos, G. Bish, P. E. Brennan, M. E. Bunnage, A. S. Cook, O. Federov, B. S. Gerstenberger, H. Jones, S. Knapp, B. Marsden, K. Nock, D. R. Owen, M. Philpott, S. Picaud, M. J. Primiano, M. J. Ralph, N. Sciammetta, J. D. Trzupek, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 9831-9837.
- ¹⁴ P. Filippakopoulos, S. Picaud, M. Mangos, T. Keates, J. P. Lambert, D. Barseyte-Lovejoy, I. Felletar, R. Volkmer, S. Müller, T. Pawson, A. C. Gingras, C. H. Arrowsmith, S. Knapp, *Cell.* 149 (2012) 214-231.
- ¹⁵ F. A. Remero, A. M. Taylor, T. D. Crawford, V. Tsui, A. Côté, S. Magnuson, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 1271-1298.
- ¹⁶ C. Chung, H. Coste, J. White, O. Mirguet, J. Wilde, R. L. Gosmini, C. Delves, S. M. Magny, R. Woodward, S. A. Hughes, E. V. Boursier, H. Flynn, A. M. Bouillot, P. Bamborough, J. G. Brusq, F. J. Gellibert, E. J. Jones, A. M. Riou, P. Homes, S. L. Martin, I. J. Uings, J. Toum, C. A. Clément, A. B. Boullay, R. L. Grimley, F. M. Blandel, R. K. Prinjha, K. Lee, J. Kirilovsky, E. Nicodeme, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3827-3838.
- ¹⁷ A. M. Taylor, R. G. Vaswani, V. S. Gehling, M. C. Hewitt, Y. Leblanc, J. E. Audia, S. Bellon, R. T. Cummings, A. Côté, J. C. Harmange, H. Jayaram, S. Joshi, J. M. Lora, J. A. Mertz, A. Neiss, E. Pardo, C. G. Nasveschuk, F. Poy, P. Sandy, J. W. Setser, R. J. Sims, Y. Tang, B. K. Albrecht, *ACS Med. Chem. Lett.* 7 (2016) 145-150.
- ¹⁸ P. Filippakopoulos, S. Picaud, O. Federov, M. Keller, M. Wrobel, O. Morgenstern, F. Bracher, S. Knapp, *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 1878-1886.

-
- ¹⁹ X. Ran, Y. Zhao, L. Liu, L. Bai, C. Yang, B. Zhou, J. L. Meagher, K. Chinnaswamy, J. A. Stuckey, S. Wang, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 4927–4939.
- ²⁰ C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 5061–5084.
- ²¹ K. A. Sharp, B. Honig, *Annu Rev Biophys Chem* 19 (1990) 301–332.
- ²² K. Kitaura, K. Morokuma, *J. Quantum. Chem.* 10 (1976) 325–340.
- ²³ http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/riss/dl/download/index.php#download_2
- ²⁴ Y. Umezawa, S. Tsuboyama, H. Takahashi, J. Uzawa, M. Nishio, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 71 (1998) 1207–1213.
- ²⁵ O. Ichihara, J. Barker, R. J. Law, M. Whittaker, *Mol. Inf.* 30 (2011) 298–306.
- ²⁶ M. Brand, A. M. Measures, B. G. Wilson, W. A. Cortopassi, R. Alexander, M. Höss, D. S. Hewings, T. P. C. Rooney, R. S. Paton, S. J. Conway, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 22–39.
- ²⁷ K. M. Sureshan, T. Uchimaru, Y. Yao, Y. Watanabe, *CrysEngComm*, 10 (2008) 493–496.
- ²⁸ A. S. Bayden, D. T. Moustakas, D. Joseph-McCarthy, M. C. Lamb, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2015) 1552–1565.

第5章 総括

本論文では、streptavidin-biotin およびプロモドメイン-阻害剤の2つの系に対してFMO法を中心とした計算化学手法を適応することで、ドラッグデザインにおける主要なリガンド-タンパク質の分子間相互作用の理解を深めるための検討を行ったものである。

第三章の「Streptavidin-biotinの相互作用解析」では、streptavidin-biotinの系について、その相互作用を検討した。BiotinはビタミンB群の生体内物質である。またStreptavidinはStreptomyces avidinii(細菌の一種)によって作られるタンパク質であり、Biotinと非共有結合性の結合をする。その相互作用は共有結合に迫る強さで、他のリガンド-タンパク質複合体では見られない特異的なものであるが、その相互作用に関する詳細な報告例は少ない。そこで、この強固な相互作用の理由を分子間相互作用に着目して、FMO法計算により検討した。その結果、分子間には、6つのアミノ酸側鎖と1つのアミノ酸主鎖による水素結合(主に静電相互作用)と、3つの脂溶性アミノ酸(Trp79, Trp108, 隣接ユニットのTrp120)によるCH/ π 相互作用が働き、この相互作用で強固に固定されていることが分かった。また、これら相互作用全体に対してCH/ π 相互作用が5分の1程度寄与していることが分かった。さらに、この分子はstreptavidin-biotin 1対1が4個集合した複合体で機能しているが、その構造の維持においてはユニット間のCH/ π 相互作用、即ちbiotinと隣接ユニットTrp120とを中心としたユニット間のCH/ π 相互作用のネットワークが、4量体構造を維持するのに重要であることが示唆された。

第四章の、「プロモドメイン阻害剤のリガンド-タンパク相互作用解析」では、プロモドメインとドラッグデザインされた阻害剤間の相互作用解析をFMO法により行った。プロモドメインはヒストンのアセチル化リジンを認識するアミノ酸100個程度のタンパク質ドメインであり、抗がん剤のターゲットとしても着目され、多くのプロモドメイン阻害剤の報告例がある。しかし、それらの分子間の相互作用については深く論じられていない。そこで、ドラッグデザインされた、活性既知阻害剤とプロモドメインとの複合体構造を調べ、FMO法による解析を行った。その結果、FMO法により求めたIFIE値(inter fragment interaction energy)と化合物の活性値に良い相関があることを見出した。また、化合物の高活性化にAsp145との静電的相互作用やPro82とのCH/ π 相互作用が寄与していることが示唆された。更に、各化合物とプロモドメインのアミノ酸との相互作用を調べたところ、高活性な化合物ほど相互作用パターンがペプチドリガンドに似ていることが分かった。既知化合物の活性値とFMO計算値とで良い相関関係が得られた本研究の結果は、実際に化合物合成を実施する前の段階でFMO法による化合物デザインの評価が可能であることを示したものである。

以上、本研究では、FMO法を中心とした計算化学によってリガンドとタンパク質の分子間相互作用の特徴や性質などを詳細に検討した。これらの結果は、今後更なる高活性化合物のデザインにおいて、重要な情報となることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇意なご指導、ご鞭撻を賜りました横浜国立大学大学院工学府機能発現工学専攻・上田一義教授に深く感謝申し上げます。また、上田研究室在籍中にお世話になった植村宣行修士ほか多くの方々に感謝申し上げます。

本研究の学位審査にあたり、審査にご尽力いただきました横浜国立大学大学院工学府の榊原和久教授、小林憲正教授、佐藤浩太准教授、川村出准教授に感謝申し上げます。

本研究に際し、多大なるご支援と研究の機会を与えてくださいましたキッセイ薬品工業株式会社代表取締役 神澤睦雄会長ならびに両角正樹社長に深甚なる感謝の意を表します。また、多大なご支援とご援助を頂きました、常務取締役 伊佐治正幸博士、常務取締役 竹花泰雄博士、取締役研究本部長 菊池伸次博士、研究本部の伊東史顕博士ならびに田中信之博士に感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、計算化学や論文作成において有益なご助言、ご指導を頂きました基盤技術研究所長 小沢知永博士に深く感謝いたします。また、計算化学の実施を援助して頂きました石井裕子修士に感謝いたします。

本研究のきっかけや分子間相互作用について御指導、御鞭撻を頂きました西尾元宏博士に感謝いたします。

最後に、本研究を進めるにあたり、終始協力、そして暖かく励ましてくれた家族に心から感謝いたします。

