

分子科学計算・シミュレーションを用いた
自由エネルギー変化の線形表現解析に基づく
定量的構造活性相関に関する研究

2013

比多岡 清司

目次

第1章 緒言	1
1.1 定量的構造活性相関	2
1.2 分子科学計算・シミュレーション	3
1.3 分子科学計算を用いた新しい定量的構造活性相関の試み	4
第2章 自由エネルギー変化の線形表現解析: Linear Expression by Representative Energy terms (LERE)	5
2.1 LERE-QSAR 式	5
2.2 Entropy-enthalpy 補償則	8
2.2.1 複合体形成過程における entropy-enthalpy 補償則 (経験則)	8
2.2.2 動的挙動を取り入れた configurational entropy の定量的評価 (理論計算)	10
2.3 代表自由エネルギー項	12
2.3.1 結合相互作用エネルギー項 (ΔE_{bind}^0)	13
2.3.1.1 分子力学法に基づく ΔE_{bind}^0 の古典的評価法	13
2.3.1.2 分子軌道法に基づく ΔE_{bind}^0 の量子化学的評価法	14
2.3.2 大規模分子系に対する ΔE_{bind}^0 の量子化学的評価法	15
2.3.2.1 非経験的フラグメント分子軌道 (FMO)法に基づく量子化学的評価法	15
2.3.2.1.1 阻害剤を単一フラグメントとした FMO 計算	16
2.3.2.1.2 阻害剤をフラグメント分割した FMO 計算	17
2.3.2.2 古典/量子化学の hybrid 評価法	18
2.3.3 分散相互作用エネルギー項 (E_{disp})	20
2.3.3.1 力場パラメータに基づく E_{disp} の古典的評価法	21
2.3.3.2 摂動論に基づく E_{disp} の量子化学的評価法	21
2.3.4 水和自由エネルギー変化項 (ΔG_{sol})	22
2.3.4.1 PB/GB 連続誘電体モデルに基づく ΔG_{sol} の古典的評価法	23
2.3.4.2 分極連続体モデルに基づく ΔG_{sol} の量子化学的評価法	25
2.3.4.3 古典/量子化学・連続誘電体モデルの hybrid 評価法	26
2.3.4.4 連続誘電体モデルに基づく溶媒効果の検証	28
2.3.5 解離自由エネルギー変化項 (ΔG_{diss})	33
2.4 結合相互作用エネルギー項および水和自由エネルギー変化項に対する理論的考察	34
2.5 小括	35

第 3 章	インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1-シアル酸誘導体の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化に対する LERE-QSAR 解析	39
3.1	序論	39
3.2	解析方法	45
3.2.1	化合物セット	45
3.2.2	N1-NA-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング	47
3.2.2.1	Set I 化合物の複合体構造のモデリング	47
3.2.2.2	Set II 化合物の複合体構造のモデリング	53
3.2.3	N1-NA-シアル酸誘導体に対する LERE-QSAR 解析	55
3.2.3.1	LERE-QSAR 解析 (N1-NA-Set I 化合物)	55
3.2.3.2	LERE-QSAR 解析 (N1-NA-Set II 化合物)	56
3.3	結果および考察	60
3.3.1	Set I 化合物の解析	60
3.3.1.1	Set I 化合物の N1-NA に対する結合相互作用様式	60
3.3.1.2	N1-NA-Set I 化合物の結合相互作用エネルギー解析	63
3.3.1.3	N1-NA-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析	65
3.3.1.4	阻害剤の各部分構造の全自由エネルギー変化に対する寄与	70
3.3.2	Set II 化合物の解析	73
3.3.2.1	Set II 化合物の N1-NA に対する結合相互作用様式	73
3.3.2.2	複合体形成に伴う自由エネルギー変化	77
3.3.2.3	N1-NA-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析	79
3.3.2.4	直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の結合相互作用様式の違い	82
3.3.3	LERE-QSAR 解析および古典 QSAR 解析に基づくシアル酸誘導体の活性発現メカニズムに対する物理化学的考察	86
3.4	小括	89
第 4 章	ヒト・ノイラミニダーゼ-2-シアル酸誘導体の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化に対する LERE-QSAR 解析	90
4.1	序論	90
4.2	解析方法	93
4.2.1	化合物セット	93
4.2.2	hNEU2-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング	94
4.2.3	LERE-QSAR 解析 (hNEU2-シアル酸誘導体)	97
4.3	結果および考察	98
4.3.1	シアル酸誘導体の hNEU2 に対する結合相互作用様式	98
4.3.2	hNEU2-シアル酸誘導体に対する LERE-QSAR 解析	101
4.3.3	阻害剤の各部分構造の全自由エネルギー変化に対する寄与	103

4.3.4	ヒト (hNEU2)およびインフルエンザウイルス (N1-NA)の比較解析	107
4.3.4.1	Oseltamivir の結合選択性の違い	107
4.3.4.2	LERE-QSAR 式に基づくシアル酸誘導体の阻害メカニズムの理解.....	110
4.3.5	Oseltamivir 服用後の副作用と hNEU2 の遺伝的多型との関連性	111
4.4	小括.....	113
第 5 章 ホモロジーモデリングに基づくヒト・ノイラミニダーゼ-1 の 3 次元立体構造の構築と LERE-QSAR 解析による構造妥当性評価.....		
5.1	序論.....	114
5.2	解析方法.....	118
5.2.1	ホモロジーモデリングによる hNEU1 の 3 次元立体構造構築	118
5.2.2	LERE-QSAR 解析に基づく hNEU1 立体構造の妥当性評価	121
5.2.2.1	化合物セット	121
5.2.2.2	hNEU1-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング	122
5.2.2.3	LERE-QSAR 解析 (hNEU1-シアル酸誘導体).....	125
5.3	結果および考察.....	125
5.3.1	タンパク質の構造評価手法に基づく hNEU1 予測立体構造の妥当性評価.....	125
5.3.1.1	タンパク質の構造評価	125
5.3.1.2	シアリドーシス患者における hNEU1 変異アミノ酸残基位置の検証.....	128
5.3.2	LERE-QSAR 解析に基づく hNEU1 予測立体構造の妥当性評価	130
5.3.2.1	hNEU1-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析	130
5.3.2.2	hNEU1-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析	131
5.3.3	hNEU1-Set II 化合物の結合相互作用エネルギー解析.....	134
5.4	小括.....	135
第 6 章 総括.....		
		137
謝 辞.....		139
引用文献.....		140

本稿で用いた省略形

AMBER	assisted model building with energy refinement
ASA	accessible surface area
BAR	Bennett acceptance ratio
bCA II	bovine carbonic anhydrase II
β -Gal	β -galactosidase
BSA	benzenesulfonamide
BSSE	basis set superposition error
CG	conjugate gradient
Con A	concanavalin A
CPCM	conductor-like polarizable continuum model
CT	charge transfer
DA	double-annihilation
DANA	2-deoxy-2,3-didehydro- <i>N</i> -acetyl-neuraminic acid
DEM	2,3-dihydroxypropyl ether DANA mimetic
DFT	density functional theory
ECL	<i>erythrina crystagalli</i> lectin
ECorL	<i>erythrina corollodendrum</i> lectin
EDA	energy decomposition analysis
EE	electronic embedding
EIL	<i>erythrina indica</i> lectin
ES	electrostatic
EX	exchange repulsion
FEP	free-energy perturbation
FMO	fragment molecular orbital
GAFF	general AMBER force field
GB	generalized Born
GTP	guanosine triphosphate
HA	harmonic approximation, hemagglutinin
hCath A	human cathepsin A
HCT	Hawkins-Cramer-Truhlar
HEM	3-hydroxypropyl ether DANA mimetic
HF	Hartree-Fock
hNEU	human neuaminidase
hNEU1	human neuraminidase-1
hNEU2	human neuraminidase-2

hNEU3	human neuraminidase-3
hNEU4	human neuraminidase-4
IEFPCM	integral equation formalism polarizable continuum model
IEM	isobutyl ether DANA mimetic
IFIE	inter-fragment interaction energy
IMP	inosine monophosphate
ITC	isothermal titration calorimetry
LD	Langevin dynamics
LERE	linear expression by representative energy terms
LFEP	linear free-energy principle
LIE	linear interaction energy
LJ	Lennard–Jones
M1	matrix protein
MAE	mean absolute error
MC	monte carlo
MD	molecular dynamics
ME	mechanical embedding
MFCC	molecular fractionation with conjugate caps
MIX	mixing terms
MM	molecular mechanics
MM/MD	molecular mechanics/molecular dynamics
MO	molecular orbital
MOE	molecular operating environment
MP2	second-order Møller–Plesset
MR	molar refractivity
N1-NA	influenza virus neuraminidase-1
NA	neuraminidase
NANA	<i>N</i> -acetyl-neuraminic acid
NMA	<i>N</i> '-methyl acetamide
NP	nucleoprotein
OBC	Onufriev-Bashford-Case
ONIOM	our own <i>N</i> -layered integrated molecular orbital and molecular mechanics
PB	Poisson–Boltzmann
PBC	periodic boundary condition
PCM	polarizable continuum model
PDB	protein data bank
PL	polarization

PME	particle mesh Ewald
PPCA	protective protein/cathepsin A
QHA	quasi-harmonic approximation
QM	quantum mechanics
QM/MM	quantum mechanics/molecular mechanics
QSAR	quantitative structure–activity relationship
RCSB	research collaboratory for structural bioinformatics
RESP	restrained electrostatic potential
RMSD	root mean square deviation
RMSF	root mean square fluctuation
SAR	structure–activity relationship
SBA	soybean agglutinin from <i>glycine max</i>
SBDD	structure based drug design
SCRF	self-consistent reaction field
SD	steepest descent
SGLD	self-guided Langevin dynamics
SIE	solvation interaction energy
TI	thermodynamics integration
TIP3P	three-point transferable inter-molecular potential
UA	united atom
UAFF	united-atom force field
VAST	vector alignment search tool
vdW	van der Waals
vRNP	viral ribonucleoprotein complex

第 1 章 緒言

創薬研究において、従来の試行錯誤的なアプローチをより効率化・迅速化させることを目的として、コンピュータを用いた様々な手法が開発され、創薬の現場で用いられるようになってきている。にもかかわらず、現在も新薬開発には長い時間と莫大な費用を要するうえにその成功率は低い。一方で、ヒトゲノムの解読完了をはじめとする様々な生物種のゲノミクスの進展に伴い、疾患と関連する膨大なオミックス情報が急速に集積されつつある。このような状況は創薬においても大きな意味をもつ。例えば、薬物分子の標的受容体となるタンパク質の 3 次元立体構造情報を活用する structure based drug design (SBDD) は応用され、創薬研究において実際に使われてきている。さらに、近年の飛躍的なコンピュータの演算能力の向上とともに分子科学理論と計算化学の進歩も目覚ましく、先端的な理論・計算化学法を創薬へと応用する新たな試みは、これまでの論理的創薬のアプローチと比較して効果的かつ高確度な医薬品設計につながることを期待されている。

一方で、定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship: QSAR) は、自由エネルギーの線形則 (linear free-energy principle: LFEP) に基づき、一連の薬物分子の標的受容体までの輸送過程から受容体との結合過程までの全自由エネルギー変化 (生物活性値) の変動を、化合物の化学構造に基づく各自由エネルギー関連パラメータの線形式から定量的に説明、さらに生物活性値が未知の化合物の活性値予測を行うことができる。QSAR は、標的受容体の構造情報を用いていないものの、これまでに数々の創薬の成功例が報告されていることから、論理的創薬における強力なアプローチである。しかしながら、薬物分子の生物活性値の変動は、薬物分子と標的受容体との間に働く分子間相互作用に起因するため、それらを分子科学計算・シミュレーションを用いて原子・電子レベルで定量的に明らかにすることは、薬物分子の活性発現メカニズムについてのより深い物理化学的理解および分子間相互作用に基づく新たな理解につながると考えられる。

本研究では、QSAR と分子科学計算・シミュレーションをリンクさせた LFEP に基づく自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE-QSAR) 解析を用いて、薬物分子-標的受容体の相互作用を原子・電子レベルにおいて定量的に理解することを目的とし、論理的創薬における従来の QSAR のさらなる発展として、新しい体系的な方法論の構築と検証を試みた。次節において、LERE-QSAR の構築とその有用性の検証について順次説明する。

1.1 定量的構造活性相関

薬物分子は、生体内の受容体と相互作用することによって生物活性を発現すること、また、薬物分子の化学構造を変化させるとこれらの生物活性値は一般に変化することなどから、薬物分子の化学構造と生物活性値との間には何らかの関係があることは容易に推測できる。この両者の間の関係の理解は、創薬研究における中心的位置を占めるものであり、新薬開発の根幹を担っていると思われる。類似の化学構造を有する薬物分子は、活性強度は異なるものの、類似の薬理作用を発現するという経験則から、現在もなお合成化学者が経験と直観的に薬物分子の化学構造を修飾することも行われている。また、時には間違った仮説に基づいて行ったことが思いがけない発見につながった例も知られている。薬物分子の化学構造と生物活性値の相関は構造活性相関 (structure-activity relationship: SAR) と呼ばれる。

現在の論理的な創薬の試みは medicinal chemistry として、薬理作用を有する薬物分子の発見、合成展開 (修飾)、そしてこれらの薬物分子を安全かつ有効な医薬品に発展させる方向で行われている。創薬の過程において、一般に、(1) 新規化合物 (薬物分子) の合成、(2) 吸収、輸送、分布、代謝に関連する化学的検討、(3) 受容体や酵素をはじめとする様々な生体高分子との相互作用解析、(4) 化学構造と生物活性値との間の関係の検討などが必要となる。生体に投与された薬物分子が吸収部位からタンパク質などの薬物受容体へと到達し、さらに受容体と相互作用する過程では、薬物分子の化学構造の物理化学的特性、たとえば、薬物分子全体もしくは特定の官能基の極性、イオン化能力や電子密度などが重要となる場合がある。これらの物理化学的特性は実験的に測定可能であり、生物活性値をそれらの関数として表現できる可能性がある。すなわち、一連の薬物分子の生物活性値を薬物の分子構造の物理化学的特性を用いて定量的に予測できる可能性がある。

現在、QSAR には種々の方法があるが、最も代表的かつ体系的なアプローチは 1964 年に提案された Hansch-Fujita 法 [1] であり、今日の QSAR の原型である。Hansch-Fujita 法では、一般に芳香族環上の置換基を系統的に変化させた一連の薬物分子について、生物活性値と化学構造との間の定量的関係を次式 (1.1) を用いて表す。

$$\log (1/C) = a \pi + b \pi^2 + \rho \sigma + \delta E_s + const \quad (1.1)$$

ここで、左辺の目的変数 $\log (1/C)$ は、薬物分子がある一定の生物活性を示すために必要な濃度 C の逆数の常用対数値で、薬物分子の輸送・分配過程や標的受容体との相互作用過程などを包含した実効的な薬物分子-生体系の自由エネルギー変化量に対応する。濃度 C は、 K_i , IC_{50} , LD_{50} などの活性値の指標が対応する。一方で、右辺の説明変数 π , σ , E_s はそれぞれ置換基ごとに定められた疎水性、電子的、立体的性質を表す自由エネルギー関連パラメータである。また a , b , ρ , δ は重回帰分析における最小二乗法により求まる回帰係数で

ある。以上をまとめると、Hansch-Fujita 法は LFEP に基づく薬物分子の活性値予測と活性発現メカニズムの推定のための統計的手法である。Hansch-Fujita 式は、現在までに多くの改良が重ねられるとともに、数々の創薬の成功例が報告されており、QSAR における一般的かつ最も強力な方法となっている。しかしながら、標的受容体の構造情報を考慮していないため、右辺の説明変数の原子・電子レベルでの解釈が必ずしも一義的でない場合も生じる。このことは、標的受容体の構造情報を考慮した新たな QSAR の構築が必要であることを示唆している。また、QSAR の方法論の成立基盤と適用限界の解明は、今後もお重要な研究課題であると思われる。

以上を鑑みて、薬物分子-標的受容体の相互作用の理解において、従来の QSAR より一歩踏み込んだ分子論的観点から捉えることは、QSAR のさらなる発展・展開につながると考え、本研究を遂行した。

1.2 分子科学計算・シミュレーション

理論・計算化学は、化学反応素過程、有機分子の構造やその反応性、核酸やタンパク質などの生体分子から星間分子に至るまでの幅広い化学反応を対象とし、それらを量子論などの物理の基礎理論から解明しようとするものであり、実験化学では“見えない”部分の本質の解明において、現在までに重要な役割を果たしている。今や理論・計算化学は、様々な化学現象の解明に対する必要不可欠なアプローチとなっており、理論化学者のみならず実験化学者も、実験結果の物理化学的な解析・解釈などにおいて日常的に用いている。理論・計算化学に基づく分子科学計算・シミュレーションの応用の一つが、コンピュータを利用する「インシリコ創薬技術」であり、実験だけからでは考察が困難な解析対象に対して、微視的な原子・電子レベルでの理解を可能とする。特に、解析対象が複雑あるいは巨大すぎて解析が困難である場合や、実験的検証に多くの時間・費用がかかるため事実上不可能である場合、または実験条件が極限状況ないしは危険を伴う場合などに、分子科学計算・シミュレーションは非常に有効となる。

一方で、これまでの分子科学計算・シミュレーションは高性能なコンピュータを利用可能な環境にある少数の研究者だけのものであった。しかしながら、近年の飛躍的なコンピュータの性能向上と低価格化の結果、非経験的分子軌道 (*ab initio* molecular orbital: MO)法による低分子有機化合物の反応性予測などは、研究室レベルでも比較的容易に実施可能な状況になっている。今や分子科学計算・シミュレーションは、有機低分子からタンパク質や核酸といった生体巨大分子に至るまで、広範な分子 (系)の解析に利用されている。理論・計算化学者は、大規模分子系を解析するための理論と解法のアルゴリズムを発展させ、スーパーコンピュータ「京」に代表される巨大超並列計算機の開発などと歩調をあわせた様々な理論計算手法を開発してきた。たとえば、大規模分子系に対する非経験的な全電子状態

計算としては、Kitaura ら [2-5]により提唱された非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital: FMO)法や反応中心を担う重要な部位は高精度な非経験的分子軌道法で取扱い、その他の部位はより低精度な古典力学法で取扱う古典/量子化学の hybrid 評価法 [6-9]を挙げることができる。このような新しい理論計算方法の出現により、分子科学計算・シミュレーションの適用範囲は急速に拡大している。このことは、理論・計算化学の一応用分野である SBDD においても重要な意味をもつ。SBDD における一つのアプローチである統計力学的方法に基づく自由エネルギーの評価法としては、熱力学的積分 (thermodynamics integration: TI)法 [10], 自由エネルギー摂動 (free-energy perturbation: FEP)法 [11], ベネット受容比 (Bennett acceptance ratio: BAR)法 [12], 二重消去 (double-annihilation: DA)法 [13], 線形相互作用エネルギー (linear interaction energy: LIE)法 [14]および溶媒和相互作用エネルギー (solvation interaction energy: SIE)法 [15]などが現在までに提案されている。しかしながら、いずれも一般性と実用性においてはまだまだ問題が残されている。また、創薬研究においては、~1 kcal/mol の全自由エネルギー変化の予測、すなわち化学的精度の予測が要求されるが、それを満たすのは現状では一般に困難が伴う。

現在の創薬研究においては、従来に比べて格段に高精度かつ高速化されている分子科学計算・シミュレーションが利用可能であるが、実験結果の最大限の活用と物理化学的な洞察を加えた解釈がますます重要な意味をもつと考えられる。

1.3 分子科学計算を用いた新しい定量的構造活性相関の試み

本研究では、薬物分子-標的受容体の相互作用を分子論的観点から原子・電子レベルで理解するために、両者の 3 次元立体構造情報に基づいた分子科学計算・シミュレーションを活用する新たな QSAR の構築と検証を試みた。すなわち、薬物分子の活性発現メカニズムの定量的な理解と予測を目的とし、物理化学的解釈と高い化学的精度の両立を図る一つの方法として、QSAR と分子科学計算・シミュレーションをリンクさせた LFEP に基づく自由エネルギー変化の線形表現 (LERE-QSAR)法 [16-21]の提案・構築・検証を行った。第 2 章で、一般化 LERE-QSAR 式の導出について概説した後、第 3 章および第 4 章では、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1 (N1-NA)およびヒト・ノイラミニダーゼ-2 (hNEU2)と代表的な抗インフルエンザ剤を含むシアル酸誘導体の複合体に対する LERE-QSAR 解析の検証を、第 5 章では、3 次元立体構造が未知であるヒト・ノイラミニダーゼ-1 (hNEU1)への適用について詳述する。第 6 章では本研究を総括し、今後の展望について述べる。

本研究の成果が薬物分子-標的受容体の相互作用の定量的な理解に対してより深い物理化学的描象を与えるにとどまらず、論理的創薬における新しい体系的な方法論につながることを期待される。

第 2 章 自由エネルギー変化の線形表現解析: Linear Expression by Representative Energy terms (LERE)

2.1 LERE-QSAR 式

自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE)解析 [16–21]において、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 ΔG_{obs} ($= RT \ln K$, R : 気体定数, T : 絶対温度, K : 平衡定数 (K_A , K_D , K_i , (IC_{50}) etc.))は、いくつかの自由エネルギー変化の加成性に基づき下式 (2.1)で表される。

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{others}} \text{ (additivity assumption)} \quad (2.1)$$

ここで、 ΔG_{bind} はリガンドとタンパク質との間の結合自由エネルギー、 ΔG_{sol} は複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化を表しており、これらは両分子の複合体形成の主要因となると考えられる。 ΔG_{others} はこれら二種類の代表自由エネルギー項 (representative energy terms)以外の自由エネルギー項の総和を表す。 ΔG_{others} は、一般に骨格が同一である一連の構造類似体 (congeneric series)とタンパク質との複合体形成においては、代表自由エネルギー項の総和 ($\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}$)に線形あるいは正の定数と仮定する (LERE approximation, 式 (2.2))。

$$\Delta G_{\text{others}} = \beta (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1 \text{ (LERE assumption)} \quad (2.2)$$

すなわち、 ΔG_{others} は複合体形成の前後におけるリガンドやタンパク質の構造変化に伴う変形エネルギーなどの penalty energy 項と考えられる ($\beta < 0$ and/or $\text{const}_1 > 0$)。また、式 (2.1) および(2.2)より、下式 (2.3)が得られる。

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1 \quad (2.3)$$

一般に、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} は、enthalpic 変化 (ΔH_{obs})のみならず、温度に依存する entropic 変化 ($-T\Delta S_{\text{obs}}$)も加わった自由エネルギー変化が支配すると考えられるが、タンパク質などの大規模分子系に対する entropic 変化項を分子科学計算・シミュレーションにより定量的に評価することは現状では困難である。一方で、多くの化学反応や生物学的プロセスにおいて、enthalpic 変化と entropic 変化との間には経験的に強い線形関係が成立することが知られており、この関係は entropy–enthalpy 補償則 (entropy–enthalpy compensation rule, 式 (2.4)) [22–26]と称される。

$$T\Delta S_{\text{obs}} = \alpha \Delta H_{\text{obs}} + \text{const}_2 \text{ (entropy–enthalpy compensation rule)} \quad (2.4)$$

リガンドとタンパク質の複合体形成過程においても、この経験則が良好に成立することが多くの等温滴定熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC)の実験から報告されており [27–30], これは両分子の複合体形成に伴い生じる enthalpic 変化による利得が、同時に生じる entropic 変化による損失によって補償されることを意味する ($\alpha > 0$). すなわち、本研究で用いる一連の構造類似体とタンパク質の複合体形成においても entropy–enthalpy 補償則が成立することが期待される. したがって、entropy–enthalpy 補償則から式 (2.3)における ΔG_{bind} を変形し ($\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H_{\text{bind}} - T\Delta S_{\text{bind}} \approx (1 - \alpha) \Delta E_{\text{bind}} + \text{const}$ (なお、溶液中では体積・圧力の変化が無視できるため ΔH_{bind} は結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind})と同等であると考えられることから $\Delta H_{\text{bind}} \approx \Delta E_{\text{bind}}$ とした)), また ΔG_{sol} を変形することで ($\Delta G_{\text{sol}} = \Delta H_{\text{sol}} - T\Delta S_{\text{sol}} \approx (1 - \alpha) \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \text{const}$ (なお、 ΔH_{sol} は水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)とほぼ等しい ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}/\Delta H_{\text{sol}} = 0.983$) [31]と考えられるため $\Delta H_{\text{sol}} \approx \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ とした)), 下式 (2.5)を得る.

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + \text{const}_3 \quad (2.5)$$

ここで、右辺の第一項の係数 $\gamma_1 (= (1 + \beta)(1 - \alpha))$ は線形定数である. ΔE_{bind} および $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は主要な代表自由エネルギー項であり、複合体形成の結合および水和過程において支配的な役割を担うと考えられる. 一方で、本研究で用いるシアル酸誘導体は解離基を有しているため、その部分構造の解離自由エネルギー変化 (ΔG_{diss})も、 ΔG_{obs} の変動を担う一つの要因になる. また、シアル酸誘導体の解離過程およびタンパク質との相互作用過程における自由エネルギー変化は、 ΔG_{obs} の変動に対してそれぞれ独立して寄与すると考えられる [32, 33]. すなわち、 ΔG_{obs} は相互作用過程を反映する ΔE_{bind} および $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の和と解離過程を反映する ΔG_{diss} の線形式として表現可能であり、これを LERE-QSAR の基本式 (2.6)とした.

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}} + \text{const}_3 \text{ (LERE-QSAR equation)} \quad (2.6)$$

ここで、右辺の第一項の ΔE_{bind} は、分散相互作用以外の相互作用に基づく結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0)および分散相互作用エネルギー (E_{disp})の和として表される ($\Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}}$). ΔE_{bind}^0 は、非経験的分子軌道 (*ab initio* molecular orbital: MO)法では Hartree–Fock (HF)エネルギー、分子力学法では非結合原子間の静電相互作用エネルギーと斥力エネルギー (Lennard–Jones R^{-12} (LJ12))の和として算出できる. ΔG_{sol} については、極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)に加えて entropic 変化項も含む非極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$)の寄与もあるが ($\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$), $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$ の化合物間の変動は $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の変動と比べてきわめて小さいため、 $\Delta G_{\text{sol}} \approx \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ として評価した. また、右辺の第二項 ΔG_{diss} の係数 γ_2 は

解離過程における entropy–enthalpy 補償則 [34]などの補償効果を反映する線形定数である。また、基本式 (2.6)に明示的に現れない ΔG_{others} の効果は、線形定数 β (および $const_1$)に反映されると考えられるが、この penalty energy 項の性質は、*N*'-methyl acetamide (NMA)–acetophenone 置換体の簡易相互作用モデルの解析系 ($n = 41$) [35]から確認できる。図 2.1 は、acetophenone 置換体と NMA の複合体形成に伴う全分子間相互作用エネルギー $-\Delta G_{\text{total}}$ ($= \Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + BSSE + E_{\text{M06-2X}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}} + \Delta G_{\text{ther}} - 3RT$)に対する各エネルギー項の関係を示す。代表自由エネルギー項 ΔG_{rep} ($= \Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + E_{\text{M06-2X}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}$)は、 ΔG_{total} の寄与の大部分を担うが、結合・水と自由エネルギー変化項を過大に評価していることを確認できる ($slope = 1.41$)。一方で、 $BSSE$ および ΔG_{ther} の寄与は小さいものの、 ΔG_{rep} と逆相関関係にあることから、penalty energy 項として寄与している。実際のリガンドとタンパク質の複合体形成過程においては、これら penalty energy 項に加えてその他の種々のエネルギーの寄与も大きいと考えられるため [36–38], より強力な penalty 効果が働くと思われる。

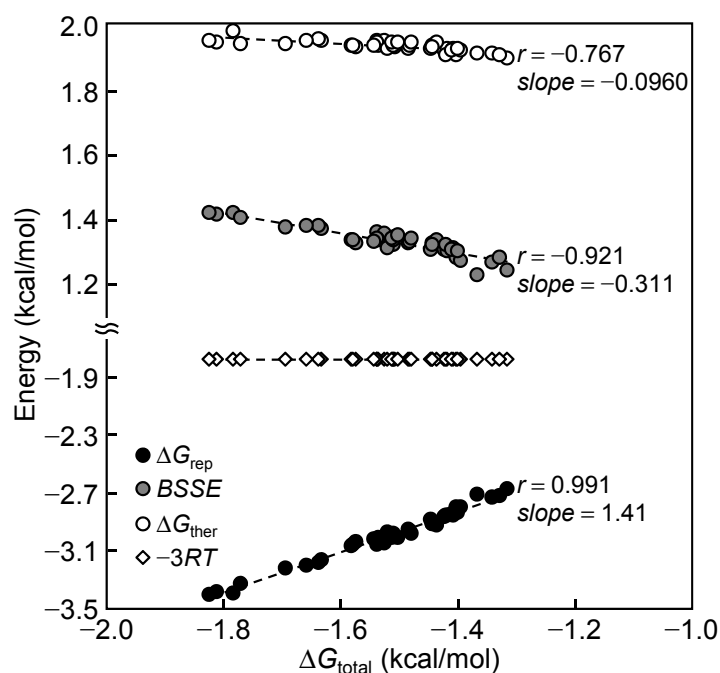


図 2.1 ΔG_{total} と各エネルギー項 (ΔG_{rep} , $BSSE$, ΔG_{ther} , $-3RT$)のプロット

$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$, $E_{\text{M06-2X}}$ および $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}$ は、HF/6-31G(d,p) (ΔE_{bind}^0 に対応), M06-2X (E_{disp})および conductor-like polarizable continuum model (CPCM)/HF/6-31G(d,p) ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)からそれぞれ算出した。Basis set superposition error ($BSSE$), ΔG_{ther} および $-3RT$ は、基底関数重なり誤差, thermal energy (振動)項および並進, 回転 energy ($T = 298$ K)をそれぞれ表す。

本研究では、第3章、第4章および第5章のそれぞれにおいて、基本式 (2.6) に基づく LERE-QSAR 解析を行った。

2.2 Entropy–enthalpy 補償則

2.2.1 複合体形成過程における entropy–enthalpy 補償則 (経験則)

一般に、熱力学平衡状態におけるリガンドとタンパク質の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) は、実測される両分子間における平衡定数 K と関連し、enthalpic 変化 (ΔH_{obs}) と entropic 変化 ($-T\Delta S_{\text{obs}}$) に依存する (式 (2.7))。

$$\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln K = \Delta H_{\text{obs}} - T\Delta S_{\text{obs}} \quad (2.7)$$

前節の式 (2.4) で示したように、 ΔH_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ との間には経験的に良好な補償関係が成立すると考えられるが、その起源は一連のリガンドと単一のタンパク質の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動が、 ΔH_{obs} や $-T\Delta S_{\text{obs}}$ のそれらと比べてかなり小さいことが、多くの実験系において確認されたことによる。すなわち、 ΔH_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ との間に補償関係が成立する結果として、 ΔG_{obs} の変動はきわめて小さくなると考えられる [39]。しかしながら、この補償関係は実験計画・手法やランダム誤差に起因する“artificial”なものであるとの主張もあり [40, 41]、その可観測性については未だ議論が続いている [42–46]。その不確定性の根源は、van't Hoff プロット ($\ln K = \Delta H_{\text{obs}}/RT - \Delta S_{\text{obs}}/R$) の傾きから得られる ΔH_{obs} の誤差が、 ΔG_{obs} の測定誤差に比べて大きいことによる。さらに、この傾き ($\Delta H_{\text{obs}}/R$) の誤差が切片 ($-\Delta S_{\text{obs}}/R$) の誤差と相関し、これが ΔH_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ との間に強い相関関係を生じる原因と考えられる。一方で、ITC は分子同士の結合に伴い発生する微小な熱量変化を計測し、滴定曲線から結合定数 K_a および ΔH_{obs} を求めることができる。また、式 (2.7) から ΔG_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ を算出できることから、van't Hoff プロットとは異なり、ITC はこれら熱力学状態量を独立かつ正確に測定できる。すなわち、ITC により実測される ΔH_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ との間の強い補償関係は、その存在に対する十分な根拠となると考えられる。Olsson ら [47, 48] は、実験誤差を除いた大規模な ITC の実測データを用いた統計解析から、entropy–enthalpy 補償則がリガンドとタンパク質の複合体形成において広範かつ強力に成立することを見出している。実際に、本研究で用いるシアル酸誘導体のような糖化合物とその分解タンパク質の複合体形成に伴う ΔH_{obs} と $-T\Delta S_{\text{obs}}$ との間においても良好な補償関係が成立すること (図 2.2)、また、その他の多くの解析系においてもきわめて広範に成立することを確認している (表 2.1)。したがって、前節の LERE-QSAR の基本式 (2.6) において、entropy–enthalpy 補償則の経験則に基づき entropic 変化を考慮することは妥当であると考えられる。

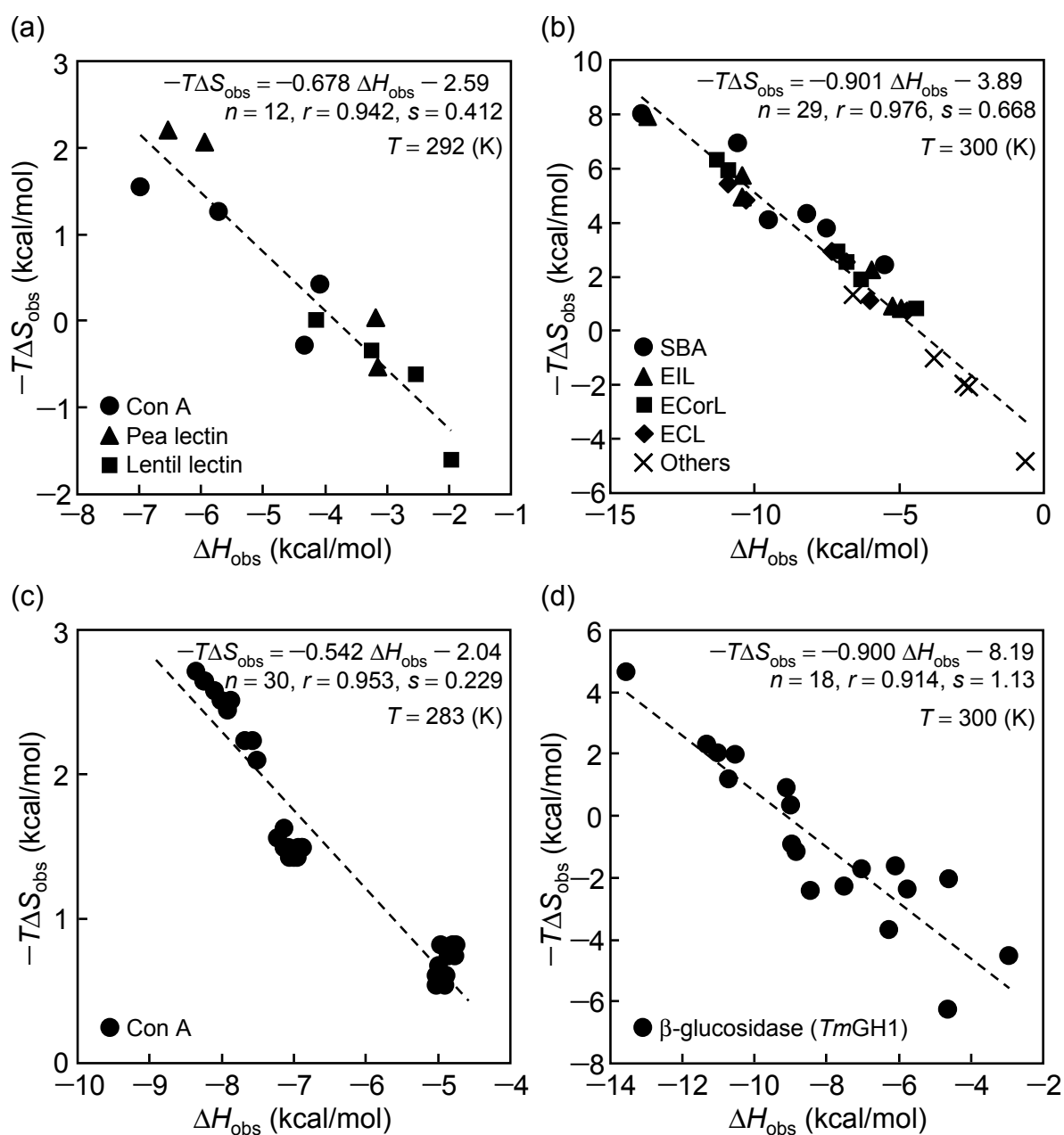


図 2.2 糖化合物と分解タンパク質の複合体形成過程における entropy–enthalpy 補償則 (a) Concanavalin A (Con A), pea lectin, and lentil lectin [49], (b) Soybean agglutinin from *glycine max* (SBA), *erythrina indica* lectin (EIL), *erythrina corollodendrum* lectin (ECorL), *erythrina crystagalli* lectin (ECL), and others [50], (c) Con A [51], (d) β -glucosidase (*TmGH1*) [52].

表2.1 Entropy–enthalpy 補償則 (式 (2.4))の実例 [49–66]

$T\Delta S_{\text{obs}} = \alpha \Delta H_{\text{obs}} + \text{const}_2$					
protein	n^a	r^b	α	const_2	ref.
Con A, pea lectin, and lentil lectin	12	0.942	0.678	2.59	[49]
SBA, EIL, ECorL, ECL, and others	29	0.976	0.901	3.89	[50]
Con A	30	0.953	0.542	2.04	[51]
Cytochrome c peroxidase (W191G mutant)	13	0.977	0.937	4.51	[53]
Third PDZ domain from the postsynaptic density 95 kDa (PSD-95) protein	9	0.907	0.651	5.16	[54]
Four- α -helix bundle protein	10	0.942	0.924	-4.22	[55]
Growth factor receptor-bound protein 2 SH2 domain	6	0.906	0.535	5.13	[56]
Farnesyl diphosphate synthase	6	0.995	1.06	9.13	[57]
HIV-1 protease	7	0.990	0.915	13.8	[58]
Renin	11	0.985	0.955	8.63	[59]
β -glucosidase (<i>TmGH1</i>)	18	0.914	0.900	8.19	[52]
Serotonin transporter	9	0.955	0.914	11.4	[60]
Phosphoinositide-dependent protein kinase 1	8	0.988	1.13	7.04	[61]
Human purine nucleoside phosphorylase	17	0.954	0.658	7.70	[62]
Growth factor receptor bound protein 7 SH2 domain	6	0.996	1.04	7.29	[63]
Trypsin	8	0.992	1.04	37.8	[64]
Glucose-regulated protein 78 kDa	6	0.958	0.862	6.96	[65]
Homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase	5	0.995	1.01	7.77	[66]

^a Number of compounds.

^b Correlation coefficient.

2.2.2 動的挙動を取り入れた configurational entropy の定量的評価 (理論計算)

自由エネルギー変化 (ΔG)は、タンパク質–タンパク質やリガンド–タンパク質の相互作用における結合親和性を規定するだけでなく、酵素反応、電子移動、膜上でのイオン輸送および溶媒和などの多くの重要な過程を反映する状態量である。この ΔG は、式 (2.7)における ΔH と $-T\Delta S$ の両変化項によって支配されるため、これら熱力学状態量を定量的に評価することは、多くの興味深い現象を物理化学的な観点から理解するうえで重要になる。しかしながら、特に $-T\Delta S$ を理論計算に基づき定量的に評価することはきわめて困難であり、多くの方法論の開発と応用がなされているが、その評価には未だ多くの不確実性を伴う。

ある離散分子系に対する絶対 entropy (S)は, configuration i が Boltzmann 確率分布 $P_i^B (= \exp[-E_i/k_B T]/Z$, E_i : ポテンシャルエネルギー, k_B : Boltzmann 定数, T : 絶対温度, $Z (= \sum \exp[-E_i/k_B T])$: configurational 分配関数)に従うとした場合, 下式 (2.8)として表される.

$$S = -k_B \sum P_i^B \ln P_i^B = S_{\text{tra}} + S_{\text{rot}} + S_{\text{vib}} \quad (2.8)$$

ここで, S は主要な entropy 寄与 S_{tra} , S_{rot} , S_{vib} の総和として捉えることができ, それぞれは並進, 回転, 振動 entropy を表す. また, S_{tra} と S_{rot} の和は conformational entropy (S_{confor})であり, S_{confor} と S_{vib} の和は, configurational entropy (S_{config})と呼ぶ [67]. Go, Scheragaら [68, 69]により導入された調和近似 (harmonic approximation: HA)に基づく基準振動解析 (normal mode analysis)では, S は下式 (2.9)で与えられる.

$$S_{\text{ha}} = -R/2 \ln[\det(\mathbf{F})] \quad (2.9)$$

ここで, \mathbf{F} はエネルギー極小化後の質量加重原子座標に対する多次元ポテンシャルエネルギー関数の二階偏微係数を要素とし, ヘシアンと呼ばれる. HA は分子運動を調和振動的に振る舞いと仮定しているが, 一般にタンパク質のような生体高分子の集団揺らぎの主要な振動モードは, 非調和的振る舞いにより支配されることが知られている [70, 71]. 短時間スケールにおけるタンパク質全体の揺らぎは局所最小点の揺らぎ, すなわち調和振動により支配されると考えられるが, 長時間スケールにおける大きな揺らぎは多数の局所最小点の揺らぎの伝播, すなわち非調和振動により支配される [72–74]. そのため Gilsonら [75, 76]は, 調和性および非調和性の両効果を考慮することのできる独自のアプローチを報告しているが, これら HA に基づくアプローチは非調和性の問題に加え, 対象とする系の configuration が多い場合, 計算コストが高くなる問題を抱えている.

一方で, Karplus, Kushickら [77]は, 準調和近似 (quasi-harmonic approximation: QHA)に基づく HA の拡張アプローチを報告している. QHA では, 分子系における実効的な振動モードは多変数 Gaussian 確率分布に従うとし, その S は下式 (2.10)で与えられる [78–81].

$$S_{\text{qha}} = R/2 \{n + \ln[(2\pi)^n \det(\boldsymbol{\sigma})]\} \quad (2.10)$$

ここで, $n (= 3N, N$: 原子数)および $\boldsymbol{\sigma} (= \langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle$, $x_{i,j}$: Cartesian 座標)は, 内部座標の自由度および分散・共分散 matrix をそれぞれ表す. また, $\boldsymbol{\sigma}$ は HA における \mathbf{F} に対応する ($\mathbf{F} = k_B T \det(\boldsymbol{\sigma}^{-1})$). すなわち, QHA は原子位置揺らぎ (平均二乗変位)の動的挙動を考慮している点において, 少なくともいくつかの非調和性の効果を含んでいると考えられるが, 多次元ポテンシャルエネルギー関数における座標変位の3次以上のエネルギー項を基本的には無視しているため, S_{qha} は上限を与える ($S < S_{\text{qha}}$, S の過大評価) [79, 82]. そのため, 非調和性やその他のエネルギー項の効果を考慮する試みが報告されている [79, 83–

86]. しかしながら、通常 QHA では σ の算出に内部座標を使用するため、その実用性は制限される。一方で、Schlitter [87]は、“ad-hoc”な量子力学的 HA に基づく S の評価を報告している。Schlitter 近似は、 σ の算出において Cartesian 座標を内部座標に変換することなく直接使用できるため、実用的かつ簡便である利点を有しており、その S は下式 (2.11) で与えられる。

$$S_{\text{schl}} = R/2 \ln \det [\mathbf{1} + k_{\text{B}} T e^2 / \hbar^2 \mathbf{M} \sigma] \quad (2.11)$$

ここで、 e ($= \exp[1]$) および \hbar ($= h/2\pi$) は、Euler 数および換算 Planck 定数をそれぞれ表す。また、 $\mathbf{1}$ および \mathbf{M} は、単位および質量 matrix をそれぞれ表す。Schlitter 近似の実用性については、Schäfer ら [88–90] により広範に検証され、またその他にも多くの実用例が報告されている [91, 92]。さらに、Schlitter 近似と QHA の比較検証の報告もある [93, 94]。なお、上述した HA および QHA (Schlitter 近似) による S の評価では、 \mathbf{F} および σ をそれぞれ得る必要があるが、通常それらはモンテカルロ (monte carlo: MC) 法や分子動力学 (molecular dynamics: MD) 法から得られるダイナミクストラジェクトリの座標に基づき算出される。

本研究では、第 3 章において、一連のシアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成に伴う ΔS_{config} ($= \Delta S_{\text{confor}} + \Delta S_{\text{vib}}$) を評価するために、実用的かつ簡便な評価法である Schlitter 近似を用いた。また、理論計算により算出した ΔH と $-T\Delta S$ の間においても、entropy–enthalpy 補償則の経験則が成立するかどうかの確認検証も行った。なお、本研究における ΔS_{config} の理論計算にはすべて sch-s42 (in-house program) を使用した。

2.3 代表自由エネルギー項

2.1 節で導出した LERE-QSAR の基本式 (2.6) における代表自由エネルギー項は、分子力学/分子動力学 (molecular mechanics/molecular dynamics: MM/MD) シミュレーションにより得られる構造に対して、種々の分子科学計算に基づき算出した。基本式 (2.6) の右辺の第一項の結合相互作用エネルギー項 (ΔE_{bind}^0) は、MM 法 [95] に基づく古典的評価法、非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital: FMO) 法 [2–5] に基づく量子化学的評価法および古典/量子化学の hybrid 評価法 [6–9] から算出し、また分散相互作用エネルギー項 (E_{disp}) は、力場パラメータ [96, 97] に基づく古典的評価法および Møller–Plesset (MP) 摂動論 [98] に基づく量子化学的評価法からそれぞれ算出した。水和自由エネルギー変化項 (ΔG_{sol}) は、Poisson–Boltzmann/generalized Born (PB/GB) 連続誘電体モデル [99] に基づく古典的評価法および古典/量子化学・連続誘電体モデルの hybrid 評価法 [100] から算出した。右辺の第二項の解離自由エネルギー変化項 (ΔG_{diss}) は、分極連続体モデル [101] に基づく量子化学的評価法に基づき算出した。 ΔE_{bind}^0 , E_{disp} , ΔG_{sol} およ

び ΔG_{diss} の詳細な算出方法は、それぞれ 2.3.(1, 2)節, 2.3.3 節, 2.3.4 節および 2.3.5 節において順次説明する。

2.3.1 結合相互作用エネルギー項 (ΔE_{bind}^0)

リガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0)は、分散相互作用以外の相互作用に基づくエネルギー項であり、複合体形成の前後におけるエネルギーの差、すなわちリガンドとタンパク質の複合体状態 (complex)におけるエネルギーからそれぞれの単独状態 (protein, ligand)のエネルギーを差し引くことで算出した (図 2.3, 式 (2.12))。

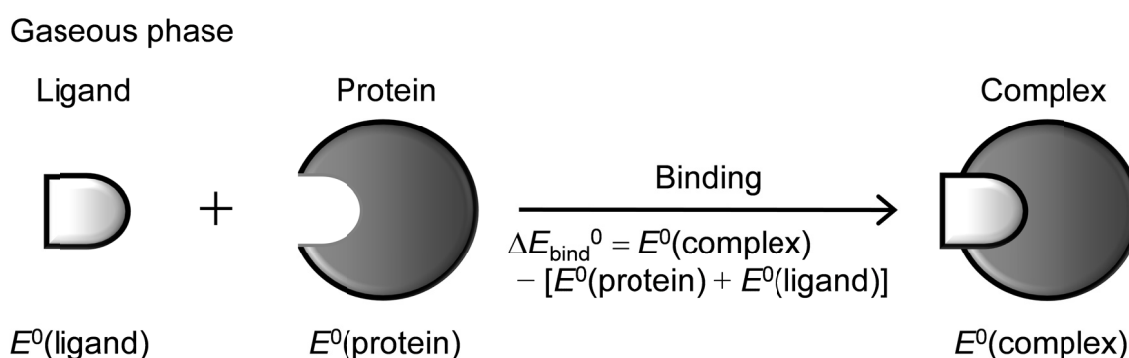


図 2.3 リガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0)

$$\Delta E_{\text{bind}}^0 = E^0(\text{complex}) - [E^0(\text{protein}) + E^0(\text{ligand})] \quad (2.12)$$

ここで、各状態 (complex, protein, ligand)におけるエネルギー (E^0)は、次節で示す古典的評価法、量子化学的評価法および古典/量子化学の hybrid 評価法に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。

2.3.1.1 分子力学法に基づく ΔE_{bind}^0 の古典的評価法

分子力学 (MM)法は、分子の挙動を解析するとき、その分子を構成する原子の原子核を質点と考え、マクロな世界で用いられる古典力学をそのまま持ち込んで、分子内の環境を 3 次元的なポテンシャル空間として記述する方法である。すなわち、MM 法では大胆な近似を用いているため、その計算は量子力学 (quantum mechanics: QM)法に比べて格段に速く、

QM 法で取扱うには困難な大規模分子系に対しても適用可能である。MM 法における系内のポテンシャルエネルギー (E)は、各原子間に働く力に対して古典力学により導かれる独立したポテンシャルエネルギー関数の総和として記述され、結合原子間項 (結合長, 結合角, 二面角)と非結合原子間項 (静電相互作用, van der Waals 相互作用)に大別される。後者は、リガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギーに対応するエネルギー項であり、静電相互作用エネルギー (E_{es})および van der Waals 相互作用エネルギー (E_{vdw})は、それぞれ下式 (2.13)および(2.14)で与えられる。

$$E_{es} = q_i q_j / \epsilon r_{ij} \quad (2.13)$$

$$E_{vdw} = A_{ij}/r_{ij}^{12} - B_{ij}/r_{ij}^6 = E_{LJ12} + E_{LJ6} \quad (2.14)$$

ここで, q, ϵ, r および $A (B)$ は, 原子の点電荷, 比誘電率, 原子間距離および LJ12 (LJ6)パラメータをそれぞれ表す。また, $E_{LJ12} (= A_{ij}/r_{ij}^{12})$ および $E_{LJ6} (= -B_{ij}/r_{ij}^6)$ は, LJ12 パラメータに基づく斥力エネルギーおよび LJ6 パラメータに基づく引力エネルギーにそれぞれ対応する。以上より, 式 (2.12)に示すリガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0)に対応するエネルギー項は, MM 法の非結合原子間項に基づく古典的評価法から算出できる (式 (2.15))。

$$\Delta E_{bind}^{MM/es + LJ12} = E^{MM/es + LJ12}(\text{complex}) - [E^{MM/es + LJ12}(\text{protein}) + E^{MM/es + LJ12}(\text{ligand})] \quad (2.15)$$

ここで, $E^{MM/es + LJ12}(\text{complex})$, $E^{MM/es + LJ12}(\text{protein})$ および $E^{MM/es + LJ12}(\text{ligand})$ のそれぞれは, E_{es} と E_{LJ12} の和として算出した。また, E_{LJ6} は後述の分散エネルギーに対応する。なお, 本研究における分子力場にはすべて Amber の力場パラメータ (AMBER10) [102]を使用した。

2.3.1.2 分子軌道法に基づく ΔE_{bind}^0 の量子化学的評価法

分子軌道 (MO)法は, 分子内の電子は原子核と他の電子によって作られる平均場の中を運動しており, 個々の電子の振る舞いを分子全体に広がった分子軌道関数により記述することで分子の電子状態を理論的に計算する方法である。すなわち, 分子の電子状態に対する Schrödinger 方程式を近似的に解く方法であり, その近似の程度により, 非経験的 (*ab initio*)MO 法, 半経験的 (semi-empirical)MO 法および経験的 (empirical)MO 法の 3 つの方法に大別される。なかでも, 非経験的 MO 法は最も高精度な方法であるが, タンパク質などの大規模分子系が解析対象となる場合, その計算は現実的に困難となる。しかしながら, 近年の飛躍的なコンピュータの演算能力の向上とともに発展してきた理論・計算化学の進歩

は目覚ましく、これまでに解析が困難であった大規模分子系に対しても、系全体を考慮した非経験的 MO 計算は現時点で既に可能となっている。その代表的な理論計算手法として、タンパク質などの大規模分子系をアミノ酸残基単位のフラグメントに分割して非経験的な全電子状態計算を高精度かつ迅速に行う FMO 法や古典/量子化学の hybrid 評価法により計算を行う QM/MM 法の開発を挙げることができる。FMO 法および QM/MM 法は、それぞれ 2.3.2.1 節および 2.3.2.2 節において順次説明する。

2.3.2 大規模分子系に対する ΔE_{bind}^0 の量子化学的評価法

2.3.2.1 非経験的フラグメント分子軌道 (FMO)法に基づく量子化学的評価法

Kitaura ら [2-5]により提唱された FMO 法では、タンパク質などの大規模分子系を数十原子程度の小さなフラグメントに分割して計算を行うことにより、計算コストを大幅に削減しながらも通常非経験的 MO 法と同等の結果を得ることができる。実際に FMO 法を使用した多くの成果が報告されている [18, 103-109]。FMO 法では、分子系を N 個のフラグメント (モノマー)に分割した場合、 I 番目のフラグメント (モノマー I)に対する Schrödinger 方程式 ($H_I \Psi_I = E_I \Psi_I$, H_I : Hamiltonian, Ψ_I : 波動関数, E_I : 電子エネルギー)を MO がフラグメント内に局在するようにして解く。 H_I には周囲の $N-1$ 個のフラグメントからの環境静電ポテンシャルが含まれているため、すべてのフラグメントについて電子密度が自己無撞着になるまで繰り返し計算を行うことで、フラグメントの分極相互作用に関して、 N 体までの高次項を取り込むことが可能となる。フラグメントペア (ダイマー IJ)についても、フラグメント (モノマー)の計算と同様にその Schrödinger 方程式 ($H_{IJ} \Psi_{IJ} = E_{IJ} \Psi_{IJ}$)を MO がフラグメントペア内に局在するようにして解く。 H_{IJ} にも周囲の $N-2$ 個のフラグメントからの環境静電ポテンシャルが含まれているが、この環境静電ポテンシャルはモノマー計算で得られたモノマーの電子密度を用いて計算される。上記の計算により得られる電子エネルギー E_I および E_{IJ} を用いることで、FMO 法による分子系の全電子エネルギー E は近似的に下式 (2.16)から算出される。

$$E = \sum_{I>J} E_{IJ} - (N-2) \sum_I E_I \quad (2.16)$$

以上より、式 (2.12)に示すリガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0) に対応するエネルギー項は、FMO 法に基づく量子化学的評価法から算出できる (式 (2.17))。

$$\Delta E_{\text{bind}}^0 = \Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} = E^{\text{FMO/HF}}(\text{complex}) - [E^{\text{FMO/HF}}(\text{protein}) + E^{\text{FMO/HF}}(\text{ligand})] \quad (2.17)$$

ここで、 $E^{\text{FMO/HF}}(\text{complex})$, $E^{\text{FMO/HF}}(\text{protein})$ および $E^{\text{FMO/HF}}(\text{ligand})$ のそれぞれは、FMO/HF/6-31G (計算方法: HF 法, 基底関数: 6-31G) に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。なお、HF エネルギーから算出される $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$ は、エネルギー分割法 (energy decomposition analysis: EDA) [110] に基づき多成分に分割可能であるが ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} = \Delta E_{\text{es}} + \Delta E_{\text{ex}} + \Delta E_{\text{CT}} + \Delta E_{\text{PL}} + \Delta E_{\text{MIX}}$, ΔE_{es} : 静電相互作用エネルギー, ΔE_{ex} : 交換反発エネルギー, ΔE_{CT} : 電荷移動エネルギー, ΔE_{PL} : 分極エネルギー, ΔE_{MIX} : その他のエネルギー成分), $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$ の変動の大半を担うのは ΔE_{es} であることを簡易相互作用モデルの解析系において明らかにしている [35]。なお、本研究における FMO 計算にはすべて ABINIT-MP ver. 4.1 [111, 112] を使用した。

2.3.2.1.1 阻害剤を単一フラグメントとした FMO 計算

FMO 法における分子系のフラグメント分割は、計算精度に影響を与える。通常、フラグメントサイズを大きくすれば計算精度は向上するが、同時に計算時間も増大するためバランスの取れた分割方法が必要となる。解析対象がタンパク質である場合、二残基単位で分割を行えば十分な精度が得られるが、リガンドとタンパク質を構成する各アミノ酸残基との間の相互作用を定量的に解析する場合は一残基分割としたほうが結果の解釈が容易になる。本研究の解析対象はタンパク質-リガンドの複合体系であるため、その目的からリガンドと各アミノ酸残基との間の相互作用を定量的に解析するために一残基分割とした。このとき、計算誤差を小さくするために、N 末端のアミノ酸残基については、キャップ部分である CH_3CO 基とそのアミノ酸残基との間の分割を行わずに単一フラグメントとした (図 2.4)。また、リガンドやその相互作用を媒介する重要な水についても同様に単一フラグメントとした。

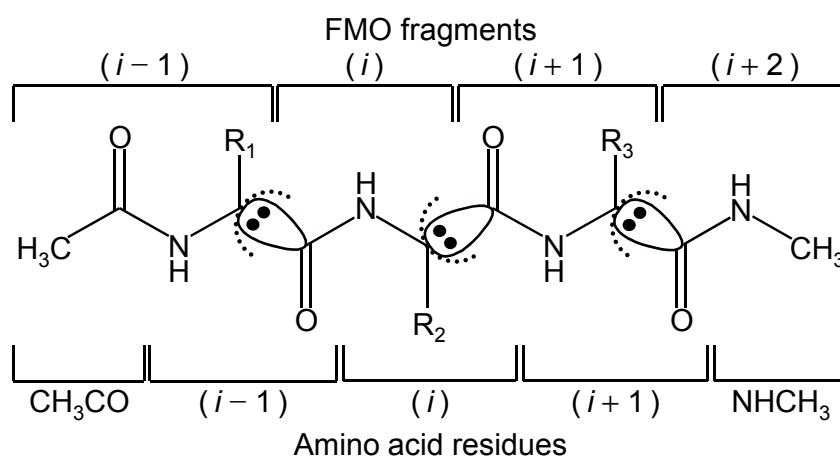


図 2.4 FMO 法におけるタンパク質のフラグメント分割 [18, 103–109]

CH_3CO 基, NHCH_3 基は、それぞれ N, C 末端のキャップである。

FMO 法では、リガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0)に加え、その計算過程においてタンパク質をアミノ酸残基単位にフラグメント分割するため、リガンドと各アミノ酸残基との間の相互作用エネルギーを定量的に解析することができる。このことは、式 (2.16)を下式 (2.18)へと変形できることから明らかである。

$$E = \sum_{I>J} \Delta \tilde{E}_{IJ} + \sum_I E'_I \quad (2.18)$$

ここで、 E は I 番目と J 番目のフラグメント間相互作用エネルギー $\Delta \tilde{E}_{IJ}$ (inter-fragment interaction energy: IFIE)と環境静電ポテンシャルからの寄与 V^I を除いたモノマーのエネルギー $E'_I (= E_I - \text{Tr}(\mathbf{P}^I \mathbf{V}^I))$ の和を用いて表される。また、 $\Delta \tilde{E}_{IJ}$ は下式 (2.19)で定義される。

$$\Delta \tilde{E}_{IJ} = (E'_{IJ} - E'_I - E'_J) + \text{Tr}(\Delta \mathbf{P}^{IJ} \mathbf{V}^{IJ}) \quad (2.19)$$

ここで、 E'_{IJ} および $\Delta \mathbf{P}^{IJ}$ は、ダイマーに対する環境静電ポテンシャルの寄与 \mathbf{V}^{IJ} を除いたダイマーのエネルギーおよびモノマーとダイマーの電子密度行列の差分行列をそれぞれ表す。IFIE ($\Delta \tilde{E}_{IJ}$)を用いることで、リガンドとタンパク質の各アミノ酸残基との間の相互作用を定量的に解析することができる。また、リガンドと各アミノ酸残基との間の IFIE の総和 (ΣIFIE)は、 ΔE_{bind}^0 に対応することが期待される (式 (2.20)) [16, 18, 109, 113, 114].

$$\Delta E_{\text{bind}}^0 = a \Sigma \text{IFIE} + \text{const} \quad (2.20)$$

2.3.2.1.2 阻害剤をフラグメント分割した FMO 計算

前節で説明したように、FMO 法ではタンパク質をアミノ酸残基単位にフラグメント分割するため、リガンドとタンパク質の各アミノ酸残基との間の相互作用エネルギーを定量的に解析することができる。さらに、通常タンパク質側のフラグメント分割に加えて、リガンド側もフラグメント分割を行うことで、より詳細な相互作用エネルギー解析が可能となる [18, 106–109]. 本研究では、阻害剤であるシアル酸誘導体を3つのフラグメント (fragments **A**, **B**, **C**)に分割することで (図 2.5), 相互作用における各フラグメントの寄与を定量的に明らかにすることを試みた。前節の式 (2.20)と同様に、各フラグメントとタンパク質の各アミノ酸残基との間の相互作用エネルギー (IFIE)の総和 ($\Sigma \text{IFIE}^{\text{fragment X}}$, $\mathbf{X} = \mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}$)およびその和 ($\Sigma \Sigma \text{IFIE} = \Sigma \text{IFIE}^{\text{fragment A}} + \Sigma \text{IFIE}^{\text{fragment B}} + \Sigma \text{IFIE}^{\text{fragment C}}$)は、 ΔE_{bind}^0 に対応することが期待される (式 (2.21)) [18, 109].

$$\Delta E_{\text{bind}}^0 = a \Sigma \Sigma \text{IFIE}^{\text{fragment X}} + \text{const} \quad (2.21)$$

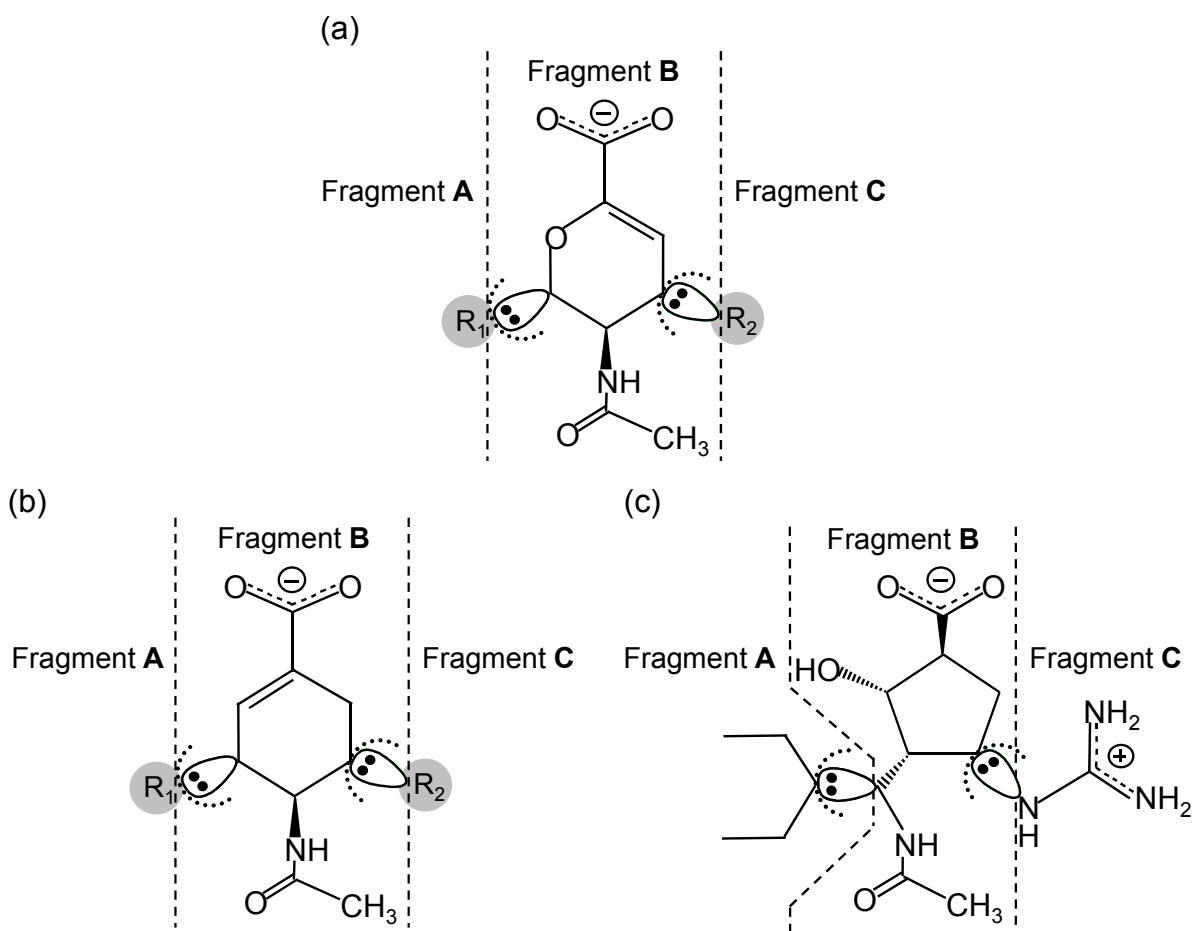


図 2.5 FMO 法における阻害剤のフラグメント分割 [18, 109]

(a) Zanamivir 誘導体, (b) Oseltamivir 誘導体, (c) Peramivir.

本研究では, 第 3 章および第 4 章において, 阻害剤であるシアル酸誘導体をフラグメント分割した FMO 計算を実行し, 相互作用の詳細解析を試みた.

2.3.2.2 古典/量子化学の hybrid 評価法

タンパク質などの大規模分子系全体に対する高精度な取扱いが困難である場合, その活性部位や反応中心を担う重要な部位はより高精度な QM 法で, その他の部位は低精度な MM 法で取扱う古典/量子化学の hybrid 評価法が有用となる. その代表的な手法として, Morokuma ら [115, 116]により提唱された QM/MM 法の一つである our own *N*-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics (ONIOM)法を挙げることができ, 実際に ONIOM 法を使用した多くの成果が報告されている [19, 117–119]. ONIOM 法では, 高

精度な MO 法と低精度な MM 法の組み合わせだけではなく、高精度な MO 法と低精度な MO 法を組み合わせるなど、解析対象に応じた任意の計算方法の組み合わせが可能である。二層型 ONIOM 法による分子系の全電子エネルギー E は近似的に下式 (2.22) から算出することができる。

$$E (\approx E_{\text{high}}^{\text{real}}) = E_{\text{low}}^{\text{real}} + E_{\text{high}}^{\text{model}} - E_{\text{low}}^{\text{model}} \quad (2.22)$$

ここで、分子系全体 (real) の高精度 (high) なエネルギー $E_{\text{high}}^{\text{real}}$ は、real に対する低精度 (low) なエネルギー $E_{\text{low}}^{\text{real}}$ 、重要な部位 (model) に対する high エネルギー $E_{\text{high}}^{\text{model}}$ および model に対する low エネルギー $E_{\text{low}}^{\text{model}}$ を用いて表される (図 2.6)。このように、領域に応じた計算を行うことで、計算コストを大幅に削減しながらも、real に対する high エネルギー $E_{\text{high}}^{\text{real}}$ を得ることができる。

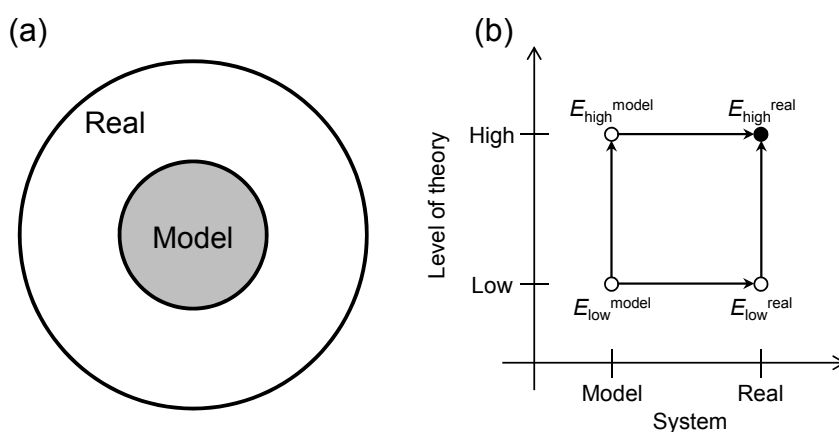


図 2.6 ONIOM 法のご概念図

(a) 分子系の領域定義, (b) エネルギー計算方法.

以上より、式 (2.12) に示すリガンドとタンパク質との間の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0) に対応するエネルギー項は、ONIOM 法に基づく古典/量子化学の hybrid 評価法から算出できる (式 (2.23)).

$$\Delta E_{\text{bind}}^0 = \Delta E_{\text{bind}}^{\text{ONIOM/HF}} = E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{complex}) - [E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{protein}) + E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{ligand})] \quad (2.23)$$

ここで、 $E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{complex})$ 、 $E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{protein})$ および $E^{\text{ONIOM/HF}}(\text{ligand})$ のそれぞれは、ONIOM (HF/6-31G:Amber) (high: HF/6-31G, low: Amber) に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。このとき、low 領域においては、 E_{LJ6} のエネルギー成分を除き、 E_{es} と

E_{LJ12} の成分のみを考慮した。また、ONIOM 法には mechanical embedding (ME) と electronic embedding (EE) の二つのスキームがある。ME では、model と周辺環境の静電相互作用を、点電荷同士の古典的な静電相互作用として評価するのに対し、EE では、model の波動関数が周辺環境の各原子が有する点電荷によって分極するように改良されている。本章の小括では、ME および EE の両スキームの比較検証も行った。なお、ONIOM 計算にはすべて Gaussian09 (Revision C.01) [120] を使用した。

2.3.3 分散相互作用エネルギー項 (E_{disp})

リガンドとタンパク質との間の分散相互作用エネルギー (E_{disp}) は、電子相関により瞬間的に発生する誘起双極子同士の引力的相互作用、すなわち分散力に起因するエネルギー項である。一般に、二原子間のエネルギーを比較した場合、 E_{disp} は静電相互作用エネルギー (ΔE_{es}) に比べてその程度は小さいが、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動に対する寄与については無視できない場合もある。特に、リガンドがタンパク質と静電相互作用により強固に結びつく場合、近距離力である分散力に起因する E_{disp} を定量的に評価することが重要となる。 E_{disp} は、複合体形成の前後における分散エネルギーの差、すなわちリガンドとタンパク質の複合体状態 (complex) における分散エネルギーからそれぞれの単独状態 (protein, ligand) の分散エネルギーを差し引くことで算出した (図 2.7, 式 (2.24))。

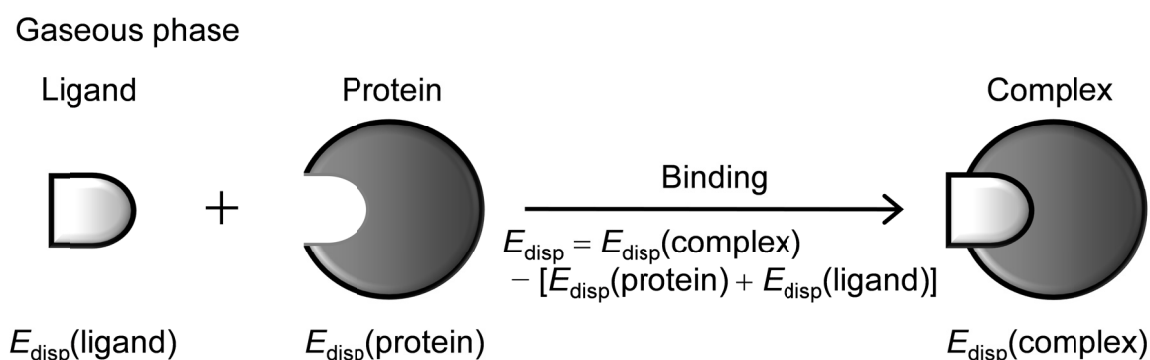


図 2.7 リガンドとタンパク質との間の分散相互作用エネルギー (E_{disp})

$$E_{\text{disp}} = E_{\text{disp}}(\text{complex}) - [E_{\text{disp}}(\text{protein}) + E_{\text{disp}}(\text{ligand})] \quad (2.24)$$

ここで、各状態 (complex, protein, ligand) における分散エネルギー (E_{disp}) は、次節で示す古典的評価法および量子化学的評価法に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。

2.3.3.1 力場パラメータに基づく E_{disp} の古典的評価法

解析対象がタンパク質のような大規模分子系である場合、力場パラメータに基づく古典的評価法による分散相互作用エネルギー (E_{disp}) の評価は計算コストの問題から有用となる。Heら [121] の報告によれば、 E_{disp} は Amber の LJ6 パラメータに基づく引力エネルギー (E_{LJ6}) により良好に近似できることから、本研究における E_{disp} の評価の一つとして E_{LJ6} を用いた。さらに、Grimme ら [96] により開発された分散力補正パラメータに基づき算出した E_{Grimme} も用いた。すなわち、式 (2.24) に示すリガンドとタンパク質との間の E_{disp} に対応するエネルギー項は、力場パラメータに基づく古典的評価法から算出できる (式 (2.25))。

$$E_{\text{disp}} = E_{\text{LJ6, Grimme}} = E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{complex}) - [E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{protein}) + E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{ligand})] \quad (2.25)$$

ここで、 $E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{complex})$, $E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{protein})$ および $E_{\text{LJ6, Grimme}}(\text{ligand})$ のそれぞれは、LJ6 および Grimme パラメータに基づく古典的評価法に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。なお、本研究における力場パラメータに基づく E_{LJ6} および E_{Grimme} の計算には、それぞれ AMBER10 [102] および dftd06 (in-house program) を使用した。

2.3.3.2 摂動論に基づく E_{disp} の量子化学的評価法

分散力は量子力学起源の力であるため、より厳密には量子化学的評価法に基づき電子相関を評価する必要がある。電子相関の記述には、摂動 (perturbation theory), 配置間相互作用 (configuration interaction), 結合クラスター (coupled cluster) あるいは密度汎関数理論 (density functional theory: DFT) が挙げられるが、計算コスト的には DFT が最も有利である。しかしながら、van der Waals 相互作用や水素結合などの弱い相互作用の記述においては信頼性が低下する問題があり [122], この点においては HF 波動関数を零次の出発点とし、平均化ポテンシャルからの摂動を直接的に扱う MP 摂動論の摂動展開の最低次相関補正である MP2 の方が望ましい場合が多い。そこで、式 (2.24) に示すリガンドとタンパク質との間の E_{disp} に対応するエネルギー項を、MP2 摂動論に基づく量子化学的評価法から算出した (式 (2.26))。

$$E_{\text{disp}} = E_{\text{corr}} = E_{\text{corr}}(\text{complex}) - [E_{\text{corr}}(\text{protein}) + E_{\text{corr}}(\text{ligand})] \quad (2.26)$$

ここで、 $E_{\text{corr}}(\text{complex})$, $E_{\text{corr}}(\text{protein})$ および $E_{\text{corr}}(\text{ligand})$ のそれぞれは、MP2 摂動論に基づく量子化学的評価法より得られる電子相関エネルギー E_{corr} ($= E^{\text{MP2}} - E^{\text{HF}}$) から算出した。なお、

本研究における MP2 に基づく E^{MP2} の計算にはすべて ABINIT-MP ver. 4.1 [111, 112]を使用した。

2.3.4 水和自由エネルギー変化項 (ΔG_{sol})

リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol})は、複合体形成の前後における溶媒和自由エネルギーの差、すなわちリガンドとタンパク質の複合体状態 (complex)における溶媒和自由エネルギーからそれぞれの単独状態 (protein, ligand)の溶媒和自由エネルギーを差し引くことで算出した (図 2.8, 式 (2.27)).

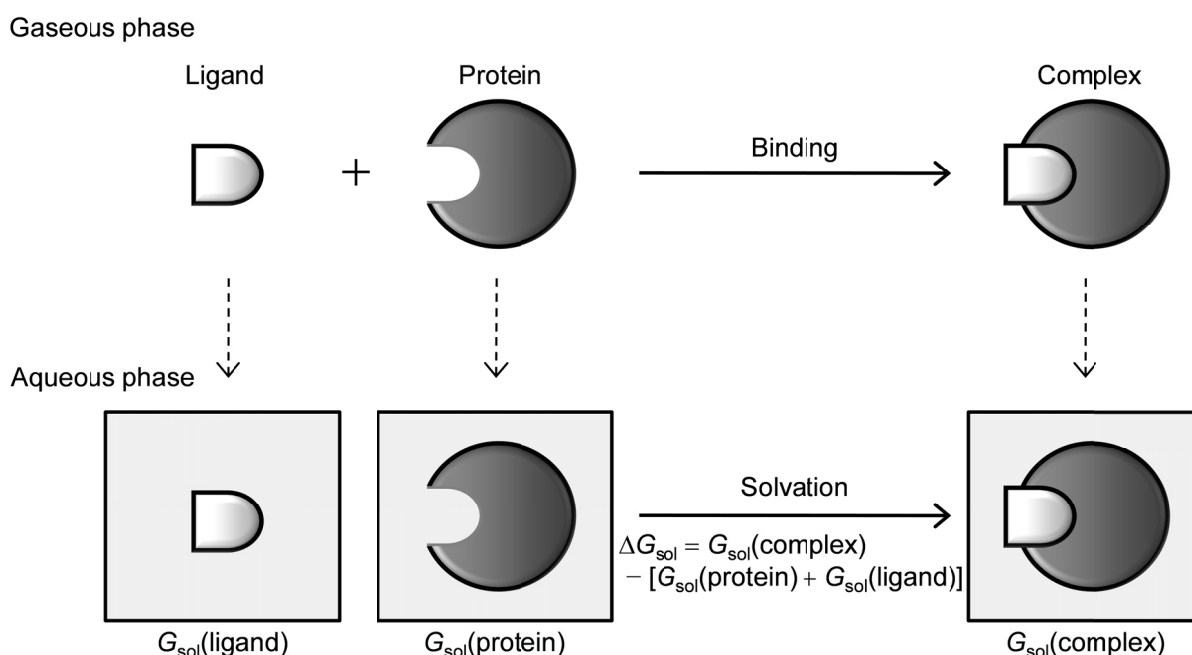


図 2.8 リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol})

$$\Delta G_{\text{sol}} = G_{\text{sol}}(\text{complex}) - [G_{\text{sol}}(\text{protein}) + G_{\text{sol}}(\text{ligand})] \quad (2.27)$$

ここで、各状態 (complex, protein, ligand)における溶媒和自由エネルギー (G_{sol})は、次節で示す連続誘電体モデルに基づく古典的評価法、量子化学的評価法および古典/量子化学の hybrid 評価法によるシングルポイントエネルギー計算から算出した。 G_{sol} の評価において、実溶媒を用いる評価法は最も精度が高いと考えられるが、長距離にまで達する溶媒効果を定量的に評価するには多くの水分子を必要とすること、さらに、長時間の統計平均をとる必要があるため、しばしば計算コストの増大を招く。一方で、近年、その溶媒効果を連続

誘電体モデルに基づき精度よく近似的に評価する種々の方法が提案されている。本研究では、連続誘電体モデルに基づく評価法を用いて G_{sol} の評価を行った。なお、分子の気相中 (gaseous phase) から水相中 (aqueous phase) への移行に伴う G_{sol} は、極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) と非極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$) の和として定義した ($G_{\text{sol}} = G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$)。

2.3.4.1 PB/GB 連続誘電体モデルに基づく ΔG_{sol} の古典的評価法

連続誘電体モデルは、水相 (極性溶媒) 中では静電的な相互作用が支配的であることから、溶媒分子を顕な形で記述する代わりに分極可能な連続媒体として捉える近似法である。すなわち、溶媒を気相中での系の挙動に対する摂動と見なす手法であり、これまでに連続誘電体モデルは多数提案されているが、溶質分子をその分子形状の空孔を用いて表し、溶媒分子を均一な誘電率の連続体 (反応場) として表すという点では同じであると言える。それぞれの手法の違いは、空孔や反応場をどのように定義するかで生じるが、基本的にこれら連続誘電体モデルは古典的評価法および量子化学的評価法のいずれの方法でも取扱うことが可能である。

代表的な古典的連続誘電体モデルとしては、PB あるいは GB [99] の連続誘電体モデルと接触表面積変化 (accessible surface area change: ΔASA) に基づく経験式 [123] を組み合わせた PB/SA 法あるいは GB/SA 法を挙げることができる。これら古典的評価法は、量子化学的評価法と比べた場合、精度的には多少劣ると考えられるものの、迅速であるためタンパク質などの大規模分子系への適用も可能となっている。PB/GB 法による溶媒和自由エネルギーの極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB)}}$) は、PB 方程式および解析的 GB 式に基づき下式 (2.28)–(2.31) で表される。

$$G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} = -1/2 \sum q_i (\phi_i^{\varepsilon_{\text{in}}} - \phi_i^{\varepsilon_{\text{out}}}) \quad (2.28)$$

$$\nabla[\varepsilon(r)\nabla\phi(r)] = -4\pi\rho(r) \quad (2.29)$$

$$G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB)}} = -1/2(1/\varepsilon_{\text{in}} - 1/\varepsilon_{\text{out}}) \sum q_i^2/R_i^2 - 1/2(1/\varepsilon_{\text{in}} - 1/\varepsilon_{\text{out}}) \sum \sum q_i q_j / f_{\text{GB}} \quad (2.30)$$

$$f_{\text{GB}} = \{r_{ij}^2 + R_i R_j \exp[-r_{ij}^2/(4R_i R_j)]\}^{1/2} \quad (2.31)$$

ここで、 $\varepsilon(r)$, $\phi(r)$, $\rho(r)$, q , r , R および f_{GB} は、誘電率、静電ポテンシャル、溶質の電荷分布、溶質電荷、原子間距離、有効 Born 半径および r と R を変数に持つ関数をそれぞれ表す。GB 法については、 R の評価が異なる3つの方法 (Hawkins-Cramer-Truhlar: HCT [124–126], Onufriev-Bashford-Case: OBC I, OBC II [127, 128]) を用いた。また、溶質および溶媒の誘電率 (ε_{in} , ε_{out}) は、1 および 78.4 とした (図 2.9)。

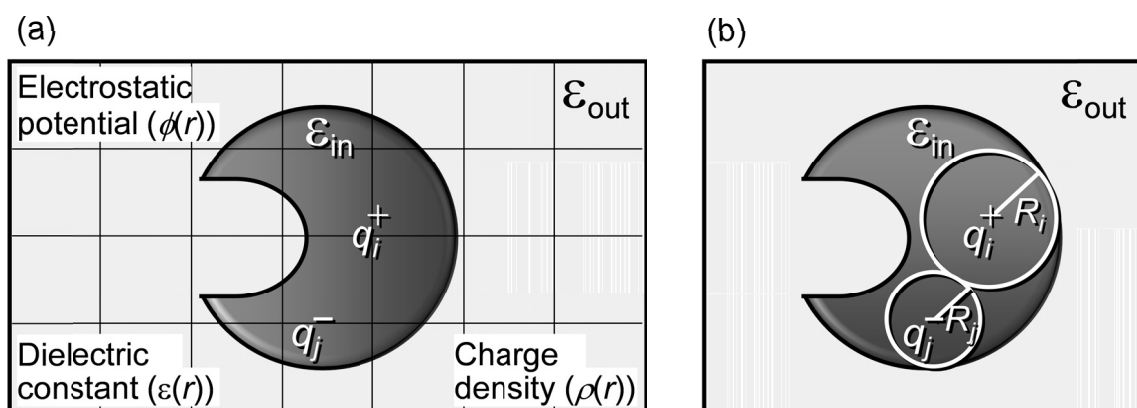


図 2.9 古典的連続誘電体モデル (PB/GB) [99]

(a) PB, (b) GB.

一方で、溶媒和自由エネルギーの非極性項 ($G_{sol}^{nonpolar (PB/GB)}$)は、 ΔASA に基づく経験式 (2.32)を用いて算出した.

$$G_{sol}^{nonpolar (PB/GB)} = \gamma \Delta ASA + b \quad (2.32)$$

ここで、 γ および b は、それぞれ0.00542および0.92とした。以上より、式 (2.27)に示すリガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol})に対応するエネルギー項は、古典的連続誘電体モデルであるPB/GB法から算出できる (式 (2.33)).

$$\Delta G_{sol} = \Delta G_{sol}^{polar (PB/GB)} = G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{complex}) - [G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{protein}) + G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{ligand})] \quad (2.33)$$

ここで、 $G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{complex})$, $G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{protein})$ および $G_{sol}^{polar (PB/GB)}(\text{ligand})$ のそれぞれは、PB/GB法 (キャビティモデル: mbondi2)に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。ただし、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う ΔG_{sol} は、極性項 (ΔG_{sol}^{polar})に加え非極性項 ($\Delta G_{sol}^{nonpolar}$)の寄与もあるが、 $\Delta G_{sol}^{nonpolar}$ のリガンド間の変動はきわめて小さいと考えられるため、前述したように LERE-QSAR 解析では $\Delta G_{sol}^{nonpolar}$ を考慮しないこととした。なお、本研究におけるPB/GB計算にはすべて AMBER10 [102]を使用した。

2.3.4.2 分極連続体モデルに基づく ΔG_{sol} の量子化学的評価法

代表的な量子化学的連続誘電体モデルとしては、Onsager モデル [129]や分極連続体モデル (PCM) [101]を挙げることができるが、PCM が通常よく用いられる。PCM 法では、溶質分子の空孔と溶媒分子の反応場との間の静電相互作用を自己無撞着反応場 (self-consistent reaction field: SCRF)理論に基づく量子化学計算により厳密に評価することができる。SCRF-PCM 法による溶媒和自由エネルギーの極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{polar (PCM)}}$)は、下式 (2.34)で表される。

$$G_{\text{sol}}^{\text{polar (PCM)}} = \langle \Psi | H + 1/2V | \Psi \rangle - \langle \Psi^0 | H | \Psi^0 \rangle \quad (2.34)$$

ここで、 Ψ^0 および Ψ は溶質の気相中 (gaseous phase) および水相中 (aqueous phase) での波動関数を、 H および V は Hamiltonian および溶質-溶媒間の相互作用ポテンシャルエネルギーをそれぞれ表す。実際の $\langle \Psi | H + 1/2V | \Psi \rangle$ は、空孔内の溶質分子の電子密度と空孔表面の電荷による電場について、SCRF 理論に基づく CPCM 法により評価した。また、溶質および溶媒の誘電率 (ϵ_{in} , ϵ_{out}) は、前節の PB/GB 法と同様に 1 および 78.4 とした (図 2.10)。

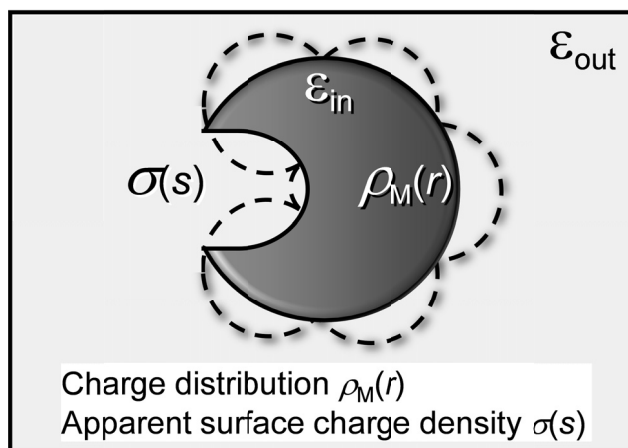


図 2.10 量子化学的連続誘電体モデル (SCRF-PCM) [101]

一方で、溶媒和自由エネルギーの非極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar (PCM)}}$) は、溶質-溶媒間の分散・反発相互作用エネルギーと溶質のキャビティエネルギーの 3 項の和として算出した (式 (2.35))。

$$G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar (PCM)}} = G_{\text{sol}}^{\text{disp}} + G_{\text{sol}}^{\text{rep}} + G_{\text{sol}}^{\text{cav}} \quad (2.35)$$

以上より、式 (2.27) に示すリガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol}) に対応するエネルギー項は、量子化学的連続誘電体モデルである SCRF-CPCM 法から算出できる (式 (2.36)).

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}} = G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{complex}) - [G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{protein}) + G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{ligand})] \quad (2.36)$$

ここで、 $G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{complex})$ 、 $G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{protein})$ および $G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM)}}(\text{ligand})$ のそれぞれは、SCRF-CPCM 法に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出できるが、解析対象がタンパク質のような大規模分子系の場合、計算コストの増大からその適用は現状では困難である。

2.3.4.3 古典/量子化学・連続誘電体モデルの hybrid 評価法

2.3.4.1 節および 2.3.4.2 節では、溶媒和自由エネルギーの極性項 ($G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) の評価として、代表的な連続誘電体モデルに基づく古典および量子化学的評価法である PB/GB 法 [99] および SCRF-CPCM 法 [101] について説明したが、後者のほうが精度的には優れていると考えられる。しかしながら、SCRF-CPCM 法をリガンドとタンパク質の複合体のような大規模分子系にそのまま適用することは現状では困難である。そこで、少なくともリガンドならびにその周辺のアミノ酸残基を含む活性部位については SCRF-CPCM 法で取扱い、その他を PB/GB 法で取扱う hybrid 評価法 [100] が計算コスト的な観点から有用かつ妥当であると考えられる。Hybrid 評価法による分子系の $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は、2.3.2.2 節の hybrid 評価法と同様の考え方にに基づき、近似的に下式 (2.37) から算出することができる。

$$G_{\text{sol}}^{\text{polar}} (\approx G_{\text{sol}}^{\text{polar (real)}}) = G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB) (real)}} + G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM) (model)}} - G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB) (model)}} \quad (2.37)$$

ここで、分子系全体 (real) の溶媒和自由エネルギーの極性項 $G_{\text{sol}}^{\text{polar (real)}}$ は、real に対する PB/GB 法に基づく溶媒和自由エネルギー $G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB) (real)}}$ 、重要な部位 (model) に対する SCRF-CPCM 法に基づく溶媒和自由エネルギー $G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM) (model)}}$ および model に対する PB/GB 法に基づく溶媒和自由エネルギー $G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB) (model)}}$ を用いて表される (図 2.11)。

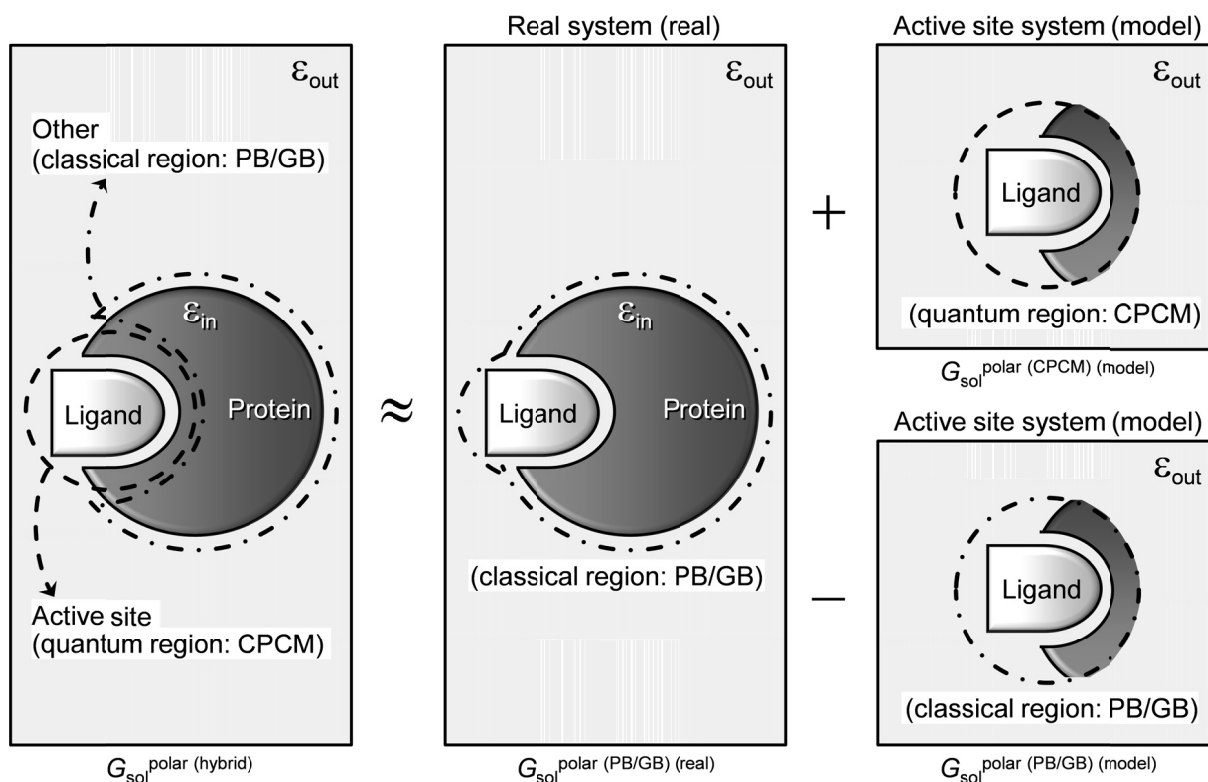


図 2.11 Hybrid 評価法に基づく $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の算出 [100]

このように、古典および量子化学的連続誘電体モデルを領域に応じて適用することで、計算コストを大幅に削減しながらも、real に対する溶媒和自由エネルギー $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})$ を得ることができる。そこで、式 (2.27) に示すリガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol}) に対応するエネルギー項を、古典/量子化学・連続誘電体モデルの hybrid 評価法から算出した (式 (2.38))。

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{hybrid}) = G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{complex}) - [G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{protein}) + G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{ligand})] \quad (2.38)$$

ここで、 $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{complex})$, $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{protein})$ および $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}(\text{real})(\text{ligand})$ のそれぞれは、PB/GB 法 (キャビティモデル: mbondi2) と SCRF-CPCM 法 (キャビティモデル: Bondi, 計算レベル: HF/6-31G) の hybrid 評価法に基づくシングルポイントエネルギー計算から算出した。ただし、LERE-QSAR 解析では $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$ を考慮しないこととした。なお、本研究における SCRF-CPCM/HF/6-31G 計算にはすべて Gaussian09 (Revision C.01) [120] を使用した。

2.3.4.4 連続誘電体モデルに基づく溶媒効果の検証

溶媒効果は生体内の様々な生物学的プロセスに関与している。特に、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol})を定量的に評価することは、創薬において重要な役割を担うとともに大きな課題でもある。その評価には、前節までに述べた連続誘電体モデルに基づく評価法が実用的であると考えられる。しかしながら、これら各々の方法論の有効性についての議論は多々なされているが、それらを相互に比較・検討することは必ずしも十分になされていない。本節では、実測の溶媒和自由エネルギー ($G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$)が既知である有機小分子のデータセットについて、連続誘電体モデルに基づく溶媒和自由エネルギー計算による定量的な比較解析から、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う ΔG_{sol} に対する有用かつ妥当な評価法の提案と検証を行った。

G_{sol} の比較解析では、Kongstedら [130]が用いた化合物セットの一部を使用した (表 2.2)。この化合物セットは、 $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$ が既知である合計 28 個の有機小分子化合物 (neutral: 14 個, ionic: 14 個)より構成され、本質的に G_{sol} の実測が困難であるタンパク質を構成するアミノ酸残基の主鎖や側鎖の部分構造を有する。したがって、これらに対する溶媒和自由エネルギーの実測と計算値との関係性の比較議論・解釈は、タンパク質のような大規模分子系に対する溶媒和の評価へ応用可能であると考えられる。

表2.2 有機小分子 ((a) Neutral, (b) Ionic)の $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$ ^a

(a) Small neutral compound				(b) Small ionic compound			
no.	rational formula	type	$G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$ ^a	no.	rational formula	type	$G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$ ^a
1	CH ₄	neutral	2.00	15	CH ₃ NH ₃ ⁺	cation	-76.45
2	C ₃ H ₈	neutral	1.96	16	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	cation	-68.63
3	<i>n</i> -C ₄ H ₁₀	neutral	2.08	17	(CH ₃) ₃ NH ⁺	cation	-61.12
4	CH ₃ CH(CH ₃) ₂	neutral	2.32	18	C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺	cation	-72.43
5	C ₆ H ₅ CH ₃	neutral	-0.89	19	CH ₃ COHNH ₂ ⁺	cation	-73.94
6	CH ₃ SH	neutral	-1.24	20	CH ₃ SHCH ₃ ⁺	cation	-64.54
7	CH ₃ CH ₂ SCH ₃	neutral	-1.48	21	C ₅ H ₅ NH ⁺	cation	-61.12
8	CH ₃ OH	neutral	-5.11	22	HCOO ⁻	anion	-76.23
9	CH ₃ CH ₂ OH	neutral	-5.01	23	CH ₃ COO ⁻	anion	-77.64
10	NH ₃	neutral	-4.29	24	C ₆ H ₅ COO ⁻	anion	-71.24
11	CH ₃ NH ₂	neutral	-4.56	25	CH ₃ COCH ₂ ⁻	anion	-76.23
12	CH ₃ CONH ₂	neutral	-9.72	26	CH ₃ CONH ⁻	anion	-80.25
13	CH ₃ CH ₂ CONH ₂	neutral	-9.39	27	C ₆ H ₅ NH ⁻	anion	-62.94
14	CH ₃ -C ₃ H ₃ N ₂	neutral	-10.28	28	CH ₃ S ⁻	anion	-73.84

^a In kcal/mol.

表 2.2 に示す一連の有機小分子化合物について、代表的な古典および量子化学的連続誘電体モデルである PB/GB 法および SCRF-CPCM 法をそれぞれ使用し、各化合物の気相中 (gaseous phase) から水相中 (aqueous phase) への移行に伴う溶媒和自由エネルギー G_{sol} ($= G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$) を評価した。PB/GB 法における $G_{\text{sol}}^{\text{PB/GB}}$ は、HF/6-31G(d)//HF/6-31+G(d) より得られる restrained electrostatic potential (RESP) 電荷 [131] を各原子の点電荷として使用し、PB/GB 方程式 (PB: 式 (2.28), (2.29), GB: 式 (2.30), (2.31)) および (2.32) に基づき算出した。一方で、SCRF-CPCM 法における $G_{\text{sol}}^{\text{CPCM}}$ は、式 (2.34) および (2.35) に基づき HF/6-31+G(d) により算出した。なお、各方法におけるキャビティモデルとして、mbondi2 (PB/GB) および Bondi, Pauling, UFF, UA0, UAHF, UAKS (SCRF-CPCM) をそれぞれ使用した。

有機小分子化合物の気相中から水相中への移行に伴う G_{sol} について、PB/GB 法および SCRF-CPCM 法に基づき算出した計算値を表 2.3 および表 2.4 にそれぞれ示す。図 2.12 は、その実測値 ($G_{\text{sol}}^{\text{obs}}$) と計算値との間の相関係数 (r) および誤差絶対値の平均値 (mean absolute error: MAE) を示す。PB/GB 法および SCRF-CPCM 法のいずれにおいても、neutral compound に対する相関と MAE は、ionic compound のそれらと比べて良好な結果である。PB/GB 法の neutral compound に対する評価においては、方法間の差は小さい。一方で、SCRF-CPCM 法では特に水素原子を明示的に考慮しない united atom (UA) 近似に基づくキャビティモデル (UA0, UAHF, UAKS) を用いた場合、その MAE は他の方法と比べて大きい。また、水素原子を明示的に考慮するキャビティモデル (Bondi, Pauling, UFF) のうち、UFF については相関もそれほど良好ではないことから ($r = 0.894$)、相対的な評価についても問題があると考えられる。Ionic compound については、古典および量子化学的評価法において、PB ($r = 0.811$, MAE = 4.34 kcal/mol) ならびに CPCM-Pauling (0.951, 1.72) がそれぞれ最良の結果を示すが、後者は特に良好な結果である。また、CPCM-Bondi (0.950, 3.31) も CPCM-Pauling と同様に良好な結果を与えることから、SCRF-CPCM 法において水素原子を明示的に考慮するキャビティモデル (UFF は除く) は ionic compound の G_{sol} を良好に評価可能である。すなわち、neutral compound については古典および量子化学的評価法の方法間の差は概して小さく両者とも比較的精度よく評価可能であるのに対して、ionic compound については顕著な差を生じる。特に、ionic compound に対しては量子化学的評価法である SCRF-CPCM 法は良好な結果を与えるが、その評価結果はキャビティモデルの選択に大きく依存する。なかでも、水素原子を明示的に考慮するキャビティモデルを用いた CPCM-Pauling, CPCM-Bondi は、相対的ならびに絶対的評価ともに良好な結果を与えることができる。これらの結果は、Kim ら [132] の neutral および zwitter-ionic glycine の溶媒和自由エネルギーに関する理論的研究の解析結果とも対応している。なお、本節では、量子化学的評価法として SCRF-CPCM 法を用いたが、これらの結果が同様の SCRF 理論を用いる積分方程式表式化 (integral equation formalism: IEF) に基づく数値積分 (SCRF-IEFPCM 法) による結果とほぼ同等であることを確認している。

表2.3 PB/GB 法に基づく有機小分子 ((a) Neutral, (b) Ionic)の $G_{\text{sol}}^{\text{PB/GB } a}$

(a) Small neutral compound			$G_{\text{sol}}^{\text{PB/GB } a}$			
no.	rational formula	type	PB	GB-HCT	GB-OBC I	GB-OBC II
1	CH ₄	neutral	1.40	1.05	1.08	1.13
2	C ₃ H ₈	neutral	0.80	0.75	0.70	0.78
3	<i>n</i> -C ₄ H ₁₀	neutral	2.09	1.99	1.93	2.03
4	CH ₃ CH(CH ₃) ₂	neutral	1.69	1.53	1.29	1.52
5	C ₆ H ₅ CH ₃	neutral	-3.14	-2.94	-3.49	-2.08
6	CH ₃ SH	neutral	-1.50	-1.50	-1.74	-0.92
7	CH ₃ CH ₂ SCH ₃	neutral	-0.45	-0.33	-0.56	0.17
8	CH ₃ OH	neutral	-5.32	-5.19	-5.91	-3.81
9	CH ₃ CH ₂ OH	neutral	-4.35	-4.01	-4.76	-2.59
10	NH ₃	neutral	-5.73	-8.09	-8.56	-6.46
11	CH ₃ NH ₂	neutral	-4.25	-4.97	-5.89	-3.59
12	CH ₃ CONH ₂	neutral	-9.44	-10.50	-11.88	-7.65
13	CH ₃ CH ₂ CONH ₂	neutral	-8.40	-9.33	-10.64	-6.54
14	CH ₃ -C ₃ H ₃ N ₂	neutral	-8.72	-8.59	-9.62	-6.26
Correlation coefficient for $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}(r)$			0.977	0.952	0.959	0.937
Mean absolute error (MAE)			0.813	1.02	1.29	1.56
(b) Small ionic compound			$G_{\text{sol}}^{\text{PB/GB } a}$			
no.	rational formula	type	PB	GB-HCT	GB-OBC I	GB-OBC II
15	CH ₃ NH ₃ ⁺	cation	-73.16	-71.07	-72.51	-65.51
16	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	cation	-66.24	-65.26	-66.23	-58.93
17	(CH ₃) ₃ NH ⁺	cation	-58.64	-57.75	-58.26	-50.92
18	C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺	cation	-64.81	-61.61	-63.00	-55.32
19	CH ₃ COHNH ₂ ⁺	cation	-68.55	-66.65	-68.69	-60.45
20	CH ₃ SHCH ₃ ⁺	cation	-63.42	-62.57	-63.55	-57.42
21	C ₅ H ₅ NH ⁺	cation	-58.31	-58.04	-59.28	-54.40
22	HCOO ⁻	anion	-82.00	-83.89	-86.21	-78.68
23	CH ₃ COO ⁻	anion	-80.15	-81.50	-83.92	-75.64
24	C ₆ H ₅ COO ⁻	anion	-73.22	-73.73	-76.34	-67.71
25	CH ₃ COCH ₂ ⁻	anion	-77.55	-79.01	-81.34	-74.07
26	CH ₃ CONH ⁻	anion	-84.37	-85.85	-88.73	-79.51
27	C ₆ H ₅ NH ⁻	anion	-71.37	-71.08	-73.78	-66.05
28	CH ₃ S ⁻	anion	-85.37	-87.39	-88.99	-82.50
Correlation coefficient for $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}(r)$			0.811	0.766	0.767	0.741
Mean absolute error (MAE)			4.34	5.67	6.26	6.99

^a In kcal/mol.

表2.4 SCRF-CPCM 法に基づく有機小分子 ((a) Neutral, (b) Ionic)の $G_{\text{sol}}^{\text{CPCM } a}$

(a) Small neutral compound			$G_{\text{sol}}^{\text{CPCM } a}$					
no.	rational formula	type	Bondi	Pauling	UFF	UA0	UAHF	UAKS
1	CH ₄	neutral	1.19	1.49	3.27	6.94	0.86	0.86
2	C ₃ H ₈	neutral	3.04	3.63	6.15	6.65	1.66	1.66
3	<i>n</i> -C ₄ H ₁₀	neutral	3.68	5.30	7.38	7.34	1.76	1.76
4	CH ₃ CH(CH ₃) ₂	neutral	4.04	5.18	7.38	7.75	1.94	1.94
5	C ₆ H ₅ CH ₃	neutral	0.29	0.99	5.06	3.89	-3.46	-3.46
6	CH ₃ SH	neutral	-3.40	-3.18	0.39	1.80	-2.86	-2.86
7	CH ₃ CH ₂ SCH ₃	neutral	-1.17	-0.62	3.50	4.67	-3.52	-3.52
8	CH ₃ OH	neutral	-5.11	-5.78	-0.40	0.42	-9.42	-9.42
9	CH ₃ CH ₂ OH	neutral	-3.96	-4.66	1.19	0.57	-10.04	-10.04
10	NH ₃	neutral	-5.78	-6.09	-1.33	-0.67	-7.72	-7.72
11	CH ₃ NH ₂	neutral	-3.88	-3.82	0.78	1.62	-8.71	-8.71
12	CH ₃ CONH ₂	neutral	-10.31	-12.10	-3.11	-3.30	-15.99	-17.12
13	CH ₃ CH ₂ CONH ₂	neutral	-8.92	-10.20	-1.28	-2.47	-16.12	-17.16
14	CH ₃ -C ₃ H ₃ N ₂	neutral	-9.58	-9.96	-1.89	-3.02	-15.00	-17.65
Correlation coefficient for $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}(r)$			0.972	0.969	0.894	0.971	0.995	0.998
Mean absolute error (MAE)			0.998	1.43	5.05	5.41	3.07	3.42
(b) Small ionic compound			$G_{\text{sol}}^{\text{CPCM } a}$					
no.	rational formula	type	Bondi	Pauling	UFF	UA0	UAHF	UAKS
15	CH ₃ NH ₃ ⁺	cation	-73.44	-74.43	-61.27	-57.54	-79.61	-79.61
16	(CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺	cation	-66.00	-67.51	-54.30	-49.66	-74.97	-74.97
17	(CH ₃) ₃ NH ⁺	cation	-59.48	-60.90	-48.49	-42.20	-68.56	-68.56
18	C ₆ H ₅ NH ₃ ⁺	cation	-67.80	-69.10	-52.95	-55.37	-76.14	-76.14
19	CH ₃ COHNH ₂ ⁺	cation	-69.09	-71.49	-55.55	-58.08	-83.86	-83.86
20	CH ₃ SHCH ₃ ⁺	cation	-64.40	-64.54	-52.77	-46.48	-94.92	-94.92
21	C ₅ H ₅ NH ⁺	cation	-59.02	-62.40	-48.03	-51.83	-64.29	-67.17
22	HCOO ⁻	anion	-73.38	-77.51	-64.17	-63.90	-78.44	-78.44
23	CH ₃ COO ⁻	anion	-73.22	-77.18	-62.88	-61.37	-79.73	-79.73
24	C ₆ H ₅ COO ⁻	anion	-66.88	-70.22	-55.87	-57.54	-74.18	-74.18
25	CH ₃ COCH ₂ ⁻	anion	-67.36	-70.25	-58.32	-54.04	-68.17	-70.32
26	CH ₃ CONH ⁻	anion	-76.89	-79.55	-65.20	-62.84	-88.97	-90.82
27	C ₆ H ₅ NH ⁻	anion	-62.09	-62.51	-52.24	-51.73	-66.45	-69.79
28	CH ₃ S ⁻	anion	-71.20	-70.00	-64.97	-62.46	-73.18	-73.18
Correlation coefficient for $G_{\text{sol}}^{\text{obs}}(r)$			0.950	0.951	0.885	0.835	0.408	0.391
Mean absolute error (MAE)			3.31	1.72	14.3	15.8	6.59	7.02

^a In kcal/mol.

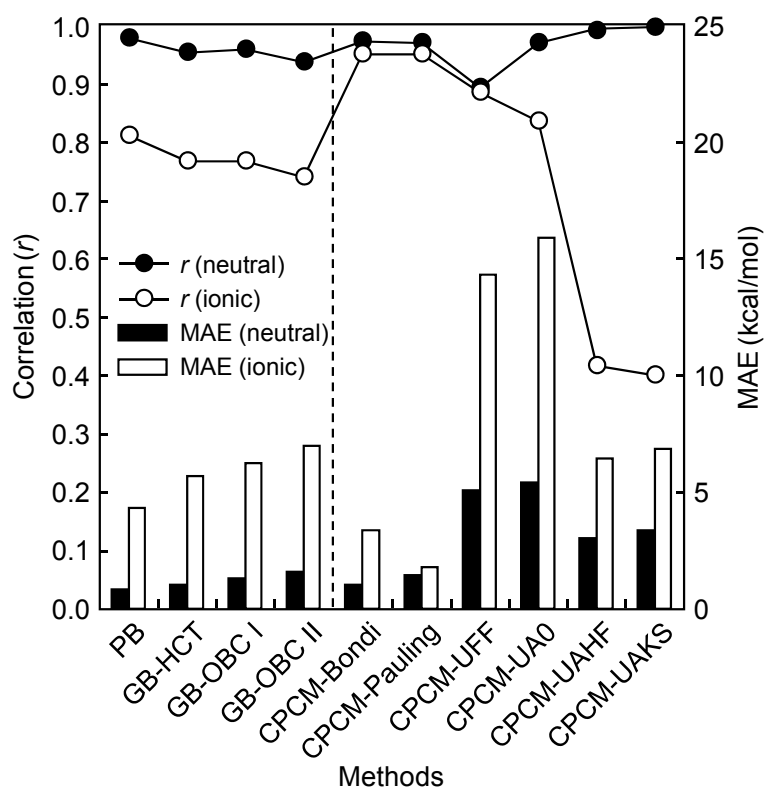


図 2.12 G_{sol} の実測値と計算値との間の r および MAE

以上の解析結果から、本解析のような解離型の官能基を有するリガンドと解離性のアミノ酸残基に富む活性部位を有するタンパク質の複合体形成に伴う ΔG_{sol} を定量的に評価する場合、少なくとも双性イオンであるシアル酸誘導体ならびに解離性のアミノ酸残基を多く含む活性部位については SCRF-CPCM 法で取扱い、その他を PB/GB 法で取扱う hybrid 評価法が計算コスト的な観点から現状最も有用かつ妥当であると考えられる。

本研究では、第 3 章において、一連のシアル酸誘導体とインフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1 (N1-NA) の複合体形成に伴う ΔG_{sol} を PB/GB 法ならびに 2.3.4.3 節で述べた古典/量子化学の hybrid 評価法に基づき算出し、hybrid 評価法の有用性の検証を行った。

2.3.5 解離自由エネルギー変化項 (ΔG_{diss})

本研究で用いるシアル酸誘導体は解離基を有しているため、その部分構造の解離自由エネルギー変化 (ΔG_{diss})を定量的に評価する必要がある。シアル酸誘導体の ΔG_{diss} は、解離の前後における自由エネルギーの差、すなわち双性イオン (zwitter-ionic form)であるシアル酸誘導体 (ligand)の自由エネルギーから anion 型 (anion form)の自由エネルギーを差し引くことで算出した (図 2.13, 式 (2.39))。

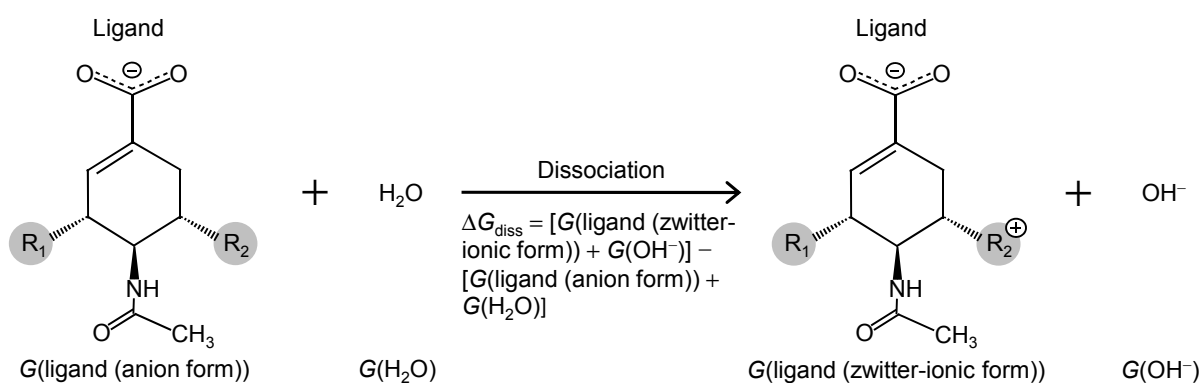


図 2.13 シアル酸誘導体の解離自由エネルギー変化 (ΔG_{diss})

$$\Delta G_{\text{diss}} = [G(\text{ligand (zwitter-ionic form)}) + G(\text{OH}^-)] - [G(\text{ligand (anion form)}) + G(\text{H}_2\text{O})] \quad (2.39)$$

ここで、各自由エネルギーは、2.3.4.2 節で述べた代表的な量子化学的連続誘電体モデルである SCRF-CPCM 法に基づき、SCRF-CPCM/HF/6-31+G(d,p)によるシングルポイントエネルギー計算から算出した。このとき、 R_2 部位の塩基性官能基 (amino, guanidino 基)の解離に伴う自由エネルギー変化のみを評価することで ΔG_{diss} を算出した。すなわち、シアル酸誘導体が共通に有する部分構造である carboxyl (COO^-)基 ($\text{p}K_{\text{a}} \sim 2.4$)については、細胞表面の作用部位における pH (= 7.4)ではほぼ完全に解離していると考えられるため、 ΔG_{diss} は考慮しないこととした。

2.4 結合相互作用エネルギー項および水和自由エネルギー変化項に対する理論的考察

結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^0) および水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol}) は、リガンドとタンパク質の複合体形成の相互作用過程における主要な代表自由エネルギー項である。特に、 ΔE_{bind}^0 および ΔG_{sol} の変動の大部分は、それぞれ静電相互作用エネルギー (ΔE_{es}) および水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) の変動が担うと考えられる [31, 35]。これまでに我々は、これら主要項である ΔE_{es} と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の間に良好な逆相関関係が成立することを多くの解析系において確認している。その一例として、図 2.14 にウシの炭酸脱水酵素 (bovine carbonic anhydrase II: bCA II)–ベンゼンスルホンアミド (benzenesulfonamide: BSA) 誘導体の解析系 ($n = 16$) [16, 17] について、PB/GB-OBC I 法ならびに hybrid (SCRf-IEFPCM/HF/6-31G-Bondi/PB, GB-OBC I) 評価法で算出した $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ と FMO (HF/6-31G) 法により算出した $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ との関係を示しているが、両者の間には良好な逆相関関係が成立している。

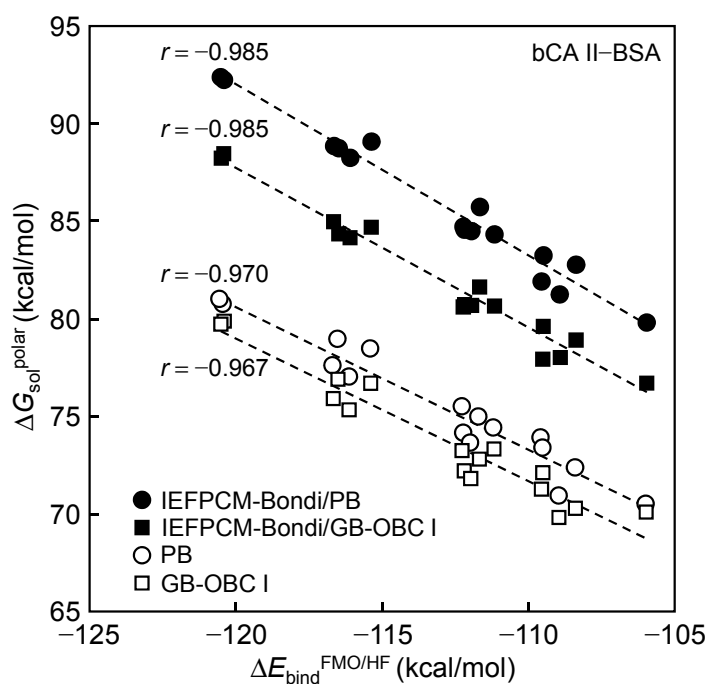


図 2.14 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ のプロット (bCA II-BSA)

$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は、線形応答理論の仮定に基づき、自己エネルギー ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{self}}$, $G_{\text{sol}}^{\text{self}} = -1/2(1/\epsilon_{\text{in}}$

$-1/\epsilon_{\text{out}}) \sum q_i^2/R_i^2$)と相互作用エネルギー ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}}$, $G_{\text{sol}}^{\text{screening}} = -1/2(1/\epsilon_{\text{in}} - 1/\epsilon_{\text{out}}) \sum \sum q_i q_j / f_{\text{GB}}$)の二成分に分割可能であるが ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\text{self}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}}$), 理論からの要請 [133]を満たすように両者の間には良好な逆相関関係が成立している ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}} = -0.957 \Delta G_{\text{sol}}^{\text{self}} + 64.5$; $r = -0.968$). 前節の有機小分子化合物の気相中から水相中への移行に伴う $G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ についても, この関係は同様に確認できることから ($G_{\text{sol}}^{\text{screening}} = -0.957 G_{\text{sol}}^{\text{self}} - 1.67$; $r = -1.000$ (neutral), $G_{\text{sol}}^{\text{screening}} = -0.939 G_{\text{sol}}^{\text{self}} - 65.2$; $r = -0.996$ (ionic)), リガンドとタンパク質のそれぞれの分子系における複合体形成の前後においても, この二項の間には良好な逆相関関係が成立すると考えられる. すなわち, リガンドとタンパク質の複合体形成における $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}}$ のみを用いて表現可能である (式 (2.40)).

$$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \approx \delta_1 \Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}} \quad (2.40)$$

ここで, 一般に $|\Delta G_{\text{sol}}^{\text{self}}| > |\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}}|$ であることから, δ_1 は負の値をとる. 一方で, $G_{\text{sol}}^{\text{screening}}$ ($= -1/2(1/\epsilon_{\text{in}} - 1/\epsilon_{\text{out}}) \sum \sum q_i q_j / f_{\text{GB}}$)と静電相互作用エネルギー E_{es} ($= q_i q_j / \epsilon r_{ij}$)のポテンシャルエネルギー関数の類似性から下式 (2.41)が成立すると考えられる.

$$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}} \approx \delta_2 \Delta E_{\text{es}} \quad (2.41)$$

ここで, δ_2 は経験的に正の値をとる. さらに, 式 (2.40)および(2.41)より, 下式 (2.42)が得られる.

$$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \approx \delta \Delta E_{\text{es}} \quad (2.42)$$

ここで, $\delta (= \delta_1 \cdot \delta_2, \delta_1 < 0, \delta_2 > 0)$ は負の値をとると考えられる. したがって, bCA II-BSA の解析系を含めその他の多くの系において確認される $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ との間の良好な逆相関関係は, 主としてそれぞれの変動を支配的に担うエネルギー成分である ΔE_{es} と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{screening}}$ との間の逆相関関係を反映している. 上記の理論的根拠により, 一般に, リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う ΔE_{es} と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ との間には逆相関関係が成立することが期待される.

2.5 小括

本章では, 一般化 LERE-QSAR 式の導出および代表自由エネルギー項について概説した. 表 2.5 は, 導出した LERE-QSAR の基本式 (2.6)の右辺の第一項の結合相互作用エネルギー項 (ΔE_{bind}^0), 分散相互作用エネルギー項 (E_{disp})および水和自由エネルギー変化の

極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$), 右辺の第二項の解離自由エネルギー変化項 (ΔG_{diss}), また entropic 変化項 ($-T\Delta S$)の算出方法を示す. すなわち, LERE-QSAR 解析では, 対象とする系に応じて任意の代表自由エネルギー項の組み合わせが可能であるが, 種々の分子科学理論の性質や特徴を理解していないと, 解析結果の物理化学的解釈や意味づけが困難となる場合がある.

表2.5 代表自由エネルギー項の算出方法

LERE term	symbol	method	ref.	
Binding energy (ΔE_{bind}) ^a		MM, molecular fractionation with conjugate caps (MFCC), FMO, QM/MM (ONIOM); LJ6, Grimme, and MP2	[2, 95–98, 115, 134]	
	Intrinsic binding energy (ΔE_{bind}^0)	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{MM/es} + \text{LJ12}}$	MM (AMBER)	[95]
		$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$	FMO (ABINIT-MP and GAMESS)	[2]
$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{ONIOM/HF}}$		ONIOM (Gaussian)	[115]	
Dispersion energy (E_{disp})	$E_{\text{LJ6, Grimme}}$	LJ6 and Grimme (AMBER and dftd06)	[96, 97]	
	E_{corr}	MP2 (ABINIT-MP, GAMESS, and Gaussian)	[98]	
Solvation energy (ΔG_{sol}) ^b		PB/GB, PCM, hybrid, RISM; and ASA	[99–101, 123, 135]	
Polar solvation energy ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{PB/GB}}$	PB/GB (AMBER)	[99]	
	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{PCM}}$	PCM (GAMESS and Gaussian)	[101]	
	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{hybrid}}$	Hybrid (PCM-PB/GB)	[100]	
Nonpolar solvation energy ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$)	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$	ASA (AMBER)	[123]	
Dissociation energy (ΔG_{diss})	ΔG_{diss}	PCM (GAMESS and Gaussian)	[101]	
Entropic energy ($-T\Delta S$)		HA, QHA, Schlitter, and empirical formula	[26, 68, 77, 87]	
	$-T\Delta S_{\text{ha}}$	HA (AMBER)	[77]	
	$-T\Delta S_{\text{qha, schl}}$	QHA and Schlitter (AMBER and sch-s42)	[77, 87]	
	$-T\Delta S_{\text{obs}}$	Entropy–enthalpy compensation rule	[26]	

$$^a \Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}}.$$

$$^b \Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}.$$

本研究の第3章における解析対象であるN1-NA-シアル酸誘導体の解析系 ($n = 8$)について, 種々の分子科学計算に基づき代表自由エネルギー項 (ΔE_{bind}^0 , E_{disp} , $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)を評価した. これら ΔE_{bind}^0 , E_{disp} および $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ のそれぞれにおける比較解析の結果を, 表 2.6

(a), 表 2.6 (b)および表 2.6 (c)にそれぞれ示す. なお, 表 2.6 では相関式 ($\Delta X_j = slope \Delta X_i + const$ ($n = 8$), X_j : 行 (j)に示す各エネルギー, X_i : 列 (i)に示す各エネルギー)における相関係数 (r)および傾き ($slope$)を, 表中の斜線より下段および上段にそれぞれ示す.

表2.6 代表自由エネルギー項 ((a) ΔE_{bind}^0 , (b) E_{disp} , (c) ΔG_{sol}^{polar})における相関^aと傾き^b

(a) Intrinsic binding energy (ΔE_{bind}^0) ^c				
(r , $slope$)	MM/es + LJ12	FMO/HF	ONIOM-ME/HF	ONIOM-EE/HF
MM/es + LJ12		1.020	1.202	1.026
FMO/HF	0.944		1.162	1.035
ONIOM-ME/HF	0.955	0.996		0.885
ONIOM-EE/HF	0.912	0.994	0.991	

(b) Dispersion energy (E_{disp}) ^d			
(r , $slope$)	LJ6	Grimme	corr
LJ6		1.208	1.668
Grimme	0.996		1.378
corr	0.998	1.000	

(c) Polar solvation energy (ΔG_{sol}^{polar}) ^e				
(r , $slope$)	PB	GB-HCT	GB-OBC I	GB-OBC II
PB		0.320	0.645	0.118
GB-HCT	0.352		0.983	0.169
GB-OBC I	0.653	0.904		0.189
GB-OBC II	0.560	0.727	0.886	
CPCM-Bondi/PB	-0.633	0.460	0.061	-0.082
CPCM-Bondi/GB-HCT	-0.570	0.541	0.159	0.035
CPCM-Bondi/GB-OBC I	-0.564	0.549	0.171	0.053
CPCM-Bondi/GB-OBC II	0.185	0.865	0.815	0.876

(c) Polar solvation energy (ΔG_{sol}^{polar}) ^e				
(r , $slope$)	CPCM-Bondi/ PB	CPCM-Bondi/ GB-HCT	CPCM-Bondi/ GB-OBC I	CPCM-Bondi/ GB-OBC II
PB		-0.260	-0.256	0.044
GB-HCT	0.246		0.274	0.226
GB-OBC I	0.030	0.073		0.195
GB-OBC II	-0.190	0.075	0.115	0.982
CPCM-Bondi/PB		0.929	0.922	0.197
CPCM-Bondi/GB-HCT	0.991		0.996	0.265
CPCM-Bondi/GB-OBC I	0.988	1.000		0.275
CPCM-Bondi/GB-OBC II	0.405	0.510	0.527	

^a Correlation coefficient of $\Delta X_j = slope \Delta X_i + const$ ($n = 8$) (lower-left triangle).

^b Slope of $\Delta X_j = slope \Delta X_i + const$ ($n = 8$) (upper-right triangle).

^c $\Delta E_{bind}^0 = \Delta E_{bind}^{MM/es+LJ12}, \Delta E_{bind}^{FMO/HF}, \Delta E_{bind}^{ONIOM-ME/HF}, \Delta E_{bind}^{ONIOM-EE/HF}$.

^d $E_{disp} = E_{LJ6}, E_{Grimme}, E_{corr}$.

^e $\Delta G_{sol}^{polar} = \Delta G_{sol}^{PB}, \Delta G_{sol}^{GB-HCT}, \Delta G_{sol}^{GB-OBC I}, \Delta G_{sol}^{GB-OBC II}, \Delta G_{sol}^{CPCM-Bondi/PB}, \Delta G_{sol}^{CPCM-Bondi/GB-HCT}, \Delta G_{sol}^{CPCM-Bondi/GB-OBC I}, \Delta G_{sol}^{CPCM-Bondi/GB-OBC II}$.

ΔE_{bind}^0 について, MM 法, FMO 法および ONIOM 法で評価した場合, それら同士の相関は比較的良好であり ($r > 0.900$), いずれの *slope* も 1 に近い値であることを確認できる (表 2.6 (a)). このことは, 8 化合物間の値の分散値 (variance) がほぼ等しいことを意味し, 本解析系の ΔE_{bind}^0 の化合物間の変動の評価においては, 方法間の差が小さいことを示している. また, ONIOM 法における ME および EE の二つのスキームを比べた場合, その *slope* が 1 より小さいことから, 分極を考慮する EE の方が 8 化合物間の値の variance が大きいものの, 両者の差はほとんどないと考えられる. E_{disp} について, LJ6 や Grimme パラメータおよび MP2 摂動論で評価した場合, それら同士の相関はきわめて良好であるが ($r > 0.995$), *slope* においては 1 から逸脱する値を確認できる (表 2.6 (b)). 特に, MP2 は LJ6 や Grimme パラメータに比べて過小評価している. このことは, MP2 による評価においては, 分散エネルギーのみならず局所的な電子の相関・交換効果も含んでいるため, 分散エネルギーの評価が十分ではない可能性を示唆している. また, MP2 による評価において, その基底関数に 6-31G(d) を用いて算出される分散エネルギーの大部分が, BSSE であるとの報告もある [121]. $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ について, PB/GB 法および hybrid 評価法で算出した場合, PB/GB 法での相関は良好ではないが, hybrid 評価法での相関はきわめて良好であること (ただし, CPCM-Bondi/GB-OBC II はこの限りではない)を確認できる (表 2.6 (c)). これら方法間の差は, 主として活性部位近傍のイオン性分子に対する評価の差であると考えられる. すなわち, hybrid 評価法では双性イオンであるシアル酸誘導体ならびに活性部位近傍のアミノ酸残基を量子化学的に評価した結果を反映し, PB/GB 法は 2.3.4.4 節で示したようにこれらイオン性分子に対する評価が十分ではなく, 方法間の差が顕著に生じていると考えられる. この $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ についてのさらなる詳細な検証は, 第 3 章にて行う.

本研究の第 3 章および第 4 章の LERE-QSAR 解析における代表自由エネルギー項 (ΔE_{bind}^0 , E_{disp} , $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) は, FMO 法, MP2 摂動論および hybrid 評価法 (PB/GB 法) に基づきそれぞれ算出した. また, 第 5 章では MM 法および PB/GB 法を用いた.

第 3 章 インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1-シアル酸誘導体の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化に対する LERE-QSAR 解析

3.1 序論

インフルエンザウイルスは orthomyxoviridae 科に属し、脂質二重層からなるエンベロープに覆われた直径が約 100 nm (100×10^{-9} m)のウイルスである。ウイルスの内部構成タンパク質である核タンパク質 (nucleoprotein: NP)およびマトリックスタンパク質 (matrix protein: M1)の抗原性の違いから、A, B, C 型の 3 タイプに分類される。このうち A 型は、ヒト、鳥、豚、馬などの幅広い宿主に感染し、強い病原性を発現する。これまでにパンデミック (1918 年のスペイン型, 1957 年のアジア型, 1968 年のホンコン型, 2009 年の新型)を引き起こした原因ウイルスはすべてこの A 型に属する [136–138]。一方で、B, C 型はアザラシや豚から分離されたという報告もあるが、主にヒトを宿主とし流行するため、地域流行に留まる [139, 140]。図 3.1 は、A 型インフルエンザウイルスの構造を模式的に表したものであるが、ヒトのゲノムが二本鎖の DNA であるのに対し、インフルエンザウイルスのそれは一本鎖のマイナスセンス RNA (vRNA)であり、8 分節に分かれている。この一本鎖 vRNA は、NP および RNA ポリメラーゼ (PB2, PB1, PA の 3 種類のタンパク質で構成)と結合した vRNA タンパク質複合体 (viral ribonucleoprotein complex: vRNP)として存在する。8 本の vRNA 分節は長い順に PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS と称され、M および NS を除く 6 本の分節は一種類のタンパク質をコードしているのに対し、M および NS の 2 本の分節からは選択的スプライシングによって、それぞれ M1, M2 および NS1, NS2 の二種類のタンパク質が合成される。すなわち、インフルエンザウイルス粒子は 8 分節の一本鎖 vRNA と非構造タンパク質である NS1 を除く 9 種類のタンパク質から構成される。脂質二重層のエンベロープで覆われたウイルス表面上には、膜タンパク質である M2 と二種類のスパイク糖タンパク質が存在している。二種類の糖タンパク質とは、ホモ 3 量体のヘマグルチニン (hemagglutinin: HA)およびホモ 4 量体のノイラミニダーゼ (neuraminidase: NA, EC3.2.1.18)であり、これらの抗原性の違いにより、HA では 16 種類の亜型 (H1–H16), NA では 9 種類の亜型 (N1–N9)に分類される [141]。これら HA と NA の組み合わせにより、144 種類の A 型インフルエンザウイルスの亜型が存在することになり、このなかでパンデミックを引き起こしたウイルスは、H1N1 亜型 (1918 年のスペイン型), H2N2 亜型 (1957 年のアジア型), H3N2 亜型 (1968 年のホンコン型)および H1N1 亜型 (2009 年の新型)である。

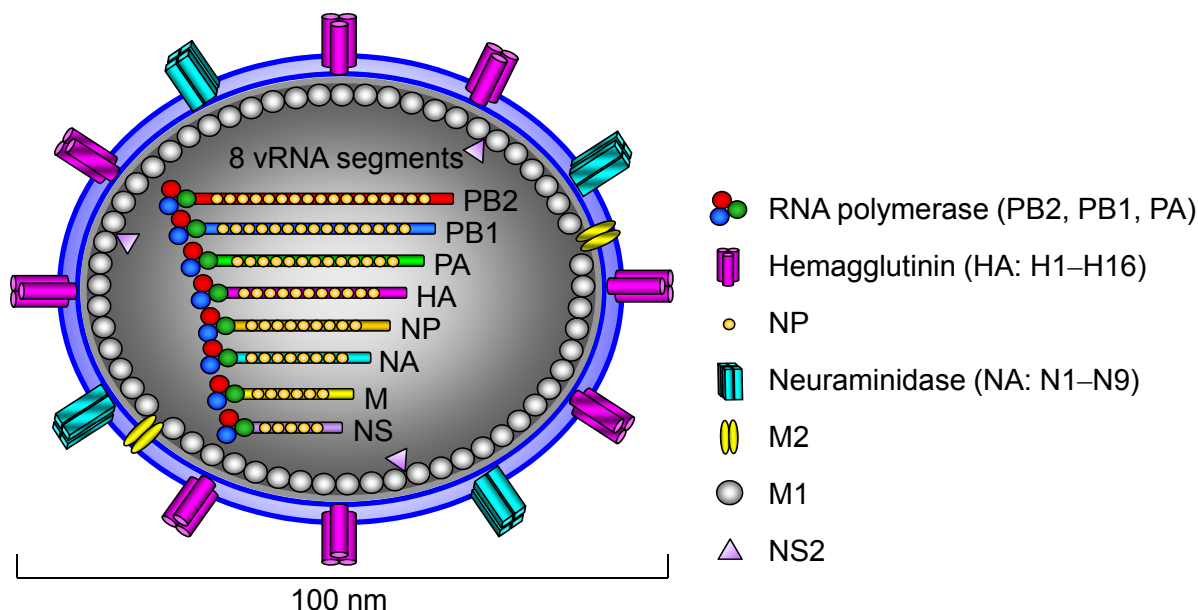


図 3.1 A 型インフルエンザウイルスの構造

図 3.2 は、インフルエンザウイルスの感染・増殖サイクルを模式的に表したものであるが、いずれの亜型においても宿主細胞への感染は、ウイルス粒子と細胞との間の物理的な衝突により開始する。この衝突は偶然の産物ではあるが、吸着できるかどうかはウイルス表面の HA と宿主細胞表面のシアル酸 (*N*-acetyl-neuraminic acid: Neu5Ac, NANA) を含むシアロ糖鎖の結合様式の相性により決定されるため [142]、ウイルスによって吸着できる宿主や器官・細胞が限定される。HA がシアル酸を認識・結合し、宿主細胞膜表面上に吸着できた場合 (adsorption)、ウイルス粒子はエンドサイトーシスによって細胞内へと侵入する (endocytosis, invasion)。次に、エンドソーム内部の酸性環境が HA の構造変化を引き起こし、エンベロープとエンドソーム膜との融合を惹起する (fusion)。さらに、酸性化に伴い M2 タンパク質のイオンチャネルが活性化されウイルス粒子内に水素イオンが流入すると、内部が酸性となる。その結果、vRNP とエンベロープとの間の結合力が低下し、vRNA は細胞質に放出され (uncoating)、さらに宿主の核内部へと侵入する [143, 144]。核内部では、自身の vRNA の鋳型を作る RNA ポリメラーゼを構成するタンパク質 (PB2, PB1, PA) が優先的に作られ、同時に vRNA を鋳型として転写により mRNA が (mRNA synthesis)、中間体である cRNA が複製の第一段階反応により合成される (cRNA synthesis)。子孫 vRNA は、cRNA を鋳型とした複製の第二段階反応により増幅される (replication)。子孫 vRNA の複製と平行して、それを保護する M1 タンパク質、感染・吸着に必要な HA および細胞表面からの遊離に必要な NA が大量に合成される (protein synthesis)。また、新しく合成された RNP 構成タンパク質 (NP, PB2, PB1, PA) は核内へと移行し、子孫 vRNA と結合することで、vRNP を形成する (formation of vRNP)。M1 および NS2 も核内へと移行し、これらのタンパク質の助けにより核外へと輸送される。すべての構成要素の合成が完了すると、ウイルスは再構築され (assembly)、出芽により宿主細胞から放出されることで感染を拡大していくが (packing and

budding, release), この放出過程に NA は重要な役割を果たしている. NA は子孫ウイルスの放出の際に, シアロ糖鎖末端に存在するシアル酸を加水分解することで HA が再びシアロ糖鎖へ結合し離れられなくなるのを防ぎ, 子孫ウイルスの遊離を促進させることができる (図 3.3) [145, 146].

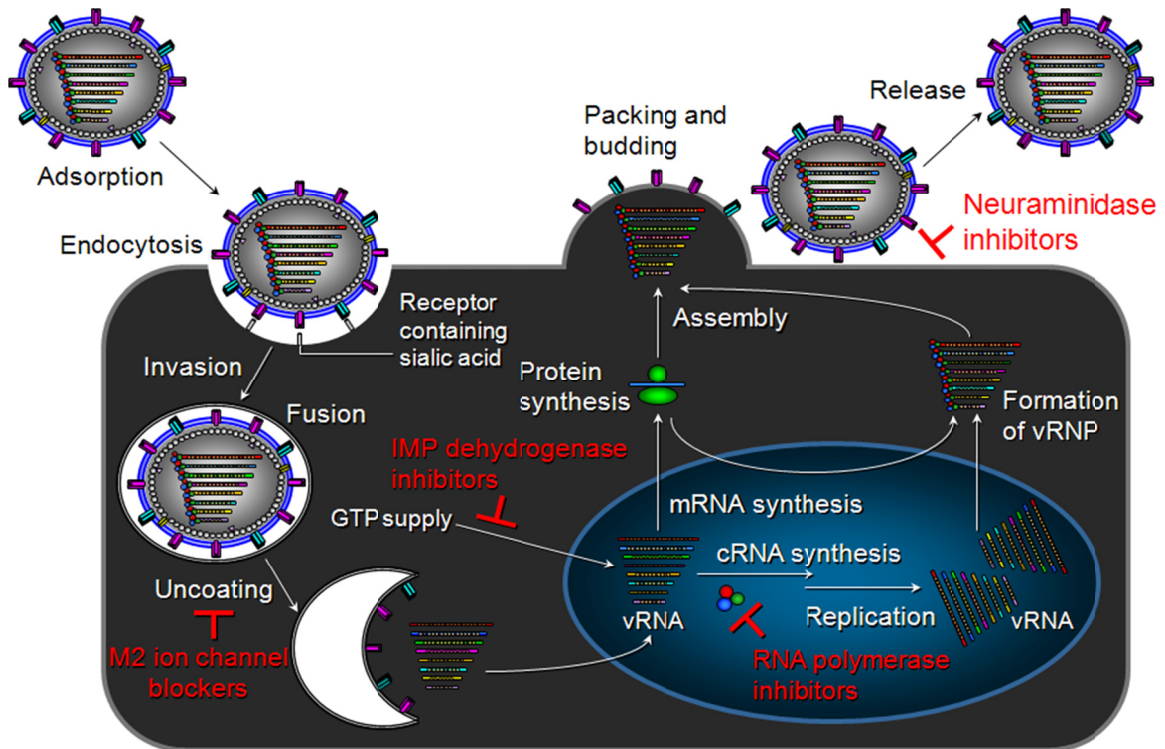


図 3.2 インフルエンザウイルスの感染・増殖サイクルと抗インフルエンザ剤の作用点 [147]

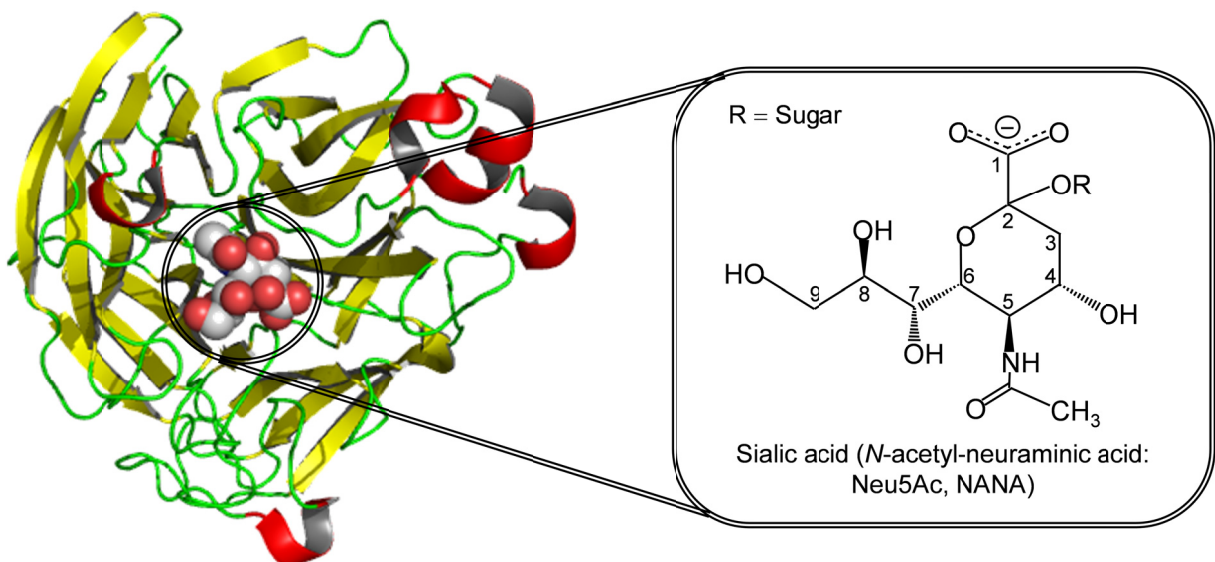


図 3.3 NA の単量体の X 線結晶解析構造とシアル酸の化学構造 (PDB code: 2BAT [148])
 α -helix および β -sheet は, それぞれ赤色および黄色で表す. CPK モデルはシアル酸を表す.

インフルエンザは、インフルエンザウイルスの飛沫・接触感染によりヒトからヒトへと伝播する呼吸器感染症であり、高齢者や乳幼児のみならず基礎疾患を有する人々に合併症を引き起こし、時として重篤な疾患となる。また、新型インフルエンザウイルスの場合、それらはこれまでにない新しい抗原タンパク質を有するため、壮健な成人・若年者においても重症化することがある。インフルエンザへの対抗手段としては、ワクチンと抗インフルエンザ剤が挙げられる。ワクチンは、流行株と抗原性が不一致であると有効性が低下するため新型ウイルスに対しては基本的には無効となる。また、感染拡大の防止に必要な供給量の確保も困難であるため、現状では必ずしもインフルエンザ対策として十分な手段とは言えず、抗インフルエンザ剤が果たす役割は大きく、その必要性もきわめて高いと考えられる。

抗インフルエンザ剤は、インフルエンザウイルスに共通の感染・増殖サイクルを阻害することで作用するため、異なる亜型のウイルスに対しても同等の効果を示す。すなわち、ワクチンにおける「免疫」とは直接関係ない仕組みで働くため、より汎用的である。抗インフルエンザ剤が、図 3.2 で示した各ステップのいずれかを阻害できればウイルスの感染・伝播を防ぐことが可能となる。図 3.4 は、各ステップを阻害する代表的な抗インフルエンザ剤（阻害剤）を示しているが、現在国内ではこれらのうちの 5 剤が抗インフルエンザ剤として認可されている。一剤は M2 イオンチャネル阻害剤であり、4 剤は NA 阻害剤である。M2 イオンチャネル阻害剤である *amantadine* (*Symmetrel*[®]) [149] は (図 3.4 (a)), vRNA の細胞質への放出過程 (*uncoating*) を阻害する薬剤であり、国内では 1997 年から抗インフルエンザ剤として臨床応用されている。しかしながら、2004 年から *amantadine* 耐性変異型 M2 イオンチャネルを有するウイルスが世界的に蔓延し、さらに米国疾病予防管理センターが 2005 年以降、*amantadine* を使用しないことを推奨したこともあり、現在はほとんど使用されていない。*Amantadine* が事実上無効となった現在、臨床現場において最も使用されている抗インフルエンザ剤は NA 阻害剤である。NA 阻害剤の標的タンパク質である NA は、前述したようにウイルスの増殖・遊離に必須の酵素であることから、この酵素を阻害することはウイルスの一連の増殖サイクルにおいて未感染細胞への感染・伝播を防ぐと考えられ、現在までに *zanamivir* (*Relenza*[®]) [150], *oseltamivir* (*Tamiflu*[®]) [151], *peramivir* (*Rapivacta*[®]) [152] および *laninamivir* (*Inavir*[®]) [153] が開発されている (図 3.4 (d))。これら 4 剤はそれぞれに特色ある用法で使用されるが、いずれも基質であるシアル酸の C₄ 位に位置する hydroxyl 基 (図 3.3) を塩基性官能基 (*amino*, *guanidino* 基) へと置換したことが結合活性増強への大きな *breakthrough* となり、NA の活性中心にシアル酸の遷移状態アナログ [154–156] として強力かつ競合的に結合することで、これを阻害することができる。なかでも *oseltamivir* は、*amino* 基の導入に加え、シアル酸の C₆ 位の *glycerol* 基を *pentyl ether* 基へと置換したことが経口投与を可能とし、その服用の容易さから現在最も使用される NA 阻害剤である。

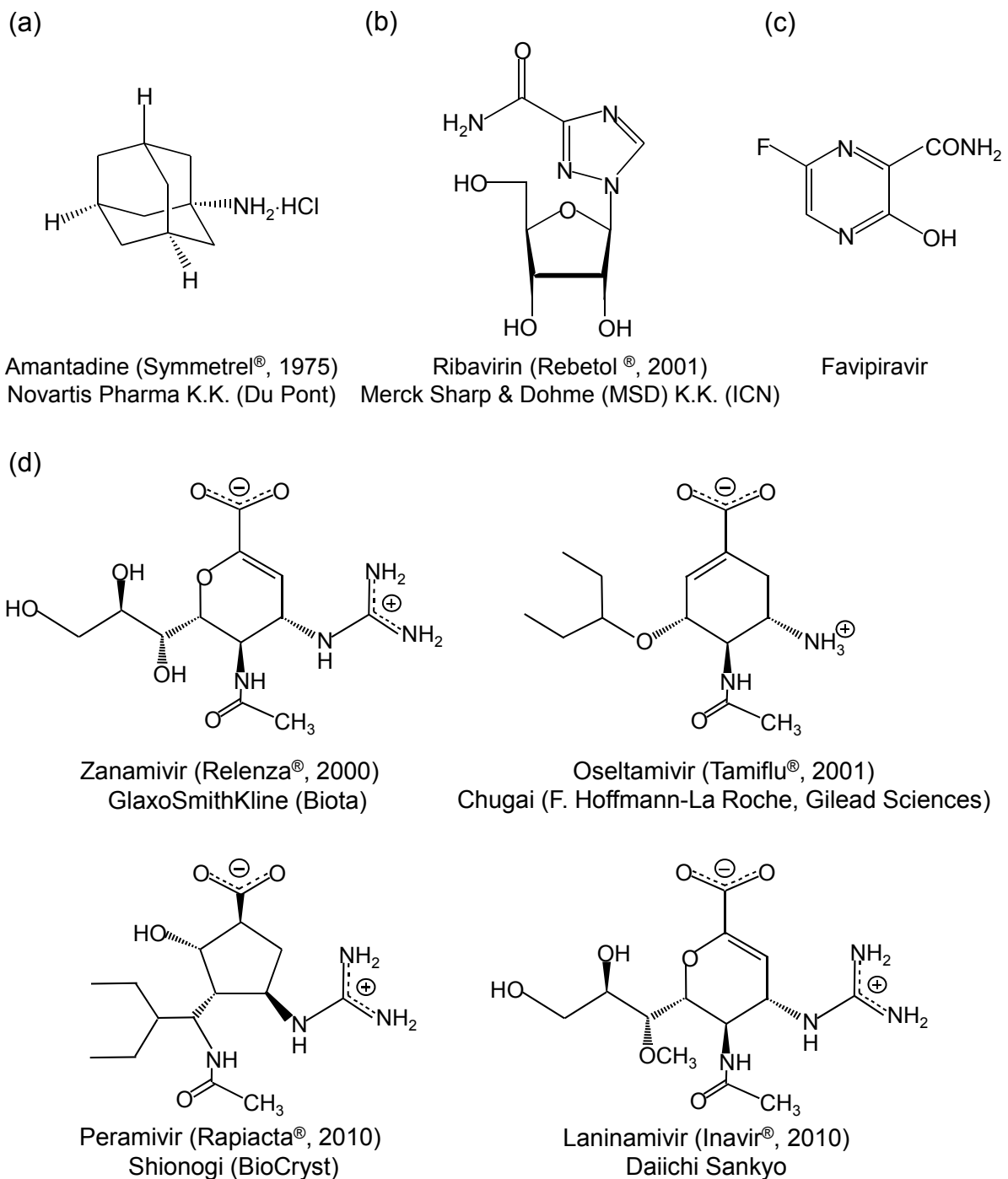


図 3.4 代表的な抗インフルエンザ剤 (阻害剤)の化学構造

(a) M2 ion channel blocker, (b) IMP dehydrogenase inhibitor, (c) RNA polymerase inhibitor, (d) NA inhibitors. 阻害剤の化学構造および名称は、それぞれ活性体表記および一般名 (商標名、国内での販売開始年) 製造販売元 (開発会社)で表す。

一方で、これら NA 阻害剤についても、既に薬剤耐性ウイルスが流行または耐性変異が進みつつあるのが現状である [157]. このため、近年、様々なアプローチによる抗インフルエンザ剤の開発が進められている. たとえば、ウイルス感染の初期段階に重要な役割を担う HA の機能を特異的に阻害するもの [158, 159], NA の機能を阻害するポリマー [160], さらに阻害活性を高めた oseltamivir の合成誘導体 [161]などである. また、これまでの抗インフルエンザ剤とは異なる新しい作用機構を有する薬剤の開発も進みつつある. 既に国内での製造承認申請がなされた RNA ポリメラーゼ阻害剤である favipiravir (図 3.4 (c)) [162]および HA と NA の両機能を同時に阻害できる薬剤 [163]などである. これらは、季節性や新型インフルエンザウイルス (H3N2 亜型, H1N1 亜型, B 型)のみならず、高病原性のトリインフルエンザウイルス (H5N1 亜型)および薬剤耐性ウイルスに対抗するための新たな試みであると言える. 特に、NA 阻害剤の開発は NA の X 線結晶解析構造 [164–166]を利用した structure based drug design (SBDD)の成功例の一つとして挙げることができ、分子科学計算・シミュレーションを駆使した解析 [167–181]ならびに多くの QSAR [182]および 3D QSAR 解析 [183, 184]がなされているが、これらを相互に組み合わせた方法による解析・報告例は少ない. したがって、QSAR と分子科学計算・シミュレーションをリンクさせた自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE-QSAR)解析に基づく新たな定量的な試みが、阻害剤と NA との間の詳細な相互作用メカニズムの理解を可能とし、さらには野生型のみならず変異型 NA に対しても高活性な新規 NA 阻害剤の開発につながると考えられる.

本章では、季節性や新型インフルエンザウイルスがともに有する N1 型のノイラミニダーゼ (N1-NA)と代表的な抗インフルエンザ剤の一つである oseltamivir (Tamiflu)を含む一連のシアル酸誘導体の複合体について、非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital: FMO)法等による分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析 [16–21]から、複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式ならびにその変動に対するシアル酸誘導体の各部分構造の寄与を原子・電子レベルで定量的に明らかにすることを目的とした. また、抗インフルエンザ剤が共通に有する amino, guanidino 基の相互作用の違いを明確にするとともに、特異な分岐鎖 alkoxy 基を有する oseltamivir が、一連のシアル酸誘導体のなかで最大の阻害活性を示す要因についても議論する.

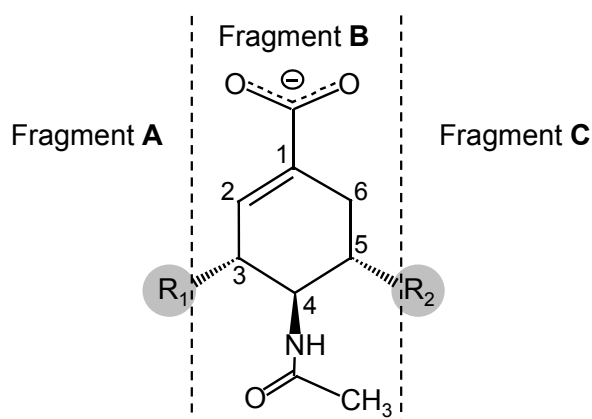
上記の検討の結果、シアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成において、(1) 実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動を LERE-QSAR 解析から定量的に説明できたこと、(2) その変動を支配する特定のエネルギー成分を明らかにしたこと、(3) その変動に関与する N1-NA のアミノ酸残基を定量的に明らかにしたのでそれらを中心に以下に述べる [21, 109, 185].

3.2 解析方法

3.2.1 化合物セット

Kimら [186]により報告されている oseltamivir を含む一連のシアル酸誘導体の N1-NA に対する阻害活性データに基づき、本解析では二つの化合物セット (Sets **I**, **II**) を使用した。Set **I** 化合物として、fragment **C** 部位が amino 基 ($R_2 = \text{NH}_3^+$) である type **I** 化合物および guanidino 基 ($\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$) である type **II** 化合物の二つの系列から構成される合計 8 化合物 (mixed congeneric series) を使用した。また、types **I**, **II** 化合物のそれぞれの fragment **A** 部位は同様の側鎖基 ($R_1 = \text{OH}$, OC_3H_7 , $\text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)(R)$, $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) を有しており、この R_1 の順に Set **I** compounds **1-4** (type **I**) および **5-8** (type **II**) とした。Set **I** 化合物の化学構造、50% 阻害濃度 (IC_{50} 値), Verma ら [182] の NA 阻害剤についての古典 QSAR 解析でしばしば用いられている疎水性置換基定数 π_1 および分子屈折 (molar refractivity: MR) の値を表 3.1 (a) に示す。

表 3.1 シアル酸誘導体 ((a) Sets **I**, (b) **II** 化合物) の化学構造と IC_{50} 値, π_1 および MR



(a) Set I compound				N1-NA		
no.	type	R_1 (fragment A)	R_2 (fragment C)	IC_{50}^a	π_1^b	MR^c
1	I	OH	NH_3^+	6300	-2.61	5.34
2	I	OC_3H_7	NH_3^+	180	-1.53	6.73
3	I	$\text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)(R)$	NH_3^+	10	-1.22	7.19
4^d	I	$\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	NH_3^+	1	-0.69	7.66
5	II	OH	$\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$	100	-2.89	6.36
6	II	OC_3H_7	$\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$	2	-1.98	7.75
7	II	$\text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)(R)$	$\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$	0.5	-1.67	8.22
8	II	$\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$	$\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$	0.5	-1.14	8.68

(Continued)

(b) Set II compound				N1-NA		
no.	type	R ₁ (fragment A)	R ₂ (fragment C)	IC ₅₀ ^a	π ₂ ^e	MR ^c
1	I	OH	NH ₃ ⁺	6300	0.12	5.34
2	I	OCH ₃ (O-C ₁) ^f	NH ₃ ⁺	3700	0.29	5.80
3	I	OC ₃ H ₇ (O-C ₁ -C ₂ -C ₃) ^f	NH ₃ ⁺	180	1.20	6.73
4	I	OC ₄ H ₉ (O-C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄) ^f	NH ₃ ⁺	300	1.73	7.19
5	I	OC ₅ H ₁₁ (O-C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄ -C ₅) ^f	NH ₃ ⁺	200	2.26	7.66
6	I	OC ₆ H ₁₃ (O-C ₁ -C ₂ -C ₃ -C ₄ -C ₅ -C ₆) ^f	NH ₃ ⁺	150	2.79	8.12
7	I	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂ (O-C ₁ -C ₂ -(C ₃)(C _{3'})) ^f	NH ₃ ⁺	200	1.60	7.19
8	I	OCH(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)(R) (O-C ₁ -(C ₂ -C ₃)(C _{2'})) ^f	NH ₃ ⁺	10	1.51	7.19
9 ^d	I	OCH(CH ₂ CH ₃) ₂ (O-C ₁ -(C ₂ -C ₃)(C _{2'} -C _{3'})) ^f	NH ₃ ⁺	1	2.04	7.66

^a Taken from ref. 186 (in nM).

^b π₁ = Clog P (fragments A, B, and C) – Clog P (fragment B), where Clog P is the molecular hydrophobicity parameter, log P, calculated by the BioByte system [187].

^c MR is the molar refractivity and is defined by the Lorentz–Lorenz equation: $MR = [(n^2 - 1)/(n^2 + 2)](MW/d)$, where n = refractive index, MW = molecular weight, and d = density.

^d Oseltamivir (Tamiflu).

^e π₂ = Clog P (fragments A, B, and C) – Clog P (fragments B and C).

^f Numbers denote carbon numbers.

一方で, Set II 化合物として, fragment C 部位に amino 基を有する Set I の type I 化合物に, fragment A 部位のみが異なる新たな化合物を加えた合計 9 化合物 (congeneric series) を使用した. また, fragment A 部位の直鎖・分岐鎖 alkoxy 基 (R₁ = OH, OCH₃, OC₃H₇, OC₄H₉, OC₅H₁₁, OC₆H₁₃, OCH₂CH(CH₃)₂, OCH(CH₃)(CH₂CH₃)(R), OCH(CH₂CH₃)₂) の R₁ の順に Set II compounds 1–9 とした. Set II 化合物の IC₅₀ 値, π₂ および MR の値を表 3.1 (b) に示す. なお, 二つの化合物セットにおける IC₅₀ 値の逆数の常用対数値 log (1/IC₅₀) と Cheng–Prusoff 式 ($K_i = IC_{50}/(1 + [S]/K_m)$ [188], [S] (= 100 μM): 基質濃度, K_m (= 15 μM): Michaelis 定数 [168]) から算出した K_i 値の逆数の常用対数値 log (1/ K_i) との間において, slope が 1 のほぼ完全な線形関係が成立することを確認している.

3.2.2 N1-NA-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング

N1-NA とシアル酸誘導体 (Sets I, II 化合物)の複合体の初期構造として, PDB に登録されている N1-NA と oseltamivir (compound 4 (Set I), compound 9 (Set II): $R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{NH}_3^+$)の複合体の X 線結晶解析構造 (PDB code: 2HU4 [189])を使用した. 2HU4 には二つの野生型ホモ 4 量体の NA 構造が存在するが, 通常シアル酸を切断する NA 活性は単量体 NA がその機能を果たしていると考えられるため, 実際はその単量体 A 鎖構造を使用した. NA の先行研究において, リガンドと NA との間の相互作用を媒介する水分子 (結晶水)の重要性が示されていたが [170, 190, 191], 2HU4 には対応する水分子に加え活性部位の構造維持および酵素活性発現に重要とされる Ca^{2+} イオン [192–195]も含まれていなかった. そこで, 変異体 N1-NA (His274Tyr)と oseltamivir の複合体の X 線結晶解析構造 (PDB code: 3CLO [196])ではあるが, 結晶水および Ca^{2+} イオンを有している 3CLO と 2HU4 の単量体 A 鎖構造同士の C_α 原子座標の重ね合わせ操作から, 結晶水ならびに Ca^{2+} イオンの座標を挿入することで N1-NA と oseltamivir の複合体の初期構造を構築した. 構築した初期構造における解離性のアミノ酸残基 (Asp, Glu, Lys, Arg)はすべて解離型とし, His のプロトン化状態は, pH 7.0 において PDB2PQR web server [197]にて予測した pK_a に基づき決定した. なお, N, C 両末端はそれぞれ CH_3CO 基, NHCH_3 基でキャップした. 以上のすべての操作には SYBYL7.0 [198]を使用した. 得られた N1-NA と oseltamivir の複合体の初期構造に基づき, その他の Sets I, II 化合物の複合体構造をそれぞれ構築した. そのモデリング方法については, 3.2.2.1 節および 3.2.2.2 節においてそれぞれ述べる.

3.2.2.1 Set I 化合物の複合体構造のモデリング

Set I 化合物 (compounds 1–8)は, 中性条件下では解離型の酸性官能基 (fragment B: carboxyl (COO^-) 基) および塩基性官能基 (fragment C: amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(\text{=NH}_2^+)\text{NH}_2$) 基)を有する双性イオンであるため, これら官能基と N1-NA との間の相互作用, 特に amino 基 (type I) および guanidino 基 (type II) の静電相互作用の違いを正確に見積もる必要がある. 静電相互作用は, 電荷の大きさのみならず媒質 (溶媒) の誘電率に大きく影響される. 生体系を構成する溶媒は水であり, その誘電率は一般的な溶媒のなかでは比較的大きいため (水の比誘電率: 78.4), 水を溶媒として成立する生体系においては, 静電相互作用は大きく減弱すると考えられる. そこで, 前節で構築した N1-NA-oseltamivir (compound 4) の複合体の初期構造に対して, 水素原子を付加, さらに切頂八面体の溶媒和ボックスを使用し, 周囲 12 Å に three-point transferable inter-molecular potential (TIP3P) モデル [199]の水分子を配置することで, 水分子による溶媒効果を考慮した. 一方で, これ

ら水分子を含む大規模分子系の molecular mechanics/molecular dynamics (MM/MD)シミュレーションを周期境界条件 (periodic boundary condition: PBC)下で行う場合, 特に静電相互作用の計算に多くの時間を要する. この演算量を軽減するために, 静電相互作用の及ぶ範囲を適当な距離で切断するカットオフ法が, これまでに広く用いられてきた. しかしながら, 長距離にまで達する静電相互作用を特定の距離で切断するカットオフ法は様々な問題を有しており, 現在では無限遠までの静電相互作用を近似的に計算することのできる Ewald 法が広く用いられている. 本解析では, Ewald 法の高速度改良法である particle mesh Ewald (PME)法 [200]を使用するために, 複合体の系全体の荷電状態-1 を中性に保つようにカウンターイオンとして 1 個の Na^+ イオンを加え (図 3.5), 後述の MM/MD シミュレーションを行った.

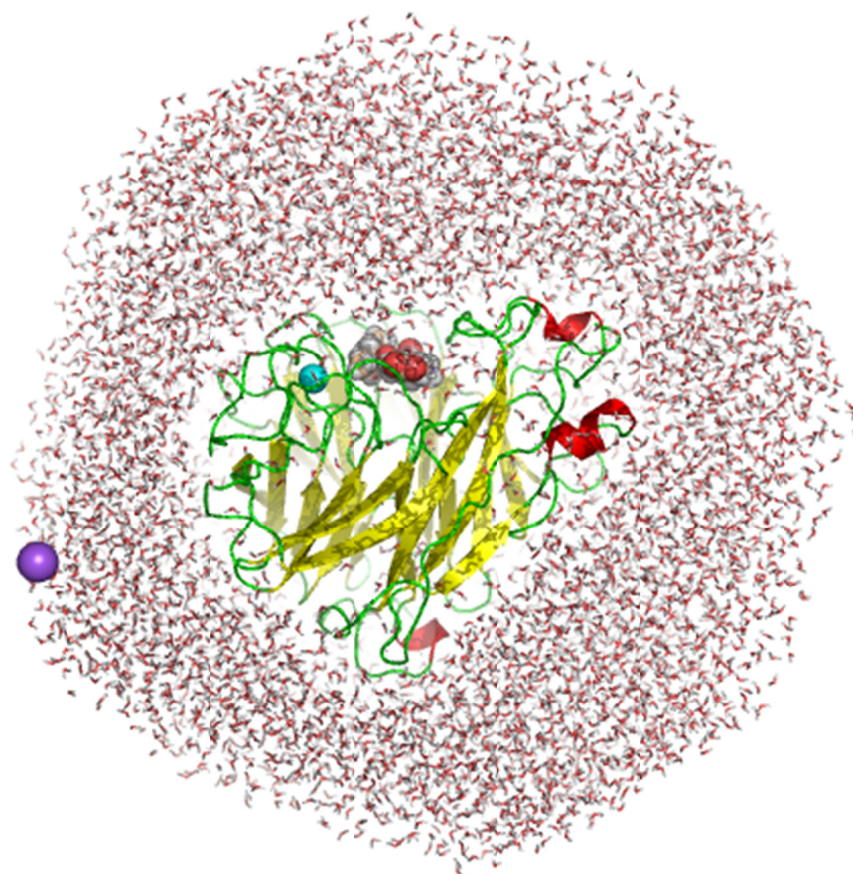


図 3.5 N1-NA-oseltamivir (compound 4)の複合体の溶媒和構造
10,153 個の水分子と Ca^{2+} イオンおよび Na^+ カウンターイオン (それぞれ水色および紫色の CPK モデル)をそれぞれ 1 個ずつ含む.

構築した N1-NA-compound 4 の複合体構造に対する MM/MD シミュレーションには、AMBER10 [102]を使用し、力場パラメータとして parm99 [201]および general AMBER force field (GAFF) [202]を N1-NA および compound 4 にそれぞれ割り当てた。Compound 4 の原子電荷は、Gaussian 03 [203]を使用し、HF/6-31G(d)より得られる restrained electrostatic potential (RESP)電荷 [131]を用いた。MD シミュレーションを行う前処理として、(1) 水素原子、(2) 水分子とカウンターイオン、(3) 阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子、(4) 系全体の順にそれぞれエネルギー極小化計算を行った。このとき、極小化対象原子以外の原子は調和ポテンシャル型の位置拘束 (力の定数 = 500 kcal/mol/Å²)を設けたが、系全体のエネルギー極小化計算においては拘束条件なしで行った。各段階における極小化計算には 1,000 ステップの最急降下 (steepest descent: SD)法と 5,000 ステップの共役勾配 (conjugate gradient: CG)法を組み合わせ使用した (ただし、水素原子の極小化計算における共役勾配法は 2,000 ステップとした)。このとき、エネルギー勾配の収束閾値を 10⁻⁴ kcal/mol/Å に設けた。

エネルギー極小化計算後の N1-NA-compound 4 の複合体構造について、PBC 下での MD シミュレーションを行った。以下に示す MD シミュレーションにおいては、積分時間の刻みに 1.0 fs (1.0 × 10⁻¹⁵ s)を、水素原子が関わる共有結合長には SHAKE アルゴリズム [204]を、温度・圧力制御には Berendsen アルゴリズム [205]を使用し、非結合の分子間相互作用のカットオフ距離を 10 Å とした。ただし、収束の遅い静電相互作用に関しては PME 法 [200]を使用した。第一段階は系の水分子およびカウンターイオンの平衡化であり、N1-NA および compound 4 の全原子に対して調和ポテンシャル型の位置拘束 (10 kcal/mol/Å²)を設けた状態で 120 ps (120 × 10⁻¹² s)に渡り 300 K まで昇温させ、第二段階として系全体を原子の位置拘束条件なしで 120 ps に渡り 300 K まで昇温させた (NVT アンサンブル)。その後、温度を 300 K に保った production MD を原子の位置拘束条件なしで 1.0 ns 行った (NPT アンサンブル)。なお、MM/MD シミュレーションの詳細な計算条件は表 3.2 に示す。さらに、production MD の後半 500 ps のトラジェクトリから抽出した 5,000 個の構造の全原子の座標平均に基づき平均構造を算出し、再度切頂八面体の溶媒和ボックスを使用し、周囲 12 Å に TIP3P モデルの水分子を配置した系に対し、表 3.3 に示す計算条件に基づきエネルギー極小化計算を行った。

表 3.2 N1-NA-compound 4 の複合体構造に対する MM/MD シミュレーション

MM simulation	
Force field	parm99 (N1-NA), GAFF (compound 4)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 2,000 cycles, no cut-off, non-PBC)
Step 2. MM	水分子とカウンターイオンの極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 3. MM	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 4. MM	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
	最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)
MD simulation	
Force field	parm99 (N1-NA), GAFF (compound 4)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Time step	1.0 fs
Steps 1–6. MD	水分子とカウンターイオンの昇温 (20,000 steps / MD step, NVT ensemble, 0–300 K, 1–120 ps)
Steps 7–12. MD	系全体の昇温 (20,000 steps / MD step, NVT ensemble, 0–300 K, 121–240 ps)
Step 13. MD	Production phase (1,000,000 steps, NPT ensemble, 300 K, 240.1–1240 ps)

表 3.3 N1-NA-compound 4 の複合体の平均構造に対するエネルギー極小化計算

MM simulation	
Force field	parm99 (N1-NA), GAFF (compound 4)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 1,000 cycles, no cut-off, non-PBC)
Step 2. MM	水分子とカウンターイオンの極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 7,000 cycles, PBC)
Step 3. MM	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 7,000 cycles, PBC)
Step 4. MM	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 7,000 cycles, PBC)
最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)	

極小化後の構造に基づき、その他の Set I 化合物 (compounds 1–3, 5–8) の複合体構造を構築した。NA に関する先行研究では、リガンドと NA との間の相互作用を媒介する水分子の重要性が示唆されており [170, 190, 191], 実際に複数個の NA-リガンドの複合体の X 線結晶解析構造 (PDB codes: 1BJI, 1F8C, 1F8E, 2QWD, 2QWG, 2QWH, 2QWJ, 2QWK, 3CLO (type I), 1L7F, 1L7G, 1L7H, 1NNC, 2CML, 2HTQ, 2QWE, 2QWF, 2QWI, 3B7E, 3CKZ (type II) [189, 196, 206–211]) において、リガンドと NA との間の相互作用を媒介する水分子 (W1, W2) が確認された (図 3.6) [109]. 具体的には, fragment C 部位に amino 基を有する type I 化合物の場合は二つの水分子 (W1, W2) が、一方で guanidino 基を有する type II 化合物の場合は一つの水分子 (W1) が存在する。また、複数個の X 線結晶解析構造における W1 および W2 の酸素原子の位置についての根平均二乗変位 (root mean square deviation: RMSD) は、それぞれ 0.32 Å ($n = 23$) および 0.26 Å ($n = 9$) であることから、これら水分子はほぼ同等な位置に存在し、リガンドと NA との間の相互作用を媒介すると考えられる。したがって、fragment C 部位 (amino, guanidino 基) に依存する type 特異的な水分子 (compounds 1–4 (type I): W1, W2, 5–8 (type II): W1) を考慮してそれぞれの複合体構造を構築した (図 3.7). 構築した各複合体構造における阻害剤部分の原子電荷は、前述と同様に RESP 電荷を用い、再度切頂八面体の溶媒和ボックスを使用し、周囲 12 Å に TIP3P モデルの水分子を配置した系に対し、表 3.4 に示す計算条件に基づきエネルギー極小化計算を行った。

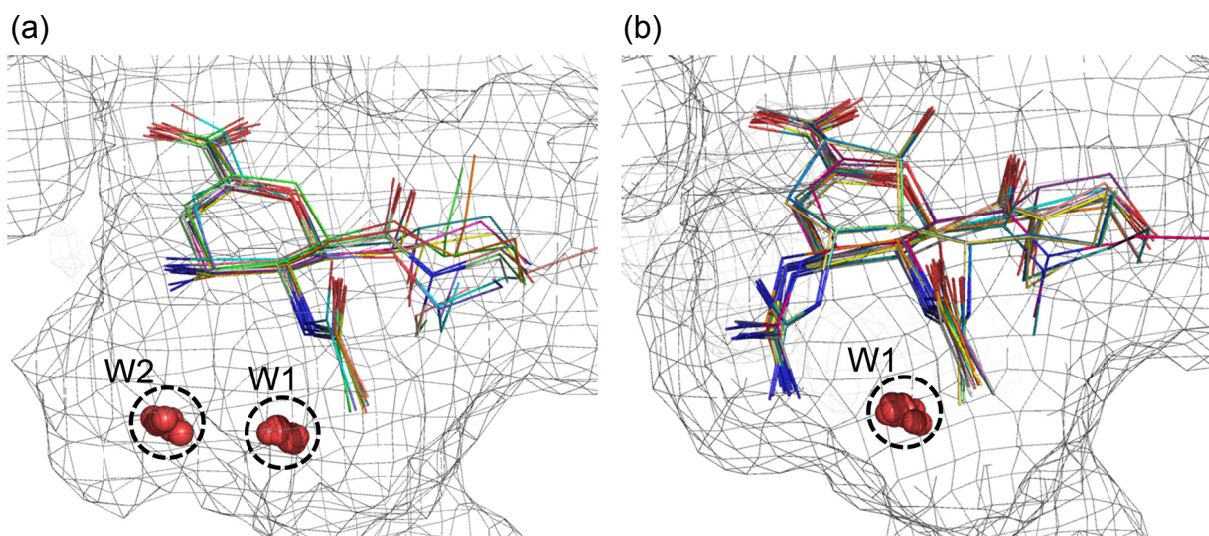


図 3.6 X線結晶解析構造におけるNAとリガンドとの間に位置する水分子

(a) amino 基を有するリガンド (PDB codes: 1BJI, 1F8C, 1F8E, 2QWD, 2QWG, 2QWH, 2QWJ, 2QWK, 3CL0 (type I) [196, 208–210]), (b) guanidino 基を有するリガンド (PDB codes: 1L7F, 1L7G, 1L7H, 1NNC, 2CML, 2HTQ, 2QWE, 2QWF, 2QWI, 3B7E, 3CKZ (type II) [189, 196, 206, 207, 210, 211]).

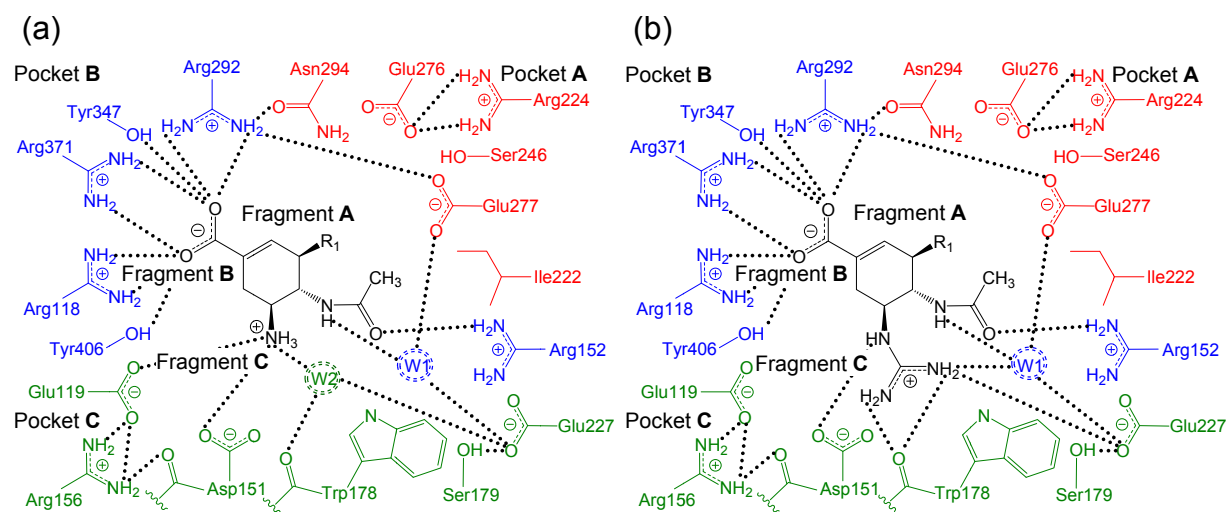


図 3.7 N1-NA-Set I 化合物の複合体構造の活性部位近傍の相互作用

(a) N1-NA-compounds 1–4 (type I)の複合体, (b) N1-NA-compounds 5–8 (type II)の複合体. W1 および W2 は水分子を, pockets A, B, C は, それぞれ fragments A, B, C の近傍のアミノ酸残基を表す.

表 3.4 N1-NA-Set I compounds 1-8 の複合体構造に対するエネルギー極小化計算

MM simulation	
Force field	parm99 (N1-NA), GAFF (Set I compounds 1-8)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子の極小化 (SD: 500 cycles, CG: 500 cycles, no cut-off, non-PBC)
Step 2. MM	水分子とカウンターイオンの極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 7,000 cycles, PBC)
Step 3. MM	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 7,000 cycles, PBC)
Step 4. MM	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 8,000 cycles, PBC)
	最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)

3.2.2.2 Set II 化合物の複合体構造のモデリング

Set II 化合物 (compounds 1-9)も, Set I 化合物と同様に解離性の酸性官能基 (fragment B: carboxyl (COO⁻)基)および塩基性官能基 (fragment C: amino (NH₃⁺)基)を有する双性イオンであるが, これら官能基は Set II 化合物に共通の部分構造であるため, N1-NA との間の静電相互作用は化合物によらずほぼ一定であると考えられる. 一方で, fragment A 部位の直鎖・分岐鎖 alkoxy 基は, 長鎖の alkoxy 基も含んでいるため, その高い自由度に基づく分子運動を広範かつ効果的に評価する必要がある. そこで, 3.2.2 節にて構築した N1-NA-oseltamivir (compound 9)の複合体構造に基づき, その他の Set II 化合物 (compounds 1-8)の複合体構造を構築し, これらに対して self-guided Langevin dynamics (SGLD)シミュレーション [212]を行った. Langevin dynamics (LD)では, LD 方程式を用いて粒子のブラウン運動を記述するが, このとき粒子に作用する合力は粒子の速度に比例する摩擦力と粒子を取り囲む溶媒分子が粒子に与えるランダム力 (摂動力)の和として定義される. SGLD は, この LD 方程式に局所的な平均摩擦力である“guiding force”を導入することで, 通常の LD および MD に比べて広範かつ効果的な配座探索を可能とする. SGLD シミュレーションでは, 力場パラメータとして united-atom force field (UAFF) [213]および GAFF を N1-NA および compounds 1-9 にそれぞれ割り当てた (AMBER10) [102]. Compounds 1-9 の原子電荷は, 前述と同様に HF/6-31G(d)より得られる RESP 電荷を用いた (Gaussian 03). SGLD シミュレーションを行う前処理として, 表 3.5 に示す計算条件に基づきエネルギー極小化計算を行った. このとき, 極小化対象原子以外の原子は調和ポテンシャル型の位置

拘束を設けたが、系全体のエネルギー極小化計算においては拘束条件なしで行い、また距離依存性誘電率 ($\epsilon = 4r$)を導入することで静電相互作用に対する溶媒効果を考慮した。エネルギー極小化計算後の N1-NA-compounds **1-9** の各複合体構造について、表 3.5 に示す計算条件に基づき SGLD シミュレーションを行った。このとき、積分時間の刻みに 1.0 fs を、水素原子が関わる共有結合長には SHAKE アルゴリズムを、温度制御には衝突頻度を 5.0 ps^{-1} に設定した Langevin 温度制御法を使用し、非結合の分子間相互作用のカットオフ距離を 10 Å とした。Production SGLD は、温度を 300 K に保ち 20 ns 行った (NPT アンサンブル)。加えて、N1-NA の主鎖および相互作用を媒介する水分子ならびに Set II 化合物の fragments **B**, **C** 部位の重原子に対して位置拘束を設けたが ($5 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$)、これは共通の部分構造である fragments **B**, **C** は、化合物の fragment **A** によらずほぼ同等な水素結合ないしは静電相互作用により N1-NA と強固に結合すると考えられるためである。なお、N1-NA-Set II 化合物の複合体構造における活性部位近傍の相互作用は、図 3.7 (a) で示したものと同様である。

表 3.5 N1-NA-Set II compounds **1-9** の複合体構造に対する MM/SGLD シミュレーション

MM simulation	
Force field	UAFF (N1-NA), GAFF (Set II compounds 1-9)
Solvent effect	Distance-dependent dielectric constant ($\epsilon = 4r$)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 2,000 cycles, non-PBC)
Step 2. MM	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, non-PBC)
Step 3. MM	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, non-PBC)
	最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)
SGLD simulation	
Force Field	UAFF (N1-NA), GAFF (Set II compounds)
Solvent	Distance-dependent dielectric constant ($\epsilon = 4r$)
Cut-off	10 Å
Time step	1.0 fs
Production SGLD	N1-NA の主鎖, 相互作用を媒介する水分子および Set II 化合物の fragments B , C 部位の重原子位置拘束 (20,000,000 steps, NPT ensemble, 300 K, 1-20 ns)

3.2.3 N1-NA-シアル酸誘導体に対する LERE-QSAR 解析

3.2.3.1 LERE-QSAR 解析 (N1-NA-Set I 化合物)

Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために, LERE-QSAR 解析 [16–21] を行った. 2.1 節で構築した LERE-QSAR 解析の基本式 (2.6) において, 結合相互作用エネルギー ΔE_{bind} ($= \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}}$) は FMO/MP2/6-31G で算出し, ΔE_{bind}^0 および E_{disp} はそれぞれ FMO/HF エネルギー $E^{\text{FMO/HF}}$ および電子相関エネルギー E_{corr} ($= E^{\text{FMO/MP2}} - E^{\text{FMO/HF}}$) により評価した. 水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は古典的連続誘電体モデルである Poisson–Boltzmann/generalized Born (PB/GB) 法に加え, 量子化学的連続誘電体モデルである self-consistent reaction field-conductor-like polarizable continuum model (SCRf-CPCM) 法を組み込んだ古典/量子化学の hybrid 評価法で算出することで, LERE-QSAR 解析における $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の定量的評価に対する hybrid 評価法の有用性の検証も行った. また, 解離自由エネルギー変化 ΔG_{diss} は Set I 化合物の fragment C 部位 (amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(\text{=NH}_2^+)\text{NH}_2$) 基) の自由エネルギー変化として, SCRf-CPCM/HF/6-31+G(d,p) により評価した. なお, Set I 化合物の fragment B 部位 (carboxyl (COO^-) 基, $\text{pK}_a \sim 2.4$) については, 細胞表面の作用部位における pH ($= 7.4$) においてほぼ完全に解離していると考えられるため, ΔG_{diss} は考慮していない. 各エネルギー項は, 3.2.2.1 節のモデリング方法に従って構築した N1-NA-Set I 化合物の複合体構造に基づき算出した. 最終的に式 (2.6) から下式 (3.1) を導き, これを N1-NA-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析における基本式とした.

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}} + \text{const}_3 \quad (3.1)$$

古典/量子化学の hybrid 評価法に基づく $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の評価では, 双性イオンである Set I 化合物ならびに活性部位近傍のアミノ酸残基 (解離性およびその他のアミノ酸残基を含む 26 残基, 図 3.8) を量子化学的 (SCRf-CPCM 法: CPCM/HF/6-31G, キャビティモデル: Bondi) に取扱い, その他を古典的 (PB/GB 法: PB, GB-HCT, GB-OBC I, GB-OBC II, キャビティモデル: mbondi2) に評価した. すなわち, N1-NA-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析における $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の評価として, 4 種の PB/GB 法 (PB, GB-HCT, GB-OBC I, GB-OBC II) ならびに 4 種の hybrid 評価法 (CPCM-Bondi/PB, CPCM-Bondi/GB-HCT, CPCM-Bondi/GB-OBC I, CPCM-Bondi/GB-OBC II) の合計 8 種類を用いた.

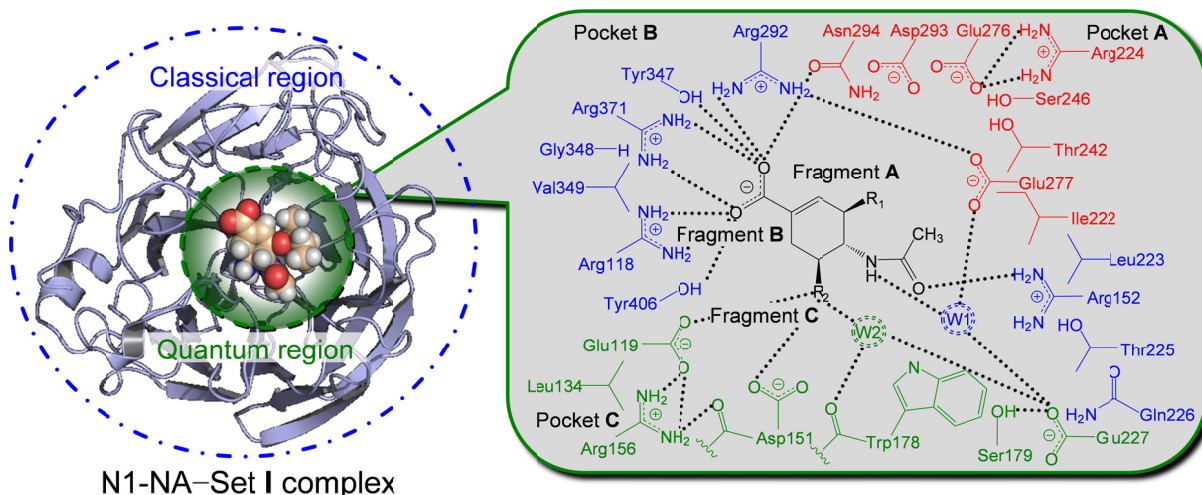


図 3.8 N1-NA-Set I 化合物の複合体構造に対する hybrid 評価法における古典/量子領域
 Quantum region: SCRF-CPCM 法 (CPCM/HF/6-31G), Classical region: PB/GB 法 (PB, GB-HCT, GB-OBC I, GB-OBC II).

3.2.3.2 LERE-QSAR 解析 (N1-NA-Set II 化合物)

Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために, entropic 変化 ($-T\Delta S$) 項を陽に考慮した拡張 LERE-QSAR 解析を行った. なぜなら, 従来の LERE-QSAR 解析においては enthalpic 変化 (ΔH) 項しか陽に考慮しておらず, Set II 化合物のような fragment A 部位に長鎖の alkoxy 基を有する化合物の場合 (表 3.1 (b)), その揺らぎに基づく $-T\Delta S$ の考慮が必要であると考えられるためである. Set II 化合物は共通の解離性官能基 (fragment B: carboxyl (COO^-) 基, fragment C: amino (NH_3^+) 基) を有することから, ΔG_{diss} は化合物によらずほぼ一定であると考えられるため, 2.1 節の式 (2.3) に基づき拡張 LERE-QSAR 式の構築を行った. 式 (2.3) において, ΔG_{bind} と ΔG_{sol} の和を結合・水和に伴う自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}}$) と定義し ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}} = \Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}$), $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ が N1-NA (protein: P) および Set II 化合物 (ligand: L) の結合・水和に伴う適応自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ および $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}}$), さらに N1-NA と Set II 化合物との間 (P/L) の結合自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{P/L}}$) を含むと仮定した場合 ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}} = \Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}} + \Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}} + \Delta G_{\text{bind}}^{\text{P/L}}$), 下式 (3.2) を得ることができる.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}} + \Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}} + \Delta G_{\text{bind}}^{\text{P/L}}) + \text{const}_1 \quad (3.2)$$

ここで, 各自由エネルギー項は複合体形成 (適応 (adaptation) および結合 (binding)) に伴う自由エネルギー変化を表す. 図 3.9 に示すように, $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}} (= G^{\text{PP}} - G^{\text{PO}})$ および $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}} (=$

$G^{LL} - G^{L0}$ は、適応に伴う N1-NA および Set II 化合物の適応自由エネルギー変化を、 $\Delta G_{\text{bind}}^{P/L} (= G^C - G^{PP} - G^{LL})$ は結合に伴う N1-NA と Set II 化合物との間の結合自由エネルギー変化をそれぞれ表す。すなわち、 $\Delta G_{\text{adapt}}^P$ および $\Delta G_{\text{adapt}}^L$ は N1-NA および Set II 化合物の複合体状態 (bound)における自由エネルギー (G^{PP} , G^{LL})からそれぞれの単独状態 (free)における自由エネルギー (G^{P0} , G^{L0})を差し引くことで、 $\Delta G_{\text{bind}}^{P/L}$ は N1-NA-Set II 化合物の複合体状態の自由エネルギー (G^C)から N1-NA および Set II 化合物のそれぞれの自由エネルギー (G^{PP} , G^{LL})を差し引くことで算出した。

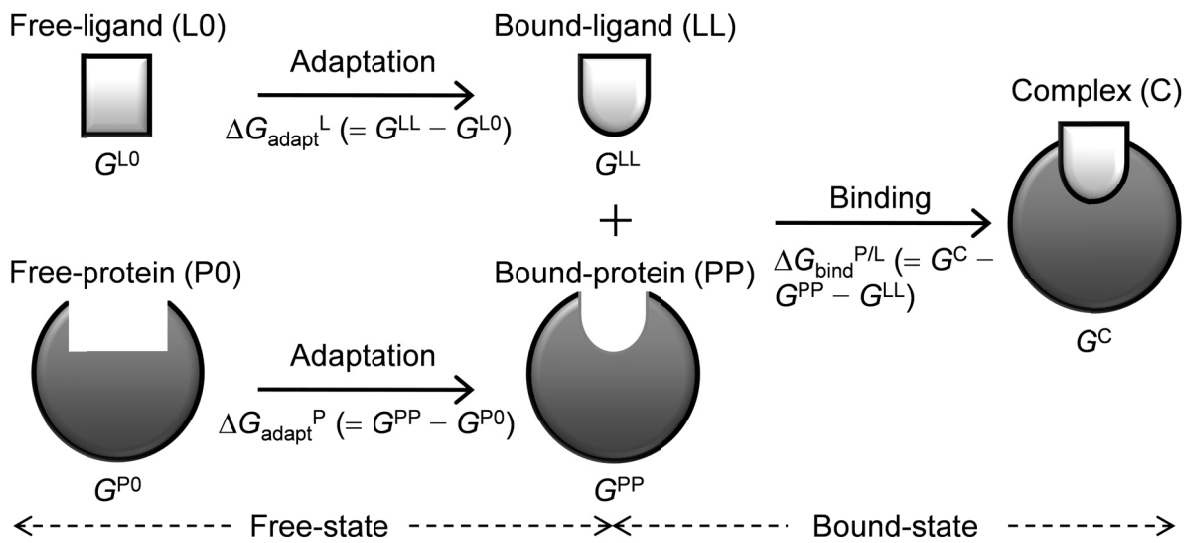


図 3.9 リガンドとタンパク質の複合体形成過程

N1-NA-Set II 化合物の複合体状態およびそれぞれの単独状態における自由エネルギー (G^{P0} , G^{PP} , G^{L0} , G^{LL} , G^C)は、3.2.2.2 節にて述べたそれぞれ独立した SGLD シミュレーションにおける 20 ns のダイナミクストラジェクトリから 0.4 ps 間隔で抽出した 50,000 個の構造に基づく自由エネルギーの統計平均値 ($\langle G^{P0} \rangle$, $\langle G^{PP} \rangle$, $\langle G^{L0} \rangle$, $\langle G^{LL} \rangle$, $\langle G^C \rangle$)とした。独立した SGLD トラジェクトリに基づき算出される適応自由エネルギー変化は、複合体状態のみのトラジェクトリから得られる結合自由エネルギー変化では捉えることのできない複合体形成過程における動的挙動に基づく自由エネルギー変化を反映すると考えられる。すなわち、式 (3.2)においては、結合に伴う自由エネルギー変化に加え、前節の式 (3.1)には含まれない適応に伴う自由エネルギー変化が含まれることを意味する。一方で、 $\Delta G_{\text{adapt}}^P$, $\Delta G_{\text{adapt}}^L$ および $\Delta G_{\text{bind}}^{P/L}$ は、それぞれ ΔH と $-T\Delta S$ の和であることから ($\Delta G_{\text{adapt}}^P = \langle G^{PP} \rangle - \langle G^{P0} \rangle = (\langle H^{PP} \rangle - \langle H^{P0} \rangle) - T(S^{PP} - S^{P0}) = \Delta H^P - T\Delta S^P$, $\Delta G_{\text{adapt}}^L = \langle G^{LL} \rangle - \langle G^{L0} \rangle = (\langle H^{LL} \rangle - \langle H^{L0} \rangle) - T(S^{LL} - S^{L0}) = \Delta H^L - T\Delta S^L$, $\Delta G_{\text{bind}}^{P/L} = \langle G^C \rangle - \langle G^{PP} \rangle - \langle G^{LL} \rangle = (\langle H^C \rangle - \langle H^{PP} \rangle - \langle H^{LL} \rangle) - T(S^C - S^{PP} - S^{LL}) = H^{P/L} - TS^{P/L}$)、式 (3.2)は下式 (3.3)として表現可能である。

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}} - T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}}) + \text{const}_1 \quad (3.3)$$

ここで、 $\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}} (= \Delta H^{\text{P}} + \Delta H^{\text{L}} + H^{\text{P/L}})$ および $-T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}} (= -T\Delta S^{\text{P}} - T\Delta S^{\text{L}} - TS^{\text{P/L}})$ は、Set II 化合物とN1-NAの複合体形成に伴う enthalpic 変化項および entropic 変化項をそれぞれ表す。 $\Delta H^{\text{P}} (-T\Delta S^{\text{P}})$ および $\Delta H^{\text{L}} (-T\Delta S^{\text{L}})$ は、それぞれ適応に伴う N1-NA および Set II 化合物の適応 enthalpic (entropic)変化を、 $H^{\text{P/L}} (-TS^{\text{P/L}})$ は結合に伴う N1-NA と Set II 化合物との間の結合 enthalpic (entropic)変化を表す。

ΔH^{X} ($X = \text{P, L, P/L}$)は実効的な enthalpic 変化項である ΔE_{bind}^0 , E_{disp} および ΔG_{sol} の総和として表される ($\Delta H^{\text{X}} = \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}$). Set II 化合物とN1-NAの複合体形成においては、Set II 化合物の共通の解離性官能基である fragments B, C 部位とN1-NAの pockets B, C のアミノ酸残基との間の水素結合ないしは静電相互作用による強固な結びつきがその主要因となると考えられるが (図 3.7 (a)), これら静電相互作用の ΔG_{obs} の変動に対する寄与は小さいと考えられる。なぜなら、この静電相互作用エネルギーの大部分を担う ΔE_{bind}^0 ($\approx \Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$)と ΔG_{sol} ($\approx \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)の各々の寄与は大きい、2.4 節でも確認したように、両者の間には良好な逆相関関係が成立しており、結果として静電相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)の寄与は比較的小さくなると考えられるためである。あるいは、fragments B, C 部位は Set II 化合物に共通の部分構造であるため、N1-NA との間の静電相互作用エネルギーは化合物によらずほぼ一定であると考えられる。一方で、これまでに我々は N1-NA-Set I 化合物の複合体に対する相互作用解析 [109]において、両分子の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動は、fragment A と pocket A のアミノ酸残基との間の分散相互作用などの局所的な相互作用により支配されることを定量的に明らかにしている。すなわち、Set II 化合物とN1-NAの複合体形成においても、それを実効的に担う enthalpic 変化項のうち、特に分散相互作用エネルギー (E_{disp})が ΔG_{obs} の変動に対して支配的に働くと考えられる。そのため、N1-NA-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析における enthalpic 変化項として、 E_{disp} のみを考慮した。SGLD トrajекトリから得られる 50,000 個の構造に対する E_{disp} の評価として、MP2 レベルの計算に基づく評価 (E_{corr} の算出)は計算コストの問題から現状では困難である。He ら [121]の報告によれば、 E_{disp} は Amber の LJ6 パラメータに基づく引力エネルギー (E_{LJ6})により良好に近似できることから、本解析における E_{disp} の評価として E_{LJ6} を用いた。したがって、複合体形成に伴う enthalpic 変化項 $\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}} (= \Delta H^{\text{P}} + \Delta H^{\text{L}} + H^{\text{P/L}})$ は、 $E_{\text{LJ6}} (= \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}} + \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}})$ のみを考慮することで評価した。

$-T\Delta S^{\text{X}}$ ($X = \text{P, L, P/L}$)は実効的な entropic 変化項を表すが、通常この項はその寄与が小さいために無視あるいはその定量的評価には不確実性を伴う。しかしながら、リガンドとタンパク質が複合体を形成する際には、両分子における並進・回転・振動の分子運動が制限される結果として configurational entropy (S_{config})の変化が生じ、これが複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動に対して与える影響は大きいとされる。 S_{config} の評価には、2.2.2 節にて述べた Schlitter 近似 [87]を用いた。本解析では、N1-NA-Set II 化合物の複合体状態およびそれぞれの単独状態における SGLD トrajекトリから得られる 50,000 個の構造から原子位置揺らぎの分

散・共分散 matrix σ を算出し, これに基づき $-TS_{\text{schl}} (= (-RT/2) \ln \det [\mathbf{1} + k_B T e^2 / \hbar^2 \mathbf{M}\sigma])$ を評価した. このとき, 各トラジェクトリにおける 50,000 個の構造をそれぞれの初期配座に対して並進・回転 fitting することで並進・回転の分子運動に基づく寄与 (conformational entropy (S_{confor})) を分離して S_{schl} を算出した. なお, 別途に Karplus ら [77] の quasi-harmonic 近似に基づき算出した S_{confor} を S_{schl} に加えているため, S_{schl} は S_{config} に対応すると考えられる. 図 3.10 に示すように, $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}} (= (-TS_{\text{schl}}^{\text{PP}}) - (-TS_{\text{schl}}^{\text{P0}}))$ および $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} (= (-TS_{\text{schl}}^{\text{LL}}) - (-TS_{\text{schl}}^{\text{L0}}))$ は N1-NA および Set II 化合物の複合体状態における entropic 変化 ($-TS_{\text{schl}}^{\text{PP}}$, $-TS_{\text{schl}}^{\text{LL}}$) からそれぞれの単独状態における entropic 変化 ($-TS_{\text{schl}}^{\text{P0}}$, $-TS_{\text{schl}}^{\text{L0}}$) を差し引くことで, $-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}} (= (-TS_{\text{schl}}^{\text{C}}) - (-TS_{\text{schl}}^{\text{PP}}) - (-TS_{\text{schl}}^{\text{LL}}))$ は複合体状態における交差項から算出した. したがって, 複合体形成に伴う entropic 変化項 $-T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}} (= -T\Delta S^{\text{P}} - T\Delta S^{\text{L}} - TS^{\text{P/L}})$ は, $-T\Delta S_{\text{schl}} (= -T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}})$ として評価した.

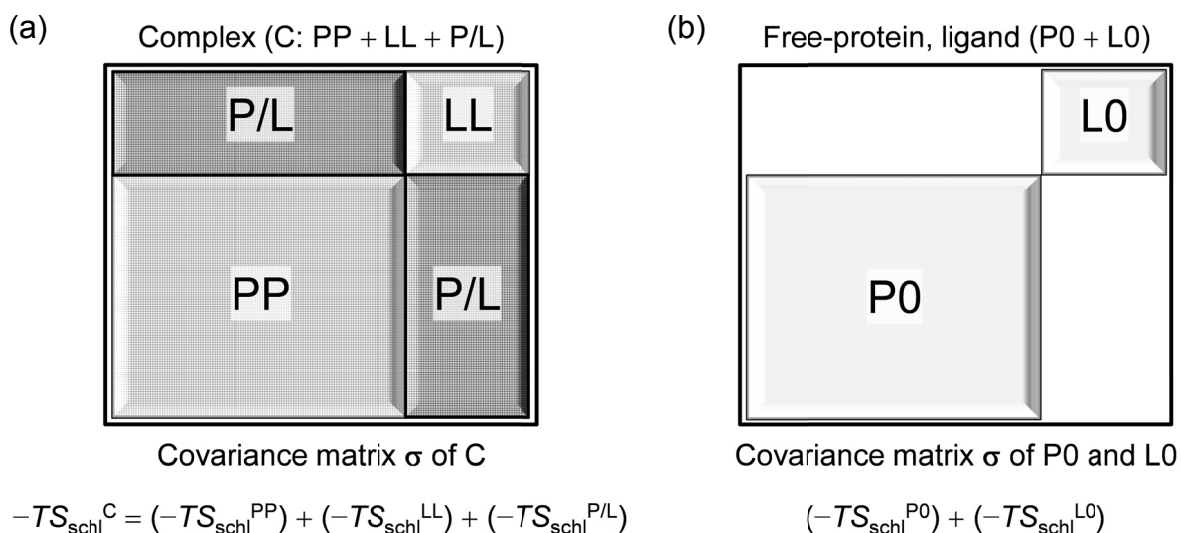


図 3.10 Schlitter 近似に基づく entropic 変化項の評価

(a) N1-NA-Set II 化合物の複合体状態, (b) N1-NA および Set II 化合物の単独状態における分散・共分散 matrix σ . σ の要素は $\langle (x_i - \langle x_i \rangle)(x_j - \langle x_j \rangle) \rangle$ で与えられ, $x_{i,j}$ は各トラジェクトリにおける構造をそれぞれの初期配座に対して並進・回転 fitting した後の Cartesian 座標である.

最終的に式 (3.3) から下式 (3.4) を導き, これを N1-NA-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析における基本式とした.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}} + \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}) + \text{const}_1 \quad (3.4)$$

3.3 結果および考察

3.3.1 Set I 化合物の解析

3.3.1.1 Set I 化合物の N1-NA に対する結合相互作用様式

図 3.11 は, N1-NA-oseltamivir (compound 4)の複合体構造に対する MD シミュレーションにおける RMSD 値の経時変化を示す. Production MD における RMSD 値はほぼ一定であることから初期構造からの大きな逸脱はないと考えられるため, MM/MD シミュレーションにより得られた複合体構造は妥当であると判断できる (図 3.11 (a)). Compound 4 における fragments B, C 部位の RMSD 値はほぼ一定となっているが, fragment A 部位の RMSD 値は fragments B, C 部位のそれらと比べて変動が大きい (図 3.11 (b)). このことは, 図 3.7 (a)からも確認・推察可能なように, fragments B, C 部位の carboxyl, acetamide, amino 基と N1-NA の pockets B, C のアミノ酸残基との間には強固な水素結合ないしは静電相互作用が存在すること, 一方で, fragment A 部位は alkoxy 基であるためその近傍の pocket A のアミノ酸残基との間には比較的結合力の弱い分散相互作用が存在することを反映している. 図 3.12 は production MD の後半 500 ps における compound 4 と N1-NA との間の水素結合占有率 (カットオフ距離: 3.0 Å (以内), カットオフ角度: 120.0° (以上)を満たすトラジェクトリ中の構造数 (n)と全構造数 (N)の比 ($= n/N$))を示しているが, 実際に compound 4 (fragments B, C)と N1-NA (pockets B, C)のアミノ酸残基との間にはいくつかの強固な水素結合が確認される. 特に, carboxyl 基 (fragment B)と arginine triad (pocket B: Arg118, Arg292, Arg371)の Arg292 および Arg371 との間の水素結合は強固であるが, Arg118 との間の水素結合はほとんど確認されない. これは Arg118 がその近傍に位置する Glu119 (pocket C)との間に水素結合を形成することに起因し, 結果として carboxyl 基との相互作用が減弱すると考えられる. このような Arg118 の動的挙動は先行研究においても報告されている [190, 214–216]. また, acetamide 基 (fragment B)および amino 基 (fragment C)は, それぞれ Arg152, W1 (pocket B)および Glu119, Asp151, W2 (pocket C)との間において水素結合を形成している. したがって, fragments B, C 部位と pockets B, C のアミノ酸残基および水分子との間の水素結合ないしは静電相互作用が, oseltamivir (compound 4)を含む一連の Set I 化合物の N1-NA に対する結合の安定化に支配的に働き, これが複合体形成の主要因であると考えられる.

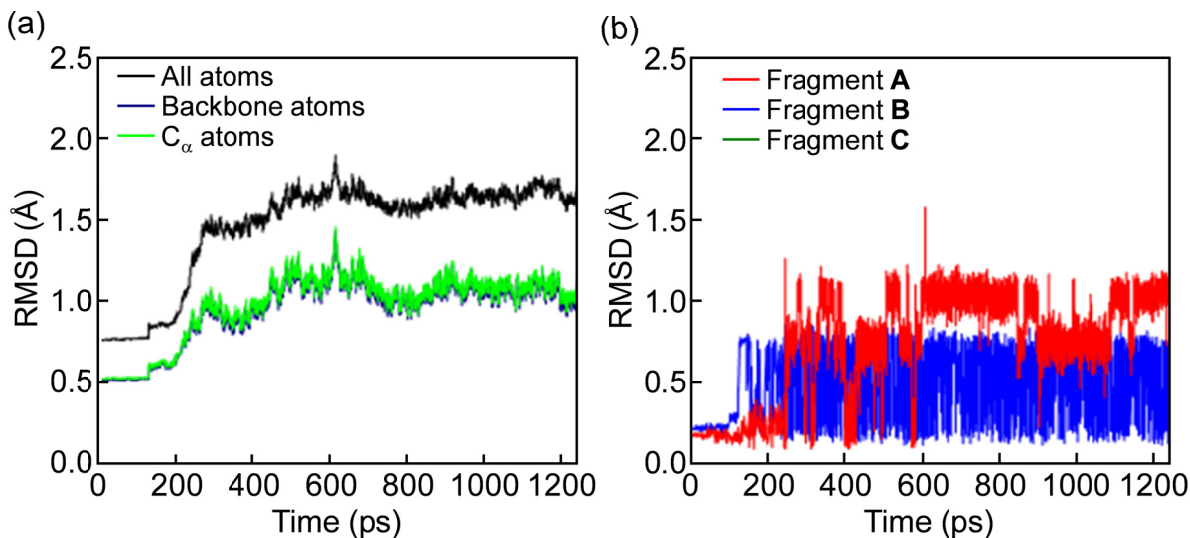


図 3.11 N1-NA-oseltamivir (compound 4)の複合体構造の MD シミュレーションにおける RMSD 値の経時変化 (a) N1-NA, (b) Oseltamivir (compound 4). RMSD 値は, 初期配座を基準原子座標として, MD シミュレーションにおける各構造をその初期配座に重ね合わせることで算出した.

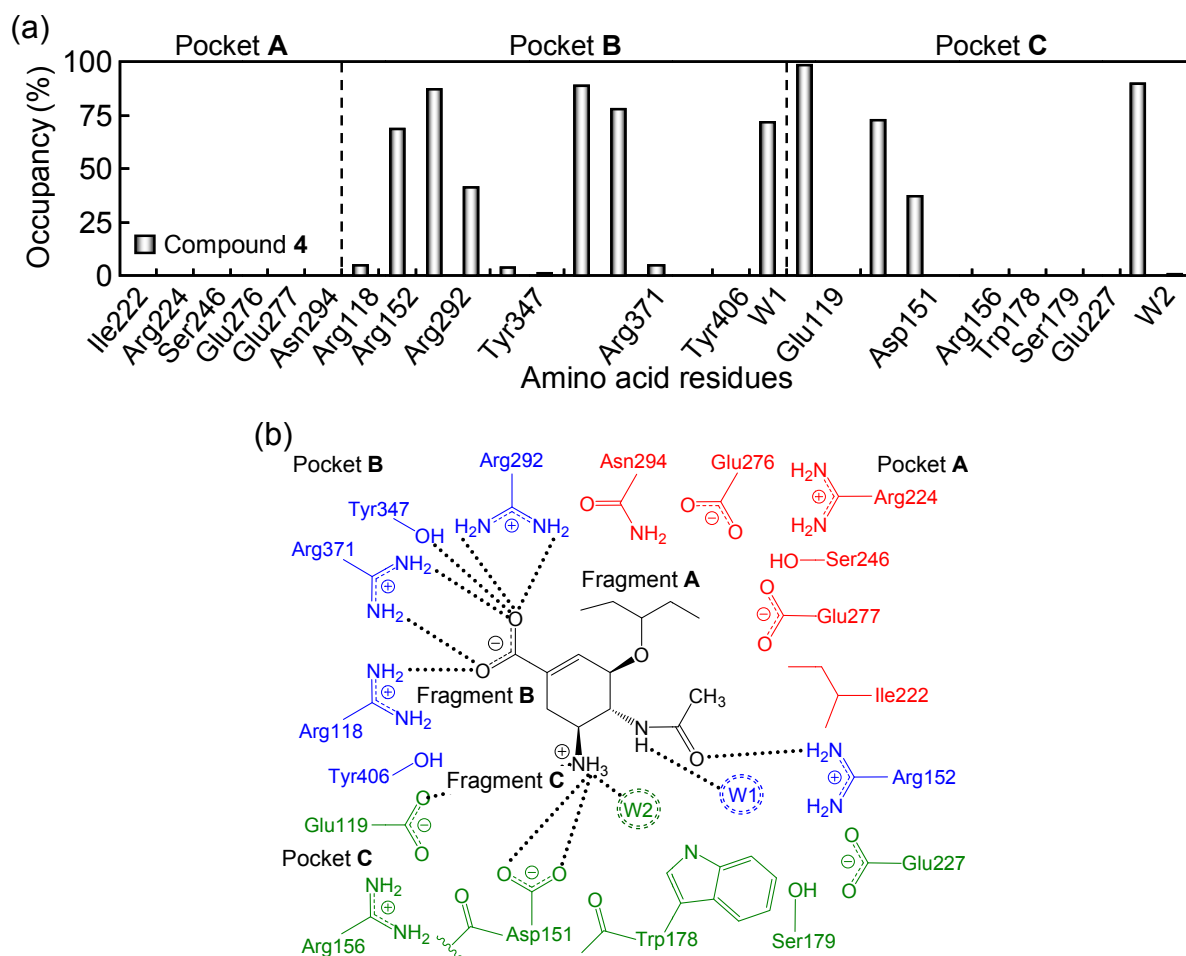


図 3.12 Oseltamivir (compound 4)と N1-NA との間の相互作用様式 (a) 水素結合占有率, (b) 水素結合様式.

MM/MD シミュレーションにより得られた N1-NA-compound 4 の複合体構造に基づき、その他の Set I 化合物 (compounds 1-3, 5-8) の複合体構造を構築した。図 3.13 は、N1-NA-compounds 1-4 (type I) および N1-NA-compounds 5-8 (type II) の複合体構造の重ね合わせを示す。Types I, II 化合物のそれぞれの系列の複合体において、阻害剤同士は類似した空間配置を占めていることを確認できる。Type I 化合物の acetamide 基および amino 基の窒素原子 (N_1 および N_2) と二つの水分子 W1 および W2 の酸素原子 (O_1 および O_2) との間の平均距離は、それぞれ $2.98 (\pm 0.09) \text{ \AA}$ および $2.88 (\pm 0.01) \text{ \AA}$ であり (図 3.13 (a), 表 3.6), また, type II 化合物の acetamide 基および guanidino 基の窒素原子 (N_1 および N_4) と水分子 W1 の酸素原子 (O_1) との間の平均距離は、それぞれ $2.85 (\pm 0.01) \text{ \AA}$ および $2.87 (\pm 0.01) \text{ \AA}$ であることから (図 3.13 (b), 表 3.6), 各阻害剤と N1-NA との間に位置する水分子との水素結合を介した相互作用が良好に保たれている。また, N1-NA-compound 4 の複合体構造に対する MD シミュレーションにおける W1 および W2 についての根平均二乗揺らぎ (root mean square fluctuation: RMSF) は、それぞれ 0.42 \AA および 0.46 \AA であることから、これら水分子は compound 4 と N1-NA との間に位置し、両分子間の相互作用を媒介することを確認した。次節において、これら相互作用を媒介する水分子を含め近傍のアミノ酸残基との間の相互作用の詳細を、FMO 法に基づく結合相互作用エネルギー解析から明らかにする。

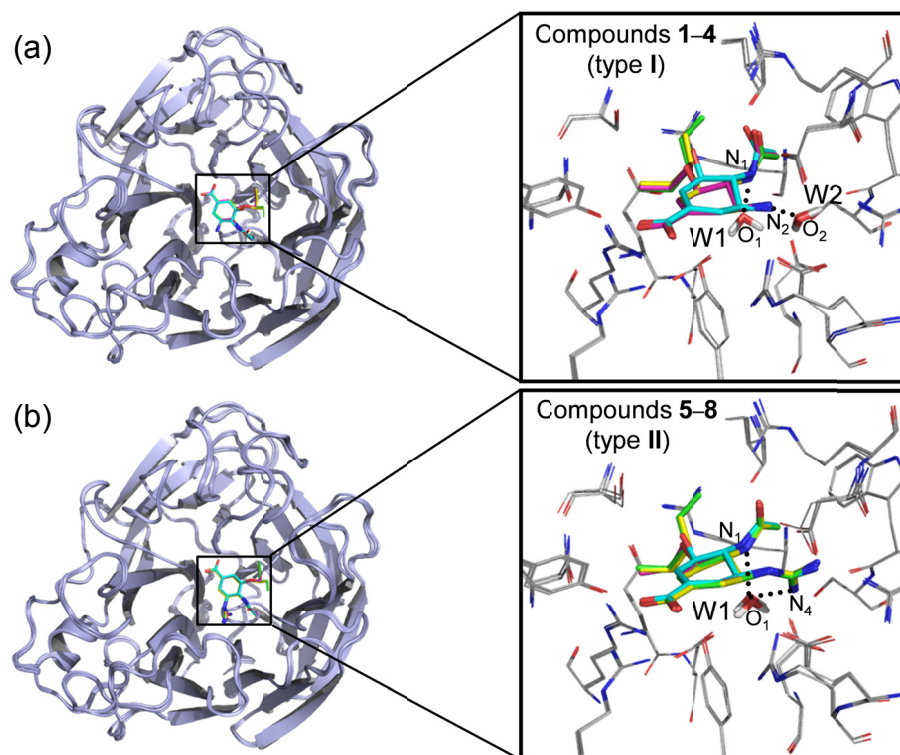


図 3.13 N1-NA の活性部位における types I, II 化合物および水分子の空間配置 (a) N1-NA-compounds 1-4 (type I) の複合体, (b) N1-NA-compounds 5-8 (type II) の複合体. 各阻害剤および水分子 (W1, W2) は、それぞれ stick モデルで、活性部位近傍に位置するアミノ酸残基は line モデルで表す。

表 3.6 Set I 化合物と水分子との間の原子間距離

Set I compound		Interatomic distance ^a			
no.	type	N ₁ (acetamide)	N ₁ (acetamide)	N ₂ (amino)	N ₄ (guanidino)
		-O ₁ (W1)	-O ₂ (W2)	-O ₂ (W2)	-O ₁ (W1)
1	I	3.11	3.00	2.88	—
2	I	2.94	3.10	2.88	—
3	I	2.93	3.10	2.89	—
4	I	2.92	3.13	2.88	—
5	II	2.86	—	—	2.87
6	II	2.84	—	—	2.88
7	II	2.84	—	—	2.86
8	II	2.84	—	—	2.87

^a In Å.

3.3.1.2 N1-NA-Set I 化合物の結合相互作用エネルギー解析

図 3.14 は、Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 ΔG_{obs} ($= RT \ln IC_{50}$, $T = 310 \text{ K}$) と FMO 法に基づき算出した結合相互作用エネルギー ΔE_{bind} ($= \Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}}$) との関係を示す。Compounds 1–4 (type I), 5–8 (type II) のそれぞれにおいて、 ΔE_{bind} の変動は ΔG_{obs} のそれと相関していることから ($r = 0.882$ (type I), 0.925 (type II)), 結合相互作用エネルギーの安定化に伴い阻害活性値が線形に増大することを確認できる。しかしながら、types I, II はそれぞれ異なる傾きと切片を有する直線上にプロットされていることから、type 依存的な結合様式が存在すると考えられる。このことは types I, II 化合物の fragment C 部位の ΔG_{diss} ($\text{p}K_{\text{a}}$) の違いあるいは N1-NA に対する結合様式の違い、すなわち amino, guanidino 基とその近傍のアミノ酸残基および水分子との間の相互作用の違いを反映していると考えられる。また、下式 (3.5) から確認可能なように、 ΔE_{bind} は Set I 化合物と N1-NA の各アミノ酸残基との間の相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy: IFIE) の総和 (ΣIFIE) にほぼ対応していることから、IFIE を用いることで両分子間の相互作用についての定量的な議論が可能となる。

$$\Delta E_{\text{bind}} = 0.751 \Sigma \text{IFIE} - 2.79 \quad (3.5)$$

$$n = 8, r = 0.977, s = 0.730, F = 124$$

ここで、上式ならびにこれ以降の相関式において、 n は化合物数、 r は相関係数、 s は標準偏差、 F は分散比をそれぞれ表す。

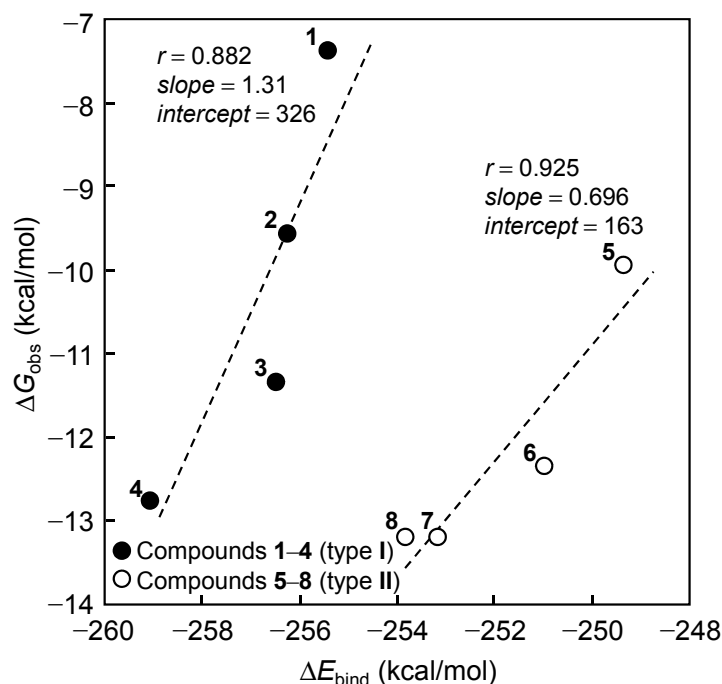


図 3.14 ΔG_{obs} と ΔE_{bind} のプロット (N1-NA-Set I 化合物)

Types I, II 化合物のそれぞれにおいて最大の阻害活性を示す compounds 4 ($R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{NH}_3^+$), 8 ($R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $R_2 = \text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$)と N1-NA との複合体構造について, FMO-IFIE (MP2/6-31G)に基づく結合相互作用エネルギー解析の結果を図 3.15 に示す. Types I, II 化合物の解離型の官能基 (fragment B: carboxyl (COO^-)基, fragment C: amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$)基)と N1-NA の解離性のアミノ酸残基 (pocket A: Glu277, pocket B: Arg152, Arg292, Arg371, pocket C: Asp151, Glu227)との間の強固な水素結合ないしは静電相互作用による安定化相互作用エネルギーが結合安定化の支配要因であり, これらは両阻害剤に共通した特徴である. 一方で, Arg156 (pocket C)との間には共通して大きな不安定化相互作用エネルギーが確認される. このことは Arg156 との安定化相互作用を得るための阻害剤修飾の試み [217-219]が実際に行われていることに対応している. また, W1 (pocket B)ならびに Glu119, Trp178, W2 (pocket C)との間には, 両阻害剤において相互作用の違いが確認される. これらは, 両阻害剤の fragment C 部位 (amino, guanidino 基)とその近傍のアミノ酸残基との相互作用の違いを反映しており, 図 3.14 で示した type 間を区別するエネルギー差として寄与するものと考えられる. しかしながら, LERE-QSAR の基本式 (3.1)における左辺の ΔG_{obs} に対して, 上記で示した阻害剤の fragments B, C 部位と N1-NA の pockets B, C のアミノ酸残基との間の強固な水素結合ないしは静電相互作用に基づくエネルギーの寄与は大きい, その変動に与える影響は必ずしも明白ではない. 次節において, Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を支配する相互作用様式を LERE-QSAR 解析に基づき明らかにする.

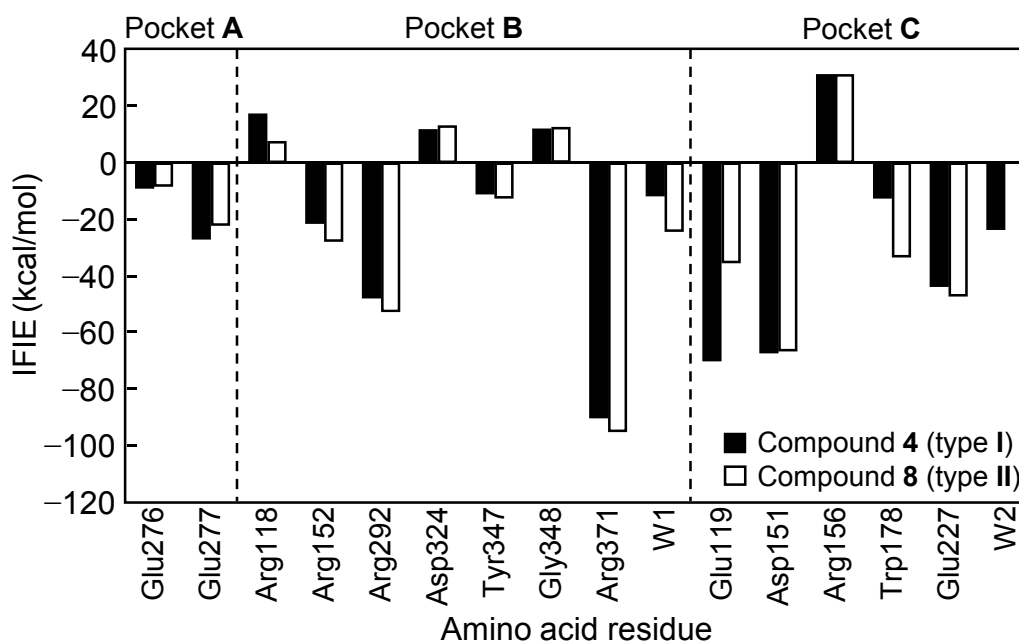


図 3.15 Set I 化合物 (compounds 4, 8) と N1-NA のアミノ酸残基との間の IFIE FMO/MP2/6-31G, $|IFIE| > 8.0$ kcal/mol のみを示す。

3.3.1.3 N1-NA-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析

Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために、基本式 (3.1) に基づく LERE-QSAR 解析を行った。本解析のような双性イオンである Set I 化合物と活性部位に解離性のアミノ酸残基を多く有する N1-NA との複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) の評価については、古典/量子化学の hybrid 評価法が有用となる可能性を 2.3.4.4 節の解析結果から明らかにした。そこで本節における LERE-QSAR 解析では、異なる評価法に基づく $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の評価が LERE-QSAR の解析結果へ与える影響の検証も行った。

表 3.7 に示すように、 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の評価法がそれぞれ異なるものの、Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を、物理化学的な意味づけとともに説明可能な統計的に有意である LERE-QSAR 相関式 (3.6)–(3.13) ((3.6): PB, (3.7): GB-HCT, (3.8): GB-OBC I, (3.9): GB-OBC II, (3.10): CPCM-Bondi/PB, (3.11): CPCM-Bondi/GB-HCT, (3.12): CPCM-Bondi/GB-OBC I, (3.13): CPCM-Bondi/GB-OBC II) を得ることができた。

表3.7 LERE-QSAR 相関式 (N1-NA-Set I 化合物)

$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}(X)}) + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}} + \text{const}_3 (n = 8)$								
eq. no.	X	r^a	s^b	F^c	γ_1	β^d	γ_2	const_3
(3.6)	PB	0.847	1.31	6.35	0.545	0.690	0.534	26.7
(3.7)	GB-HCT	0.935	0.880	17.3	0.457	0.417	0.341	29.0
(3.8)	GB-OBC I	0.938	0.861	18.2	0.500	0.551	0.428	28.9
(3.9)	GB-OBC II	0.885	1.15	8.99	0.154	-0.521	0.337	-6.14
(3.10)	CPCM-Bondi/ PB ^e	0.988	0.389	98.5	0.561	0.739	0.0708	25.4
(3.11)	CPCM-Bondi/ GB-HCT ^e	0.988	0.377	105.2	0.486	0.508	0.0798	21.4
(3.12)	CPCM-Bondi/ GB-OBC I ^e	0.988	0.384	101.5	0.476	0.477	0.0838	21.0
(3.13)	CPCM-Bondi/ GB-OBC II ^e	0.910	1.02	12.1	0.162	-0.498	0.229	-13.5

^a Correlation coefficient.

^b Standard deviation (in kcal/mol).

^c Ratio of regression and residual variances.

^d $\alpha = 0.678$ (Taken from ref. 49).

^e Hybrid approach.

$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の算出に hybrid 評価法を用いた相関式 (3.10)–(3.13)のほうが, PB/GB 法を用いた相関式 (3.6)–(3.9)に比べて, 実測との間のより良好な相関関係を確認できる. また, これら相関式は entropy–enthalpy 補償則に基づいており, 等温滴定熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC)の実験結果 [49]から α を 0.678 とした場合, 相関式 (3.6)–(3.13)の右辺の第一項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)の係数 ($\gamma_1 = (1 + \beta)(1 - \alpha)$)における β の値はいずれも正の値を示し, 切片 (const_3)も大きな正の値を示す (式 (3.9)および(3.13)は除く). このことは, 式 (2.2)導出において仮定したとおり ($\beta < 0$ and/or $\text{const}_1 > 0$), 化合物によらずほぼ一定の penalty energy が存在することを示している.

図 3.16 は, $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ と結合相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$)との間の関係を示す. 2.4 節における理論的考察から期待されるように, hybrid 評価法に基づく $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ と $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ との間には良好な逆相関関係 ($r = -0.950$ (CPCM-Bondi/PB), -0.971 (CPCM-Bondi/GB-HCT), -0.973 (CPCM-Bondi/GB-OBC I))を確認できる (図 3.16 (a)). ただし, CPCM-Bondi/GB-OBC IIはこの限りではない. 一方で, PB/GB 法に基づく $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ と $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ との間においては, 良好な逆相関関係は確認できない (図 3.16 (b)). このことは, hybrid 評価法では双性イオンである Set I 化合物ならびに活性部位近傍のアミノ酸残基 (図 3.8)を量子化学的に評価した結果を反映し, PB/GB 法は 2.3.4.4 節で示したようにこれら

イオン性分子に対する評価が十分ではないと考えられる。以上の結果は、本解析のような解離型の官能基を有するリガンドと解離性のアミノ酸残基に富む活性部位を有するタンパク質の複合体形成に伴う $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ を評価する場合、両分子ならびにそれらを取り巻く反応場との間の静電相互作用を厳密に評価する必要性を示唆している。このとき、古典/量子化学の hybrid 評価法は有用かつ妥当であり、CPCM-Bondi/GB-OBC II を除く hybrid 評価法を用いて $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ を評価した場合、相関式 (3.10)–(3.12) はいずれもほぼ同等な統計的有意性を示す。したがって、以下の代表自由エネルギー項の寄与についての議論では、相関式 (3.10) の構築に用いた代表自由エネルギー項に基づき議論する。

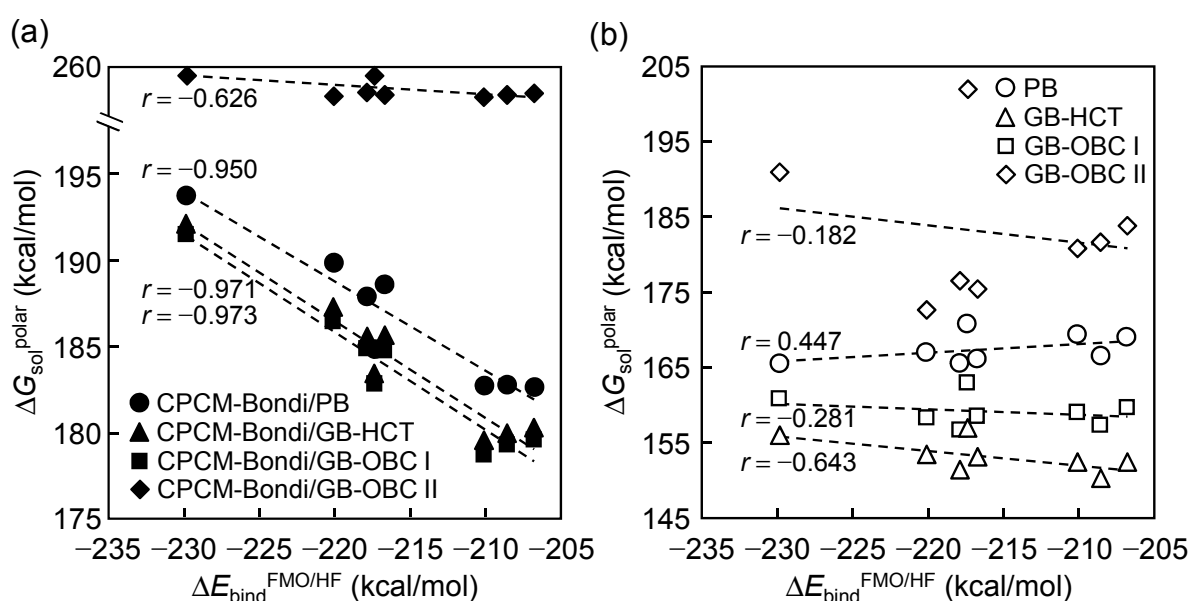


図 3.16 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ のプロット (N1-NA-Set I 化合物)

(a) Hybrid 評価法 (CPCM-Bondi/PB, CPCM-Bondi/GB-HCT, CPCM-Bondi/GB-OBC I, CPCM-Bondi/GB-OBC II), (b) PB/GB 法 (PB, GB-HCT, GB-OBC I, GB-OBC II).

表 3.8 は、LERE-QSAR 解析で用いた代表自由エネルギー項、実測値 ΔG_{obs} 、LERE-QSAR 相関式 (3.10)より得られる予測値 ΔG_{calc} 、FMO (HF/6-31G)法に基づく結合相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ 、hybrid 評価法 (CPCM-Bondi/PB)に基づく水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ (CPCM-Bondi/PB)、SCRF-CPCM (HF/6-31+G(d,p))法に基づく解離自由エネルギー変化 ΔG_{diss} および分散相互作用エネルギー E_{disp} に対応する電子相関エネルギー E_{corr} の値を示す。図 3.17 は、 ΔG_{obs} の変動に対する各エネルギー項の寄与を示す。 ΔG_{diss} は二つの化合物系列 (types I, II 化合物)を区別するエネルギー差として寄与しており、相関式 (3.10) におけるそれは古典 QSAR 式においてしばしば用いられる尺度変数 (indicator variable) の役割を果たしていると考えられるが、その寄与は小さい。一方で、結合相互作用エネルギー

の大部分を担う $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$ の各々の寄与は大きい ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}] = 48.7$, $\text{var.}[\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}] = 14.9 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$). しかしながら, 前述したように両者の間には良好な逆相関関係が成立し ($r = -0.950$, 式 (3.14)), 結果として静電相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$) の寄与は比較的小さくなることを確認できる ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}] = 12.4$). すなわち, 3.3.1.2 節において確認した Set I 化合物の解離性官能基である fragments **B**, **C** 部位と N1-NA の pockets **B**, **C** のアミノ酸残基との間の強固な水素結合ないしは静電相互作用に対応する $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ は, 両分子の複合体形成の主要因となると考えられるが, $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$ との間には良好な逆相関関係が成立する結果として ΔG_{obs} の変動に対する寄与は比較的小さくなると考えられる.

$$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}} = -0.527 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + 73.2 \quad (3.14)$$

$n = 8, r = 0.950, s = 1.39, F = 56.1$

一方で, E_{corr} の寄与は大きく ($\text{var.}[E_{\text{corr}}] = 43.1$), さらに E_{corr} と ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$) との間においても良好な逆相関関係 ($r = -0.989$, 式 (3.15)) が成立している.

$$E_{\text{corr}} = -1.85 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}) - 92.1 \quad (3.15)$$

$n = 8, r = 0.989, s = 1.10, F = 280$

ここで, E_{corr} の寄与は ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$) の寄与と比べて相対的に大きいことから, E_{corr} が ΔG_{obs} の変動に対して支配的に働くと考えられる ($r = 0.967$, 式 (3.16)). したがって, Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動に対して, 両分子間における分散相互作用などの局所的な相互作用が支配的な役割を果たしている.

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.288 E_{\text{corr}} - 0.142 \quad (3.16)$$

$n = 8, r = 0.967, s = 0.572, F = 87.6$

本節では, LERE-QSAR 解析に基づき一連の Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式, すなわち分散相互作用が支配的な役割を果たしていることを定量的に明らかにした. 次節では, この支配項に対する阻害剤の各部分構造の寄与について原子・電子レベルにおいて定量的に議論する.

表3.8 複合体形成に伴う ΔG_{obs} および代表自由エネルギー項^a (N1-NA-Set I 化合物)

Set I compound									electrostatic energy ^d
no.	type	ΔG_{obs}^b	ΔG_{calc}^c	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$	ΔG_{diss}	E_{corr}		
1	I	-7.38	-7.32	-229.83	194.10	24.06	-25.61	-35.73	
2	I	-9.57	-10.07	-220.12	190.10	23.34	-36.12	-30.02	
3	I	-11.35	-11.32	-217.87	188.12	23.27	-38.63	-29.75	
4	I	-12.77	-12.35	-216.72	188.85	23.29	-42.33	-27.87	
5	II	-9.93	-9.87	-217.34	185.05	11.76	-32.03	-32.29	
6	II	-12.34	-11.99	-210.10	182.87	11.73	-40.87	-27.23	
7	II	-13.19	-13.16	-208.53	182.94	11.88	-44.62	-25.59	
8	II	-13.19	-13.64	-206.78	182.80	11.74	-47.07	-23.99	
variance ^e				48.68	14.94	34.34	43.10	12.36	

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln IC_{50}$ ($T = 310$ K).

^c Calculated from eq. (3.10).

^d $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}$.

^e In kcal²/mol².

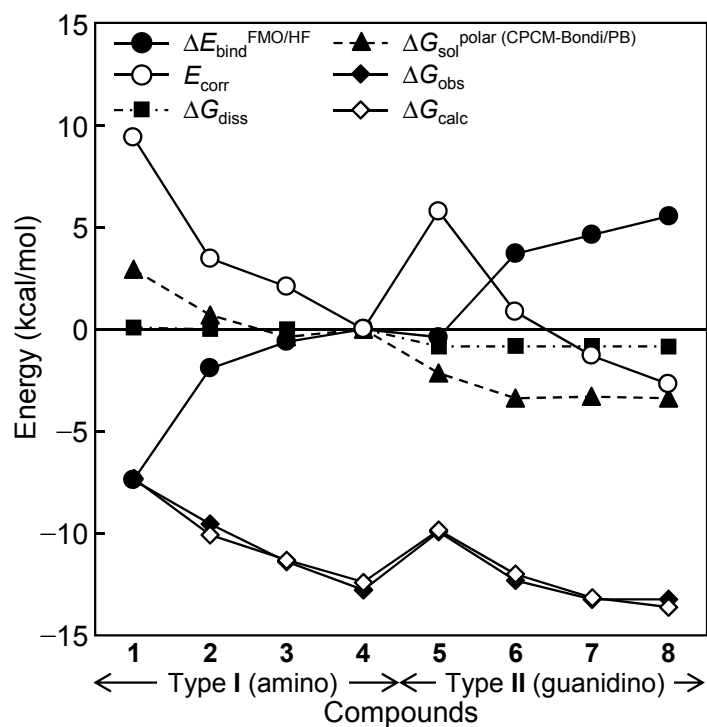


図 3.17 Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う各エネルギー項の変動
各代表自由エネルギー項は compound 4 を基準として表す。

3.3.1.4 阻害剤の各部分構造の全自由エネルギー変化に対する寄与

本節では、FMO 法における通常のタンパク質側のフラグメント分割に加えて、阻害剤である Set I 化合物を 3 つのフラグメント (fragments **A**, **B**, **C**) に分割し (2.3.2.1.2 節, 図 2.5), 前節の LERE-QSAR 解析から明らかにした支配項である分散相互作用エネルギー (E_{corr}) に対する各フラグメントの寄与およびそれらの全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) に対する寄与を定量的に明らかにする. 表 3.9 は, E_{corr} , Set I 化合物と N1-NA の各アミノ酸残基との間の分散相互作用エネルギー ($\text{IFIE}_{\text{corr}}$) の総和 ($\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}$), 各フラグメントと N1-NA の各アミノ酸残基との間の分散相互作用エネルギーの総和 ($\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment X}}$, $\text{X} = \text{A}, \text{B}, \text{C}$) およびその和 ($\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}} = \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment B}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment C}}$) を示す.

表3.9 Set I 化合物と N1-NA との間の分散相互作用エネルギー^a

Set I compound		E_{corr}	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^b$	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment X } c}$			$\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^d$
no.	type		non-divided	A	B	C	A + B + C
1	I	-25.61	-42.36	0.31	-34.78	-7.50	-41.97
2	I	-36.12	-52.49	-7.60	-36.79	-7.18	-51.57
3	I	-38.63	-54.59	-9.37	-37.00	-7.29	-53.66
4	I	-42.33	-58.08	-12.96	-36.75	-7.16	-56.87
5	II	-32.03	-47.86	0.33	-32.90	-14.51	-47.08
6	II	-40.87	-56.71	-7.93	-33.51	-13.65	-55.08
7	II	-44.62	-60.14	-10.52	-33.96	-13.92	-58.40
8	II	-47.07	-62.27	-13.21	-33.63	-13.65	-60.48
r^{2e}		0.936	0.926	0.728	0.0137	0.190	0.921
variance ^f		43.10	38.15	24.67	2.49	11.12	32.94
contribution ^g				64.7	6.5	29.2	

^a In kcal/mol.

^b Summation of $\text{IFIE}_{\text{corr}}$ for a non-divided ligand over all the amino acid residues in N1-NA.

^c Summation of $\text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment X}}$ for $\text{X} = \text{A}, \text{B}$, and C over all the amino acid residues in N1-NA.

^d $\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}} = \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment B}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment C}}$.

^e Coefficient of determination for ΔG_{obs} .

^f In kcal²/mol².

^g $\text{Var.}[\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment X}}] / \text{var.}[\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}]$ for $\text{X} = \text{A}, \text{B}$, and C (in %).

下式 (3.17) および (3.18) に示すように, E_{corr} は $\Sigma \text{IFIE}_{\text{corr}}$ と良好に線形かつ *slope* も 1 に近く ($r = 0.999$, *slope* = 1.06, 式 (3.17)), Set I 化合物を 3 つのフラグメントに分割した場合において

も, E_{corr} と $\Sigma\Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}}$ との間に良好な線形関係 ($r = 0.999$, $\text{slope} = 1.14$, 式 (3.18)) が存在することから, 各フラグメントの寄与についての定量的な議論が可能となる。

$$E_{\text{corr}} = 1.06 \Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}} + 19.3 \quad (3.17)$$

$$n = 8, r = 0.999, s = 0.265, F = 4905$$

$$E_{\text{corr}} = 1.14 \Sigma\Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}} + 22.3 \quad (3.18)$$

$$n = 8, r = 0.999, s = 0.403, F = 2117$$

図 3.18 は, ΔG_{obs} と E_{corr} ($\approx \Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}} \approx \Sigma\Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}}$) との間の相関 (決定係数) および E_{corr} の変動に対する寄与 (割合) を各フラグメントについて示しているが, 相関および変動がともに最大であるのは fragment **A** であることを確認できる。分散相互作用エネルギーは近距離力に基づくため, fragment **A** とその近傍の pocket **A** のアミノ酸残基との間の分散相互作用などの局所的な相互作用が, 一連の Set **I** 化合物と N1-NA との複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動に対して最も支配的な役割を果たしていることが示唆される。

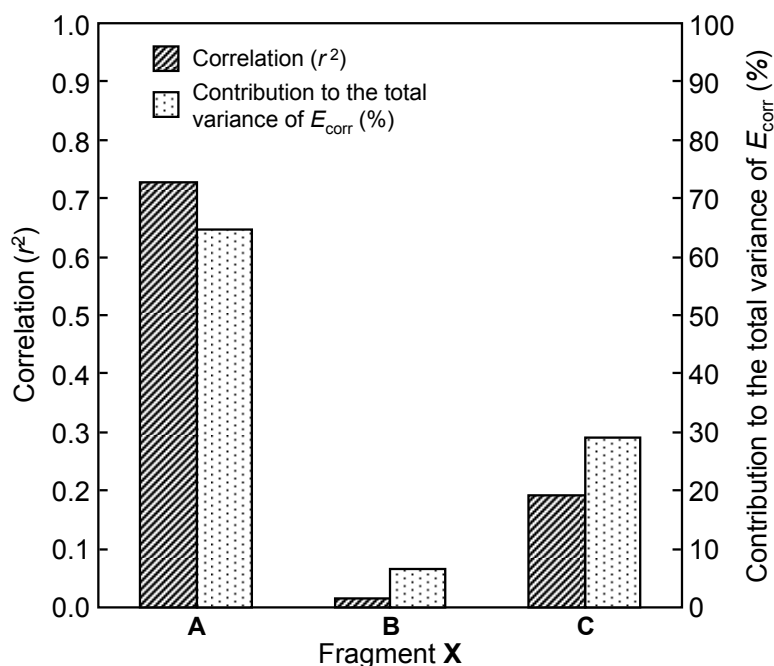


図 3.18 阻害剤と N1-NA の相互作用における各部分構造の寄与
X は阻害剤を 3 つのフラグメントに分割した場合の部分構造 **A**, **B** および **C** に対応する。

Compound 4 (oseltamivir)の fragment A ($R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)部位がその近傍に位置するアミノ酸残基 (pocket A: Ile222, Arg224, Ser246, Glu276, Glu277, Asn294, pocket B: Arg292)と相互作用している様子および両分子間の $\text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}}$ を, 図 3.19 (a)および図 3.19 (b)にそれぞれ示す. Fragment A を取り囲むこれら 7 つのアミノ酸残基との間の $\text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}}$ の和は, fragment A が果たす全分散相互作用エネルギー ($\Sigma\text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}}$) の 90%以上を占めており, この局所的な相互作用に基づくエネルギー変化が複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動の大半を担うと考えられる. 特に, compound 4 の fragment A と Arg224 との間の分散相互作用エネルギーの安定化の程度およびその化合物間の変動は, fragment A が担う相互作用のなかで最大である. このことは, Arg224 と Glu276 との間の強固なイオン結合 (塩橋)により形成される疎水的環境と compound 4 の fragment A との間の相互作用が結合に重要であるとする報告 [220, 221]を裏付けるものである. また, このような Arg-Glu motif は真核性プロテインキナーゼにおいても保存されており, 上記と同様にその塩橋が疎水的環境の形成とタンパク質の安定に寄与している [222]. この Arg224-Glu276 を含む 7 つのアミノ酸残基間の緻密な相互作用ネットワークにより, 図 3.19 で示す局所的な相互作用は生じているが, これらアミノ酸残基のほとんどは極性のアミノ酸残基である. このような極性のアミノ酸残基の極性基との間における分散相互作用は, Hansch ら [223]が papain による *N*-置換 glycine ester などの加水分解反応に対する QSAR 解析において見出している“非古典的疎水性相互作用”に対応するとも考えられる.

以上より, 一連の Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は, 両分子間において特に fragment A とその近傍の pocket A のアミノ酸残基との間の分散相互作用などの局所的な相互作用により支配されていると結論づけられる.

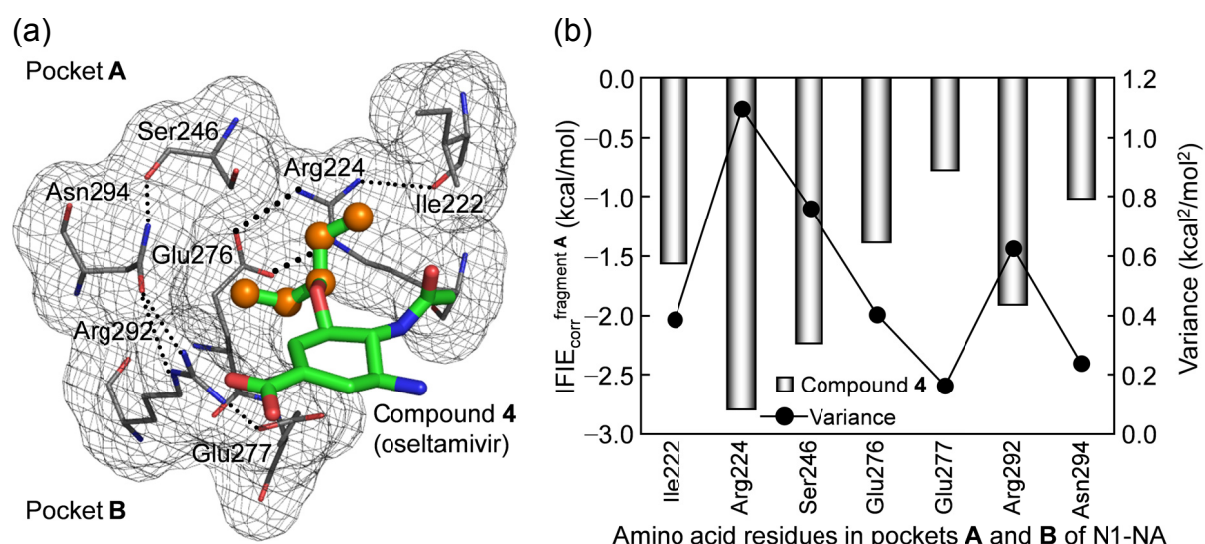


図 3.19 阻害活性値の変動を支配する相互作用様式 (N1-NA-compound 4)
 (a) Compound 4 (oseltamivir)の fragment A とその近傍のアミノ酸残基との間の相互作用, (b) Fragment A との間の $\text{IFIE}_{\text{corr}}^{\text{fragment A}}$ とその化合物間の変動.

3.3.2 Set II 化合物の解析

3.3.2.1 Set II 化合物の N1-NA に対する結合相互作用様式

表 3.10 は, N1-NA-Set II 化合物 (compounds 1-9)の複合体状態 (bound)および N1-NA の単独状態 (free)に対する SGLD シミュレーションにおけるタンパク質部分の平均 RMSD 値を示す. N1-NA の主鎖部分の原子に対しては位置拘束を設けているため, C α 原子を含む主鎖部分において大きな構造変化は確認されない. また, N1-NA の全体の構造変化は側鎖部分の構造変化に依存し, その程度は主鎖部分と比べて大きい, 化合物によらず RMSD 値はほぼ一定であることを確認できる. しかしながら, これら RMSD 値は N1-NA の単独状態のそれとほぼ同等であることから, 複合体形成に伴う N1-NA の構造変化の程度は比較的小さく, Set II 化合物によらずほぼ同程度の構造変化が生じていると考えられる. 表 3.11 は, N1-NA-Set II 化合物の複合体状態および Set II 化合物の単独状態に対する SGLD シミュレーションにおける各化合物の fragment ごとの平均 RMSD 値を示す. Set II 化合物の複合体状態および単独状態のいずれにおいても, その構造変化の大部分は fragment A 部位に起因することを確認できる.

表3.10 N1-NA (複合体状態および単独状態)の SGLD シミュレーションにおける構造変化

Set II compound		RMSD (N1-NA) ^a			
no.	type	All ^b	Side chain ^b	Backbone ^b	C α ^b
1	I	1.65 (0.07)	1.65 (0.07)	0.80 (0.01)	0.77 (0.01)
2	I	1.67 (0.08)	1.67 (0.08)	0.79 (0.01)	0.77 (0.01)
3	I	1.68 (0.10)	1.68 (0.10)	0.78 (0.01)	0.75 (0.01)
4	I	1.66 (0.07)	1.66 (0.07)	0.79 (0.01)	0.77 (0.01)
5	I	1.63 (0.06)	1.63 (0.06)	0.79 (0.01)	0.77 (0.01)
6	I	1.62 (0.07)	1.62 (0.07)	0.79 (0.01)	0.77 (0.01)
7	I	1.67 (0.06)	1.67 (0.06)	0.79 (0.01)	0.76 (0.01)
8	I	1.66 (0.07)	1.66 (0.07)	0.80 (0.01)	0.78 (0.01)
9	I	1.65 (0.07)	1.65 (0.07)	0.79 (0.01)	0.76 (0.01)
variance ^c		3.51×10^{-4}	3.51×10^{-4}	3.69×10^{-5}	3.61×10^{-5}
ligand-free N1-NA		1.65 (0.06)	1.65 (0.06)	0.80 (0.01)	0.78 (0.01)

^a In Å.

^b Average value and standard deviation (in parentheses).

^c In Å².

表3.11 Set II 化合物 ((a) 複合体状態および(b) 単独状態)の SGLD シミュレーションにおける構造変化

(a) Set II compound (bound)		RMSD (ligand) ^a			
no.	type	All ^b	fragment A ^b	fragment B ^b	fragment C ^b
1	I	0.71 (0.14)	–	0.59 (0.14)	0.04 (0.01)
2	I	0.87 (0.15)	0.07 (0.02)	0.58 (0.14)	0.04 (0.01)
3	I	1.52 (0.20)	0.90 (0.36)	0.59 (0.14)	0.04 (0.01)
4	I	1.22 (0.31)	1.06 (0.38)	0.62 (0.15)	0.04 (0.01)
5	I	1.39 (0.33)	1.35 (0.32)	0.62 (0.15)	0.04 (0.01)
6	I	1.51 (0.43)	1.38 (0.35)	0.61 (0.15)	0.04 (0.01)
7	I	1.93 (0.18)	0.96 (0.32)	0.59 (0.14)	0.04 (0.01)
8	I	1.58 (0.24)	1.31 (0.31)	0.59 (0.14)	0.04 (0.01)
9	I	1.54 (0.45)	1.39 (0.38)	0.59 (0.14)	0.04 (0.01)
variance ^c		0.13	0.17	2.24×10^{-4}	3.08×10^{-9}

(b) Set II compound (free)		RMSD (ligand) ^a			
no.	type	All ^b	fragment A ^b	fragment B ^b	fragment C ^b
1	I	1.12 (0.60)	–	0.88 (0.46)	0.04 (0.01)
2	I	1.52 (0.67)	0.07 (0.02)	1.02 (0.50)	0.04 (0.01)
3	I	1.73 (0.45)	1.00 (0.34)	0.81 (0.42)	0.04 (0.01)
4	I	1.53 (0.48)	1.07 (0.35)	0.77 (0.39)	0.04 (0.01)
5	I	1.85 (0.60)	1.42 (0.27)	0.92 (0.47)	0.04 (0.01)
6	I	1.85 (0.52)	1.50 (0.27)	0.78 (0.40)	0.04 (0.01)
7	I	2.05 (0.42)	1.05 (0.31)	0.86 (0.45)	0.04 (0.01)
8	I	1.98 (0.44)	1.39 (0.26)	0.96 (0.49)	0.04 (0.01)
9	I	1.95 (0.44)	1.48 (0.30)	0.78 (0.40)	0.04 (0.01)
variance ^c		0.08	0.19	7.01×10^{-3}	1.35×10^{-9}

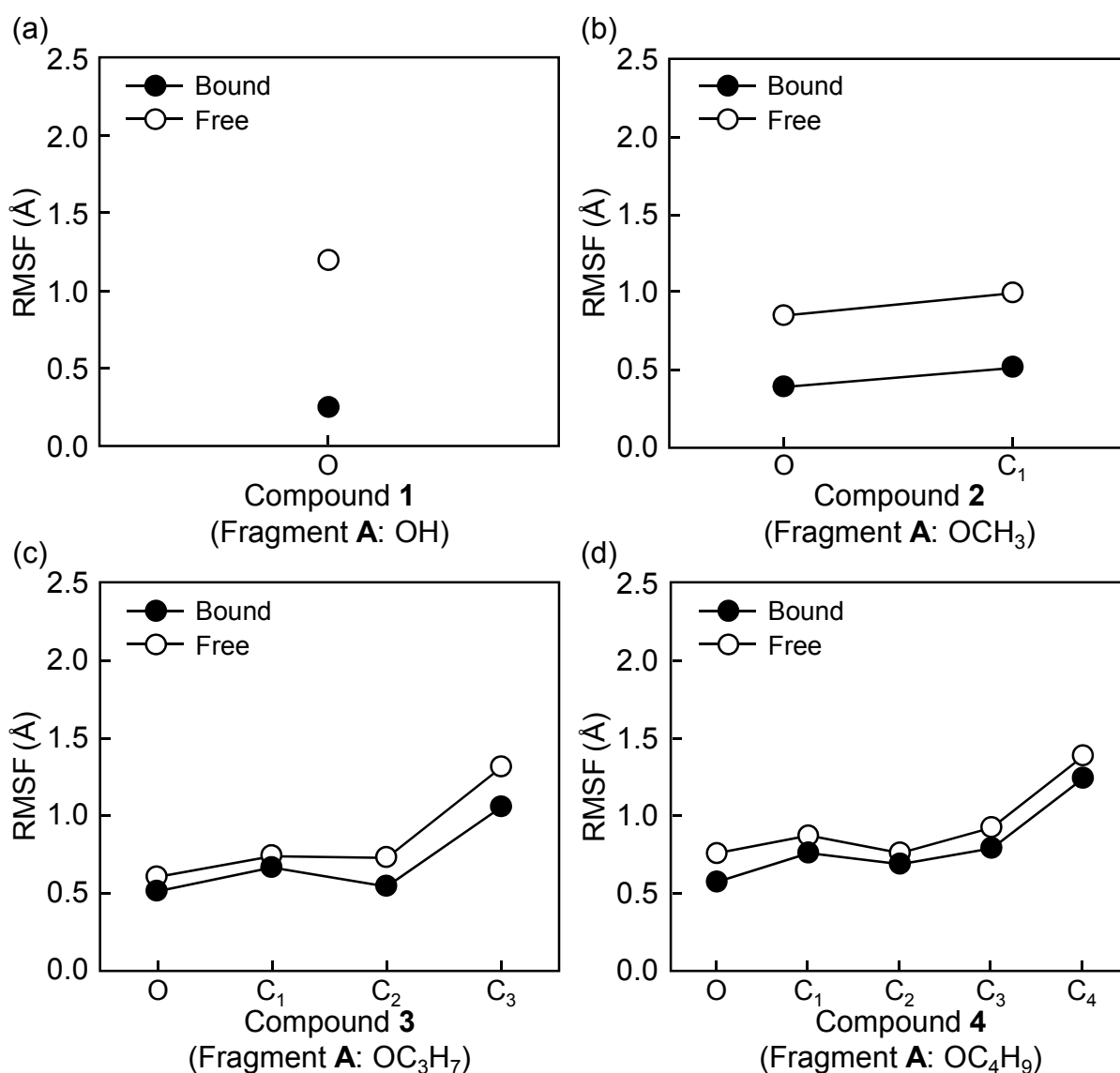
^a In Å.

^b Average value and standard deviation (in parentheses).

^c In Å².

図 3.20 は複合体状態および単独状態における Set II 化合物の fragment A 部位の RMSF 値を示す。Fragment A 部位の alkyl 基の伸長に伴い柔軟性は増大するものの、いずれの化合物も N1-NA との複合体形成に伴い、その程度は異なるものの柔軟性が凍結することを確認できる。特に、compounds 5, 6 のような fragment A 部位に長鎖の直鎖 alkoxy 基 (R₁ = OC₅H₁₁, OC₆H₁₃) を有する化合物の場合、複合体形成の前後における柔軟性の凍結の程度は大きい (図 3.20 (e), (f))。一方で、compound 9 (oseltamivir) が有する分岐鎖 alkoxy 基

($R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)の揺らぎは、複合体形成の前後においてほとんど変化が無いことを確認できる (図 3.20 (i)). 上記で確認した Set II 化合物と N1-NA の複合体形成の前後における fragment A 部位の揺らぎの変化は, configurational entropy (S_{config})の変化を生じ, これが複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動に対して与える影響は大きいと考えられる. この揺らぎに基づく S_{config} の変化を定量的に評価することが, 直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の結合相互作用様式の違いを明確にするうえで重要である.



(Continued)

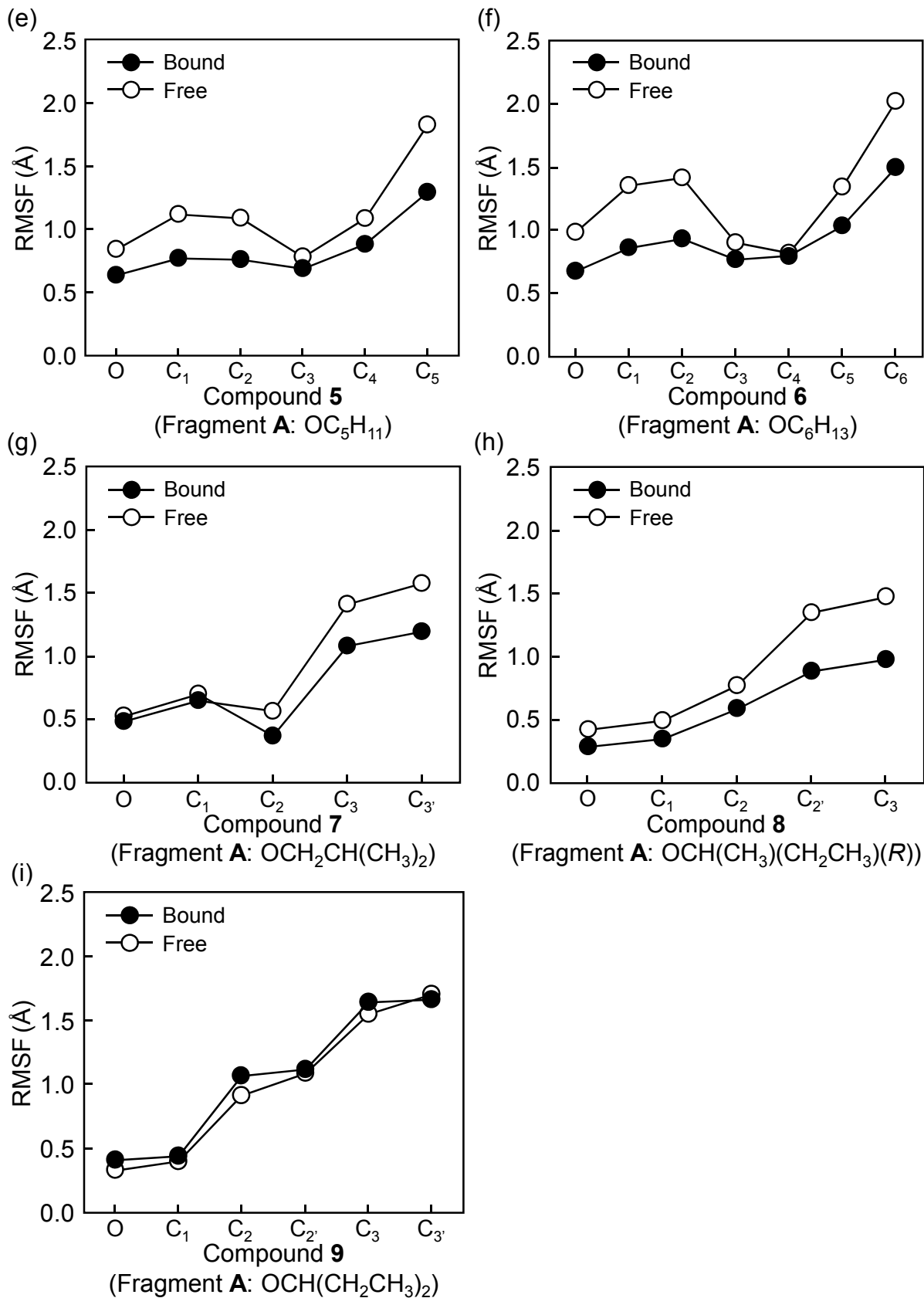


図 3.20 複合体形成の前後における Set II 化合物の fragment A の揺らぎ
 (a)–(i) Compounds 1–9. 炭素番号の表記は表 3.1 (b)に準ずる.

3.3.2.2 複合体形成に伴う自由エネルギー変化

3.2.3.2 節にて示したように, Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動は, enthalpic 変化 ($\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}}$)のみならず entropic 変化 ($-T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}}$), すなわち両変化項の和である自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}}$)によって支配されると考えられる. 3.3.1.3 節ならびにこれまでの解析結果 [109]から, Set II 化合物のような fragment A 部位のみが異なる化合物の場合, $\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ として特に fragment A が担う分散相互作用エネルギー (E_{disp})および $-T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ としてその揺らぎに基づく configurational entropy (S_{config})の変化に起因する entropic 変化 ($-T\Delta S_{\text{config}}$)が ΔG_{obs} の変動を実効的に支配すると考えられる. 複合体形成に伴う E_{disp} および $-T\Delta S_{\text{config}}$ については, それぞれ LJ6 パラメータに基づく引力エネルギー E_{LJ6} ($= \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}} + \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$)および Schlitter 近似に基づく $-T\Delta S_{\text{schl}}$ ($= -T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$)により評価した. E_{LJ6} , $-T\Delta S_{\text{schl}}$ および両変化項の和 $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ ($= E_{\text{LJ6}} - T\Delta S_{\text{schl}} = \Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}} + \Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}} + \Delta G_{\text{bind}}^{\text{P/L}}$)について, 20 ns の SGLD シミュレーションにおける全化合物の累積平均値を, 図 3.21 (a), 図 3.21 (b)および図 3.21 (c)にそれぞれ示す. 複合体形成における適応に伴う Set II 化合物の適応 enthalpic (entropic)変化 $\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}}$ ($-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$)ならびに結合に伴う N1-NA と Set II 化合物との間の結合 enthalpic (entropic)変化 $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ ($-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$)の各々の変動 (標準偏差)は小さく, その収束も良好である. 一方で, 適応に伴う N1-NA の適応 enthalpic (entropic)変化 $\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}}$ ($-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}}$)の変動は大きく, 特に $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}}$ についてはその収束も良好ではないことを確認できる (図 3.21 (a), (b)). 結果として, Set II 化合物の適応自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{L}}$ ($= \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$)および N1-NA と Set II 化合物との間の結合自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{bind}}^{\text{P/L}}$ ($= E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$)のそれぞれは良好に収束している一方で, N1-NA の適応自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ ($= \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}}$)の収束は良好ではなく, またその変動は Set II 化合物のそれと比べて顕著に大きいため, $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ に対する定量的な議論は困難と思われる (図 3.21 (c)). 一方で, 本解析で用いる Set II 化合物は一連の低分子化合物 (cogeneric series)であるため, これらとの複合体形成に伴う N1-NA の変化項 ($\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{P}}$ および $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{P}}$)は互いに相殺し, さらに長時間のシミュレーションにおいては両変化項の和である $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ の変動は小さくなると考えられる. また, Ikeguchi ら [224]の線形応答理論によれば, リガンドとタンパク質の複合体形成に伴うタンパク質の揺らぎはリガンドに非依存的であり, そのタンパク質固有の熱揺らぎにのみ依存することから, 一連の Set II 化合物の適応に伴う N1-NA の適応自由エネルギー変化 $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ は, その収束域においては化合物によらずほぼ一定となると推察できるため, 次節の LERE-QSAR 解析では $\Delta G_{\text{adapt}}^{\text{P}}$ を考慮しないこととした.

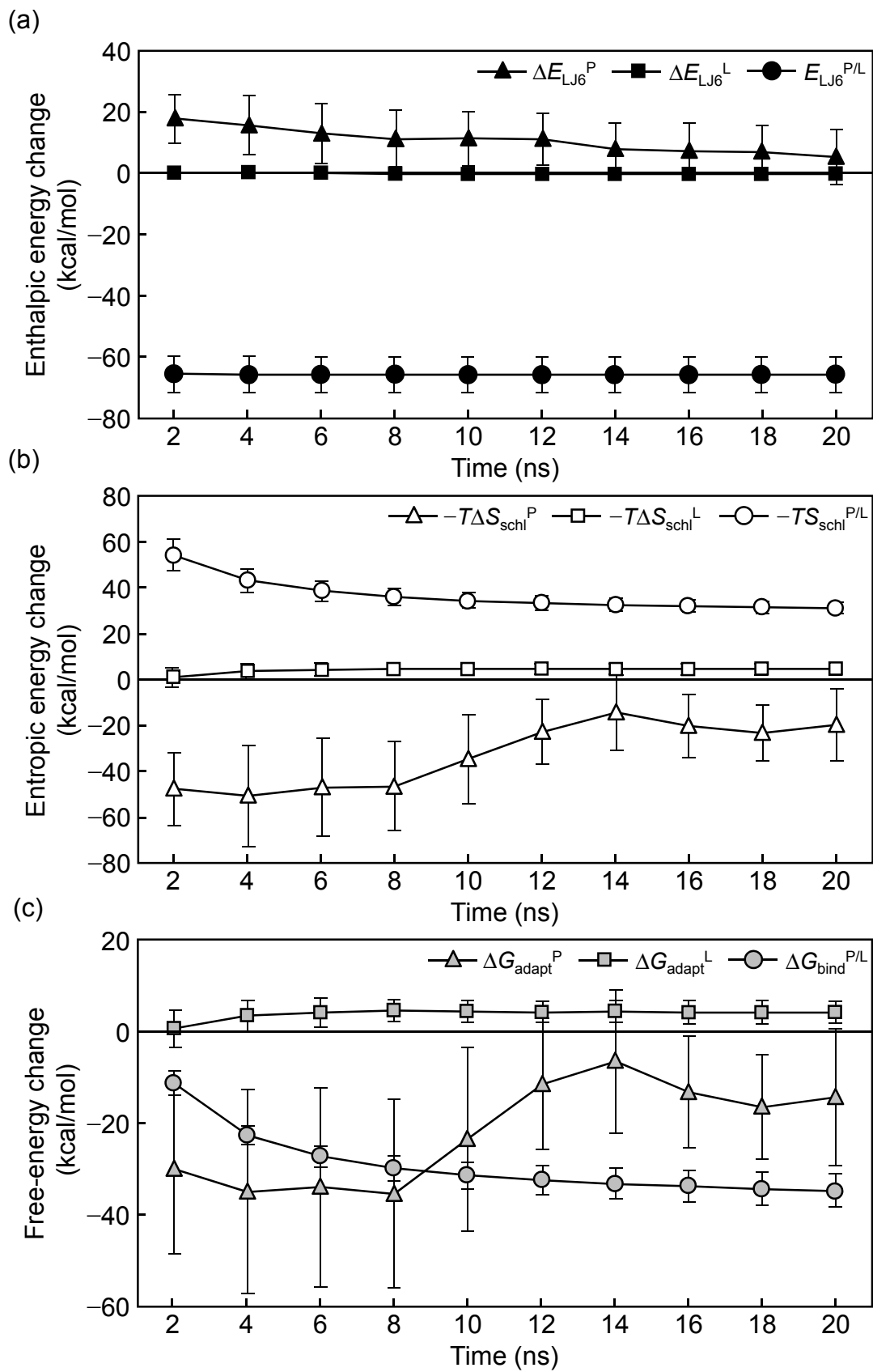


図 3.21 SGLD シミュレーションにおけるエネルギーの経時変化

(a) Enthalpic energy change, (b) Entropic energy change, (c) Free-energy change.

3.3.2.3 N1-NA-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析

Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために、基本式 (3.4) に基づき entropic 変化を陽に考慮した拡張 LERE-QSAR 解析を行った. Enthalpic 変化 $\Delta H_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ ($\approx E_{\text{LJ6}}$ ($\approx \Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$)) および entropic 変化 $-T\Delta S_{\text{bind}}^{\text{sol}}$ ($\approx -T\Delta S_{\text{schl}}$ ($\approx -T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$)) の両変化項 (SGLD シミュレーション (20 ns) のダイナミクストラジェクトリの構造に基づき算出される統計平均値) に基づき, Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を, 物理化学的な意味づけとともに説明可能な統計的に有意である LERE-QSAR 相関式 (3.19) を得ることができた.

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.411 (\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}) + 3.69 \quad (3.19)$$

$n = 9, r = 0.961, s = 0.490 \text{ kcal/mol}, F = 83.6$

表 3.12 は, LERE-QSAR 解析で用いた代表自由エネルギー項, 実測値 ΔG_{obs} , LERE-QSAR 相関式 (3.19) より得られる予測値 ΔG_{calc} , 分散相互作用エネルギー E_{disp} に対応する LJ6 パラメータに基づく引力エネルギー E_{LJ6} , configurational entropic 変化 $-T\Delta S_{\text{config}}$ に対応する Schlitter 近似に基づく $-T\Delta S_{\text{schl}}$ の値を示す. 図 3.22 は, ΔG_{obs} の変動に対する各エネルギー項の寄与を示す. Set II 化合物の適応 enthalpic 変化 $\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}}$ の変動はきわめて小さいことからその寄与は無視できると考えられ ($\text{var.}[E_{\text{LJ6}}^{\text{L}}] = 0.1 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$), 実際にこのエネルギー項を除外した場合においても, LERE-QSAR 相関式が良好に成立することを確認している ($r = 0.967$). 各エネルギー項において結合 enthalpic 変化 $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ の変動は最大であるが ($\text{var.}[E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}] = 35.3$), ΔG_{obs} との間の相関はそれほど良好ではない ($r = 0.800$). 一方で, 下式 (3.20) および図 3.23 で示すように, $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ と結合 entropic 変化 $-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$ との間には entropy-enthalpy 補償則が良好に成立している.

$$-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}} = -0.367 E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}} + 6.39 \quad (3.20)$$

$n = 9, r = 0.957, s = 0.751, F = 76.1$

ここで, $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ および $-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$ の寄与は互いに相殺し, それぞれの寄与は減弱するが, $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ の寄与は $-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$ の寄与と比べて相対的に大きいことを確認できる ($\text{var.}[E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}] = 35.3 > \text{var.}[-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}] = 5.2$). 一方で, Set II 化合物の適応 entropic 変化 $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$ は compound 9 (oseltamivir) を除きいずれも正の値であることから, 複合体形成に伴い Set II 化合物の柔軟性は凍結すると考えられる. この凍結効果は, 3.3.2.1 節で確認した複合体形成の前後における化合物の fragment A 部位の動的挙動の変化を反映している. Fragment A 部位に直鎖 alkoxy 基 ($R_1 = \text{OH}, \text{OCH}_3, \text{OC}_3\text{H}_7, \text{OC}_4\text{H}_9, \text{OC}_5\text{H}_{11}, \text{OC}_6\text{H}_{13}$) を有する

compounds **1–6** の凍結効果は alkyl 基の伸長に伴い増大するが、分岐鎖 alkoxy 基 ($R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)(R)$, $\text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) を有する compounds **7–9** のうち、特に compound **9** の凍結効果はほとんどないことを確認できる。このことは、 $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$ は $\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}}$ とは独立した変動であることを示唆している。したがって、Set **II** 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動に対して、両分子間における分散相互作用などの結合 enthalpic 変化と適応に伴う Set **II** 化合物の適応 entropic 変化が支配的な役割を果たしていると考えられる。

表3.12 複合体形成に伴う ΔG_{obs} および代表自由エネルギー項^a (N1-NA–Set **II** 化合物)

Set II compound				enthalpic energy		entropic energy	
no.	type	ΔG_{obs}^b	ΔG_{calc}^c	$\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}}$	$E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$	$-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$	$-TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}$
1	I	-7.38	-7.02	0.28 (0.11 ^d)	-53.89 (-22.13 ^d)	1.08 (0.44 ^d)	26.44 (10.86 ^d)
2	I	-7.70	-7.97	0.34 (0.14 ^d)	-57.67 (-23.69 ^d)	1.39 (0.57 ^d)	27.53 (11.31 ^d)
3	I	-9.57	-9.99	0.00 (0.00 ^d)	-64.94 (-26.67 ^d)	2.08 (0.85 ^d)	29.55 (12.14 ^d)
4	I	-9.25	-9.98	-0.38 (-0.16 ^d)	-65.78 (-27.02 ^d)	2.03 (0.83 ^d)	30.85 (12.67 ^d)
5	I	-9.50	-9.64	-0.42 (-0.17 ^d)	-70.06 (-28.77 ^d)	5.83 (2.40 ^d)	32.19 (13.22 ^d)
6	I	-9.68	-9.55	-0.23 (-0.09 ^d)	-72.45 (-29.76 ^d)	6.89 (2.83 ^d)	33.55 (13.78 ^d)
7	I	-9.50	-9.35	-0.29 (-0.12 ^d)	-66.44 (-27.29 ^d)	3.53 (1.45 ^d)	31.43 (12.91 ^d)
8	I	-11.35	-10.50	0.25 (0.10 ^d)	-69.17 (-28.41 ^d)	4.09 (1.68 ^d)	30.27 (12.43 ^d)
9	I	-12.77	-12.70	-0.88 (-0.36 ^d)	-71.68 (-29.44 ^d)	-0.59 (-0.24 ^d)	33.23 (13.65 ^d)
variance ^e				0.14	35.27	5.06	5.20

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln \text{IC}_{50}$ ($T = 310 \text{ K}$).

^c Calculated from eq. (3.19).

^d The value of the representative energy terms multiplied by $(1 + \beta)$ ($= 0.411$ obtained from eq. (3.19)).

^e In kcal²/mol².

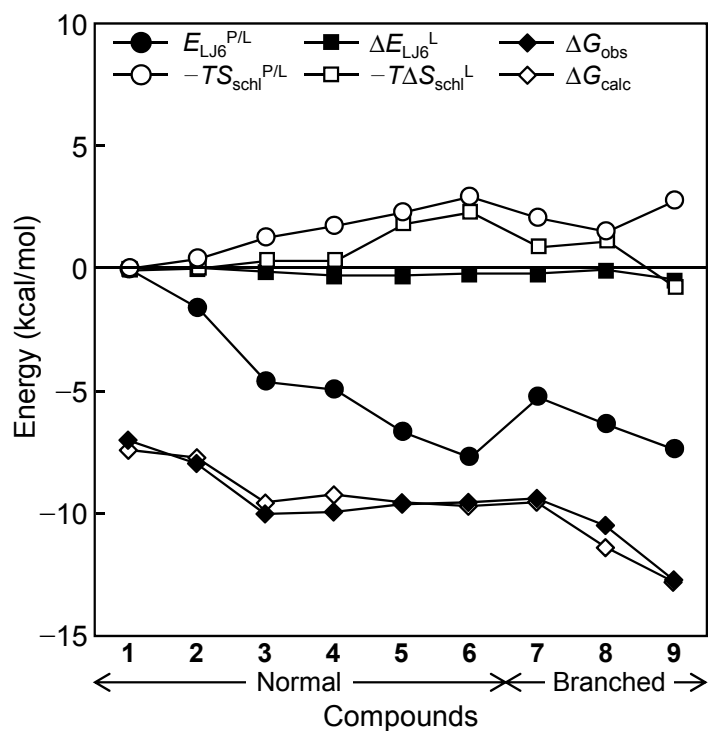


図 3.22 Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う各エネルギー項の変動
各代表自由エネルギー項は compound 1 を基準として表す。

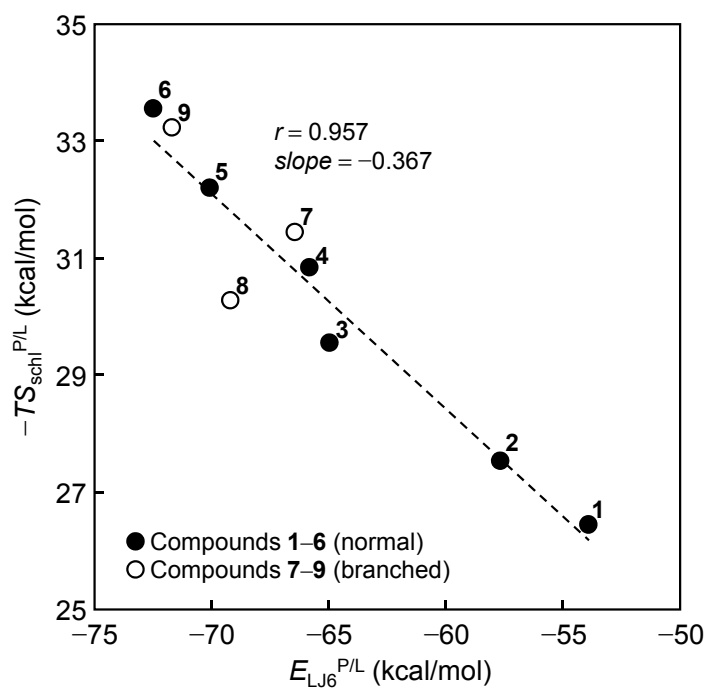


図 3.23 結合過程における entropy ($-TS_{schl}^{P/L}$)–enthalpy ($E_{LJ6}^{P/L}$)補償則

本節では, entropic 変化を陽に考慮した拡張 LERE-QSAR 解析に基づき一連の Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式, すなわち分散相互作用などの結合 enthalpic 変化と適応 entropic 変化の両変化項が支配的な役割を果たしていることを定量的に明らかにした. 次節では, Set II 化合物の fragment A 部位の直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の結合相互作用様式の違いを明確にすることで, 特異な分岐鎖 alkoxy 基を有する oseltamivir が一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示す要因について議論する.

3.3.2.4 直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の結合相互作用様式の違い

Fragment A 部位に直鎖 alkoxy 基を有する compounds 1-3 ($R_1 = \text{OH}, \text{OCH}_3, \text{OC}_3\text{H}_7$) においては, fragment A 部位の alkyl 基の伸長に伴い阻害活性値の増大を確認でき, 特に R_1 に propyl 基を導入した compound 3 の活性値は, methyl 基を導入した compound 2 の約 20 倍である (表 3.1 (b)). このことは, 3.3.1.3 節にて示した解析結果から, fragment A 部位に導入した propyl 基と近傍の pocket A のアミノ酸残基との間の分散相互作用の増大に起因すると考えられる. しかしながら, fragment A 部位にさらに alkyl 基を付加した長鎖の直鎖 alkoxy 基を有する compounds 4-6 ($R_1 = \text{OC}_4\text{H}_9, \text{OC}_5\text{H}_{11}, \text{OC}_6\text{H}_{13}$) の阻害活性値は, いずれも compound 3 のそれと同程度までしか増強していないことから, 伸長した alkyl 基部分が近傍のアミノ酸残基との間において効果的な分散相互作用に関与していない可能性が示唆される. 一方で, 分岐鎖 alkoxy 基を有する compounds 7-9 ($R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)(R), \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) のうち, 特に compound 9 (oseltamivir) の阻害活性値は compound 3 の約 180 倍であり, 一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示す. すなわち, ほぼ同程度の炭素原子数で構成される fragment A 部位の alkoxy 基において, それが直鎖あるいは分岐鎖であるかにより大きな活性差を生じている. 本節では, 前節の LERE-QSAR 解析において明らかにした支配項 (結合 enthalpic 変化 $E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}}$ および適応 entropic 変化 $-T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}}$) に基づき, 直鎖・分岐鎖 alkoxy 基を有する化合物間の活性差を担う要因について議論する.

Fragment A 部位に直鎖・分岐鎖 alkoxy 基を有する化合物において, 長鎖の直鎖 (normal) alkoxy 基を有する compound 6 と分岐鎖 (branched) alkoxy 基を有する compound 9 の活性差は, 自由エネルギー差として約 3.1 kcal/mol (ΔG_{obs} (compound 6) = -9.7, ΔG_{obs} (compound 9) = -12.8 kcal/mol) 生じている. Compounds 6, 9 の fragment A 部位がその近傍のアミノ酸残基と相互作用している様子を図 3.24 に示す. Compound 6 の直鎖 alkoxy 基 ($R_1 = \text{OC}_6\text{H}_{13}$ (O-C₁-C₂-C₃-C₄-C₅-C₆)) は, 主として N1-NA の pocket A のうちタンパク質表面へと広がる subpocket A2 のアミノ酸残基と相互作用しているのに対し (図 3.24 (a)), compound 9 の分岐鎖 alkoxy 基 ($R_1 = \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ (O-C₁-(C₂-C₃)(C₂'-C₃'))) は, この subpocket A2 と

の相互作用に加え、分岐鎖であるため活性部位の奥へと広がる subpocket **A1** のアミノ酸残基とも相互作用していることを確認できる (図 3.24 (b)). Compounds **6**, **9** の fragment **A** 部位とその近傍のアミノ酸残基との間の主要な結合 enthalpic 変化である分散相互作用エネルギー $E_{LJ6}^{P/L \text{ fragment A}}$ を図 3.25 に示す. Compound **6** の直鎖 alkoxy 基における母核構造付近の部分構造 (O-C₁-C₂-C₃)は、主に近傍の subpocket **A2** の Ile222, Arg224, Ser246 との間の分散相互作用に関与しているが、先端付近の部分構造 (C₄-C₅-C₆)は近傍の Asn221, Gly244, Pro245 との間において、効果的な分散相互作用に関与していないことを確認できる (図 3.24 (a), 図 3.25). 一方で、compound **9** の分岐鎖 alkoxy 基における部分構造 (O-C₁-C₂-C₃)は、近傍の subpocket **A1** の Glu276, Arg292, Asn294 との間の分散相互作用に関与し、また部分構造 (C₂'-C₃')は近傍の subpocket **A2** の Arg224, Ser246 との間の分散相互作用に関与していることを確認できる (図 3.24 (b), 図 3.25). このように、fragment **A** の相互作用部位は両阻害剤で異なるものの、 $E_{LJ6}^{P/L}$ においては顕著な差は確認されない ($E_{LJ6}^{P/L}$ (compound **6**) = -29.8, $E_{LJ6}^{P/L}$ (compound **9**) = -29.4 kcal/mol, 表 3.12). したがって、両阻害剤の約 3.1 kcal/mol の活性差は結合 enthalpic 変化において生じておらず、fragment **A** 部位の適応 entropic 変化項 $-T\Delta S_{schl}^L$ において生じていることが示唆される.

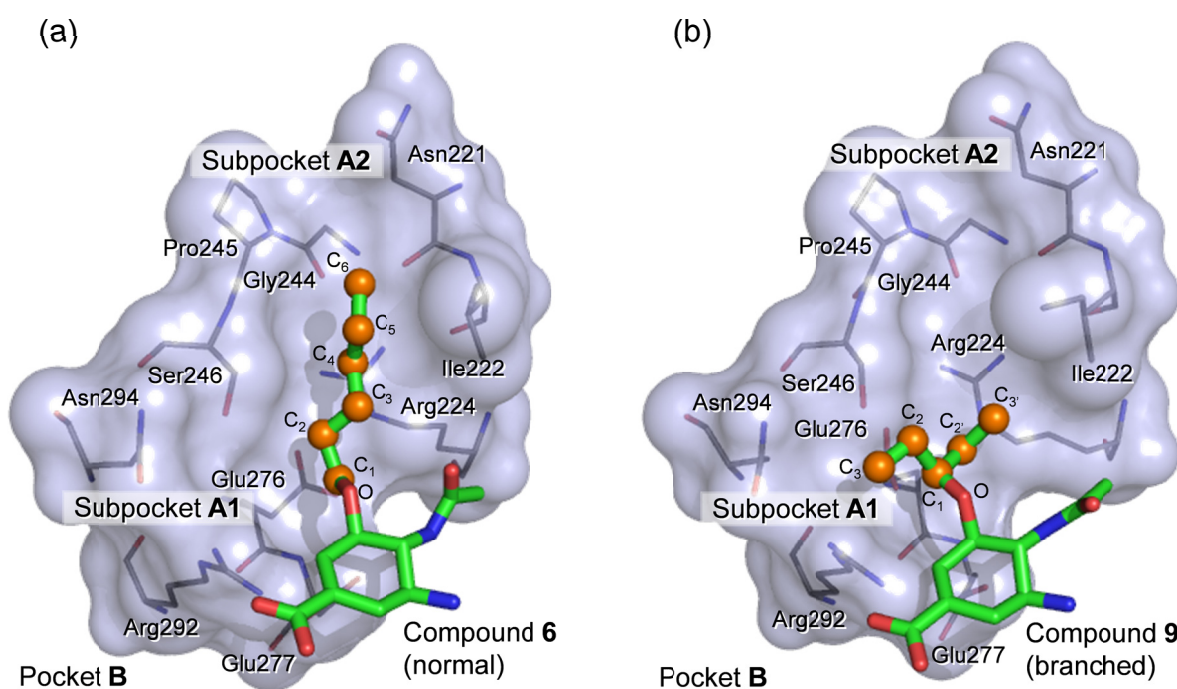


図 3.24 Compounds **6** と **9** の fragment **A** とその近傍のアミノ酸残基との間の相互作用
(a) Compound **6** (normal), (b) Compound **9** (branched).

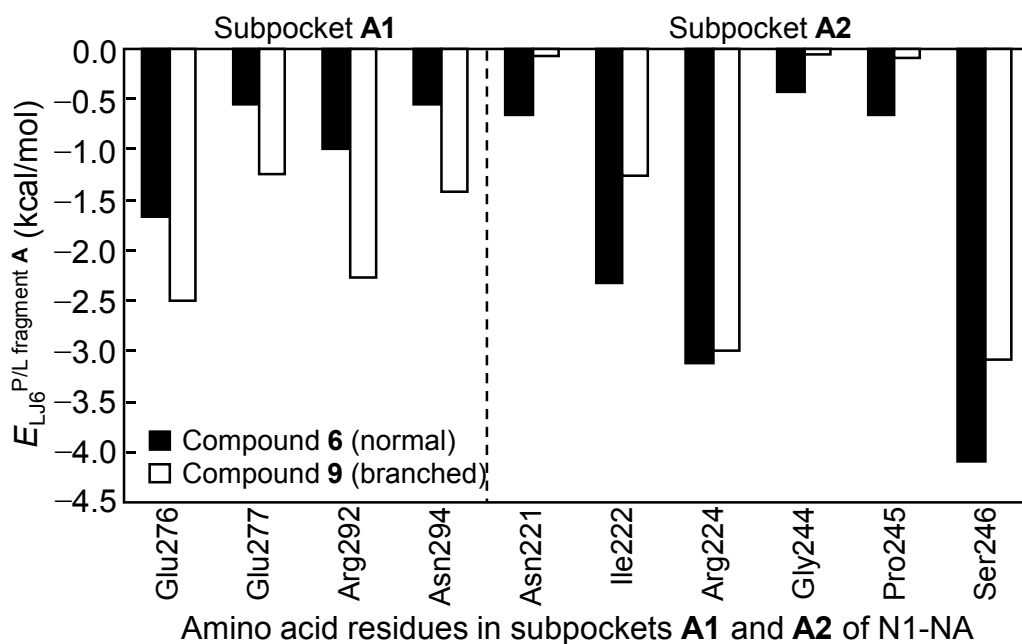


図 3.25 Compounds 6 と 9 の fragment A との間の $E_{LJ6}^{P/L \text{ fragment A}}$

図 3.26 は, compounds 6, 9 の fragment A 部位の各原子について, $-T\Delta S_{\text{schl}}^L$ の算出に用いた複合体形成の前後における原子位置揺らぎの分散・共分散 matrix σ を示す. Compound 6 の fragment A 部位について, 複合体形成前の単独状態 (free) の揺らぎは大きい, 複合体形成後の複合体状態 (bound) における揺らぎは一部の原子で凍結していることを確認できる (図 3.26 (a)). 長鎖の直鎖 alkoxy 基の先端の部分構造 ($C_4-C_5-C_6$) は, 複合体状態においても依然よく揺らいでいることから N1-NA との結合に効果的に働いていないと考えられる. 一方で, 母核構造付近の部分構造 ($O-C_1-C_2-C_3$) は, 近傍のアミノ酸残基 (subpocket A2: Ile222, Arg224, Ser246, 図 3.24 (a), 図 3.25) との間の分散相互作用に関与することにより揺らぎが凍結し, 結果として凍結 entropy ($-T\Delta S_{\text{schl}}^L$ (compound 6) = 2.8 kcal/mol, 表 3.12) を生じている. Compound 9 の fragment A 部位については, 部分構造 (C_2-C_3 および $C_2'-C_3'$) 同士が協調して揺らいでおり, この特徴的な揺らぎは複合体形成の前後においてほとんど変化していないことを確認できる (図 3.26 (b)). すなわち, これら compound 9 の部分構造はそれぞれ近傍のアミノ酸残基 (subpocket A1: Glu276, Arg292, Asn294, subpocket A2: Arg224, Ser246, 図 3.24 (b), 図 3.25) との間の分散相互作用に関与するが, この相互作用に伴う fragment A 部位の凍結 entropy はほとんど生じていない ($-T\Delta S_{\text{schl}}^L$ (compound 9) = -0.2 kcal/mol, 表 3.12).

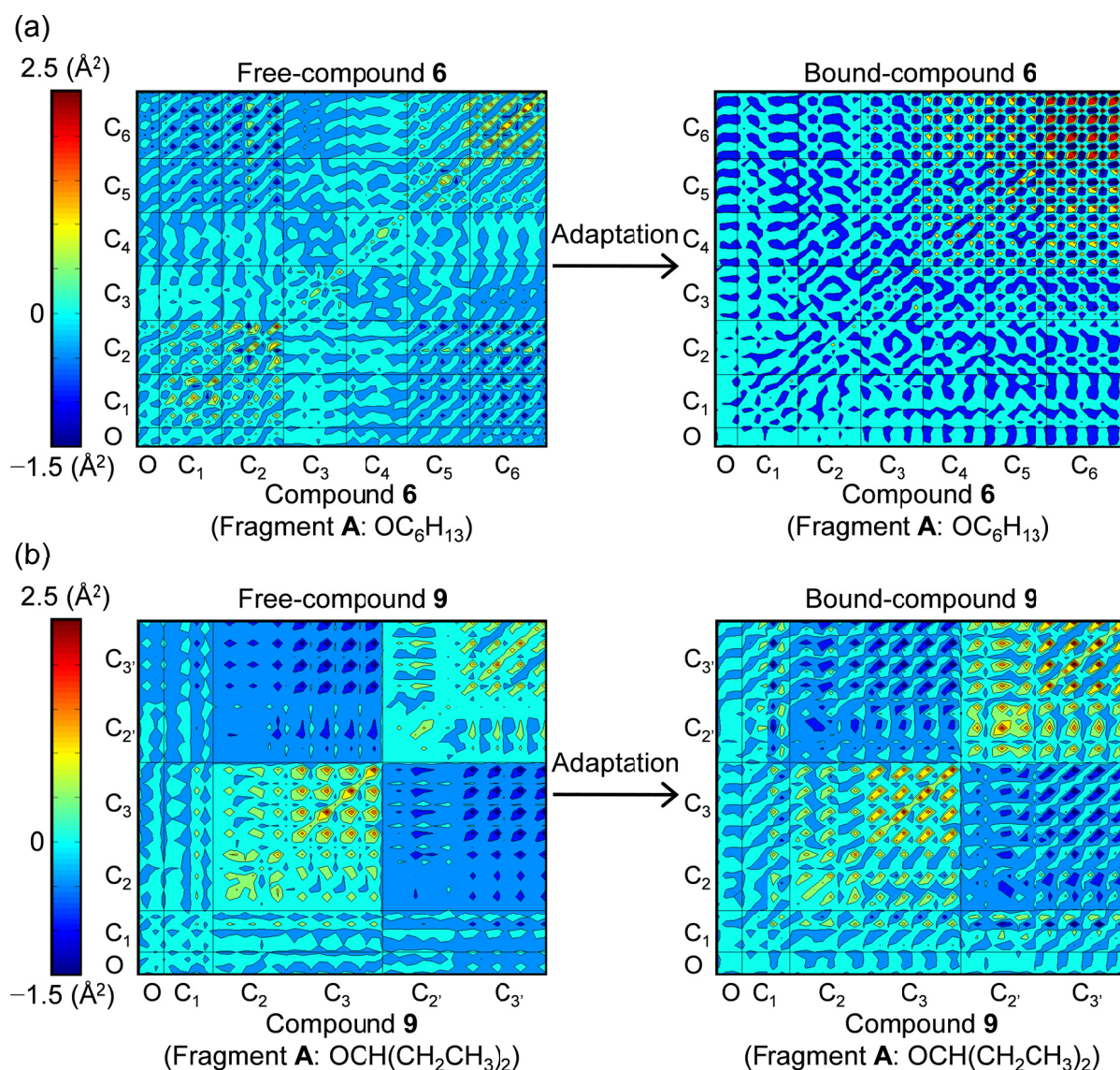


図 3.26 Compounds 6 と 9 の fragment A 部位の原子位置揺らぎの分散・共分散 matrix σ
(a) Compound 6 (normal), (b) Compound 9 (branched).

以上より、一連の Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、両分子間において特に fragment A とその近傍の pocket A のアミノ酸残基との間の分散相互作用などの結合 enthalpic 変化と適応 entropic 変化の両変化項のバランスによって支配されていると結論づけられる。また、oseltamivir (compound 9)が一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示すのは、特異な分岐鎖 alkoxy 基が entropic に安定であり、複合体形成の前後におけるリガンド部分の凍結 entropy がほとんどないことに起因することを定量的に明らかにした。

3.3.3 LERE-QSAR 解析および古典 QSAR 解析に基づくシアル酸誘導体の活性発現メカニズムに対する物理化学的考察

LERE-QSAR 解析に基づき二つの化合物セット (Sets I, II) から構成される一連のシアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を、物理化学的な意味づけとともに定量的に明らかにした。

一連の Set I 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動は、統計的に有意な LERE-QSAR 相関式 (3.10) を用いて定量的に説明可能であった (図 3.27 (a)). 一方で、表 3.1 (a) に示す π_1 および MR を用いた古典 QSAR 解析からも、 ΔG_{obs} の変動を説明可能な相関式 (3.21) および (3.22) を得ることができた (図 3.27 (b)).

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.561 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}) + 0.0708 \Delta G_{\text{diss}} + 25.4 \quad (3.10)$$

$n = 8, r = 0.988, s = 0.389 \text{ kcal/mol}, F = 98.5$

$$\Delta G_{\text{obs}} = -2.45 \pi_1 - 2.91 I_{\text{type}} - 14.0 \quad (3.21)$$

$n = 8, r = 0.968, s = 0.619 \text{ kcal/mol}, F = 37.5$

$$\Delta G_{\text{obs}} = -1.88 MR + 2.41 \quad (3.22)$$

$n = 8, r = 0.969, s = 0.561 \text{ kcal/mol}, F = 91.2$

ここで、式 (3.21) における右辺の第二項 I_{type} は、Set I 化合物の fragment C 部位が amino 基である場合は 0 を、guanidino 基の場合は 1 をとる尺度変数を表す。 π_1 および I_{type} の回帰係数がともに負の値を示すことから、シアル酸誘導体の疎水性の増大と fragment C 部位の塩基性の増強が阻害活性値の増大に有効であることが示唆される。また、 MR は原子や分子によって占有される体積やその分極率に依存し、分散力を表すパラメータと解釈されるが、式 (3.22) におけるその回帰係数が負の値を示すことから、分散相互作用の増大が阻害活性値の増大に寄与している。本解析で用いた阻害活性値は IC_{50} 値であるため、 ΔG_{obs} はシアル酸誘導体の標的受容体までの輸送過程を含んでいると考えられるが、通常、薬物分子が作用を発現する過程は、薬物分子が吸収部位から作用点へと到達するまでの過程 (薬力学的過程) と薬物分子が標的部位と相互作用する過程 (薬動力学過程) によって規定される。上記の古典 QSAR 解析においては、主に式 (3.21) および (3.22) が薬力学的過程および薬動力学過程をそれぞれ反映していると考えられる。すなわち、輸送過程におけるシアル酸誘導体の疎水性とその官能基の解離性ならびに N1-NA (標的部位) との相互作用過程における分散相互作用の重要性を示唆している。一方で、 π_1 はその定義からシアル酸誘導体の特定の部分構造である fragments A, C 部位の疎水性を表しているため、fragments A, C

部位と N1-NA との間の疎水性相互作用が、シアル酸誘導体の輸送過程よりも重要であると考えられる。しかしながら、 π_1 のみを用いる古典 QSAR 式の統計的質は乏しく ($r = 0.658$)、また π_1 と MR との間には強い共線性が存在することから、その詳細については必ずしも明らかとはならない。

一方で、LERE-QSAR 解析に基づくシアル酸誘導体の活性発現メカニズムの解釈は、上記の古典 QSAR 解析の結果に対するより強固な物理化学的な意味づけにつながると考える。LERE-QSAR 解析では、一つの相関式 (3.10)を用いて一連のシアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を統一的に説明可能であった。式 (3.10)における右辺の第二項 ΔG_{diss} は、fragment C 部位 (amino, guanidino 基)の解離自由エネルギー変化を表し、これは二つの化合物系列を区別するエネルギー差として寄与することから、式 (3.21)における I_{type} に対応すると考えられる。このことは、amino 基よりも塩基性が強い guanidino 基の導入が阻害活性値の増大に有効であることを裏付けている。また、式 (3.10)の右辺の第一項における E_{corr} は、 ΔG_{obs} の変動に対して支配的に働くが、これは式 (3.22)における MR と良好に対応している ($r = 0.993$)。すなわち、両 QSAR 解析の結果はともに分散相互作用エネルギーが ΔG_{obs} の変動に対して支配的に働くことを示唆している。一方で、式 (3.10)の右辺の第一項における $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ (CPCM-Bondi/PB)の大部分は溶媒和 enthalpy 変化に対応し、式 (3.21)における π_1 と関連していると考えられるが、両者の間の相関は良好ではないことから、考慮していない溶媒和 entropy 変化の寄与も大きいと思われる [225–227]。加えて $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ (CPCM-Bondi/PB)と $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ の間にはきわめて良好な逆相関関係が存在しており、これらのことが古典 QSAR 解析における π_1 の解釈を見かけ上不明瞭にしていると考えられる。

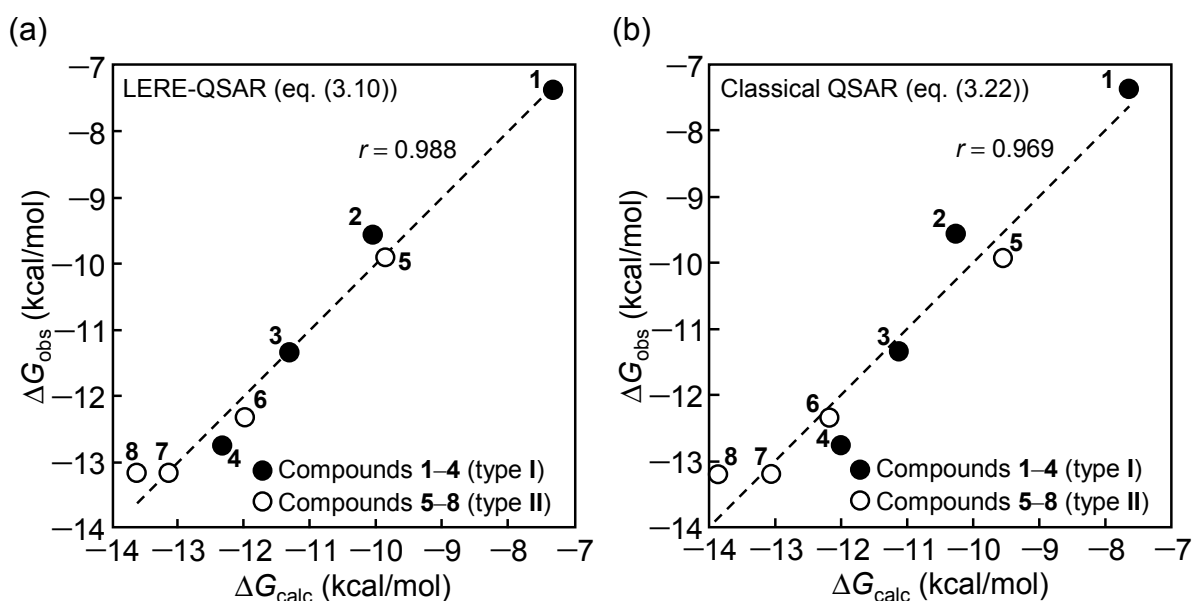


図 3.27 ΔG_{obs} と ΔG_{calc} のプロット (N1-NA-Set I 化合物)

(a) LERE-QSAR 式 (3.10)による ΔG_{calc} , (b) 古典 QSAR 式 (3.22)による ΔG_{calc} .

一連の Set II 化合物と N1-NA の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動は, entropic 変化を陽に考慮した統計的に有意な拡張 LERE-QSAR 相関式 (3.19) を用いて定量的に説明可能であった (図 3.28 (a)). 一方で, 表 3.1 (b) に示す π_2 および MR を用いた古典 QSAR 解析では, 統計的質の乏しい相関式 (3.23) および (3.24) しか得ることができなかった (図 3.28 (b)).

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.411 (\Delta E_{\text{LJ6}}^{\text{L}} + E_{\text{LJ6}}^{\text{P/L}} - T\Delta S_{\text{schl}}^{\text{L}} - TS_{\text{schl}}^{\text{P/L}}) + 3.69 \quad (3.19)$$

$n = 9, r = 0.961, s = 0.490 \text{ kcal/mol}, F = 83.6$

$$\Delta G_{\text{obs}} = -1.16 \pi_2 - 7.88 \quad (3.23)$$

$n = 9, r = 0.614, s = 1.39 \text{ kcal/mol}, F = 4.23$

$$\Delta G_{\text{obs}} = -1.28 MR - 0.671 \quad (3.24)$$

$n = 9, r = 0.701, s = 1.26 \text{ kcal/mol}, F = 6.77$

このことは, 図 3.28 (b) から確認可能なように, π_2 (MR) では直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の違いを明確にすることができず, 特異な分岐鎖 alkoxy 基を有する oseltamivir が, 一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示すことは必ずしも明白とはならないことを示唆している. 一方で, LERE-QSAR 相関式 (3.19) から, ΔG_{obs} の変動は分散相互作用などの結合 enthalpic 変化と適応 entropic 変化の両変化項のバランスによって支配されていること, また, oseltamivir が一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示すのは, 複合体形成の前後におけるリガンド部分の凍結 entropy がほとんどないことに起因することを定量的に明らかにした.

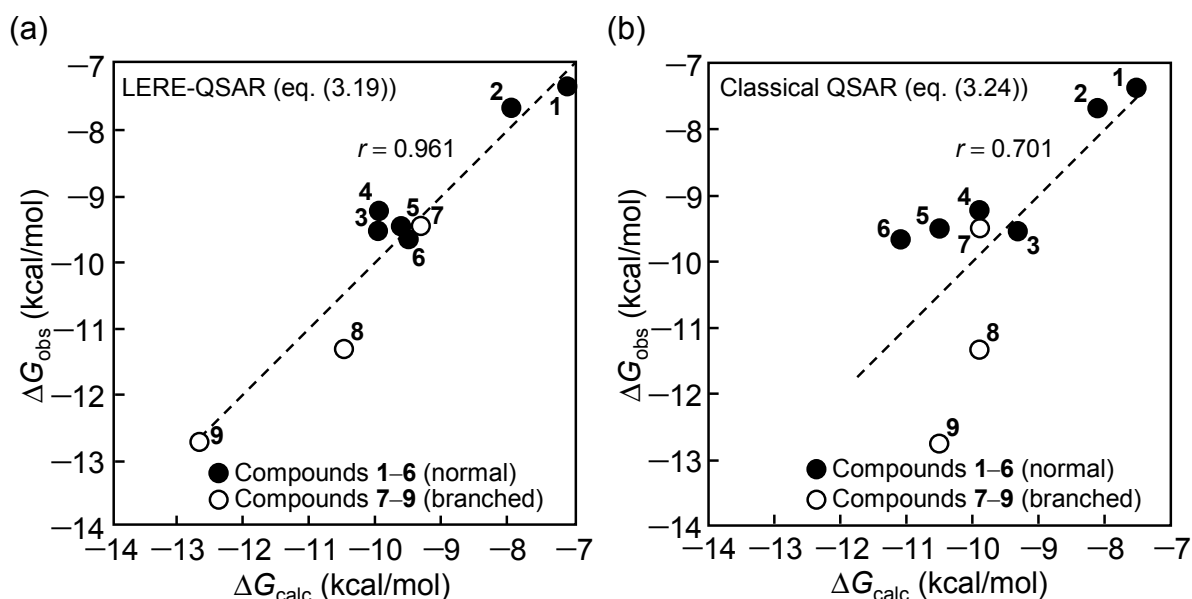


図 3.28 ΔG_{obs} と ΔG_{calc} のプロット (N1-NA-Set II 化合物)

(a) LERE-QSAR 式 (3.19) による ΔG_{calc} , (b) 古典 QSAR 式 (3.24) による ΔG_{calc} .

以上の議論は、LERE-QSAR 解析と古典 QSAR 解析の両者に対する優位性の議論ではなく、両アプローチに基づく統合解析が、阻害剤の活性発現メカニズムの定量的な理解において、より強固な物理化学的な意味づけを与えたことになる。

3.4 小括

本章では、インフルエンザウイルスの N1-NA と代表的な抗インフルエンザ剤の一つである oseltamivir (Tamiflu)を含む一連のシアル酸誘導体 (Sets I, II)の複合体について、FMO 法等による分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析を行った。その結果、シアル酸誘導体とN1-NAの複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式を、物理化学的な意味づけとともに定量的に明らかにした。すなわち、両分子間に働く分散相互作用が実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動と良好な線形関係にあること、さらに、シアル酸誘導体の各部分構造の相互作用様式を原子・電子レベルで明確にするとともにその変動に関与する N1-NA のアミノ酸残基を定量的に明らかにした。

一連の Set I 化合物と N1-NA の解析において、Set I 化合物の N1-NA に対する結合の安定化に寄与するアミノ酸残基 (pocket A: Glu277, pocket B: Arg152, Arg292, Arg371, pocket C: Asp151, Glu227)と不安定化に寄与するアミノ酸残基 (pocket C: Arg156)を特定した。後者については、Arg156 との安定化相互作用を得るための阻害剤修飾の試みが行われていることに対応している。また、amino, guanidino 基の相互作用の違いを担うアミノ酸残基 (pocket C: Glu119, Trp178)を特定し、水分子 (W1, W2)の役割も明確にした。Set I 化合物の fragments B, C 部位と N1-NA の pockets B, C のアミノ酸残基との間の強固な水素結合ないしは静電相互作用によるエネルギーの寄与は大きく、複合体形成の主要因となると考えられるが、水和自由エネルギー変化との間に良好な逆相関関係が成立する結果として全自由エネルギー変化の変動に対する寄与は比較的小さかった。実際に、両分子の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、fragment A と pocket A のアミノ酸残基との間の分散相互作用などの局所的な相互作用により支配されることを定量的に明らかにした。

一連の Set II 化合物と N1-NA の解析において、古典 QSAR 解析では直鎖・分岐鎖 alkoxy 基の違いを明確にすることができず、特異な分岐鎖 alkoxy 基を有する oseltamivir が、一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示すことは必ずしも明白とはならなかった。一方で、entropic 変化を陽に考慮した拡張 LERE-QSAR 解析の結果、両分子の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、分散相互作用などの結合 enthalpic 変化と適応 entropic 変化の両変化項のバランスによって支配されていること、また、oseltamivir が一連の Set II 化合物のなかで最大の阻害活性を示すのは、複合体形成の前後におけるリガンド部分の凍結 entropy がほとんどないことに起因することを定量的に明らかにした。

第4章 ヒト・ノイラミニダーゼ-2-シアル酸誘導体の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化に対する LERE-QSAR 解析

4.1 序論

ノイラミニダーゼ (neuraminidase: NA, EC3.2.1.18)は exoglycohydrolase に属し、糖タンパク質、糖ペプチド、ガングリオシド、オリゴ糖などの複合糖質の非還元末端に存在するシアル酸を加水分解する酵素であり、このシアル酸の制御を介して様々な生物学的プロセスに関与している。NA は、前章で述べたウイルスをはじめ、微生物 (細菌, 原虫, 真菌)やヒトを含む高次の動物まで、自然界に広く分布している [228]。これまでに、NA の構造・機能の解明を目的とする多くの解析が報告されているが、その大部分はインフルエンザウイルス・NA に関するものであり [145, 146], ヒト・ノイラミニダーゼ (human neuraminidase: hNEU) についての報告例は少ない [229, 230]。インフルエンザウイルス・NA および hNEU のいずれにおいてもその基質はシアル酸であり、特に前者に対する触媒反応機構の研究から [154–156], シアル酸の遷移状態中間体を模倣した阻害剤 (transition-state analogues (mimetic) inhibitor) が開発されている。なかでも 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac2en, DANA) [231]は、1960 年の後半に開発された初期の NA 阻害剤であるが (図 4.1), インフルエンザウイルス・NA のみならず、その他の様々な NA に対しても、弱いながらも阻害効果を示す [232, 233]。このことは、インフルエンザウイルスやヒトを含め、多くの生物種由来の NA の活性部位のアミノ酸残基が高度に保存されていることを示唆している。

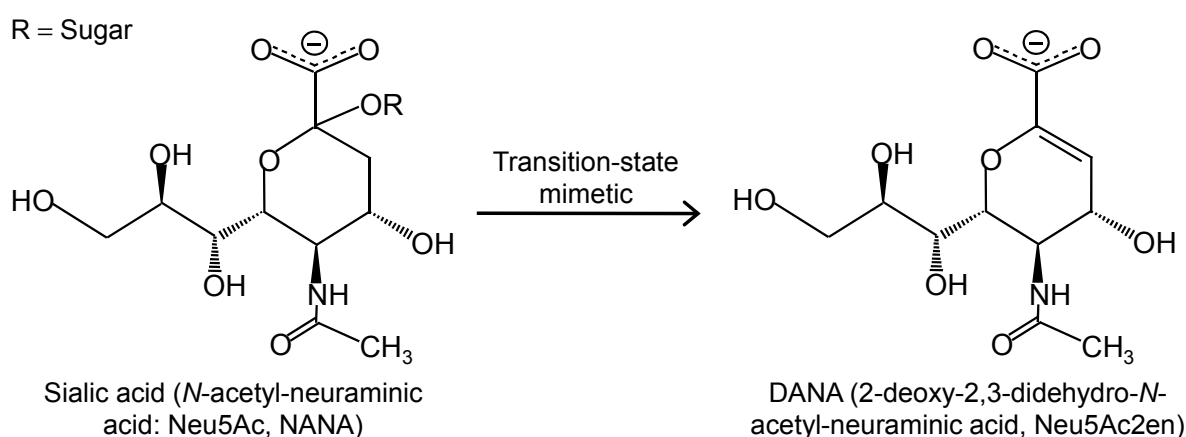


図 4.1 シアル酸の遷移状態中間体を模倣した阻害剤 (DANA)の開発

hNEU は、細胞内局在性、酵素特性および基質特異性が異なる 4 種類が現在までに同定・特徴づけられており [234], それらはリソソームに局在するヒト・ノイラミニダーゼ-1 (hNEU1) [235], 細胞質に局在するヒト・ノイラミニダーゼ-2 (hNEU2) [236], 細胞表層の形質膜に局在するヒト・ノイラミニダーゼ-3 (hNEU3) [237]およびこれらとは大きく性質の異なるヒト・ノイラミニダーゼ-4 (hNEU4) [238]に分類される. いずれも、細胞増殖・分化およびアポトーシスなどの様々な細胞機能に関与する (表 4.1). 特に、hNEU1 はシアル酸含有複合糖質のリソソーム性の異化作用に必要不可欠であり、hNEU2 は筋・神経分化に関与、また、hNEU3 はガングリオシドの制御を介して細胞表面機能を担う. 一方で、hNEU4 は広範な複合糖質に対して活性を示し、また、糖脂質の異化作用にも関与するとされるが、その詳細については未だ明らかとなっていない. また、構造的な観点については、hNEU2 は動物 NA においては初めて、また hNEU1-4 のなかでは唯一その 3 次元立体構造が明らかとなっている (図 4.2 (a)) [239]. その構造的な特徴として、一般に NA が有する 6 個の β -sheet から構成される β -propeller 構造および活性部位のアミノ酸残基は高度に保存されている. hNEU2 とインフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1 (N1-NA, 図 4.2 (b))を比べた場合、両者のアミノ酸残基の配列相同性はそれほど高くないものの (identity: ~16%, similarity: ~25%), タンパク質全体の構造的な特徴や arginine triad (hNEU2: Arg21, Arg237, Arg304, N1-NA: Arg118, Arg292, Arg371)などの活性部位のアミノ酸残基については比較的類似している.

表 4.1 hNEU1-4 の比較 [229, 230]

	hNEU1	hNEU2	hNEU3	hNEU4
subcellular localization	Lysosomes	Cytosol	Plasma membrane	Lysosomes, mitochondria and ER
substrates	Oligosaccharides and glycopeptides	Oligosaccharides, glycoproteins, and gangliosides	Gangliosides	Oligosaccharides, glycoproteins, and gangliosides
optimal pH (in vitro)	4.4-4.6	5.6-6.5	4.6-4.8	3.2-4.5
total amino acid residues	415	380	428	496 (484) ^a
function	Lysosomal catabolism and immune responses	Muscle cell and neuronal differentiation	Neuronal differentiation, apoptosis, and cell signaling	Cell apoptosis or neural differentiation

^a hNEU4 exists as two isoforms.

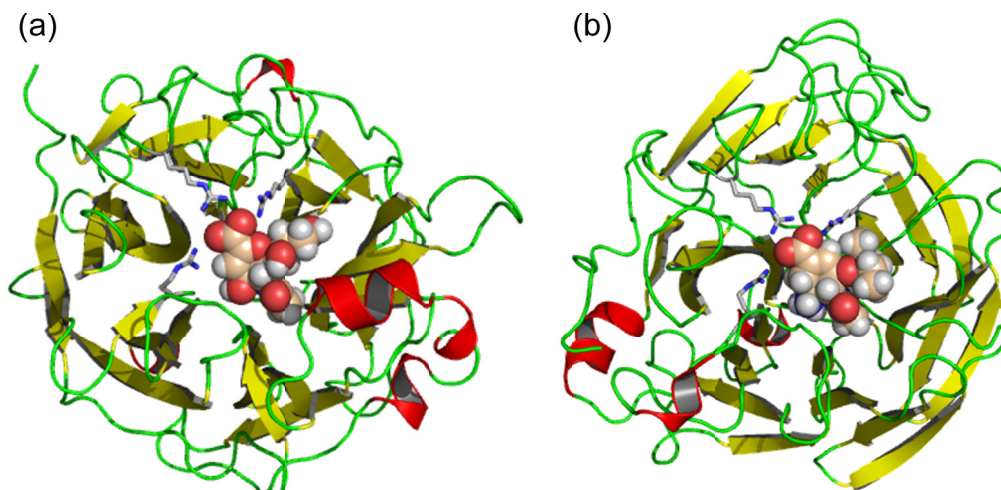


図 4.2 ヒトおよびインフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼの 3 次元立体構造 (a) hNEU2-DANA の複合体 (PDB code: 1VCU [239]), (b) N1-NA-oseltamivir の複合体 (2HU4, [189]). α -helix および β -sheet は、それぞれ赤色および黄色で表す. リガンドおよび arginine triad は、それぞれ CPK モデルおよび stick モデルで表す.

前述したように、DANA はインフルエンザウイルス・NA 全般を阻害するが、その強度は実際に抗インフルエンザ剤として使用するには小さい。そのため、NA の構造情報に基づく structure based drug design (SBDD) や DANA 誘導体の QSAR 解析から、現在までに代表的な抗インフルエンザ剤として、4 つの NA 阻害剤 (図 3.4 (d)) が開発され、インフルエンザの治療に広く使用されている。しかしながら、特に oseltamivir 服用後の精神・神経症状の有害事象が報告されており [240]、NA 阻害剤のヒトへの影響が懸念される。その原因の一つとして、hNEU への影響が指摘され、NA 阻害剤の hNEU に対する阻害効果の検討が行われている [241–248]。実際に、zanamivir や oseltamivir は、その程度は小さいものの hNEU を阻害することが報告されている [242, 244, 245, 247]。したがって、NA 阻害剤のヒトおよびインフルエンザウイルス・NA に対する結合選択性の違いを理解することは、高い選択性と副作用の少ない新規 NA 阻害剤の開発につながると考えられる。

本章では、hNEU2 と抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体の複合体について、非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital: FMO) 法等による分子科学計算ならびにその結果に基づく自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE-QSAR) 解析 [16–21] から、複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式ならびにその変動に対するシアル酸誘導体の各部分構造の寄与を原子・電子レベルで定量的に明らかにすることを目的とした。また、抗インフルエンザ剤のなかでも特に oseltamivir のヒト (hNEU2) およびインフルエンザウイルス (N1-NA) に対する結合選択性の違いについても、前章における N1-NA の解析結果に基づき議論する。

上記の検討の結果、シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成において、(1) 実測の阻害

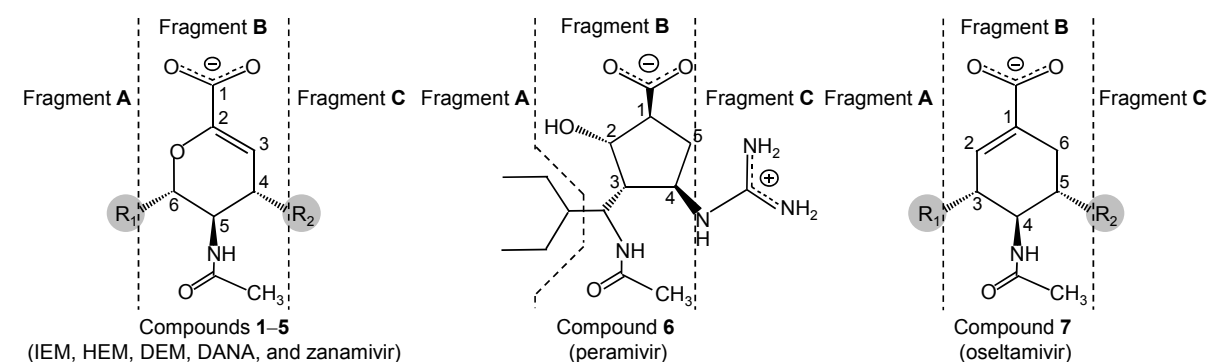
活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動を LERE-QSAR 解析から定量的に説明できたこと, (2) その変動を支配する特定のエネルギー成分を明らかにしたこと, (3) oseltamivir の結合選択性を担う相互作用様式を定量的に明らかにしたのでそれらを中心に以下に述べる [18, 21, 249].

4.2 解析方法

4.2.1 化合物セット

Chavas ら [244]により報告されている抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体の hNEU2 に対する阻害活性データに基づき, 本解析では DANA とその誘導体を含む一連のシアル酸誘導体 (isobutyl ether DANA mimetic (IEM, compound **1**), 3-hydroxypropyl ether DANA mimetic (HEM, **2**), 2,3-dihydroxypropyl ether DANA mimetic (DEM, **3**), DANA (**4**))および抗インフルエンザ剤 (zanamivir (Relenza, **5**), peramivir (Rapiacta, **6**), oseltamivir (Tamiflu, **7**))の合計 7 化合物を使用した. この化合物セットは, fragments **A**, **C** 部位の側鎖基の構造のみならず, fragment **B** 部位の母核構造も異なる多様な化合物で構成され, その化学構造および阻害定数 K_i 値を表 4.2 に示す.

表 4.2 シアル酸誘導体の化学構造と K_i 値



compound				hNEU2
no.	name	R ₁ (fragment A)	R ₂ (fragment C)	K_i^a
1	IEM ^b	OCH ₂ CH(CH ₃) ₂	OH	0.88
2	HEM ^c	OCH ₂ CH ₂ CH ₂ (OH)	OH	0.74
3	DEM ^d	OCH ₂ CH(OH)CH ₂ (OH)	OH	1.4
4	DANA ^e	CH(OH)CH(OH)CH ₂ (OH)	OH	0.14
5	zanamivir ^f	CH(OH)CH(OH)CH ₂ (OH)	NHC(=NH ₂ ⁺)NH ₂	0.017

(Continued)

6	peramivir ^g	CH(CH ₂ CH ₃) ₂	NHC(=NH ₂ ⁺)NH ₂	0.33
7	oseltamivir ^h	OCH(CH ₂ CH ₃) ₂	NH ₃ ⁺	5

^a Taken from ref. 244 (in mM).

^b Isobutyl ether DANA mimetic.

^c 3-Hydroxypropyl ether DANA mimetic.

^d 2,3-Dihydroxypropyl ether DANA mimetic.

^e 2-Deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid.

^f Relenza.

^g Rapiacta.

^h Tamiflu.

4.2.2 hNEU2-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング

現在, PDB に登録されている hNEU2 の立体構造として, 14 件の X 線結晶解析構造 (PDB codes: 1SNT, 1SO7, 1VCU, 2F0Z, 2F10, 2F11, 2F12, 2F13, 2F24, 2F25, 2F26, 2F27, 2F28, 2F29 [239]) が利用可能である. このなかには, 表 4.2 に示す compound 7 (oseltamivir) 以外の compounds 1–6 と hNEU2 の複合体の立体構造があるが, 特に compound 4 (DANA) と hNEU2 の複合体構造 (PDB code: 1VCU, 図 4.2 (a)) は, 欠落アミノ酸残基が最小であるため, これを各化合物の複合体の初期構造として使用した. なお, 1VCU は crystal packing により野生型ホモ二量体の構造として存在するが, 通常その酵素機能は単量体 hNEU2 が担うと考えられるため, 実際には単量体 B 鎖構造を使用した. 欠落アミノ酸残基が最小である 1VCU の B 鎖構造においても, 一部のアミノ酸残基 (Ser284–Gly287, Leu378–Gln380) の座標に欠落が確認されたため, SYBYL7.0 [198] を用いて補完した. hNEU2–compound 4 の複合体構造 (complex 4) における compound 4 と compound 1 (IEM, PDB code: 2F11, complex 1), 2 (HEM, 2F12, 2), 3 (DEM, 2F13, 3), 5 (zanamivir, 2F0Z, 5), 6 (peramivir, 2F10, 6) および 7 (oseltamivir, 2HU4, 7) と hNEU2 の複合体構造における化合物同士の座標の重ね合わせ操作から, compound 4 の座標をそれぞれの化合物の座標に置き換えることで, 各化合物の複合体の初期構造を構築した.

一方で, complexes 2, 4, 5 におけるそれぞれの化合物の fragment A 部位の近傍に位置する構造領域 (loop A: Ile103–Thr122, loop B: Val265–Ser275) において, 特に loop A 部位に有意な構造変化を確認できる (図 4.3). なかでも, complex 2 の loop A の構造は, complexes 4, 5 のそれらと比べて大きく異なり, これは化合物の fragment A 部位の構造の違い (compound 2: R₁ = OCH₂CH₂CH₂(OH), 4, 5: CH(OH)CH(OH)CH₂(OH)) に起因する相互作用様式の差異を反映していると考えられる. また, complexes 1, 3, 6 における loop A 部位の座標は欠落していることから, loop A は柔軟な構造領域であることが示唆される. 実際, この

loop A 部位を含む構造領域は、リガンド非結合の hNEU2 における disorder 領域の一部であり、リガンドの結合に伴い大きく構造変化することが報告されている [239]。一方で、complexes 1-6 における loop B 部位は、loop A ほどの大きな構造変化は確認されない。すなわち、fragment A 部位の構造に応じて、その近傍の構造領域に変化が生じている可能性が示唆される。そのため、compound 2 の fragment A 部位と類似した部分構造を有する compounds 1, 3 については、その複合体中における loops A, B 部位の座標を対応する complex 2 のそれに置き換えることで、複合体構造を再構築した。

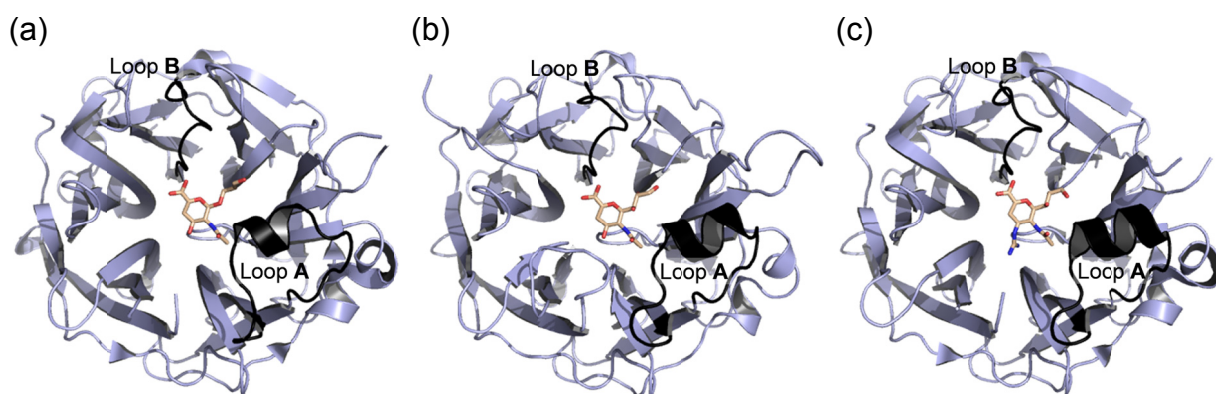


図 4.3 Compounds 2, 4, 5 の fragment A 部位の近傍に位置する構造領域 (loops A, B)
 (a) Complex 2 (HEM, 2F12), (b) Complex 4 (DANA, 1VCU), (c) Complex 5 (zanamivir, 2F0Z).

また、インフルエンザウイルス・NA の場合と同様に、hNEU2-リガンド複合体の複数個の X 線結晶解析構造 (PDB codes: 2F11, 2F12, 2F13, 2F25, 2F27, 1VCU) において、リガンドと hNEU2 との間の相互作用を媒介する水分子 (W1, W2) が確認された (図 4.4 (a)). W1 および W2 の酸素原子の位置の根平均二乗変位 (root mean square deviation: RMSD) は、それぞれ 0.33 \AA ($n = 7$) および 0.44 \AA ($n = 8$) であることから、これら水分子はほぼ同等な位置に存在し、リガンドと hNEU2 との間の相互作用を媒介すると考えられる。そのため、先の N1-NA のモデリング方法と同様に、fragment C 部位 (hydroxyl (OH), amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$) 基) に依存する特異的な水分子 (W1, W2: hydroxyl, amino 基 (compounds 1-4, 7), W1: guanidino 基 (5, 6)) を考慮してそれぞれの複合体構造を構築した。なお、各複合体における解離性のアミノ酸残基 (Asp, Glu, Lys, Arg) の取扱い、His のプロトン化状態の決定、末端残基の処理および溶媒効果については、3.2.2 節のモデリング方法に準ずる。本解析においても、particle mesh Ewald (PME) 法 [200] を使用するために、各複合体の系全体の電荷状態 (compounds 1-4: -5, 5-7: -4) を中性に保つように Na^+ イオン (1-4: 5 個, 5-7: 4 個) を加え、エネルギー極小化計算を行った。その手順は、3.2.2 節の方法に準じ、表 4.3 の計算条件に基づき行った。Steps 3, 4 における極小化計算では、特に fragment A 部位との水素結合ないしは静電相互作用に関与するアミノ酸残基 (Glu111,

Tyr179, Tyr181, Glu218, Gln270) (図 4.4 (b))に対して, 調和ポテンシャル型の原子位置拘束 ($10 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$)を設けることで X 線結晶解析構造からの大きな逸脱を防いだ。

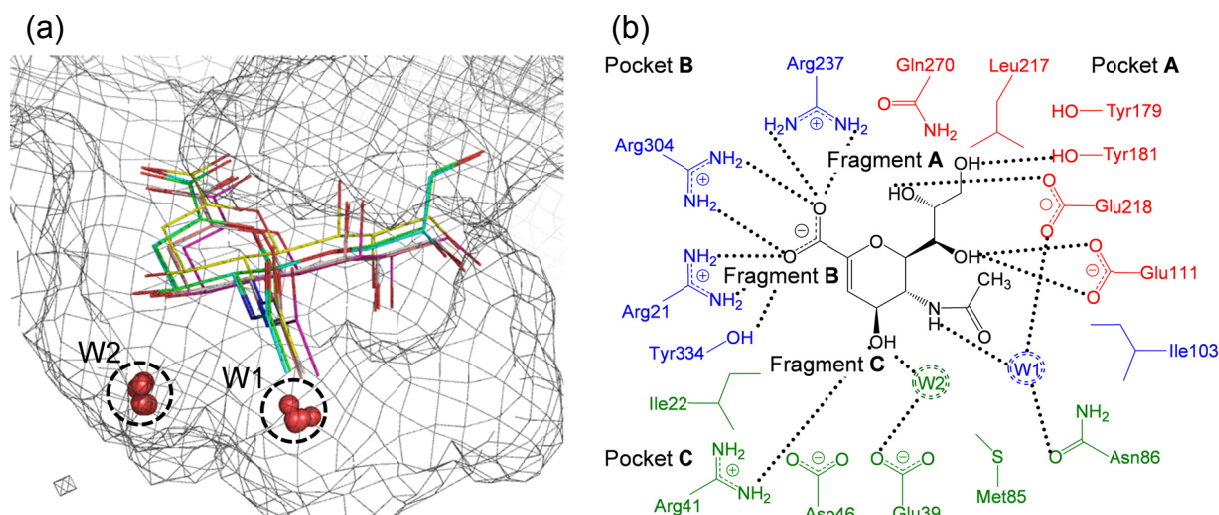


図 4.4 シアル酸誘導体の hNEU2 に対する結合相互作用様式

(a) 相互作用を媒介する水分子 (PDB codes: 2F11, 2F12, 2F13, 2F25, 2F27, 1VCU), (b) Compound 4 の相互作用様式. W1 および W2 は水分子を, pockets A, B, C は, それぞれ fragments A, B, C の近傍のアミノ酸残基を表す。

表 4.3 hNEU2-シアル酸誘導体の複合体構造に対するエネルギー極小化計算

MM simulation	
Force field	parm99 (hNEU2), GAFF (compounds 1-7)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子および欠落アミノ酸残基 ^a の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 1,000 cycles, PBC)
Step 2. MM	水分子とカウンターイオンの極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 3. MM ^b	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 4. MM ^b	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)	

^a Ser284-Gly287 and Leu378-Gln380.

^b The atomic positions of Glu111, Tyr179, Tyr181, Glu218, and Gln270 were constrained with a harmonic potential of $10 \text{ kcal/mol/\text{Å}^2}$.

4.2.3 LERE-QSAR 解析 (hNEU2-シアル酸誘導体)

シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために、LERE-QSAR 解析 [16-21]を行った。2.1 節において構築した LERE-QSAR 解析の基本式 (2.6)において、結合相互作用エネルギー ΔE_{bind} ($= \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}}$) は FMO/MP2/6-31G で算出し、 ΔE_{bind}^0 および E_{disp} はそれぞれ $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ および E_{corr} により評価した。水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は阻害剤の結合部位以外の微小な構造変化に対して敏感であるため、この効果を 200 ps の production molecular dynamics (MD) より得られるダイナミクストラジェクトリから統計平均値 ($\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$) として (MD 後半 150 ps のダイナミクストラジェクトリから 3.0 ps 間隔で抽出した 50 個の構造に基づき) 算出することで考慮した。これは、前節で確認したように、阻害剤の fragment A 部位の近傍に位置する構造領域は柔軟であるため、この変化に起因する $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ を評価するためである。なお、 $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$ は古典的連続誘電体モデルである Poisson-Boltzmann/generalized Born-OBC I (PB/GB-OBC I) 法で評価した。解離自由エネルギー変化 ΔG_{diss} は、シアル酸誘導体の fragment C 部位 (hydroxyl (OH), amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$) 基) の自由エネルギー変化として、self-consistent reaction field-conductor-like polarizable continuum model (SCRF-CPCM)/HF/6-31+G(d,p) により評価した。なお、シアル酸誘導体の fragment B 部位 (carboxyl (COO^-) 基, $\text{p}K_{\text{a}} \sim 2.4$) および fragment C 部位の guanidino 基 ($\text{p}K_{\text{a}} \sim 13$) については、至適 pH (= 5.6) [244, 250] における hNEU2 との複合体形成の前後ではほぼ完全に解離していると考えられるため、本解析では compound 6 (oseltamivir) の amino 基の解離自由エネルギー変化のみを評価した。 $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$ を除く各エネルギー項は、前節のモデリング方法に従って構築した hNEU2-シアル酸誘導体の複合体構造に基づき算出した。最終的に式 (2.6) から下式 (4.1) を導出し、これを hNEU2-シアル酸誘導体に対する LERE-QSAR 解析における基本式とした。

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB-OBC I)}} \rangle) + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}} + \text{const}_3 \quad (4.1)$$

4.3 結果および考察

4.3.1 シアル酸誘導体の hNEU2 に対する結合相互作用様式

図 4.5 および図 4.6 は、エネルギー極小化計算後の hNEU2-compounds 4-7 (DANA (4), zanamivir (5), peramivir (6), oseltamivir (7))の複合体における活性部位近傍の相互作用様式および production MD の後半 150 ps における compounds 4-7 と hNEU2 との間の水素結合占有率 (カットオフ距離: 3.0 Å (以内), カットオフ角度: 120.0° (以上))を満たすトラジェクトリ中の構造数 (n)と全構造数 (N)の比 ($= n/N$)を示す。なお, compounds 1-3 の相互作用様式は compound 4 とほぼ同等であるために示していない。Compounds 4-7 のすべてにおいて, 共通の部分構造である carboxyl 基 (fragment B)および acetamide 基 (fragment B)は, それぞれ arginine triad (pocket B: Arg21, Arg237, Arg304)および W1 (pocket B)との間に強固な水素結合が確認される。また, compounds 4, 5 が有する glycerol 基 (fragment A)は, Glu111 および Glu218 (pocket A)との間において水素結合を形成しており, compound 5 のほうがより強固であることを確認できる。一方で, compounds 6, 7 の fragment A は glycerol 基のような水酸基を有していないため, 近傍のアミノ酸残基との間に水素結合は確認されない。Fragment C 部位の相互作用として, 中性の hydroxyl 基を有する compound 4 は Arg41, W2 (pocket C)との間に, また塩基性官能基 (amino, guanidino 基)を有する compounds 5-7 は Glu39, Asp46, Asn86, W2 (pocket C)との間に水素結合の形成を確認できるが, 後者のほうがより強固である。なかでも, guanidino 基を有する compounds 5, 6 のほうが, amino 基を有する compound 7 に比べてより多くのアミノ酸残基と水素結合を形成している。このように阻害剤とその近傍のアミノ酸残基との間において, 水素結合などの相互作用様式は比較的容易に確認できるが, これらの結合相互作用情報のみでは表 4.2 で示した阻害活性値, すなわち実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動を説明できない。そこで, 次節において, シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動を支配する相互作用様式を LERE-QSAR 解析に基づき明らかにする。

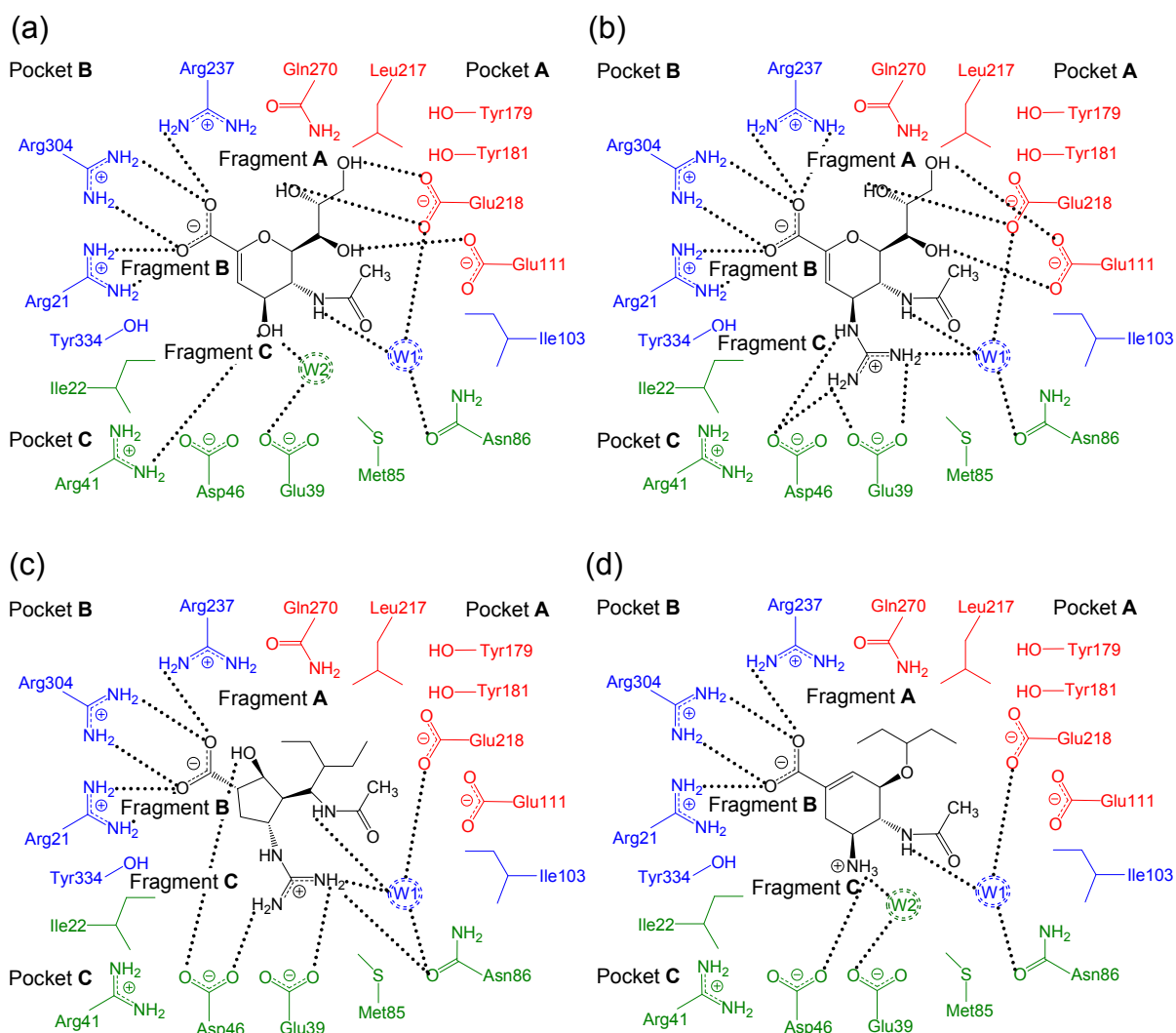


図 4.5 Compounds 4-7 と hNEU2 との間の相互作用様式

(a) Compound 4 (DANA), (b) Compound 5 (zanamivir), (c) Compound 6 (peramivir), (d) Compound 7 (oseltamivir). W1 および W2 は水分子を, pockets A, B, C は, それぞれ fragments A, B, C の近傍のアミノ酸残基を表す.

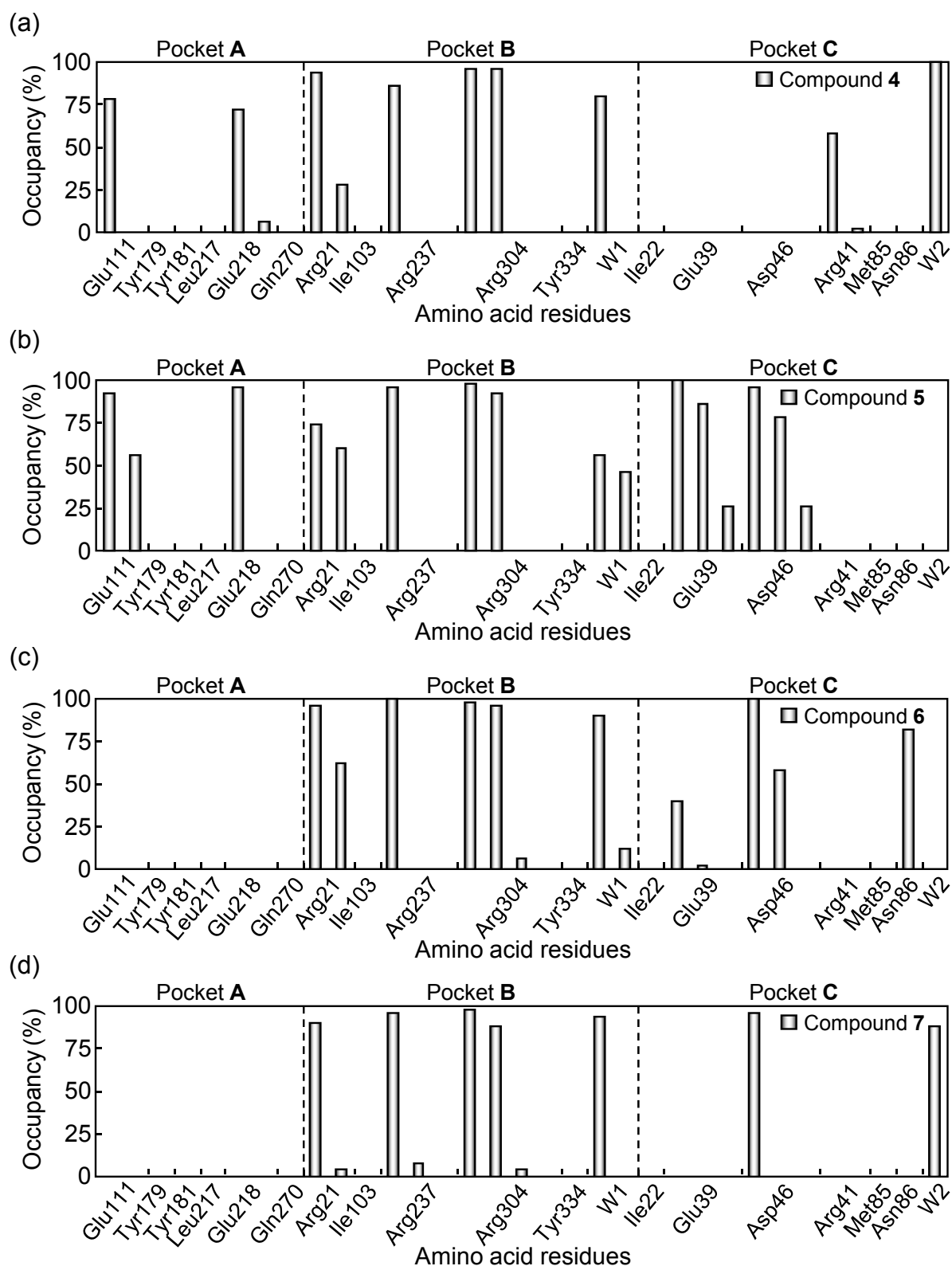


図 4.6 Compounds 4–7 と hNEU2 との間の水素結合占有率

(a) Compound 4 (DANA), (b) Compound 5 (zanamivir), (c) Compound 6 (peramivir), (d) Compound 7 (oseltamivir).

4.3.2 hNEU2-シアル酸誘導体に対する LERE-QSAR 解析

シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動を支配する相互作用様式を明確にするために、基本式 (4.1) に基づく LERE-QSAR 解析を行った。母核構造が異なる多様な化合物セットにもかかわらず、一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を、物理化学的な意味づけとともに説明可能な統計的に有意である LERE-QSAR 相関式 (4.2) および (4.3) ((4.2): PB, (4.3): GB-OBC I) を得ることができた。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0476 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle) + 0.0976 \Delta G_{\text{diss}} - 2.25 \quad (4.2)$$

$n = 7, r = 0.985, s = 0.237 \text{ kcal/mol}, F = 65.5$

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0600 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle) + 0.0829 \Delta G_{\text{diss}} - 1.02 \quad (4.3)$$

$n = 7, r = 0.971, s = 0.331 \text{ kcal/mol}, F = 32.7$

相関式において、等温滴定熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC) の実験結果 [49] から α を 0.678 とした場合、上式の右辺の第一項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB/GB-OBC I)}} \rangle$) の係数 ($\gamma_1 = (1 + \beta)(1 - \alpha)$) における β は負の値を示す (式 (4.2): $\beta = -0.852$, (4.3): -0.814)。このことは、式 (2.2) 導出において仮定したとおり ($\beta < 0$ and/or $const_1 > 0$)、相関式の右辺の第一項に対して線形な penalty energy 項の存在を表している。なお、 $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$ の評価に対して PB 法および GB-OBC I 法のどちらを用いた場合においても、相関式 (4.2) および (4.3) はほぼ同等な統計的有意性を示す。したがって、以下の代表自由エネルギー項の寄与についての議論では、相関式 (4.2) の構築に用いた代表自由エネルギー項に基づき議論する。

表 4.4 は、LERE-QSAR 解析で用いた代表自由エネルギー項、実測値 ΔG_{obs} 、LERE-QSAR 相関式 (4.2) より得られる予測値 ΔG_{calc} 、FMO (HF/6-31G) 法に基づく結合相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ 、PB 法に基づく水和自由エネルギー変化の極性項 $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle$ 、SCRF-CPCM (HF/6-31+G(d,p)) 法に基づく解離自由エネルギー変化 ΔG_{diss} および分散相互作用エネルギー E_{disp} に対応する電子相関エネルギー E_{corr} の値を示す。図 4.7 は、 ΔG_{obs} の変動に対する各エネルギー項の寄与を示す。Compound 7 (oseltamivir) の ΔG_{diss} の値は他と比べてわずかに大きい。これは fragment C 部位の amino 基の結合と非結合状態における解離自由エネルギー差を反映している。 E_{corr} の寄与は小さく、実際にこのエネルギー項を除外した場合においても、相関式が良好に成立することを確認できる (式 (4.4))。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0457 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle) + 0.0935 \Delta G_{\text{diss}} - 4.29 \quad (4.4)$$

$n = 7, r = 0.958, s = 0.397 \text{ kcal/mol}, F = 22.1$

一方で、結合相互作用エネルギーの大部分を担う $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle$ の各々の寄与は大きいものの ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}] = 3224$, $\text{var.}[\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle] = 2005 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$), 前章の N1-NA の解析結果と同様に、両者の間には良好な逆相関関係が成立し ($r = -0.969$, 式 (4.5)), 結果として静電相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle$)の寄与は比較的小さくなることを確認できる ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle] = 300$).

$$\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle = -0.764 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + 18.9 \quad (4.5)$$

$n = 7, r = 0.969, s = 13.0, F = 78.0$

しかしながら、これら静電相互作用エネルギーの寄与は E_{corr} の寄与 ($\text{var.}[E_{\text{corr}}] = 45$)と比べて大きいので、静電相互作用エネルギーが ΔG_{obs} の変動に対して支配的であることが示唆される。ここで、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ の寄与が $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle$ の寄与よりも相対的に大きいことから、静電相互作用エネルギーのなかでも特に $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ の寄与が支配的となる。したがって、一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動に対して、両分子間における静電相互作用が支配的な役割を果たしている。

本節では、LERE-QSAR 解析に基づき一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式、すなわち静電相互作用が支配的な役割を果たしていることを定量的に明らかにした。次節では、この支配項に対する阻害剤の各部分構造の寄与について原子・電子レベルにおいて定量的に議論する。

表 4.4 複合体形成に伴う ΔG_{obs} および代表自由エネルギー項^a (hNEU2-シアル酸誘導体)

compound								
no.	name	ΔG_{obs}^b	ΔG_{calc}^c	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$	$\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle^d$	ΔG_{diss}	E_{corr}	electrostatic energy ^e
1	IEM	-4.33	-4.04	-78.27	79.45 (6.79)	0.00	-38.88	1.18
2	HEM	-4.44	-4.35	-85.77	78.82 (4.76)	0.00	-37.32	-6.95
3	DEM	-4.05	-4.37	-98.06	93.87 (7.66)	0.00	-40.34	-4.18
4	DANA	-5.47	-5.47	-154.28	123.44 (9.27)	0.00	-36.81	-30.84
5	zanamivir	-6.77	-6.68	-247.22	197.14 (7.71)	0.00	-43.03	-50.09
6	peramivir	-4.94	-5.09	-178.88	176.99 (4.89)	0.00	-57.83	-1.89
7	oseltamivir	-3.26	-3.26	-171.91	158.19 (4.71)	17.71	-43.96	-13.72
variance ^f				3224.49	2004.60	38.39	44.90	299.78

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln K_i$ ($T = 310 \text{ K}$).

^c Calculated from eq. (4.2).

^d Average value and standard deviation (in parentheses).

^e $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle$.

^f In $\text{kcal}^2/\text{mol}^2$.

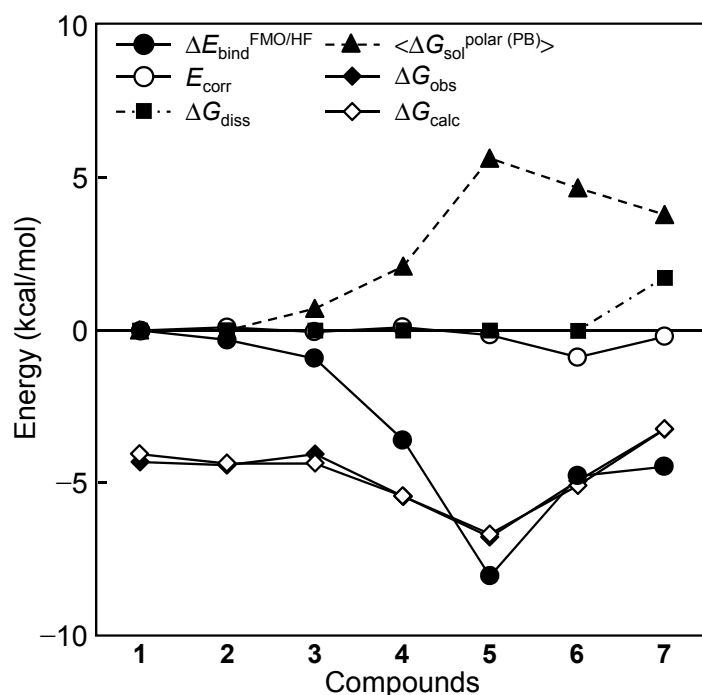


図 4.7 シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う各エネルギー項の変動
各代表自由エネルギー項は compound 1 を基準として表す。

4.3.3 阻害剤の各部分構造の全自由エネルギー変化に対する寄与

本節では、阻害剤であるシアル酸誘導体を3つのフラグメント (fragments **A**, **B**, **C**)に分割し (2.3.2.1.2 節, 図 2.5), 前節の LERE-QSAR 解析から明らかにした支配項である結合相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$)に対する各フラグメントの寄与およびそれらの全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})に対する寄与を定量的に明らかにする. 表 4.5 は, $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$, シアル酸誘導体と hNEU2 の各アミノ酸残基との間の結合相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy at HF level: IFIE_{HF})の総和 ($\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}$), 各フラグメントと hNEU2 の各アミノ酸残基との間の結合相互作用エネルギーの総和 ($\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}$, $\mathbf{X} = \mathbf{A}, \mathbf{B}, \mathbf{C}$)およびその和 ($\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}} = \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment A}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment B}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment C}}$)を示す.

表4.5 シアル酸誘導体と hNEU2 との間の結合相互作用エネルギー^a

compound		$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^b$	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X } c}$			$\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^d$
no.	name		non-divided	A	B	C	A + B + C
1	IEM	-78.27	-127.14	6.67	-122.74	-13.59	-129.67
2	HEM	-85.77	-135.42	-4.49	-119.18	-14.92	-138.59
3	DEM	-98.06	-147.10	-19.79	-115.44	-15.65	-150.87
4	DANA	-154.28	-221.88	-39.91	-156.69	-29.33	-225.93
5	zanamivir	-247.22	-334.86	-53.06	-123.61	-148.52	-325.19
6	peramivir	-178.88	-239.78	1.84	-124.63	-108.52	-231.30
7	oseltamivir	-171.91	-227.04	-1.84	-104.11	-118.64	-224.60
r^2^e		0.389	0.467	0.606	0.307	0.131	0.475
variance ^f		3224.49	4728.50	446.29	223.16	2942.76	4137.57
contribution ^g				9.4	4.7	62.2	

^a In kcal/mol.

^b Summation of IFIE_{HF} for a non-divided ligand over all the amino acid residues in hNEU2.

^c Summation of $\text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}$ for $\mathbf{X} = \mathbf{A}, \mathbf{B},$ and \mathbf{C} over all the amino acid residues in hNEU2.

^d $\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}} = \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment A}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment B}} + \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment C}}$.

^e Coefficient of determination for ΔG_{obs} .

^f In $\text{kcal}^2/\text{mol}^2$.

^g $\text{Var.}[\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}]/\text{var.}[\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}]$ for $\mathbf{X} = \mathbf{A}, \mathbf{B},$ and \mathbf{C} (in %).

下式 (4.6)および(4.7)に示すように、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ は $\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}$ と良好に線形かつ *slope* も 1 に近く ($r = 0.996$, $\text{slope} = 0.823$, 式 (4.6)), シアル酸誘導体を 3 つのフラグメントに分割した場合においても、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ と $\Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}$ との間に良好な線形関係 ($r = 0.993$, $\text{slope} = 0.877$, 式 (4.7))が存在することから、各フラグメントの寄与についての定量的な議論が可能となる。

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} = 0.823 \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}} + 23.6 \quad (4.6)$$

$$n = 7, r = 0.996, s = 5.63, F = 706$$

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} = 0.877 \Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}} + 33.8 \quad (4.7)$$

$$n = 7, r = 0.993, s = 7.72, F = 373$$

図 4.8 は、 ΔG_{obs} と $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ ($\approx \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}} \approx \Sigma \Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}$)との間の相関 (決定係数)および $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}}$ の変動に対する寄与 (割合)を各フラグメントについて示しているが、相関が最大であるのは **fragment A** 部位、一方で、変動に対する寄与が最大であるのは **fragment C** 部位であることが確認できる。

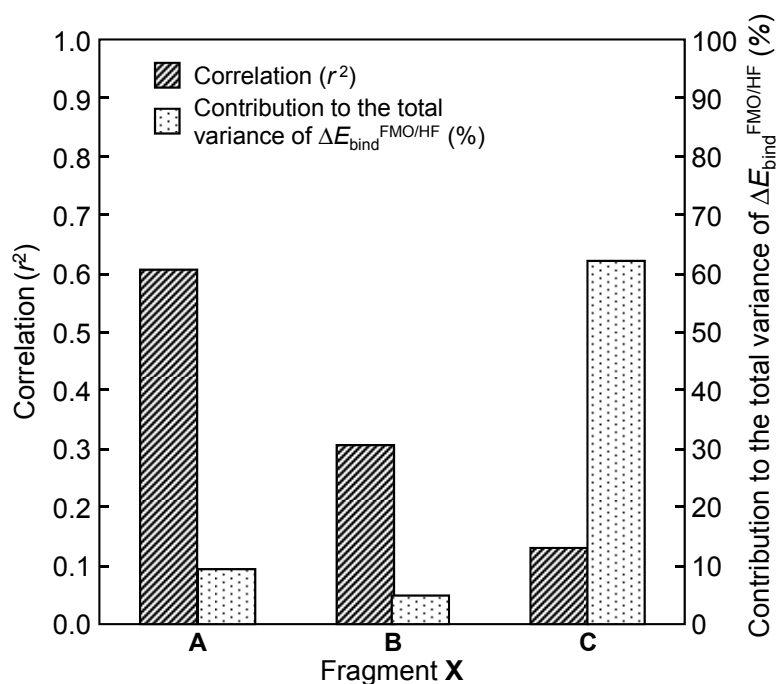


図 4.8 阻害剤と hNEU2 の相互作用における各部分構造の寄与
X は阻害剤を 3 つのフラグメントに分割した場合の部分構造 A, B および C に対応する。

最大の相関を示すシアル酸誘導体の fragment A 部位とその近傍に位置するアミノ酸残基 (pocket A: Glu111, Tyr179, Tyr181, Leu217, Glu218, Gln270, pocket B: Arg237) との間の $\text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment A}}$ を図 4.9 (a) に示す. Fragment A 部位に hydroxyl 基を有していない側鎖基 ($R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, \text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2, \text{OCH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) をもつ compounds 1, 6, 7 においては、大きな相互作用エネルギーは確認されないが、fragment A 部位に hydroxyl 基を有する側鎖基をもつ化合物のなかで、glycerol 基 ($R_1 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$) をもつ compounds 4, 5 は Glu111 や Glu218 との間の水素結合による安定化相互作用エネルギーが確認される (図 4.5 (a), (b), 図 4.9 (a)). 特に、Glu111 との間の水素結合による安定化相互作用エネルギーの程度およびその化合物間の変動は、fragment A が担う相互作用のなかで最大である。すなわち、一連のシアル酸誘導体のなかで compounds 4, 5 が高い阻害活性値を示すのは、これらが fragment A 部位に有する glycerol 基における hydroxyl 基が、Glu111 を含む pocket A のアミノ酸残基との間で、効果的かつ強力な水素結合を形成できることに起因している。一方で、最大の変動を示すシアル酸誘導体の fragment C 部位とその近傍に位置するアミノ酸残基 (pocket C: Glu39, Arg41, Lys44, Lys45, Asp46, Glu47, Asn86, W2) との間の $\text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment C}}$ を図 4.9 (b) に示す. Fragment C 部位に中性の hydroxyl (OH) 基を有する compounds 1-4 においては、Arg41 との間の水素結合による安定化相互作用エネルギーが確認されるものの、その他の大きな相互作用エネルギーを示すアミノ酸残基は確認されない (図 4.5 (a), 図 4.9 (b)). 一方で、塩基性官能基 (amino (NH_3^+), guanidino

(NHC(=NH₂⁺)NH₂)基を有する compounds 5-7 は Glu39 や Asp46 との間の水素結合による大きな安定化相互作用エネルギー, Arg41 との間では静電反発相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが確認される (図 4.5 (b), (c), (d), 図 4.9 (b)). 概して, amino および guanidino 基の方が hydroxyl 基と比べて結合に有効に働いている. すなわち, fragment C が最大の変動を示すのは, DANA とその誘導体 (compounds 1-4) が有する中性の hydroxyl 基と抗インフルエンザ剤 (compounds 5-7) が共通に有する amino あるいは guanidino 基の相互作用の差に起因すると考えられる.

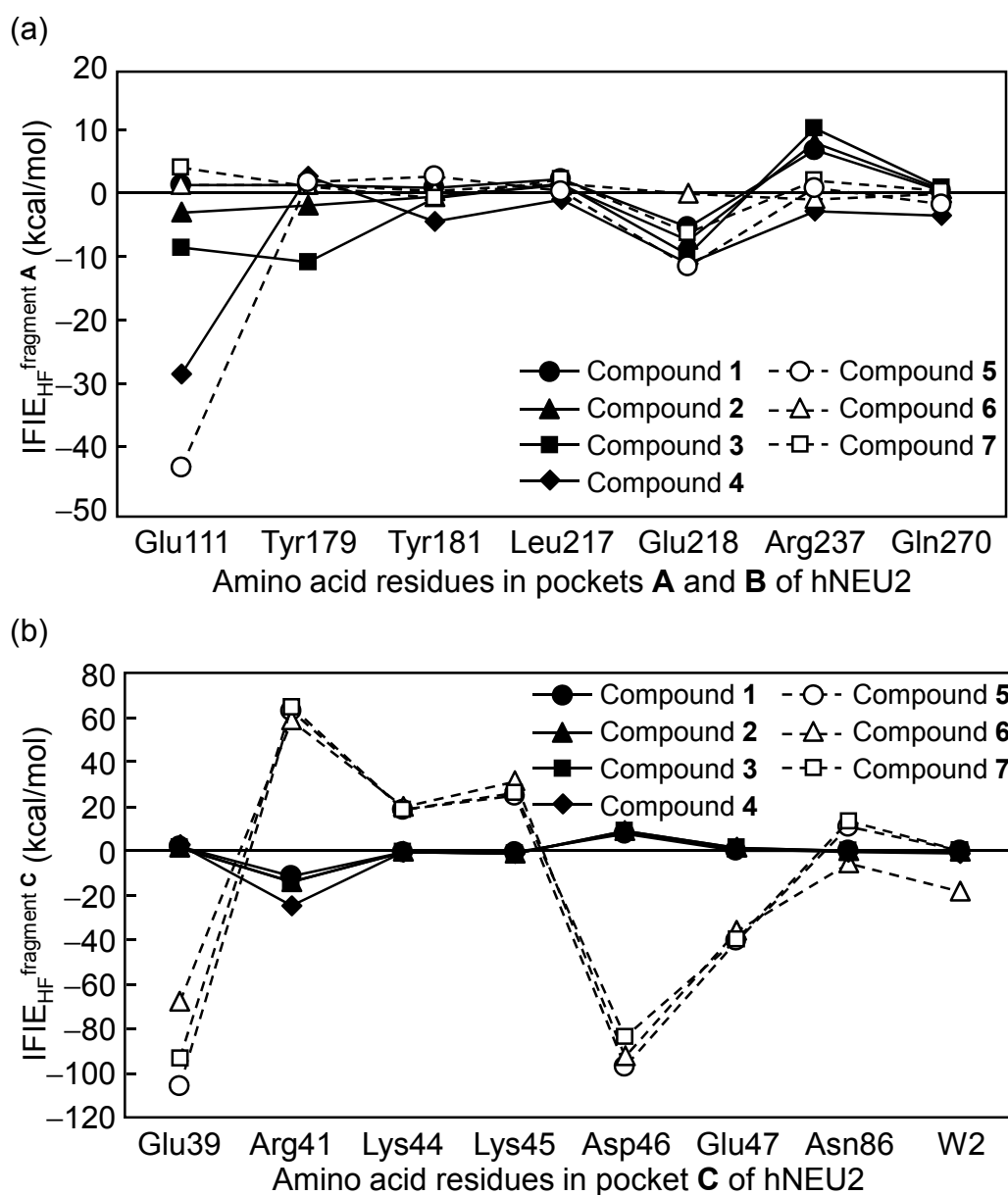


図 4.9 シアル酸誘導体と hNEU2 のアミノ酸残基との間の IFIE_{HF}
 (a) Fragment A 部位の近傍の相互作用, (b) Fragment C 部位の近傍の相互作用.

以上より、一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、両分子間において特に fragment A とその近傍の pocket A のアミノ酸残基との間の水素結合ないしは静電相互作用により支配されていると結論づけられる (図 4.10).

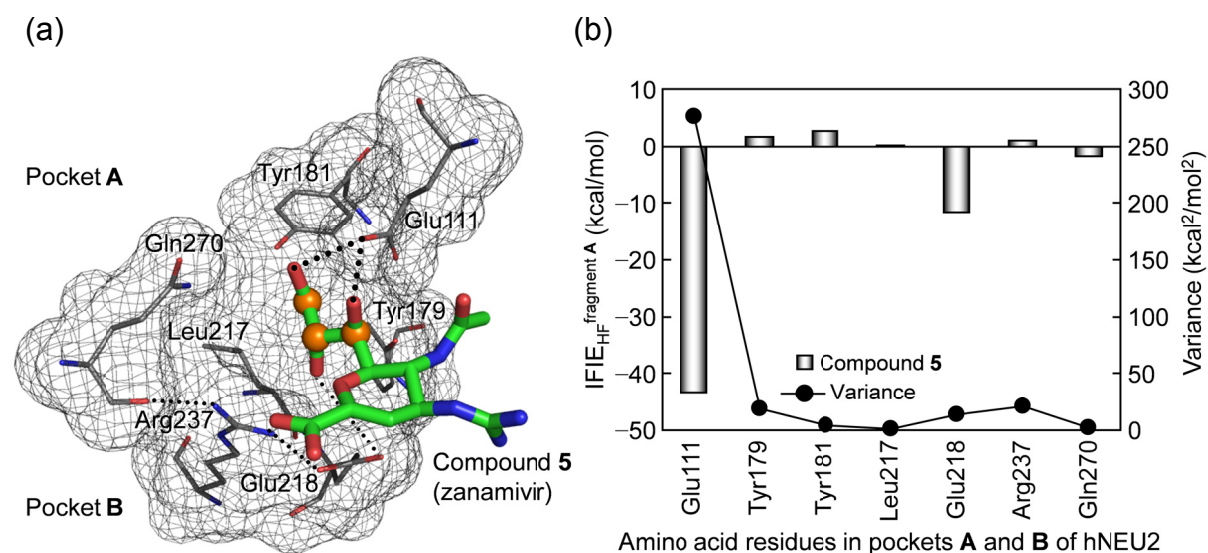


図 4.10 阻害活性値の変動を支配する相互作用様式 (hNEU2-compound 5)

(a) Compound 5 (zanamivir) の fragment A とその近傍のアミノ酸残基との間の相互作用, (b) Fragment A との間の $IFIE_{HF}^{\text{fragment A}}$ とその化合物間の変動.

4.3.4 ヒト (hNEU2) およびインフルエンザウイルス (N1-NA) の比較解析

4.3.4.1 Oseltamivir の結合選択性の違い

現在、臨床において最も使用されている代表的な抗インフルエンザ剤である oseltamivir (Tamiflu) は、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼを選択的に阻害する目的で開発されていることから、ヒト・ノイラミニダーゼに対する阻害効果は小さいことが期待される。実際、oseltamivir のヒト (hNEU2) に対する阻害効果は、インフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ -1 (N1-NA) に対するそれと比べた場合、有意に小さいことが報告されている (hNEU2: $K_i = 5 \times 10^6$ (nM) [244], N1-NA: $IC_{50} = 0.45$ (nM) [251])。本節では、oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する結合選択性の違いを、hNEU2 および前章の N1-NA の解析結果に基づき定量的に明らかにする。

図 4.11 は、hNEU2-oseltamivir および N1-NA-oseltamivir の複合体における活性部位近傍の相互作用様式を示す。Arginine triad (hNEU2: Arg21, Arg237, Arg304, N1-NA: Arg118, Arg292, Arg371) などの pocket B のアミノ酸残基は両者において高度に保存されているが、

pockets **A**, **C** のアミノ酸残基は異なっていることを確認できる。Oseltamivir と各アミノ酸残基との間の相互作用エネルギーの観点においては, amino 基を有する fragment **C** と pocket **C** のアミノ酸残基との間の水素結合ないしは静電相互作用エネルギーの方が, alkoxy 基を有する fragment **A** と pocket **A** のアミノ酸残基との間の分散相互作用エネルギーに比べて, oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する結合選択性を担う要因になると考えられる。実際, oseltamivir を 3 つのフラグメントに分割し (図 2.5), 各部分構造の hNEU2 および N1-NA に対する結合相互作用エネルギーを比べた場合, fragments **A**, **B** が担う結合相互作用エネルギーの差に比べて, fragment **C** が担う結合相互作用エネルギーにおいて大きな差が確認できる (表 4.6)。

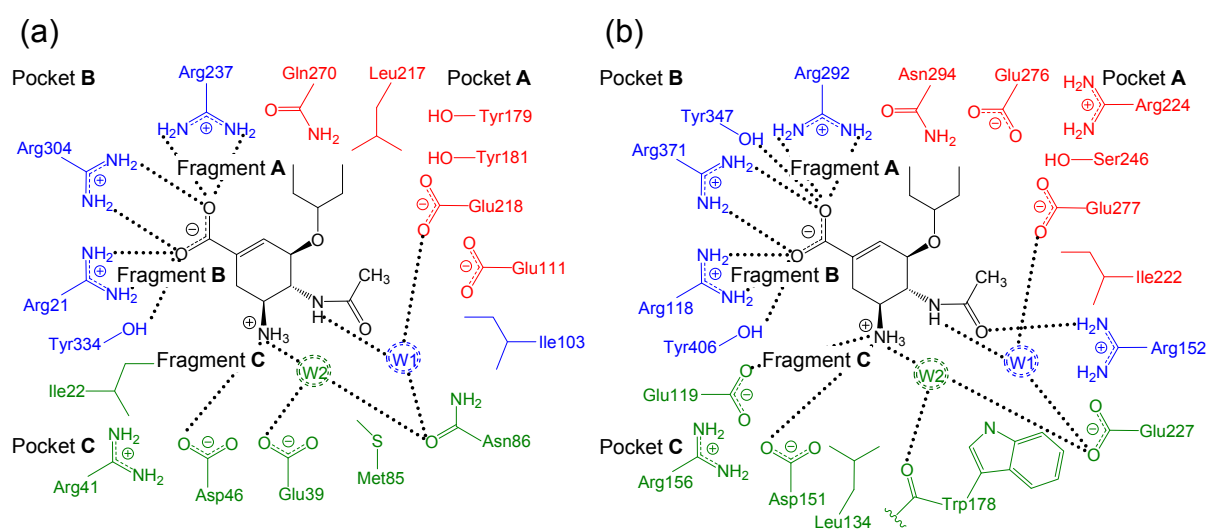


図 4.11 Oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する相互作用様式

(a) hNEU2-oseltamivir の複合体, (b) N1-NA-oseltamivir の複合体. W1 および W2 は水分子を, pockets **A**, **B**, **C** は, それぞれ fragments **A**, **B**, **C** の近傍のアミノ酸残基を表す。

表4.6 Oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する結合相互作用エネルギー^a

complex	ΔG_{obs}	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X } b}$		
		A	B	C
hNEU2-oseltamivir	-3.26 ^c	-1.84	-104.11	-118.64
N1-NA-oseltamivir	-13.26 ^d	-9.32	-112.69	-157.09
difference	9.99	7.48	8.57	38.45

^a In kcal/mol.

^b Summation of $\text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}$ for **X** = **A**, **B**, and **C** over all the amino acid residues in neuraminidase.

^c $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln K_i$ ($T = 310 \text{ K}$). K_i value is taken from ref. 244.

^d $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln \text{IC}_{50}$ ($T = 310 \text{ K}$). IC_{50} value is taken from ref. 251.

図 4.12 は, oseltamivir の fragment C 部位 (amino 基)とその近傍に位置する pocket C のアミノ酸残基 (hNEU2: Ile22, Arg41, Asp46, Glu39, Met85, Asn86, W2, N1-NA: Glu119, Arg156, Asp151, Leu134, Trp178, Glu227, W2)との間の $IFIE_{HF}^{\text{fragment C}}$ を示す. Oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する共通した相互作用として, Asp46, W2 (hNEU2)および Asp151, W2 (N1-NA)との間の水素結合による安定化相互作用エネルギー, Arg41 (hNEU2) および Arg156 (N1-NA)との間の静電反発相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが確認できるが (図 4.11, 図 4.12), これら共通した相互作用は oseltamivir の両者に対する結合選択性を担う要因ではないと考えられる. 一方で, Ile22, Glu39, Asn86 (hNEU2)および Glu119, Leu134, Glu227 (N1-NA)との間には, 両者において相互作用エネルギーの差が確認される. Fragment C と N1-NA の酸性アミノ酸残基 (Glu119, Glu227)との間の水素結合ないしは静電相互作用エネルギーは, 対応する hNEU2 の中性アミノ酸残基 (Ile22, Asn86)との間のそれらと比べてより安定化に寄与している. 一方で, hNEU2 の酸性残基 (Glu39)においては, 対応する N1-NA の中性残基 (Leu134)の間では確認されない静電相互作用エネルギーによる安定化が確認されるが, その安定化の程度は上述の N1-NA の酸性残基 (Glu119, Glu227)との安定化ほどではない. したがって, fragment C とその近傍の pocket C のアミノ酸残基との間の水素結合ないしは静電相互作用エネルギーの違いが, oseltamivir がヒト (hNEU2)よりもインフルエンザウイルス (N1-NA)に対して強い結合選択性を示す主要な要因であると結論づけられる.

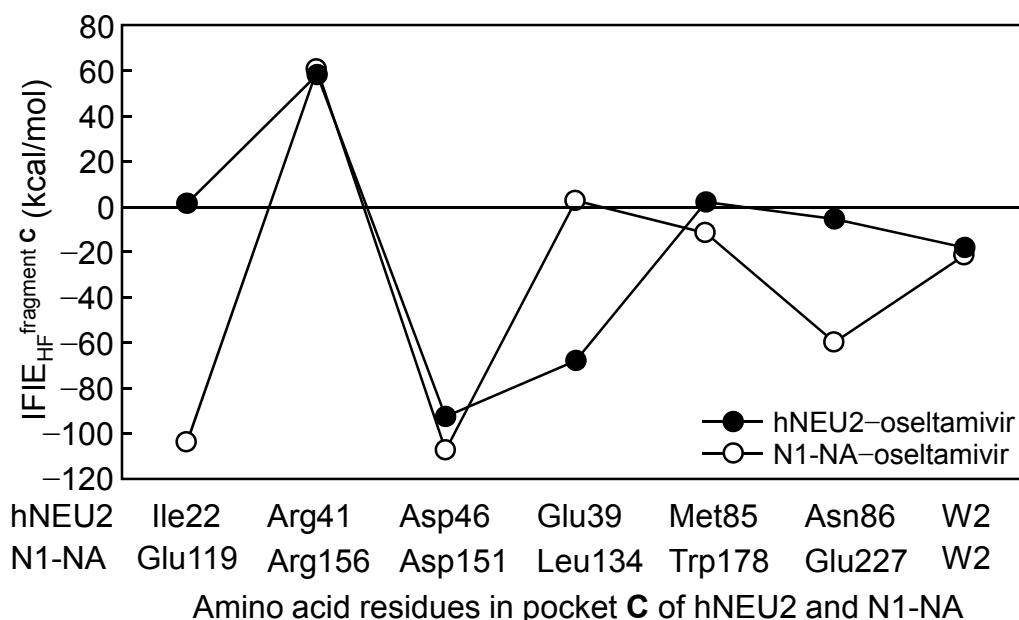


図 4.12 Oseltamivir の fragment C と pocket C (hNEU2, N1-NA)との間の結合相互作用エネルギー

4.3.4.2 LERE-QSAR 式に基づくシアル酸誘導体の阻害メカニズムの理解

本章および前章では、ノイラミニダーゼ (ヒト: hNEU2, インフルエンザウイルス: N1-NA)と一連のシアル酸誘導体との複合体について、分子科学計算に基づく LERE-QSAR 解析を行った。両解析ともに、構築した LERE-QSAR 相関式 ((4.2): hNEU2, (3.10): N1-NA)に基づき、一連のシアル酸誘導体とノイラミニダーゼの複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動を支配する相互作用様式を、物理化学的な意味づけとともに原子・電子レベルで定量的に明らかにした。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0476 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle) + 0.0976 \Delta G_{\text{diss}} - 2.25 \quad (4.2)$$

$n = 7, r = 0.985, s = 0.237 \text{ kcal/mol}, F = 65.5$

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.561 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}) + 0.0708 \Delta G_{\text{diss}} + 25.4 \quad (3.10)$$

$n = 8, r = 0.988, s = 0.389 \text{ kcal/mol}, F = 98.5$

相関式 (4.2)および(3.10)において、右辺の第一項の係数 ($\gamma_1 = (1 + \beta)(1 - \alpha)$)および切片 ($const_3$)の値は異なる (式 (2.6)における γ_1 および $const_3$ にそれぞれ対応する)。ここで、LERE 仮定 (式 (2.2): $\Delta G_{\text{others}} = \beta (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + const_1$)における β および $const_1$ は、式 (2.4)ならびに(2.6)における $\alpha, \gamma_1, const_2$ および $const_3$ を用いて、それぞれ $(\alpha + \gamma_1 - 1)/(1 - \alpha)$ および $(const_2 + const_3)/(1 - \alpha)$ と表される。また、entropy-enthalpy 補償則 (式 (2.4): $T\Delta S_{\text{obs}} = \alpha \Delta H_{\text{obs}} + const_2$)における α ($const_2$)を、Schwarzら [49]の ITC の実測結果に基づき 0.678 (2.59)とした場合 (図 2.2 (a)), hNEU2 および N1-NA の解析系における β ($const_1$)は、それぞれ-0.852 (1.06)および 0.739 (86.7)となり、 ΔG_{others} は下式で表される (式 (4.8)および(4.9))。

$$\Delta G_{\text{others}} = -0.852 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle) + 1.06 \quad (4.8)$$

$$\Delta G_{\text{others}} = 0.739 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + E_{\text{corr}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}}) + 86.7 \quad (4.9)$$

式 (4.8)において、 β は負の値および切片は比較的小さな値を示すことから、一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成過程では、 ΔG_{others} は代表自由エネルギーの和 (ΔG_{rep})と逆相関関係にある penalty energy として作用しており、このことは ΔG_{obs} の変動を支配する静電相互作用が活性部位のみならず hNEU2-シアル酸誘導体の系全体の変化に関連していることを示唆している (図 4.13 (a))。一方で、式 (4.9)において、 β は正の値および切片は比較的大きな正の値を示すことから、 ΔG_{others} は化合物によらずほぼ一定の penalty energy として働き、これは一連のシアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動を支配する分散相互作用が活性部位近傍において働く短距離相互作用によるためと考えられる (図

4.13 (b)). 期待されるように, ΔG_{others} は両解析系において penalty energy として作用しているが, その振る舞いは ΔG_{obs} の変動を支配する相互作用に依存していることを定量的に明らかにした [21].

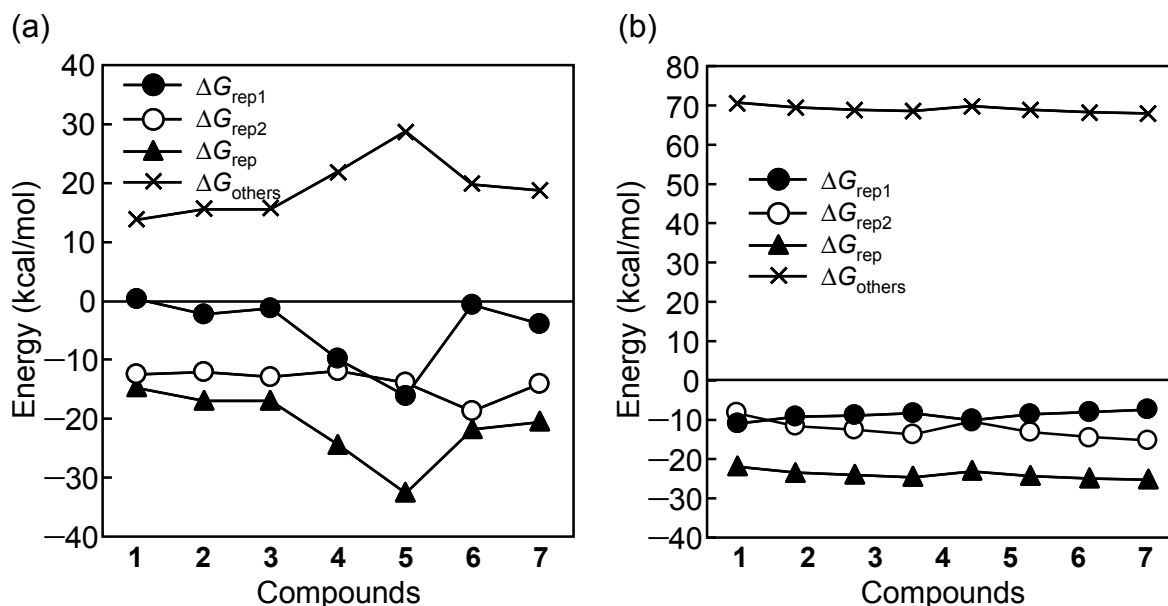


図 4.13 Penalty energy 項 ΔG_{others} の作用

(a) hNEU2 ($\Delta G_{\text{rep1}} = (1 - \alpha) (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (PB)}} \rangle + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}})$, $\Delta G_{\text{rep2}} = (1 - \alpha) E_{\text{disp}}$, $\Delta G_{\text{rep}} = \Delta G_{\text{rep1}} + \Delta G_{\text{rep2}}$, $\Delta G_{\text{others}} = \beta \Delta G_{\text{rep}} + \text{const}_1$, $\alpha = 0.678$, $\beta = -0.852$, $\text{const}_1 = 1.06$), (b) N1-NA ($\Delta G_{\text{rep1}} = (1 - \alpha) (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{FMO/HF}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (CPCM-Bondi/PB)}} + \gamma_2 \Delta G_{\text{diss}})$, $\Delta G_{\text{rep2}} = (1 - \alpha) E_{\text{disp}}$, $\Delta G_{\text{rep}} = \Delta G_{\text{rep1}} + \Delta G_{\text{rep2}}$, $\Delta G_{\text{others}} = \beta \Delta G_{\text{rep}} + \text{const}_1$, $\alpha = 0.678$, $\beta = 0.739$, $\text{const}_1 = 86.7$).

4.3.5 Oseltamivir 服用後の副作用と hNEU2 の遺伝的多型との関連性

近年, 特に oseltamivir (Tamiflu)服用後の精神・神経症状の有害事象が報告されており, 懸念される原因の一つとして, hNEU への影響が指摘されているが, oseltamivir が N1-NA に対して強い結合選択性を示すという前節の解析結果からは, この可能性については結論づけ難い. 一方で, Li ら [252]はアジア人に多い hNEU2 の遺伝的多型 (Arg41Gln 変異型 hNEU2)においては, oseltamivir の阻害効果が野生型 hNEU2 に比べて増大することを見出している (野生型 hNEU2: $K_i = 0.432$ (mM), Arg41Gln 変異型 hNEU2: $K_i = 0.175$ (mM)). この Arg41Gln 変異に伴う oseltamivir の感受性の増大は, 変異したアミノ酸残基 (Arg41Gln) の近傍の相互作用, すなわち oseltamivir の fragment C (amino 基)部位が担う相互作用が重要になると考えられる. 実際, 表 4.7 に示すように fragment C の野生型および変異型 hNEU2 に対する結合相互作用の予測エネルギーにおいて, 大きな差が確認できる.

表4.7 Oseltamivir の野生型および変異型 hNEU2 に対する結合相互作用エネルギー^a

complex	ΔG_{obs}^c	$\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X } b}$		
		A	B	C
hNEU2 (wild-type)-oseltamivir	-4.77	-1.84 (-0.09 ^d)	-104.11 (-4.95 ^d)	-118.64 (-5.64 ^d)
hNEU2 (Arg41Gln mutant)-oseltamivir	-5.33	-1.39 (-0.07 ^d)	-94.74 (-4.51 ^d)	-148.95 (-7.08 ^d)
difference	0.56	-0.46 (-0.02 ^d)	-9.38 (-0.45 ^d)	30.31 (1.44 ^d)

^a In kcal/mol.

^b Summation of $\text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}$ for **X = A, B, and C** over all the amino acid residues in neuraminidase.

^c $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln K_i$ ($T = 310 \text{ K}$). K_i value is taken from ref. 252.

^d The value of $\Sigma \text{IFIE}_{\text{HF}}^{\text{fragment X}}$ multiplied by γ_1 ($= 0.0476$ obtained from eq. (4.2)).

図 4.14 に示すように、特に fragment C と Arg41 との間の静電反発相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが、Gln への変異によって消失し、その結果として変異型 hNEU2 に対する阻害効果が増大することが示唆される。しかしながら、hNEU2 は骨格筋にのみ発現するという報告 [253] もあり、oseltamivir による hNEU2 の阻害が精神・神経症状などの中枢性の有害事象に直接的に関与しているとは考えにくい。したがって、oseltamivir 服用後の有害事象については、既知の hNEU への影響よりも、中枢性の症状を生じた患者における未知の hNEU の存在の有無についての検証やインフルエンザ自体に伴い発現する症状の一つとして捉えるなどの今後さらなる検討が必要であると考えられる。

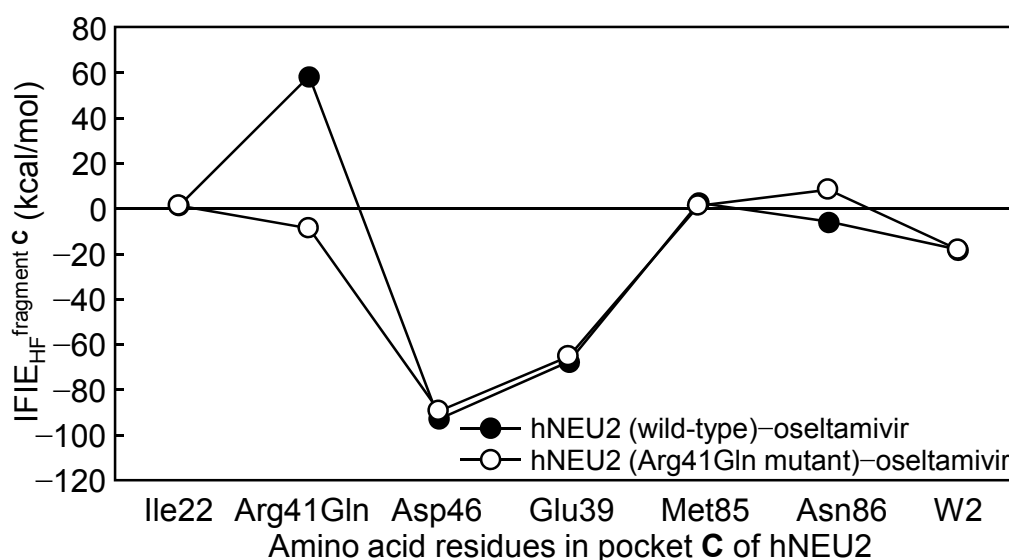


図 4.14 Fragment C (oseltamivir) と pocket C (hNEU2 (wild-type, Arg41Gln mutant)) との間の結合相互作用エネルギー

4.4 小括

本章では、ヒトの hNEU2 と代表的な抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体の複合体について、FMO 法等による分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析を行った。その結果、シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式を、物理化学的な意味づけとともに定量的に明らかにした。すなわち、両分子間に働く静電相互作用が実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動と良好な線形関係にあること、さらに、oseltamivir (Tamiflu) の hNEU2 および N1-NA に対する相互作用において、特に oseltamivir の amino 基とその近傍に位置するアミノ酸残基との間の静電相互作用エネルギーの違いが、oseltamivir の結合選択性に大きく寄与していることを定量的に明らかにした。

一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成において、水素結合ないしは静電相互作用に基づくエネルギーの寄与は大きいものの、前章の N1-NA の解析結果と同様に、結合相互作用エネルギーと水和自由エネルギー変化との間に良好な逆相関関係が成立する結果として、互いの寄与は減弱していた。しかしながら、これら静電相互作用エネルギーの寄与は分散相互作用エネルギーの寄与に比べて相対的に大きいことから、静電相互作用エネルギーが全自由エネルギー変化の変動の支配要因である。なかでも、結合相互作用エネルギーの寄与が実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する主要なエネルギー成分である。特に、fragment A と pocket A のアミノ酸残基 (Glu111) との間の効果的かつ強力な水素結合ないしは静電相互作用が重要であること、また、抗インフルエンザ剤が共通に有する塩基性官能基 (fragment C: amino, guanidino 基) は、hNEU2 の pocket C のアミノ酸残基 (Glu39, Asp46) との間の相互作用においても、結合に有効に働いていることを定量的に明らかにした。

Oseltamivir の fragment C (amino 基) と hNEU2 および N1-NA の pocket C のアミノ酸残基との間の相互作用において、両者に対する結合の共通安定化に寄与するアミノ酸残基 (hNEU2: Asp46, N1-NA: Asp151) および不安定化に寄与するアミノ酸残基 (hNEU2: Arg41, N1-NA: Arg156) を特定した。一方で、両者に対する結合相互作用において、その差を担うアミノ酸残基 (hNEU2: Ile22, Glu39, Asn86, N1-NA: Glu119, Leu134, Glu227) を特定したが、これらのアミノ酸残基との間の静電相互作用エネルギーの違いが oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する結合選択性に大きく寄与していることを定量的に明らかにした。

Oseltamivir 服用後の精神・神経症状の有害事象については、遺伝的多型 (Arg41Gln 変異型 hNEU2) の関与が考えられ、この実測結果を裏付ける理論からの解析結果を得ることができた。一方で、hNEU2 の組織局在性の観点からは、oseltamivir による hNEU2 の阻害が中枢性の有害事象に直接的に関与しているとは考えにくいと、今後その他の可能性についても検討する必要がある。

第5章 ホモロジーモデリングに基づくヒト・ノイラミニダーゼ-1の3次元立体構造の構築と LERE-QSAR 解析による構造妥当性評価

5.1 序論

前章で述べたように、現在までに4種類のヒト・ノイラミニダーゼ (human neuraminidase: hNEU)が同定・特徴づけられているが、なかでもヒト・ノイラミニダーゼ-1 (hNEU1)はリソソーム性のノイラミニダーゼであり、その遺伝子は主要組織適合複合体に関連したノイラミニダーゼとして同定された [235, 254, 255]. hNEU1 については、リソソーム内で保護タンパク質であるヒト・カテプシン A (human cathepsin A: hCath A (or protective protein/cathepsin A: PPCA), EC3.4.16.5)や β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase: β -Gal, EC3.2.1.23)と多酵素複合体を形成することで酵素活性を発現すること (図 5.1) [256–261], また、この複合体の解離は hNEU1 の活性消失を引き起こすことなどが明らかにされている. そのため、hNEU1 は神経変性リソソーム蓄積症であるシアリドーシスおよびガラクトシアリドーシス (常染色体劣性遺伝病)の標的タンパク質として広範に研究されている.

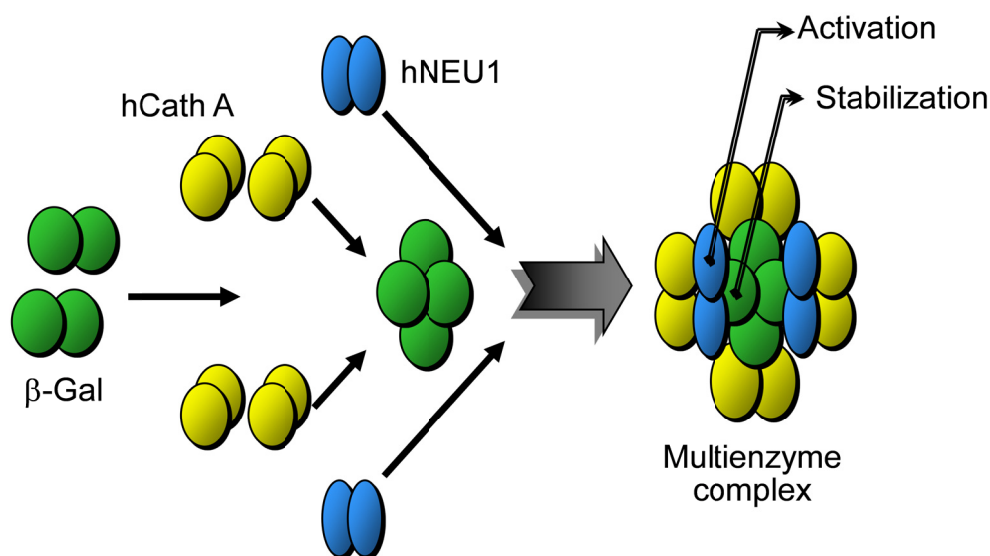


図 5.1 多酵素複合体の形成による hNEU1 の酵素活性発現機構

シアリドーシスは、hNEU1 自身の遺伝子変異に基づく酵素活性の低下が主な原因であり、進行性の生体内基質の過剰蓄積と代謝異常を生じる [235, 262–264]. 一方で、ガラクトシアリドーシスは、hCath A の機能消失に伴う β -Gal との多酵素複合体の形成異常がその主な

原因と考えられている (図 5.2) [256, 265]. ガラクトシアリドーシスは、小脳性失調、ミオクロームスなどの中枢神経症状をはじめ、肝脾腫、骨格異常、心症状などの様々な臨床症状を呈するが、これらはシアリドーシスの臨床症状ときわめてよく類似しており、その病態は主に hNEU1 の酵素活性の低下と欠損に相関することが知られている。また、ガラクトシアリドーシスでは遺伝子変異の種類により臨床症状が異なり、その臨床型は早期乳児型、晩期乳児型および若年/成人型などに分類されるが [265], このうち若年/成人型の症例の約 6 ~ 7 割が日本人であるのもその特徴の一つである。このように、リソソーム病についての病理学的ならびに病態生理学的知見は多く、また、遺伝子治療、骨髄・臓器や細胞の移植治療、酵素補充療法などの研究開発が進められてはいるものの、根本的な治療法の確立には至っていない。その原因の一つとして、hNEU1 の 3 次元立体構造は現在までに解明されておらず、hCath A や β -Gal との多酵素複合体の形成機構およびその機能調節などの酵素活性の発現メカニズムに関する詳細な解析が進んでいないことが挙げられる。

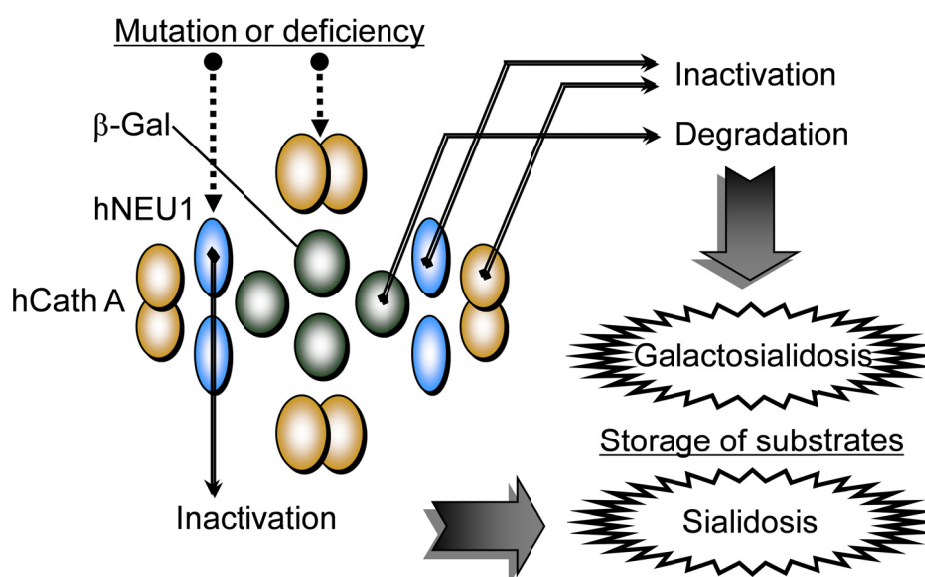


図 5.2 シアリドーシスおよびガラクトシアリドーシスの発症機構

hNEU1-4 は、いずれもノイラミダーゼが一般にもつ特徴的なアミノ酸配列 (arginine triad [266], Asp box (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp) [267-269] および RIP motif (Phe (Tyr)-Arg-Ile-Pro) [270]) を有しているが (表 5.1), hNEU1-4 同士のアミノ酸残基の配列相同性はそれほど高くない (表 5.2). 特に、hNEU1 と hNEU2-4 との間の相同性の平均値 (identity: 23.2 (\pm 0.4)%, similarity: 35.6 (\pm 2.2)%) は、hNEU2-4 同士のそれ (identity: 33.9 (\pm 5.2), similarity: 44.4 (\pm 6.3)) と比べて有意に低いことから、hNEU1 の立体構造は hNEU2-4 のそれらと有意に異なる可能性が示唆される。立体構造未知な hNEU1 の 3 次元立体構造

をホモロジーモデリングにより構築し、その hNEU1 の予測モデル構造を用いた解析がこれまでに報告されている [261, 271–276]. これらは、多酵素複合体における hCath A との会合面の予測 [261], シアル酸誘導体の hNEU1 に対する結合相互作用解析 [271], hNEU1 のアミノ酸変異が多酵素複合体の形成に与える影響の解析 [272–275], *N*-結合糖鎖付加が hNEU1 の酵素活性へ与える影響の解析 [276]などである. いずれのホモロジーモデリングにおいても、参照タンパク質 (template)として、ヒトにおいて唯一その 3 次元立体構造が明らかとなっている hNEU2 (PDB code: 1VCU)および細菌 (*Micromonospora viridifaciens* (1EUR), *Salmonella typhimurium* (2SIL), *Vibrio cholera* (1KIT))のノイラミニダーゼの立体構造がよく用いられている. これら template は、ノイラミニダーゼに特徴的なアミノ酸配列を有するが (表 5.1), hNEU1 との間の同一残基率 (identity: 22.5 (±5.1)%)は低く (表 5.2), ホモロジーモデリングにおいて一般に必要とされる相同性の基準値 (> 50%)を超えていないため [277–279], 構築した hNEU1 の予測モデル構造の妥当性については議論の余地がある.

表 5.1 hNEU1–4 および細菌のノイラミニダーゼのアミノ酸配列の特徴

	hNEU1	hNEU2	hNEU3	hNEU4	<i>M.</i> <i>viridifaciens</i> ^a	<i>S.</i> <i>typhimurium</i> ^b	<i>V.</i> <i>cholerae</i> ^c
accession no. (PDB code)	Q99519	Q9Y3R4 (1VCU)	Q9UQ49	Q8WWR8	Q02834 (1EUR)	P29768 (2SIL)	POC6E9 (1KIT)
number of amino acids	415	380	428	496 (484)	647	382	781
arginine triad	78, 280, 341	21, 237, 304	25, 245, 340	23, 242, 389	68, 276, 342	37, 246, 309	224, 635, 712
Asp box ^d	114–121, 174–181, 233–240, 349–356	129–136, 199–206, 248–255	131–138, 205–212, 256–263	129–136, 202–209, 253–260	104–111, 177–184, 241–248, 289–296, 350–357	73–80, 147–154, 212–218, 256–263	265–272, 587–594, 655–662, 720–727
RIP motif ^e	77–80	20–23	24–27	22–25	67–70	36–39	223–226
signal peptide	1–47				1–37		1–24
internalization signal	412–415						

^a *Micromonospora viridifaciens*.

^b *Salmonella typhimurium*.

^c *Vibrio cholerae*.

^d Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp.

^e Phe (Tyr)-Arg-Ile-Pro.

表 5.2 hNEU1-4 および細菌のノイラミニダーゼのアミノ酸配列の同一性^a および類似性^b

Sequence identity and similarity							
(identity, similarity)	hNEU1	hNEU2 (1VCU ^c)	hNEU3	hNEU4	<i>M.</i>	<i>S.</i>	<i>V.</i>
					<i>viridifaciens</i> (1EUR ^c)	<i>typhimurium</i> (2SIL ^c)	<i>cholera</i> (1KIT ^c)
hNEU1		32.9	38.3	35.5	41.2	22.6	34.4
hNEU2 (1VCU ^c)	22.7		42.2	38.0	29.7	18.0	29.5
hNEU3	23.5	31.2		52.9	36.5	23.7	32.8
hNEU4	23.5	29.2	41.2		32.5	24.5	30.9
<i>M. viridifaciens</i> (1EUR ^c)	29.8	21.6	23.3	22.4		22.7	36.0
<i>S. typhimurium</i> (2SIL ^c)	21.9	17.8	18.2	17.1	21.2		24.4
<i>V. cholera</i> (1KIT ^c)	15.4	11.3	13.9	15.6	14.8	14.3	

^a Identity (%), lower-left triangle).

^b Similarity (%), upper-right triangle).

^c PDB code.

ホモロジーモデリングにより構築した予測モデル構造の妥当性評価については、構造の立体化学的な質の評価、タンパク質の主鎖二面角の評価、各アミノ酸残基が置かれている環境の評価などが一般に行われるが、リガンドが結合する活性部位近傍の評価についてはこれらの評価のみでは十分ではないと考えられる。一方で、前章でも述べたように、代表的な抗インフルエンザ剤である neuraminidase (NA) 阻害剤のヒトへの影響の懸念から、NA 阻害剤の hNEU に対する阻害効果の検討が行われており [241–248]、本章の解析対象である hNEU1 に対しても、少数であるが報告されている [241–243, 248]。そこで、これら hNEU1 に対する阻害活性データを用いる QSAR 手法に基づき、その予測モデル構造の妥当性を評価することが必要と考えられる。

本章では、3次元立体構造が未知である hNEU1 の立体構造を、ホモロジーモデリング手法を用いて構築し、さらにその hNEU1 の予測モデル構造と抗インフルエンザ剤を含むシアル酸誘導体との複合体構造を構築した。この複合体について、分子科学計算ならびに第3章のインフルエンザウイルス・ノイラミニダーゼ-1 (N1-NA) および第4章のヒト・ノイラミニダーゼ-2 (hNEU2) の解析結果と対照させた自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE-QSAR) 解析 [16–21] から、hNEU1 の予測モデル構造の妥当性評価を行った。

上記の検討の結果、hNEU1 の予測モデル構造は、(1) 実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動を説明可能な妥当な構造であること、(2) 抗インフルエンザ剤を含むシアル酸誘導体の活性発現メカニズムを原子・電子レベルで理解するうえで有用となることを明らかにしたのでそれらを中心に以下に述べる [20]。

5.2 解析方法

5.2.1 ホモロジーモデリングによる hNEU1 の 3 次元立体構造構築

ホモロジーモデリングは、立体構造未知のタンパク質 (target) の 3 次元立体構造を立体構造既知のタンパク質 (template) の構造情報に基づき予測する手法である。この手法は、進化的類縁関係にあるタンパク質同士では類似する立体構造と生化学的機能は保存されるという経験則に基づいている。そのため、target と template との間の相同性 (identity) が 25 ~ 30% 程度以上の場合には有効であるが、相同性が低い template を用いた場合、その精度は悪くなる。一般に、ホモロジーモデリングは、(1) template 検索、(2) 立体構造構築、(3) 立体構造評価の 3 つのステップに従って行われる。ホモロジーモデリング手法に基づく hNEU1 の 3 次元立体構造構築における各ステップについては、以下において説明する。

hNEU1 のホモロジーモデリングに必要な template 検索の前段階として、ノイラミニダーゼの立体構造情報の収集を research collaboratory for structural bioinformatics PDB (RCSB-PDB) にて行った。検索クエリーを“neuraminidase”あるいは“sialidase”とした場合、ウイルス、細菌、原虫および哺乳類由来の立体構造として、それぞれ 152 件 (55%)、81 件 (29%)、29 件 (10%) および 14 件 (5%)、その他の 3 件 (1%) を含め、合計 279 件が該当した (図 5.3)。

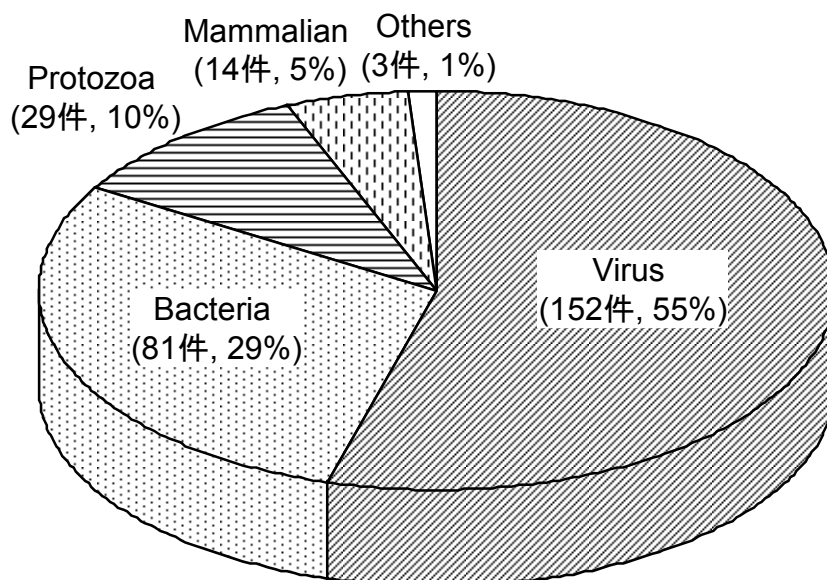


図 5.3 RCSB PDB に登録されているノイラミニダーゼの立体構造情報
(2013 年 2 月 1 日 現在)

通常の template 検索では、構造データベース中に hNEU1 のアミノ酸配列 (target) と相同な配列が存在するかどうかを検索するホモロジー検索法を使用するが、上記で確認したノイラミナーゼの立体構造が主として該当することが予想される。実際には、hNEU1 のプロファイルを用いてホモロジー検索を行う PSI-BLAST [280] に基づく template 検索を行った。ここで、hNEU1 の配列情報は UniProt データベース (accession no. Q99519, 表 5.1) [281] より入手し、signal peptide (Met1-Ala47) を含む N 末端の 52 残基を除いた配列を用いた。なぜなら、この signal peptide が切断された後に、hNEU1 は活性型となるためである [282]。表 5.3 は、この hNEU1 の配列を用いた PSI-BLAST による template 検索の結果 [283] を示す。E-value の閾値 ($1e-03$) 未満の大半は、細菌由来の template であることを確認できる一方で、ウイルス由来の template は確認されない。このことは、hNEU1 において確認される特徴的な配列である Asp box (Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp) や RIP motif (Phe (Tyr)-Arg-Ile-Pro) (表 5.1) が、細菌やヒトでは存在するのに対して、ウイルスにおいては存在しないことによると考えられる。また、ウイルスにはその他のノイラミナーゼの立体構造においては確認されないジスルフィド結合が特異的に存在していることから、hNEU1 の立体構造の template としてウイルス由来の template を用いることは好ましくないと考えられる。Asp box は、 β -sheet を構成する二つの β -strand 同士をつなぐ領域に位置しており、その構造的特徴としては水分子を介した水素結合を形成することが挙げられ、ノイラミナーゼの β -propeller の構造維持に関与している。また、RIP motif に含まれる Arg は、活性中心である arginine triad を構成するアミノ酸残基の一部であるため、アライメントにおけるこの領域の一致を得ることは hNEU1 における arginine triad の立体構造の構築に重要であると考えられる。これら Asp box や RIP motif の両方を有する template は、細菌とヒトに限定され、そのなかで相同性、解像度、アミノ酸残基の変異およびリガンドの結合の有無などを総合的に評価した結果、hNEU1 の template として hNEU2 (identity: 22.7% (1VCU, B 鎖 [239])) および *M. viridifaciens* (identity: 29.8% (1EUR, A 鎖 [284])) を選択した [285]。ここで、これら二つの template と hNEU1 の配列との同一残基率 (identity) は、ホモロジーモデリングにおける妥当な立体構造の構築に必要とされる相同性の基準値 ($> 50\%$) を超えていない。そこで、hNEU1 の予測モデル構造の質の向上を図るために、これら二つの template を同時に用いたマルチプルアライメントを行った [286]。ここで、arginine triad, Asp box および RIP motif などの重要なアミノ酸配列同士を一致させる操作をマルチプルアライメントの結果に対して行った。図 5.4 は、この手動操作を加えたマルチプルアライメントの結果を示す。以上の操作には vector alignment search tool (VAST) program [287] (molecular operating environment (MOE) [288]) を使用した。マルチプルアライメントの結果に基づき hNEU1 の予測モデル構造 (100 個) を MODELLER 9v4 [289] により構築し、Ramachandran plot (PROCHECK) [290]、DSSP program [291]、表面積や体積などの形状パラメータおよび Verify 3D [292] を用いてその立体構造の評価を行った。Verify 3D では、そのスコアの値が正に大きいほど、立体構造中の各アミノ酸残基が置かれている環境が妥当であると判定する。なお、最終的には Verify 3D スコアの最も高い立体構造を、hNEU1 の予測モデル構造として使用した。

表 5.3 PSI-BLAST に基づく template 検索

scientific name	species	PDB code (resolution ^a)	mutation	E-value ^b
<i>M. viridifaciens</i> ^c	bacteria	1W8O (1.70), 1W8N (2.10), 1EUU (2.50), 1EUT (2.50), 1EUS (2.00), 1EUR (1.82)	Asp92Gly, Asp92Gly, none, none, none, none	1e-21
<i>M. viridifaciens</i> ^c	bacteria	1WCQ (2.10)	Trp370Tyr	3e-21
<i>M. viridifaciens</i> ^c	bacteria	2BZD (2.00)	Ala260Glu	6e-21
<i>M. viridifaciens</i> ^c	bacteria	2BER (1.80)	Tyr370Gly	2e-20
<i>P. distasonis</i> ^d	bacteria	4FJ6 (1.90)	none	3e-11
hNEU2	mammalian	2F24 (1.76), 2F25 (1.95)	Glu111Qln, Glu111Qln	8e-10
<i>C. perfringens</i> ^e	bacteria	2BF6 (0.97), 2VK5 (0.97), 2VK6 (1.50), 2VK7 (1.20)	none, none, none, none	1e-09
hNEU2	mammalian	1VCU (2.85), 1SO7 (1.49), 1SNT (1.75), 2F0Z (2.80), 2F10 (2.90), 2F11 (2.57), 2F12 (2.27), 2F13 (2.26), 2F26 (1.58), 2F27 (2.15), 2F28 (1.67), 2F29 (2.92)	none, none, none, none, none, none, none, none, Glu111Gln Gln112Glu, Glu111Gln Gln112Glu, Gln116Glu, Gln116Glu	1e-09
<i>S. pneumoniae</i> ^f	bacteria	2YA4 (1.80), 2YA5 (2.00), 2YA6 (2.00), 2YA7 (1.89), 2YA8 (1.75), 2VVZ (2.50), 2W20 (1.49), 3H71 (1.70), 3H72 (1.70), 3H73 (1.70)	none, none, none, none, none, none, none, none, none, none	5e-07
<i>S. typhimurium</i> ^g	bacteria	1DIM (1.60), 1DIL (1.90), 2SIL (1.60), 3SIL (1.05), 2SIM (1.60)	none, none, none, none, none	2e-06
<i>A. fumigatus</i> ^h	bacteria	2XCY (1.84), 2XZI (1.45), 2XZJ (1.84), 2XZK (1.50)	none, none, none, none	5e-06
<i>V. cholerae</i> ⁱ	bacteria	1KIT (2.30), 1W0O (1.90), 1W0P (1.60)	none, none, none	4e-05

^a In Å.

^b E-value threshold of 1e-03.

^c *Micromonospora viridifaciens*.

^d *Parabacteroides distasonis*.

^e *Clostridium perfringens*.

^f *Streptococcus pneumoniae*.

^g *Salmonella typhimurium*.

^h *Aspergillus fumigatus*.

ⁱ *Vibrio cholerae*.

```

hNEU1  LVQPLVTMEQLLWVSGRQIGSVDTFRIPLITATFRG-TLLAFAEARKMSSSDE-GAKFIALRR
1VCU   MASLPVLQKESVFSQG-----AHAYRIPALLYLPGQQSLLAFAEQRA-SKKDE-HAELIVLRR
1EUR   --GEPLYTEQDLAVNGR--EGFPNYRIPALTVTFDG-DLLASYDGRP-TGIDAPGPNSILQRR
      . . . . .
hNEU1  SMDQG---STWSPTAFIVND--GDVPDGLNLGAVVSDVETGVVFLFYS-LCAHK-AGCQ---
1VCU   GDYDAPTHQVQWQAQEVVAQA--RLDGHRSMNPCPLYDAQTGTLFLFIAIPGQVTEQQQLQT
1EUR   STDGG---RTWGEQQVVSAGQTTAPIKGFSDPSYLVDRETGTIENFHVYSQRQGFAGSRPGT
      . . . . .
hNEU1  -----VASTMLVSKDDGVSWSTPRNLSLD-IG-----TEVFAPGPGSGIQKQREPRKGRLI
1VCU   ---RANVTRLCQVTSTDHGRTWSSPRDLTDAAIGPAYREWSTFAVGPGHCLQLNDRA--RSLV
1EUR   DPADPNVLHANVATSTDGGLTWS-HRTITADIT--PDPGWRSRFAASGEGIQLRYGPHAGRLI
      . . . . .
hNEU1  VCGHGT-----LER-----DGVFCLLSDDHGASWRYGSGVSGIPYGQPKQENDFN-PDECQPY
1VCU   VPAYAYRKLHP---IQRPIPSAFCFLSHDHGRTWARGHFVAQ-----DTLECQVA
1EUR   QQYTIINAA-----GAFQAVSVYSDDHGRTWARGEAVGV-----GMDENKTV
      . . . . .
hNEU1  EL---PDG---SVVINARN---QNNYHCHCRIVLRSYDACDTLRPRDVTFDPELVDPVVAAG
1VCU   EVETG---EQRVVTLNARSH--L-----RARVQAQSTNDGLDFQESQLVKKLVEPPPQGCQG
1EUR   ELSD-----GRVLLNSRDSARS-----GYRKVAVSTDGGHSYGPVTIDRDLPDP---TNNA
      . . . . .
hNEU1  AVVTSSG-----IVFFSNPAHPEFRVNLTLRWS--FSNGTSWRKETVQLWPGPSGYSS
1VCU   SVISFPSPR---SPAQWLLYTHPTHSWQRADLGAYLNPRPPAPEAWS-EPVLLAKGSCAYSD
1EUR   SIIRAFPDAPAGSARAKVLLFSNAASQTSRSQGTIRMSCDDGQ--TWP-VSKVFQPGSMSYST
      . . . . .
hNEU1  LATLEGSMDGEEQAPQLYVLYEKRNHYTESISVAKISVYGTL-----
1VCU   LQSMGTGPDG---SPLFGCLYEAN---DYEEIVFLMFTLKQAFPAEY-
1EUR   LTALPD-----GTYGLLYEP-----GTGIRYANFNLAWLGGICAP

```

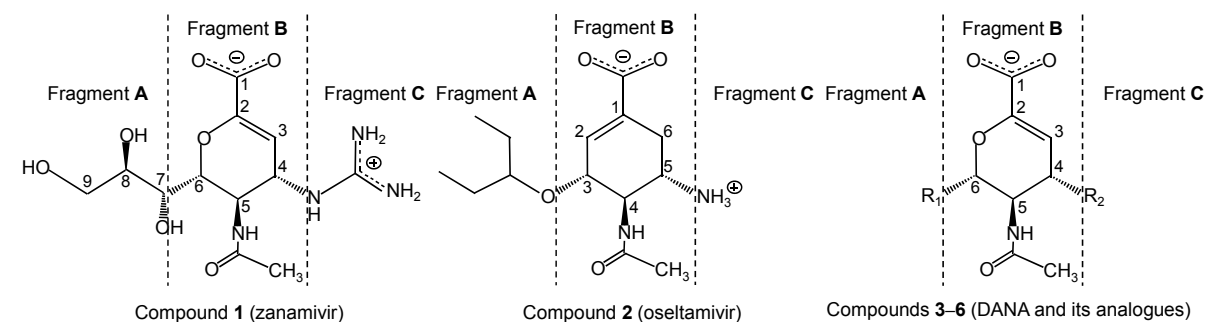
図 5.4 hNEU1 と template (hNEU2 (1VCU), *M. viridifaciens* (1EUR)) のマルチプルアライメント
Asp box および RIP motif は、それぞれ青色およびマゼンタ色の dot で表す。Arginine triad および同一残基は、それぞれ赤色の bold および背景を緑色で表す。

5.2.2 LERE-QSAR 解析に基づく hNEU1 立体構造の妥当性評価

5.2.2.1 化合物セット

LERE-QSAR 解析に基づく hNEU1 の予測モデル構造の妥当性評価では、二つの化合物セット (Sets I, II) を使用した。Set I 化合物は、抗インフルエンザ剤 (zanamivir (compound 1), oseltamivir (2)) および DANA (3) の合計 3 化合物で構成され、Hata [242] および Woods ら [293] により hNEU1, hNEU2 および N1-NA に対する阻害活性データがこれまでに報告されている。一方で、Set II 化合物は compound 3 の誘導体として fragment A 部位のみが異なる合計 4 化合物で構成され、Magesh ら [241] により hNEU1 に対する阻害活性データが報告されている。また、fragment A 部位の側鎖基の R₁ の順に Set II compounds 3-6 とした。Set I 化合物および Set II 化合物の化学構造と IC₅₀ 値を、表 5.4 (a) および表 5.4 (b) にそれぞれ示す。なお、本解析では二つの化合物セットに対して異なる実験グループの IC₅₀ 値を使用しているが、compound 3 の hNEU1 に対する IC₅₀ 値について、二つの報告値の間の差は 20% 程度であることから、compound 3 が両化合物セットをつなぐ役割を果たしている。

表 5.4 シアル酸誘導体 ((a) Sets I, (b) II 化合物)の化学構造と IC₅₀ 値



(a) Set I compound				IC ₅₀ ^a		
no.	set	R ₁ (fragment A)	R ₂ (fragment C)	hNEU1	hNEU2	N1-NA
1 ^b	I	CH(OH)CH(OH)CH ₂ (OH)	NHC(=NH ₂ ⁺)NH ₂	2700 ^e	16 ^e	0.0016 ^e
2 ^c	I	OCH(CH ₂ CH ₃) ₂	NH ₃ ⁺	~10000 ^e	~6000 ^e	0.0071 ^e
3 ^d	I	CH(OH)CH(OH)CH ₂ (OH)	OH	170 ^e	46 ^e	3.5 ^f

(b) Set II compound				IC ₅₀ ^a		
no.	set	R ₁ (fragment A)	R ₂ (fragment C)	hNEU1	hNEU2	N1-NA
3 ^d	II	CH(OH)CH(OH)CH ₂ (OH)	OH	140 ^g	–	–
4	II	CH(OH)CH(OH)CH ₂ NHCO-CH ₃	OH	58 ^g	–	–
5	II	CH(OH)CH(OH)CH ₂ NHCO-C ₃ H ₇	OH	32 ^g	–	–
6	II	CH(OH)CH(OH)CH ₂ NHCO- <i>n</i> -C ₄ H ₉	OH	10 ^g	–	–

^a In μM.

^b Zanamivir (Relenza).

^c Oseltamivir (Tamiflu).

^d DANA.

^e Taken from ref. 242.

^f Taken from ref. 293.

^g Taken from ref. 241.

5.2.2.2 hNEU1-シアル酸誘導体の複合体構造のモデリング

第3章および第4章で用いた N1-NA-compound 2 (oseltamivir) (PDB code: 2HU4 [189]) および hNEU2-compound 3 (DANA) (1VCU [239])の複合体の X線結晶解析構造を、本解析の複合体構造のモデリングにおける初期構造として使用した。これら二つの複合体 (complex 2-c (compound 2-c (N1-NA)), complex 3-b (compound 3-b (hNEU2)))以外の複合体の初期構造は、図 5.5 に示す手順に従って構築した。このとき、前章のモデリング方法

と同様に, fragment C 部位 (hydroxyl (OH), amino (NH_3^+), guanidino ($\text{NHC}(=\text{NH}_2^+)\text{NH}_2$)基) に依存する特異的な水分子 (W1, W2: hydroxyl, amino 基 (compounds 2-6), W1: guanidino 基 (1))を考慮してそれぞれの複合体構造を構築した. なお, N1-NA (protein c)および hNEU2 (protein b)と各化合物 (compounds 1-3)との複合体 (complexes 1-c, 2-c, 3-c, 1-b, 2-b, 3-b)における解離性のアミノ酸残基 (Asp, Glu, Lys, Arg)の取扱い, His のプロトン化状態の決定, 末端残基の処理および溶媒効果については, 前章のモデリング方法に準ずる. 一方で, hNEU1 (protein a)と各化合物 (compounds 1-6)との複合体 (1-a, 2-a, 3-a, 4-a, 5-a, 6-a)については, hNEU1 の至適 pH (= 4.6)において PDB2PQR web server [197]にて予測した pK_a に基づき, 解離性のアミノ酸残基の一部 (Asp130, Asp300, Glu264, Glu312, Glu339)の側鎖を非解離型とし, また His のプロトン化状態を決定した. 本解析においても, 表 5.5 に示す各複合体の系全体の電荷状態を中性に保つようにカウンターイオンを加え, エネルギー極小化計算を行った. その手順についても, 前章の方法に準じ, 表 5.6 の計算条件に基づき行った.

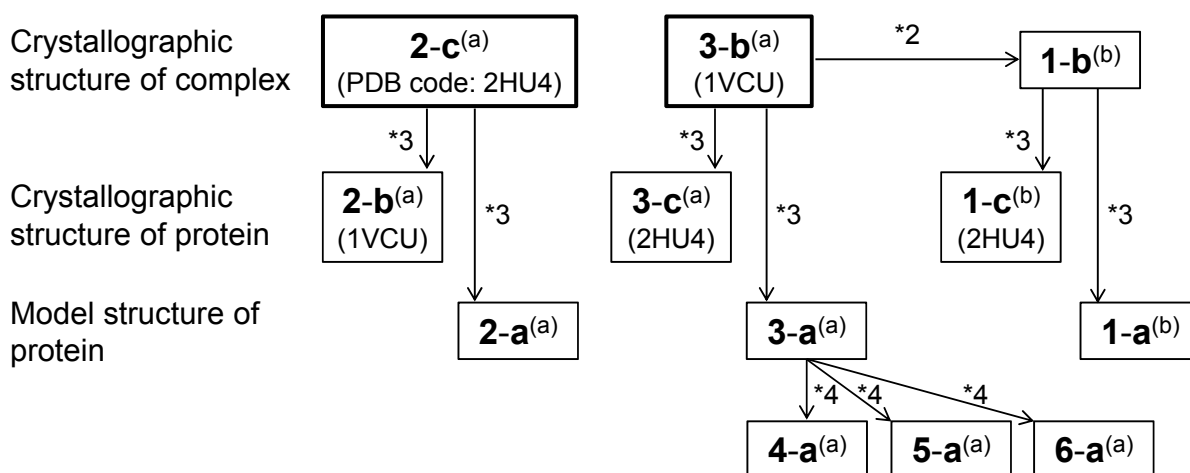


図 5.5 各複合体の初期構造の構築手順

1: 1-6 は, 表 5.4 に示す化合物番号を, a, b および c は, hNEU1, hNEU2 および N1-NA をそれぞれ表す. 2: hNEU2-compound 1 の複合体の X 線結晶解析構造 (PDB code: 2F0Z)は 24 個の欠落アミノ酸残基があるため, complex 3-b (1VCU)における compound 3 と 2F0Z における compound 1 の座標の重ね合わせ操作から, compound 3 の座標を compound 1 の座標に置き換えることで complex 1-b を構築した. 3: 矢印の終点が指し示すタンパク質と始点に位置するタンパク質の C_α 原子の座標の重ね合わせ操作から (二次構造同士の重ね合わせ操作により一致したアミノ酸残基について), タンパク質 (終点)におけるリガンドの座標をタンパク質 (始点)におけるリガンドの座標に置き換えることで複合体を構築した. 4: complex 3-a における compound 3 の fragment A 部位を対応する compounds 4-6 のそれらに置換することで complexes 4-a, 5-a, 6-a を構築した. (a), (b): リガンドとタンパク質との間の相互作用を媒介する水分子 ((a) W1, W2, (b) W1)を表す.

表 5.5 各複合体構造の荷電状態

system					
compound (no. ^a)	protein (code ^b)	complex	pH	total charge of system	counterion (number)
1	hNEU1 (a)	1-a	4.6	+1	Cl ⁻ (1)
2	hNEU1 (a)	2-a	4.6	+1	Cl ⁻ (1)
3	hNEU1 (a)	3-a	4.6	0	–
4	hNEU1 (a)	4-a	4.6	0	–
5	hNEU1 (a)	5-a	4.6	0	–
6	hNEU1 (a)	6-a	4.6	0	–
1	hNEU2 (b)	1-b	8.0	–4	Na ⁺ (4)
2	hNEU2 (b)	2-b	8.0	–4	Na ⁺ (4)
3	hNEU2 (b)	3-b	8.0	–5	Na ⁺ (5)
1	N1-NA (c)	1-c	7.0	–1	Na ⁺ (1)
2	N1-NA (c)	2-c	7.0	–1	Na ⁺ (1)
3	N1-NA (c)	3-c	7.0	–2	Na ⁺ (2)

^a **1–6** represent compound numbers in Table 5.4.

^b **a**, **b**, and **c** denote ligand-free proteins, hNEU1, hNEU2, and N1-NA, respectively.

表 5.6 各複合体構造に対するエネルギー極小化計算

MM simulation	
Force field	parm99 (proteins), GAFF (compounds 1–6)
Solvent effect	TIP3P octahedron water box (12 Å)
Cut-off	10 Å
Step 1. MM	水素原子と欠落アミノ酸残基 ^a の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 1,000 cycles, PBC)
Step 2. MM	水分子とカウンターイオンの極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 3. MM ^b	阻害剤とアミノ酸残基の側鎖原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
Step 4. MM ^b	系全体の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles, PBC)
最急降下 (SD)法, 共役勾配 (CG)法, 周期境界条件 (PBC)	

^a Ser284–Gly287 and Leu378–Gln380 are missing residues only in hNEU2.

^b The atomic positions of Glu111, Tyr179, Tyr181, Glu218, and Gln270 only in hNEU2 were constrained with a harmonic potential of 10 kcal/mol/Å².

5.2.2.3 LERE-QSAR 解析 (hNEU1-シアル酸誘導体)

ホモロジーモデリングにより構築した hNEU1 の予測モデル構造ならびに X 線結晶解析構造が既知である hNEU2 および N1-NA と Set I 化合物 (compounds 1-3) の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動の支配要因を明らかにする LERE-QSAR 解析 [16-21] から, hNEU1 の予測モデル構造の妥当性評価を行った. 2.1 節で構築した LERE-QSAR 解析の基本式 (2.6) において, 結合相互作用エネルギー ΔE_{bind} ($= \Delta E_{\text{bind}}^0 + E_{\text{disp}}$) は MM 法で算出し, ΔE_{bind}^0 および E_{disp} はそれぞれ $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{MM/es+LJ12}}$ および E_{LJ6} により評価した. 水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は, 前章と同様の理由・方法により, 統計平均値 ($\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$) として算出した. なお, $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$ は古典的連続誘電体モデルである generalized Born-OBC I (GB-OBC I) 法で評価した. 解離自由エネルギー変化 ΔG_{diss} は, それぞれの複合体系における pH 環境が異なるため, その評価には多くの不確実性を伴うと考えられるため, 考慮しないこととした. $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle$ を除く各エネルギー項は, 前節のモデリング方法に従って構築した各複合体構造に基づき算出した. 最終的に式 (2.6) から下式 (5.1) を導き, これを各複合体に対する LERE-QSAR 解析における基本式とした.

$$\Delta G_{\text{obs}} = \gamma_1 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} \rangle) + \text{const}_3 \quad (5.1)$$

ここで, $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{MM/es+LJ12}}$ と E_{LJ6} の和を, MM 法による静電相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}$ と van der Waals 相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ ($= E_{\text{LJ6}} + E_{\text{LJ12}}$) の和とした. また, Set II 化合物 (compounds 3-6) を用いた hNEU1 の予測モデル構造のさらなる妥当性評価についての LERE-QSAR 解析も, 上式 (5.1) に基づき行った.

5.3 結果および考察

5.3.1 タンパク質の構造評価手法に基づく hNEU1 予測立体構造の妥当性評価

5.3.1.1 タンパク質の構造評価

図 5.6 は, ホモロジーモデリングに基づき構築した hNEU1 の予測モデル構造とその template として用いた hNEU2 (1VCU) および *M. viridifaciens* (1EUR) の X 線結晶解析構造を示す. 予測モデル構造では, 6 枚の β -sheet より構成される β -propeller の基本構造をはじめ, ノイラミニダーゼが一般にもつ構造的特徴である arginine triad, Asp box および RIP motif が空間配置的に template のそれらとほぼ同等の位置に形成されていることを確認できる.

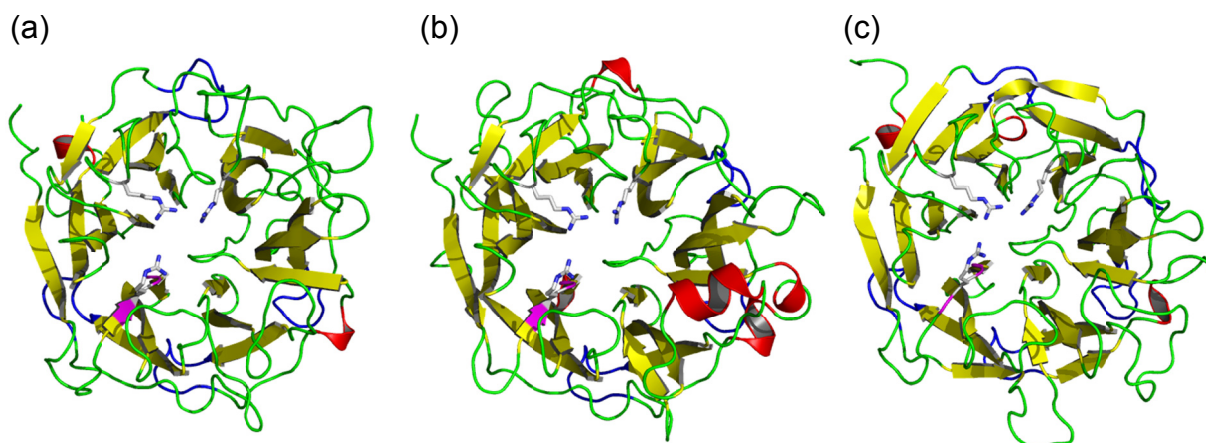


図 5.6 hNEU1 と template (hNEU2 (1VCU), *M. viridifaciens* (1EUR)) の 3 次元立体構造 (a) hNEU1 (予測モデル構造), (b) hNEU2 (1VCU), (c) *M. viridifaciens* (1EUR). α -helix および β -sheet は、それぞれ赤色および黄色で表す。Asp box および RIP motif は、それぞれ青色およびマゼンタ色で表す。Arginine triad は stick モデルで表す。

表 5.7 は、hNEU1 の予測モデル構造の立体化学的な質、形状および各アミノ酸残基が置かれている環境などの一般的な評価結果を、template として用いた hNEU2 (1VCU) および *M. viridifaciens* (1EUR) のそれらとともに示す。hNEU1 の主鎖構造において、98% のアミノ酸残基の二面角が立体的許容領域にあることから、タンパク質の高次構造を形成するうえで重要となる基本骨格の大部分は良好に構築できていること、また、template として用いた構造との比較においても、大差がないことを確認できる (表 5.7 (a))。加えて、タンパク質の二次構造においても、ノイラミニダーゼに特徴的な β -propeller の基本構造を形成する β -strand の割合が template とほぼ同等であること (hNEU1: 42%, hNEU2: 50%, *M. viridifaciens*: 43%)、また、 α -helix の割合が低いこと (hNEU1: 4%, hNEU2: 6%, *M. viridifaciens*: 3%) を確認できる (表 5.7 (b))。さらに、タンパク質の表面積 (S_{ASA})、体積 (V_{ASA}) および両者の比率 (V_{ASA}/S_{ASA}) や回転半径 (R_g) などの形状パラメータのいずれの指標においても、hNEU1 の予測モデル構造と template との間の差は小さいことから、モデル構造の形状についても妥当であると考えられる (表 5.7 (c))。全アミノ酸残基についての Verify 3D スコアの平均値においても、template との差は小さいことから (hNEU1: 0.40, hNEU2: 0.47, *M. viridifaciens*: 0.44)、モデル構造中の各アミノ酸残基が置かれている環境も妥当であると判断できる。

以上より、ホモロジーモデリングに基づき構築した hNEU1 の予測モデル構造における主鎖構造、形状および各アミノ酸残基が置かれている環境については、いずれも良好であることを確認した。

表 5.7 タンパク質の構造評価 ((a) Ramachandran plot による主鎖構造の評価, (b) 二次構造の評価, (c) 形状評価)

(a) Ramachandran plot		core		allowed		generous		disallowed		Gly and	
scientific name	species	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	Pro ^a	total
hNEU1 (model ^b)	mammalian	262	85.9	37	12.1	4	1.3	2	0.7	58	363
hNEU2 (1VCU ^c)	mammalian	257	80.8	61	19.2	0	0	0	0	55	373
<i>M. viridifaciens</i> (1EUR ^c)	bacteria	258	88.1	31	10.6	4	1.4	0	0	68	361

(b) Secondary structure		α-helix		β-strand		turn		random coil	
scientific name	species	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
hNEU1 (model ^b)	mammalian	14	3.9	153	42.1	36	9.9	160	44.1
hNEU2 (1VCU ^c)	mammalian	24	6.4	187	50.1	44	11.8	118	31.6
<i>M. viridifaciens</i> (1EUR ^c)	bacteria	11	3.0	156	43.2	47	13.0	147	40.7

(c) Compactness parameter		S_{ASA}^d	V_{ASA}^e	V_{ASA}/S_{ASA}^f	R_g^g	Verify 3D score ^h
scientific name	species					
hNEU1 (model ^b)	mammalian	16659	64603	3.9	19.1	0.40 (0.03)
hNEU2 (1VCU ^c)	mammalian	14945	66160	4.4	19.2	0.47 (0.02)
<i>M. viridifaciens</i> (1EUR ^c)	bacteria	13911	61356	4.4	18.9	0.44 (0.01)

^a Number of Gly, Pro, and terminal-residues.

^b Final model of hNEU1.

^c Template.

^d Accessible surface area of a protein (in Å²).

^e Volume of a protein (in Å³).

^f Ratio of V_{ASA} to S_{ASA} (in Å).

^g R_g is radius of gyration: $R_g = \Sigma(m_i r_i^2 / M)^{1/2}$, where m_i = mass of the i -th atom, r_i = distance of the i -th atom from center of gravity, and M = mass of a protein.

^h Average value of all amino acid residues in a protein and standard deviation (in parentheses).

5.3.1.2 シアリドーシス患者における hNEU1 変異アミノ酸残基位置の検証

Seyrantepe ら [294]は, シアリドーシス患者において確認される変異型 hNEU1 およびそれらの臨床表現型を報告しており, 図 5.7 は, ホモロジーモデリングに基づき構築した hNEU1 の予測モデル構造におけるこれらのアミノ酸残基の変異位置を示している. これらのうち, hNEU1 自身の酵素活性に影響を及ぼすと示唆される変異アミノ酸残基は (表 5.8), 予測モデル構造における活性部位近傍に位置していることを確認できる. 一方で, hNEU1 と hCath A との多酵素複合体の形成における両者の会合面, すなわちタンパク質-タンパク質相互作用に影響を及ぼすと示唆されるアミノ酸残基の変異の一部については, hNEU1 のタンパク質表面に位置している. また, 活性部位近傍およびタンパク質表面に位置するアミノ酸残基に変異が生じた場合, 重症化する傾向を確認できる (表 5.8). これらの結果は, Lukong ら [272]が構築した hNEU1 の予測モデル構造におけるアミノ酸残基の変異位置とも良好に対応しており, 本解析における hNEU1 のモデル構造の妥当性を支持するものと考えられる.

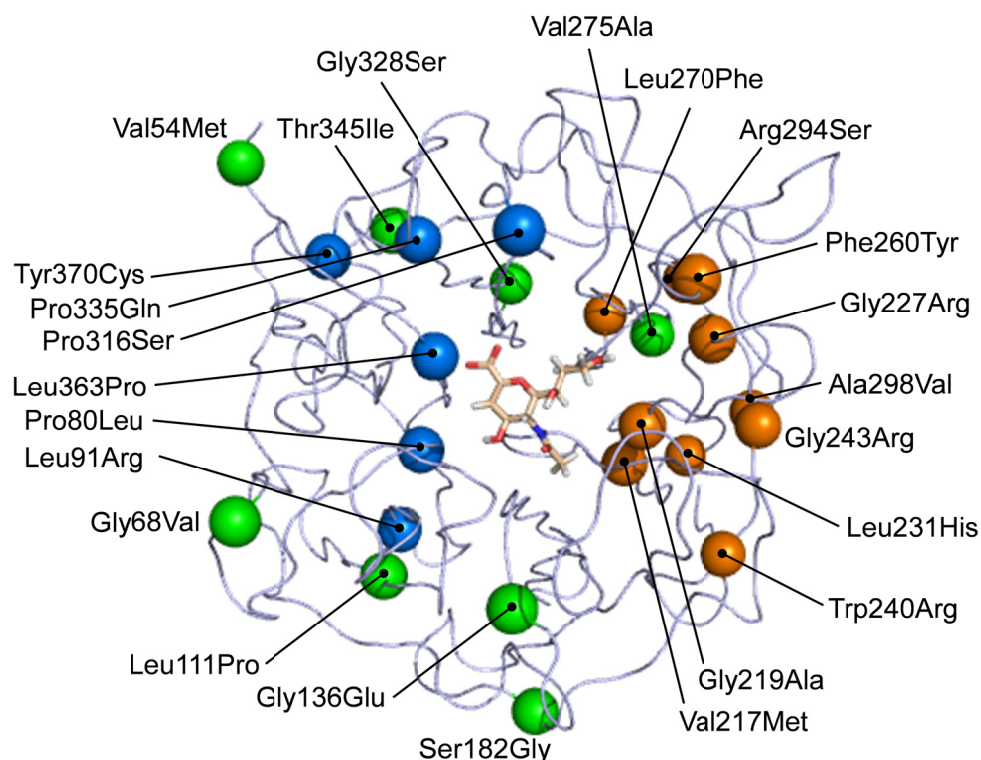


図 5.7 hNEU1 の予測モデル構造におけるアミノ酸残基の変異位置
活性部位近傍, hCath A との会合面およびそれ以外に位置すると推測される変異アミノ酸残基は, それぞれ青色, 橙色および緑色の CPK モデルで表す. DANA は stick モデルで表す.

表 5.8 シアリドーシス患者において確認される変異型 hNEU1 およびそれらの臨床表現型^a

mutation	location	phenotype	severity
Val54Met	others	type I ^b	mild
Gly68Val	others	type II congenital ^c	severe
Pro80Leu	active site	type II congenital ^c	severe
Leu91Arg	active site	type II ^c	severe
Leu111Pro	others	type I ^b	mild
Gly136Glu	others	type I adult ^b	mild
Ser182Gly	others	type I adult ^b	mild
Val217Met	hCath A binding site	type I ^b	mild
Gly219Ala	hCath A binding site	type I ^b	mild
Gly227Arg	hCath A binding site	type II infantile ^c	severe
Leu231His	hCath A binding site	type I ^b	mild
Trp240Arg	hCath A binding site	type II congenital ^c	severe
Gly243Arg	hCath A binding site	type I ^b	mild
Phe260Tyr	hCath A binding site	type II infantile ^c	severe
Leu270Phe	hCath A binding site	type II infantile ^c	severe
Val275Ala	others	type I adult ^b	mild
Arg294Ser	hCath A binding site	type I ^b	mild
Ala298Val	hCath A binding site	type II infantile ^c	severe
Pro316Ser	active site	type I ^b	mild
Gly328Ser	others	type I ^b	mild
Pro335Gln	active site	type II congenital ^c	severe
Thr345Ile	others	type I ^b	mild
Leu363Pro	active site	type II infantile ^c	severe
Tyr370Cys	active site	type II infantile ^c	severe

^a Taken from ref. 294.

^b Sialidosis type I, or the nondysmorphic type, is a relatively mild and late onset form.

^c Sialidosis type II, or the dysmorphic type, is the early-onset form.

5.3.2 LERE-QSAR 解析に基づく hNEU1 予測立体構造の妥当性評価

5.3.2.1 hNEU1-Set I 化合物に対する LERE-QSAR 解析

図 5.8 に示すように、ホモロジーモデリングにより構築した hNEU1 の予測モデル構造ならびに X 線結晶解析構造が既知である hNEU2 および N1-NA と Set I 化合物 (compounds 1-3) の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs} , 3 化合物 \times 3 タンパク質) の変動を, 表 5.9 に示す代表自由エネルギー項を用いた LERE-QSAR 解析から良好に説明可能であった. 抗インフルエンザ剤 (compounds 1 (zanamivir), 2 (oseltamivir)) は, インフルエンザウイルス (N1-NA) に対しては強い阻害効果を示す一方で, ヒト (hNEU1, hNEU2) に対しては弱いこと, 特に compound 2 のヒトに対する阻害効果はきわめて弱いこと, また compound 3 (DANA) がいずれのノイラミニダーゼに対しても同程度の阻害効果を示すことなどの Set I 化合物の阻害効果の特徴を良好に再現している.

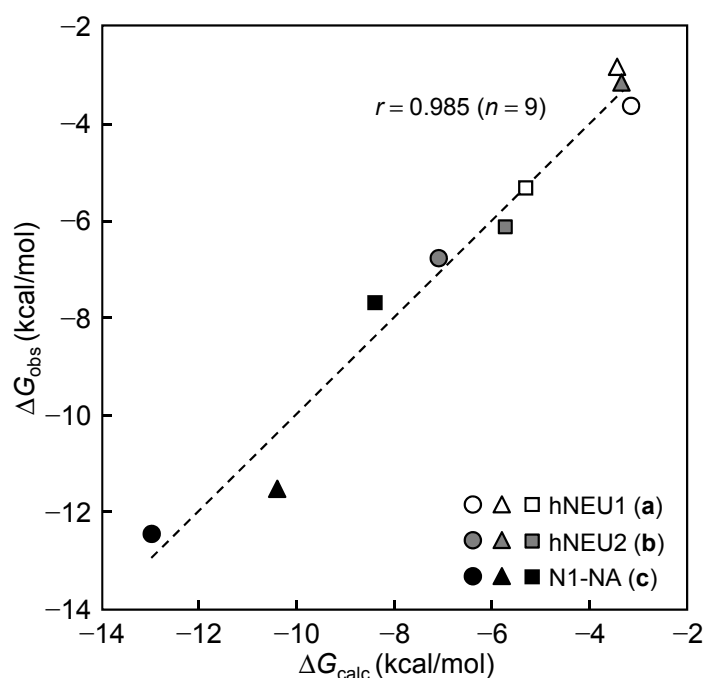


図 5.8 ΔG_{obs} と ΔG_{calc} のプロット (hNEU1, hNEU2, N1-NA-Set I 化合物)

Set I 化合物 (compounds 1 (zanamivir), 2 (oseltamivir) および 3 (DANA)) と 3 つのノイラミニダーゼ (hNEU1 (a, 白色), hNEU2 (b, 灰色) および N1-NA (c, 黒色)) との複合体は, それぞれ丸, 三角および四角で表す. ΔG_{calc} は式 (5.1) に基づき算出した (式 (5.2): (a) $r = 0.905$, $\gamma_1 = 0.0442$, $const_3 = -1.05$, (5.3): (b) $r = 0.978$, $\gamma_1 = 0.0694$, $const_3 = -0.254$, (5.4): (c) $r = 0.917$, $\gamma_1 = 0.345$, $const_3 = 8.79$).

表 5.9 複合体形成に伴う ΔG_{obs} および代表自由エネルギー項^a (hNEU1 (**a**), hNEU2 (**b**), N1-NA (**c**)-Set I 化合物)

complex						
no. ^b	ΔG_{obs} ^c	ΔG_{calc} ^d	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}$	$\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$ ^e	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$	electrostatic energy ^f
1-a	-3.64	-3.14	-221.12	194.15 (7.23)	-20.17	-26.97
2-a	-2.84	-3.42	-175.72	140.46 (12.11)	-18.23	-35.26
3-a	-5.35	-5.28	-250.37	168.82 (9.51)	-14.08	-81.55
1-b	-6.79	-7.08	-272.30	197.98 (6.05)	-24.11	-74.32
2-b	-3.15	-3.32	-172.49	154.06 (4.26)	-25.83	-18.43
3-b	-6.16	-5.69	-164.91	113.31 (8.93)	-26.81	-51.60
1-c	-12.49	-13.00	-204.75	166.79 (5.37)	-25.15	-37.96
2-c	-11.56	-10.40	-194.15	169.04 (6.66)	-30.49	-25.11
3-c	-7.74	-8.39	-124.10	93.49 (5.95)	-19.15	-30.61
variance (a) ^g			943.26	480.95	6.45	576.72
variance (b) ^g			2394.68	1195.48	1.25	526.68
variance (c) ^g			1280.42	1231.75	21.46	27.71

^a In kcal/mol.

^b 1–6 represent compound numbers. **a**, **b**, and **c** denote ligand-free proteins, hNEU1, hNEU2, and N1-NA, respectively.

^c $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln \text{IC}_{50}$ ($T = 310$ K).

^d ΔG_{calc} for **a**, **b**, and **c** were calculated from eqs. (5.2), (5.3), and (5.4), respectively.

^e Average value and standard deviation (in parentheses).

^f $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$.

^g In kcal²/mol².

5.3.2.2 hNEU1-Set II 化合物に対する LERE-QSAR 解析

Set II 化合物 (compounds 3–6) と hNEU1 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動の支配要因を明らかにする LERE-QSAR 解析に基づき、構築した hNEU1 の予測モデル構造のさらなる妥当性評価を行った。hNEU1 は、ホモロジーモデリングにより構築した予測モデル構造であるにもかかわらず、一連の Set II 化合物と hNEU1 の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動を、物理化学的な意味づけとともに説明可能な統計的に有意である LERE-QSAR 相関式 (5.5) を得ることができた。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0739 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle) + 1.32 \quad (5.5)$$

$n = 4, r = 0.926, s = 0.318 \text{ kcal/mol}, F = 12.0$

相関式において、実測と計算による全自由エネルギー変化との間には良好な線形関係があることを確認できる。また、等温滴定熱量測定 (isothermal titration calorimetry: ITC)の実験結果 [49]から α を 0.678 とした場合、上式の右辺の第一項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$)の係数 ($\gamma_1 = (1 + \beta)(1 - \alpha)$)における β は負の値を示す ($\beta = -0.771$)。このことは、式 (2.2)導出において仮定したとおり ($\beta < 0$ and/or $const_1 > 0$)、相関式の右辺の第一項に対して線形な penalty energy 項の存在を表している。

表 5.10 は、LERE-QSAR 解析で用いた代表自由エネルギー項、実測値 ΔG_{obs} 、LERE-QSAR 相関式 (5.5)より得られる予測値 ΔG_{calc} 、MM 法に基づく静電相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}$ 、GB-OBC I 法に基づく水和自由エネルギー変化の極性項 $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$ および van der Waals 相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ の値を示す。図 5.9 は、 ΔG_{obs} の変動に対する各エネルギー項の寄与を示す。第 3 章および第 4 章の解析結果と同様に、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}$ と $\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$ の各々の寄与は大きいものの ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}] = 430, \text{var.}[\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle] = 474 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$)、両者の間にはほぼ完全な逆相関関係が成立し ($r = -0.995$, 式 (5.6))、結果として静電相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$)の寄与はきわめて小さくなることを確認できる ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle] = 5$)。

$$\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle = -1.04 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} - 91.4 \quad (5.6)$$

$n = 4, r = 0.995, s = 3.00, F = 209$

一方で、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ の寄与は、($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$)の寄与と比べて相対的に大きいことから ($\text{var.}[\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}] = 53$)、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ が ΔG_{obs} の変動に対して支配的に働くと考えられる ($r = 0.996$, 式 (5.7))。したがって、Set II 化合物と hNEU1 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動に対して、両分子間における van der Waals 相互作用が支配的な役割を果たしている。

$$\Delta G_{\text{obs}} = 0.0815 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}} - 4.33 \quad (5.7)$$

$n = 4, r = 0.996, s = 0.0734, F = 261$

本節ならびに前節における LERE-QSAR 解析から、ホモロジーモデリングにより構築した hNEU1 の予測モデル構造は、実測を再現可能な妥当な構造であり、少なくともその活性部位近傍のアミノ酸残基については良好に構築できていると考えられる。次節では、支配項である van der Waals 相互作用に焦点を当て、その変動に関与する hNEU1 のアミノ酸残基を定量的に明らかにする。

表 5.10 複合体形成に伴う ΔG_{obs} および代表自由エネルギー項^a (hNEU1-Set II 化合物)

compound						
no.	ΔG_{obs}^b	ΔG_{calc}^c	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}}$	$\langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle^d$	$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$	electrostatic energy ^e
3	-5.45	-5.75	-250.37	168.82 (9.51)	-14.08	-81.55
4	-6.01	-5.69	-284.88	209.70 (13.87)	-19.63	-75.18
5	-6.38	-6.47	-307.20	227.71 (10.28)	-25.83	-79.49
6	-7.09	-7.03	-291.29	212.03 (14.27)	-33.64	-79.26
variance ^f			430.46	473.87	52.95	5.33

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln \text{IC}_{50}$ ($T = 310 \text{ K}$).

^c Calculated from eq. (5.5).

^d Average value and standard deviation (in parentheses).

^e $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \langle \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar (GB-OBC I)}} \rangle$.

^f In kcal²/mol².

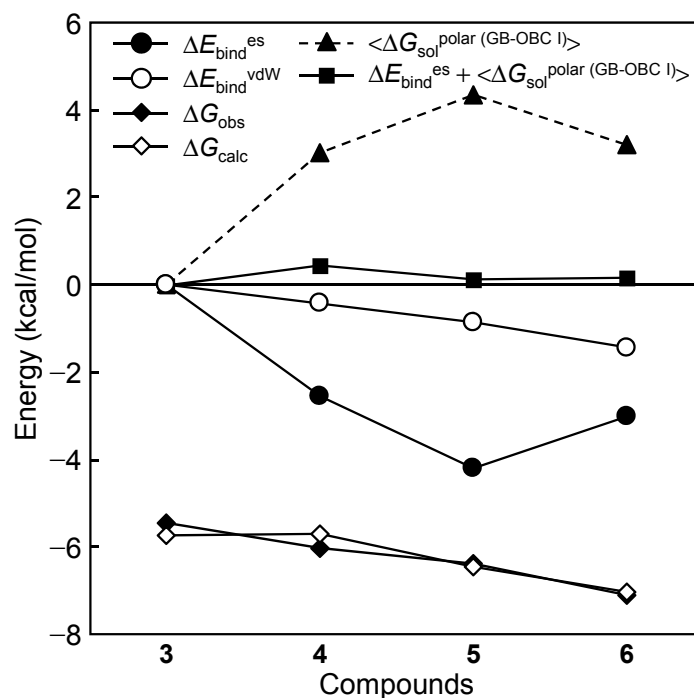


図 5.9 Set II 化合物と hNEU1 の複合体形成に伴う各エネルギー項の変動
各代表自由エネルギー項は compound 3 を基準として表す。

5.3.3 hNEU1-Set II 化合物の結合相互作用エネルギー解析

Set II 化合物 (compounds 3-6) と hNEU1 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) の変動の支配要因は、結合相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}} (= \Delta E_{\text{bind}}^{\text{es}} + \Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}})$ における van der Waals 相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ であることを、前節の LERE-QSAR 解析から定量的に明らかにした。Set II 化合物は、fragment A 部位のみが異なる化合物であるため (表 5.4), $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}}$ に対する Set II 化合物の各部分構造の寄与については、fragment A が最も大きいと考えられる。図 5.10 (a) は、compound 6 の fragment A ($R_1 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NHCO-}n\text{-C}_4\text{H}_9$) 部位がその近傍に位置するアミノ酸残基 (pocket A: Lys161, His220, Gly221, Thr222, Asp226, Gly227, Pro262, Asp263, Glu264) と相互作用している様子を示す。Set II 化合物の fragment A が共通に有する C₇ 位および C₈ 位に位置する hydroxyl 基は、Lys161, Asp263, Glu264 の側鎖との間において水素結合ないしは静電相互作用に参与している。また、compound 3 (DANA) の fragment A ($R_1 = \text{CH}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$) においては、C₉ 位に位置する hydroxyl 基が Asp263 の側鎖との間の付加的な水素結合形成に参与していることを確認している。しかしながら、これら静電的な結合相互作用エネルギーの ΔG_{obs} の変動に対する寄与はきわめて小さいと考えられる。なぜなら、前節で確認したように静電相互作用エネルギーによる安定化相互作用エネルギーは、水和自由エネルギー変化による不安定化相互作用エネルギーにより、ほぼ完全に相殺されるためである。一方で、これら fragment A と pocket A のアミノ酸残基との間の静電相互作用による強固な結びつきが、fragment A に近接するアミノ酸残基との間の van der Waals 相互作用エネルギーの安定化につながると考えられる。図 5.10 (b) は、fragment A と pocket A のアミノ酸残基との間の van der Waals 相互作用エネルギー $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW}} \text{ fragment A}$ を示しているが、実際に Lys161, Asp263, Glu264 に加え、His220 や Asp226 との間においても van der Waals 相互作用による大きな安定化相互作用エネルギーが確認できる。なかでも、His220 や Asp263 の側鎖は、fragment A 部位の伸長方向に平行して沿うように pocket を形成しているため、その安定化への寄与は大きい。特に、Asp263 との間の van der Waals 相互作用エネルギーの化合物間の変動は、fragment A が担う相互作用のなかで最大である。その主要因は、compound 3 における C₉ 位に位置する hydroxyl 基を、compounds 4-6 では NHCO-*n*-alkyl 基に置換することにより獲得した近傍のアミノ酸残基との間における van der Waals 相互作用による安定化相互作用エネルギーの増大であると考えられる。

以上より、一連の Set II 化合物と hNEU1 の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、両分子間において特に fragment A とその近傍の pocket A のアミノ酸残基との間の van der Waals 相互作用などの局所的な相互作用により支配されていると結論づけられる。

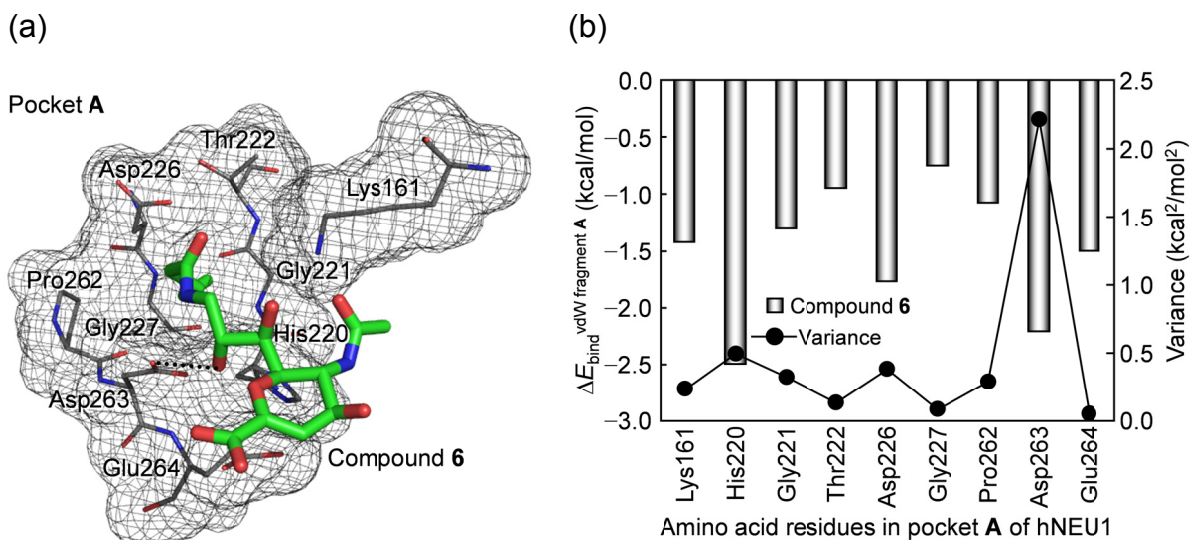


図 5.10 阻害活性値の変動を支配する相互作用様式 (hNEU1-compound 6)

(a) Compound 6 の fragment A とその近傍のアミノ酸残基との間の相互作用, (b) Fragment A との間
の $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{vdW fragment A}}$ とその化合物間の変動.

5.4 小括

本章では、3次元立体構造が未知である hNEU1 の立体構造をホモロジーモデリング手法に基づき構築し、さらに第 3 章の N1-NA および第 4 章の hNEU2 の解析結果と対照させた LERE-QSAR 解析から、hNEU1 の予測モデル構造の妥当性評価を行った。その結果、シアル酸誘導体 (Sets I, II) と 3 つのノイラミニダーゼ (hNEU1, hNEU2, N1-NA) の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動は、LERE-QSAR 解析に基づき算出した予測値を用いて統一的に説明可能であった。すなわち、hNEU1 の予測モデル構造は、実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動を説明可能な妥当な構造であること、さらに、抗インフルエンザ剤を含むシアル酸誘導体の活性発現メカニズムを原子・電子レベルで理解するうえで有用となることを明らかにした。

ホモロジーモデリングに基づく hNEU1 の予測モデル構造の構築において、二つの template (hNEU2 (1VCU) および *M. viridifaciens* (1EUR)) を同時に用いることにより、モデル構造の質の向上を図った。これは、hNEU1 の予測モデル構造の構築に関するこれまでの報告にない新たな試みである。結果として、モデル構造における主鎖構造、形状および各アミノ酸残基が置かれている環境、さらに報告されている変異型 hNEU1 における変異アミノ酸残基の位置についても良好であることから、hNEU1 のモデル構造が妥当であることを確認した。

Set I 化合物と 3 つのノイラミニダーゼ (hNEU1, hNEU2, N1-NA) の解析において、実測の全自由エネルギー変化の変動は、LERE-QSAR 解析に基づき算出した予測値を用いて

統一的に説明可能であり, Set I 化合物の阻害効果の特徴を良好に再現できた. Set II 化合物と hNEU1 の複合体形成において, 第 3 章および第 4 章の解析結果と同様に, 水素結合ないしは静電相互作用に基づくエネルギーの寄与は大きいものの, 静電相互作用エネルギーと水和自由エネルギー変化との間にほぼ完全な逆相関関係が成立する結果として, 互いの寄与はきわめて減弱していた. 一方で, van der Waals 相互作用エネルギーの寄与は大きく, これが実測の全自由エネルギー変化の変動に対する主要因である. 特に, fragment A と pocket A のアミノ酸残基 (Asp263) との間の van der Waals 相互作用による安定化相互作用エネルギーが, その支配要因であることを定量的に明らかにした.

以上より, ホモロジーモデリングにより構築した hNEU1 の予測モデル構造は, 実測を再現可能な妥当な構造であり, 本解析で提案した hNEU1 の予測モデル構造に基づき, 今後, 抗インフルエンザ剤を含むシアル酸誘導体と hNEU1 の相互作用についての新たな知見が得られることが期待される.

第 6 章 総括

現在、新薬開発には長い時間と莫大な費用を要することに加え、一般的に成功率は低い。一方で、近年の飛躍的なコンピュータの性能向上とともに発展してきた理論・計算化学の進歩は目覚ましく、これらの先端的な理論・計算化学法を創薬へと応用する新たな試みは、これまでの論理的創薬のアプローチと比較して迅速かつ高確度な医薬品設計につながることを期待されている。すなわち、薬物分子の活性発現メカニズムを、物理化学的解釈に基づき定量的かつ原子・電子レベルで理解することのできる新しい体系的な方法論の構築が望まれる。本研究では、定量的構造活性相関 (QSAR) と分子科学計算・シミュレーションをリンクさせた自由エネルギーの線形則 (LFEP) に基づく自由エネルギー変化の線形表現 (LERE-QSAR) 解析を用いて、薬物分子-標的タンパク質の相互作用を原子・電子レベルにおいて定量的に理解することを目的に、論理的創薬における QSAR のさらなる発展として新しい体系的な方法論の構築と検証を試みた。第 2 章では、一般化 LERE-QSAR 式の構築を、第 3 章、第 4 章および第 5 章では、その有用性の検証を行った。以下に本研究から得られた知見を総括する。

第 2 章では、リガンドとタンパク質の複合体形成に伴う自由エネルギー変化の加成性と線形関係に基づく LERE-QSAR 式の構築および代表自由エネルギー項について概説した。LERE-QSAR 式で用いる代表自由エネルギー項について、各種分子科学計算に基づく算出方法と手順を示すとともに、それらの論理的かつ実地的な利用についても指針を与えた。結合相互作用エネルギーおよび水和自由エネルギー変化は、主要な代表自由エネルギー項と考えられるが、これらに対する理論的考察の結果、一般に両エネルギー項の間には逆相関関係が成立する論理的根拠を明らかにし、その具体例を示した。特に、水和自由エネルギー変化については、いくつかの評価法を相互に比較・検討することで、大規模分子系に対して有用となる古典/量子化学の hybrid 評価法を提案した。

第 3 章では、インフルエンザウイルスの N1-NA と代表的な抗インフルエンザ剤の一つである oseltamivir (Tamiflu) を含む一連のシアル酸誘導体の複合体について、分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析および拡張 LERE-QSAR 解析を行った。その結果、シアル酸誘導体と N1-NA の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式を物理化学的な意味づけとともに定量的に明らかにした。すなわち、両分子間に働く分散相互作用が実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動と良好な線形関係にあること、さらに、シアル酸誘導体の各部分構造の相互作用様式を原子・電子レベルで明確にするとともにその変動に関与する N1-NA のアミノ酸残基を特定した。また、タンパク質および阻害剤の構造の揺らぎに伴う entropic 変化を陽に考慮した拡張 LERE-QSAR 解析の結果、特異な分岐鎖 alkoxy 基を有する oseltamivir が、一連のシアル酸誘導体のなかで最大の阻害活性を示すのは、複合体形成の前後におけるリガンド部分の凍結 entropy がほとんどないことに起因することを定量的に明らかにした。

第4章では、ヒトの hNEU2 と代表的な抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体の複合体について、分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析を行った。その結果、シアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式を物理化学的な意味づけとともに定量的に明らかにした。すなわち、両分子間に働く静電相互作用が実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動と良好な線形関係にあること、さらに、oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する相互作用において、特に oseltamivir の amino 基とその近傍に位置するアミノ酸残基との間の静電相互作用エネルギーの違いが、oseltamivir の結合選択性に大きく寄与していることを定量的に明らかにした。また、oseltamivir 服用後の精神・神経症状の有害事象 (副作用) については、遺伝的多型 (Arg41Gln 変異型 hNEU2) の関与が考えられ、oseltamivir の有害事象に関する報告を科学的に裏付ける可能性の一つを示した。

第5章では、3次元立体構造が未知である hNEU1 の立体構造をホモロジーモデリング手法に基づき構築し、LERE-QSAR 解析を用いて hNEU1 の予測モデル構造の妥当性評価を行った。その結果、シアル酸誘導体と3つのノイラミニダーゼ (hNEU1, hNEU2, N1-NA) の複合体形成に伴う実測の全自由エネルギー変化の変動は、LERE-QSAR 解析に基づき算出した予測値を用いて統一的に説明可能であった。すなわち、hNEU1 の予測モデル構造は、実測の阻害活性値より求まる全自由エネルギー変化の変動を説明可能な妥当な構造であることを明らかにした。

以上、QSAR と分子科学計算・シミュレーションの統合化に基づく研究から得られた特筆すべき知見を総括した。第3章および第4章では、標的タンパク質の立体構造情報は既知でありそれらを使用して解析を行ったが、創薬研究において論理的に医薬品設計を行っていくうえでタンパク質の立体構造情報は必要不可欠である。近年、X線結晶構造解析や NMR スペクトル解析などの実験技術の飛躍的進歩に伴い、多くのタンパク質の立体構造が決定されるようになってきている。また、実験的に立体構造が得られない場合であっても、第5章で示したホモロジーモデリングに基づきその予測立体構造を得ることができ、さらにそれを用いた原子・電子レベルでの解析も可能となってきている。すなわち、本研究では、実験化学と理論・計算化学を相補的かつ効果的に活用することのできる一つの方法として、新規 QSAR の方法である LERE-QSAR 法の提案・構築・検証を行った。

本研究で示した QSAR と分子科学計算・シミュレーションの統合的アプローチである LERE-QSAR 法は、従来の QSAR 法では得ることが困難である原子・電子レベルでの阻害剤と標的タンパク質の相互作用メカニズムを定量的に解析可能であることを、ノイラミニダーゼ-阻害剤の複合体系を検証例として明らかにした。LERE-QSAR 法は、今後の高精度かつ高確度が要求される創薬の過程において新しい論理的かつ実用的な QSAR の一つであると結論できる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 創薬理論化学分野 恩師 中馬 寛 教授に心より感謝の意を表するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、良き理解者として長きにわたる御指導と御協力ならびに有益な御助言を頂きました、徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 創薬理論化学分野 吉田 達貞 助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 創薬生命工学分野 伊藤 孝司 教授、辻 大輔 助教に深く感謝致します。

本研究の共同研究者として、hNEU1 のホモロジーモデリング構造を御提供して頂くとともに、御指導と御協力ならびに御討論して頂きました、(独) 産業技術総合研究所 生命情報工学研究センター 研究チーム長 広川 貴次 博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多くの貴重な御助言を賜りました、京都大学名誉教授・エミルプロジェクト代表 藤田 稔夫 先生に心より御礼申し上げます。

また、日頃の研究生生活において、有益な御助言と御協力ならびに御討論して頂きました、廣隅 公治 修士 (現、総合メディカル株式会社)、宗井 陽平 修士 (現、日本曹達株式会社)、的場 弘 氏、杉本 拓弥 学士、また本論文の文章校正をして頂きました、河野 明大 氏、芝田 雄登 氏、山内 香子 学士、坂本 修平 学士を初め、徳島大学薬学部 創薬理論化学分野 研究室の諸氏に深く感謝致しますとともに、今後益々のご活躍を御祈り申し上げます。

なお、本研究の一部は、公益財団法人 大塚芳満記念財団の助成を受けたものであり、深く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたる学生生活において、不断の経済的援助ならびに終始温かく見守って下さいました両親および家族、そして友人その他の方々に心より感謝致します。

2013年3月
比多岡 清司

引用文献

- [1] Hansch, C.; Fujita, T. ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616–1626.
- [2] Kitaura, K.; Ikeo, E.; Asada, T.; Nakano, T.; Uebayasi, M. Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 701–706.
- [3] Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6904–6914.
- [4] Fedorov, D. G.; Nagata, T.; Kitaura, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7562–7577.
- [5] Gordon, M. S.; Fedorov, D. G.; Pruitt, S. R.; Slipchenko, L. V. Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 632–672.
- [6] Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227–249.
- [7] Lin, H.; Truhlar, D. G. QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here? *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 185–199.
- [8] Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM studies of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 182–187.
- [9] Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198–1229.
- [10] Kirkwood, J. Statistical mechanics of fluid mixtures. *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 300–313.
- [11] Zwanzig, R. W. High-temperature equation of state by a perturbation method. I. Nonpolar gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1420–1426.
- [12] Bennett, C. H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22*, 245–268.
- [13] Jorgensen, W. L.; Buckner, J. K.; Boudon, S.; Tirado-Rives, J. Efficient computation of absolute free energies of binding by computer simulations. Application to the methane dimer in water. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 3742–3746.
- [14] Åqvist J.; Medina, C.; Samuelsson, J. E. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng.* **1994**, *7*, 385–391.
- [15] Naïm, M.; Bhat, S.; Rankin, K. N.; Dennis, S.; Chowdhury, S. F.; Siddiqi, I.; Drabik, P.; Sulea, T.; Bayly, C. I.; Jakalian, A.; Purisima, E. O. Solvated interaction energy (SIE) for scoring protein–ligand binding affinities. 1. Exploring the parameter space. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 122–133.
- [16] Yoshida, T.; Munei, Y.; Hitaoka, S.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of substituted benzenesulfonamides with carbonic anhydrase using ab initio MO calculations on their complex structures. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 850–860.
- [17] Munei, Y.; Shimamoto, K.; Harada, M.; Yoshida, T.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of substituted benzenesulfonamides with carbonic anhydrase using ab initio MO calculations on their complex structures (II). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 141–144.
- [18] Hitaoka, S.; Matoba, H.; Harada, M.; Yoshida, T.; Tsuji, D.; Hirokawa, T.; Itoh, K.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues and anti-influenza drugs with human neuraminidase using ab initio MO calculations on their

- complex structures – LERE-QSAR analysis (IV). *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2706–2716.
- [19] Yoshida, T.; Hitaoka, S.; Mashima, A.; Sugimoto, T.; Matoba, H.; Chuman, H. Combined QM/MM (ONIOM) and QSAR approach to the study of complex formation of matrix metalloproteinase-9 with a series of biphenylsulfonamides – LERE-QSAR analysis (V). *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10283–10289.
- [20] Hitaoka, S.; Shibata, Y.; Matoba, H.; Kawano, A.; Harada, M.; Rahman, M.; Tsuji, D.; Hirokawa, T.; Itoh, K.; Yoshida, T.; Chuman, H. Modeling of human neuraminidase-1 and its validation by LERE-correlation analysis. *Chem-Bio Informatics Journal* **2013**, *13*, 30–44.
- [21] Hitaoka, S.; Chuman, H. Revisiting the Hansch-Fujita approach and development of a fundamental QSAR. *J. Pestic. Sci.*, in press.
- [22] Dunitz, J. D. Win some, lose some: enthalpy–entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [23] Searle, M. S.; Westwell, M. S.; Williams, D. H. Application of a generalised enthalpy–entropy relationship to binding co-operativity and weak associations in solution. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1995**, 141–151.
- [24] Houk, K. N.; Leach, A. G.; Kim, S. P.; Zhang, X. Binding affinities of host-guest, protein-ligand, and protein-transition-state complexes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872–4897.
- [25] Williams, D. H.; Stephens, E.; O’Brien, D. P.; Zhou, M. Understanding noncovalent interactions: ligand binding energy and catalytic efficiency from ligand-induced reductions in motion within receptors and enzymes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6596–6616.
- [26] Freire, E. A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 468–472.
- [27] Calderone, C. T.; Williams, D. H. An enthalpic component in cooperativity: the relationship between enthalpy, entropy, and noncovalent structure in weak associations. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6262–6267.
- [28] Krishnamurthy, V. M.; Bohall, B. R.; Semetey, V.; Whitesides, G. M. The paradoxical thermodynamic basis for the interaction of ethylene glycol, glycine, and sarcosine chains with bovine carbonic anhydrase II: an unexpected manifestation of enthalpy/entropy compensation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5802–5812.
- [29] De, M.; You, C.-C.; Srivastava, S.; Rotello, V. M. Biomimetic interactions of proteins with functionalized nanoparticles: a thermodynamic study. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10747–10753.
- [30] Li, L.; Dantzer, J. J.; Nowacki, J.; O’Callaghan, B. J.; Meroueh, S. O. PDBcal: a comprehensive dataset for receptor-ligand interactions with three-dimensional structures and binding thermodynamics from isothermal titration calorimetry. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2008**, *71*, 529–532.
- [31] Noyes, R. M. Thermodynamics of ion hydration as a measure of effective dielectric properties of water. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 513–522.
- [32] Fujita, T. The analysis of physiological activity of substituted phenols with substituent constants. *J. Med. Chem.* **1966**, *9*, 797–803.
- [33] Fujita, T.; Hansch, C. Analysis of the structure–activity relationship of the sulfonamide drugs using substituent constants. *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 991–1000.
- [34] Meloun, M.; Ferenčíková, Z. Enthalpy–entropy compensation for some drugs

- dissociation in aqueous solutions. *Fluid Phase Equilib.* **2012**, *328*, 31–41.
- [35] Yoshida, T.; Shimizu, M.; Harada, M.; Hitaoka, S.; Chuman, H. Reassessment of Hammett σ as an effective parameter representing intermolecular interaction energy—links between traditional and modern QSAR approaches. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 124–128.
- [36] Faver, J. C.; Zheng, Z.; Merz, K. M., Jr. Model for the fast estimation of basis set superposition error in biomolecular systems. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 144110.
- [37] Faver, J. C.; Zheng, Z.; Merz, K. M., Jr. Statistics-based model for basis set superposition error correction in large biomolecules. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7795–7799.
- [38] Kruse, H.; Grimme, S. A geometrical correction for the inter- and intra-molecular basis set superposition error in Hartree-Fock and density functional theory calculations for large systems. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 154101.
- [39] Lumry, R.; Rajender, S. Enthalpy–entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers* **1970**, *9*, 1125–1227.
- [40] Exner, O. Statistics of the enthalpy–entropy relationship. I. The special case. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 1425–1444.
- [41] Krug, R. R.; Hunter, W. G.; Grieger, R. A. Statistical interpretation of enthalpy–entropy compensation. *Nature* **1976**, *261*, 566–567.
- [42] Exner, O. Entropy–enthalpy compensation and anticompensation: solvation and ligand binding. *Chem. Commun.* **2000**, *2000*, 1655–1656.
- [43] Sharp, K. Entropy–enthalpy compensation: fact or artifact? *Protein Sci.* **2001**, *10*, 661–667.
- [44] Cornish-Bowden, A. Enthalpy–entropy compensation: a phantom phenomenon. *J. Biosci.* **2002**, *27*, 121–126.
- [45] Ford, D. M. Enthalpy–entropy compensation is not a general feature of weak association. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16167–16170.
- [46] Rekharsky, M. V.; Mori, T.; Yang, C.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, H.; Sobransingh, D.; Kaifer, A. E.; Liu, S.; Isaacs, L.; Chen, W.; Moghaddam, S.; Gilson, M. K.; Kim, K.; Inoue, Y. A synthetic host-guest system achieves avidin-biotin affinity by overcoming enthalpy–entropy compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 20737–20742.
- [47] Olsson, T. S. G.; Williams, M. A.; Pitt, W. R.; Ladbury, J. E. The thermodynamics of protein–ligand interaction and solvation: insights for ligand design. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1002–1017.
- [48] Olsson, T. S. G.; Ladbury, J. E.; Pitt, W. R.; Williams, M. A. Extent of enthalpy–entropy compensation in protein–ligand interactions. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1607–1618.
- [49] Schwarz, F. P.; Puri, K. D.; Bhat, R. G.; Surolia, A. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7668–7677.
- [50] Gupta, D.; Cho, M.; Cummings, R. D.; Brewer, C. F. Thermodynamics of carbohydrate binding to galectin-1 from Chinese hamster ovary cells and two mutants. A comparison with four galactose-specific plant lectins. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15236–15243.
- [51] Swaminathan, C. P.; Surolia, N.; Surolia, A. Role of water in the specific binding of mannose and manno-oligosaccharides to concanavalin A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5153–5159.
- [52] Gloster, T. M.; Meloncelli, P.; Stick, R. V.; Zechel, D.; Vasella, A.; Davies, G. J.

- Glycosidase inhibition: an assessment of the binding of 18 putative transition-state mimics. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2345–2354.
- [53] Musah, R. A.; Jensen, G. M.; Bunte, S. W.; Rosenfeld, R. J.; Goodin, D. B. Artificial protein cavities as specific ligand-binding templates: characterization of an engineered heterocyclic cation-binding site that preserves the evolved specificity of the parent protein. *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 845–857.
- [54] Saro, D.; Klosi, E.; Paredes, A.; Spaller, M. R. Thermodynamic analysis of a hydrophobic binding site: probing the PDZ domain with nonproteinogenic peptide ligands. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3429–3432.
- [55] Zhang, T.; Johansson, J. S. The binding of 10 general anesthetics to a four-alpha-helix bundle protein displays enthalpy–entropy compensation. *Int. Congr. Ser.* **2005**, *1283*, 219–222.
- [56] Benfield, A.; Teresk, M. G.; Plake, H. R.; DeLorbe, J. E.; Millspaugh, L. E.; Martin, S. F. Ligand preorganization may be accompanied by entropic penalties in protein–ligand interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 6830–6835.
- [57] Yin, F.; Cao, R.; Goddard, A.; Zhang, Y.; Oldfield, E. Enthalpy versus entropy-driven binding of bisphosphonates to farnesyl diphosphate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3524–3525.
- [58] Muzammil, S.; Armstrong, A. A.; Kang, L. W.; Jakalian, A.; Bonneau, P. R.; Schmelmer, V.; Amzel, L. M.; Freire, E. Unique thermodynamic response of tipranavir to human immunodeficiency virus type 1 protease drug resistance mutations. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5144–5154.
- [59] Sarver, R. W.; Peevers, J.; Cody, W. L.; Ciske, F. L.; Dyer, J.; Emerson, S. D.; Hagadorn, J. C.; Holsworth, D. D.; Jalaie, M.; Kaufman, M.; Mastronardi, M.; McConnell, P.; Powell, N. A.; Quin III, J.; Van Huis, C. A.; Zhang, E.; Mochalkin, I. Binding thermodynamics of substituted diaminopyrimidine renin inhibitors. *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 30–40.
- [60] Martin, R. S.; Henningsen, R. A.; Suen, A.; Apparsundaram, S.; Leung, B.; Jia, Z.; Kondru, R. K.; Milla, M. E. Kinetic and thermodynamic assessment of binding of serotonin transporter inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *327*, 991–1000.
- [61] Stroba, A.; Schaeffer, F.; Hindie, V.; Lopez-Garcia, L.; Adrian, I.; Fröhner, W.; Hartmann, R. W.; Biondi, R. M.; Engel, M. 3,5-Diphenylpent-2-enoic acids as allosteric activators of the protein kinase PDK1: structure–activity relationships and thermodynamic characterization of binding as paradigms for PIF-binding pocket-targeting compounds. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4683–4693.
- [62] Edwards, A. A.; Mason, J. M.; Clinch, K.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Schramm, V. L. Altered enthalpy–entropy compensation in picomolar transition state analogues of human purine nucleoside phosphorylase. *Biochemistry.* **2009**, *48*, 5226–5238.
- [63] Ambaye, N. D.; Gunzburg, M. J.; Lim, R. C. C.; Price, J. T.; Wilce, M. C. J. Benzopyrazine derivatives: a novel class of growth factor receptor bound protein 7 antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 693–701.
- [64] Brandt, T.; Holzmann, N.; Muley, L.; Khayat, M.; Wegscheid-Gerlach, C.; Baum, B.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. Congeneric but still distinct: how closely related trypsin ligands exhibit different thermodynamic and structural properties. *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 1170–1187.
- [65] Macias, A. T.; Williamson, D. S.; Allen, N.; Borgognoni, J.; Clay, A.; Daniels, Z.; Dokurno, P.; Drysdale, M. J.; Francis, G. L.; Graham, C. J.; Howes, G. R.; Matassova,

- N.; Murray, J. B.; Parsons, R.; Shaw, T.; Surgenor, A. E.; Terry, L.; Wang, Y.; Wood, M.; Massey, A. J. Adenosine-derived inhibitors of 78 kDa glucose regulated protein (Grp78) ATPase: insights into isoform selectivity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4034–4041.
- [66] Henderson, K. L.; Le, V. H.; Lewis, E. A.; Emerson, J. P. Exploring substrate binding in homoprotocatechuate 2,3-dioxygenase using isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 991–994.
- [67] Chang, C.-E.; Chen, W.; Gilson, M. K. Ligand configurational entropy and protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 1534–1539.
- [68] Gō, N.; Scheraga, H. A. Analysis of the contribution of internal vibrations to the statistical weights of equilibrium conformations of macromolecules. *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4751–4767.
- [69] Gō, N.; Scheraga, H. A. On the use of classical statistical mechanics in the treatment of polymer chain conformation. *Macromolecules* **1976**, *9*, 535–542.
- [70] Amadei, A.; Linssen, A. B.; Berendsen, H. J. C. Essential dynamics of proteins. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1993**, *17*, 412–425.
- [71] Hayward, S.; Kitao, A.; Gō, N. Harmonicity and anharmonicity in protein dynamics: a normal mode analysis and principal component analysis. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1995**, *23*, 177–186.
- [72] Kitao, A.; Hayward, S.; Gō, N. Energy landscape of a native protein: jumping-among-minima model. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1998**, *33*, 496–517.
- [73] Amadei, A.; de Groot, B. L.; Ceruso, M. A.; Paci, M.; Di Nola, A.; Berendsen, H. J. C. A kinetic model for the internal motions of proteins: diffusion between multiple harmonic wells. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1999**, *35*, 283–292.
- [74] Kitao, A.; Gō, N. Investigating protein dynamics in collective coordinate space. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 164–169.
- [75] Chang, C.-E.; Gilson, M. K. Tork: conformational analysis method for molecules and complexes. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 1987–1998.
- [76] Chen, W.; Chang, C.-E.; Gilson, M. K. Concepts in receptor optimization: targeting the RGD peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4675–4684.
- [77] Karplus, M.; Kushick, J. N. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. *Macromolecules* **1981**, *14*, 325–332.
- [78] Carlsson, J.; Åqvist J. Calculations of solute and solvent entropies from molecular dynamics simulations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 5385–5395.
- [79] Baron, R.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. Estimating the configurational entropy from molecular dynamics simulations: anharmonicity and correlation corrections to the quasi-harmonic approximation. *Trends Phys. Chem.* **2006**, *11*, 87–122.
- [80] van Gunsteren, W. F.; Bakowies, D.; Baron, R.; Chandrasekhar, I.; Christen, M.; Daura, X.; Gee, P.; Geerke, D. P.; Glattli, A.; Hünenberger, P. H.; Kastenholtz, M. A.; Oostenbrink, C.; Schenk, M.; Trzesniak, D.; van der Vegt, N. F.; Yu, H. B. Biomolecular modeling: goals, problems, perspectives. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4064–4092.
- [81] Meirovitch, H.; Cheluvarama, S.; White, R. P. Methods for calculating the entropy and free energy and their application to problems involving protein flexibility and ligand binding. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2009**, *10*, 229–243.
- [82] Change, C.-E.; Chen, W.; Gilson, M. K. Evaluating the accuracy of the quasiharmonic approximation. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 1017–1028.
- [83] Rojas, O. L.; Levy, R. M.; Szabo, A. Corrections to the quasiharmonic approximation for evaluating molecular entropies *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 1037–1043.

- [84] Kolossváry, I. Evaluation of the molecular configuration integral in all degrees of freedom for the direct calculation of conformational free energies: prediction of the anomeric free energy of monosaccharides. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 9900–9905.
- [85] Baron, R.; Hünenberger, P. H.; McCammon, J. A. Absolute single-molecule entropies from quasi-harmonic analysis of microsecond molecular dynamics: correction terms and convergence properties. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 3150–3160.
- [86] Harpole, K. W.; Sharp, K. A. Calculation of configurational entropy with a Boltzmann–quasi-harmonic model: the origin of high-affinity protein–ligand binding. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 9461–9472.
- [87] Schlitter, J. Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the covariance matrix. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *215*, 617–621.
- [88] Schäfer, H.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Absolute entropies from molecular dynamics simulation trajectories. *J. Chem. Phys.* **2000**, *113*, 7809–7817.
- [89] Schäfer, H.; Daura, X.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Entropy calculations on a reversibly folding peptide: changes in solute free energy cannot explain folding behavior. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2001**, *43*, 45–56.
- [90] Schäfer, H.; Smith, L. J.; Mark, A. E.; van Gunsteren, W. F. Entropy calculations on the molten globule state of a protein: side-chain entropies of α -lactalbumin. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *46*, 215–224.
- [91] Baron, R.; de Vries, A. H.; Hünenberger, P. H.; van Gunsteren, W. F. Configurational entropies of lipids in pure and mixed bilayers from atomic-level and coarse-grained molecular dynamics simulations. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15602–15614.
- [92] Basdevant, N.; Weinstein, H.; Ceruso, M. Thermodynamic basis for promiscuity and selectivity in protein–protein interactions: PDZ domains, a case study. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12766–12777.
- [93] Andricioaei, I.; Karplus, M. On the calculation of entropy from covariance matrices of the atomic fluctuations. *J. Chem. Phys.* **2001**, *115*, 6289–6292.
- [94] Carlsson, J.; Åqvist, J. Absolute and relative entropies from computer simulation with applications to ligand binding. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 6448–6456.
- [95] Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S.; Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765–784.
- [96] Grimme, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787–1799.
- [97] Heinz, H.; Vaia, R. A.; Farmer, B. L.; Naik, R. R. Accurate simulation of surfaces and interfaces of face-centered cubic metals using 12–6 and 9–6 Lennard-Jones potentials. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 17281–17290.
- [98] Møller, C.; Plesset, M. S. Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618–622.
- [99] Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., III. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889–897.
- [100] Hitaoka, S.; Matoba, H.; Kawano, A.; Shibata, Y.; Harada, M.; Sakamoto, S.; Yoshida, T.; Chuman, H. Investigation of solvent effects on complex formation of ligand with protein: quantitative assessment of solvation free-energy term in the LERE-QSAR analysis. *40th Symposium on Structure–Activity Relationships (Abstr.)*, **2012**, 86–89.

- [101] Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilization of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117–129.
- [102] Case, D. A.; Cheatham, T. E., III.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- [103] Fukuzawa, K.; Mochizuki, Y.; Tanaka, S.; Kitaura, K.; Nakano, T. Molecular interactions between estrogen receptor and its ligand studied by the ab initio fragment molecular orbital method. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16102–16110.
- [104] Nakanishi, I.; Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Molecular recognition mechanism of FK506 binding protein: an all-electron fragment molecular orbital study. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *68*, 145–158.
- [105] Mazanetz, M. P.; Ichihara, O.; Law, R. J.; Whittaker, M. Prediction of cyclin-dependent kinase 2 inhibitor potency using the fragment molecular orbital method. *J. Cheminf.* **2011**, *3*, 2.
- [106] Iwata, T.; Fukuzawa, K.; Nakajima, K.; Aida-Hyugaji, S.; Mochizuki, Y.; Watanabe, H.; Tanaka, S. Theoretical analysis of binding specificity of influenza viral hemagglutinin to avian and human receptors based on the fragment molecular orbital method. *Comput. Biol. Chem.* **2008**, *32*, 198–211.
- [107] Ishikawa, T.; Ishikura, T.; Kuwata, K. Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2594–2601.
- [108] Sawada, T.; Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Structural and interaction analysis of helical heparin oligosaccharides with the fragment molecular orbital method. *Int. J. Quantum Chem.* **2009**, *109*, 2033–2045.
- [109] Hitaoka, S.; Harada, M.; Yoshida, T.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues with influenza virus neuraminidase-I using ab initio MO calculations on their complex structures. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1796–1805.
- [110] Kitaura, K.; Morokuma, K. A new energy decomposition scheme for molecular interactions within the Hartree-Fock approximation. *Int. J. Quantum Chem.* **1976**, *10*, 325–340.
- [111] Nakano, T.; Mochizuki, Y.; Kato, A.; Fukuzawa, K.; Ishikawa, T.; Amari, S.; Kurisaki, I.; Tanaka, S. Developments of FMO methodology and graphical user interface in ABINIT-MP. In *The Fragment Molecular Orbital Method: Practical Applications to large Molecular Systems*; Fedorov, D. G., Kitaura, K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2009; pp 37–59.
- [112] Mochizuki, Y.; Nakano, T.; Koikegami, S.; Tanimori, S.; Abe, Y.; Nagashima, U.; Kitaura, K. A parallelized integral-direct second-order Møller–Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *112*, 442–452.
- [113] Yoshida, T.; Yamagishi, K.; Chuman, H. QSAR study of cyclic urea type HIV-1 PR inhibitors using ab initio MO calculation of their complex structures with HIV-1 PR. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 694–703.
- [114] Yoshida, T.; Fujita, T.; Chuman, H. Novel quantitative structureactivity studies of HIV-1 protease inhibitors of the cyclic urea type using descriptors derived from molecular dynamics and molecular orbital calculations. *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* **2009**, *5*, 38–55.

- [115] Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. ONIOM: a multilayered integrated MO + MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels–Alder reactions and $\text{Pt}(\text{P}(t\text{-Bu})_3)_2 + \text{H}_2$ oxidative addition. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357–19363.
- [116] Morokuma, K. Theoretical studies of structure, function and reactivity of molecules—A personal account. *Proc. Jpn. Acad. Sci., Ser. B* **2009**, *85*, 167–182.
- [117] Alzate-Morales, J. H.; Caballero, J.; Vergara Jague, A.; González Nilo, F. D. Insights into the structural basis of N2 and O6 substituted guanine derivatives as cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) inhibitors: prediction of the binding modes and potency of the inhibitors by docking and ONIOM calculations. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 886–899.
- [118] Sekharan, S.; Morokuma, K. Why 11-*cis*-retinal? Why not 7-*cis*-, 9-*cis*-, or 13-*cis*-retinal in the eye? *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19052–19055.
- [119] Jurinovich, S.; Degano, I.; Mennucci, B. A strategy for the study of the interactions between metal–dyes and proteins with QM/MM approaches: the case of iron–gall dye. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 13344–13352.
- [120] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09*, revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2009.
- [121] He, X.; Fusti-Molnar, L.; Cui, G.; Merz, K. M., Jr. Importance of dispersion and electron correlation in ab initio protein folding. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5290–5300.
- [122] Grimme, S. Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1463–1473.
- [123] Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1978–1988.
- [124] Hawkins, G. D.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 122–129.
- [125] Hawkins, G. D.; Cramer, C. J.; Truhlar, D. G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19824–19839.
- [126] Tsui, V.; Case, D. A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. *Biopolymers* **2001**, *56*, 275–291.
- [127] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D. A. Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3712–3720.
- [128] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D. A. Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized Born model. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, *55*, 383–394.

- [129] Onsager, L. Electric moments of molecules in liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486–1493.
- [130] Kongsted, J.; Söderhjelm, P.; Ryde, U. How accurate are continuum solvation models for drug-like molecules? *J. Comput. -Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 395–409.
- [131] Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A wellbehaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280.
- [132] Kim, C. K.; Park, B.-H.; Lee, H. W.; Kim, C. K. Comprehensive studies on the free energies of solvation and conformers of glycine: a theoretical study. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 1985–1992.
- [133] Schaefer, M.; Karplus, M. A Comprehensive analytical treatment of continuum electrostatics. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1578–1599.
- [134] Zhang, D. W.; Zhang, J. Z. H. Molecular fractionation with conjugate caps for full quantum mechanical calculation of protein–molecule interaction energy *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 3599–3605.
- [135] Chandler, D.; Andersen, H. C. Optimized cluster expansions for classical fluids. II. Theory of molecular liquids. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 1930–1937.
- [136] Kilbourne, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 9–14.
- [137] Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M.; Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 152–179.
- [138] Olsen, B.; Munster, V. J.; Wallensten, A.; Waldenström, J.; Osterhaus, A. D. M. E.; Fouchier, R. A. M. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* **2006**, *312*, 384–388.
- [139] Manuguerra, J. C.; Hannoun, C.; Simon, F.; Villar, E.; Cabezas, J. A. Natural infection of dogs by influenza C virus: a serological survey in Spain. *New Microbiol.* **1993**, *16*, 367–371.
- [140] Osterhaus, A. D. M. E.; Rimmelzwaan, G. F.; Martina, B. E. E.; Bestebroer, T. M.; Fouchier, R. A. M. Influenza B virus in seals. *Science* **2000**, *288*, 1051–1053.
- [141] World Health Organization. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull. World Health Organ.* **1980**, *58*, 585–591.
- [142] Russell, R. J.; Stevens, D. J.; Haire, L. F.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. Avian and human receptor binding by hemagglutinins of influenza A viruses. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 85–92.
- [143] Chizmadzhev, Y. A. The mechanisms of lipid–protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry* **2004**, *63*, 129–136.
- [144] Söllner, T. H. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2004**, *16*, 429–435.
- [145] De Clercq, E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 1015–1025.
- [146] von Itzstein, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 967–974.
- [147] De Clercq, E.; Neyts, J. Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 280–285.
- [148] Varghese, J. N.; McKimm-Breschkin, J. L.; Caldwell, J. B.; Kortt, A. A.; Colman, P. M. The structure of the complex between influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins* **1992**, *14*, 327–332.

- [149] Hay, A. J.; Wolstenholme, A. J.; Skehel, J. J.; Smith, M. H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* **1985**, *4*, 3021–3024.
- [150] von Itzstein, M.; Wu, W.-Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Phan, T. V.; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W.; Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Ryan, D. M.; Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Hotham, V. J.; Cameron, J. M.; Penn, C. R. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **1993**, *363*, 418–423.
- [151] Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Liu, H.; Zhang, L.; Swaminathan, S.; Bischofberger, N.; Chen, M. S.; Mendel, D. B.; Tai, C. Y.; Laver, W. G.; Stevens, R. C. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681–690.
- [152] Babu, Y. S.; Chand, P.; Bantia, S.; Kotian, P.; Dehghani, A.; El-Kattan, Y.; Lin, T.-H.; Hutchison, T. L.; Elliott, A. J.; Parker, C. D.; Ananth, S. L.; Horn, L. L.; Laver, G. W.; Montgomery, J. A. BCX-1812 (RWJ-270201): discovery of a novel, highly potent, orally active, and selective influenza neuraminidase inhibitor through structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3482–3486.
- [153] Honda, T.; Masuda, T.; Yoshida, S.; Arai, M.; Kobayashi, Y.; Yamashita, M. Synthesis and anti-influenza virus activity of 4-guanidino-7-substituted Neu5Ac2en derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1921–1924.
- [154] Chong, A. K. J.; Pegg, M. S.; von Itzstein, M. Characterisation of an ionisable group involved in binding and catalysis by sialidase from influenza virus. *Biochem. Int.* **1991**, *24*, 165–171.
- [155] Chong, A. K. J.; Pegg, M. S.; Taylor, N. R.; von Itzstein, M. Evidence for a sialosyl cation transition-state complex in the reaction of sialidase from influenza virus. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 335–343.
- [156] Taylor, N. R.; von Itzstein, M. Molecular modeling studies on ligand binding to sialidase from influenza virus and the mechanism of catalysis. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 616–624.
- [157] Ferraris, O.; Lina, B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J. Clin. Virol.* **2008**, *41*, 13–19.
- [158] Ogata, M.; Murata, T.; Murakami, K.; Suzuki, T.; Hidari, K. I.-P. J.; Suzuki, Y.; Usui, T. Chemoenzymatic synthesis of artificial glycopolypeptides containing multivalent sialyloligosaccharides with a γ -polyglutamic acid backbone and their effect on inhibition of infection by influenza viruses. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1383–1393.
- [159] Oka, H.; Onaga, T.; Koyama, T.; Guo, C.-T.; Suzuki, Y.; Esumi, Y.; Hatano, K.; Terunuma, D.; Matsuoka, K. Sialyl $\alpha(2 \rightarrow 3)$ lactose clusters using carbosilane dendrimer core scaffolds as influenza hemagglutinin blockers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4405–4408.
- [160] Matsuoka, K.; Takita, C.; Koyama, T.; Miyamoto, D.; Yingsakmongkon, S.; Hidari, K. I.-P. J.; Jampangern, W.; Suzuki, T.; Suzuki, Y.; Hatano, K.; Terunuma, D. Novel linear polymers bearing thiosialosides as pendant-type epitopes for influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3826–3830.
- [161] Shie, J.-J.; Fang, J.-M.; Wang, S.-Y.; Tsai, K.-C.; Cheng, Y.-S. E.; Yang, A.-S.; Hsiao, S.-C.; Su, C.Y.; Wong, C.-H. Synthesis of Tamiflu and its phosphonate congeners possessing potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11892–11893.
- [162] Furuta, Y.; Takahashi, K.; Fukuda, Y.; Kuno, M.; Kamiyama, T.; Kozaki, K.; Nomura,

- N.; Egawa, H.; Minami, S.; Watanabe, Y.; Narita, H.; Shiraki, K. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 977–981.
- [163] Guo, C.-T.; Sun, X.-L.; Kanie, O.; Shortridge, K. F.; Suzuki, T.; Miyamoto, D.; Hidari, K. I.-P. J.; Wong, C.-H.; Suzuki, Y. An *O*-glycoside of sialic acid derivative that inhibits both hemagglutinin and sialidase activities of influenza viruses. *Glycobiol.* **2002**, *12*, 183–190.
- [164] Varghese, J. N.; Colman, P. M. Three-dimensional structure of the neuraminidase of influenza virus A/Tokyo/3/67 at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 473–486.
- [165] Varghese, J. N.; Laver, W. G.; Colman, P. M. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **1983**, *303*, 35–40.
- [166] Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Laver, W. G. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **1983**, *303*, 41–44.
- [167] Taylor, N. R.; von Itzstein, M. A structural and energetics analysis of the binding of a series of *N*-acetylneuraminic-acid-based inhibitors to influenza virus sialidase. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 233–246.
- [168] Wall, I. D.; Leach, A. R.; Salt, D. W.; Ford, M. G.; Essex, J. W. Binding constants of neuraminidase inhibitors: an investigation of the linear interaction energy method. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5142–5152.
- [169] Wang, T.; Wade, R. C. Comparative binding energy (COMBINE) analysis of influenza neuraminidase-inhibitor complexes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 961–971.
- [170] Masukawa, K. M.; Kollman, P. A.; Kuntz, I. D. Investigation of neuraminidase-substrate recognition using molecular dynamics and free energy calculations. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5628–5637.
- [171] Chachra, R.; Rizzo, R. C. Origins of resistance conferred by the R292K neuraminidase mutation via molecular dynamics and free energy calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 1526–1540.
- [172] Zhang, Q.; Yang, J.; Liang, K.; Feng, L.; Li, S.; Wan, J.; Xu, X.; Yang, G.; Liu, D.; Yang, S. Binding interaction analysis of the active site and its inhibitors for neuraminidase (N1 subtype) of human influenza virus by the integration of molecular docking, FMO calculation and 3D-QSAR CoMFA modeling. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48*, 1802–1812.
- [173] Amaro, R. E.; Cheng, X.; Ivanov, I.; Xu, D.; McCammon, J. A. Characterizing loop dynamics and ligand recognition in human- and avian-type influenza neuraminidases via generalized born molecular dynamics and end-point free energy calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4702–4709.
- [174] Udommaneehanakit, T.; Rungrotmongkol, T.; Bren, U.; Freceer, V.; Stanislav, M. Dynamic behavior of avian influenza A virus neuraminidase subtype H5N1 in complex with oseltamivir, zanamivir, peramivir, and their phosphonate analogues. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 2323–2332.
- [175] Lawrenz, M.; Baron, R.; McCammon, J. A. Independent-trajectories thermodynamic-integration free-energy changes for biomolecular systems: determinants of H5N1 avian influenza virus neuraminidase inhibition by peramivir. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 1106–1116.
- [176] Wang S.-Q.; Du, Q.-S.; Huang, R.-B.; Zhang, D.-W.; Chou, K.-C. Insights from investigating the interaction of oseltamivir (Tamiflu) with neuraminidase of the 2009 H1N1 swine flu virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 432–436.

- [177] Mai, B. K.; Viet, M. H.; Li, M. S. Top leads for swine influenza A/H1N1 virus revealed by steered molecular dynamics approach. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 2236–2247.
- [178] Mukherjee, S.; Balias, T. E.; Rizzo, R. C. Docking validation resources: protein family and ligand flexibility experiments. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1986–2000.
- [179] Sung, J. C.; Van Wynsberghe, A. W.; Amaro, R. E.; Li, W. W.; McCammon, J. A. Role of secondary sialic acid binding sites in influenza N1 neuraminidase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2883–2885.
- [180] Wang, Y.-T.; Chan, C.-H.; Su, Z.-Y.; Chen, C.-L. Homology modeling, docking, and molecular dynamics reveal HR1039 as a potent inhibitor of 2009 A(H1N1) influenza neuraminidase. *Biophys. Chem.* **2010**, *147*, 74–80.
- [181] Nguyen, T. T.; Mai, B. K.; Li, M. S. Study of Tamiflu sensitivity to variants of A/H5N1 virus using different force fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2266–2276.
- [182] Verma, R. P.; Hansch, C. A QSAR study on influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 982–996.
- [183] Zheng, M.; Yu, K.; Liu, H.; Luo, X.; Chen, K.; Zhu, W.; Jiang, H. QSAR analyses on avian influenza virus neuraminidase inhibitors using CoMFA, CoMSIA, and HQSAR. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2006**, *20*, 549–566.
- [184] Du, Q.-S.; Huang, R.-B.; Wei, Y.-T.; Pang, Z.-W.; Du, L.-Q.; Chou, K.-C. Fragment-based quantitative structure–activity relationship (FB-QSAR) for fragment-based drug design. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 295–304.
- [185] 比多岡清司, インフルエンザノイラミニダーゼ–シアル酸誘導体複合体相互作用の非経験的フラグメント分子軌道法計算に基づく相関解析. 構造活性相関部会・ニューズレター (*SAR News*), **2011**, *20*, 8–14.
- [186] Kim, C. U.; Lew, W.; Williams, M. A.; Wu, H.; Zhang, L.; Chen, X.; Escarpe, P. A.; Mendel, D. B.; Laver, W. G.; Stevens, R. C. Structure–activity relationship studies of novel carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451–2460.
- [187] Leo, A. J. *ClogP for Windows, Version 4.0*; BioByte Corp.: 201 West 4th St., Suite 204, Claremont, CA 91711, U.S.A., 2001.
- [188] Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [189] Russell, R. J.; Haire, L. F.; Stevens, D. J.; Collins, P. J.; Lin, Y. P.; Blackburn, G. M.; Hay, A. J.; Gamblin, S. J.; Skehel, J. J. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* **2006**, *443*, 45–49.
- [190] Bonnet, P.; Bryce, R. A. Molecular dynamics and free energy analysis of neuraminidase–ligand interactions. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 946–957.
- [191] Bonnet, P.; Bryce, R. A. Scoring binding affinity of multiple ligands using implicit solvent and a single molecular dynamics trajectory: application to influenza neuraminidase. *J. Mol. Graph. Model.* **2005**, *24*, 147–156.
- [192] Dimmock, N. J. Dependence of the activity of an influenza virus neuraminidase upon Ca^{2+} . *J. Gen. Virol.* **1971**, *13*, 481–483.
- [193] Carroll, S. M.; Paulson, J. C. Complete metal ion requirement of influenza virus N1 neuraminidases. *Arch. Virol.* **1982**, *71*, 273–277.
- [194] Chong, A. K. J.; Pegg, M. S.; von Itzstein, M. Influenza virus sialidase: effect of calcium on steady-state kinetic parameters. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1077*, 65–71.
- [195] Smith, B. J.; Huyton, T.; Joosten, R. P.; McKimm-Breschkin, J. L.; Zhang, J. G.; Luo, C.

- S.; Lou, M.-Z.; Labrou, N. E.; Garrett, T. P. J. Structure of a calcium-deficient form of influenza virus neuraminidase: implications for substrate binding. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 947–952.
- [196] Collins, P. J.; Haire, L. F.; Lin, Y. P.; Liu, J.; Russell, R. J.; Walker, P. A.; Skehel, J. J.; Martin, S. R.; Hay, A. J.; Gamblin, S. J. Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature* **2008**, *453*, 1258–1261.
- [197] Dolinsky, T. D.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–W667.
- [198] SYBYL7.0 Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MI 63144, USA.
- [199] Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [200] Darden, T. A.; York, D. M.; Pedersen, L. G. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089–10092.
- [201] Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P. A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049–1074.
- [202] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and testing of a general Amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [203] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision C.02; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2004.
- [204] Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n -alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327–341.
- [205] Berendsen, H. J. C.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A.; Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684–3690.
- [206] Xu, X.; Zhu, X.; Dwek, R. A.; Stevens, J.; Wilson, I. A. Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J. Virol.* **2008**, *82*, 10493–10501.
- [207] Varghese, J. N.; Epa, V. C.; Colman, P. M. Three-dimensional structure of the complex of 4-guanidino-Neu5Ac2en and influenza virus neuraminidase. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 1081–1087.
- [208] Taylor, N. R.; Cleasby, A.; Singh, O.; Skarzynski, T.; Wonacott, A. J.; Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Howes, P. D.; Cherry, P. C.; Bethell, R.; Colman, P.; Varghese, J.

- Dihydropyranocarboxamides related to zanamivir: a new series of inhibitors of influenza virus sialidases. 2. Crystallographic and molecular modeling study of complexes of 4-amino-4H-pyran-6-carboxamides and sialidase from influenza virus types A and B. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 798–807.
- [209] Smith, B. J.; Colman, P. M.; von Itzstein, M.; Danylec, B.; Varghese, J. N. Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 689–696.
- [210] Varghese, J. N.; Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Blick, T. J.; Sahasrabudhe, A.; McKimm-Breschkin, J. L.; Colman, P. M. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* **1998**, *6*, 735–746.
- [211] Smith, B. J.; McKimm-Breshkin, J. L.; McDonald, M.; Fernley, R. T.; Varghese, J. N.; Colman, P. M. Structural studies of the resistance of influenza virus neuraminidase to inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2207–2212.
- [212] Wu, X.; Brooks, B. R. Self-guided Langevin dynamics simulation method. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *381*, 512–518.
- [213] Yang, L.; Tan, C.-H.; Hsieh, M.-J.; Wang, J.; Duan, Y.; Cieplak, P.; Caldwell, J.; Kollman, P. A.; Luo, R. New-generation amber united-atom force field. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 13166–13176.
- [214] Aruksakunwong, O.; Malaisree, M.; Decha, P.; Sompornpisut, P.; Parasuk, V.; Pianwanit, S.; Hannongbua, S. On the lower susceptibility of oseltamivir to influenza neuraminidase subtype N1 than those in N2 and N9. *Biophys. J.* **2007**, *92*, 798–807.
- [215] Malaisree, M.; Rungrotmongkol, T.; Decha, P.; Intharathep, P.; Aruksakunwong, O.; Hannongbua, S. Understanding of known drug-target interactions in the catalytic pocket of neuraminidase subtype N1. *Proteins* **2008**, *71*, 1908–1918.
- [216] Malaisree, M.; Rungrotmongkol, T.; Nunthaboot, N.; Aruksakunwong, O.; Intharathep, P.; Decha, P.; Sompornpisut, P.; Hannongbua, S. Source of oseltamivir resistance in avian influenza H5N1 virus with the H274Y mutation. *Amino Acids* **2009**, *37*, 725–732.
- [217] Mitrasinovic, P. M. On the structure-based design of novel inhibitors of H5N1 influenza A virus neuraminidase (NA). *Biophys. Chem.* **2009**, *140*, 35–38.
- [218] Li, Y.; Zhou, B.; Wang, R. Rational design of tamiflu derivatives targeting at the open conformation of neuraminidase subtype 1. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *28*, 203–219.
- [219] Wen, W.-H.; Wang, S.-Y.; Tsai, K.-C.; Cheng, Y.-S. E.; Yang, A.-S.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. Analogs of zanamivir with modified C4-substituents as the inhibitors against the group-1 neuraminidases of influenza viruses. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4074–4084.
- [220] Varghese, J. N.; Smith, P. W.; Sollis, S. L.; Blick, T. J.; Sahasrabudhe, A.; McKimm-Breschkin, J. L.; Colman, P. M. Drug design against a shifting target: a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase. *Structure* **1998**, *6*, 735–746.
- [221] Smith, B. J.; McKimm-Breshkin, J. L.; McDonald, M.; Fernley, R. T.; Varghese, J. N.; Colman, P. M. Structural studies of the resistance of influenza virus neuraminidase to inhibitors. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2207–2212.
- [222] Yang, J.; Wu, J.; Steichen, J. M.; Kornev, A. P.; Deal, M. S.; Li, S.; Sankaran, B.; Woods, V. L., Jr.; Taylor, S. S. A conserved Glu–Arg salt bridge connects coevolved motifs that define the eukaryotic protein kinase fold. *J. Mol. Biol.* **2012**, *415*, 666–679.
- [223] Hansch, C.; Smith, R. N.; Rockoff, A.; Calef, D. F.; Jow, P. Y.; Fukunaga, J. Y. Structure–activity relationships in papain and bromelain ligand interactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **1977**, *183*, 383–392.

- [224] Ikeguchi, M.; Ueno, J.; Sato, M.; Kidera, A. Protein structural change upon ligand binding: linear response theory. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *94*, 078102.
- [225] Chuman, H.; Mori, A.; Tanaka, H. Prediction of the 1-octanol/H₂O partition coefficient, log *P*, by *ab initio* MO calculations: hydrogen-bonding effect of organic solutes on log *P*. *Anal. Sci.* **2002**, *18*, 1015–1020.
- [226] Chuman, H.; Mori, A.; Tanaka, H.; Yamagami, C.; Fujita, T. Analyses of the partition coefficient, log *P*, using *ab initio* MO parameter and accessible surface area of solute molecules. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 2681–2697.
- [227] Chuman, H. Toward basic understanding of the partition coefficient log *P* and its application in QSAR 1. *SAR QSAR Environ. Res.* **2008**, *19*, 71–79.
- [228] Achyuthan, K. E.; Achyuthan, A. M. Comparative enzymology, biochemistry and pathophysiology of human *exo-α*-sialidases (neuraminidases). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *129*, 29–64.
- [229] Miyagi, T.; Takahashi, K.; Hata, K.; Shiozaki, K.; Yamaguchi, K. Sialidase significance for cancer progression. *Glycoconjugate J.* **2012**, *29*, 567–577.
- [230] Monti, E.; Miyagi, T. Structure and function of mammalian sialidases. *Top. Curr. Chem.*, in press.
- [231] Meindl, P.; Tuppy, H. 2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids. II. Competitive inhibition of *Vibrio cholerae* neuraminidase by 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acids. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1969**, *350*, 1088–1092.
- [232] Meindl, P.; Bodo, G.; Palese, P.; Schulman, J.; Tuppy, H. Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid. *Virology* **1974**, *58*, 457–463.
- [233] Holzer, C. T.; von Itzstein, M.; Jin, B.; Pegg, M. S.; Stewart, W. P.; Wu, W.-Y. Inhibition of sialidases from viral, bacterial and mammalian sources by analogues of 2-deoxy-2,3-dihydro-*N*-acetylneuraminic acid modified at the C-4 position. *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 40–44.
- [234] Miyagi, T.; Kato, K.; Ueno, S.; Wada, T. Aberrant expression of sialidase in cancer. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2004**, *16*, 371–381.
- [235] Pshezhetsky, A. V.; Richard, C.; Michaud, L.; Igdoura, S.; Wang, S.; Elsliger, M.-A.; Qu, J.; Leclerc, D.; Gravel, R.; Dallaire, L.; Potier, M. Cloning, expression and chromosomal mapping of human lysosomal sialidase and characterization of mutations in sialidosis. *Nat. Genet.* **1997**, *15*, 316–320.
- [236] Monti, E.; Preti, A.; Rossi, E.; Ballabio, A.; Borsani, G. Cloning and characterization of NEU2, a human gene homologous to rodent soluble sialidases. *Genomics* **1999**, *57*, 137–143.
- [237] Wada, T.; Yoshikawa, Y.; Tokuyama, S.; Kuwabara, M.; Akita, H.; Miyagi, T. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a human ganglioside sialidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261*, 21–27.
- [238] Monti, E.; Bassi, M. T.; Bresciani, R.; Civini, S.; Croci, G. L.; Papini, N.; Riboni, M.; Zanchetti, G.; Ballabio, A.; Preti, A.; Tettamanti, G.; Venerando, B.; Borsani, G. Molecular cloning and characterization of NEU4, the fourth member of the human sialidase gene family. *Genomics* **2004**, *83*, 445–453.
- [239] Chavas, L. M. G.; Tringali, C.; Fusi, P.; Venerando, B.; Tettamanti, G.; Kato, R.; Monti, E.; Wakatsuki, S. Crystal structure of the human cytosolic sialidase Neu2. Evidence for the dynamic nature of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 469–475.
- [240] Edwards, E. T.; Truffa, M. M. One-year post pediatric exclusivity postmarketing

- adverse events review drug: oseltamivir phosphate, 2005. U.S. Food and Drug Administration Centre for Drug Evaluation and Research. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/05/briefing/2005-4180b_06_01_Tamiflu%20AE_reviewed.pdf (accessed May 1, 2011).
- [241] Magesh, S.; Moriya, S.; Suzuki, T.; Miyagi, T.; Ishida, H.; Kiso, M. Design, synthesis, and biological evaluation of human sialidase inhibitors. Part 1: selective inhibitors of lysosomal sialidase (NEU1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 532–537.
- [242] Hata, K.; Koseki, K.; Yamaguchi, K.; Moriya, S.; Suzuki, Y.; Yingsakmongkon, S.; Hirai, G.; Sodeoka, M.; von Itzstein, M.; Miyagi, T. Limited inhibitory effects of oseltamivir and zanamivir on human sialidases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3484–3491.
- [243] Magesh, S.; Savita, V.; Moriya, S.; Suzuki, T.; Miyagi, T.; Ishida, H.; Kiso, M. Human sialidase inhibitors: design, synthesis, and biological evaluation of 4-acetamido-5-acylamido-2-fluoro benzoic acids. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4595–4603.
- [244] Chavas, L. M. G.; Kato, R.; Suzuki, N.; von Itzstein, M.; Mann, M. C.; Thomson, R. J.; Dyason, J. C.; McKimm-Breschkin, J.; Fusi, P.; Tringali, C.; Venerando, B.; Tettamanti, G.; Monti, E.; Wakatsuki, S. Complexity in influenza virus targeted drug design: interaction with human sialidases. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2998–3002.
- [245] Zou, Y.; Albohy, A.; Sandbhor, M.; Cairo, C. W. Inhibition of human neuraminidase 3 (NEU3) by C9-triazole derivatives of 2,3-didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7529–7533.
- [246] Albohy, A.; Mohan, S.; Zheng, R. B.; Pinto, B. M.; Cairo, C. W. Inhibitor selectivity of a new class of oseltamivir analogs against viral neuraminidase over human neuraminidase enzymes. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2817–2822.
- [247] Li, Y.; Cao, H.; Yu, H.; Chen, Y.; Lau, K.; Qu, J.; Thon, V.; Sugiarto, G.; Chen, X. Identifying selective inhibitors against the human cytosolic sialidase NEU2 by substrate specificity studies. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 1060–1072.
- [248] Magesh, S.; Sriwilajaroen, N.; Moriya, S.; Ando, H.; Miyagi, T.; Suzuki, Y.; Ishida, H.; Kiso, M. Evaluation of a set of C9 *N*-acyl Neu5Ac2en mimetics as viral sialidase selective inhibitors. *Int. J. Med. Chem.* (**2011**) article id 539245 P7.
- [249] 比多岡清司, ヒトノイラミニダーゼ-シアル酸誘導体複合体相互作用の非経験的フラグメント分子軌道法計算に基づく相関解析 (LERE-QSAR). 構造活性相関部会・ニューズレター (*SAR News*), **2012**, *22*, 8–16.
- [250] Tringali, C.; Papini, N.; Fusi, P.; Croci, G.; Borsani, G.; Preti, A.; Tortora, P.; Tettamanti, G.; Venerando, B.; Monti, E. Properties of recombinant human cytosolic sialidase HsNEU2. The enzyme hydrolyzes monomerically dispersed GM1 ganglioside molecules. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3169–3179.
- [251] Gubareva, L. V.; Webster, R. G.; Hayden, F. G. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3403–3408.
- [252] Li, C.-Y.; Yu, Q.; Ye, Z.-Q.; Sun, Y.; He, Q.; Li, X.-M.; Zhang, W.; Luo, J.; Gu, X.; Zheng, X.; Wei, L. A nonsynonymous SNP in human cytosolic sialidase in a small Asian population results in reduced enzyme activity: potential link with severe adverse reactions to oseltamivir. *Cell Res.* **2007**, *17*, 357–362.
- [253] Monti, E.; Preti, A.; Nesti, C.; Ballabio, A.; Borsani, G. Expression of a novel human

- sialidase encoded by the NEU2 gene. *Glycobiology* **1999**, *9*, 1313–1321.
- [254] Bonten, E.; van der Spoel, A.; Fornerod, M.; Grosveld, G.; d'Azzo, A. Characterization of human lysosomal neuraminidase defines the molecular basis of the metabolic storage disorder sialidosis. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 3156–3169.
- [255] Milner, C. M.; Smith, S. V.; Carrillo, M. B.; Taylor, G. L.; Hollinshead, M.; Campbell, R. D. Identification of a sialidase encoded in the human major histocompatibility complex. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4549–4558.
- [256] d'Azzo, A.; Hoogeveen, A.; Reuser, A. J.; Robinson, D.; Galjaard, H. Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, *79*, 4535–4539.
- [257] Verheijen, F. W.; Palmeri, S.; Hoogeveen, A. T.; Galjaard, H. Human placental neuraminidase. Activation, stabilization and association with β -galactosidase and its 'protective' protein. *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 315–321.
- [258] Galjart, N. J.; Gillemans, N.; Harris, A.; van der Horst, G. T.; Verheijen, F. W.; Galjaard, H.; d'Azzo, A. Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal beta-galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases. *Cell* **1988**, *54*, 755–764.
- [259] van der Horst, G. T.; Galjart, N. J.; d'Azzo, A.; Galjaard, H.; Verheijen, F. W. Identification and *in vitro* reconstitution of lysosomal neuraminidase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1317–1322.
- [260] van der Spoel, A.; Bonten, E.; d'Azzo, A. Transport of human lysosomal neuraminidase to mature lysosomes requires protective protein/cathepsin A. *EMBO J.* **1998**, *17*, 1588–1597.
- [261] Bonten, E. J.; Campos, Y.; Zaitsev, V.; Nourse, A.; Waddell, B.; Lewis, W.; Taylor, G.; d'Azzo, A. Heterodimerization of the sialidase NEU1 with the chaperone protective protein/cathepsin A prevents its premature oligomerization. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28430–28441.
- [262] Carrillo, M. B.; Milner, C. M.; Ball, S. T.; Snoek, M.; Campbell, R. D. Cloning and characterization of a sialidase from the murine histocompatibility-2 complex: low levels of mRNA and a single amino acid mutation are responsible for reduced sialidase activity in mice carrying the *Neu1^a* allele. *Glycobiology* **1997**, *7*, 975–986.
- [263] Lowden, J. A.; O'Brien, J. S. Sialidosis: a review of human neuraminidase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* **1979**, *31*, 1–18.
- [264] Thomas, G. H. Disorders of glycoprotein degradation: α -mannosidosis, β -mannosidosis, fucosidosis, and sialidosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed.; Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D., Eds.; McGraw-Hill: New York, 2001; pp 3507–3534.
- [265] d'Azzo, A.; Andria, G.; Strisciuglio, G.; Galjaard, H. Galactosialidosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed.; Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D., Eds.; McGraw-Hill: New York, 2001; pp 3811–3826.
- [266] Taylor, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 830–837.
- [267] Copley, R. R.; Russell, R. B.; Ponting, C. P. Sialidase-like Asp-boxes: sequence-similar structures within different protein folds. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 285–292.
- [268] Chaudhuri, I.; Söding, J.; Lupas, A. N. Evolution of the β -propeller fold. *Proteins* **2008**, *71*, 795–803.
- [269] Quistgaard, E. M.; Thirup, S. S. Sequence and structural analysis of the Asp-box motif

- and Asp-box beta-propellers; a widespread propeller-type characteristic of the Vps10 domain family and several glycoside hydrolase families. *BMC Struct. Biol.* **2009**, *9*, 46.
- [270] Roggentin, P.; Schauer, R.; Hoyer, L. L.; Vimr, E. R. The sialidase superfamily and its spread by horizontal gene transfer. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 915–921.
- [271] Magesh, S.; Suzuki, T.; Miyagi, T.; Ishida, H.; Kiso, M. Homology modeling of human sialidase enzymes NEU1, NEU3 and NEU4 based on the crystal structure of NEU2: hints for the design of selective NEU3 inhibitors. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 196–207.
- [272] Lukong, K. E.; Elsliger, M.-A.; Chang, Y.; Richard, C.; Thomas, G.; Carey, W.; Tytki-Szymanska, A.; Czartoryska, B.; Buchholz, T.; Criado, G. R.; Palmeri, S.; Pshezhetsky, A. V. Characterization of the sialidase molecular defects in sialidosis patients suggests the structural organization of the lysosomal multienzyme complex. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 1075–1085.
- [273] Naganawa, Y.; Itoh, K.; Shimmoto, M.; Takiguchi, K.; Doi, H.; Nishizawa, Y.; Kobayashi, T.; Kamei, S.; Lukong, K. E.; Pshezhetsky, A. V.; Sakuraba, H. Molecular and structural studies of Japanese patients with sialidosis type 1. *J. Hum. Genet.* **2000**, *45*, 241–249.
- [274] Lukong, K. E.; Landry, K.; Elsliger, M.-A.; Chang, Y.; Lefrancois, S.; Morales, C. R.; Pshezhetsky, A. V. Mutations in sialidosis impair sialidase binding to the lysosomal multienzyme complex. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 17286–17290.
- [275] Itoh, K.; Naganawa, Y.; Matsuzawa, F.; Aikawa, S.; Doi, H.; Sasagasako, N.; Yamada, T.; Kira, J.; Kobayashi, T.; Pshezhetsky, A. V.; Sakuraba, H. Novel missense mutations in the human lysosomal sialidase gene in sialidosis patients and prediction of structural alterations of mutant enzymes. *J. Hum. Genet.* **2002**, *47*, 29–37.
- [276] Wang, D.; Zaitsev, S.; Taylor, G.; d'Azzo, A.; Bonten, E. Protective protein/cathepsin A rescues *N*-glycosylation defects in neuraminidase-1. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1790*, 275–282.
- [277] Martí-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Melo, F.; Sali, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291–325.
- [278] Ohlson, T.; Wallner, B.; Elofsson, A. Profile–profile methods provide improved fold-recognition: a study of different profile–profile alignment methods. *Proteins* **2004**, *57*, 188–197.
- [279] Xiang, Z. Advances in homology protein structure modeling. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2006**, *7*, 217–227.
- [280] Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402.
- [281] UniProt database. <http://www.uniprot.org/> (accessed Aug 6, 2012).
- [282] Vinogradova, M. V.; Michaud, L.; Mezentsev, A. V.; Lukong, K. E.; El-Alfy, M.; Morales, C. R.; Potier, M.; Pshezhetsky, A. V. Molecular mechanism of lysosomal sialidase deficiency in galactosialidosis involves its rapid degradation. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 641–650.
- [283] PSI-BLAST - Protein Similarity Search. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/psiblast/> (accessed Aug 6, 2012).
- [284] Gaskell, A.; Crennell, S.; Taylor, G. The three domains of a bacterial sialidase: a β -propeller, an immunoglobulin module and a galactose-binding jelly-roll. *Structure*

- 1995**, 3, 1197–1205.
- [285] EMBOSS Stretcher - Pairwise Sequence Alignment. http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_stretcher/ (accessed Aug 6, 2012).
- [286] Larsson, P.; Wallner, B.; Lindahl, E.; Elofsson, A. Using multiple templates to improve quality of homology models in automated homology modeling. *Protein Sci.* **2008**, 17, 990–1002.
- [287] Gibrat, J.-F.; Madej, T.; Bryant, S. H. Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 377–385.
- [288] MOE (The Molecular Operating Environment) Version 2011.10, software available from Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbrooke Street West, Suite 910, Montreal, Canada H3A 2R7. <http://www.chemcomp.com>.
- [289] Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 779–815.
- [290] Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, 26, 283–291.
- [291] Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, 22, 2577–2637.
- [292] Lüthy, R.; Bowie, J. U.; Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **1992**, 356, 83–85.
- [293] Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Coates, J. A. V.; Healy, N.; Hiscox, S. A.; Pearson, B. A.; Ryan, D. M.; Ticehurst, J.; Tilling, J.; Walcott, S. M.; Penn, C. R. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 1473–1479.
- [294] Seyrantepe, V.; Poupetova, H.; Froissart, R.; Zobot, M.-T.; Maire, I.; Pshezhetsky, A. V. Molecular pathology of NEU1 gene in sialidosis. *Hum. Mutat.* **2003**, 22, 343–352.