

(論文内容の要旨)

近年、タンパク質ーリガンド複合体の結晶構造データが多数蓄積された結果、CH-O、CH- π 、 π - π 、カチオン- π 相互作用などの非結合相互作用がタンパク質とリガンドの結合に重要な寄与をしていることが明らかになってきた。これらは、古くから知られている水素結合などに対して、非カノニカル相互作用と呼ばれている。しかし、非カノニカル相互作用の中には、その実体（性質、構造依存性やエネルギーなど）が明らかでないものが存在する。タンパク質の特異的分子認識の機構をより良く理解するためには、非カノニカル相互作用の実態と実体を明らかにする必要がある。

本研究では、結晶構造データベースを網羅的に解析することにより、タンパク質とリガンドの結合に関与する非結合相互作用の実態を統計的に明らかにするとともに、高頻度で見出された相互作用の内、実体が明らかでない Cl- π 相互作用とアミド- π 相互作用について、高精度電子状態計算により構造依存性と相互作用の強さを理論的に解明した。本研究の成果は、構造に基づくドラッグデザイン (Structure-Based Drug Design; SBDD) における新しい視点を提供するとともに、いまだ予測精度が満足できるレベルに到達しているとは言いがたい、タンパク質とリガンドのドッキングシミュレーション法の改良に向けての基礎となる知見を提供するものである。

第一章では、Protein Data Bank (PDB) 収載の結晶構造に含まれるタンパク質ーリガンド複合体における非結合相互作用の網羅的解析とその結果について述べた。14種の極性および芳香族アミノ酸残基について、おのおのが関与する非結合性相互作用を解析した結果、既知相互作用に加え、詳細が明らかでない相互作用がリガンドの結合に関与している例が多数見出された。一例を挙げると、メチオニンが関与する相互作用として、CH-S 相互作用が頻繁に見出された。これを含めて、アミノ酸残基ごとの非結合相互作用の指向性（出現頻度の比）を求めた。対象としたすべてのアミノ酸残基において、NH-O、OH-N および OH-O 相互作用などの典型的な水素結合が高頻度で見出された。一方、CH- π 相互作用などに代表される非カノニカル相互作用に対する指向性も明らかになったが、同様の性質を持つアミノ酸側鎖間で必ずしも指向性が一致しないという興味深い結果を得た。また、SBDD 用ソフトウェアで使用されるドッキングパラメータやスコア関数で考慮されていない Cl- π 相互作用などの非カノニカル相互作用をいくつか見出した。

第二章では、PDB 収載の構造データの解析により高頻度で見出されたにもかかわらず、これまでにその重要性がほとんど認識されていなかった相互作用の一つである Cl- π 相互作用を取り上げ、高精度 *ab initio* 分子軌道法(MO)計算による理論的解析を行った結果について述べた。この相互作用は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファンとヒスチジンの芳香族側鎖とリガンドの塩素原子間に高頻度で見出されたが、その相互作用の性質の詳細は明らかでなかった。理論計算では、アミノ酸の側鎖芳香環をベンゼン、フェノールとインドールでモデル化し、クロロメタン、クロロエテンとクロロエチンを、塩素原子を含むリガンドのモデル分子として、これらの分子間相互作用エネルギーを求めた。実験構造データの詳細な解析から、Cl- π 相互作用は

二種類の相互作用構造（塩素原子が芳香環原子上もしくは C-C 結合上に位置する“edge-on”構造と、芳香環中心上に位置する“face-on”構造）を採ることが見出されたが、これらが真に Cl- π 相互作用に起因するものであるかどうかは、構造だけでは判断できない（大きなリガンドでは、塩素原子以外の他の部分が π 電子系と引力的に相互作用していて、そのせいで塩素原子が芳香環に近づいている可能性がある）。これを検証するために、上記モデル分子系を用いて、高精度 *ab initio* MO 計算によりポテンシャルエネルギー面を広範囲にわたって調査し、この相互作用のエネルギーと構造依存性から、上記二種類の構造が Cl- π 相互作用によるものであることを明らかにした。また、Cl- π 相互作用の相互作用エネルギーは -2.0 kcal/mol 程度で、CH- π 相互作用 (-1.5 kcal/mol 程度) よりも強い相互作用であることを明らかにした。

第三章では、結晶構造データの解析から見出されたアミド- π 相互作用についての、高精度 *ab initio* MO 計算による理論的解析とその結果について述べた。この相互作用は、結晶構造データベースの検索により、アスパラギン側鎖またはグルタミン側鎖とリガンドの芳香環の間に見出された相互作用であるが、その詳細は明らかでなかった。実験構造データの統計的解析から、アミド- π 相互作用は、アミド基が芳香環面に垂直な構造 (T 型) および平行になる構造 (スタック型) が高い頻度で見出された。T 型構造でアミドの NH 基が芳香環に接近している場合は、NH- π 相互作用と理解されるが、カルボニル基が芳香環に接近すれば (>C=O- π 型構造)、ローンペア- π 相互作用となる。また、スタック型構造は π - π 相互作用となる。本研究ではホルムアミドとベンゼンをモデル分子として、高精度 *ab initio* MO 計算を実施し、アミド- π 相互作用の構造依存性を精査した。その結果、NH- π 相互作用が有利な T 型構造が最も安定で、その相互作用エネルギーは -3.8 kcal/mol 程度であることが明らかになった。また、 π - π 相互作用が有利なスタック型構造でも安定化相互作用が働くこと、および、>C=O- π 型構造は単独では不安定であるが、ローンペア- π 相互作用の反発エネルギーは十分小さい (1 kcal/mol 以下) ので、他の部分で安定化相互作用が同時に働く場合には、カルボニル基が芳香環に接近できることを示した。

以上、本研究の成果として得られたタンパク質とリガンド間に働く非カノニカル相互作用についての知見は、ドラッグデザインにおける新しい視点をもたらすとともに、SBDD におけるドッキングシミュレーションの精度改善に向けての基礎となるものである。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ドラッグデザインで用いられるドッキングシミュレーションの高精度化を目的として、タンパク質とリガンドの分子間相互作用について検討を行い、以下の新しい知見を得た。

まず、Protein Data Bank (PDB)に登録されている高分解能結晶構造を対象として、タンパク質とリガンド間の非結合相互作用を網羅的に解析した。結果、対象とした 14 種のアミノ酸残基すべてにおいて、よく知られた水素結合が高頻度に見出された一方、CH-O、CH- π 相互作用などのいわゆる非カノニカル相互作用がリガンドの結合に関与している例が多数見出された。これらに加えて、メチオニン側鎖の硫黄原子が関与する CH-S および S- π 相互作用、アルギニン側鎖のグアニジウム窒素原子が関与する CH-N 相互作用、アスパラギン酸およびグルタミン酸側鎖カルボキシル基がリガンド芳香環に接近するカルボキシル- π 相互作用、フェニルアラニンなどの芳香族側鎖が関与するハロゲン- π 相互作用など、詳細が明らかでない相互作用がリガンドの結合に関与している例を多数見出した。

次に、上記の詳細が明らかでない相互作用のうち、Cl- π 相互作用について構造依存性と相互作用エネルギーを高精度 *ab initio* MO 計算により検討した。計算は、クロロメタン-ベンゼン分子などのモデル系について行った。分子間相互作用エネルギーは、ハートリー・フォックエネルギーとカップルドクラスター理論 (CCSD(T)) による電子相関エネルギーをそれぞれ完全基底関数極限に外挿した値を求め、これらの和として算出した。結果、Cl- π 相互作用エネルギーは-2.01 kcal/mol で、引力の主成分は分散力であることが判明した。また、結晶構造中では塩素原子が芳香環原子に接近する構造が優位に見出されたが、計算からは、塩素原子が芳香環に垂直に接近する場合は結合位置依存性がほとんどないことが明らかとなった。したがって、現実のリガンドでは、塩素原子以外の部分と芳香環または近くの他のアミノ酸残基との付加的な相互作用により、さまざまな配置を取り得る可能性が示唆された。Cl- π 相互作用の持つこの構造的自由度は、リガンドを設計する際に有用な知見となることが期待される。

最後に、アミド基と芳香環間に働く非結合相互作用について理論的解析を行った。ホルムアミド-ベンゼン分子をモデル分子系として、高精度 *ab initio* MO 計算を行い、相互作用の構造依存性を精査した。結果、NH 基が芳香環に垂直に接近する NH- π 相互作用が有利な構造が最安定で、その相互作用エネルギーは-3.75 kcal/mol と見積もられた。次いで、アミド基平面と芳香環が平行に接近する π - π 相互作用が有利な構造が安定 (-2.08 kcal/mol) であることが判明した。さらに、C=O 基が芳香環に接近する構造は、酸素原子のローンペア電子と芳

香環の π 電子間の反発に起因する不安定化が生じるが、そのエネルギーは十分小さい (1 kcal/mol) ため、他の付加的な安定化相互作用が働く場合には、この配置を取り得ることが示唆された。

以上、本論文は、タンパク質とリガンドの分子間相互作用に関して、各アミノ酸残基の特徴的な相互作用を明らかにし、さらに、詳細が十分に明らかでなかった Cl⁻ π 相互作用およびアミド- π 相互作用について、相互作用エネルギーと構造依存性を理論計算により明らかにしたものであり、本研究の成果はドラッグデザインにおけるドッキングシミュレーションの精度向上のための基礎的知見を提供するものである。

よって本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。
さらに、平成 21 年 8 月 24 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。