

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	小澤 知永
論文題目	<b>Theoretical Studies on CH/<math>\pi</math> Hydrogen Bond in Protein-Ligand and Protein-Protein Bindings</b> (タンパク質-リガンド結合およびタンパク質-タンパク質結合におけるCH/ $\pi$ 水素結合の理論的研究)		
(論文内容の要旨) タンパク質と他の分子 (生体分子、医薬品分子等) との結合では、水素結合、イオン結合、van der Waals 相互作用等が働くことが知られていたが、最近、CH基と $\pi$ 電子基間の引力的な相互作用 (CH/ $\pi$ 水素結合) が重要な寄与をすることが示唆されている。しかし、CH/ $\pi$ 水素結合の強さ (相互作用エネルギー) はメタンとベンゼンなどの小さな分子間について実験的・理論的に明らかにされているが、タンパク質については、構造データからその存在が示唆されるのみで、相互作用の強さに関するデータは皆無に近い。最近、巨大分子の計算が可能なフラグメント分子軌道 (FMO) 法が開発され、実在タンパク質の分子間相互作用の強さを量子化学計算によって評価できるようになった。本研究では、タンパク質のリガンド認識、リガンド選択性およびリガンド結合に伴う配座の変化などの現象におけるCH/ $\pi$ 水素結合の関与を明らかにすることを目的として、FMO法による理論的研究を行い、以下の新しい知見を得た。  <b>第1章 「Leukocyte-specific Protein Tyrosine (LCK) キナーゼのリガンド結合におけるCH/<math>\pi</math>水素結合の寄与と医薬品分子設計」</b> 第1章ではLCKキナーゼのリガンド結合におけるCH/ $\pi$ 水素結合の寄与について述べた。LCKキナーゼとリード化合物 (IC <sub>50</sub> : 220nM) との複合体について、電子相関を考慮したFMO法 (FMO-MP2/6-31G) で計算を行い、各アミノ酸残基とこの化合物の相互エネルギーを評価した。結果、最も重要なヒンジ領域での水素結合が-19.4kcal/molであり、次いでアデニン認識部分とのCH/ $\pi$ 水素結合による安定化が-8.8kcal/molと大きな寄与をしていることが分かった。この結果に基づいて、CH/ $\pi$ 水素結合を強くすることで活性を高めることができると予測し、リード化合物の2箇所メチル基を導入して $\pi$ 電子密度を高めた化合物を設計した。計算で相互作用が-7.0kcal/mol強くなることを確認した後、設計化合物を合成し予測どおり高い活性 (20nM) を持つことを確認した。  <b>第2章 「<math>\beta</math>2アドレナリン受容体の活性状態と不活性状態の安定化に及ぼすCH/<math>\pi</math>水素結合」</b> 第2章では $\beta$ 2アドレナリンのアゴニスト結合状態とアンタゴスト結合状態に及ぼすCH/ $\pi$ 水素結合の役割について述べた。両状態における構造安定化要因を比較するために、FMO法によりリガンド結合部位周辺のアミノ酸残基間の相互作用を計算し			

た。アゴニスト結合状態では、Phe282が周囲の残基から受ける安定化が-12.6kcal/mol減少していた。この原因は、主鎖間の水素結合消失（5.5kcal/mol）とTrp286とのC H/ $\pi$ 水素結合消失（3.6kcal/mol）であった。Phe282はこの受容体の活性化に重要な役割を果たすことが指摘されている。本研究は、Phe282と周辺残基とのCH/ $\pi$ 水素結合が、 $\beta$ 2アドレナリン受容体の状態変化を制御していることを示唆するものである。

第3章 「Srcホモロジー2（SH2）ドメインの選択的ペプチド結合におけるCH/ $\pi$ 水素結合の役割」

第3章ではSrcホモロジー2（SH2）ドメインの選択的ペプチド結合におけるCH/ $\pi$ 水素結合の役割について述べた。SH2タンパク質はリン酸化チロシン（pTyr）とpTyr(+2) 又はpTyr(+3) の位置を認識し、標的タンパク質と結合する。その認識機構を解明するためにFMO（FMO-MP2/6-31G\*）計算を行い、各SH2タンパク質と基質モデルペプチドとの相互作用を残基ごとに評価した。pTyr(+3)を認識するSH2タンパク質では、選択性に重要なアミノ酸とタンパク質の芳香属性アミノ酸間に約-5kcal/molの強さのCH/ $\pi$ 水素結合が見られた。Grb2では、TrpとpTyr(+2)のAsnとの間でNH-O水素結合(-14.5kcal/mol)とともに3本のCH/ $\pi$ 水素結合が形成されている。これらの結果は、CH/ $\pi$ 水素結合がペプチド選択性において主要な役割を果たしていることを示唆するものである。

第4章 「プロリン認識ドメインの分子認識におけるCH/ $\pi$ 水素結合の役割」

第4章ではプロリンリッチな配列をコアモチーフとして認識するタンパク質ファミリー（PRDs）のプロリン認識におけるCH/ $\pi$ 水素結合の役割を解明するために、8種類のPRDsと基質モデルペプチドの相互作用をFMO法（FMO-MP2/6-31G\*）で計算した。それらの中には19個のプロリンが存在しプロリンとPRDsとのCH/ $\pi$ 水素結合のエネルギーは -1.3 ~ -7.7 kcal/molに分布していた。一例を挙げると、SH3ドメインで高度に保存されているTrpは、Abl-SH3においてPro2\*、Pro6\*とCH/ $\pi$ 水素結合し（それぞれ-7.4kcal/molと-5.6kcal/mol）、Met4\*とはNH-O水素結合(-12.5kcal/mol)を形成していた。本研究で、CH/ $\pi$ 水素結合は多点で相互作用することにより典型的な水素結合に匹敵する強さとなり、プロリン側鎖の認識の要因であることを示唆した。

以上、著者はCH/ $\pi$ 水素結合がタンパク質のリガンド認識、受容体の状態変化およびリガンド選択性に関与することを明らかにした。CH/ $\pi$ 水素結合は、多点で相互作用することにより古典的な水素結合に匹敵する強さになること、また、CH/ $\pi$ 水素結合を強化することで阻害剤の活性を向上させ得ることを示した。後者の成果は、医薬品分子設計のための新しい指針を与えるものである。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

最近、タンパク質の安定化やリガンド結合におけるCH/ $\pi$ 水素結合の重要性が指摘されている。しかし、このことは構造データから示唆されるのみで、そのエネルギーについての知見は皆無に近い。本論文は、最近開発された巨大分子のまるごと計算が可能なフラグメント分子軌道(FMO)法により、タンパク質のリガンド認識、リガンド選択性およびリガンド結合に伴う配座の変化などの現象におけるCH/ $\pi$ 水素結合の関与をエネルギーの面から解析したものである。

著者は、まず、LCKキナーゼのリガンド認識機構を明らかにするために、リード化合物との分子間相互作用エネルギーをFMO法で計算し、各アミノ酸残基の寄与に分割して解析した。結果、アデニン認識部分とのCH/ $\pi$ 水素結合が古典的水素結合に匹敵する強さで結合に寄与していることを見出した。この結果に基づいて、CH/ $\pi$ 水素結合を増強する分子設計を行い高い活性を持つ化合物の創成に成功した。次いで、 $\beta$ 2アドレナリンのアゴニスト結合状態とアンタゴスト結合状態におけるリガンド結合部位周辺のアミノ酸残基間の相互作用を解析し、Phe282と周辺残基とのCH/ $\pi$ 水素結合の変化が状態変化を制御していることを示唆する結果を得た。さらに、SH2タンパク質の分子認識機構を解析し、CH/ $\pi$ 水素結合がペプチド選択性において主要な役割を果たしていることを示唆した。また、プロリンリッチな配列をコアモチーフとして認識するタンパク質ファミリーについて、プロリンとの間に形成される多点CH/ $\pi$ 水素結合は典型的な水素結合に匹敵する強さとなり、プロリン認識の主因であることを示唆した。

以上、本研究は、タンパク質のリガンド認識、受容体の状態変化およびリガンド選択性におけるCH/ $\pi$ 水素結合の重要性を相互作用エネルギーの面から明らかにし、理論計算に基づいてCH/ $\pi$ 水素結合を増強する分子設計を行い高活性阻害剤の創成に成功したものであり、医薬品分子設計に対して有用な知見を提供するものと評価される。

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23年10月28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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降