

学位論文

水分子の動的解析によるセリンプロテアーゼの
可逆的共有結合性阻害剤の研究

2018

増田 陽介

目次

目次	3
学位論文要旨	10
略語・用語一覧	25
序章 創薬における可逆的共有結合性阻害剤研究の重要性	30
第1節 可逆的共有結合性阻害剤	30
第2節 共有結合性阻害剤のインシリコ設計	31
第3節 共有結合性阻害剤の標的としてのセリンプロテアーゼ	33
第4節 可逆的共有結合性阻害剤のアシルトリプシン中間体の結晶構造	35
第1章 背景研究：可逆的共有結合性阻害剤ガベキサートのアシルトリプシン中 間体の結晶構造解析	40
第1節 背景	40
第2節 方法	45
第1項 架橋による結晶の物理的強度の向上	45
第1. 条件探索	45
第2. 条件最適化	47
第2項 硫酸アンモニウム除去条件の探索	50
第3項 ガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造解析	52
第3節 結果及び考察	56
第1項 架橋によるトリプシン低充填密度型斜方晶系結晶の物理的強度の向上	56
第1. 条件探索	56
第2. 条件最適化	60
第2項 硫酸アンモニウム除去条件の探索	64

第3項	ガベキサートのアシルトリプシン中間体構造の解析.....	66
第4項	トリプシンによるガベキサートの加水分解反応機構.....	78
第4節	阻害剤と基質様化合物との構造に基づく判別の検討.....	80
第1項	リガンド構造に基づく判別.....	80
第2項	求核的水分子の幾何的配置（静的特性）に基づく判別.....	82
第2章	基礎的研究：求核的水分子の動的解析.....	86
第1節	背景.....	86
第1項	水和熱力学解析による酵素反応速度定数の推定.....	86
第2項	WaterMap.....	87
第2節	方法.....	89
第1項	水和熱力学解析の準備.....	89
第2項	水和熱力学解析の妥当性の検証.....	93
第3項	水和熱力学解析.....	94
第3節	結果.....	95
第1項	水和熱力学解析の準備.....	95
第2項	水和熱力学解析の妥当性の検証.....	98
第3項	水和熱力学解析.....	99
第4項	考察.....	102
第3章	創薬研究への応用：線形判別分析による阻害剤と基質様化合物の判別....	112
第1節	序論.....	112
第2節	方法.....	112
第1項	計算手順の概要.....	112
第2項	リガンドデータセットの準備.....	114
第3項	アシルトリプシン中間体構造の構築.....	115
第4項	水和熱力学解析の準備.....	116
第5項	水和熱力学解析.....	117
第6項	半経験的分子軌道計算.....	117
第7項	線形判別分析.....	119
第3節	結果.....	120

第 1 項	リガンドデータセットの準備.....	120
第 2 項	アシルートリプシン中間体構造の構築.....	122
第 3 項	水和熱力学解析の準備.....	123
第 4 項	水和熱力学解析.....	127
第 5 項	半経験的分子軌道計算.....	132
第 6 項	線形判別分析.....	135
第 4 項	考察.....	137
第 1 項	線形判別分析について.....	137
第 2 項	求核的水分子のギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) について.....	138
第 3 項	軌道エネルギー (E_{orb}) について.....	140
第 4 項	可逆的の共有結合性阻害剤のデザイン戦略.....	141
第 4 章	今後の展望.....	146
第 1 節	適用対象となる標的蛋白質.....	146
第 2 節	共有結合性阻害剤の設計戦略.....	147
第 3 節	予測の精度.....	150
付録	154
付録 A	トリプシンの分離・精製.....	154
第 1 節	方法.....	154
第 2 節	結果.....	154
付録 B	低充填密度型斜方晶系結晶の結晶構造解析.....	156
第 1 節	方法.....	156
第 2 節	結果.....	157
付録 C	硫酸イオン除去条件の探索.....	160
第 1 節	方法.....	160
第 2 節	結果.....	161
付録 D	結晶構造を初期構造とする水和熱力学解析.....	163
第 1 節	方法.....	163
第 2 節	結果.....	164
謝辞	166

参考文献167

學位論文要旨

学位論文要旨

序章 創薬における可逆的共有結合性阻害剤研究の重要性

共有結合性阻害剤は、共有結合を形成することにより生体内の標的蛋白質の働きを阻害する。共有結合性阻害剤の長所は、少ない投与量と投与回数で標的蛋白質を阻害でき、また多くの場合、薬剤耐性を示す変異型の標的蛋白質も一定程度阻害することである。一方、共有結合性阻害剤の短所は、標的以外の蛋白質と反応し修飾することで、特異的毒性を発現する場合があることである。共有結合性阻害剤のうち、形成される共有結合が可逆的である可逆的共有結合性阻害剤は、形成される共有結合が不可逆的である不可逆的共有結合性阻害剤よりも特異的毒性を示す可能性が低い。そこで、可逆的共有結合性阻害剤として有望な化合物を、有望でない化合物と判別するためのインシリコ手法の確立を目標とし、研究を行った。

まず、共有結合性阻害剤の一般的な薬物標的であるセリンプロテアーゼのうち、代表的な酵素であるトリプシンを、本研究における標的酵素とした。トリプシンの反応機構では、His 57 N_ε原子によってプロトンを引き抜かれた Ser195 O_γ原子が、ペプチド結合のカルボニル炭素を求核攻撃し、第1の四面体中間体を経てアシル-酵素中間体を形成する（アシル化）。その後、切断されたペプチドのC末端側が活性ポケットから脱離し、活性化された水分子がアシル基のカルボニル炭素を求核攻撃し、第2の四面体中間体を経て、生成物-酵素複合体が生じる（脱アシル化）。基質と構造が類似した可逆的共有結合性阻害剤であるガベキサートの

アシルトリプシン中間体の結晶構造を解析し、既に報告されている基質様化合物のアシルトリプシン中間体の結晶構造と比較することで、ある化合物が可逆的共有結合性阻害剤となる要因が解明できる可能性があると考え、研究を行った。

第1章 背景研究：可逆的共有結合性阻害剤ガベキサートのアシルトリプシン中間体の結

晶構造解析

[背景]

ガベキサート（図 1）は、トリプシンの酵素活性を、可逆的な共有結合を形成し反応機構依存的に阻害する。ガベキサートは、その 6-グアニジノヘキサノイル部分の構造が、基質であるアルギニン含有ペプチドの 5-グアニジノペンタノイル部分の構造と類似しており、これらのアシルトリプシン中間体を比較することで、阻害剤の創薬における有用な知見が得られる可能性がある。

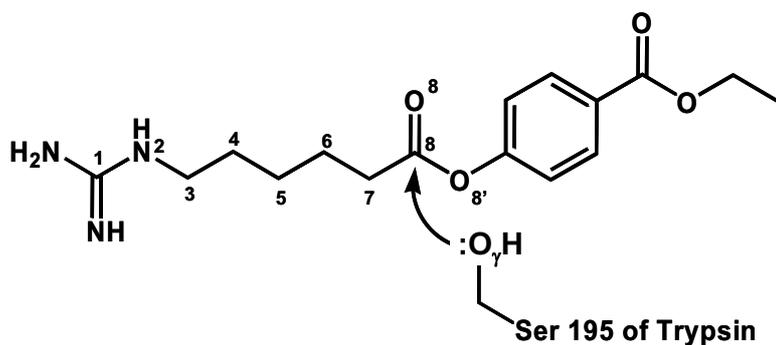


図 1. ガベキサート

トリプシンの硫酸アンモニウム析出結晶にガベキサートを浸潤させるとアシル-酵素中間体
が得られるが、活性部位に硫酸イオンが結合しており、脱アシル化反応を阻害しているもの
と思われた。そこで、本研究は、脱アシル化反応を阻害する硫酸イオンを除いた結晶を作成
し、アシル-酵素中間体を、生理的 pH において原子レベルで解析することとした。

[方法]

市販のトリプシン (Sigma) から β -トリプシンを精製した。0.7 mM β -トリプシンに、阻害
剤ベンザミジン を 400 mM 加え、硫酸アンモニウムを用いて、低充填密度型の斜方晶系結晶
を選択的に析出させた。

硫酸イオンを除くために、結晶をグルタルアルデヒド含有 3.2 M 硫酸アンモニウム溶液で
2 時間架橋処理し、結晶の物理的強度を高めた。次に、ポリエチレングリコール (PEG) 8000
を含み、硫酸アンモニウムを含まない母液に架橋処理した結晶を一晩浸漬させた。このバッ
クソーク済み架橋処理結晶について X 線回折実験を行い、活性ポケットに硫酸イオンおよび
ベンザミジンが存在しないことを分解能 2 Å で確認した。ガベキサートは 3.2 M 硫酸アンモ
ニウム溶液に 1 mM しか溶けないが、PEG 8000 含有母液にはよく溶解する。10 mM ガベキ
サート含有 30% w/v PEG 8000 溶液 (pH 7.0) に、バックソーク済み結晶を 2 時間浸漬させた
架橋処理済み結晶を用い、放射光施設 SPring-8 においてマイクロ X 線ビームを用いて 116 K
の窒素気流下で回折強度データを測定した。

[結果と考察]

架橋処理していない結晶は 30% w/v PEG 8000 含有母液に溶解してしまう。一方、架橋処理した結晶は、18% w/v PEG8000 に溶解するものの、30% w/v PEG8000 には溶解しなかった。構造精密化を行ったデータセット（分解能 1.94 Å）の基質結合ポケットには、6-グアニジノヘキサノイル部分の電子密度が存在する。6-グアニジノヘキサノイル部分のグアニジノ基は Asp189 と水素結合しており、ヘキサノイル部分は活性残基の Ser195 O_γ 原子と共有結合している。得られた結晶構造はアシル-酵素中間体である 6-グアニジノヘキサノイルトリプシンを反映している。硫酸イオンは活性部位に存在せず、代わりに水分子 1 (Wat1) が存在し、His57 N_ε, 水分子 2 (Wat2), 水分子 3 (Wat3) と水素結合している。これら水素結合は、水分子 1 をアシル平面の垂直方向、アシル基のカルボニル炭素 (C_{acyl}) 原子の上方に固定している (図 2)。この水分子 1 が、脱アシル化において、C_{acyl} 原子を攻撃する求核的水分子であると考えられる。

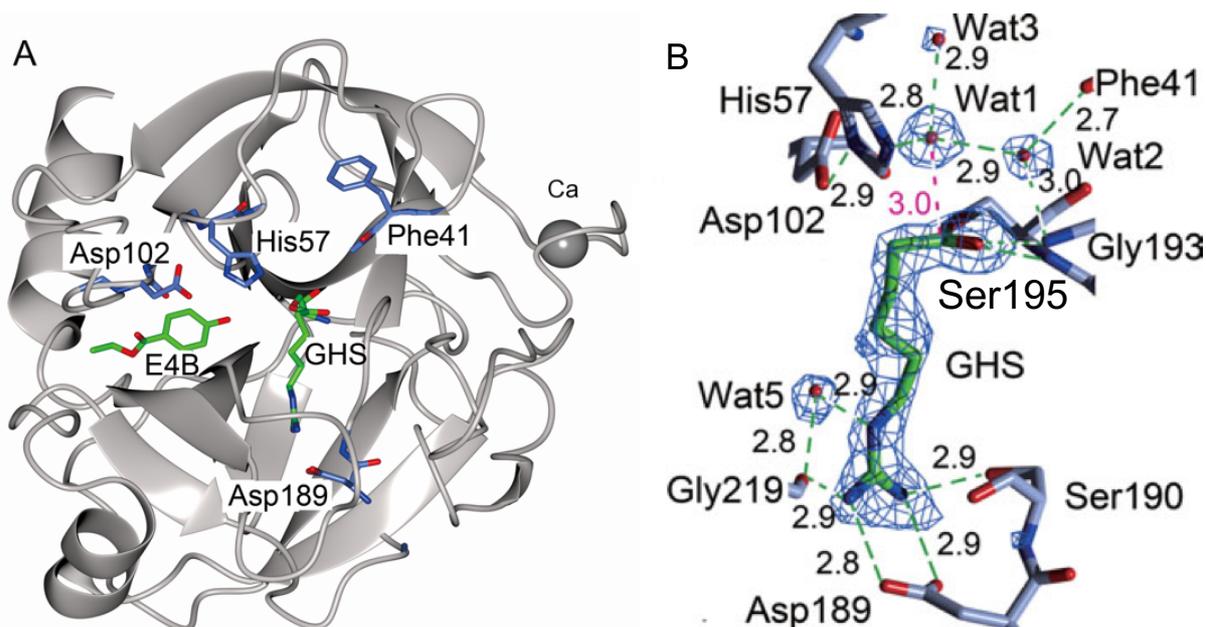


図 2. アシルトリプシン中間体の全体図と活性部位

A: 6-グアニジノヘキサノイルトリプシンの全体図. GHS: 6-グアニジノヘキサノイルセリン, E4B: エチル-4-ヒドロキシベンゾエート. **B:** 6-グアニジノヘキサノイル部分と周辺残基. 緑破線: 水素結合, 桃色破線: 水分子1 (Wat1) とアシル基のカルボニル炭素 (C_{acyl}) 原子とのファン・デル・ワールス相互作用.

求核的水分子周辺の構造に基づき阻害剤と基質様化合物を判別できれば, 可逆的共有結合性阻害剤の創薬に役立つ可能性がある. そこで, グアニジノヘキサノイルトリプシンと, 蛋白質構造データバンク (PDB) に報告されている他のアシルトリプシン中間体の求核的水分子周辺の幾何的パラメータを比較した (図 3 及び表 1). その結果, これらの値は阻害剤と基質様化合物との間で類似しており, 特に, 阻害剤ガベキサートと基質様化合物 *suc*-AAPK-*p*NA の幾何的パラメータは非常に類似していた. よって, あるアシルトリプシン

ン中間体が阻害剤由来か基質様化合物由来かを静的な構造から判別することは困難であった。

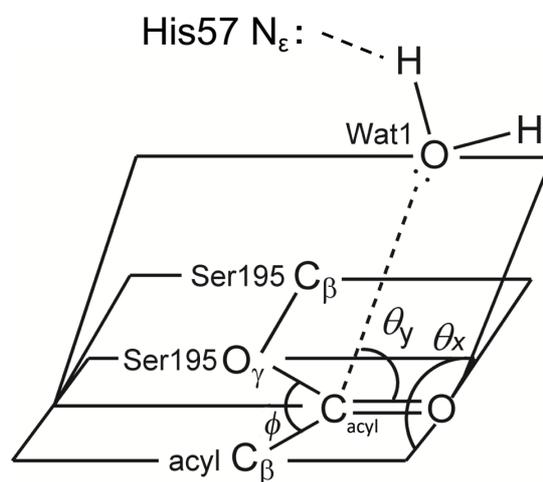


図 3. 求核的水分子の配置の幾何的パラメータ

表 1. 求核的水分子周辺の幾何的パラメータの比較

共有結合性 リガンド名	属性	PDB ID	HOH No.	$k_{cat}(\text{sec}^{-1})$	Wat1 O— C _{acyl} (Å)	Wat1 O— His57N _ε (Å)	θ_x (deg)	θ_y (deg)
Nafamostat	阻害剤	2AH4	1220	3.2×10^{-5}	3.90	2.78	129.3	53.9
Gabexate	阻害剤	3VPK	507	8.0×10^{-4}	3.02	2.75	95.3	97.8
suc-AAPK- <i>p</i> NA	基質様化合物	2AGG	526	41	2.47	2.73	94.2	96.1
suc-AAPR- <i>p</i> NA	基質様化合物	2AGE	526	91	3.03	2.92	102.1	83.8

灰色行：阻害剤，白色行：基質様化合物，

赤字：各々の幾何的パラメータにおける類似した値。

第2章 基礎的研究：求核的水分子の動的解析

[背景]

求核的水分子周辺の静的構造に基づく阻害剤と基質様化合物との判別は困難であったため、水分子の動的解析を水和熱力学解析により行い、求核的水分子の熱力学的特性と酵素反応速度との関係を調べた。

[方法]

まず、第1章で結晶構造解析したグアニジノヘキサノイルトリプシン、及びPDBから取得した4つのアシルトリプシン中間体の結晶構造を初期構造とし、2 nsの分子動力学シミュレーションをプログラム *Desmond* (Schrödinger) により行った後、蛋白質の水溶液中の代表構造をクラスタリングにより各々の初期構造につき3つ取得した。得られた水溶液中の代表構造を初期構造として、2 nsの水和熱力学解析をプログラム *WaterMap* (Schrödinger) により行った。活性部位周辺に予測された複数の水サイトのうち(図4)、His 57 N_ε原子までの距離とC_{acyl}原子までの距離の和が最も小さい水サイトを求核的水サイトとし、バルクの水分子と求核的水サイトにおける水分子のギブズ自由エネルギーの差(ΔG_{wat})と、酵素反応速度定数(k_{cat})の実験値との関係を調べた。

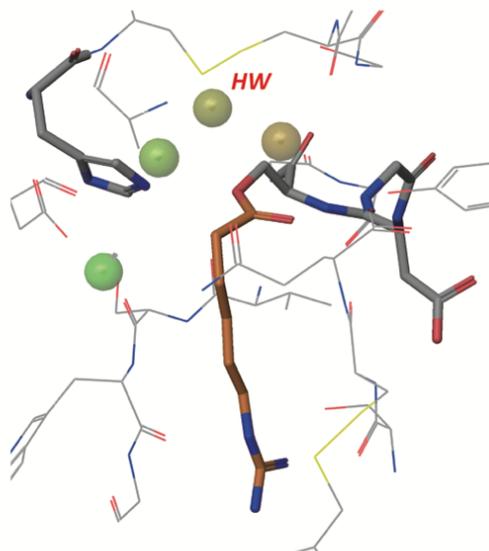


図 4. 水和熱力学解析の結果の一例（共有結合性リガンド：ガベキサート）

球：予測された水サイト，*HW*：求核的水サイト。

[結果と考察]

水和熱力学解析の結果，全ての ΔG_{wat} は正の値を示した．また， ΔG_{wat} が小さいほど， k_{cat} も小さい傾向を示した（図 5）．小さな ΔG_{wat} をもつ阻害剤の求核的水分子は，ギブズ自由エネルギー的にあまり活性化されていないため，求核攻撃が緩徐に進む一方，基質様化合物の求核的水分子は，ギブズ自由エネルギー的に活性化されており，求核攻撃が迅速に進むと考えられる．以上のことから，計算機を用いた水和熱力学解析によって得られる ΔG_{wat} は，ある共有結合性リガンドが阻害剤と同等の k_{cat} を呈するか，あるいは基質様化合物と同等の k_{cat} を呈するかを予測する上で良い指標である可能性が示された．

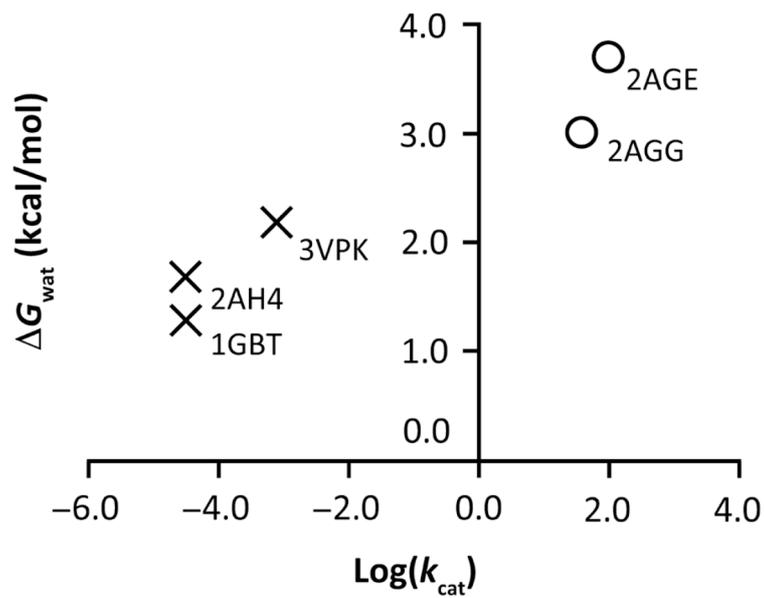


図 5. $\text{Log}(k_{cat})$ と ΔG_{wat} の関係

×は阻害剤，○は基質様化合物を表す。

第3章 創薬研究への応用：線形判別分析による阻害剤と基質様化合物の判別

[背景]

前章の結果を受け、より多くの共有結合性リガンドを対象とし、可逆的共有結合性阻害剤の候補として有望な化合物と有望でない化合物を判別できるインシリコ手法の確立を目的とし、研究を行った。

[方法]

結晶構造が PDB に報告されていないものの、 k_{cat} の実験値は報告されている共有結合性リガンドを文献から抽出した。その後、これらのリガンドのアシルトリプシン中間体の立体構造を、プログラム *Phase* (Schrödinger) を用いたフレキシブル分子重ね合わせにより構築した。これらの構造を初期構造とし、前項と同様の手法により ΔG_{wat} を求めた。さらに、アシルトリプシン中間体のうち共有結合性リガンド部分の反応性の指標として、共有結合性リガンドによりアシル化された Ser 195 の、カルボニル結合 ($C_{acyl}=O$) の反結合性分子軌道 (π^*) の軌道エネルギー (E_{orb}) を、プログラム *MOPAC2016* を用いた半経験的分子軌道計算により計算した (図 6)。

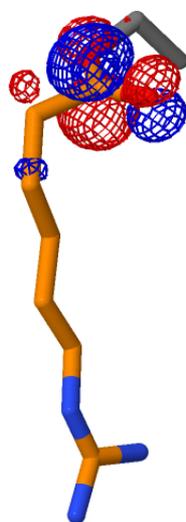


図 6. 半経験的分子軌道計算によって得られたカルボニル結合 ($C_{acyl}=O$) の反結合性分子軌道 (π^*) の一例 (共有結合性リガンド: ガベキサート)

次に、ある共有結合性リガンドが阻害剤であるか基質様化合物であるかを判別するため、学習用セット（10 化合物）の共有結合性リガンドを用いて、 ΔG_{wat} と E_{orb} を指標とした線形判別モデルを構築した。その後、構築した線形判別モデルを、検証用セットの共有結合性リガンド（4 化合物）を用いて評価した。

[結果と考察]

学習用セットの共有結合性リガンドにより構築された線形判別モデルは、学習用セットの共有結合性リガンドを、阻害剤と基質様化合物とに完全に分離した。さらに、構築された線形判別モデルは、検証用セットの共有結合性リガンドを阻害剤と基質様化合物とに完全に正しく判別した。（図 7）。よって本手法は、ある共有結合性リガンドを、阻害剤と基質様化合物とに判別する上で有用な方法であると考えられる。また、共有結合性リガンドは、求核的水分子がギブズ自由エネルギー的に安定な場合や、アシルートリプシン中間体の共有結合性リガンド部分の反応性が小さい（高い反応障壁をもつ）場合に、阻害剤となると考えられる。

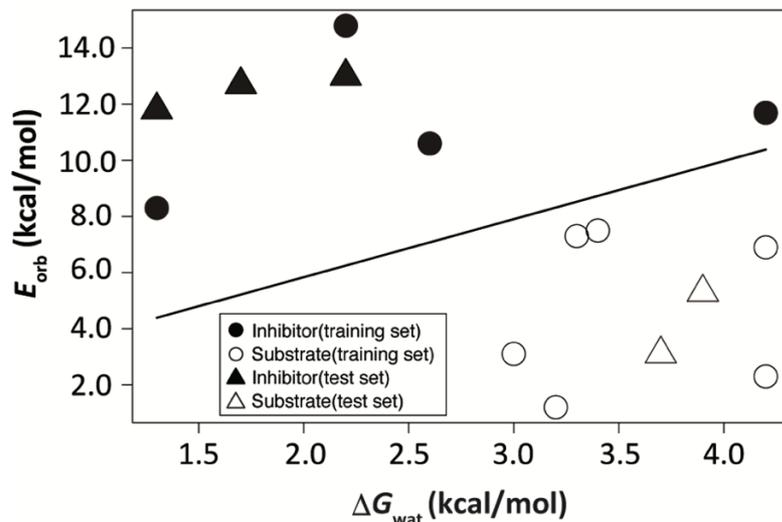


図 7. ΔG_{wat} 及び E_{orb} による線形判別分析

- : 阻害剤 (学習用セット), ○ : 基質様化合物 (学習用セット),
- ▲ : 阻害剤 (検証用セット), △ : 基質様化合物 (検証用セット).

第 4 章 今後の展望

本研究により開発された手法は、標的とする蛋白質が加水分解酵素であること、水分子の求核攻撃が酵素反応の律速段階であること、求核的水分子が一般塩基により脱プロトン化され加水分解反応が進行することの3点のみを前提としていることから、幅広い加水分解酵素に適用可能と考えられる。また、創薬の現場では、非共有結合性阻害剤の阻害能を改善するために、共有結合性阻害剤への改変が検討されることがあるが、その際にも、本方法は適用可能であると考えられる。さらに、予測の精度を高めるためには、指標の数を増やす必要があるが、少ない指標により阻害剤と基質様化合物を効果的に判別できる本手法は、計算コス

トの面で効率的な方法であると言える。

総括

本研究では、まずガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造解析を行い、脱アシル化反応を担う求核的水分子を含む結晶構造を得た。次に、得られた構造を既に PDB に報告されている他のアシルトリプシン中間体の結晶構造と比較したが、求核的水分子周辺の静的構造（幾何的パラメータ）に基づき阻害剤と基質様化合物を判別することは困難であった。そこで、アシルトリプシン中間体の結晶構造を初期構造とし、求核的水分子の動的特性を解析した。その結果、水分子が求核的水サイトにおいて獲得するギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) は、阻害剤と基質様化合物を判別する有用な指標となり得ることが示された。この結果を発展させ、可逆的共有結合性阻害剤の候補として有望な化合物と、有望でない化合物を判別するための線形判別手法を研究した。判別には、 ΔG_{wat} とともに、アシルトリプシン中間体の共有結合性リガンド部分の反応性の指標であるアシル基のカルボニル結合 ($\text{C}_{\text{acyl}}=\text{O}$) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (E_{orb}) を、半経験的分子軌道計算により求め用いた。その結果、 ΔG_{wat} と E_{orb} を指標として学習用セットの共有結合性リガンドにより構築された線形判別モデルは、検証用セットの共有結合性リガンドを完全に正しく判別した。以上のことから、本研究で開発された手法は、可逆的共有結合性阻害剤の候補として有望な化合物を創薬の初期段階で見出すための手法として有用であると考えられる。

略語・用語一覧

COSMO 法	半経験的分子軌道計算において、溶媒の効果を考慮する手法 (<u>conductor-like screening model</u>)
COX-2	シクロオキシゲナーゼ-2 (<u>cyclooxygenase-2</u>)
cryo-EM	低温電子顕微鏡 (<u>cryo-electron microscopy</u>)
DPP-IV	ジペプチジルプロテアーゼ-IV (<u>dipeptidyl protease-IV</u>)
EC	酵素番号 (<u>enzyme commission number</u>)
E_{orb}	共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボ ニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (<u>orbital energy</u>)
Gabexate	ガベキサート (ethyl <i>p</i> - (6-guanidinohexanoyloxy) benzoate)
Gabexate mesylate	ガベキサートメシル酸塩, 商品名: FOY® (小野薬品工業)
HCV	C 型肝炎ウイルス (<u>hepatitis C virus</u>)
HEPES	4-(2- <u>hydroxyethyl</u>)-1- <u>piperazine ethanesulfonic acid</u>
HOMO	最高被占有軌道 (the <u>highest occupied molecular orbital</u>)
<i>in silico</i>	計算機を用いて, の意味.
<i>in vitro</i>	試験管の中で, の意味.
<i>in vivo</i>	生体の中で, の意味.
k_{cat}	酵素反応速度定数 (<u>catalytic rate constant</u>)

K_M	ミカエリス定数 (<u>M</u> ichaelis constant)
k_{off}	解離速度定数 (dissociation rate constant)
k_{on}	結合速度定数 (association rate constant)
LUMO	最低空軌道 (the <u>l</u> owest <u>u</u> noccupied <u>m</u> olecular <u>o</u> rbital)
LDA	線形判別分析 (<u>l</u> inear <u>d</u> iscriminant <u>a</u> nalysis)
MD	分子動力学 (<u>m</u> olecular <u>d</u> ynamics)
MO	分子軌道 (<u>m</u> olecular <u>o</u> rbital)
MPD	2-メチル-2, 4-ペンタンジオール (2- <u>m</u> ethyl-2, 4- <u>p</u> entane <u>d</u> iol)
Nrf2	核内因子 E2 関連因子 (<u>n</u> uclear factor-E2 <u>r</u> elated <u>f</u> actor <u>2</u>)
NMR	核磁気共鳴 (<u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
PDB	蛋白質構造データバンク (<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank)
PDBj	日本蛋白質構造データバンク (<u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank <u>J</u> apan)
PEG	ポリエチレングリコール (<u>p</u> oly <u>e</u> thylene <u>g</u> lycol)
QM	量子力学 (quantum <u>m</u> echanics)
SAR	構造-活性相関 (<u>s</u> tructure- <u>a</u> ctivity <u>r</u> elationship)
SCF	自己無撞着場 (<u>s</u> elf- <u>c</u> onsistent <u>f</u> ield)
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl) aminomethane
ΔG	バルクの水分子を基準とする水分子のギブズ自由エネルギー (<u>G</u> ibbs free energy)

ΔH	バルクの水分子を基準とする水分子のエントルピー (enthalpy)
ΔS	バルクの水分子を基準とする水分子のエントロピー (entropy)
$-T\Delta S$	バルクの水分子を基準とする水分子のエントロピー項 (entropic term)
ΔG_{wat}	バルクの水分子を基準とする求核的水サイトにおける水分子のギブズ自由エネルギー
ΔH_{wat}	バルクの水分子を基準とする求核的水サイトにおける水分子のエントルピー
ΔS_{wat}	バルクの水分子を基準とする求核的水サイトにおける水分子のエントロピー
$-T\Delta S_{\text{wat}}$	バルクの水分子を基準とする求核的水サイトにおける水分子のエントロピー項
#HB	求核的水分子とアシルトリプシン中間体との間の水素結合数のトラジェクトリ平均 (number of <u>hydrogen bond</u>)

序章

創薬における可逆的共有結合性阻害剤研究の重要性

序章 創薬における可逆的共有結合性阻害剤研究の重要性

第1節 可逆的共有結合性阻害剤

共有結合性阻害剤 (covalent inhibitor) は、共有結合を形成することにより、標的とする蛋白質の活性を阻害する。共有結合性阻害剤は、非共有結合性阻害剤 (non-covalent inhibitor) に比べて、(1) 少ない投与量で高い阻害活性を呈する (2) 長い持続性を有するため、投与頻度を少なくすることができる (3) 薬剤耐性を呈する標的においても有効な場合がある 等といった長所をもつ¹。しかし、主に安全上の懸念から、共有結合能を有する化合物は、創薬における化合物ライブラリから注意深く排除されてきた。なぜなら、共有結合能を有する化合物はしばしば、標的とする蛋白質以外の蛋白質の表面の反応性残基と非特異的に反応し、さらにその蛋白質表面を抗体が異物として認識することで激しい抗原抗体反応が起こり、深刻な特異的毒性 (idiosyncratic toxicity) を誘起するためである²。

可逆的共有結合性阻害剤 (reversible covalent inhibitor) は、標的とする酵素等の蛋白質の活性を、酵素の反応機構等に基づき可逆的に阻害する共有結合性阻害剤である。不可逆的共有結合性阻害剤 (irreversible covalent inhibitor) が永久的な共有結合を形成するのに対し、可逆的共有結合性阻害剤は、可逆的で半永久的な共有結合を形成する²。可逆的共有結合性阻害剤は、不可逆的共有結合性阻害剤よりも、特異的毒性を呈する可能性が少ないと期待される。なぜなら、可逆的共有結合性阻害剤は、共有結合性阻害剤の1種であるため1日当たりの投与

量が少ないことに加え、形成する共有結合が可逆的であるため、宿主の免疫反応が惹起されるための閾値を超える量の薬剤-蛋白質複合体が形成されにくいためである²。

近年報告された可逆的共有結合性阻害剤の成功例には、HCV (hepatitis C virus) プロテアーゼ阻害剤としてC型肝炎の治療に用いられるboceprevir³, ジペプチジルプロテアーゼ4 (DPP-IV) 阻害剤として糖尿病の治療に用いられるvildagliptin⁴, 5- α -リダクターゼ阻害剤として前立腺肥大症の治療に用いられるfinasteride⁵, Keap1-nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) 阻害剤として多発性硬化症の治療に用いられるdimethyl fumarate⁶, ヒト好中球エラスターゼ阻害剤として急性呼吸不全の治療に用いられるsivelestat⁷等がある。

第2節 共有結合性阻害剤のインシリコ設計

創薬の現場において共有結合性阻害剤は、開発当初から狙って設計されることは少なく、むしろ、当初非共有結合性阻害剤として開発したものの、後になって共有結合能が見出される例が多い。例えば、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を阻害する非ステロイド性抗炎症剤アスピリン (aspirin) や、ペニシリン結合蛋白質と結合し、細菌の細胞壁のペプチドグリカン合成を阻害する抗生物質ペニシリン (penicillin) , 胃壁のプロトンポンプの働きを阻害するプロトンポンプ阻害剤オメプラゾール (omeprazole) 等は、その例である^{1,2}。しかし、近年の創薬プロセスの合理化の流れを受け、共有結合性阻害剤もまた合理的な創薬手法により開発されることが望まれている。

近年、多くの蛋白質の立体構造が、結晶構造解析 (crystallography) や核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) , クライオ電子顕微鏡法 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) 等の分析手法の進展により解析され、蛋白質構造データバンク (Protein Data Bank) ⁸より入手可能となった。これらの立体構造を利用し、創薬を合理的に行うための計算機援用によるリード創製 (computer-aided lead finding) あるいはインシリコ創薬 (*in silico*, 「計算機を用いて」の意味。) の手法が、創薬の現場で盛んに用いられるようになった。インシリコ創薬は、非共有結合性阻害剤の開発のみならず、共有結合性阻害剤の開発においても行われる傾向にある。

インシリコでの共有結合性阻害剤の創薬においては、阻害の最初の段階で起こる、標的蛋白質と共有結合性リガンドとの非共有結合の親和性 (affinity) と、その次の段階で起こる、共有結合の形成及び開裂の際の反応性 (reactivity) の両方が注意深く最適化される必要がある。前者に関しては非共有結合の親和性と結合ポーズを予測する共有結合ドッキングシミュレーション (covalent docking simulation) の手法⁹が研究されてきたが、後者に関する研究はわずかしが行われてこなかった。共有結合の形成または開裂の反応速度は、共有結合性阻害剤の阻害能を大きく左右する^{1,2}。よって、共有結合の形成または開裂の際の反応速度を効果的かつ効率的に予測できる手法の開発は有用である。これまでに、量子化学計算を用いた多くの酵素反応の反応エネルギーの研究が行われてきた¹⁰⁻¹³。しかし、量子化学計算は計算コストが高く、化合物ライブラリ中の多数の化合物の中から、有用な化合物をスクリーニングするための方法としては適していない。一方、近年、盛んに研究が行われている水和熱力学解析

(hydration thermodynamic analysis) は、シンプルな手順と合理的な計算コストで水分子の熱力学的特性を動的に解析することができ、蛋白質表面における水和サイトの位置と、その位置において水分子が獲得するギブズ自由エネルギー等を正確に見積もることができる。よって水和熱力学解析は、加水分解反応のように水分子が関与する反応を解析する際、有用である可能性がある。

尚、可逆的共有結合性阻害剤は、標的酵素と共有結合する時間が長いほど阻害能が高い¹²。よってこれ以降、「阻害剤」とは、既に上市されている標的酵素の可逆的共有結合性阻害剤と同等の時間、標的酵素と共有結合しその活性を阻害する化合物を指すものとし、「基質様化合物」とは、標的酵素本来の基質と同等の時間、標的酵素と共有結合した後、速やかに分解される化合物を指すものとする。

第3節 共有結合性阻害剤の標的としてのセリンプロテアーゼ

セリンプロテアーゼ (EC 3.4.21) は、生体内の数多くの生理学的過程に関与しており、長年、重要な薬物標的として研究されてきた^{14,15}。これまでに上市された共有結合性阻害剤のうち、セリンプロテアーゼを創薬標的としている割合は、他の酵素等を標的としている割合に比べ多い (図 0-3-1)¹⁶。実際に、第1節で例示した boceprevir, vildagliptin, sivelestat は、全てセリンプロテアーゼの可逆的共有結合性阻害剤である。よってセリンプロテアーゼは、共有結合性阻害剤の標的蛋白質として一般的であるといえる。トリプシン (EC 3.4.21.4) は

セリンプロテアーゼの中でも代表的存在の一つであり、これまで長年、トリプシンをモデル酵素として酵素反応機構の研究が行われてきた^{17,18}ため、数多くの先行研究が存在し、既存の知見を活用しやすい。よって、本研究では、トリプシンの中でも各種知見が多く報告されているウシ膵臓トリプシン（以下、単に「トリプシン」という）を標的酵素とし、可逆的共有結合性阻害剤の創薬手法に関する研究を行った。

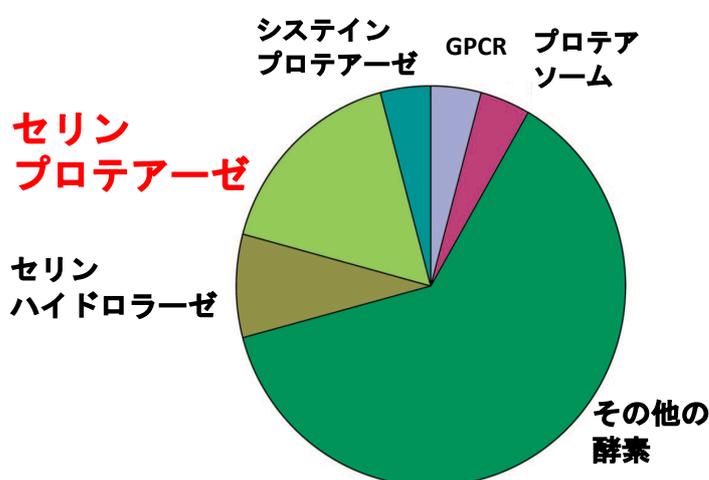


図 0-3-1. 共有結合性阻害剤の創薬標的におけるセリンプロテアーゼの割合

図は、Potashman *et al.*(2009)¹⁶を一部改変した。

トリプシンの加水分解反応は、まず、His57 N_ε 原子によってプロトンを引き抜かれたSer195 O_γ原子がペプチド結合のカルボニル炭素を求核攻撃し、第1の四面体中間体を経てアシル-酵素中間体を形成する（アシル化反応）。その後、切断されたペプチドのC末端側が活性ポケットから脱離し、続いて、活性化された水分子がアシル基のカルボニル炭素を求核攻撃し、第2

の四面体中間体を経てアシル基のC-O結合が切断され、生成物-酵素複合体が生じる（脱アシル化反応）¹⁸。市販されているトリプシンの可逆的共有結合性阻害剤は、加水分解される部分にエステル基を含むものが多いが、一般的に、トリプシンによるエステルの加水分解は、脱アシル化反応が律速段階となることが知られている¹⁸。よって、律速段階である脱アシル化の反応速度が遅い化合物は、可逆的共有結合性阻害剤の候補となる。そこで本研究では、律速段階である脱アシル化反応に注目し研究を進めることとした。

第4節 可逆的共有結合性阻害剤のアシル-トリプシン中間体の結晶構造

トリプシンの脱アシル化に着目しインシリコ研究を行う際、初期構造としてアシル-酵素中間体（acyl-enzyme intermediate）の立体構造が必要である。PDBには、基質様化合物 succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-lysyl-*para*-nitroanilide (suc-AAPK-*p*NA, 図0-4-1 *a*) のアシル-トリプシン中間体である succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-lysyl trypsin (suc-AAPKトリプシン) の結晶構造 (PDB ID: 2AGG), 及び succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-arginyl-*para*-nitroanilide (suc-AAPR-*p*NA, 図0-4-1 *b*) のアシル-トリプシン中間体である succinyl-alanyl-alanyl-prolyl-arginyl trypsin (suc-AAPR トリプシン, PDB ID: 2AGE) の結晶構造 (PDB ID: 2AGE) が報告されている¹⁹。また、急性膵炎治療薬である可逆的共有結合性阻害剤ナファモスタット (nafamostat, 図0-4-1 *c*) のアシル-トリプシン中間体である *para*-guanidinobenzoyl trypsin の pH 5.0 及び pH 6.0 における結晶構造 (各々, PDB ID: 1GBT²⁰ 及び 2AH4¹⁹) も報告されている。しかし、トリプシンの

酵素反応における最適pHはpH 7ないし8であり²¹, 1GBT及び2AH4の構造は, 生体内の環境と大きく異なるpHにおける立体構造を反映していると考えられた. また, ナファモスタットは芳香環を含む4-ベンゾイル (4-benzoyl) 部分を持つが, トリプシンの本来の基質は芳香環を含まない. 基質に類似した構造をもつ阻害剤のアシルートリプシン中間体と, 基質様阻害剤のアシルートリプシン中間体の結晶構造を比較することで, ある化合物が阻害剤となる要因を解析できると考えられたことから, 本来の基質に類似した低分子の可逆的共有結合性阻害剤のアシルートリプシン中間体の結晶構造解析を, 生体内に近いpHで行う方針を定めた.

臨床で用いられる急性膵炎治療薬として小野薬品工業から販売されているガベキサート (gabexate, ethyl 6-guanidinohexanoyloxy benzoate, 図0-4-2) は, 基質のアルギニンが持つ5-グアニジノペンタノイル (5-guanidinopentanoyl) 部分に類似した6-グアニジノヘキサノイル (6-guanidinohexanoyl) 部分を有する, 低分子量 (417.5 Da) のトリプシンの可逆的共有結合性阻害剤である. ガベキサートのトリプシンによる加水分解反応の反応速度定数 (k_{cat}) は報告されていないものの, ナファモスタットの k_{cat} の実験値 ($3.2 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$)²²及びヒト血漿におけるガベキサートとナファモスタットとの半減期 ($t_{1/2}$) の実験値 (55 sec及び23 min)²³の比から, およそ $8.0 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ と推定される. また, ガベキサートのメシル酸塩は水によく溶解するため, 生化学的な実験を行うことが容易である. 以上のことから, 本研究ではまず, ガベキサートのアシルートリプシン中間体の結晶構造を解析することを目指した.

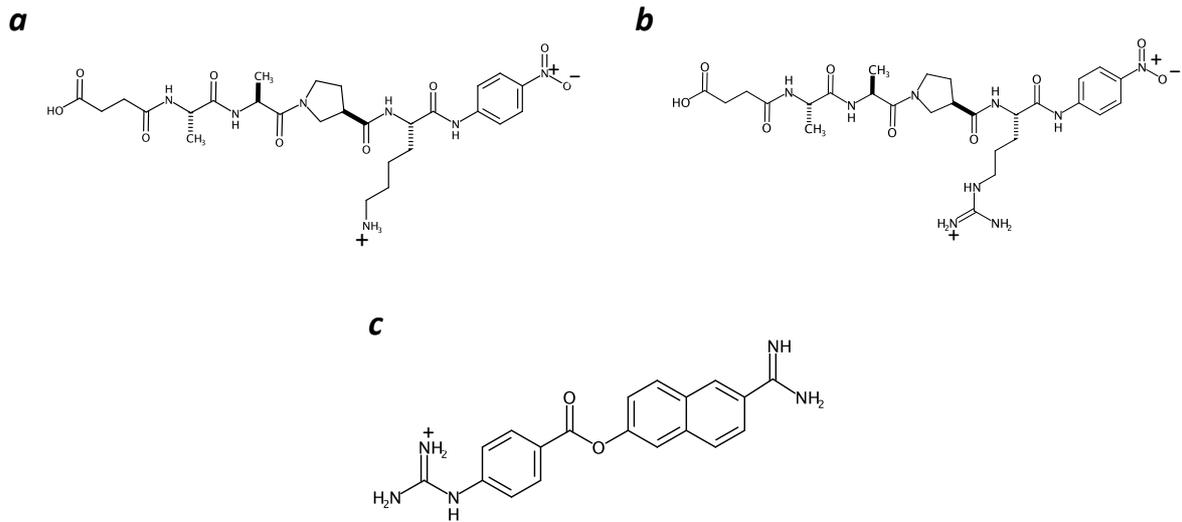


図 0-4-1. アシルトリプシン中間体の結晶構造が報告されている

共有結合性リガンドの化学構造式

a : suc-AAPK-pNA, **b** : suc-AAPR-pNA (以上, 基質様化合物),

c : ナファモスタット (阻害剤)

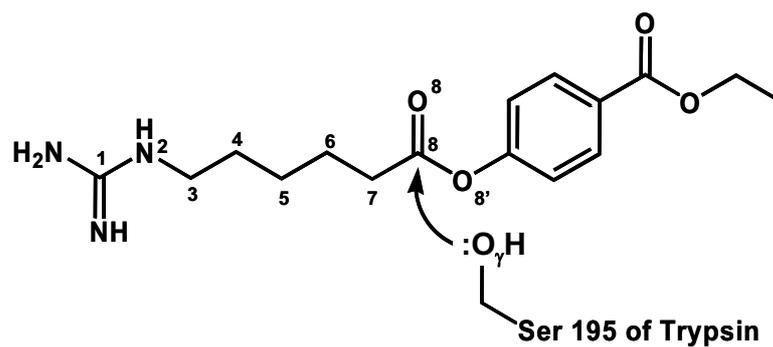


図 0-4-2. 基質に構造が類似した阻害剤ガベキサート

第 1 章

背景研究：可逆的共有結合性阻害剤ガベキサートの
アシルトリプシン中間体の結晶構造解析

第1章 背景研究：可逆的共有結合性阻害剤ガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造解析

第1節 背景

基質と構造が類似した可逆的共有結合性阻害剤であるガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造を解析するためには、(1) ガベキサートとトリプシンをあらかじめ混合した後、結晶化する (2) トリプシンの結晶をあらかじめ作成しておき、ガベキサートを後から浸潤 (ソーキング, soaking) するという2つの方法が考えられる。しかし、先行研究 (似内ら, 1993)²⁴によれば、(1)の方法ではガベキサートがトリプシンにより分解されてしまい、アシルトリプシン中間体の結晶が得られないことが報告されている。そこで、本研究では、(2)の方法によりガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造を解析する方針を定めた。

実際に、ある種の結晶では、結晶作成の後、基質や阻害剤を結晶中にソーキングしたり、逆に結晶中から除去 (バックソーキング, backsoaking) したりといった操作が可能である。リガンドが結合していないトリプシンの結晶構造 (PDB ID:1TLD)²⁵は、まずトリプシンと非共有結合性阻害剤であるベンザミジン (benzamidine) をあらかじめ混合し、硫酸アンモニウムを結晶化剤として低充填密度型斜方晶系結晶 (low packing density orthorhombic crystal) を析出させた後、ベンザミジンを含まない溶液に結晶を浸

漬し、ベンザミジンを基質結合ポケットからバックソーキングすることにより得られている。結晶構造中のトリプシン分子の活性部位には、酵素活性に必須であり、基質のペプチド基を求核攻撃する Ser195 が存在し、その近傍には、アシル化において Ser195 を、脱アシル化において求核的水分子 (nucleophilic water molecule) を一般塩基として脱プロトン化し活性化する His57, 及び His57 の配向を水素結合により固定する役割を果たす Asp102 の 3 つの残基が観測された。これらの 3 つの残基は、セリンプロテアーゼ全般に保存されている、セリンプロテアーゼの酵素活性に必須な残基であり、三つ組み触媒 (catalytic triad) と呼ばれる²⁶⁻²⁸。また、基質結合ポケットには、基質であるアルギニンのグアニジノ基、またはリシンのアミノ基と水素結合し安定化する Asp189 が観測された。さらに、活性部位の Ser195 及び His57 の近傍には、これらの残基と水素結合する 1 分子の硫酸イオンが観測された (図 1-1-1)。この研究で用いられたトリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶を用いることで、基質結合ポケットに結合するリガンドを、結晶が浸っている結晶母液へとバックソーキングしたり、逆にリガンドを結晶母液からソーキングしたりできると考えられた。

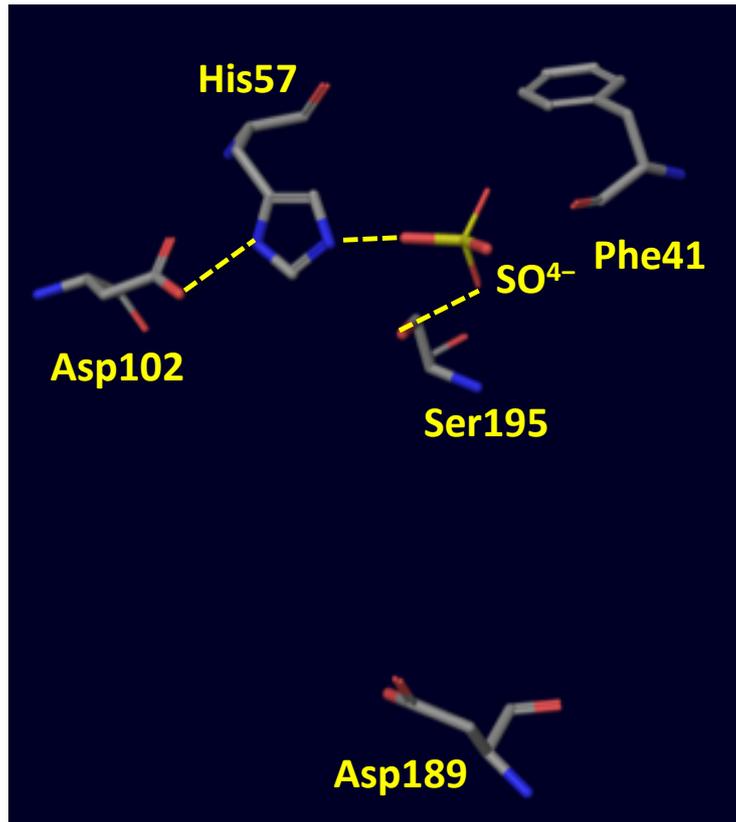


図 1-1-1. トリプシン結晶構造 (1TLD) の活性部位付近の構造

灰色棒線：トリプシンの酵素活性及び基質認識に重要な役割を果たす残基,

また, 前述の似内らの先行研究²⁴では, 有機溶媒であるアセトニトリル(acetonitrile)を共溶媒としてガベキサートを結晶母液に溶解させた後, トリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶にガベキサートをソーキングし, 結晶中のトリプシン分子とガベキサートを反応させ結晶構造解析したところ, 基質結合部位の Asp189 近傍から Ser195 O_γ原子に連続する電子密度が観測された. これは, ガベキサートとトリプシンのアシル-酵素中間体を反映していると考えられた. また, Ser195 及び His57 の近傍に, 1TLD の結晶構造と同様, 結晶化剤に由来する硫酸イオンを反映した四面体様の形状を持つ

高い電子密度ピークが観測された。しかし、Ser195 及び His57 の近傍には、脱アシル化反応においてアシルトリプシン中間体のアシル基のカルボニル炭素原子を求核攻撃する求核的水分子に相当する電子密度は観測されなかった。このことから、この結晶中のトリプシン分子では、活性部位に結合した結晶化剤由来の硫酸イオンが、求核的水分子が結合すべきサイトから水分子を空間的に排除し、脱アシル化反応を人工的に阻害しているものと考えられた (図 1-1-2)。

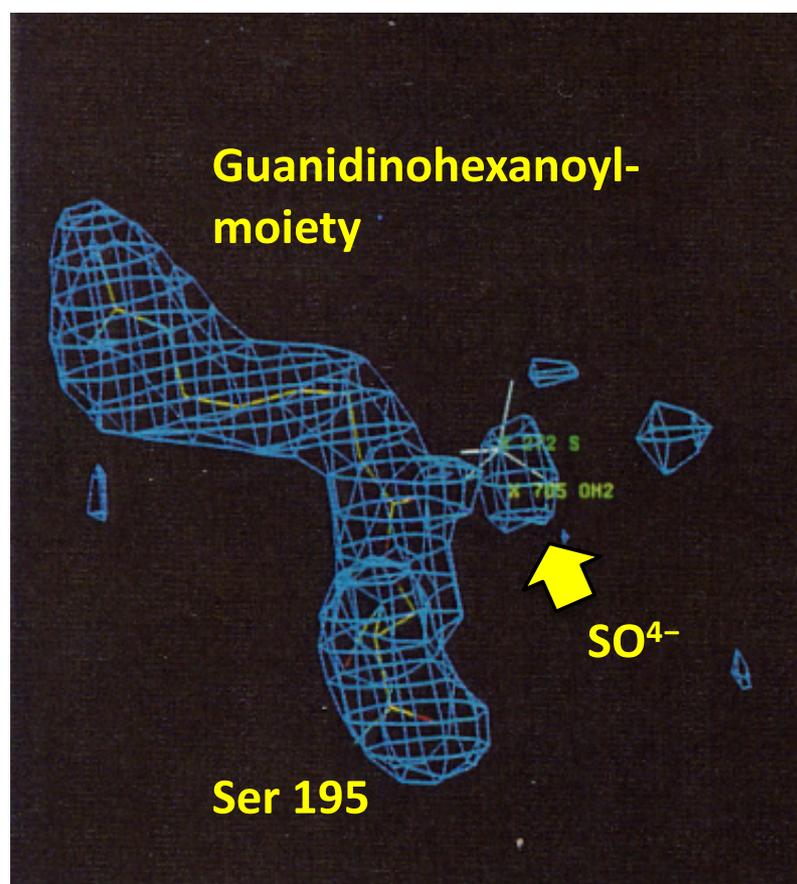


図 1-1-2. 硫酸イオンを含むガベキサートとトリプシンの複合体の結晶構造

文献²⁴より一部改変。黄色矢印は、結晶化剤由来の硫酸イオンを示す。

以上のことから、生体内におけるガベキサートのアシルトリプシン中間体の立体構造を明らかにするため、まず、トリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶を析出させた後、活性部位から結晶化剤由来の硫酸イオンを除き、さらにガベキサートを含む結晶母液に結晶を浸漬し、結晶中のトリプシン分子の活性部位にガベキサートをソーキングして反応させることにより、アシルトリプシン中間体の結晶構造を得るという方針を定めた。

そこでまず、市販のトリプシン粉末 (Sigma) から、低充填密度型斜方晶系結晶の作成に適した β -トリプシンを定法により分離・精製した後 (付録 A を参照)、硫酸アンモニウムを結晶化剤として、低充填密度型斜方晶型結晶を作成した (付録 B を参照)。得られた低充填密度型斜方晶型結晶の活性部位から硫酸イオンをバックソーキングするため、硫酸イオンを含まない溶液 (硫酸アンモニウム以外の結晶化剤を含む) に結晶を浸漬したが、結晶の外形が保持され、結晶にひび等の損傷を与えず、かつその後の結晶構造解析に適した結晶が得られる溶液は見いだせなかった。しかし、結晶にひびが入り脆くなるものの、結晶が概ね溶解しない溶液 (0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0, 30% w/v ポリエチレングリコール (PEG) 8000) を見出すことができた (付録 C を参照) ため、低充填密度型斜方晶系結晶中の分子同士を架橋し物理的強度を向上させた後、同様な溶液に結晶を浸漬することにより活性部位から硫酸イオンが除去された結晶を得られるのではないかと考え、検討を行うこととした。

蛋白質分子同士を架橋する低分子化合物として、ジアルデヒド (dialdehydes) が古

くから知られており，その中でもグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) がよく用いられてきた²⁹．溶液中の蛋白質分子同士をグルタルアルデヒドにより架橋すると，多くの場合凝集し，水溶液中で不溶性の画分となる³⁰．よって，結晶中の分子同士を同様に架橋すれば，結晶の溶解度が低下し，結晶の物理的強度も向上する可能性がある．実際に，蛋白質結晶中の蛋白質分子同士をグルタルアルデヒドにより架橋し結晶構造解析を行った例も報告されている³¹．

以上のことから，トリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶を，グルタルアルデヒドを用いて架橋処理する方法を検討することとした．

第2節 方法

第1項 架橋による結晶の物理的強度の向上

第1. 条件探索

グルタルアルデヒドにより蛋白質結晶中の分子同士を架橋する際，蛋白質分子の間に挿入されるグルタルアルデヒドが結晶中の蛋白質分子のパッキングの整然性を乱し，X線回折強度データにおける分解能を低下させる場合があると考えられた．よって，良好な分解能が得られる架橋条件を探索することとした．

まず、25% v/v グルタルアルデヒド溶液（和光純薬）を用い、表 1-2-1-1-1 に示す 24 種類の架橋用溶液を作成した。

表 1-2-1-1-1. 架橋用溶液（1）

pH	緩衝液	結晶化剤	グルタルアルデヒド濃度 (% v/v)					
			0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
3.5	0.1 M グリシン-塩酸緩衝液	3.0 M 硫酸アンモニウム	a1	a2	a3	a4	a5	a6
4.7	0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液		a7	a8	a9	a10	a11	a12
7.7	0.1 M HEPES-塩酸緩衝液		a13	a14	a15	a16	a17	a18
9.7	0.1 M グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液		a19	a20	a21	a22	a23	a24

(a1からa24の計24条件)

その後、デプレッショングラス（結晶を溶液に浸漬する際に用いられる、容積約 600 μL の円形の窪みのあるガラス板）に架橋用溶液をピペットマンで注入した後、ハンギングドロップ蒸気拡散法によって得た、およそ $75 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$ のトリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶（付録 B を参照）を、ハンギングドロップの液滴中から、ピペッティングにより架橋用溶液中に移し、 20°C の培養器で反応させた。1 時間後、架橋用溶液から、グルタルアルデヒドを含まない同等の溶液（0.1 M 緩衝液（緩衝液の種類は架橋用溶液と同じ）、3.0 M 硫酸アンモニウム）に置換することで、架橋反応を停止した。

次に、架橋処理した結晶を用いて、X 線回折強度データを取得した。X 線源は、銅回転対陰極 X 線発生装置の $\text{CuK}\alpha$ 線（波長： 1.5418 \AA ）を用い、X 線回折像の記録にはイメージングプレートを用いた。結晶はクライオループ（投げ縄状のプラスチック繊維を細い金属片の末端に固定した、蛋白質結晶操作の治具）で掬い、クライオブ

ロテクタント溶液（蛋白質結晶を窒素気流下に置いた際、ガラス状に変化することにより回折データの取得を容易にする不凍液。今回は、グルコースを結晶母液と同じ組成の溶液に溶解し、25% w/v の濃度としたものを用いた）に急速に浸漬し、10 分間常温に放置した後、100 K の窒素気流下に置き X 線回折像を取得した。振動角は 2.0° に固定した。回折像は各々の架橋条件につき 1 プレート取得するものとし、1 プレートあたりの露光時間は 25 分とした。回折像は、プログラム *HKL2000* パッケージ³² を用いて解析した。そのうち、積分回折強度の算出はプログラム *DENZO*、スケーリングとポストリファインメントはプログラム *Scalepack* を用い、回折強度 (I) とその標準偏差 ($\sigma(I)$) を求めた後、シグナル-ノイズ比 ($I/\sigma(I)$) が 3 以上となる分解能範囲の分解能を得た。

第 2. 条件最適化

上記の検討により良好な架橋条件(0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7, 0.5% v/v グルタルアルデヒド) の候補が見出されたため、この条件をさらに最適化するため、X 線回折強度のデータセット(回折像:45 プレート)を収集して詳細な検討を行った。今回は、分解能と併せて、結晶中の蛋白質分子のパッキングの整然性の指標である全体の B 因子 (overall B -factor, 結晶中の分子の平均位置に対する、結晶中の各々の分子のずれの尺度) を、分解能と併せて用い評価することとした。反応の pH は上述の条

件探索で良好な分解能が得られた酸性の pH (pH 5.0) とし、複数のグルタルアルデヒド濃度において架橋処理を行った。尚、「第 1. 条件探索」において、架橋処理した結晶を顕微鏡下で観察したところ、結晶の表面に細かなひびが見られたことから、架橋用溶液の硫酸アンモニウムの濃度を 3.0 M から 3.2 M に高め、浸透圧により結晶中の水分子を脱水した。その結果、ひびが見られなくなったため、硫酸アンモニウムの濃度は 3.2 M とした。

まず、表 1-2-1-2-1 に示す架橋用溶液を調整した。

表 1-2-1-2-1. 架橋用溶液 (2)

pH	緩衝液	結晶化剤	グルタルアルデヒド濃度 (%v/v)					
			0.00	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75
5.0	0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液	3.2 M 硫酸アンモニウム	b1	b2	b3	b4	b5	b6

(b1からb6の計6条件)

次に、ハンギングドロップ蒸気拡散法により得たトリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶 (大きさ: 約 125 μm \times 125 μm \times 1000 μm , 付録 B を参照) のリザーバー溶液を、400 μL のクエン酸ナトリウム溶液 (0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0, 3.2 M 硫酸アンモニウム) に置換した後、2~3 時間 20°C に置き、結晶が含まれているハンギングドロップの結晶母液とリザーバー溶液とを蒸気平衡に置いた。その後、リザーバー溶液であるクエン酸ナトリウム溶液から 2 μL を取り、結晶母液に加えてさらに 2~3 時間蒸気平衡に置いた。以上の操作を 3~4 回繰り返し、結晶をクエン酸ナトリウム溶液に慣らした。その後、デプレッショングラスに 600 μL のクエン酸ナトリウム溶液を

入れ、上記の結晶をその中に移すことで、結晶をクエン酸ナトリウム緩衝液に浸漬した。

その後、デプレッショングラス中の結晶母液を、表 1-2-1-2-1 の架橋用溶液 (pH 5.0) に徐々に置換し慣らした後、完全に置換して、20 °C で 2 時間浸漬した。その後、架橋用溶液を除去し、架橋処理した結晶を、クエン酸ナトリウム溶液 (グルタルアルデヒドを含まない) を用い、ピペットマンで穏やかに洗浄することで、架橋反応を停止した。

次に、架橋処理した結晶の X 線回折強度データを「第 1. 条件探索」と同様の条件で収集した。回折像は、プログラム *HKL2000* パッケージ³²を用いて解析した。そのうち、積分回折強度の算出はプログラム *DENZO*、スケーリングとポストリファインメントはプログラム *Scalepack* を用い、分解能と全体の *B* 因子を求めた。全体の *B* 因子は、(式 1-2-1-2-1) の Wilson 温度因子プロット (Wilson temperature factor plot)³³により求めた。

$$\begin{aligned} \langle I \rangle &= \exp \left[-2B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right] \sum_i (f_i^0)^2 \\ \Leftrightarrow \ln \langle I \rangle &= -2B \left(\frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2} \right) + \ln \left[\sum_i (f_i^0)^2 \right] \end{aligned} \quad (\text{式 1-2-1-2-1})$$

ここで、 $\langle I \rangle$ はある分解能範囲 (shell) における反射の平均強度、*B* は全体の *B* 因子、 θ はブラッグ角 (Bragg angle)、 λ は X 線の波長 (1.5418 Å)、 f_i^0 は蛋白質を構成

する原子によって決まる原子散乱因子 (atomic scattering factor) である。結晶内のバックソウキングの整然性は、全体の B 因子が小さいほど規則正しいことから、分解能が最小となり、かつ全体の B 因子の値も小さくなる架橋条件を調べた。

第2項 硫酸アンモニウム除去条件の探索

以上の検討により、トリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶の物理的強度を向上させる良好な架橋条件が定まったため、次に、架橋処理した結晶中のトリプシン分子の活性部位から硫酸イオンをバックソウキングする条件を検討することとした。前述のとおり、架橋していない結晶から硫酸イオンを除去する方法を検討した結果、結晶構造解析に適した条件は見出せなかったものの、結晶が概ね溶解しない条件が見出された。(付録 C を参照)。これを参考とし、表 1-2-2-1 に示す硫酸イオン除去用溶液を調整した。硫酸イオン除去用溶液は、結晶化剤として一般的に用いられるポリエチレングリコール (PEG) やその他の有機化合物を含み、硫酸イオンを含まないことを特徴としている。

表 1-2-2-1. 硫酸イオン除去用溶液 (1)

番号	pH	緩衝液	結晶化剤1	結晶化剤2
c1	7.0	0.1 M HEPES- 塩酸緩衝液	30% v/v PEG400	—
c2			30% w/v PEG1000	—
c3			30% w/v PEG3350	—
c4			30% w/v PEG4000	—
c5			30% w/v PEG6000	—
c6			30% w/v PEG8000	—
c7			18% w/v PEG8000	—
c8			30% w/v PEG20000	—
c9			30% w/v PEGモノメチルエーテル5000	—
c10			10% v/v 2-プロパノール	—
c11			20% v/v 2-プロパノール	—
c12			30% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール	—
c13			70% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール	—
c14			3.4 M 1,6-ヘキサジオール	—
c15			10% v/v 2-プロパノール	20% w/v PEG4000
c16			10% w/v PEG6000	5% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール

(c1からc16の計16条件)

次に、600 μ L の硫酸イオン除去溶液をデプレッショングラスに入れた後、第1項の検討の結果得られた架橋条件で架橋処理した結晶を、クライオグループで掬って硫酸イオン除去溶液の中に入れ、20°Cで一晩浸漬した。その後、結晶の外形が保持されたか否か、及びひび等の損傷が生じたか否かを実体顕微鏡下で観察した。外形が保持され、ひび等の損傷が生じなかった条件（30% w/v PEG1000, 30% w/v PEG3350, 30% w/v PEG4000, 30% w/v PEG6000, 30% w/v PEG8000, 30% w/v PEG20000, 30% w/v PEGモノメチルエーテル5000）の結晶についてはさらにX線回折強度データを収集し、得られた分解能および回折点の鋭さにより硫酸イオン除去溶液の優劣を検討した。特に優れた条件（30% w/v PEG8000）については、X線回折強度データセットを収集した後、結晶構造解析を行い、得られたトリプシンの立体構造の活性部位に、硫酸イオンに相当する電子密度が存在するか否かを調べた。

第3項 ガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造解析

硫酸イオン除去用溶液（30% w/v PEG8000, 0.1 M HEPES－塩酸緩衝液 pH 7.0）に浸漬することで、結晶中のトリプシン分子の活性部位から硫酸イオンがバックソーキングされた。この結晶を、さらにガベキサート含有溶液に浸漬することで、ガベキサートを結晶中にソーキングし、結晶中のトリプシン分子と反応させることで、ガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶を作成した(図 1-2-3-1)。

まず、デプレッショングラス中に、活性部位から硫酸イオンがバックソーキングされた結晶を準備した。次に、結晶母液である硫酸イオン除去用溶液（30% w/v PEG8000, 0.1 M HEPES－塩酸緩衝液 pH 7.0）に、ガベキサート浸潤用母液（10 mM ガベキサートメシル酸塩, 30% w/v PEG8000, 0.1 M HEPES－塩酸緩衝液 pH 7.0）を毎分 5 μ L ずつ、10 ないし 15 回程度、デプレッショングラス中の結晶母液に添加し、結晶を徐々にガベキサート浸潤用母液に慣らした。次に、結晶母液をガベキサート浸潤用母液に完全に置換した後、カバーガラスをかけて封入し、20°C に 2 時間置いた。ガベキサート浸潤用母液の pH は、生体内に近い環境を模擬するため、pH 7.0 で行った（トリプシンの至適 pH は 7.0～8.0²¹）。

ガベキサートメシル酸塩粉末は、3.2 M 硫酸アンモニウムを含む緩衝液にほとんど溶解しないが、硫酸イオン除去用溶液（30% w/v PEG8000, 0.1 M HEPES－塩酸緩衝液 pH 7.0）には 10 mM 以上溶解する。結晶母液が PEG8000 を含む溶液となったことに

より、より高濃度のガベキサート溶液にソーキングすることができることとなった。

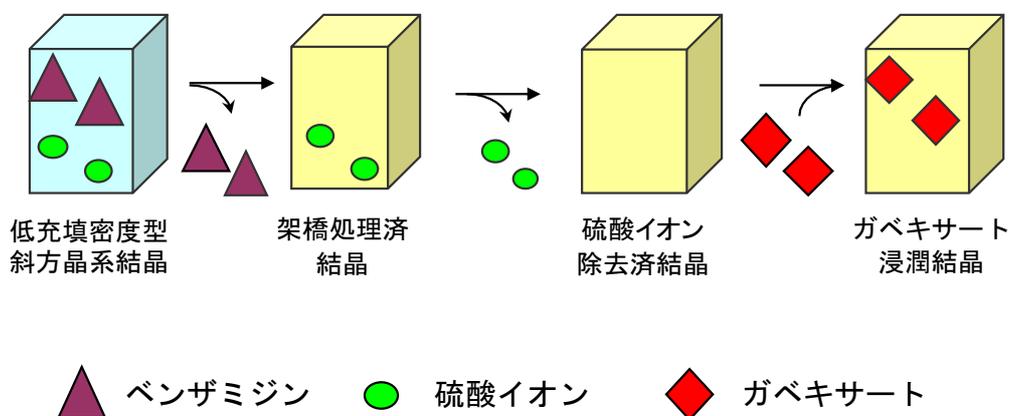


図 1-2-3-1. 結晶の調整手順

ガベキサートをソーキングした結晶の回折強度データは、大型放射光施設 SPring-8 (兵庫) の BL47XU ビームラインを用いて測定した。測定には、マイクロ放射光ビーム (ビーム幅 : $0.5 \mu\text{m} \times 0.3 \mu\text{m}$) を用いた。マイクロ放射光ビームは、通常の放射光ビームと比べビーム幅が狭いため、架橋処理をはじめとする結晶の各種処理や回折強度データ測定中の放射光による結晶の損傷により、結晶中の分子のパッキングに多少の乱れが生じても良好な回折強度データが取得できると考えられた。測定には、波長 1.25869 \AA (9.85003 keV) の放射光を用いた。

回折強度データの測定には、大きさが $125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ の結晶を 1 つ用い、ゴニオメーターヘッドへの結晶の設置は、MiTeGen (米国) から購入した MicroMounts (ポリマー薄膜により蛋白質結晶を掬い取ることができる治具) を用いた。測定は窒素気流下 (116 K) で行った。ガベキサート浸潤用母液に含まれている 30% w/v PEG8000

がクライオプロテクタントの役割を果たした。回折像の記録には、イメージングプレートを用いた。

まず、振動角を 0.3° とし、ビーム中心を結晶の末端に合わせ回折強度データの収集を試行した。その結果、良好な回折像が得られたため、次に完全なデータセットを収集した。露光時間は1枚の回折像あたり3分とし、1枚の回折像あたりの振動角は 2.0° とした。放射光による結晶の損傷による回折像の劣化を防ぐため、1枚の回折像あたり $0.56\ \mu\text{m}$ (90枚の回折像あたり $50\ \mu\text{m}$) ずつ、結晶を連続的に平行移動させ、ビームが照射される位置をずらしながら、回折強度データを収集した。

回折像は、プログラム *HKL2000* パッケージ³² を用いて解析した。そのうち、積分回折強度の算出はプログラム *DENZO*、スケーリングとポストリファインメントはプログラム *Scalepack* を用いて行った。また、トリプシン構造の決定は、プログラムパッケージ *CNS*³⁴ を用いた分子置換法により行った。探索モデル分子は、リガンドが結合していないトリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶由来の結晶構造 (PDB ID: 1TLD) を用い、まず回転関数により方位を、続いて並進関数により並進位置の探索を行った。その結果得られた構造を初期構造として、結晶学的構造精密化を進めた。結晶学的構造精密化は、プログラムパッケージ *CNS* 及びプログラムパッケージ *CCP4*³⁵ のプログラム *REFMAC5*³⁶ を用いた。まず、プログラムパッケージ *CNS* により剛体精密化及びシミュレーテッドアニーリングを行い、ある程度精密化が進んだ後に、各原子の座標と *B* 因子を精密化し、各段階の分子モデルから計算される位相を用いて電子密度を計算し、分子モデル構築を

進めた。さらにREFMAC5により、構造表示用プログラムCoot³⁷上でモデル構造を手動で編集しつつ構造の最適化を行った。特に、分子置換法におけるモデル分子（1TLD）に含まれていない、6-グアニジノヘキサノイル部分及びエチル4-ヒドロキシベンゾエート部分は、プログラムPRODRG³⁸により得た座標ファイル及びトポロジーファイルにより拘束をかけて精密化した。精密化したモデル構造の妥当性は、日本蛋白質構造データバンク（PDBj）のADIT Validation Server、プログラムMolProbity³⁹及びプログラムRAMPAGE⁴⁰により確認した。

第3節 結果及び考察

第1項 架橋によるトリプシン低充填密度型斜方晶系結晶の物理的強度の向上

第1. 条件探索

グルタルアルデヒドを含む架橋用溶液にトリプシン結晶を浸漬したところ、結晶は無色透明から褐色透明に変化した。これは、結晶中の分子同士の架橋が進行したことを示唆している。また、架橋処理した結晶の回折強度データを取得した結果、結晶は

(1) 0.5% v/v のグルタルアルデヒドを含む pH 4.7 の緩衝液

において最も良好な分解能を示し、次いで

(2) 0.5% v/v のグルタルアルデヒドを含む pH 9.7 の緩衝液

(3) 0.38% v/v のグルタルアルデヒドを含む pH 4.7 の緩衝液

の順に、良好な分解能を示した（表 1-3-1-1-1 及び図 1-3-1-1-1）。

表 1-3-1-1-1. 架橋条件と分解能

グルタルアルデヒド濃度 (% v/v)	平均強度/誤差 $I/\sigma(I)$			
	pH 3.5	pH 4.7	pH 7.7	pH 9.7
0.13	NM	2.19	2.91	2.54
0.25	NM	2.64	2.37	2.64
0.38	ND	2.05	2.54	2.45
0.50	ND	1.95	3.09	2.02
0.63	ND	2.31	NM	2.64
0.75	NM	2.31	NM	NM

NM:測定せず (not measured) , ND:回折せず (not diffracted)

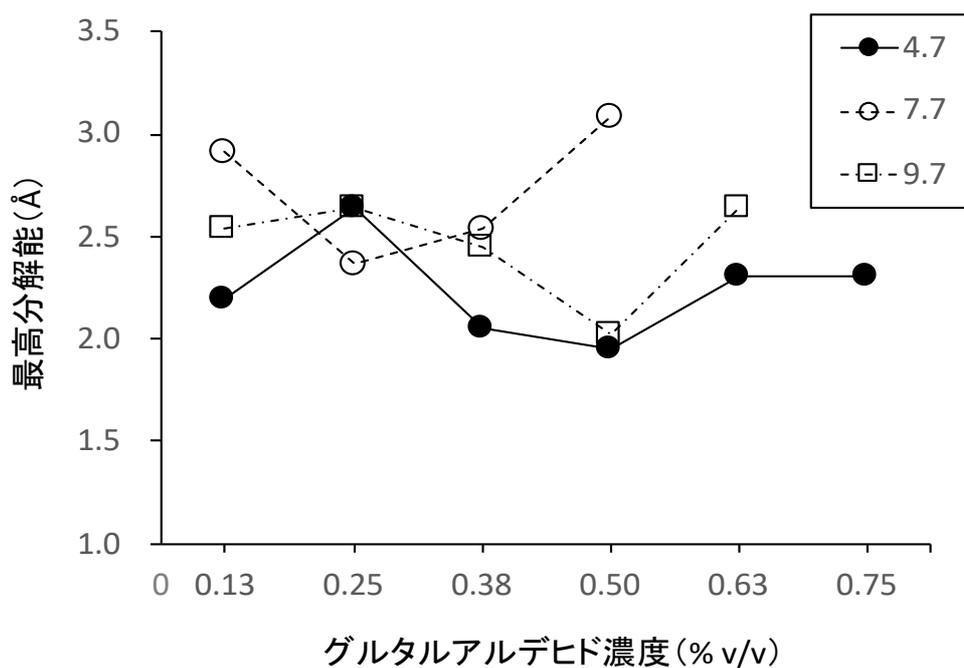


図 1-3-1-1-1. 架橋条件と分解能

グルタルアルデヒド濃度 0.5 %v/v を含む pH4.7 の緩衝液において、

分解能が最も小さい値 (1.95 Å) を示した。

pH 3.5 の結晶架橋用溶液を用いた諸条件においては、結晶による回折が確認されなかった。強い酸性の溶液により、蛋白質結晶中のトリプシン分子のパッキングの整然性が大きく損なわれたためと考えられる。よって以降、pH 3.5 の条件を検討から外した。

また、架橋反応前後で、pH 3.5、pH 4.7 及び pH 7.7 の架橋用溶液は、無色透明からシナモン様の茶色の透明な溶液に変色したのに対し、pH 9.7 の架橋用溶液は、無色透明から白濁した茶色に着色し、かつ白い沈殿が析出した。さらに、pH 9.7 で架橋した結晶の回折像には、蛋白質結晶由来の回折点とは明らかに異なる斑点が確認された。

これは、架橋反応中に硫酸アンモニウムの微粉末が析出して結晶に付着し、回折点を与えたためと考えられる。このような回折点はノイズとなり、回折像の質を低下させる。また、pH 9.7 の溶液を用いた諸条件では、2 Å より大きい分解能の回折のみが確認された。よって、以降の検討では、pH 9.7 の条件を検討から外した。

また、pH 7.7 の溶液を用いた諸条件では、2 Å より大きい分解能の回折のみが確認された。

結果として、良好な分解能を与えたのは pH 4.7 の架橋条件であった。特に先述の 0.5% v/v グルタルアルデヒド、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7、3.0 M 硫酸アンモニウムの架橋条件において最も良好な分解能 (1.95 Å) を示し、0.38% v/v グルタルアルデヒド、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7、3.0 M 硫酸アンモニウムの溶液を用いた架橋条件においても、良好な分解能 (2.05 Å) を示した。グルタルア

ルデヒドによる架橋反応は、リシン側鎖のアミノ基 ($-\text{NH}_2$) によるアルデヒド基 ($-\text{CHO}$) の求核攻撃により進行するため、リシンのアミノ基がプロトン化されていない塩基性条件下で行うのが一般的である³⁰。しかし今回の結果では、酸性条件下 (pH 4.7) でも結晶中のトリプシン分子同士は架橋されることがわかり、かつ酸性条件下で架橋処理したトリプシン結晶のほうが、塩基性条件下で架橋処理したトリプシン結晶よりも良好な分解能を示した。pH4.7 では、リシン側鎖のアミノ基のほとんどがプロトン化 ($-\text{NH}_3^+$) されておりアルデヒド基を求核攻撃しづらいが、一方でグルタルアルデヒドのアルデヒド基 ($-\text{CHO}$) のカルボニル酸素原子は一部プロトン化 ($-\text{HC}=\text{O}-\text{H}^+$) されるため、求核攻撃は穏やかに進行するものと考えられる。さらに、酸性条件下ではグルタルアルデヒドの多くがモノマーとして存在するが、塩基性条件下ではポリマーとして存在することが知られている³⁰。今回の低充填密度型斜方晶系結晶中のトリプシン分子同士の架橋においては、鎖長の短いモノマーのグルタルアルデヒドを用いたほうが、鎖長の長いポリマーのグルタルアルデヒドを用いるより、蛋白質結晶中のトリプシン分子のパッキングの整然性を損なわなかったため、良好な分解能を与えたと推定される。

第 2. 条件最適化

上述の条件探索の結果を受け、架橋条件の最適化を行った結果（表 1-3-1-2-1 及び図 1-3-1-2-1）、各々の架橋条件における全体の B 因子と分解能は、グルタルアルデヒド濃度が 0.5% v/v のとき、分解能が最も小さい値 (1.9 Å) を示し、全体の B 因子も全体で 2 番目に小さい値 (19.6 Å²) を示した。一方、グルタルアルデヒド濃度が 0.25% v/v のとき、全体の B 因子は最も小さい値 (18.7 Å²) を示したものの、その値はグルタルアルデヒド濃度が 0.5% v/v の条件における全体の B 因子 (19.6 Å²) に比べて顕著な違いはなく、また分解能はグルタルアルデヒド濃度が 0.5 %v/v の条件と比べそれほど良好ではなかった (2.3 Å)。

表 1-3-1-2-1. 架橋条件と全体の B 因子及び分解能

	グルタルアルデヒド濃度 (%v/v)					
	0.00	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75
全体の B 因子 (Å ²)	22.6	18.7	20.1	19.6	24.8	38.5
標準偏差 (Å ²)	1.4	1.3	1.4	0.6	5.5	3.4
分解能 (Å)	2.3	2.3	2.3	1.9	2.6	2.5

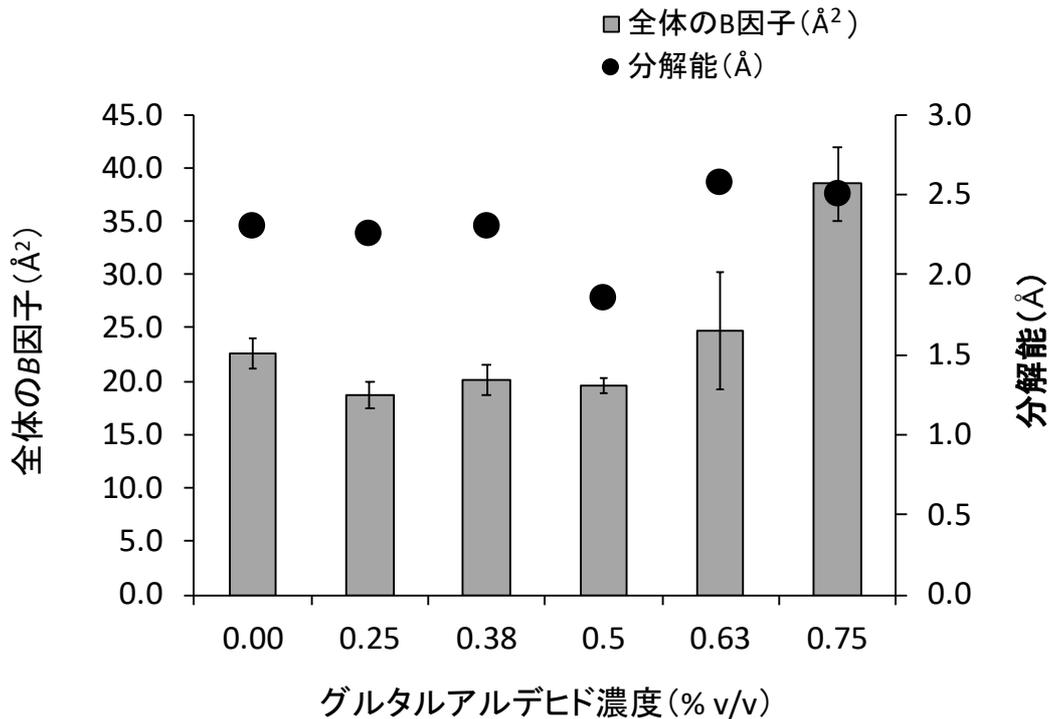


図 1-3-1-2-1. 架橋条件と全体の B 因子及び分解能

また、今回のグルタルアルデヒド濃度が 0.5% v/v の条件は、「第 1. 条件探索」で得られた良好な条件 (0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.7, 3.0 M 硫酸アンモニウム, 0.5% v/v グルタルアルデヒド) と概ね同等の架橋条件であった。以上のことからこれ以降、トリプシン結晶の架橋用溶液として、0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 5.0, 3.2M 硫酸アンモニウム, 0.5% v/v グルタルアルデヒドを用いることとした。

尚、架橋用溶液は架橋反応前後で無色透明から褐色透明へと変化し、また結晶自体も架橋反応前後で無色透明から黄褐色透明へと変化した。問題なく X 線回折強度データが取得できた。また、結晶の表面に微粉末は付着しておらず、回折像に顕著なノイズは観測されなかった。

架橋処理した結晶の空間群と格子定数を、X線回折強度データから求めた（表1-3-1-2-2）。空間群は架橋処理前後で変化はなく、いずれも $P2_12_12_1$ であった。また、格子定数は、 a 軸及び c 軸は、架橋処理前後で概ね変化はなかったものの、 b 軸は 63.5 Å から 61.5 Å へと変化した（3.2%の減少）。グルタルアルデヒドにより、トリプシン分子表面のリシン残基同士が架橋され、結晶中のトリプシン分子が接近したため、 b 軸の格子定数が変化したものと考えられる。一方で、架橋処理した結晶を用いた結晶中のトリプシン分子表面のいずれのリシン残基周辺にも、グルタルアルデヒド分子に相当する電子密度は観測されなかった。これは、トリプシン分子同士を架橋するグルタルアルデヒド分子の配座の自由度が高く、温度因子（ B 因子）が大きかったため、明瞭な電子密度が観測されなかったことが原因であると考えられる。

表 1-3-1-2-2. 架橋前後における結晶の空間群及び格子定数の変化

結晶	空間群	格子定数 (Å)		
		a	b	c
架橋処理していない結晶	$P2_12_12_1$	63.7	63.5	68.9
架橋処理した結晶	$P2_12_12_1$	63.2	61.5	68.7

また、分解能は、架橋処理していない結晶においてはおよそ 1.8 Å であるのに対し、架橋処理した結晶においてはおよそ 1.9 Å であり、顕著な差は見られなかった。さらに、得られた X 線回折強度データから構造モデル構築を行った結果、架橋処理した結晶中のトリプシン分子の基質結合ポケットには、ベンザミジン分子に相当する電子密

度は観測されなかった。このことから、ベンザミジン分子は、架橋用溶液（ベンザミジン溶液は含まない）に浸漬している間に、基質結合ポケットから除去されたものと考えられる。一方、硫酸イオン分子に相当する電子密度は観測された（図 1-3-1-2-2）。

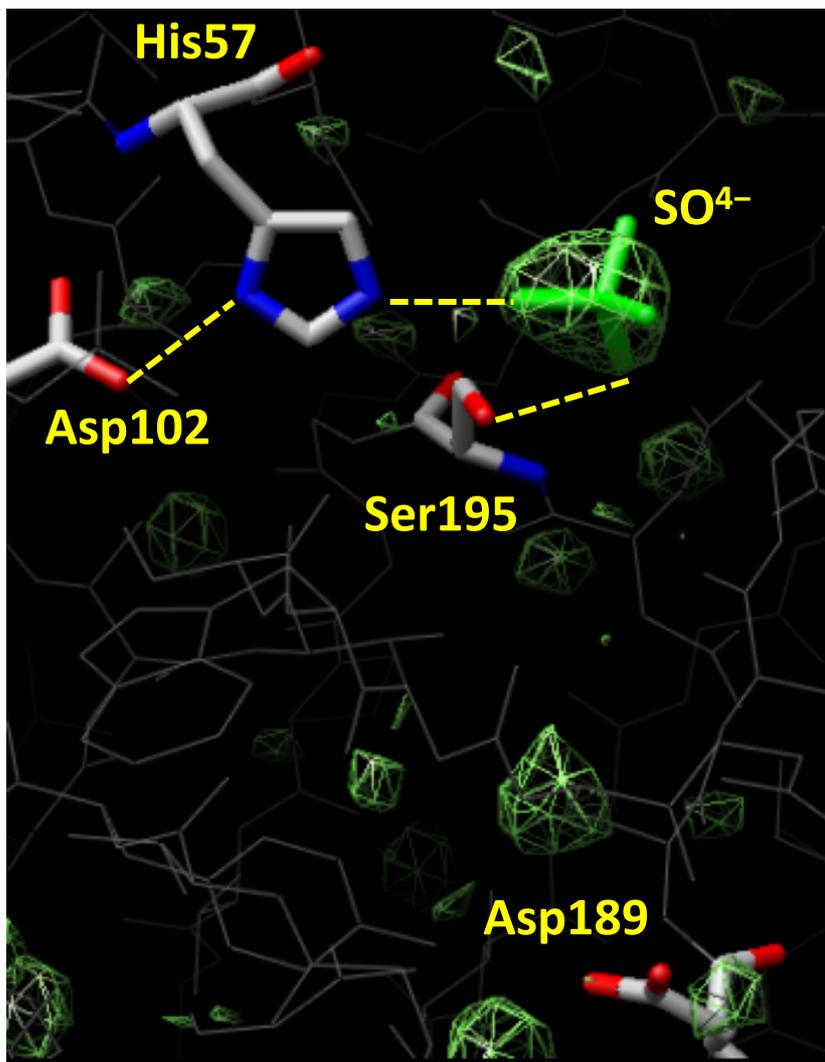


図 1-3-1-2-2. 架橋処理した結晶におけるトリプシンの活性部位

分解能：1.9 Å. 緑棒線：硫酸イオン分子，灰色棒線：トリプシン分子，

緑網線：電子密度（等高線レベル： 3σ ），黄色点線：水素結合

第2項 硫酸アンモニウム除去条件の探索

架橋処理した結晶におけるトリプシンの活性部位から硫酸イオンを除くための条件検討を行った。その結果、架橋処理した結晶は、分子量の大きい PEG の濃厚溶液を含む緩衝液 (30% w/v PEG1000, 30% w/v PEG3350, 30% w/v PEG4000, 30% w/v PEG6000, 30% w/v PEG8000 及び 30%w/v PEG20000) に浸漬した際、良好に外形を保持し、ひび等の損傷も見られなかった (表 1-3-2-1)。

これらの結晶について X 線回折強度データを収集したところ、

- (1) 30% w/v PEG8000 を含む緩衝液
- (2) 30% w/v PEG20000 を含む緩衝液
- (3) 30% w/v PEG6000 を含む緩衝液

に浸漬した結晶は、この順に鋭い回折点を与えた。

尚、架橋処理した結晶を一晩、18% w/v PEG8000 を含む緩衝液中に浸漬した際、損傷 (ひび) が見られ、この条件下では結晶が一部溶解しているものと考えられた。また、架橋処理していない結晶は 30% w/v PEG 8000 含有母液中に浸漬すると、結晶は概ね溶解しないものの極めて脆くなり、さらにガベキサートを含む溶液に浸漬するとひび割れてしまう (付録 C を参照)。一方、架橋処理した結晶は 30% w/v PEG8000 含有母液中に浸漬しても損傷が見られないことから、架橋処理により結晶の溶解度は減少し、物理的強度が向上したと考えられる。

表 1-3-2-1. 架橋処理した結晶の硫酸イオン除去用溶液への浸漬の結果

番号	pH	緩衝液	結晶化剤1	結晶化剤2	結晶の状態 (一晩後) *1	X線回折 パターン *2
c1	7.0	0.1 M HEPES-塩酸 緩衝液	30% v/v PEG400	—	2	N/A
c2			30% w/v PEG1000	—	4	2
c3			30% w/v PEG3350	—	4	3
c4			30% w/v PEG4000	—	4	3
c5			30% w/v PEG6000	—	4	4
c6			30% w/v PEG8000	—	4	5
c7			18% w/v PEG8000	—	3	1
c8			30% w/v PEG20000	—	4	4
c9			30% w/v PEGモノメチルエーテル5000	—	4	3
c10			10% v/v 2-プロパノール	—	1	N/A
c11			20% v/v 2-プロパノール	—	1	N/A
c12			30% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール	—	1	N/A
c13			70% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール	—	1	N/A
c14			3.4 M 1,6-ヘキサンジオール	—	1	N/A
c15			10% v/v 2-プロパノール	20% w/v PEG4000	2	N/A
c16			10% w/v PEG6000	5% v/v 2-メチル-2,4-ペンタンジオール	1	N/A

(c1からc16の計16条件)

(*1) 結晶の状態 (一晩後) の凡例: 4=損傷なし, 3=ほぼ損傷なし, 2=やや損傷あり, 1=損傷あり.

(*2) X線回折パターンの凡例: 5=非常に鋭い回折点, 4=鋭い回折点, 3=やや鋭い回折点,
2=ややにじんだ回折点, 1=にじんだ回折点, N/A=回折実験せず

また, 30% w/v PEG8000 を含む緩衝液に架橋した結晶を一晩浸漬した後, X線回折強度データを測定した結果, 分解能 2.0 Å の X線回折強度データが得られた. 得られた回折強度データをもとに構造モデル構築を行った結果, トリプシンの活性部位に, 硫酸イオン分子に相当する電子密度は観測されなかった (図 1-3-2-1). この結果から, 架橋処理した結晶を 30% w/v PEG8000 を含む緩衝液 (硫酸アンモニウムは含まない) に一晩浸漬することで, 低充填密度型斜方晶系結晶中のトリプシン分子の活性部位から硫酸イオンがバックソーキングされ, 除去されたと考えられる.

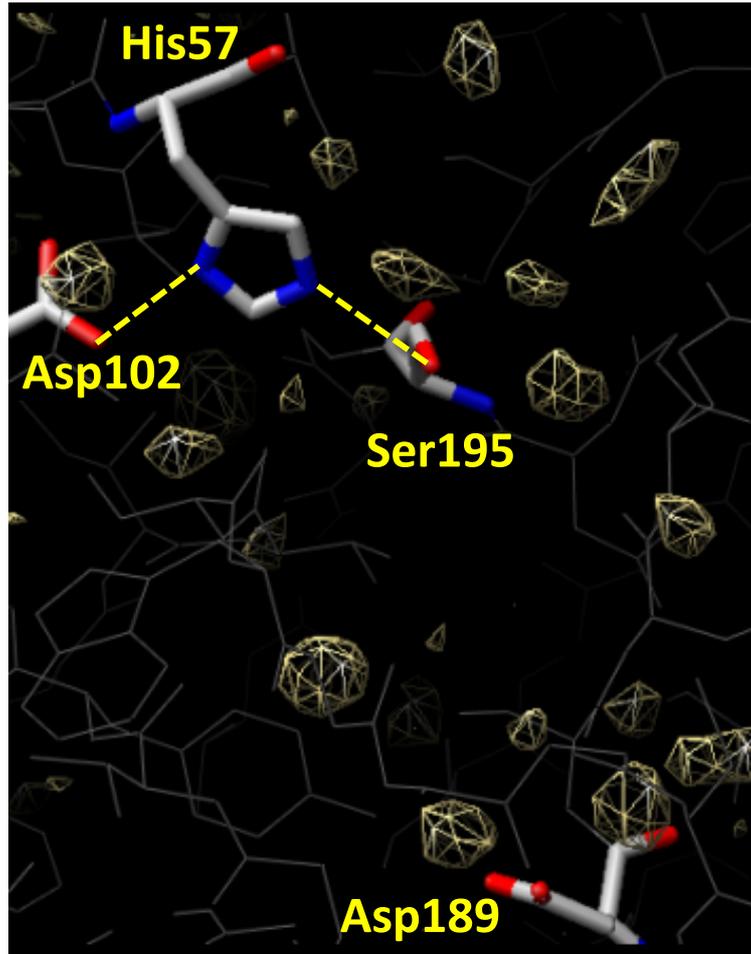


図 1-3-2-1. 硫酸イオンを除去した結晶におけるトリプシンの活性部位

分解能：2.0 Å. 灰色棒線：トリプシン分子，黄色点線：水素結合，

黄色網線：水分子等に相当する電子密度（等高線レベル：3σ）

第3項 ガベキサートのアシルートリプシン中間体構造の解析

ガベキサートをソーキングした結晶の回折強度データを取得し，結晶構造解析を行った．結晶学的データ及び結晶学的構造精密化の統計値を表1-3-3-1に，測定に用いた結晶の写真を図1-3-3-1に示す．

表 1-3-3-1. 結晶学的データ及び結晶学的構造精密化の統計値

データセット名	tryp2
結晶サイズ	125 μm \times 125 μm \times 800 μm
線源	シンクロトロン放射光
波長	1.2587 \AA
検出器	イメージングプレート
測定温度	116 K (窒素気流下)
振動角	2.0°
露光時間	3 min/枚
収集された回折像数	88 枚
空間群	$P2_12_12_1$
格子定数	$a = 63.8 \text{ \AA}$ $b = 61.1 \text{ \AA}$ $c = 69.7 \text{ \AA}$
分解能範囲	30.0–1.94 \AA (1.96–1.94 \AA)
用いた結晶の数	1
観測された反射の総数	133,895
独立な反射数	20,650
多重度	6.48
モザイシティ	0.600
完全性	99.5% (99.4%) *
$R_{\text{merge}}(I)$	8.1% (31.7%) *
平均強度/誤差 $I/\sigma(I)$	27.1 (5.34) *
* : 括弧内は最高分解能範囲 (1.96–1.94 \AA) における値を示す.	
非対称単位あたりの分子数	1
V_M	2.85 $\text{\AA}^3/\text{Da}$
溶媒含量	56.8 %

表 1-3-3-1. 結晶学的データ及び結晶学的精密化の統計値 (続き)

結晶学的構造精密化	
精密化に用いられた反射数	19,390
原子数 (蛋白質)	1,629
原子数 (溶媒)	158
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$	18.5%/21.7% (20.4%/22.5%)
根平均二乗和 (RMSD)	
結合長	0.009 Å
結合角	1.28 Å
平均の B 因子	
蛋白質	25.2 Å ²
水分子	33.4 Å ²
リガンド及びイオン	47.7 Å ²
Ramachandran プロット**	
好ましい領域	97.7%
許容される領域	2.3%
外れ値の領域	0.0%

** : 値はプログラム *RAMPAGE*⁴⁰ により計算された.

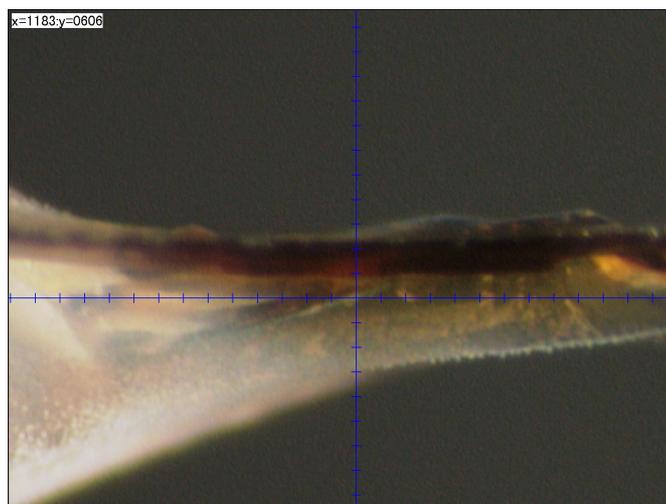


図 1-3-3-1. 回折強度データ測定に用いた結晶

構造モデル構築と結晶学的精密化が7サイクル終了した時点で、トリプシンの基質結合ポケットの Ser195 O_γ 原子の近傍に、連続的な電子密度が観測された。この電子密度は、トリプシン分子が結晶中でアシル-酵素中間体を形成していることを示している (図 1-3-3-2)。

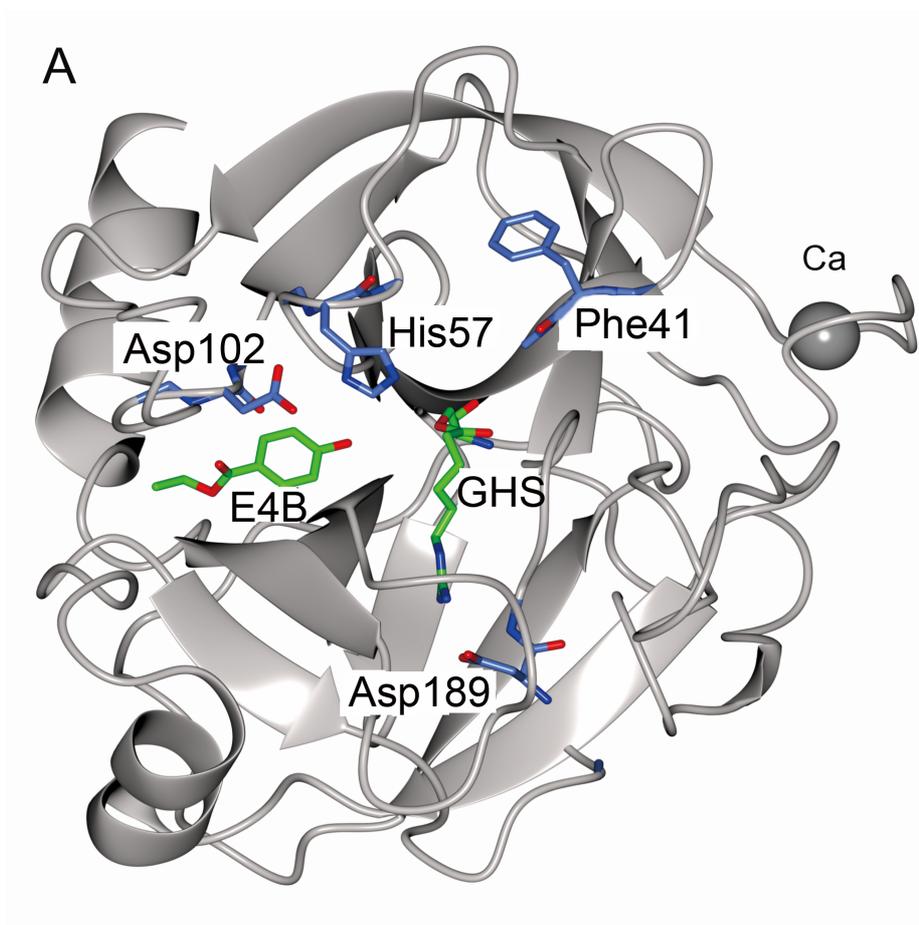


図 1-3-3-2. アシル-トリプシン中間体の全体図 (再掲)

GHSは6-グアニジノヘキサノイルセリン,

E4Bはエチル 4-ヒドロキシベンゾエートを表す。

観測された電子密度は 6-グアニジノヘキサノイル部分を反映しており、そのヘキサノイル部分は活性残基の Ser195 O_γ 原子と共有結合していた (図 1-3-3-3)。また, Ser195 O_γ 原子近傍の 6-グアニジノヘキサノイル部分は平面的な構造をとっており、この部分はアシル平面に相当するものと考えられた。また, 6-グアニジノヘキサノイル部分のグアニジノ基の窒素原子のうちの 1 つは, Asp189 O_{δ1} 及び Ser190 O_γ 原子と水素結合しており, その距離はいずれも 2.9 Å であった。

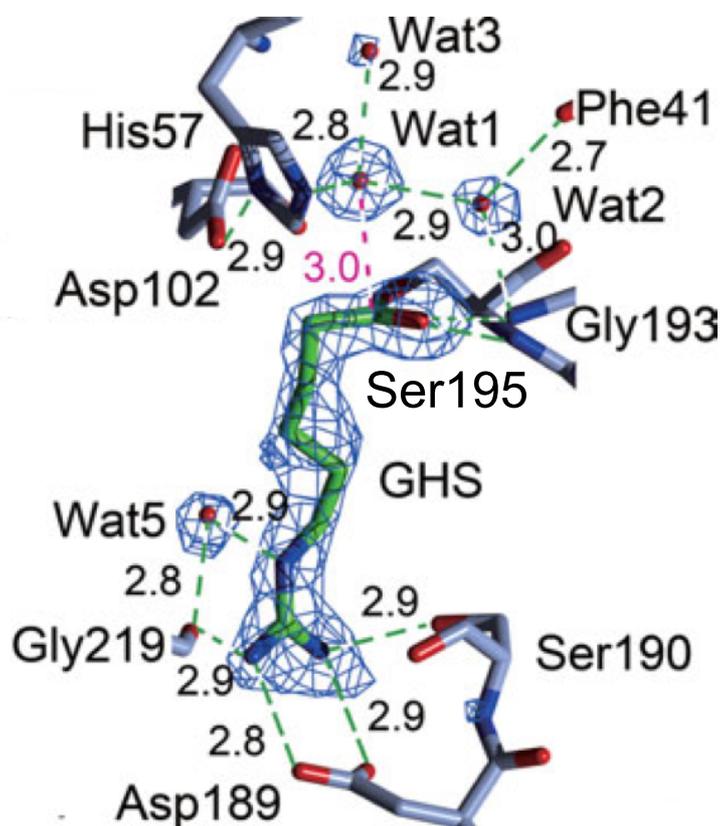


図 1-3-3-3. アシルトリプトシン中間体の活性部位 (再掲)

6-グアニジノヘキサノイル部分と周辺残基.

緑破線は水素結合, 桃色破線は Wat1 と C_{acyl} 原子の相互作用を表す.

また、グアジノ基の窒素原子のうち2つ目は、Asp189 O_{δ2}及びGly219の主鎖の酸素原子と水素結合しており、その距離は各々2.8 Å及び2.9 Åであった。さらに、グアジノ基の窒素原子のうち3つ目は、水分子5と水素結合しており、その距離は2.9 Åであった。また、6-グアニジノヘキサノイルセリンのアルキル鎖とHis57, Cys191, Gln192, Val213, Trp215, Gly216, Cys220及びGly226との間の各残基には、疎水的相互作用により相互作用しているものと考えられた。以上のことから、この結晶構造は、ガベキサートのアシルトリプシン中間体、すなわち6-グアニジノヘキサノイルトリプシンを反映しているものと考えられた。

この結晶構造は、知り得る限り、セリンプロテアーゼと低分子化合物との生成物-酵素複合体に進行し得るアシル-酵素中間体の結晶構造のうち、酵素反応に最適なpHで解析された最初のものである。一般に酵素反応中間体の結晶構造解析は困難であるが、本研究で成功した要因として、(1) アシルトリプシン中間体自体がエネルギー的に比較的安定な反応中間体であることに加え、(2) 結晶を析出させた後、ガベキサートを活性部位にソーキングすることで反応を開始したこと、並びに(3) 酵素反応が極めて遅く進行する低温条件下(窒素気流下 116 K)で回折強度データを取得したこと等が挙げられる。

さらに、平面的で、瓢箪型をした電子密度が Thr98, Leu99, Gln175 及び Trp215 及び 6-グアニジノヘキサノイル部分のアシル基の近傍に観測された。これは、トリプシンによるアシル化反応によってガベキサートから脱離した、エチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子に相当する電子密度であると考えられる (図 1-3-3-4)。エチル 4-ヒドロキシベンゾエートのエチルエステル部分の酸素原子は、Gln175 の N_{ϵ} 原子と水素結合しており、その距離は 2.7 Å であった。また、エチルエステル部分のエチル基 ($-CH_2-$) の炭素原子は、水分子 495 (Wat495) の酸素原子とファンデルワールス結合を形成する距離にあった。この水分子 495 は、Gln175 の主鎖の酸素原子及び Thr98 の主鎖の酸素原子と水素結合しており、その距離は各々 2.7 Å 及び 2.8 Å であった。また、エチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子の芳香環は Leu99 や Trp215 等の疎水的側鎖に取り囲まれていた。よって、脱離基であるエチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子は、化合物が解離しやすい蛋白質の表面ではあるものの、上記の相互作用により活性サイト周辺に結合し留まったものと考えられる。

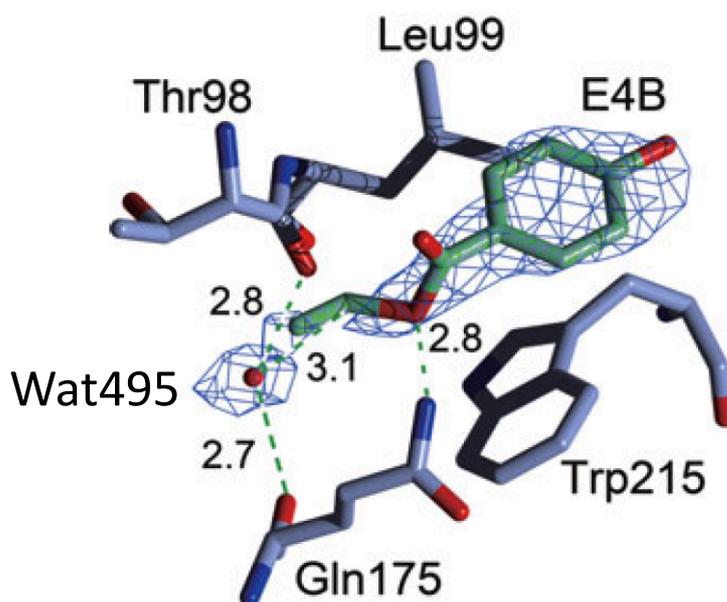


図 1-3-3-4. 活性部位近傍に結合したエチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子

6-グアニジノヘキサノイル部分及びエチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子部分の構造モデルの最適化を行ったところ、最終的な R_{work} 因子と R_{free} 因子は、各々 18.5% 及び 21.7% まで改善した。この結晶構造の分解能 1.94 Å 及び R_{free} 値 21.7% から推定される座標の標準不確かさ (standard uncertainties of coordinates) 及び距離の不確かさ (uncertainties of distances) は、各々 0.132 Å 及び 0.19 Å である。

結晶学的構造精密化の際、6-グアニジノヘキサノイル部分及びエチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子の占有率は、1.0 と仮定した。6-グアニジノヘキサノイル部分の原子の平均の B 因子は 32.3 Å² であり、この部分の周辺の蛋白質原子と比べて同等程度であったため、基質結合ポケットは 6-グアニジノヘキサノイル部分によって完全に占有されているものと推定された。一方、エチル 4-ヒドロキシベンゾエート分子平均の原子の平均

の*B*因子は63.8 Å²であり、この部分の周辺の蛋白質原子と比べて顕著に高い値を示していた（周辺の蛋白質原子の*B*因子のうち、最大はGln175 N₂原子の41.1 Å²）。以上のことから、エチル 4-ヒドロキシベンゾエート結合部位は4-ヒドロキシベンゾエート分子によって完全には占有されていないものと推定された。

また、Gln192の側鎖は、基質結合ポケットの方向を向いていなかった。これは、他のアシルトリプシン中間体（PDB ID：2CMY及び2AGE）では、Gln192の側鎖が基質結合ポケットの方向を向いているのと比較して特徴的である（図1-3-3-5）。この差異は、基質結合ポケットに結合しているリガンド部分が、非ペプチド様のものかペプチド様のものかによって決まるものと思われる。つまり、6-グアニジノヘキサノイルトリプシンのGln192は、非ペプチド様の阻害剤である6-グアニジノヘキサノイル部分の中に、水素結合アクセプターとなる原子を持たないため、Gln192の側鎖は基質結合ポケットの方向を向かなかったと考えられる。一方、2CMYや2AGEでは、ペプチド様のリガンドの中に、Gln192が水素結合する相手方の酸素原子が存在するため（2CMYにおいてはGln14の主鎖の酸素原子、2AGEにおいてはPro4の主鎖の酸素原子）、Gln192の側鎖は基質結合ポケットの方向を向いたと考えられる。

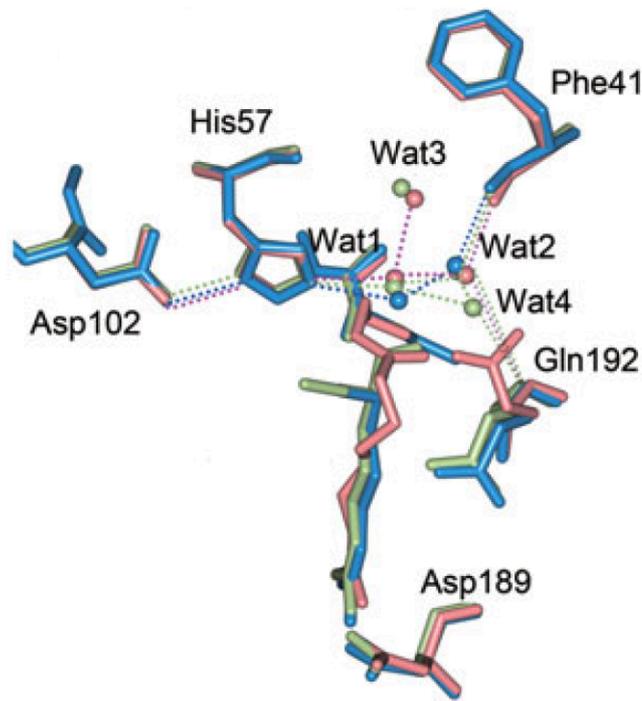


図1-3-3-5. アシルトリプシン中間体の結晶構造の比較

桃色：ガベキサートのアシルトリプシン中間体，青色：2CMY (*Veronica hederifolia* 由来トリプシンインヒビターとのアシルトリプシン中間体)，緑色：2AGE (suc-AAPR トリプシン)。求核的水分子周辺の水素結合は，構造の色と同じ点線で示した。

また，水分子1 (Wat1) は，アシル基のカルボニル炭素原子とファンデルワールス接触する距離 (3.0 Å) に位置しており，ほぼアシル平面に垂直となるよう配置していた (図1-3-3-6)。また，水分子1は，His57 N ϵ ，水分子2 (Wat2) 及び水分子3 (Wat3) と四面体様に水素結合しており，その距離は各々2.8 Å, 2.9 Å及び2.9 Åである。これらの構造的な特徴から，水分子1は，脱アシル化反応において，アシル基のカルボニル炭素原子を求核攻撃する，求核的水分子であると考えられる。水分子2は，Phe41の主鎖のカ

ルボニル酸素原子及びGln193の主鎖の窒素原子と水素結合しており，その距離は各々2.7 Å及び3.0 Åである．水分子3は，水分子1とのみ水素結合している（図1-3-3-7）．尚，活性部位には，硫酸イオン分子に相当する電子密度は観測されなかった．

この6-グアニジノヘキサノイルトリプシンの結晶構造は，蛋白質構造データバンク（PDB）に報告され登録された（PDB ID: 3VPK）．

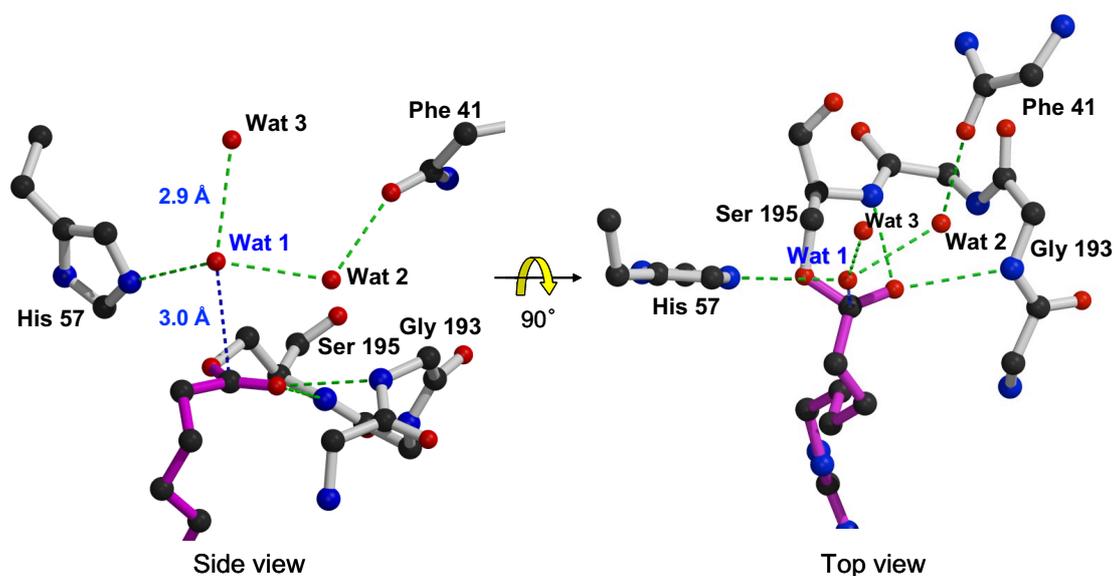


図1-3-3-6. 水分子1周辺の構造

左図はアシル平面に水平な視点，右図はアシル平面に垂直な視点から見た図．

黒丸：炭素原子，青丸：窒素原子，赤丸：酸素原子，マゼンタ：6-グアニジノヘキサノイル部分，緑破線：水素結合，青破線：水分子1とアシル基のカルボニル炭素原子との相互作用．

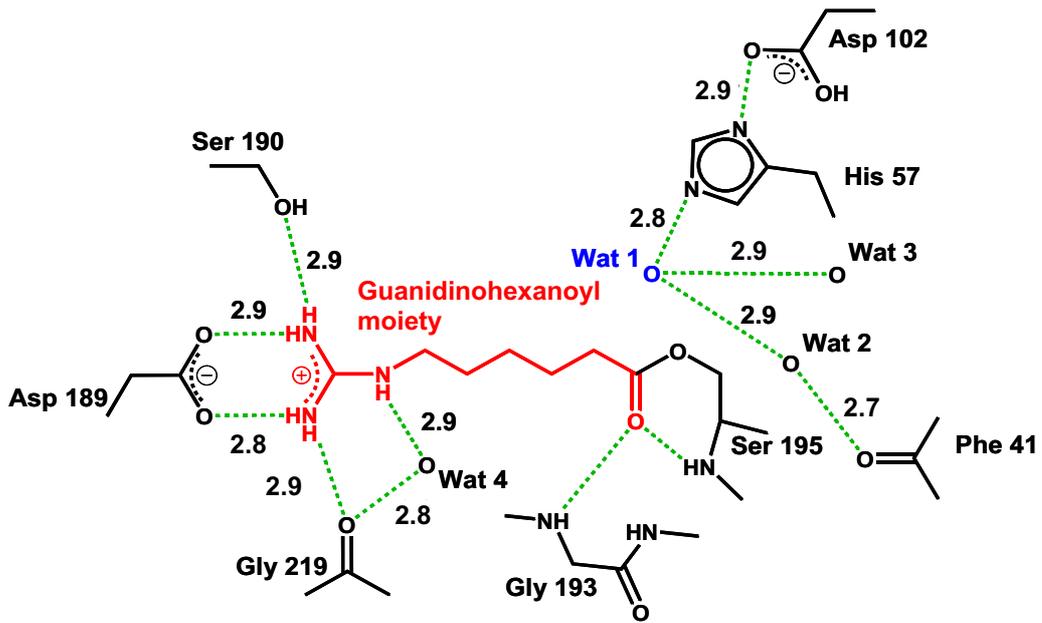


図 1-3-3-7. 基質結合ポケット近傍の構造の模式図

Wat : 水分子, 緑破線 : 水素結合, 数字は水素結合距離 (単位 : Å).

第4項 トリプシンによるガベキサートの加水分解反応機構

得られたガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造に基づき、トリプシンによるガベキサートの加水分解は以下のとおり進行するものと考えられる（図1-3-4-1）。まず、ガベキサートとトリプシンとが非共有結合的に結合し、基質-酵素中間体（ミカエリス複合体）が形成された後、His57 N_ε原子によってプロトンを引き抜かれ求核性が高められた Ser195 O_γ原子が、ガベキサートのエステル基のカルボニル炭素原子を求核攻撃し、第1の四面体中間体を経て、アシル-酵素中間体を形成するものと考えられる（アシル化反応）。さらに、ガベキサートの脱離基であるエチル 4-ヒドロキシベンゾエート部分が切断され活性ポケットから脱離した後、His57 N_ε原子によってプロトンを引き抜かれ求核性が高められた水分子が、アシル基のカルボニル炭素を求核攻撃し、第2の四面体中間体を経て、生成物-酵素複合体が生じるものと考えられる（脱アシル化反応）⁴¹。

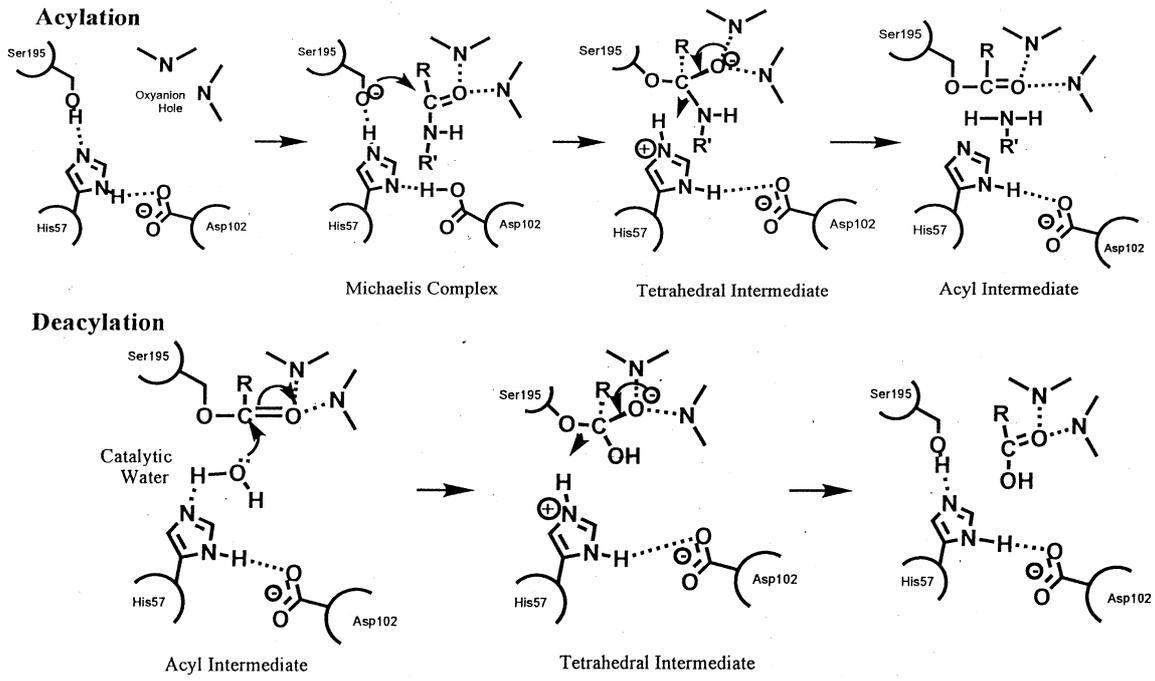


図1-3-4-1. トリプシンの加水分解反応の模式図

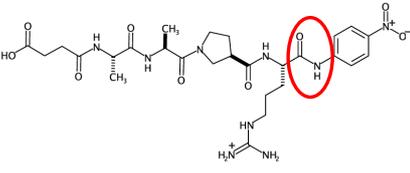
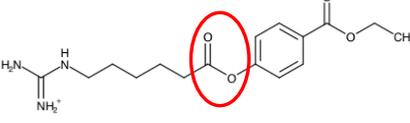
第4節 阻害剤と基質様化合物との構造に基づく判別の検討

アシルトリプシン中間体の立体構造における求核的水分子周辺の構造等に基づき、ある化合物が阻害剤の候補として有望な化合物であるか、あるいは阻害剤として働き得ない基質様化合物であるかを判別し予測することができれば、可逆的共有結合性阻害剤の創薬に役立つ可能性がある。よって、(1)リガンドの構造のみに基づく判別 (2)アシルトリプシン中間体の求核的水分子の静的特性(幾何的配置)に基づく判別 の2通りの方法について検討することとした。

第1項 リガンド構造に基づく判別

まず、リガンド構造のみから阻害剤と基質様化合物が判別できるか否かを検討するため、共有結合を形成する部分がアミド型のものとエステル型のものとを比較した(表1-4-1-1)。一般の加水分解反応速度は、アミド型よりもエステル型の方が早く進行する。一方、トリプシンによる加水分解反応速度は、アミド型よりもエステル型の方が遅く進行するものがある。一例として、suc-AAPR-pNA はアミド型だが、基質様化合物と同等の速度で加水分解される¹⁹。また、ガベキサートはエステル型だが、臨床で用いられている阻害剤である。

表 1-4-1-1. 加水分解速度の比較 (アミド型及びエステル型の共有結合性リガンド)

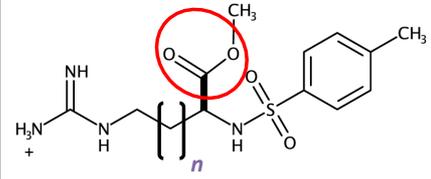
リガンド構造	名称	脱離基	Log(k_{cat})	属性
	suc-AAPR-pNA	アミド型	1.96	基質様化合物
	ガベキサート	エステル型	-3.1	阻害剤

赤枠内：共有結合を形成する部分. suc-AAPR-pNA の Log(k_{cat})は、文献¹⁹より取得した。また、ガベキサートの Log(k_{cat})は、序章 第4項に記載した方法により推定した²²。

23.

さらに、R1、R2、及びR3の3種類の共有結合性リガンドは、基質結合ポケットと結合するグアニジノ基と、共有結合を形成するエステル基とを結ぶアルキル鎖の長さのみが異なる、一連の化合物である。これらの化合物は、化学構造が非常に類似しているにも関わらず、基質と同等の速度で迅速に加水分解される基質様化合物 (R1及びR2) と、基質より1桁程度遅い速度で加水分解される化合物 (R3) とに分かれる⁴² (表 1-4-1-2)。以上のことから、リガンド構造のみに基づき、阻害剤と基質様化合物を判別することは困難と考えられる。

表 1-4-1-2. 加水分解速度の比較 (R1, R2 及び R3)

リガンド構造	<i>n</i>	名称	Log(<i>k_{cat}</i>)	属性
	1	R1	1.7	基質様化合物
	2	R2	2.0	基質様化合物
	3	R3	0.8	基質より遅く分解される化合物

赤枠内：共有結合を形成する部分.

R1, R2 及び R3 の Log(*k_{cat}*)は, 文献⁴²より取得した.

第 2 項 求核的水分子の幾何的配置 (静的特性) に基づく判別

次に, アシルトリプシン中間体の結晶構造中の求核的水分子の配置を表す幾何的パラメータと, 酵素反応速度定数とを比較した (図 1-4-2-1 及び表 1-4-2-1). 今回結晶構造解析を行ったガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造 (PDB ID: 3VPK) 以外に, PDB に報告されている基質様化合物 (suc-AAPK-*p*NA と suc-AAPR-*p*NA のアシルトリプシン中間体 (各々, PDB ID: 2AGG¹⁹ 及び 2AGE¹⁹)), 及び可逆的共有結合性阻害剤ナファモスタットのアシルトリプシン中間体 (PDB ID: 1GBT²⁰ (pH 5.0) 及び 2AH4¹⁹ (pH 6.0)) の結晶構造を用いた.

結果として, 求核的水分子とその周辺の間配置の幾何的パラメータ, 例えば(1)求核的水分子と, 求核攻撃するアシル基のカルボニル炭素原子との距離 (2)求核的水分子と, プロトンを引き抜く塩基である His57 N_ε原子との距離 (3)求核的水分子とアシ

ル平面とのなす角度 等には, 阻害剤と基質様化合物との間で顕著な差は見られなかった. 以上のことから, 求核的水分子周辺の幾何的パラメータに基づき, 阻害剤と基質様化合物を判別することは困難であると考えられる.

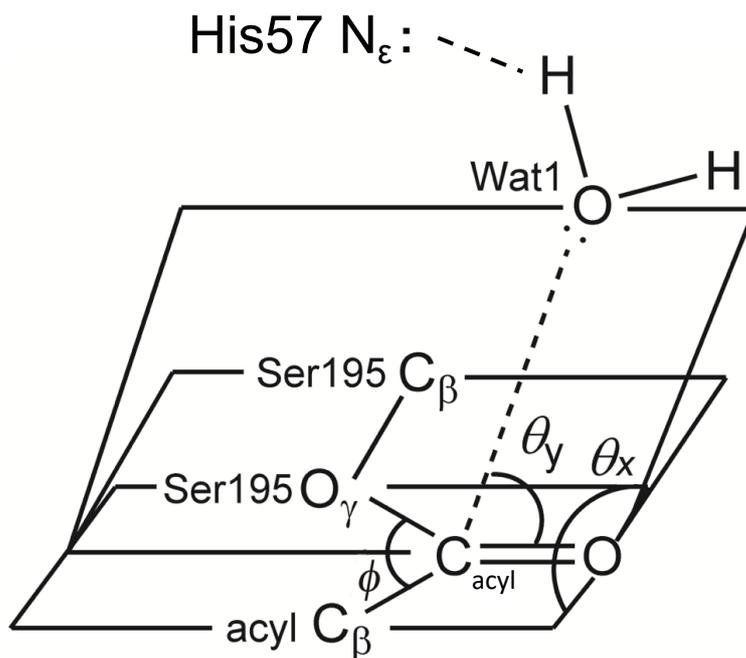


図 1-4-2-1. 求核的水分子の配置の幾何的パラメータ (再掲)

表 1-4-2-1. 求核的水分子とその周辺の残基との幾何的パラメータの比較 (再掲)

共有結合性 リガンド名	属性	PDB ID	HOH No.	$k_{cat}(\text{sec}^{-1})$	Wat1 O— C _{acyl} (Å)	Wat1 O— His57N _ε (Å)	θ_x (deg)	θ_y (deg)
Nafamostat	阻害剤	2AH4	1220	3.2×10^{-5}	3.90	2.78	129.3	53.9
Gabexate	阻害剤	3VPK	507	8.0×10^{-4}	3.02	2.75	95.3	97.8
suc-AAPK-pNA	基質様化合物	2AGG	526	41	2.47	2.73	94.2	96.1
suc-AAPR-pNA	基質様化合物	2AGE	526	91	3.03	2.92	102.1	83.8

灰色行：阻害剤, 白色行：基質様化合物,

赤字：各々のパラメータにおける類似した値.

以上のことから、阻害剤と基質様化合物を、リガンドの化学構造や求核的水分子の静的特性（配置の幾何的パラメータ）に基づき判別することは困難であると考えられた。特に、ガベキサートと suc-AAPK-pNA は、求核的水分子周辺の幾何的パラメータにおいて類似した値が多かった（表 1-4-2-1）にも関わらず、前者は阻害剤であり、後者は基質様化合物である。よって、静的構造のみからは見出せない求核的水分子の何らかの特性が酵素反応速度に影響していると考えられたため、次の研究では、求核的水分子の動的特性に基づく解析を行い、阻害剤と基質様化合物を判別する計算科学的手法を研究することとした。

第 2 章

基礎的研究：求核的水分子の動的解析

第2章 基礎的研究：求核的水分子の動的解析

第1節 背景

第1項 水和熱力学解析による酵素反応速度定数の推定

これまで、酵素反応における反応エネルギーを解析し反応速度を推定する方法として、量子化学計算による手法が研究されてきた¹⁰⁻¹³。しかしながら、本手法は計算コストが大きいいため、化合物ライブラリにある数多くの化合物の中から、阻害剤として有望な候補を選別するための手法としては適していない。一方、水和熱力学解析 (hydration thermodynamics analysis) は、シンプルな手順と合理的な計算コストで、MDシミュレーションを用いた水分子の動的解析に基づき、蛋白質表面における水和サイト（水サイト）の位置と、そのサイトにおいて水分子が獲得するギブズ自由エネルギーをはじめとする熱力学的パラメータを見積もることができる⁴³。

一般に、蛋白質表面の基質結合部位と疎水性相互作用している水分子は、分子認識及び結合過程における熱力学的駆動力をもたらすと考えられる。なぜなら、蛋白質表面の疎水的な結合ポケットからバルクの水に水分子が乖離することで、系のギブズ自由エネルギーが低下するためである。ポアソン-ボルツマン法や一般化ボルン法等、ある水分子が結合することで埋もれる部分の表面積に基づきギブズ自由エネルギーを推定する方法でも、疎水的効果を見

積もることができる⁴⁴。しかし、特にポアソン-ボルツマン法に基づく方法は、分子レベルのサイズにおける水和のエントロピーを十分な精度で見積もることができないため、結合親和性を過小評価する傾向がある。一方、水和熱力学解析は、顕な水分子を用いたシミュレーションにより、結合親和性を適切に見積もることができる。例えばストレプトアビジン-ビオチン複合体における非常に高い親和性は、ポアソン-ボルツマン法によりうまく見積もることができないが、水和熱力学解析によれば正確に見積もることができる⁴⁵。

これまでに、水和熱力学解析は多くの薬物標的に応用され、大きな正のギブズ自由エネルギー（好ましくないギブズ自由エネルギー）をもつ水分子がリガンドの結合により排除される際、リガンドと蛋白質との非共有結合が安定化し、結合親和性が増加する（ ΔG_{bind} が低下する）という知見^{46,47}が得られている。また、水和熱力学解析により、非共有結合性阻害剤の結合及び乖離の速度定数（ k_{on} 及び k_{off} ）の推定に有用であることも示されている⁴⁸。

以上のことから、水和熱力学解析により求核的水分子の熱力学的パラメータを見積もり、トリプシンの k_{cat} との関係を調べることにした。この研究は、知り得る限り、可逆的共有結合性阻害剤の創薬のため、水和熱力学解析を加水分解酵素の反応速度定数の見積もりに応用した初めての例である。

第2項 WaterMap

水和熱力学解析のソフトウェアのうち、最も多用されるアルゴリズムである *WaterMap*

(Schrödinger) は, Lazaridis により 1998 年に提唱された不均一流体理論 (inhomogeneous fluid theory) ^{49,50} に基づき, 顕な水分子を含む MD のトラジェクトリを解析し, 水分子が蛋白質表面からバルクの水に移動する際のギブズ自由エネルギーを計算する. 不均一流体理論は, ある粒子のエントロピーを, 配向的相関及び空間的相関の関数であるエントロピー展開項により見積もる. このモデルでは, バルクの水における水分子のエントロピーをゼロと定義し, 蛋白質表面の水分子の結合サイト (水サイト) において局在化し, ある構造 (配向及び位置がある程度一定となること) を持った水分子の余剰エントロピーを見積もることができる. *WaterMap* では実際には, エントロピー展開の 1 次の項及び 2 次の項の一部が計算される (式 2-1-2-1) .

$$S_e = -\frac{k_b \rho_w}{\Omega} \int g_{sw}(\mathbf{r}, \omega) \ln g_{sw}(\mathbf{r}, \omega) d\mathbf{r} d\omega - \frac{k_b \rho_w^2}{2\Omega^2} \int g_{sww}(\mathbf{r}^2, \omega^2) \ln \delta g_{sww}(\mathbf{r}^2, \omega^2) d\mathbf{r}^2 d\omega^2 - \dots$$

(式 2-1-2-1)

ここで, S_e は余剰エントロピー, \mathbf{r} と ω は水分子のデカルト座標及び水分子の配向のオイラー角, $g_{sw}(\mathbf{r}, \omega)$ は \mathbf{r} 及び ω における水分子の単体分布, $g_{sww}(\mathbf{r}, \omega)$ は水分子の 2 体分布, ρ_w はバルクの水分子の密度を表す.

WaterMap はまず, TIP4P 水モデル ⁵¹ を用いた比較的短い MD シミュレーションを行う. この MD シミュレーションは拘束分子動力学シミュレーション (restricted MD simulation) であり, 溶媒である水分子以外の重原子を剛体受容体近似に基づき, 調和振動子ポテンシャル

により拘束して行う。その後、水分子の結合キャビティにおける溶媒密度分布が分割され、続くクラスタ分析の後、主たる水分子の結合サイト（水サイト）を同定する。さらに、各々の水サイトにおける構造化された水分子のエントロピーを不均一流体理論に基づき見積もる。

第2節 方法

第1項 水和熱力学解析の準備

まず、初期構造として、第1章で結晶構造解析を行ったガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造（PDB ID: 3VPK⁵²）のほか、4つのトリプシンのアシルー酵素中間体の結晶構造をPDBより得た（PDB ID: 2AGG¹⁹, 2AGE¹⁹, 1GBT²⁰及び2AH4¹⁹）。また、これらの共有結合性リガンドの k_{cat} を、文献^{19,22,23}より取得した（表2-2-1-1）。

できなかった (付録Dを参照). これは, アシルトリプシン中間体の結晶構造が, 結晶中にパッキングされた構造に大きく偏っており, 水溶液中の蛋白質構造を反映していないことが原因であると考えられた. そこでまず, これらの結晶構造を初期構造としてMDシミュレーションを行い, 水溶液中で蛋白質がエネルギー的にとり得る構造をサンプリングすることとした.

最初に, 上記のこれらの結晶構造を, プログラム*Maestro* 10.3及びプログラム*Protein Preparation Wizard*⁵³ (ともにSchrödinger suite 2015-3) を用いて以下のとおり準備した. まず, 結晶構造中にある2価のカルシウムイオン, 及び共有結合性リガンド部分以外の非蛋白質残基は構造から適切に削除された. また, カルシウムイオンの配位水以外の全ての水分子もまた削除された. ジスルフィド結合は適切な位置に挿入された. 結晶構造モデル中になく側鎖や残基は, 必要に応じ, プログラム*Prime*^{54,55} 4.1 (Schrödinger suite 2015-3) によりモデリングされた. トリプシンの酵素反応の最適pHであるpH 8.0におけるイオン性のアミノ酸残基のプロトン化状態は, プログラム*PROPKA*⁵⁶により予測した. ただし, His57の側鎖は, N_δ原子のみプロトン化された状態とし, N_ε原子はプロトン化されていない状態とした. なぜなら, 酵素反応においてHis57 N_ε原子は, 求核的水分子を脱プロトン化する一般塩基として働くためである¹⁸. 最後に, プログラム*Impact*⁵⁷ 6.8の*Impref* モジュール (Schrödinger suite 2015-3) により, 連続体水モデル中における制限つきエネルギー極小化計算を行って蛋白質の構造を緩和し, 結晶中にパッキングされた構造への偏りを減らした.

得られた構造を初期構造として, MDシミュレーションをプログラム*Desmond*⁵⁸ 4.3

(Schrödinger suite 2015-3) により行い、水溶液中で蛋白質がエネルギー的に到達し得る構造の時系列データ(トラジェクトリ)を生成した。MDシミュレーションの初期構造となる系は、プログラム*Desmond*の*System Builder*モジュールで構築した。まず、蛋白質の端から10 Å離れたところに、水分子を充填する周期境界となる直方体の面を置き、溶媒であるTIP3P水モデル⁵¹で直方体を満たした。TIP3P水モデルは、水溶液中の蛋白質構造を得る目的で一般的に用いられ、計算効率が高い。各々の系は、全体として正に荷電していたため、系の電荷を塩化物イオン (Cl⁻) により中和した。蛋白質及び共有結合性リガンドにより修飾されたSer195及びその他のイオンの力場としては、OPLS3分子力場⁵⁹を用いた。

MDシミュレーションではまず、系の構造を、プログラム*Desmond*⁶⁸の標準的な平衡化プロトコル(一連のエネルギー極小化計算や短時間のMDシミュレーション)により緩和した。次に、長時間のMDシミュレーション(シミュレーション時間: 4.0–5.0 ns)を定温定圧(1 atm, 300 K)の条件で実施した。得られたトラジェクトリから、平衡化した1 nsのトラジェクトリ部分(平衡化の指標: RMSDが概ね一定であること)を抽出した(4.0–5.0 ns (2AH4), 3.0–4.0 ns (1GBT), 3.5–4.5 ns (3VPK), 3.0–4.0 ns (2AGG), 4.0–5.0 ns (2AGE))。その1 nsのトラジェクトリ部分からさらに、24 ps毎に構造の静止画(スナップショット)を抽出した。これらの構造から、*Maestro 10.3*の*Conformer Cluster*スクリプトを用い、共有結合性リガンドにより修飾されたSer195から4 Å以内にある重原子をRMSDに基づきクラスタリングすることにより、水溶液中の3つの代表的な構造を抽出した。

第2項 水和熱力学解析の妥当性の検証

次に、アシルトリプシン中間体においてソフトウェア *WaterMap* (Schrödinger suite 2015-3) を用いた水和熱力学解析を実施する妥当性を検証した。初期構造として、第1章で解析したガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造 (PDB ID : 3VPK) を用いた。まず、プログラム *Protein Preparation Wizard*⁵³ (Schrödinger suite 2015-3) により構造のエネルギーを極少化した。力場は、OPLS3分子力場⁵⁹を用いた。結晶構造中に観測された全ての水分子は、解析の前に削除された。解析において注目すべき領域の中心として、共有結合性リガンドにより修飾されたSer195を設定し、この残基から10 Å以内の水分子を解析の対象とした。解析に要する時間を短縮するため、蛋白質の構造は、*WaterMap* の標準的なプロトコルにより切り出し (トランケート) された。水モデルとしては、TIP4P水モデル⁵¹を用いた。TIP4P水モデルは、水分子の挙動をTIP3P水モデルよりも正確に見積もることができるため、*WaterMap* で一般的に用いられる。2 nsの水和熱力学解析の結果、アシル基のカルボニル炭素原子から5 Å以内に複数の水サイトの座標が予測された。これらの水サイトの座標と、同じ領域にある結晶構造中の水分子の座標とを比較した。さらに、上記と同様の手法により、他の4つの結晶構造 (PDB ID : 2AGG, 2AGE, 1GBT及び2AH4) でも水和熱力学解析を行い、妥当性の検証を行った。

第3項 水和熱力学解析

前項で、アシルトリプシン中間体において *WaterMap* 解析を実施する妥当性が確かめられたため、次に、MD シミュレーションによって得た 3 つの水溶液中の代表構造に対し、*WaterMap* による水和熱力学解析を実施した。解析条件は、第 2 項で検討された条件を用いた。TIP3P 水モデル⁵¹ 及び系の電荷を中和するために加えた塩化物イオン (Cl⁻) は、解析に先立ち削除された。

解析の結果、アシル基のカルボニル炭素原子から 5 Å 以内に複数の水サイトが予測されたが、その中から求核的水サイトを以下の方法により決定した。まず、求核的水分子からプロトンを引き抜く役割を果たす His57 の N_ε原子とある水サイトとの距離 d_1 、及び求核攻撃する対象の原子であるアシル基のカルボニル炭素原子とその水サイトとの距離 d_2 を求め、その和 $d = d_1 + d_2$ が最小である水サイトを求核的水サイトとした。なぜなら、求核的水分子は、求核的水分子を脱プロトン化する His57 の N_ε原子、及び求核攻撃するアシル基のカルボニル炭素原子の両方の原子から近い位置にあると考えられるためである。

さらに、求核的水サイトにおいて水分子が獲得する ΔG , ΔH 及び $-T\Delta S$ (全て基準はバルクの水分子)、求核的水サイトの水分子による占有率、並びに求核的水分子とアシルトリプシン中間体との間の水素結合数のトラジェクトリ平均 (#HB) を、共有結合性リガンド毎に平均 ($n=3$) した。得られた求核的水分子の ΔG , ΔH , $-T\Delta S$ の平均値を、以降特に ΔG_{wat} , ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$ と呼ぶこととする。最後に、得られた ΔG_{wat} と k_{cat} との関係を調べた。

第3節 結果

第1節 水和熱力学解析の準備

アシルートリプシン中間体の結晶構造を初期構造として MD シミュレーションを行い、水溶液中で蛋白質がエネルギー的にとり得る構造をサンプリングした。各々の MD トラジェクトリにおける重原子の RMSD の時間変化 (図 2-3-1-1) のうち、RMSD が概ね一定の値を示した 1 ns (図中の赤枠内) は、系が平衡状態にあると考えられた。この 1 ns のトラジェクトリ部分から構造のスナップショットを抽出した後、クラスタリングにより水溶液中の 3 つの代表的な構造を抽出した (図 2-3-1-2)。

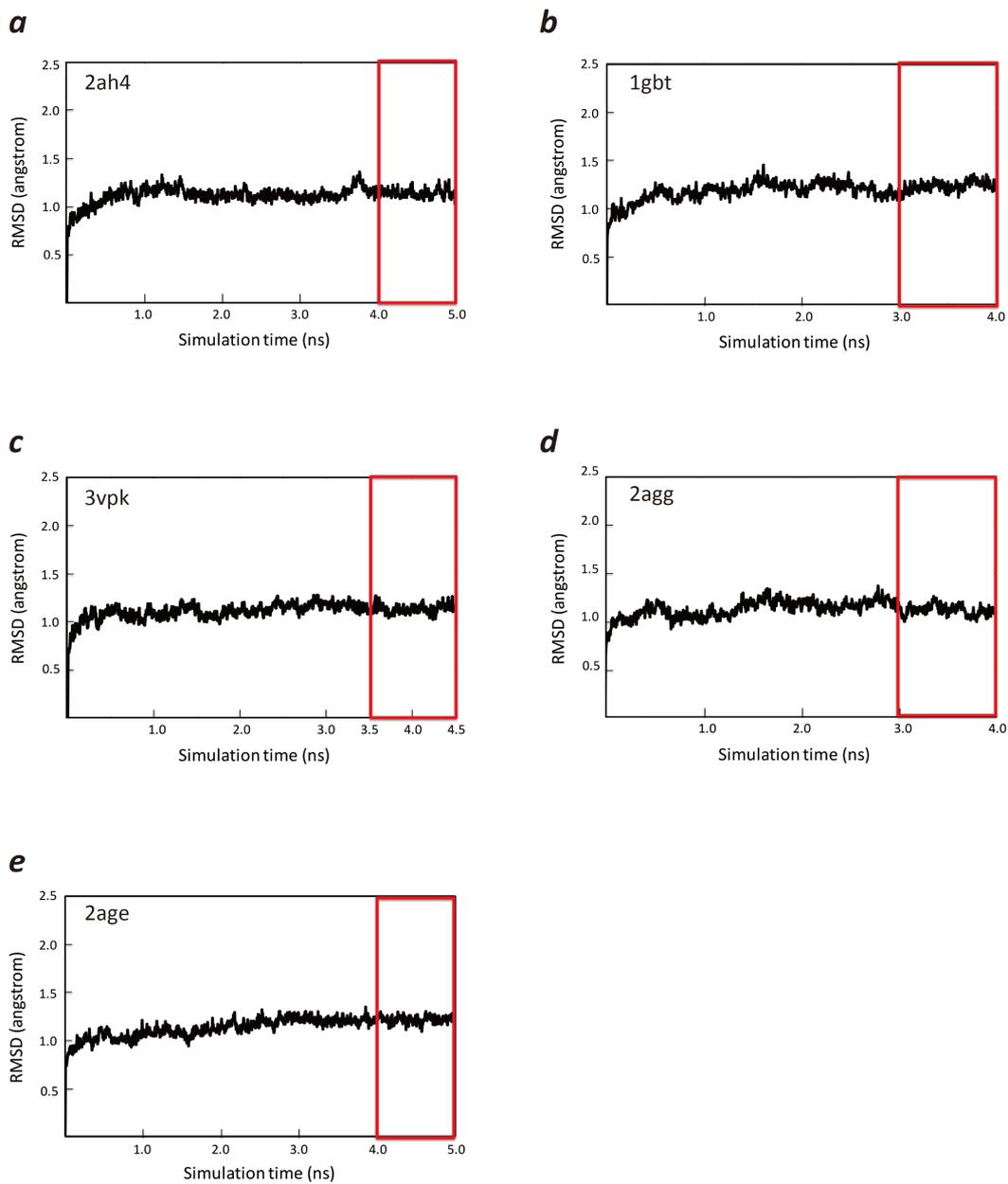


図2-3-1-1. 結晶構造のMDトラジェクトリにおける構造のRMSDの時間変化

赤枠内の1 nsは、RMSDが概ね一定の値を示しており、系が平衡化しているものと考えられる。

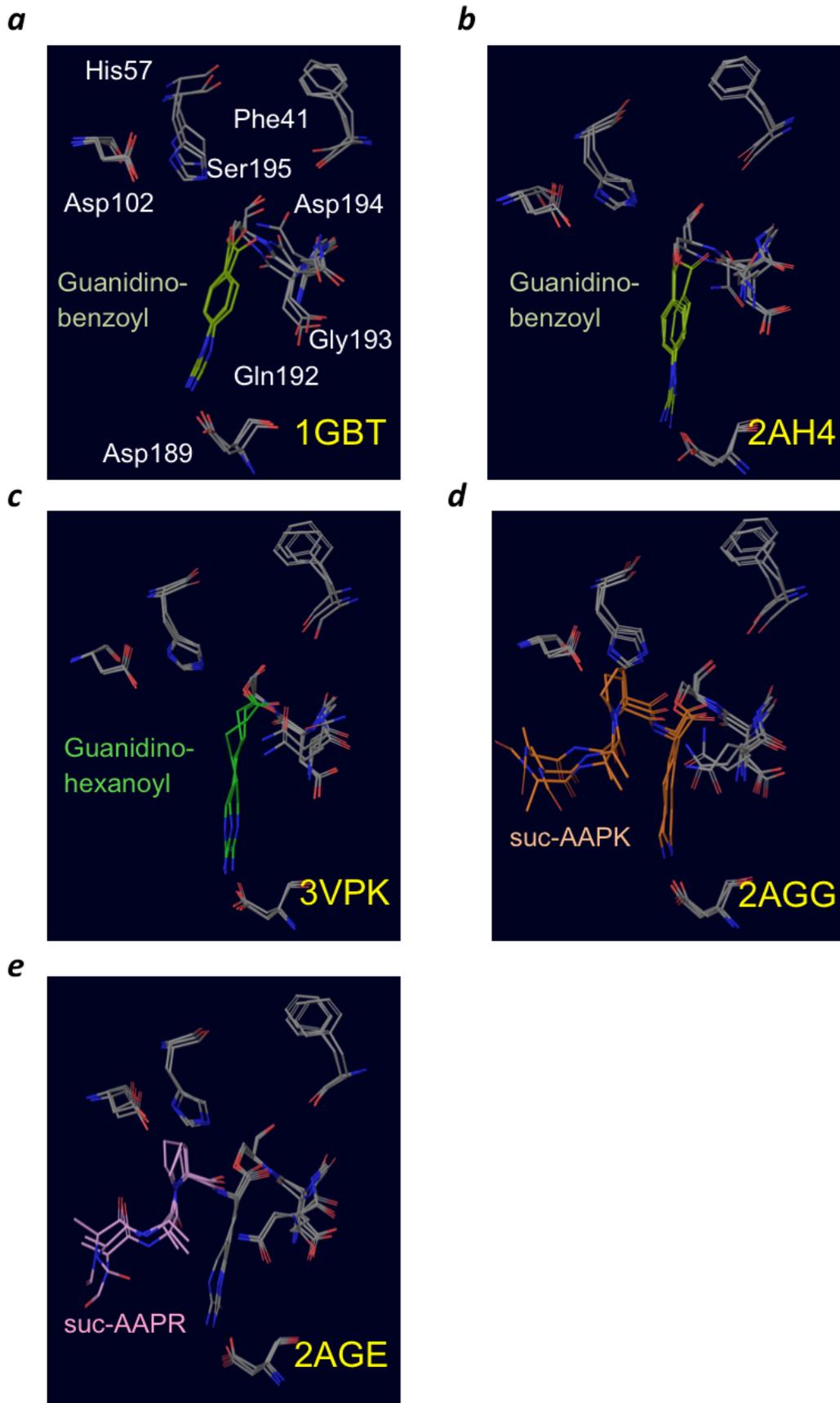


図2-3-1-2. 結晶構造のMDトラジェクトリから得た水溶液中の3つの代表構造

第2項 水和熱力学解析の妥当性の検証

アシルトリプシン中間体の結晶構造を用いて、*WaterMap*により水和熱力学解析を行う妥当性を検証した。その結果、ガベキサートのアシルトリプシン中間体（PDB ID：3VPK）では、アシル基のカルボニル炭素原子から5 Å以内に4つの水サイトが予測された。このうち、3つの水サイトは、結晶構造において観測された3つの水分子の全ての座標を概ね再現した。残りの1つの水サイトは、対応する結晶構造中の水分子がない水サイトであった（図2-3-2-1）。

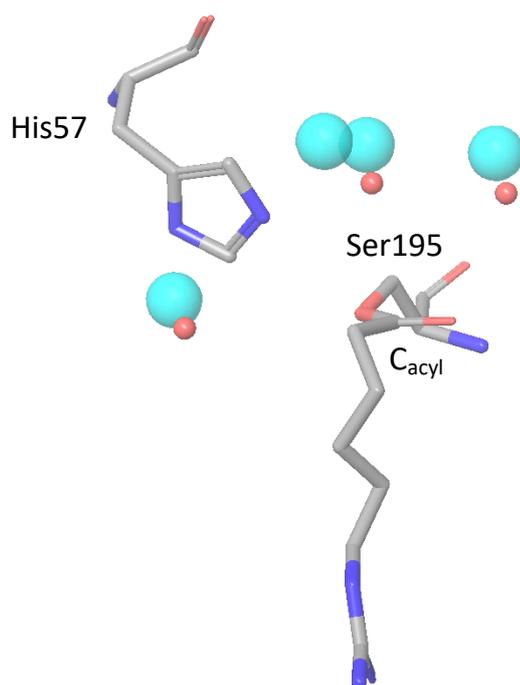


図2-3-2-1. ガベキサートのアシル基周辺の水サイトと結晶中の水分子

水色丸：予測された水サイト，赤丸：結晶中の水分子。

いずれも、アシル基のカルボニル炭素原子から< 5 Åの距離にあるもののみを示した。

また、結晶構造中に観測された3つの水分子の酸素原子の座標と、対応する3つの水サイトの座標との間の根平均二乗偏差 (RMSD) は、著しく小さかった (0.81 Å). さらに、他のアシルートリプシン中間体の結晶構造 (PDB ID : 2AGG, 2AGE, 1GBT及び2AH4) を用いて、同様に妥当性を検証した結果、予測された水サイトの座標は、それに対応する結晶構造中の水分子の座標を良好に再現した (RMSDはそれぞれ, 1.35 Å (2AGG) , 1.28 Å (2AGE) , 0.79 Å (1GBT) 及び0.57 Å (2AH4)). 以上のことから、アシルートリプシン中間体の水和熱力学解析を、*WaterMap*を用いて行うことは妥当であると考えられた.

第3項 水和熱力学解析

MDシミュレーション及びクラスタリングによって得た3つの水溶液中の代表構造を初期構造とし、*WaterMap*による水和熱力学解析を行った. その結果、各々のアシルートリプシン中間体において、求核攻撃を受けるアシル基のカルボニル炭素原子の周辺 (< 5 Å) に、複数の水サイトが予測された. 予測された水サイトの数は、各構造によって異なるものの、概ね5個程度であり、その中から前述の方法により決定された求核的水サイトの蛋白質残基中の相対位置は、各構造を通じ概ね似通っていた (図2-3-3-1). さらに、ナファモスタットのアシルートリプシン中間体の2つの結晶構造 (1GBT及び2AH4) は、概ね同じ ΔG_{wat} , ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$, 占有率及び#HBの値を与えた (図2-3-2-1脚注を参照). 以上のことから、*WaterMap*による解析は妥当であると考えられた.

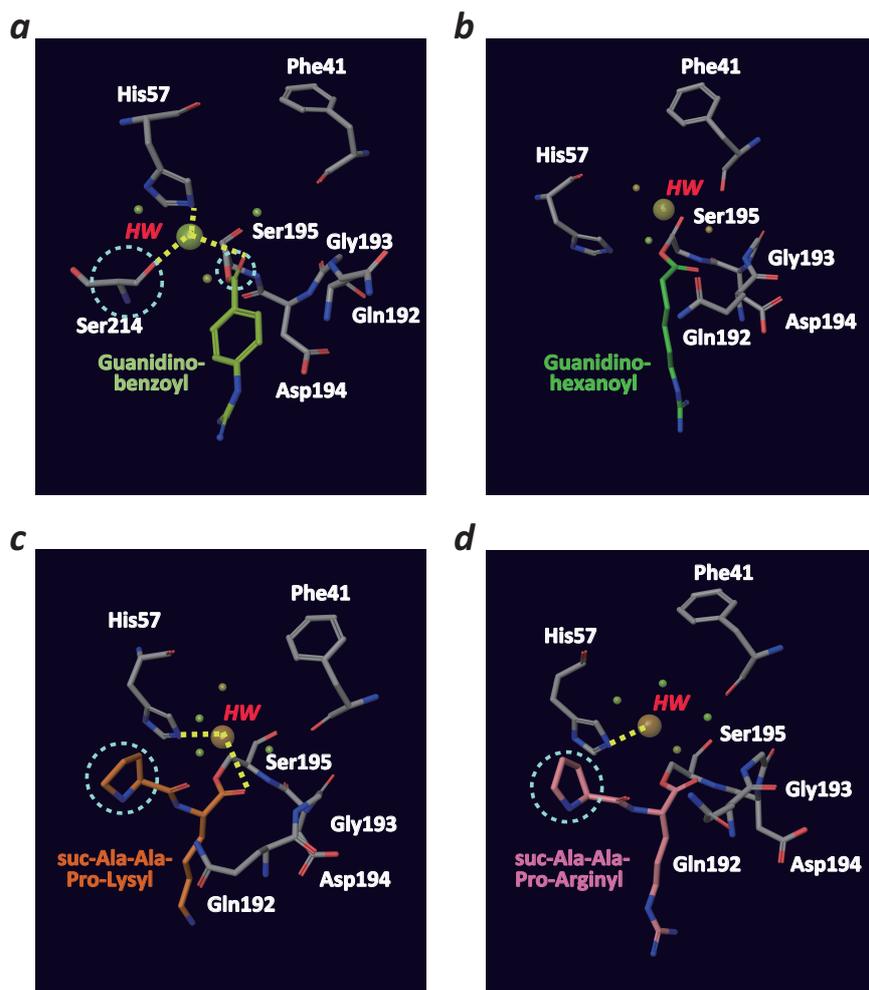


図2-3-3-1. 求核的水分子周辺の構造と ΔH_{wat} 及び $-T\Delta S_{\text{wat}}$ との関係

各々の共有結合性リガンドのアシルトリプシン中間体での水和熱力学解析の結果の一例.

a: ナファモスタット (#HB=1.3/0.8 (1GBTにおける値/2AH4における値, 以下同様) ,

$\Delta H_{\text{wat}}=-1.8/-1.4$ kcal/mol, 占有率=0.9/0.8, $-T\Delta S_{\text{wat}}=3.2/3.0$ kcal/mol) **b:** ガベキサート (#HB=0.6,

$\Delta H_{\text{wat}}=0.9$ kcal/mol, 占有率=0.4, $-T\Delta S_{\text{wat}}=1.3$ kcal/mol) , **c:** suc-AAPK-pNA (#HB=0.9, $\Delta H_{\text{wat}}=-0.4$

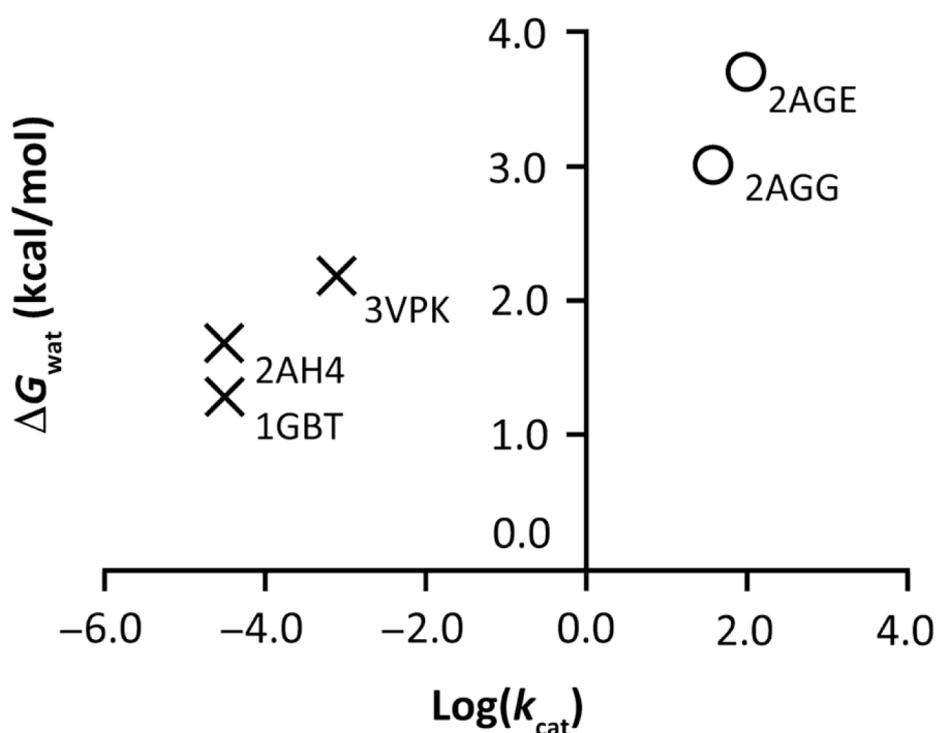
kcal/mol, 占有率=0.9, $-T\Delta S_{\text{wat}}=3.5$ kcal/mol) , **d:** suc-AAPR-pNA (#HB=0.4, $\Delta H_{\text{wat}}=1.0$ kcal/mol,

占有率=0.8, $-T\Delta S_{\text{wat}}=2.7$ kcal/mol) の比較. HW: 求核的水分子; 黄色点線: アシルトリプシン

ン中間体と求核的水分子との間の水素結合, 水色点線内: 求核的水分子にとって「袋小路

(cul-de-sac)」となる残基.

また、計算された全ての ΔG_{wat} は正の値を示した。このことから、いずれの共有結合性リガンドのアシルトリプシン中間体の活性部位においても、求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定であると考えられる。さらに、共有結合性リガンドの k_{cat} が小さいほど、 ΔG_{wat} もまた小さい値を示した(図 2-3-3-2)。よって、阻害剤における求核的水分子のギブズ自由エネルギー的な不安定化は、基質様化合物における不安定化よりも小さいと考えられる。



×は阻害剤，○は基質様化合物を表す。

図 2-3-3-2. $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ と ΔG_{wat} の関係 (再掲)

以上のことから、阻害剤のアシルトリプシン中間体の活性部位において、求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定であるものの、その不安定さは比較的小さいのに対し、

基質様化合物のアシルトリプシン中間体の活性部位において、求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定であり、かつその不安定さは阻害剤における求核的水分子に比べ大きいことが示された。ギブズ自由エネルギーは、仕事をする能力の程度を表すため、基質様化合物のアシルトリプシン中間体において大きいギブズ自由エネルギーを獲得した水分子による加水分解反応が進行しやすいことは容易に想像できる。以上のことから、水和熱力学解析により計算された ΔG_{wat} は、ある共有結合性リガンドが阻害剤と同等の k_{cat} を呈するか、あるいは基質様化合物と同等の k_{cat} を呈するかを判別し予測する際、重要な指標となり得る可能性が示された。

第4項 考察

トリプシンの脱アシル化では、His57により脱プロトン化された求核的水分子は水酸化物イオン(OH⁻)として単独で求核攻撃するのではなく、むしろ求核的水分子の脱プロトン化とアシル基のカルボニル炭素原子への水分子の求核攻撃は協奏的(concertedly)に進行すると考えられる。遷移状態理論(transition state theory)によれば、反応速度の大小は、遷移状態(今回の場合、アシルトリプシン中間体と第2の四面体中間体との間の遷移状態)と生成系(今回の場合、アシルトリプシン中間体)とのギブズ自由エネルギーの差により決まる。よって、生成系(アシルトリプシン中間体)において、水分子がより高いギブズ自由エネルギーを獲得するほど、ギブズ自由エネルギー的に不安定な遷移状態との自由エネルギー

一差はより小さくなる傾向を示すこととなるため、脱アシル化反応は迅速に進行すると考えられる。

また、各々の共有結合性リガンドにおける ΔH_{wat} 及び $-T\Delta S_{\text{wat}}$ を比較すると（図2-4-1），可逆的共有結合性阻害剤を設計する上で，以下の2つの戦略があり得ると考えられた。

(1) ΔH_{wat} を減少させること（ナファモスタット型）

(2) $-T\Delta S_{\text{wat}}$ を減少させること（ガベキサート型）

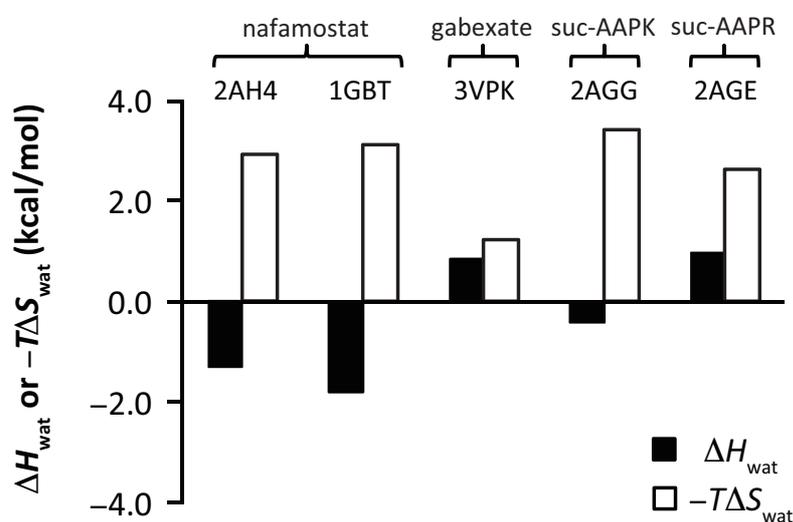


図2-4-1. 各共有結合性リガンドの ΔH_{wat} 及び $-T\Delta S_{\text{wat}}$

阻害剤ナファモスタットのアシルトリプシン中間体では， ΔH_{wat} が小さな正の値を示したため， ΔG_{wat} もまた小さな正の値を示したと考えられる。一方，阻害剤ガベキサートのアシルトリプシン中間体では， $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が小さな正の値を示したため， ΔG_{wat} もまた小さな正の値を示したと考えられる。

さらに、以下の傾向が見出された。

(1) 求核的水分子とアシルトリプシン中間体との間の水素結合数のトラジェクトリ平均

(#HB) の値が大きいほど、 ΔH_{wat} は小さい値を示す。

(2) 求核的水サイトにおける水分子の占有率が小さいほど、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ も小さい値を示す。

(1)より、水素結合は、求核的水分子をエンタルピー的に安定化する主な因子であることがわかる。さらに(2)について、基質様化合物であるsuc-AAPK-pNAのアシルトリプシン中間体では、求核的水サイト周辺の蛋白質残基は、活性部位から逃さぬよう求核的水分子を取り囲み、あたかも「袋小路 (cul-de-sac)」を形成している様に見える (図2-4-2 c)。これは、同じく基質様化合物であるsuc-AAPR-pNAのアシルトリプシン中間体 (図2-4-2 d) や、阻害剤であるナファモスタットのアシルトリプシン中間体 (図2-4-2 a) でも同様である。水分子の周囲の残基が「袋小路」を形成すると、水分子が滞留しやすくなるため、結果として占有率及び $-T\Delta S_{\text{wat}}$ は大きな値を示したと考えられる。一方、阻害剤であるガベキサートのアシルトリプシン中間体では、求核的水サイトの周辺に「袋小路」を形成する残基は無く、水分子が滞留しにくい。よって、占有率と $-T\Delta S_{\text{wat}}$ は小さい値を示したと考えられる (図2-4-2 b)。

このように、 ΔH_{wat} や $-T\Delta S_{\text{wat}}$ は、周辺の残基の構造に依存して変化するため、 ΔG_{wat} が小さい (すなわち、 k_{cat} が小さい) 共有結合性リガンドを設計する際、求核的水サイト周辺の構造は有用な手がかりを与えると考えられる。

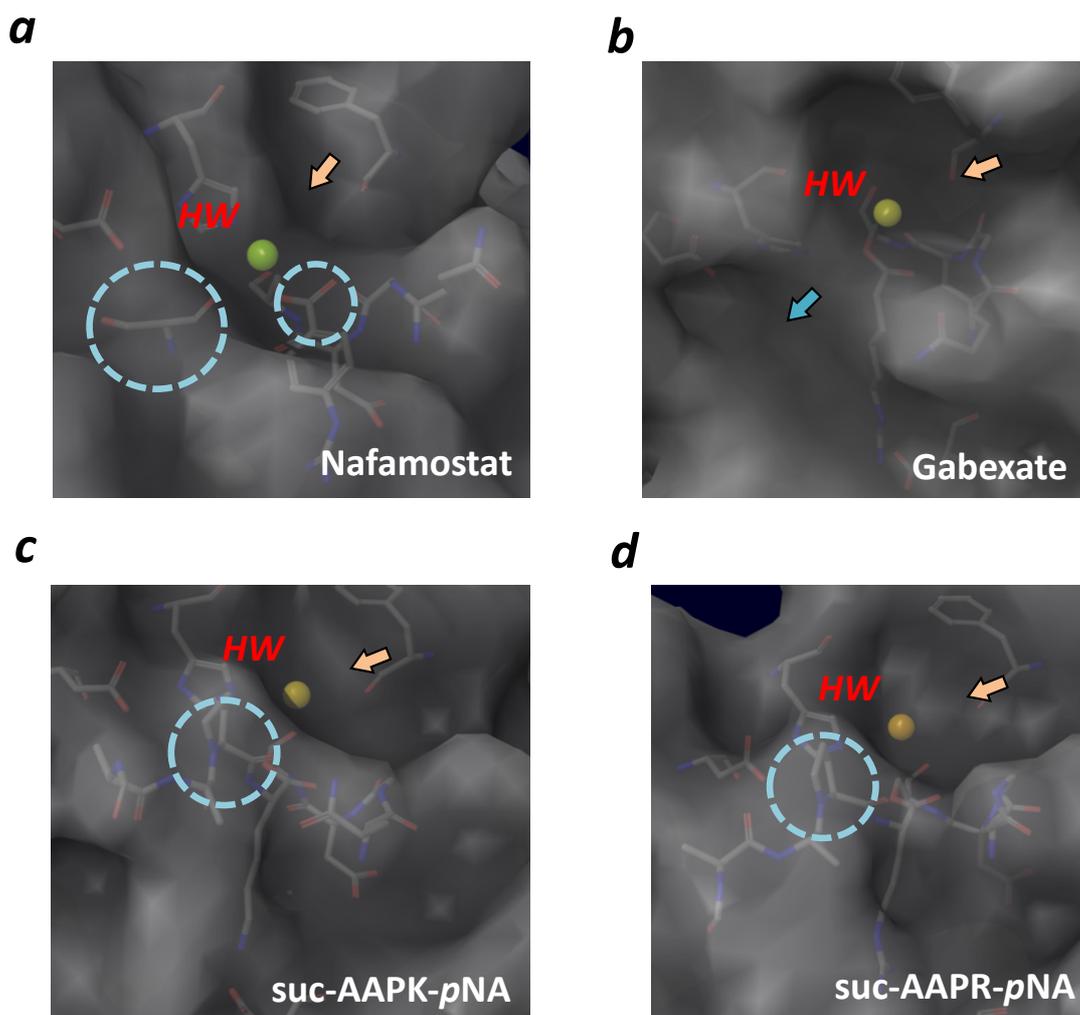


図2-4-2 求核的水サイト周辺の構造

水和熱力学解析の結果の一例。蛋白質表面は、Conolly表面で示した。球：求核的水サイト，水色丸印：「袋小路 (cul-de-sac)」残基，橙色矢印：水分子の求核的水サイトへの流入方向の一例，水色矢印：求核的水サイトからの水分子の流出方向の一例。b (ガベキサートのアシルトリプシン中間体) では，求核的水サイトの周りの蛋白質構造の隆起が少なく，水分子が求核的水サイトから逃れ出るのが容易であるのに対し，c (suc-AAPK-pNAのアシルトリプシン中間体)，d (suc-AAPR-pNAのアシルトリプシン中間体) 及びa (ナファモスタットのアシルトリプシン中間体) では，蛋白質表面が求核的水サイトを包み込んでいる。

さらに、 k_{cat} が大きい値であるほど、 ΔG_{wat} もまた大きな値を示すという結果から、基質様化合物の求核的水分子は、阻害剤の求核的水分子よりも不安定なギブズ自由エネルギーを獲得すると考えられる。ギブズ自由エネルギー的に不安定な求核的水分子は、求核的水サイトから逃れることで安定化するような熱力学的駆動力を得るが、前述のとおり、基質様化合物のアシルトリプシン中間体では、求核的水サイト周辺の残基があたかも「袋小路」を形成し求核的水分子を取り囲んでいるため、行き場を失った水分子は、求核攻撃し得るアシル基のカルボニル炭素原子を求核攻撃し、基質様化合物の脱アシル化反応は迅速に進むと考えられる。逆に、阻害剤において求核的水分子は、比較的安定なギブズ自由エネルギーを獲得するため、求核的水サイトから逃れる熱力学駆動力が基質様化合物の求核的水分子よりも小さい。よって、阻害剤の脱アシル化反応は緩徐に進むと考えられる。すなわち、位置エネルギー的に安定な水分子（小さいエンタルピーをもつ水分子）や、配向の自由度が比較的高い水分子（小さいエントロピー項 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ をもつ水分子）は、求核攻撃の頻度が低くなると考えられる。

他方、ギブズ自由エネルギー的に安定な求核的水分子は求核攻撃に適する求核的水サイトに長時間滞留するため、求核攻撃する頻度が高くなる、という正反対の議論も一見正しいように思われる。そこで、求核的水サイトにおける水分子の占有率を各々の共有結合性リガンド間で比較した。その結果、占有率は阻害剤では0.44から0.87、基質様化合物では0.45から0.93の値をとった。よって、阻害剤と基質様化合物の占有率には顕著な差はないと言える。

さらに、阻害剤のみを見ると、占有率が小さい値をとるほど、 k_{cat} は大きな値をとることが

わかる (図 2-4-3).

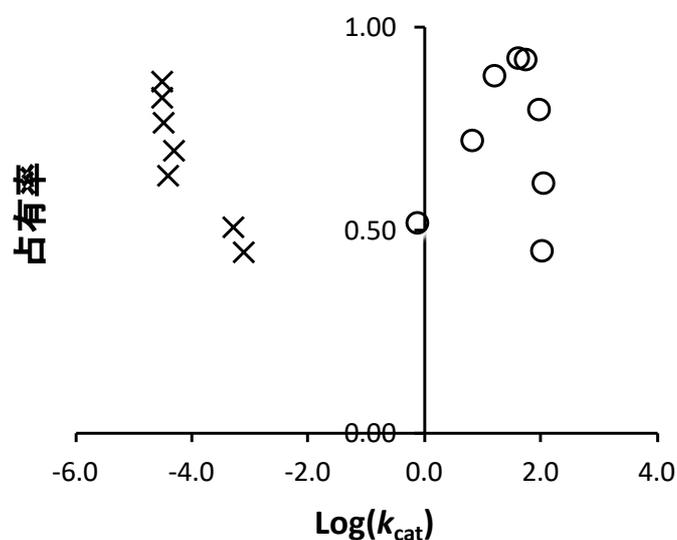


図 2-4-3. 酵素反応速度定数と平均占有率

xは阻害剤, oは基質様化合物を表す.

以上のことから, 求核的水サイトにおける水分子の占有率と k_{cat} との間には必ずしも相関がなく, 占有率が高いからといって求核攻撃の頻度が高くなるとは限らないことが示された.

その背景として, 反応速度定数と反応温度の関係を表すアレニウス (Arrhenius) の式について考察する. アレニウスの式は,

$$k = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (\text{式 1-2-4-1})$$

ここで, T は絶対温度, R は気体定数, A と E は反応に固有な定数で, 各々頻度因子 (frequency factor) と活性化エネルギー (activation energy) である. 頻度因子 A は, 反応する分子同士が適切な配向で出会う頻度の因子であり, 活性化エネルギー E は, 生成系から活性化された状態に移行するのに必要なエネルギーである. 本研究における占有率及びエントロピー項 (-

$T\Delta S_{\text{wat}}$) は、頻度因子 A と相関する。また、本研究における ΔH_{wat} は生成系のエネルギーに影響し、その結果、活性化エネルギー E にも影響する。よって、 k_{cat} を予測する際には、占有率 (頻度因子と相関) のみではなく、活性化エネルギーを含めて議論する必要がある。 ΔG_{wat} は ΔH_{wat} と $-T\Delta S_{\text{wat}}$ の和であり、水分子の位置エネルギー (活性化エネルギーに影響) と求核的水サイトにおける水分子の占有率 (頻度因子と相関) との双方を加味した指標である。よって、 k_{cat} が ΔG_{wat} によってはじめて評価できる、という結論は自然であると言える。

また、*WaterMap* による解析の結果得られる求核的水サイトの座標と、求核的水サイト周辺のトリプシン残基との幾何的パラメータを調べ、3 つの代表構造で平均した。その結果、結晶構造の場合 (表 1-4-2-1) と同様、阻害剤と基質様化合物との間で顕著な差は見られなかった (表 2-4-1)。よって、*WaterMap* 解析の結果得られる求核的水サイトの幾何的パラメータを用いて、阻害剤と基質様化合物を判別することは困難であることが示された。

表 2-4-1. 求核的水サイト周辺の幾何的パラメータの比較

共有結合性 リガンド名	属性	PDB ID	$k_{\text{cat}}(\text{sec}^{-1})$	Wat1 O— C _{acyl} (Å)	Wat1 O— His57N _ε (Å)	θ_x (deg)	θ_y (deg)
Nafamostat	阻害剤	1GBT	3.2×10^{-5}	3.80	3.27	98.20	74.47
Nafamostat	阻害剤	2AH4	3.2×10^{-5}	3.75	3.47	108.67	62.43
Gabexate	阻害剤	3VPK	8.0×10^{-4}	3.89	4.58	101.67	93.67
suc-AAPK- <i>p</i> NA	基質様化合物	2AGG	41	3.79	3.06	109.00	81.27
suc-AAPR- <i>p</i> NA	基質様化合物	2AGE	91	3.62	3.13	107.63	68.83

灰色行：阻害剤，白色行：基質様化合物，

赤字：各々のパラメータにおける類似した値。

今回研究対象とした共有結合性リガンドは4種類（アシルトリプシン中間体の結晶構造としては5つ）と少なかった。よって、より多くの共有結合性リガンドを対象とし、さらにその有用性を検証することが必要であると考えられた。

第3章

創薬研究への応用：

線形判別分析による阻害剤と基質様化合物の判別

第3章 創薬研究への応用：線形判別分析による阻害剤と基質様化合物の判別

第1節 序論

第2章までに、可逆的共有結合性阻害剤として有望な候補化合物と有望でない化合物を判別し予測する際、水分子が求核的水サイトにおいて獲得するギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) が重要な指標となる可能性があることが示された。そこで、創薬への応用を目的として、より多くの共有結合性リガンドを対象に、 ΔG_{wat} の有用性を検討することとした。具体的には、ある共有結合性リガンドの k_{cat} が既知の可逆的共有結合性阻害剤と同等であるか、あるいは既知の基質様化合物と同等であるかを判別する手法を開発することを目標とし、研究を行った。

第2節 方法

第1項 計算手順の概要

計算手順のフローチャートを図 3-2-1-1 に示す。 ΔG_{wat} を計算するための手順（エネルギー極小化、MD シミュレーション、水和熱力学解析等）及びその計算条件は、第2章で確立した方法と同一の方法により行った（図中の点線以外の部分）。ただし、第2章で確立された方

法は、今回、以下の3つの点で拡張された。(1) アシルトリプシン中間体の結晶構造が PDB に登録されていない共有結合性リガンドは、フレキシブル分子重ね合わせによりアシルトリプシン中間体構造をモデリングした。(2) ΔG_{wat} に加えて、アシルトリプシン中間体の脱アシル化の際の反応性の指標として、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (E_{orb}) を半経験的分子軌道計算により求めた。(3) ΔG_{wat} 及び E_{orb} を用いた線形判別分析 (linear discriminant analysis, LDA) を行い、構築された線形判別モデルにより阻害剤と基質様化合物を判別できるか否かについて調べた。

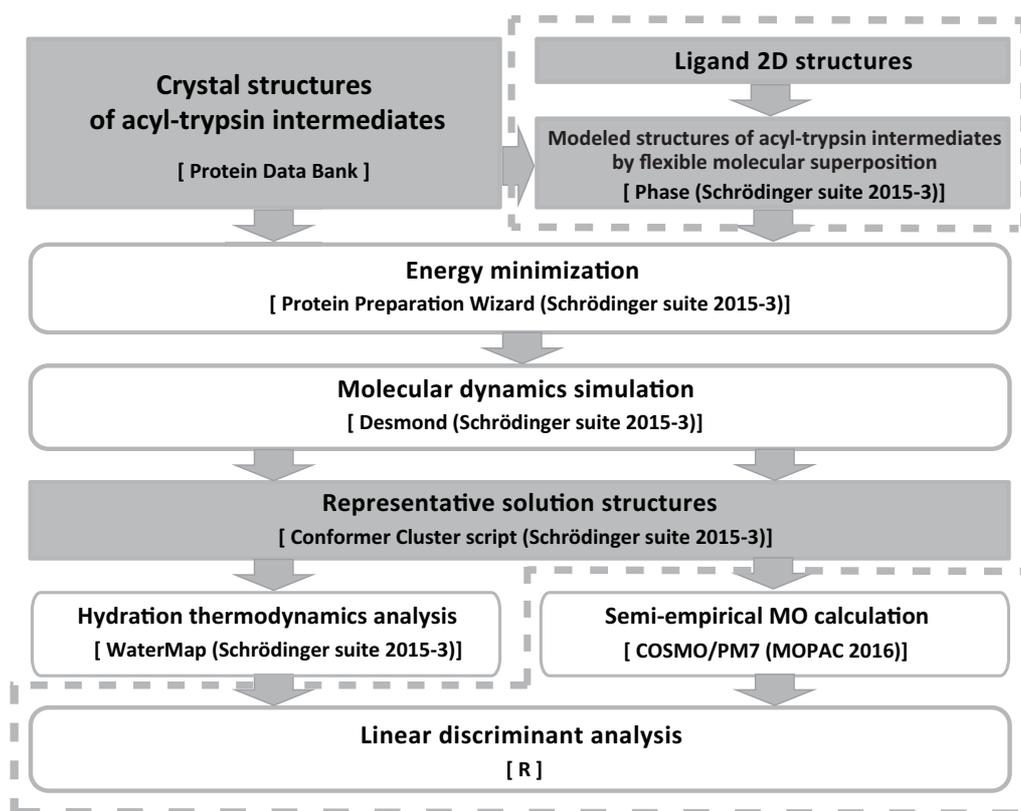


図 3-2-1-1. 計算手順のフローチャート

点線枠内は、第2章で採用した手順と比べ新規に採用された手順を示す。

第2項 リガンドデータセットの準備

まず、文献から、 k_{cat} が報告されている共有結合性リガンドの k_{cat} と化学構造式を取得した^{19,22,23,60,61}。次に、これらの共有結合性リガンドを、酵素反応速度定数の対数 ($\text{Log}(k_{\text{cat}})$) を指標とし、阻害剤群及び基質群の2つの群に分けた。阻害剤群と基質群とを分離する $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ の閾値は、 -1.0 とした。この閾値は、臨床的に用いられている阻害剤 (ナファモスタット : $\text{Log}(k_{\text{cat}}) = -4.5$ 及びガベキサート : $\text{Log}(k_{\text{cat}}) = -3.1$) と、基質様低分子化合物 (例えば K3 : $\text{Log}(k_{\text{cat}}) = -0.11$) 及びその他の基質ペプチド様化合物 (例えば suc-AAPK : $\text{Log}(k_{\text{cat}}) = 1.6$) を明確に分離できるため、設定された。次に、共有結合性リガンドを、2次元構造のフィンガープリントに基づくクラスタ分析により、学習用セットのリガンドと検証用セットのリガンドとに分けた。クラスタ分析にはプログラム *Canvas*^{62,63} (Schrödinger suite 2015-3) を用いた。クラスタ分析の際、原子タイプを決める方法として、linear daylight invariant 原子タイプ⁶⁴ (精度 : 32-bit) を用いた。原子間の結合は、結合次数により区別された。化合物の類似度は、平均リンク法に基づき、谷本係数 (Tanimoto coefficient) により求めた。検証用セットのリガンドは、各々のクラスタの中心に位置する化合物を選ぶものとした。検証用セットのリガンドは、第7項において、線形判別分析の妥当性の検証に用いた。

第3項 アシルトリプシン中間体構造の構築

本研究においても、薬物標的である蛋白質は第2章までと同様、トリプシンとした。研究に用いる共有結合性リガンドのうち、ナファモスタット^{19,20}、ガベキサート⁵²、suc-AAPR-pNA¹⁹及びsuc-AAPK-pNA¹⁹のアシルトリプシン中間体の結晶構造は、既にPDBに登録されていた(第2章を参照)。結晶構造が報告されていないその他の共有結合性リガンド^{42,60,61}のアシルトリプシン中間体は、プログラムPhase^{65,66}(Schrödinger suite 2015-3)を用いたフレキシブル分子重ね合わせにより、以下のとおりモデリングした。

まず、アシルトリプシン中間体の共有結合性リガンド部分の参照構造として、suc-AAPRトリプシン(2AGE)¹⁹中のprolyl-arginyl-Ser195部分を用いた。次に、prolyl-arginyl-Ser195部分の参照構造から5種類の特性球(正電荷、水素結合ドナー、水素結合アクセプター、疎水性、芳香族性)を抽出した。さらに、prolyl-arginyl-Ser195部分の参照構造のうち、プロリンの5員環の中心には、芳香族性の特性球を手動で設置した。その後、モデリングする探索対象の共有結合性リガンドから同様に特性球を抽出し、prolyl-arginyl-Ser195部分の参照構造から抽出した特性球に対しフレキシブルに重ね合わせた。

重ね合わされた共有結合性リガンドの複数のポーズから、1つのポーズを以下のとおり選択した。探索対象の共有結合性リガンドがグアニジノ基(-N-C(=N⁺)-N)を含む場合は、参照構造(suc-AAPRトリプシン)のprolyl-arginyl-Ser195部分グアニジノ基部分との間のRMSDが最小となるポーズを選択した。また、探索対象の共有結合性リガンドがエチルアンモニウム

ム基 (-C-C-N⁺) を含む場合は, suc-AAPR トリプシン (PDB ID : 2AGE) に重ね合わされた suc-AAPK トリプシン (PDB ID : 2AGG) の prolyl-lysyl-Ser195 のエチルアンモニウム基部分との RMSD が最小となるポーズを選択した. その後, 選択されたポーズの共有結合性リガンドは, 事前に共有結合性リガンドを削除した suc-AAPR トリプシン (PDB ID:2AGE) の Ser195 O_γ原子に手動で結合した. 以上の方法により, アシルートリプシン中間体の構造がモデリングされた.

第 4 項 水和熱力学解析の準備

アシルートリプシン中間体の結晶構造及び前項でモデリングされた構造を, プログラム *Protein Preparation Wizard*³ (Schrödinger suite 2015-3) により, 第2章と同一の手順で準備した. 次に, 得られた構造を初期構造とした, MDシミュレーションを第2章と同一の手順で行い, 水溶液中で蛋白質がエネルギー的にとり得る構造の時系列データ (トラジェクトリ) を生成した. シミュレーション時間は各々の構造に対し3.5–9.5 nsとし, 定温定圧 (1 atm, 300 K) の条件で実施した. 得られたトラジェクトリから, 平衡化した1 nsのトラジェクトリ部分 (平衡化の指標:RMSDが概ね一定であることを抽出し (4.0–5.0 ns (2AH4), 3.0–4.0 ns (1GBT), 3.5–4.5 ns (Lactone3), 8.5–9.5 ns (Isocoumarin4), 6.5–7.5 ns (Isocoumarin3), 6.0–7.0 ns (Isocoumarin1), 3.5–4.5 ns (3VPK), 3.0–4.0 ns (K3), 4.0–5.0 ns (R3), 3.0–4.0 ns (K2), 3.0–4.0 ns (2AGG), 4.0–5.0 ns (R1), 4.0–5.0 ns (2AGE), 4.0–5.0 ns (R2), and 2.5–3.5 ns (K1), 下線はモデリングされた構造, 下線なしは結晶構造), その1 nsのトラジェクトリ部分からさ

らに、24 ps毎に構造の静止画（スナップショット）を抽出した。これらの構造から、第2章と同一の方法でクラスタリングを行い、水溶液中の3つの代表的な構造を抽出した。

第5項 水和熱力学解析

アシルートリプシン中間体における求核的水分子のギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) を得るため、水和熱力学解析を行った。解析には *WaterMap* (Schrödinger suite 2015-3) を用い、解析条件は、第2章と同一とした。解析の結果、トリプシンの活性部位周辺に複数の水サイトが予測されたが、その中から求核的水サイトを決定する方法は、第2章と同一とした。さらに、求核的水サイトにおいて水分子が獲得する ΔG , ΔH 及び $-T\Delta S$ (全て基準はバルクの水分子)、求核的水サイトの水分子による占有率、並びに求核的水分子とアシルートリプシン中間体との間の水素結合数のトラジェクトリ平均 (#HB) を、共有結合性リガンド毎に平均 ($n=3$) した。求核的水分子の ΔG , ΔH , $-T\Delta S$ の平均値を、以降特に ΔG_{wat} , ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$ と呼ぶこととする。最後に、得られた ΔG_{wat} と k_{cat} との関係調べた。

第6項 半経験的分子軌道計算

前項での検討の結果、 ΔG_{wat} のみでは、今回研究対象としたリガンドにおける阻害剤と基質様化合物を完全に判別することはできないことが示された。そこで、共有結合性リガンド

により修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合 (C=O) の反応性の指標を半経験的分子軌道計算により得て、 ΔG_{wat} とともに判別に用いることとした。セリンプロテアーゼの脱アシル化反応では、求核的水分子による求核攻撃が律速段階であり¹⁸、この反応ステップにおいてはまず、求核的水分子のローンペアの最高被占有軌道 (HOMO) と、カルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道が軌道間相互作用する。よって、これらの2つの反応性分子軌道の軌道エネルギーの差は、アシルトリプシン中間体の加水分解の反応性の指標となる。いま、今回検討する脱アシル化反応では、求核剤である求核的水分子の座標及びその周辺的环境は概ね同様であり、求核的水分子の HOMO の軌道エネルギーは、全てのアシルトリプシン中間体を通じて概ね一定であると仮定すると、アシルトリプシン中間体のアシル基のカルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (E_{orb}) を、共有結合性リガンドの反応性の指標とすることができると考えられる。

まず、第4項までに得られたアシルトリプシン中間体の水溶液中の3つの代表構造から、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 部分 (Ser195 の C_{α} 炭素原子、 C_{β} 炭素原子、 O_{γ} 酸素原子、アシル基及び共有結合性リガンド部分。ただし水素原子を含む) を抽出した。抽出された構造の末端にある Ser195 の C_{α} 炭素原子に、プログラム *Maestro* 10.3 を用い水素原子を付加した後、プログラム *MacroModel* (Schrödinger suite 2015-3) を用いた制限付きエネルギー極小化計算により、付加した水素原子の座標を最適化した。その後、水溶液中の環境を模擬した条件下での半経験的分子軌道計算を、プログラムパッケージ *MOPAC2016*⁶⁷ を用いて行った。ハミルトニアンモデルは *PM7*⁶⁸ を用い、溶媒の効果を *COSMO* (conductor-like screening

model) ⁶⁹ 法により取り込んだ。水の比誘電率は、78.3 とした。いずれの共有結合性リガンドも、正に荷電した1つのグアニジノ基または1つのエチルアンモニウム基を含むため、共有結合性リガンド部分の電荷は+1 とした。その後、自己無撞着場 (self-consistent field, SCF) 計算を、各構造について行った。その後、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道を、グラフィカルソフトウェア Jmol⁷⁰ により描画しその軌道エネルギーを解析した。最後に、反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギーを各々の共有結合性リガンド毎に平均し ($n=3$)、平均軌道エネルギー (E_{orb}) を得た。最後に、得られた E_{orb} と k_{cat} との関係調べた。

第7項 線形判別分析

次に、第5節及び第6節によって得られた ΔG_{wat} 及び E_{orb} によって共有結合性阻害剤候補化合物と基質様化合物が判別できるか否かを調べるため、線形判別分析 (linear discriminant analysis, LDA) を行った。分析には、プログラム R⁷¹ version 3.4.0 (R Core Team 2017) 及びプログラム RStudio⁷² version 1.0.143 (Rstudio Team 2016) を用いた。まず、第2項で定義された学習用セットのリガンドを用い ΔG_{wat} 及び E_{orb} による線形判別モデルを構築した。事前確率は、阻害剤群と基質群とで等しいものとした (両者ともに 0.5)。その後、構築された線形判別モデルに基づき検証用セットを判別し、正しく判別されたリガンドの割合により、構築されたモデルの評価を行った。

第3節 結果

第1項 リガンドデータセットの準備

共有結合性リガンドの2次元構造の類似性に基づくクラスタリング分析の結果を図 3-3-1-1 に示す。マージ距離 0.9 を分類線として採用し、クラスタ中心の共有結合性リガンドを選択した際、阻害剤群及び基質群から各々2つの共有結合性リガンド（阻害剤群：nafamostat 及び isocoumarin4, 基質群：suc-AAPR-pNA 及び K1）が選択された。よって、これらを検証用セットの共有結合性リガンドとした（図 3-3-1-2）。尚、前述のとおり、ナファモスタットのアシルトリプシン中間体には2つの異なる結晶構造（1GBT 及び 2AH4）が存在するため、結果的に、阻害剤群から3つ、基質群から2つのアシルトリプシン中間体構造が選択されたことになる。

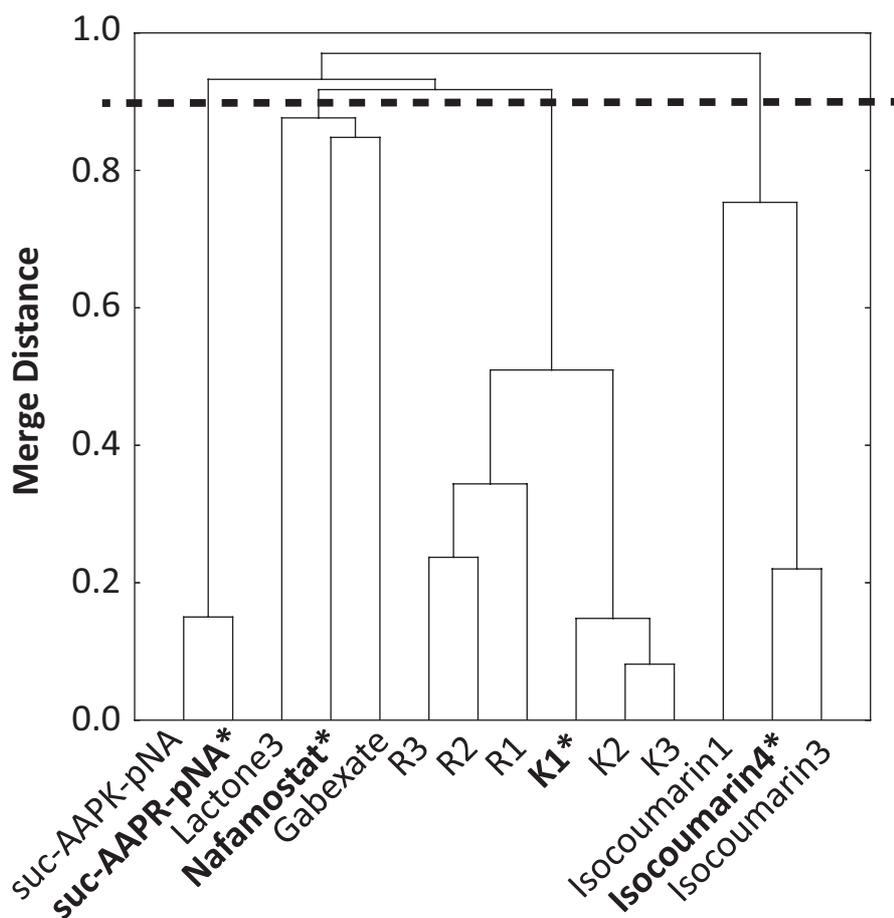


図 3-3-1-1. 共有結合性リガンドのクラスタ分析によって得られた樹形図

点線：分類線，細文字：学習用セットのリガンド，

アスタリスク付太文字：検証用セットのリガンド

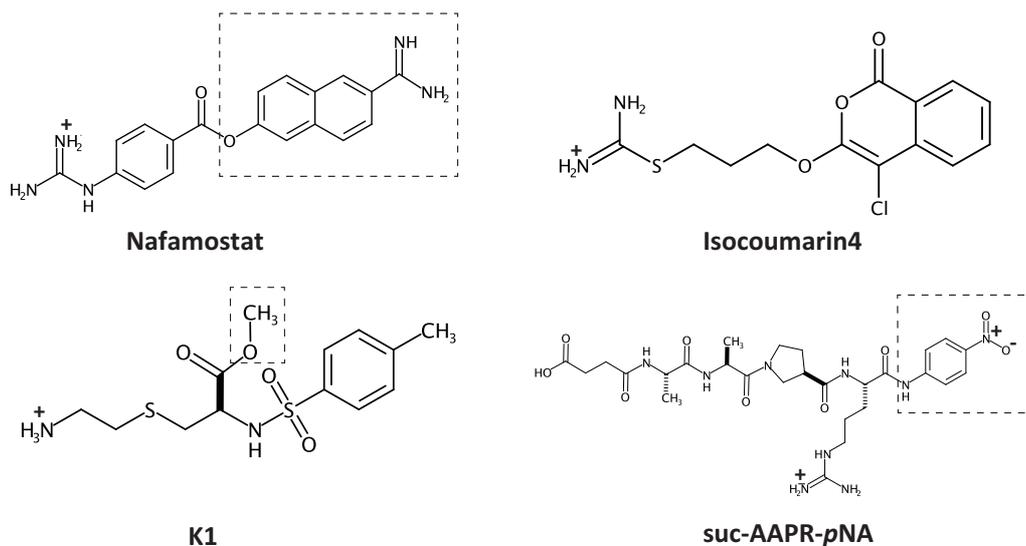


図 3-3-1-2. 検証用セットのリガンド

点線枠内：脱離基

第2項 アシルートリプシン中間体構造の構築

次に、アシルートリプシン中間体の結晶構造が報告されていない共有結合性リガンドのアシルートリプシン中間体構造をモデリングした。フレキシブル分子重ね合わせによって得られたいくつかのポーズから、共有結合性リガンドあたり1つのポーズを、第2節 第3項に示した基準に基づき選択した。その結果、選択されたポーズは、参照構造（suc-AAPR トリプシンの prolyl-arginyl-Ser195 部分または suc-AAPK トリプシンの prolyl-lysyl-Ser195 部分）に対し適切に重ね合わされていた（図 3-3-2-1）。

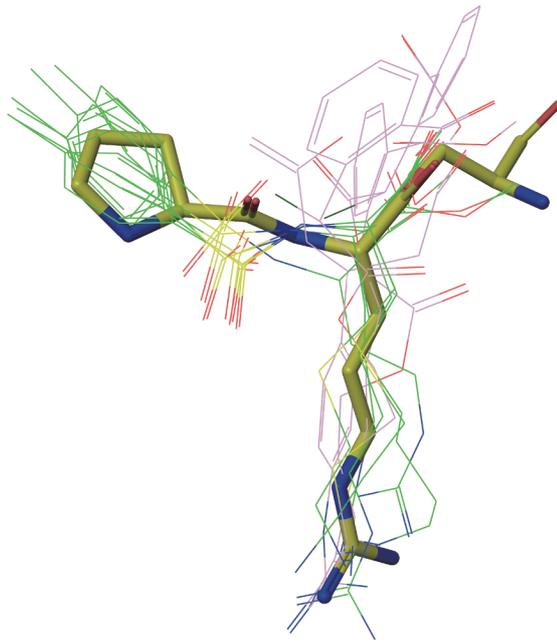


図 3-3-2-1. フレキシブル分子重ね合わせにより構築された

トリプシン分子内の共有結合性リガンドのモデル構造

黄色棒線：参照構造（suc-AAPRトリプシン（2AGE）のprolyl-arginyl-Ser195部分）,

緑線: 参照リガンド構造に重ね合わされた基質様化合物,

桃色線：参照リガンド構造に重ね合わされた阻害剤

第3項 水和熱力学解析の準備

次に、モデリングしたアシルトリプシン中間体の結晶構造を初期構造としてMDシミュレーションを行い、水溶液中で蛋白質がエネルギー的にとり得る構造をサンプリングした。

各々のMDトラジェクトリにおける重原子のRMSDの時間変化（図3-3-3-1）のうち、RMSDが概ね一定の値を示した1 ns（図中の赤枠内）は、系が平衡状態にあると考えられた。

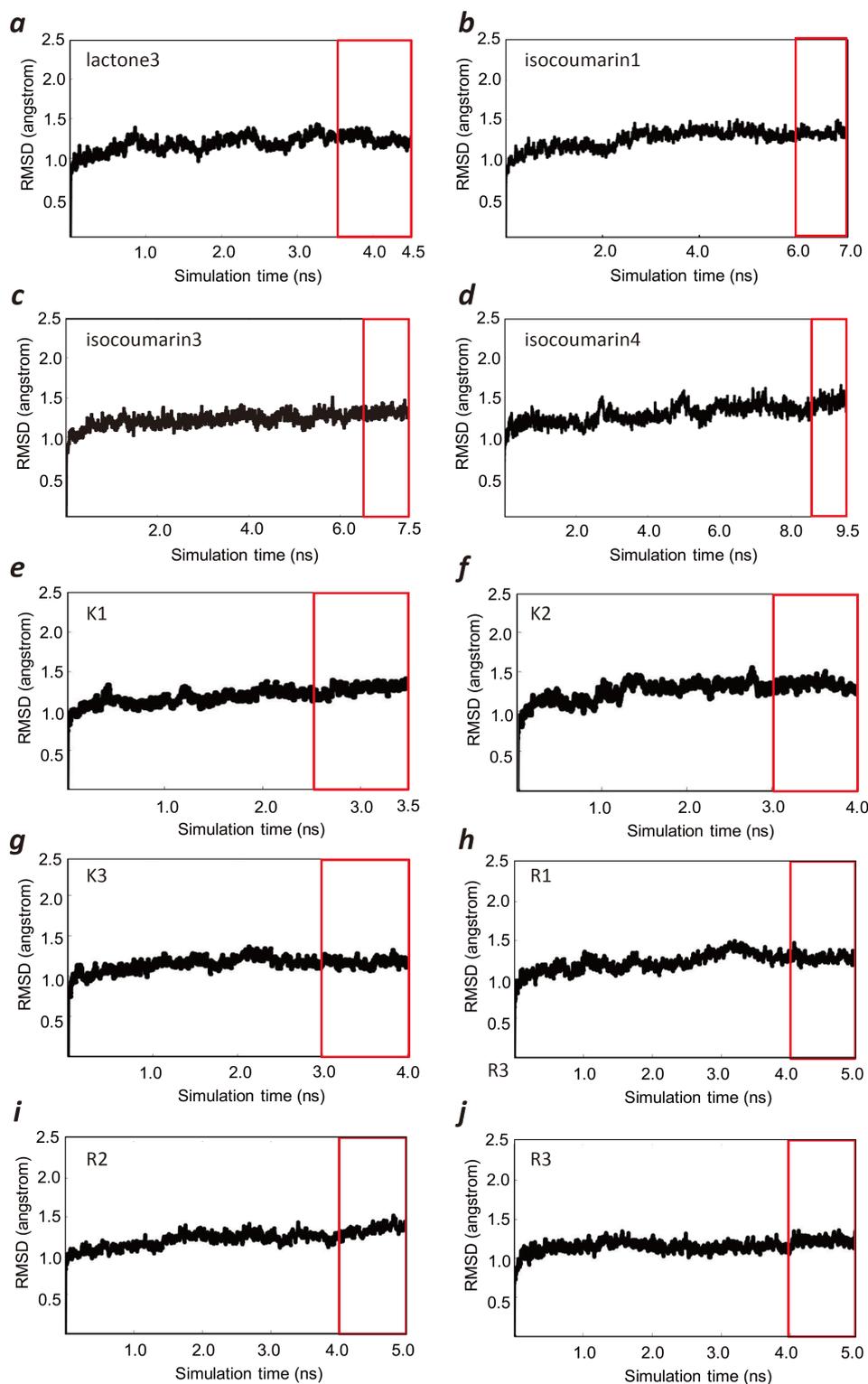


図3-3-3-1. モデリングした構造のMDトラジェクトリにおける構造のRMSDの時間変化

赤枠内の1 nsは、RMSDが概ね一定の値を示しており、系が平衡化しているものと考えられた。

この1 nsのトラジェクトリ部分から静止画（スナップショット）を抽出した後、クラスタリングにより水溶液中の3つの代表的な構造を抽出した。阻害剤の代表構造を図3-3-3-2に、基質様化合物の代表構造を図3-3-3-3に示す。

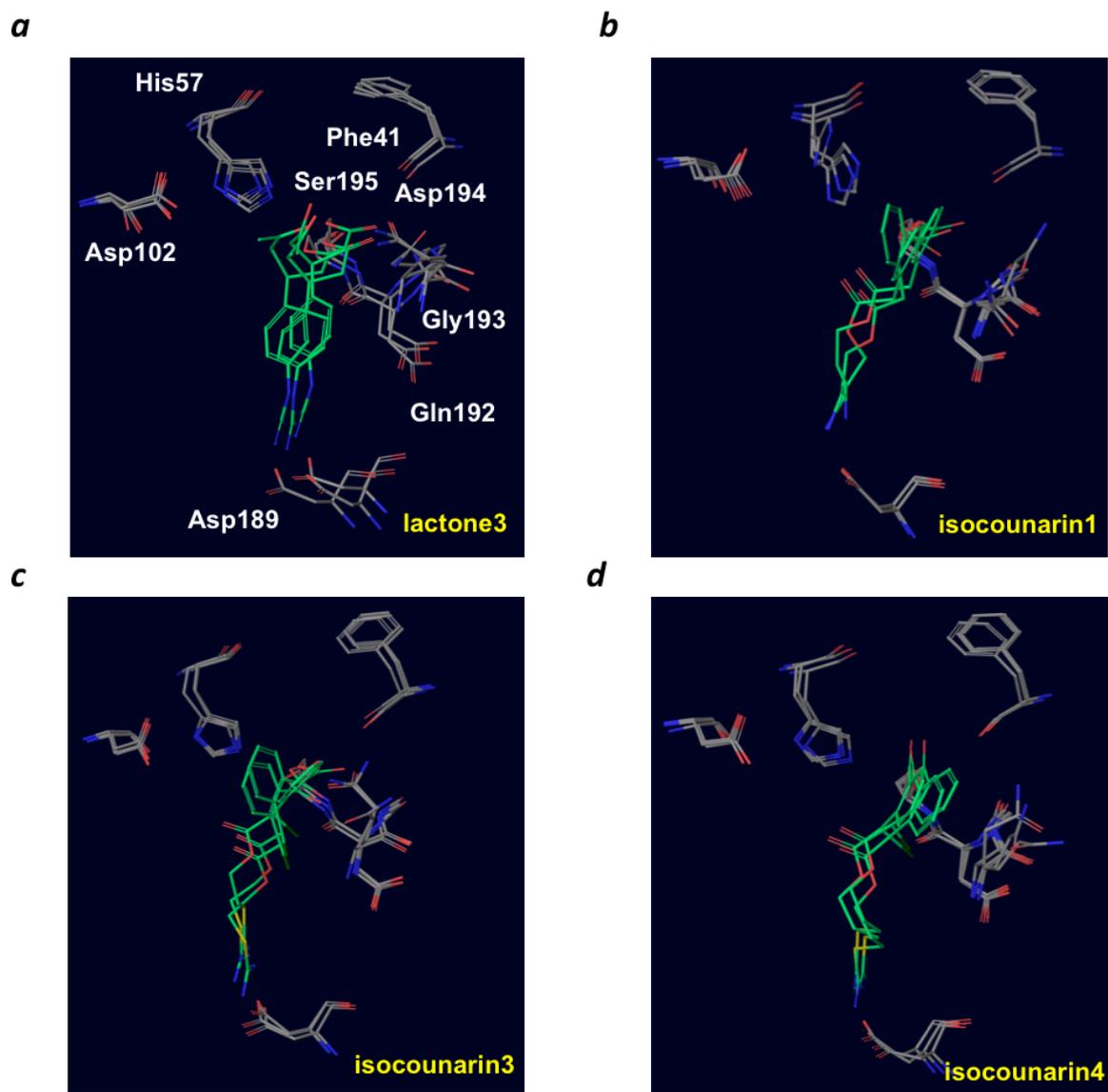


図3-3-3-2. モデリングした構造のMDトラジェクトリから得た水溶液中の3つの代表構造
(阻害剤)

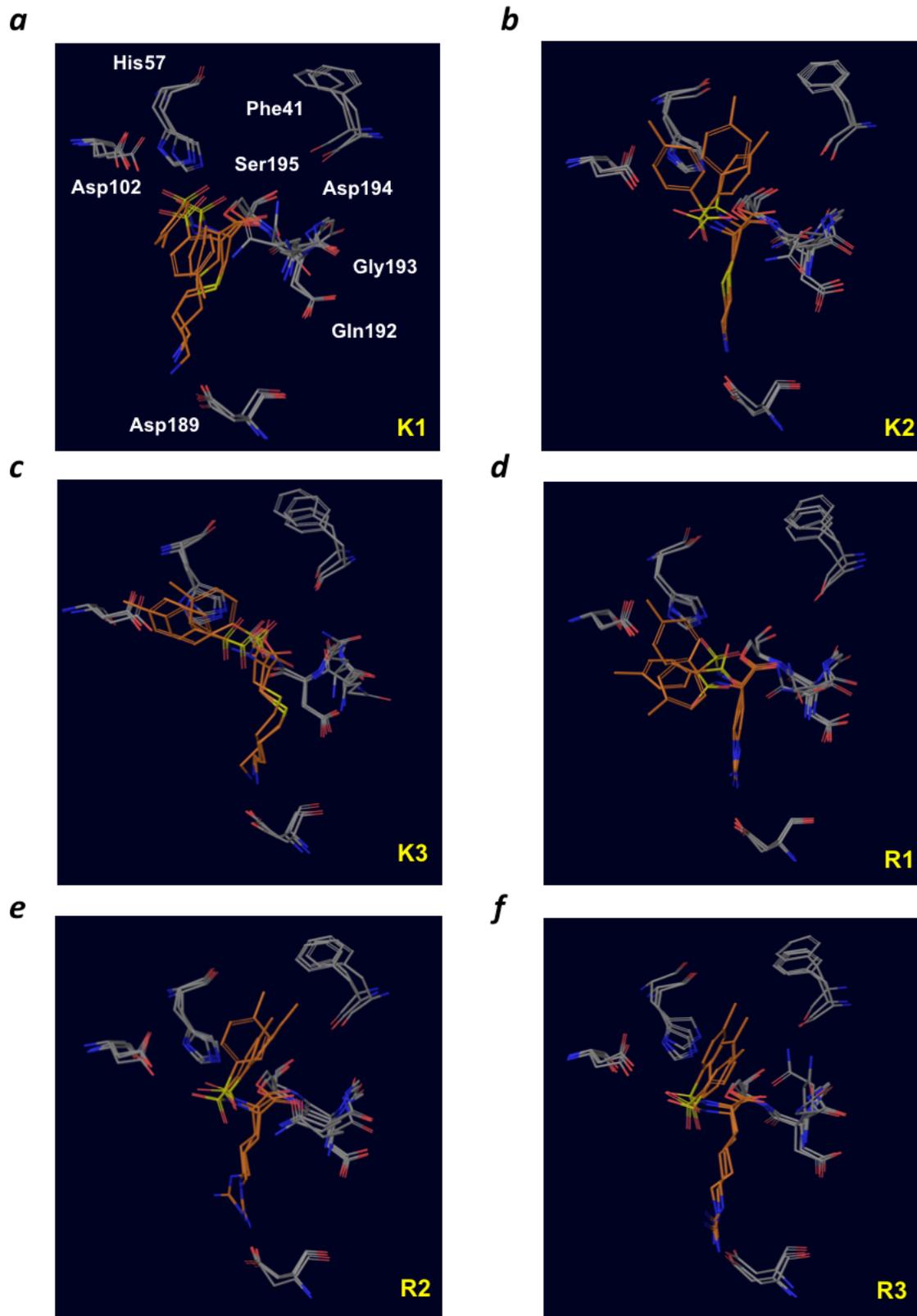
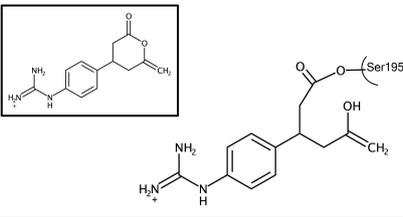
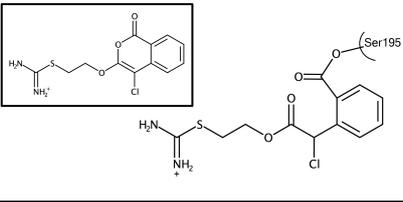
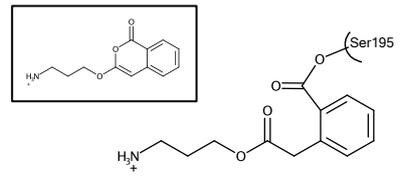
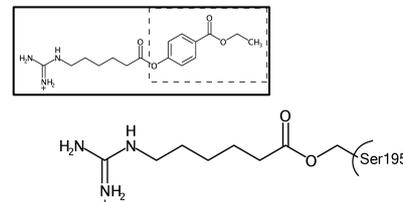
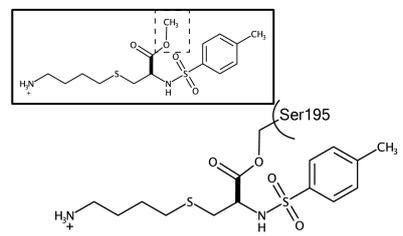


図3-3-3-3. モデリングした構造のMDトラジェクトリから得た水溶液中の3つの代表構造
(基質様化合物)

第4項 水和熱力学解析

MDシミュレーションにより水溶液中の3つの代表構造を得た後、*WaterMap*による水和熱力学解析を行った。その結果、アシルトリプシン中間体の活性部位周辺に複数の水サイトが予測された。学習用セットのリガンドの ΔG_{wat} を表3-3-4-1に、検証用セットのリガンドの ΔG_{wat} を表3-3-4-2に示した。

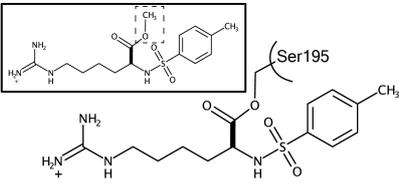
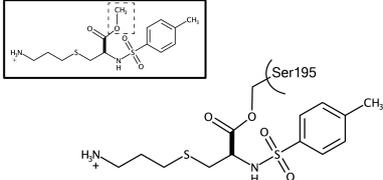
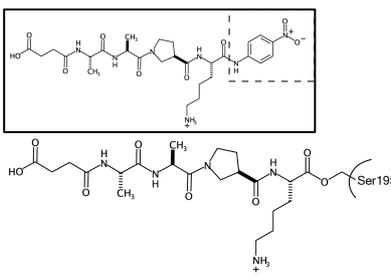
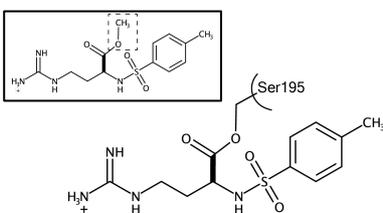
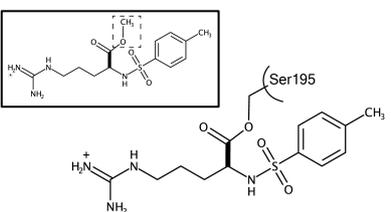
表 3-3-4-1. 学習用セットのリガンドとその関連データ及び ΔG_{wat}

番号	リガンド名/ リガンド構造/ アシルー酵素中間体構造	属性	PDB ID	k_{cat} (s^{-1})	ΔG_{wat} (kcal/mol)
1	Lactone3 	阻害剤	-	3.3×10^{-5} (文献 61)	1.3
2	Isocoumarin3 	阻害剤	-	5.0×10^{-5} (文献 60)	2.6
3	Isocoumarin1 	阻害剤	-	5.3×10^{-4} (文献 60)	4.2
4	Gabexate 	阻害剤	3VPK (文献 53)	8.0×10^{-4} **	2.2
5	K3 	基質様 化合物	-	7.7×10^{-1} (文献 43)	3.3

実線枠内：共有結合性リガンドの構造，点線枠内：脱離基

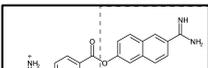
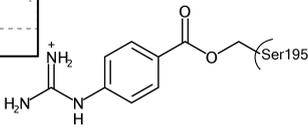
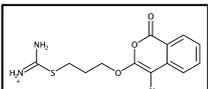
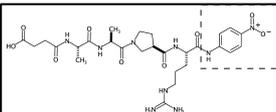
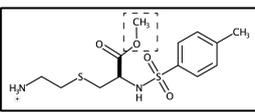
**：ガベキサートの $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ は，序章 第 4 節に記載した方法により推定した^{22,23}。

表 3-3-4-1. 学習用セットのリガンドとその関連データ及び ΔG_{wat} (続き)

番号	リガンド名/ リガンド構造/ アシルー酵素中間体構造	属性	PDB ID	k_{cat} (s^{-1})	ΔG_{wat} (kcal/mol)
6	R3 	基質様 化合物	-	6.7 (文献 43)	4.2
7	K2 	基質様 化合物	-	16.2 (文献 43)	3.4
8	suc-AAPK-pNA 	基質様 化合物	2AGG (文献 20)	41 (文献 20)	3.0
9	R1 	基質様 化合物	-	54.3 (文献 43)	3.2
10	R2 	基質様 化合物	-	106 (文献 43)	4.2

実線枠内：共有結合性リガンドの構造，点線枠内：脱離基

表 3-3-4-2. 検証用セットのリガンドとその関連データ及び ΔG_{wat}

番号	リガンド名/ リガンド構造/ アシル-酵素中間体構造	属性	PDB ID	k_{cat} (s^{-1})	ΔG_{wat} (kcal/mol)
1	Nafamostat 	阻害剤	2AH4 (文献 20)	3.2×10^{-5} (文献 23)	1.7
2			1GBT (文献 21)		1.3
3	Isocoumarin4 	阻害剤	-	4.0×10^{-5} (文献 60)	2.2
4	suc-AAPR- <i>p</i> NA 	基質様 化合物	2AGE (文献 20)	91 (文献 20)	3.7
5	K1 	基質様 化合物	-	113 (文献 43)	3.9

実線枠内：共有結合性リガンドの構造，点線枠内：脱離基

WaterMap 解析の結果，全ての ΔG_{wat} は正の値を示した．このことから，いずれの共有結合性リガンドのアシル-トリプシン中間体でも，求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定化されるものと考えられる．さらに，少数の例を除き， k_{cat} の対数値が小さいほど， ΔG_{wat} もまた小さい値を示した．しかし，1つの例外 (isocoumarin1) のために， ΔG_{wat} のみを指標として阻害剤群と基質群を判別することはできなかった (図 3-3-4-1)．

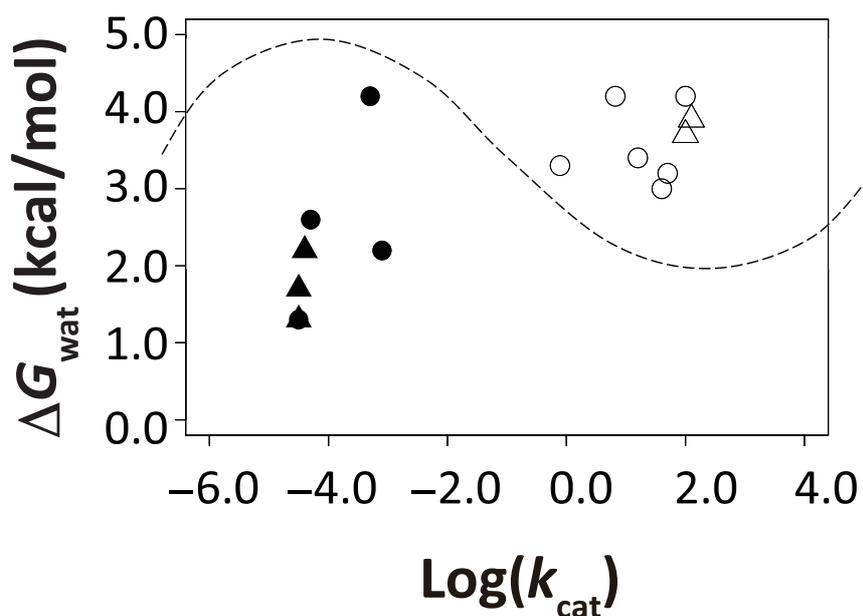


図3-3-4-1. 阻害剤と基質様化合物の ΔG_{wat} のみによる線形判別分析

● : 阻害剤 (学習用セット), ○ : 基質様化合物 (学習用セット),

▲ : 阻害剤 (検証用セット), △ : 基質様化合物 (検証用セット).

曲線 (点線) は, $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ の大小を, ΔG_{wat} のみを指標として線形判別できないことを示す.

以上のことから, 阻害剤のアシルトリプシン中間体の活性部位において, 求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定であるものの, その不安定化の程度は一部の阻害剤を除き比較的小さいのに対し, 基質様化合物のアシルトリプシン中間体の活性部位において, 求核的水分子はギブズ自由エネルギー的に不安定であり, かつその不安定化の程度は阻害剤における求核的水分子に比べ大きいと考えられた.

第 5 項 半経験的分子軌道計算

半経験的分子軌道計算を行った後、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道を同定した。その後、同定した反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギーを、共有結合性リガンド毎に平均 ($n=3$) した。学習用セット及び検証用セットのリガンドの反結合性 (π^*) 軌道及びその軌道エネルギーを、各々図 3-3-5-1 及び図 3-3-5-2 に示す。

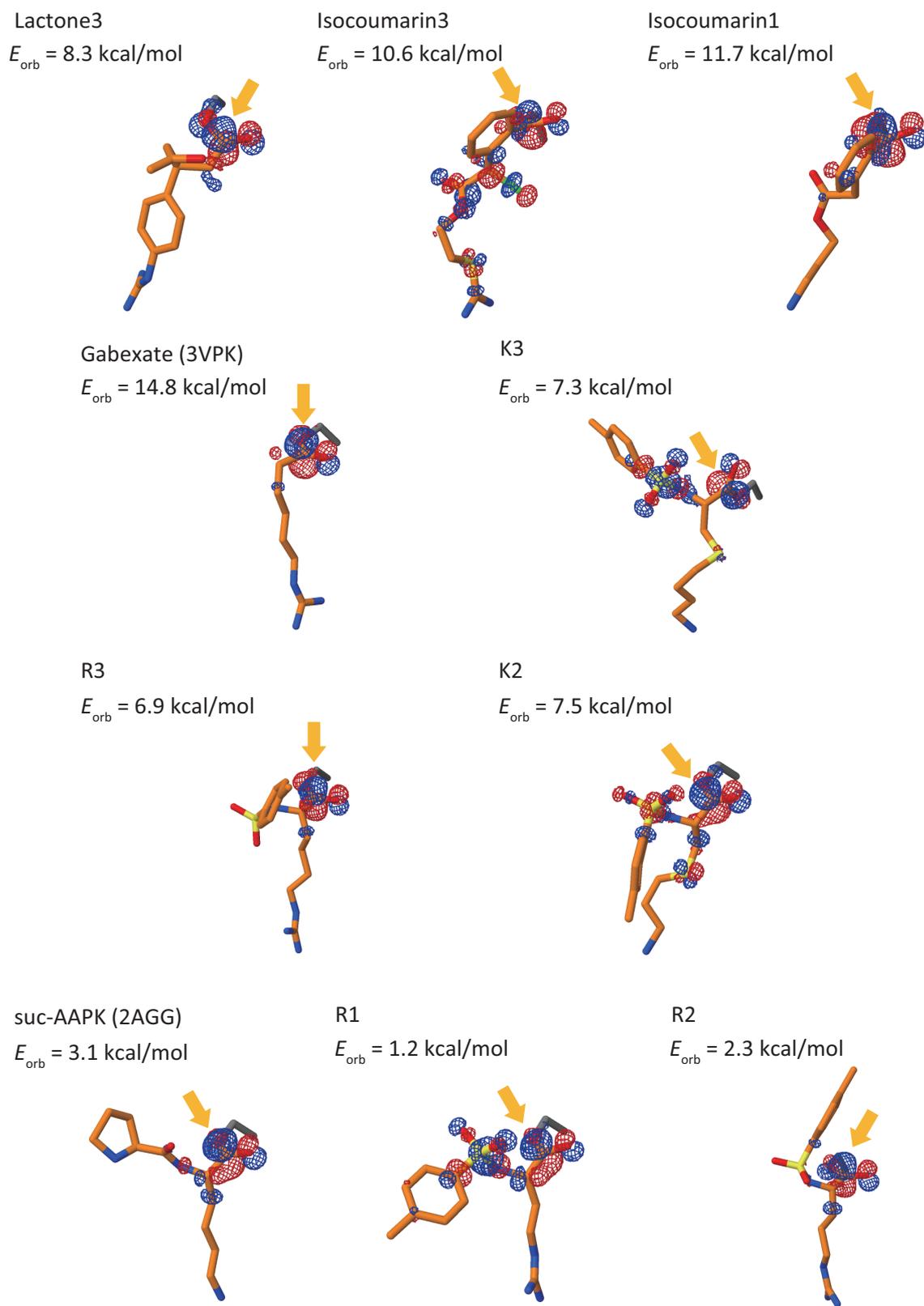


図3-3-5-1. カルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の一例と E_{orb} (学習用セット)

黄色矢印：アシル基のカルボニル炭素原子上の反結合性 (π^*) 軌道

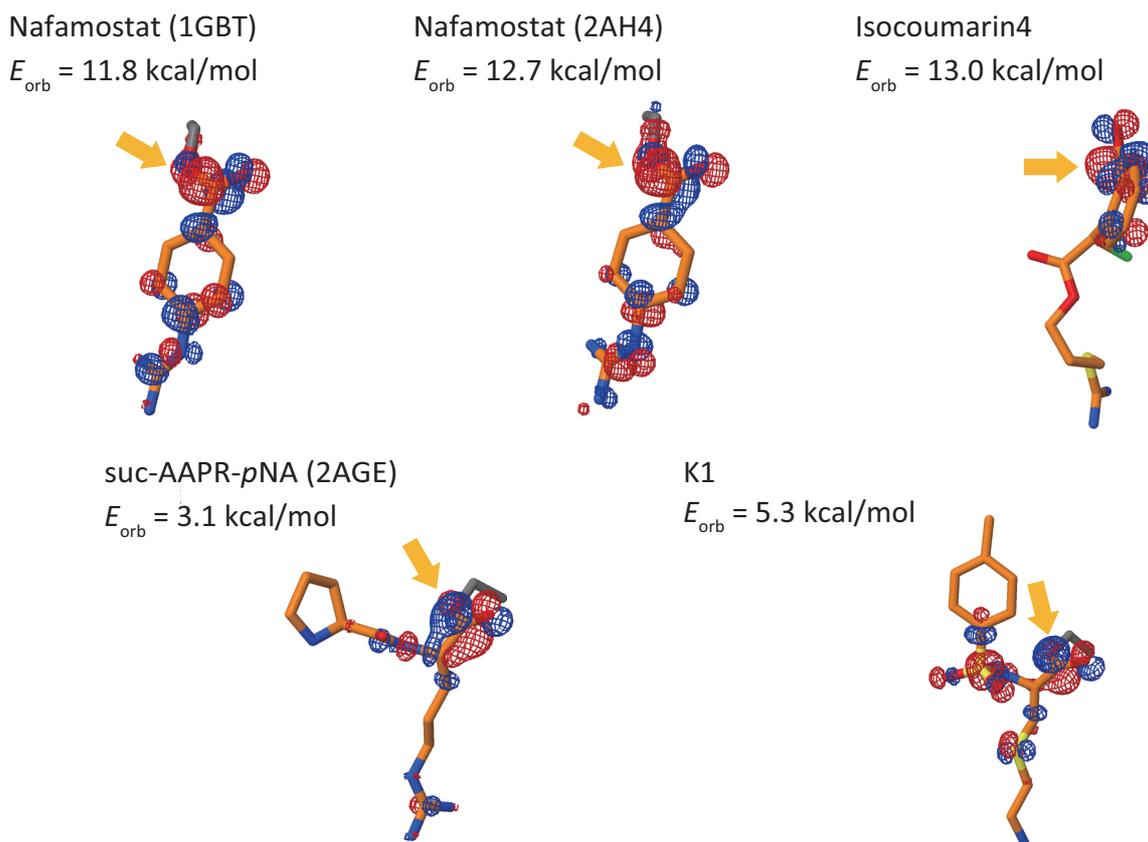


図3-3-5-2. カルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の一例と E_{orb} (検証用セット)

黄色矢印：アシル基のカルボニル炭素原子上の反結合性 (π^*) 軌道

次に、 k_{cat} と E_{orb} の関係を調べたところ、 k_{cat} が小さいほど、 E_{orb} は概ね大きいという傾向が
 られた。これは、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合
 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (E_{orb}) が大きいほど、求核的水分子による
 求核攻撃の反応障壁が大きいことを意味するため、本解析の結果は妥当であると考えられる。
 しかし、阻害剤群と基質群を、 E_{orb} のみを指標として十分に判別することはできなかった (図
 3-3-5-3)。

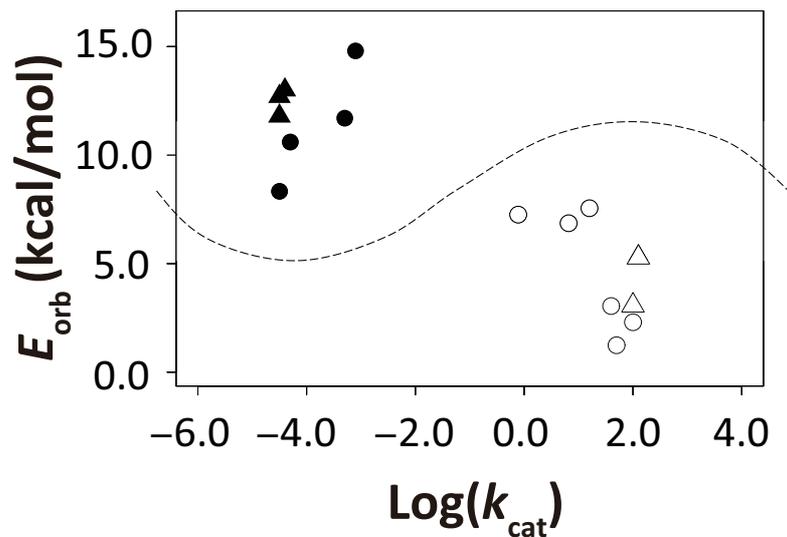


図3-3-5-3. E_{orb} のみを指標とする阻害剤と基質様化合物の線形判別分析

- : 阻害剤 (学習用セット), ○ : 基質様化合物 (学習用セット),
- ▲ : 阻害剤 (検証用セット), △ : 基質様化合物 (検証用セット).

曲線 (点線) は, $\text{Log}(k_{cat})$ の大小を E_{orb} のみを指標として線形判別できないことを示す.

第6項 線形判別分析

阻害剤群と基質群を十分に判別する手法を確立するため, 学習用セットのリガンドの ΔG_{wat} 及び E_{orb} を指標とする線形判別モデルを構築した. 結果として, 阻害剤群と基質群を判別する以下の線形判別式 f (式 3-3-6-1) が得られた.

$$f = 0.74 * \Delta G_{wat} - 0.37 * E_{orb} - 0.64 \quad (\text{式 3-3-6-1})$$

$f < 0$ の場合, リガンドは阻害剤群に分類される. 一方, $f > 0$ の場合, リガンドは基質群に分類される. 学習用セットのリガンドにより構築された線形判別モデルは, 学習用セットの

リガンドを例外なく正しく分離した。

その後、検証用セットを用いて、線形判別モデルの判別能力が評価された（外部データによる検証）。その結果、上記で構築された線形判別モデルは、検証用セットを例外なく正しく判別した（偽陽性及び偽陰性なし。図3-3-6-1）。

以上のことから、水分子の動的解析によって得られる求核的水分子のギブズ自由エネルギー（ ΔG_{wat} ）と共有結合性リガンド部分の反応性の指標（ E_{orb} ）による線形判別手法分析は、可逆的共有結合性阻害剤と基質様阻害剤の判別する上で、非常に有効な手法であると言える。

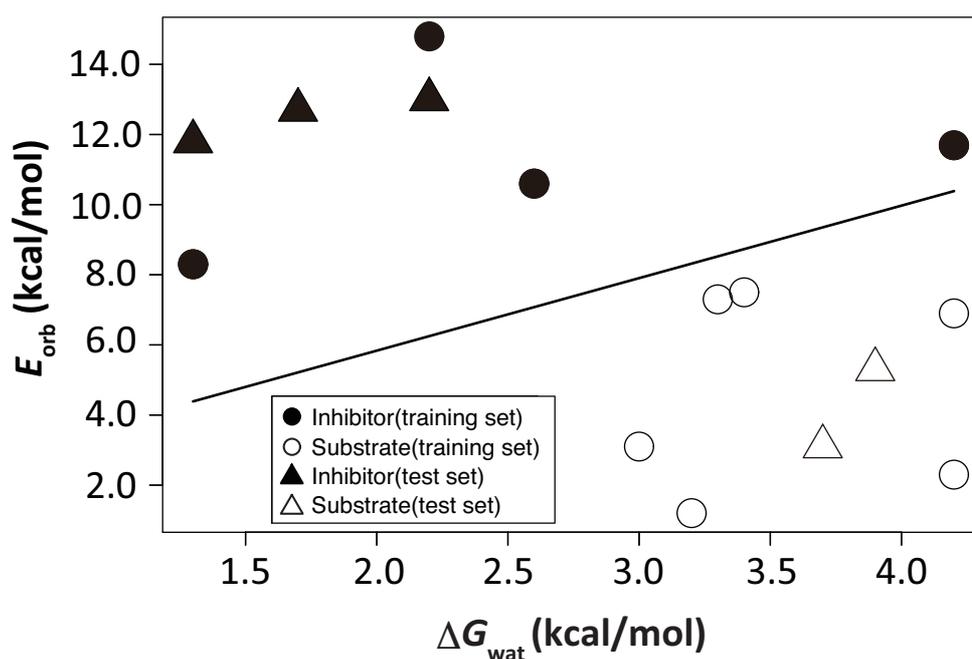


図 3-3-6-1. ΔG_{wat} 及び E_{orb} による線形判別分析

●：阻害剤（学習用セット），○：基質様化合物（学習用セット），

▲：阻害剤（検証用セット），△：基質様化合物（検証用セット）。

ΔG_{wat} 及び E_{orb} により、阻害剤と基質様化合物とを線形判別できる（直線）。

第4項 考察

第1項 線形判別分析について

「計算機援用によるリード創製 (computer-aided lead finding)」には、大きく分けて、「バーチャルスクリーニング」と「*de novo* (新規) デザイン」の2種類のアプローチがある。バーチャルスクリーニングでは、標的蛋白質に対し、化合物ライブラリ中の多数の化合物を仮想的に結合させ、その阻害能を予測する。バーチャルスクリーニングにより阻害能が高いと予測された化合物については、実際に *in vitro* または *in vivo* で生物学的アッセイが行われ、その阻害能が確かめられる⁷³。一方、*de novo* デザインにおいては、標的蛋白質の立体構造を用いて、リガンド自動成長アルゴリズムあるいは医薬化学者の直感により、新規化合物をデザインする⁷³。本研究により開発された線形判別手法は、主にバーチャルスクリーニングへの応用が想定される。

一般的に、化合物ライブラリから有望な化合物を選別するスクリーニングにおいては、「偽陽性」の数は可能な限り少ないことが望ましい。なぜならこの数は、生物学的アッセイに供される、「スクリーニングでは有望と判断されたものの、実際には阻害活性が低い化合物」の数を反映しているからである。本研究で得られた ΔG_{wat} と E_{orb} による線形判別モデルを、検証用セットのリガンドを用いて評価した結果、誤って阻害剤であると判別された基質様化合物は存在しなかった。これは理想的な偽陽性率であり、本方法によって、生物学的アッセイに

要する時間とコストを大幅に削減することができる。よって、 ΔG_{wat} と E_{orb} を指標とする線形判別モデルを用いた判別手法は、有望な可逆的共有結合性阻害剤の候補化合物を選別するための、非常に有効な手法であるといえる。

さらに、本研究により、アシルトリプシン中間体の結晶構造が報告されていない共有結合性リガンドも、フレキシブル分子重ね合わせによりアシルトリプシン中間体構造をモデリングすることで解析可能であることが示された。よって、本研究で開発された線形判別手法は、検討対象の共有結合性リガンドと標的酵素とのアシル-酵素中間体の結晶構造が入手可能であることを必ずしも前提とせず、幅広い化合物を対象として適用することができると考えられる。

第2項 求核的水分子のギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) について

わずかな例外を除けば、 k_{cat} の大小は ΔG_{wat} の大小により概ね判別できた。よって、求核的水分子は、求核的水サイトにおいて獲得する ΔG_{wat} により活性化され、脱アシル化反応が進行すると考えられる。つまり、トリプシンによる基質様化合物の加水分解反応では、求核的水分子は酵素の活性部位周辺の環境から好ましくないギブズ自由エネルギーを獲得し活性化された「熱い水分子 (hot water)」⁷⁴であり、それゆえに、基質様化合物は迅速に脱アシル化されるものと考えられる。一方、トリプシンによる阻害剤の加水分解反応では、求核的水分子は酵素の活性部位周辺の環境による活性化の程度が低い「冷たい水分子 (cold water)」⁷⁴であ

り、それゆえに、阻害剤は緩徐に脱アシル化されるものと考えられる。言い換えれば、阻害剤の求核的水分子は、基質様化合物の求核的水分子に比べると、求核的水サイトに留まり続け求核攻撃しないほうが、エネルギー的に好ましい傾向を持つと言える。 ΔG_{wat} が小さい値をとる場合、 ΔH_{wat} が小さい値をとる（安定な水分子）場合と、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が小さい値をとる（配向に規則性がない水分子）場合の2通りがあるが、いずれの場合でも、水分子による求核攻撃が緩徐に進行することは容易に想像できる。

一般に、酵素等の蛋白質とそのリガンドは自発的に結合し、系は安定化する ($\Delta G_{\text{bind}} < 0$)。しかし、加水分解酵素の反応において主要な役割を果たすもう一つの分子である求核的水分子は、必ずしも蛋白質表面においてエネルギー的に安定ではない ($\Delta G_{\text{bind}} > 0$ の場合もある)。なぜなら、互いに衝突し玉突き状態となった水分子は、必ずしも親水的な環境ではない蛋白質表面に押し込まれる場合があると考えられるからである。加水分解酵素において、求核的水分子が加水分解を担うという特徴的な役割を果たす原因の一つに、求核的水分子が酵素の活性部位でギブズ自由エネルギー的に不安定化することが挙げられると考えられる。

酵素学的に重要なミカエリス定数 (K_M) や k_{cat}/K_M 等のパラメータと、 ΔG_{wat} との関係についても解析した。解析の対象として、基質様化合物である R1, R2, R3, K1, K2 及び K3 を用いた。これは、これらの共有結合性リガンドが基質-酵素複合体（ミカエリス複合体）を形成する際の K_M が、同一の実験条件で測定されている⁴²ためである。結果として、 K_M または k_{cat}/K_M と ΔG_{wat} との間には、特筆すべき関係を見出すことができなかった (図 3-4-2-1)。よって、 ΔG_{wat} は k_{cat} の大小を判別できるが、 K_M や k_{cat}/K_M とは無関係であると言える。

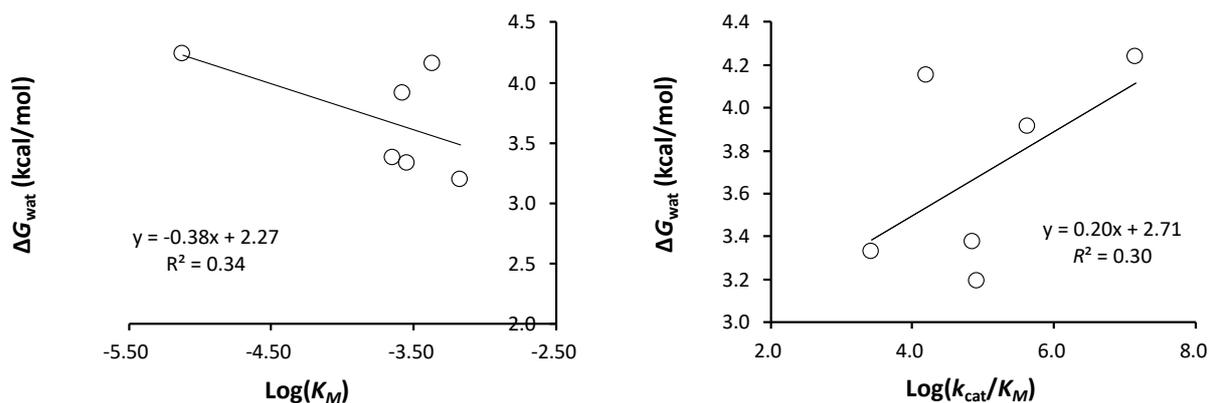


図 3-4-2-1. K_M 及び k_{cat}/K_M と ΔG_{wat} との関係

特筆すべき関係は見出せなかった。

第3項 軌道エネルギー (E_{orb}) について

本研究では、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 のアシル基のカルボニル結合 ($\text{C}=\text{O}$) の反結合性 (π^*) 軌道の軌道エネルギー (E_{orb}) が大きいほど、加水分解反応は緩徐に進行する傾向があることが示された。これまで、分子軌道理論は種々な酵素反応の解析に応用されてきた。そのひとつの例がケトンプロテアーゼ (ketone protease) 阻害剤の構造-活性相関 (structure-activity relationship, SAR) 研究である⁷⁵。この研究では、ケトン誘導体阻害剤のカルボニル基の π^* 最低空軌道 (LUMO) の軌道エネルギーを Hartree-Fock レベルで計算した。得られた指標は、ケトン基の隣に結合した環の中の β -窒素の原子電荷と共に用いられ、これらの2つの指標を用いることで、ケトン誘導体阻害剤の阻害定数 (K_i) がよく予測されたと報告されている。その他の例として、最近行われた α -キモトリプシンの酵素反応の研究

⁷⁶が挙げられる。この研究では、PM7 ハミルトニアン⁶⁸が COSMO 法⁶⁹とともに用いられた (本研究の E_{orb} の計算に用いたのと同じ方法)。結果として、計算によって得られた複数の結果のほとんどが、当該研究以前の研究 (*ab initio* 計算による研究を含む) の結果と一致したと報告されている。バーチャルスクリーニングに供される化合物は非常に多いため、*ab initio* 計算よりも格段に少ない計算コストで反応性の指標が計算できる半経験的分子軌道計算は、バーチャルスクリーニングに用いる指標の計算手法として適していると考えられる。

第4項 可逆的共有結合性阻害剤のデザイン戦略

本研究は、主に可逆的共有結合性阻害剤として有望な化合物を、有望でない化合物から判別するバーチャルスクリーニングに応用できると考えられる。一方、実際の創薬では、バーチャルスクリーニングによって見出された有望な化合物の構造をさらに改良するための戦略が示されていると、さらに有用である。本研究で得られた可逆的共有結合性阻害剤の ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$ 及び E_{orb} をさらに分析したところ、以下の3つの主要なタイプを見出した (図 3-4-4-1)。

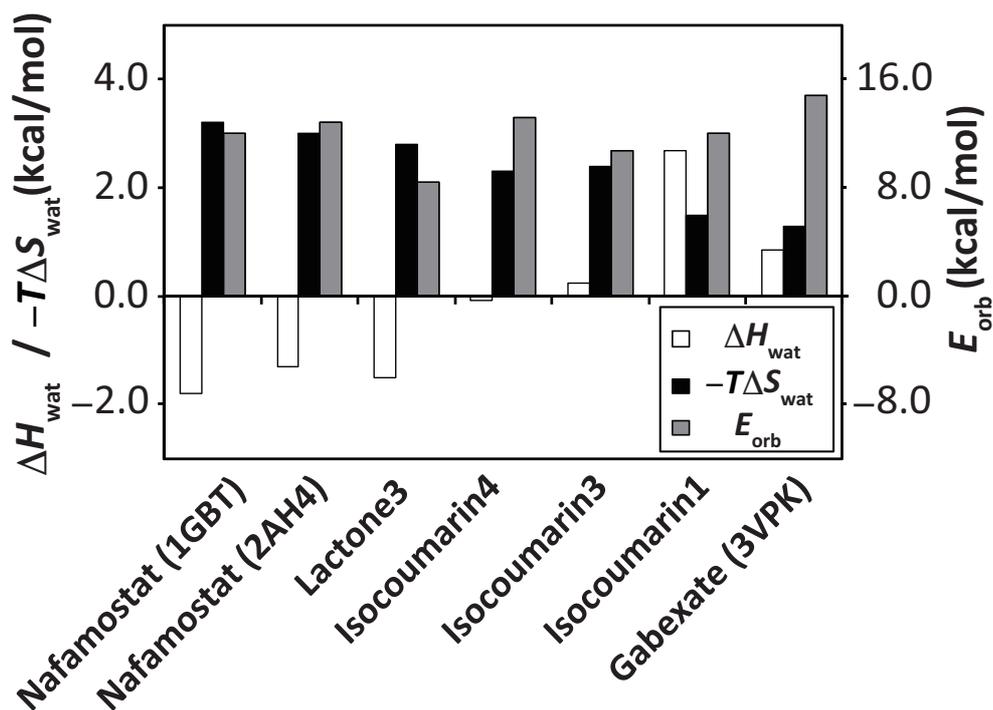


図 3-4-4-1. 阻害剤の ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$ 及び E_{orb}

(1) 負またはゼロに近い ΔH_{wat} を呈すること (ナファモスタット型)

(例：ナファモスタット, lactone3, isocoumarin4, isocoumarin3 等)

(2) 小さな正の $-T\Delta S_{\text{wat}}$ を呈すること (ガベキサート型)

(例：isocoumarin1 やガベキサート等)

(3) 相対的に大きい E_{orb} を呈すること

(例：ガベキサート等)

これらの類型に基づくならば、バーチャルスクリーニングによって見出された有望な候補化合物を改良し最適化するためには、以下の3つの戦略が有効であると考えられる。

(1) ΔH_{wat} を小さくすること

(2) $-T\Delta S_{\text{wat}}$ を小さくすること

(3) E_{orb} を大きくすること

最初の戦略は、主にアシルトリプシン中間体と求核的水分子の間の水素結合数のトラジエクトリ平均 (#HB) を増加させるよう、リガンドの構造を改良することによって具現化できる。なぜなら、 ΔH_{wat} と #HB との間には、負の相関が認められるからである (第 2 章 第 4 節を参照)。

2 番目の戦略は、求核的水サイトにおける水分子の占有率を減少させることで具現化できる。なぜなら、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ と占有率との間には、正の相関が認められるからである (第 2 章 第 4 節を参照)。占有率を減少させるためには、求核的水サイトの周囲の「袋小路 (cul-de-sac)」残基の数を減らすよう、共有結合性リガンドの構造を改良することで具現化できると考えられる。

3 番目の戦略は、電子に富んだ官能基 (芳香環や脂肪族アルキル鎖) を、求核的攻撃する対象となるアシル基のカルボニル炭素原子の近傍、あるいはアシル基のカルボニル炭素原子に直接結合するように配置することで具現化できる。これらの電子に富んだ官能基は求核攻撃される側のアシル基のカルボニル炭素原子の求電子性を減少させ、 E_{orb} の値を増加させて反応性を低下させる。

以上の 3 つの戦略は、 ΔG_{wat} と E_{orb} を指標とする線形判別分析の結果得られた阻害剤の有望な候補化合物をさらに改良する際、有用であると考えられる。

第4章

今後の展望

第4章 今後の展望

第1節 適用対象となる標的蛋白質

第3章までに、水分子の動的解析によって得られる求核的水分子のギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) は、トリプシンの可逆的共有結合性阻害剤と基質様化合物を判別する上で重要な指標であることが示された。また、アシル-トリプシン中間体の共有結合性リガンド部分の反応性の指標 (E_{orb}) を併せて用いることで、より効果的に判別できることも示された。これらの指標による線形判別分析は、可逆的共有結合性阻害剤の創薬において有用であるといえる。

一方、本研究において開発された解析手法は、現在のところ、トリプシン及びその共有結合性リガンドのみで検証されている。このため、今後、本研究で開発された ΔG_{wat} と E_{orb} を用いた線形判別分析手法が、トリプシンと類似の反応機構を持つトリプシン以外の加水分解酵素にも適用可能であるか否かが検証され評価されることが望ましい。しかし、本研究で開発された手法は、幅広い加水分解酵素に適用可能であると予想される。なぜなら、本研究で開発された手法において前提としているのは、

- (a) 標的とする酵素が加水分解酵素であること
- (b) 水分子による求核攻撃の反応ステップが、加水分解反応の律速段階であること
- (c) 求核的水分子が一般塩基によって脱プロトン化され、加水分解反応が進行すること

の3点のみだからである。そのため、今回検討したトリプシンをはじめとするセリンプロテ

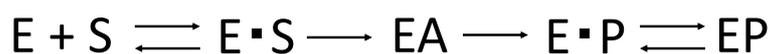
アーゼや、同様な三つ組触媒を持つセリンヒドロラーゼ (serine hydrolase), システインプロテアーゼ (cysteine protease), あるいは三つ組触媒を有しないものの, 脱プロトン化を担う一般塩基を持つアスパラギン酸プロテアーゼ (aspartic protease, 例: HIV プロテアーゼ等)をはじめとする, 幅広い加水分解酵素がこの前提条件を満たすと考えられる.

第2節 共有結合性阻害剤の設計戦略

実際の創薬の現場では, 最初から共有結合性阻害剤を狙って創薬するというよりはむしろ, 非共有結合性阻害剤を探索した結果, 当初有望と思われたものの, 実際の *in vitro* 試験において十分な阻害能を持つには至らないことが判明した化合物の阻害能を改善する目的で, 非共有結合性阻害剤を共有結合性阻害剤に作り変えるという戦略が採られることがある. その場合に, 本研究で開発された手法を適用するならば, まず先行研究により得られているドッキングポーズ等を参照し, 非共有結合性阻害剤の結合ポケット周辺に反応性 (求核性) を有する蛋白質の残基 (例えばセリン, システイン, リシン, スレオニン等) が存在するか否かを調べる. 存在する場合, その残基のうち反応性 (求核性) を有する原子 (セリンであれば O_γ 原子) から一定距離以内にある非共有結合性阻害剤の原子を抽出し, その原子に求電子性の官能基 (今回の例ではエステル基) を付加できるか検討する. 付加できる場合, 付加した化合物を新規化合物とし共有結合ドッキングシミュレーションを行い, 共有結合ポーズ及び結合自由エネルギーを得る. 結合ポーズが非共有結合性阻害の際の結合ポーズと概ね一致し,

結合自由エネルギーから予測される非共有結合の結合親和性が十分であると推定された場合、共有結合ポーズを初期構造として、第3章までに開発された線形判別手法により、その阻害能を見積もることができる。

また、今回研究対象としたトリプシンの可逆的共有結合性阻害剤の多くは、水分子による求核攻撃の反応ステップ（脱アシル化）が律速段階であったが、律速段階が水分子による求核攻撃の反応ステップではなく、酵素と共有結合性リガンドが共有結合を形成する最初の反応ステップ（トリプシンではアシル化）であるような系も考えられる（図4-1-1を参照）。そのような標的酵素に対する阻害剤を見出す場合、そもそも共有結合性阻害剤ではなく、長時間基質-酵素複合体（ミカエリス複合体）を形成するような非共有結合性リガンドを、従来のドッキングシミュレーション等により探索する、といった戦略が有効であると考えられる。あるいは、計算コストが高い戦略ではあるが、基質-酵素複合体（ミカエリス複合体）からアシル-酵素中間体に至る途中の反応中間体（図4-1-1のE・SとEAの間に形成される中間体）が安定となるようなリガンドを、量子化学計算による解析の後に設計する手法を採用する、といった戦略も有効であると考えられる。



E: 酵素 (Enzyme), S: 基質 (Substrate), P: 生成物 (Product)
E・S: ミカエリス複合体 (Michaelis complex)
EA: アシル-酵素中間体 (Acyl-enzyme intermediate)
E・P: 生成物-酵素複合体 (Product-enzyme complex)

図 4-1-1. 加水分解酵素の反応ステップ

さらに、第3章で得られた結果のうち、阻害剤群のみのデータを対象に k_{cat} と $-T\Delta S_{\text{wat}}$ との関係調べたところ、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が大きいほど、阻害剤の $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ は小さい傾向を示すことがわかった (図 4-2-1)。

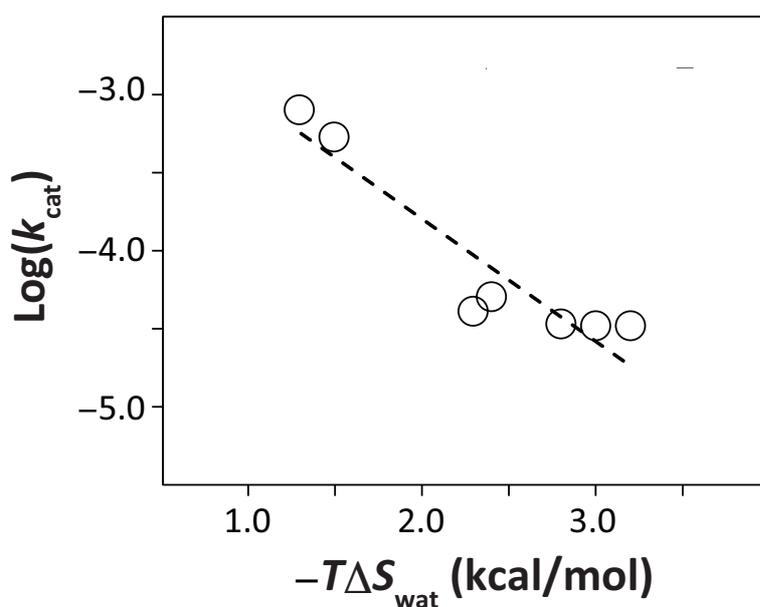


図 4-2-1. 阻害剤における求核的水分子の $-T\Delta S_{\text{wat}}$ と $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ との関係.

$$\text{近似直線} : \text{Log}(k_{\text{cat}}) = -0.79 * (-T\Delta S_{\text{wat}}) - 0.22$$

これは、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が大きい (ΔH_{wat} は負の値を示す) ナファモスタット型の阻害剤のほうが、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が小さいガベキサート型の阻害剤よりも、 $\text{Log}(k_{\text{cat}})$ が小さく阻害能が高いことを意味する。この理由は以下のとおりであると解釈できる。まず、阻害剤の求核的水サイトでは一般に、水分子は求核攻撃に適していない配向を取りやすいと考えられる。そして、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が大きいナファモスタット型の阻害剤では、求核的水サイトにおける水分子の配向の自由度が制限されている。その結果、求核的水分子の最高被占有軌道 (HOMO) と、共有結合性リガ

ンドにより修飾された Ser195 のカルボニル結合 (C=O) の反結合性 (π^*) 軌道との相互作用の機会もまた制限されることとなり、加水分解反応速度は遅くなると考えられる。

よって、阻害能の高い可逆的共有結合性阻害剤を設計したい場合は、 $-T\Delta S_{\text{wat}}$ が大きいものの、 ΔH_{wat} が大きな負の値を示す、ナファモスタット型の阻害剤を得ることを追求したほうが良いと考えられる。一方、ガベキサート型の阻害剤は、酵素の本来の基質から、「袋小路」となり得る部分を削るだけで設計できる。よって、ある程度の阻害能をもつ化合物を、迅速かつ簡便に得るという目的であれば、ガベキサート型の阻害剤を追求するのも一つの方法であると言える。

この考察に用いた共有結合性阻害剤の数 (7 個) は、定量的な解析を行うためにはやや少ないため、さらなる研究が必要であるものの、以上の論点は、今後の研究を進めて行く上で重要である。

第3節 予測の精度

アレニウス (Arrhenius) の式によれば、

$$k = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (\text{式 4-3-1})$$

である。ここで、 T は絶対温度、 R は気体定数、 A と E は反応に固有な定数で、各々頻度因子と活性化エネルギーである。頻度因子 A は、反応する分子同士が適切な配向で出会う頻度の因子であるが、今回の研究では求核的水サイトにおける求核的水分子の配向の偏りは考慮しなかった。より精度よく k_{cat} を見積もるためには、求核的水サイトにおける水分子の双極

子モーメント等を指標に、求核的水サイトにおける求核的水分子の配向の偏り（立体因子）を考慮した頻度因子を指標とする必要があると考えられる。

また、活性化エネルギー E として、以下のエネルギーを考慮に入れる必要がある。

- (1)水分子が求核的水サイトにおいて獲得するエネルギー
- (2)求核的水分子の HOMO の軌道エネルギーと共有結合性リガンドのアシル基のカルボニル結合の軌道エネルギーの差
- (3) His57 による求核的水分子の脱プロトン化の際のエネルギー
- (4)その他のエネルギー

これらのうち、今回の研究では上記(2)の一部(求核的水分子の HOMO の軌道エネルギー)、(3)及び(4)は考慮に入れてない。精度よく k_{cat} を見積もることが目的であれば、これらの因子を考慮に入れる必要がある。ただし、あくまで可逆的共有結合性阻害剤の創薬が目的であるならば、いたずらに指標とするパラメータの数を増やし計算コストを増やすよりも、主たる因子のみで有望な阻害剤とそれ以外の化合物を判別し予測できれば十分である。今回開発した手法は、2つのパラメータのみで阻害剤と基質様化合物を判別できるため、効果的かつ効率的な手法であると言える。

本研究によって開発された可逆的共有結合性阻害剤の創薬手法は、さらなる検討を通じて成功例を増やし、信頼性を高めていくものと期待される。

付録

付録

付録 A トリプシンの分離・精製

第1節 方法

市販のトリプシン粉末には、 β -トリプシン、及び β -トリプシンが Lys131 と Ser132 の間のペプチド結合を自己消化された α -トリプシンが含まれている。以下に示す定法により、市販のトリプシンを精製し、ウシ膵臓 β -トリプシンを得た⁷⁷。

ウシ膵臓トリプシン (Type I) は Sigma から購入し、緩衝液 A (5 mM Tris-塩酸緩衝液 pH7.0, 1 mM ベンザミジン) に溶解した。その後、高速液体クロマトグラフィーを用いて、 β -トリプシンを分離した。分離には、Mono S 強陽イオン交換カラム (Amersham Biosciences) を用いた。分離は、緩衝液 A と緩衝液 B (5 mM Tris-塩酸緩衝液 buffer pH 7.0, 1 mM ベンザミジン, 1 M 塩化ナトリウム) を時間経過とともに比率を変えて混合し、徐々に塩濃度を高めることにより行った。分画は、280 nm の紫外線の吸光度を監視することで行った。分離は、トリプシンの自己消化を防ぐため、4°C で行った。

第2節 結果

SDS-PAGE の結果 (図 A-1-1 *b*) から、6 番目の画分 (溶出時間 10 分頃) (図 A-1-1 *a*) の主

成分はβ-トリプシンであることが示された。よって、この溶出画分を結晶化に用いた。

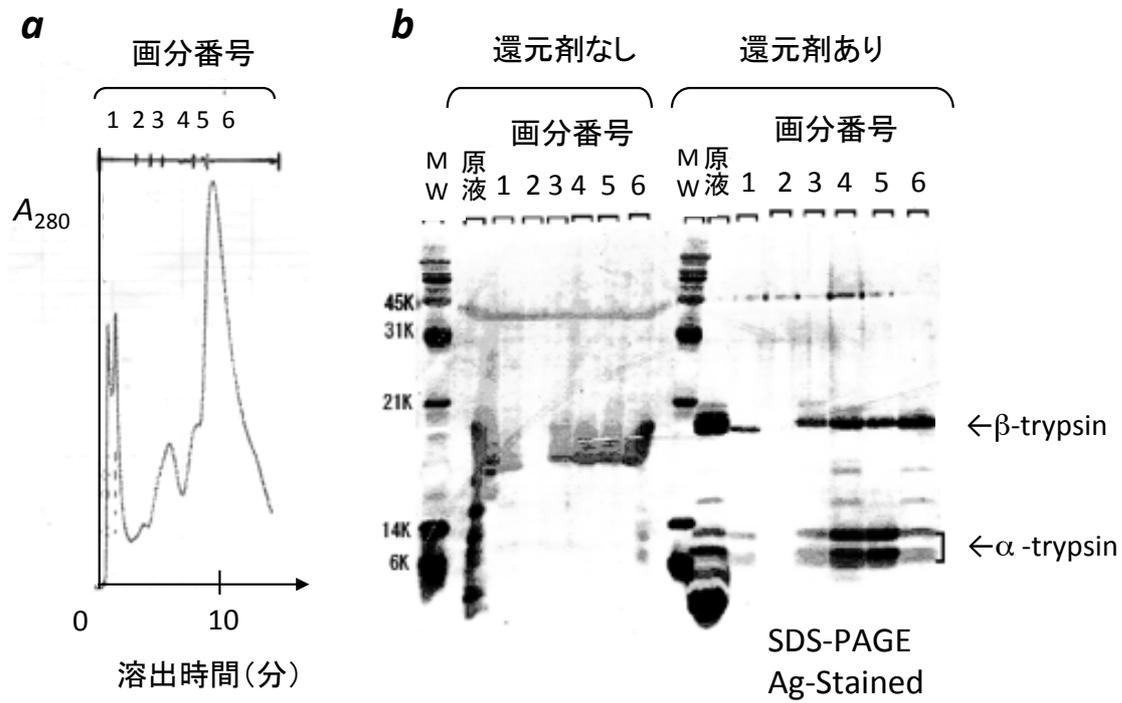


図 A-1-1. Mono S HPLC によるβトリプシンの分離

a. 吸光度 (A_{280}) の経時変化. 溶出液を 6 つの画分に分画した. **b.** SDS-PAGE による各画分の分離 (銀染色). 還元剤 (β -mercaptoethanol) を加えて分離した際, 分子量がおよそ 20 kDa となるバンドがβ-トリプシン, 14 kDa と 6 kDa のバンドがα-トリプシン. 6 番目の画分を結晶化に用いた.

付録 B 低充填密度型斜方晶系結晶の結晶構造解析

第1節 方法

ウシ膵臓β-トリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶を以下の定法により得た。まず、精製したβ-トリプシンを、Centriprep-10 と Centricon-10（いずれも Millipore, 遠心分離機を用いて蛋白質を濃縮するための限外ろ過膜付き容器）により濃縮した。濃縮されたβ-トリプシン溶液に、緩衝液 C（50 mM クエン酸緩衝液 pH 6.0, 1 mM ベンザミジン, 1 mg/mL 塩化カルシウム）を加えてさらに濃縮し、これを繰り返すことで、β-トリプシンを溶解させている緩衝液を徐々に置換し、最終的に 15 mg/mL のβトリプシン溶液を得た。得られたβ-トリプシン溶液に、400 mM のベンザミジン（Sigma）を加えて結晶化用蛋白質溶液とした^{24,25}。

結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により 20 °C で行った。リザーバー溶液として、結晶化剤である 2.4 M から 2.8 M の硫酸アンモニウム（和光純薬, 特級）と pH 5.5 から 8.0 の緩衝液とを混合したものをを用いた。結晶化用蛋白質溶液とリザーバー溶液は 1:1 の体積で混合した。

析出した結晶を用い、X 線回折強度データを取得した。測定には大きさが 100 μm × 100 μm × 1000 μm の結晶を 1 つ用いた。

X 線源は、銅回転対陰極 X 線発生装置の CuKα線（波長：1.5418 Å）を用い、X 線回折像の記録にはイメージングプレートを用いた。結晶はクライオループで掬い、クライオプロテ

クタント溶液（今回は、グルコースを結晶母液と同じ組成の溶液に溶解し、25% w/v の濃度としたものを用いた）に急速に浸漬し、10 分間常温に放置した後、クライオループで掬って 100 K の窒素気流下に置き、X 線回折データを収集した。振動角は 2.0° に固定した。露光時間は、1 プレートあたり 25 分とした。

回折像は、プログラム *HKL2000* パッケージ³² を用いて解析した。そのうち、積分回折強度の算出はプログラム *DENZO*、スケーリングとポストリファインメントはプログラム *Scalepack* を用いて行った。また、トリプシン構造の決定は、プログラムパッケージ *CNS*³⁴ を用いた分子置換法により行った。探索モデル分子として、リガンドが結合していないトリプシンの低充填密度型斜方晶系結晶由来の結晶構造²⁵ (PDB ID : 1TLD) を用い、まず回転関数により方位を、続いて並進関数により並進位置の探索を行った。その結果得られた構造を初期構造として、結晶学的構造精密化を進めた。結晶学的構造精密化は、プログラムパッケージ *CNS*³⁴ を用いた。まず、剛体精密化及びシミュレーテッドアニーリングを行い、ある程度精密化が進んだ後に、各原子の座標と *B* 因子を精密化し、各段階の分子モデルから計算される位相を用いて電子密度を計算し、分子モデル構築を進めた。

第2節 結果

結晶化をはじめてから約 7 日で、柱状のβ-トリプシン結晶が析出した（大きさ : およそ 150 μm × 150 μm × 800 μm）。回折強度データを取得した結果、このβ-トリプシン結晶は、空間群

$P2_12_12_1$, 格子定数 $a = 63.7 \text{ \AA}$, $b = 63.5 \text{ \AA}$, $c = 68.9 \text{ \AA}$ の低充填密度型斜方晶系結晶であった.

結晶構造解析 (分解能 : 1.9 \AA) の結果得られた電子密度マップ (図 B-2-1) では, 基質結合ポケットに, 芳香環に相当する平面状の電子密度が確認された. これは蛋白質溶液に含まれるベンザミジン分子に相当する電子密度であり, このベンザミジン分子は Asp189 と水素結合していた. また, His57 近傍に, 硫酸イオン分子に相当する四面体様の電子密度が観測された. この硫酸イオン分子は, His57 及び Ser195 と水素結合しており, 中央の硫黄原子に由来する高い電子密度ピークを特徴としている. また, 活性部位に, 脱アシル化反応を担う求核的水分子に相当する電子密度は観測されなかった. これは, His57 近傍の硫酸イオン分子により, 求核的水分子が空間的に排除されているためと考えられた.

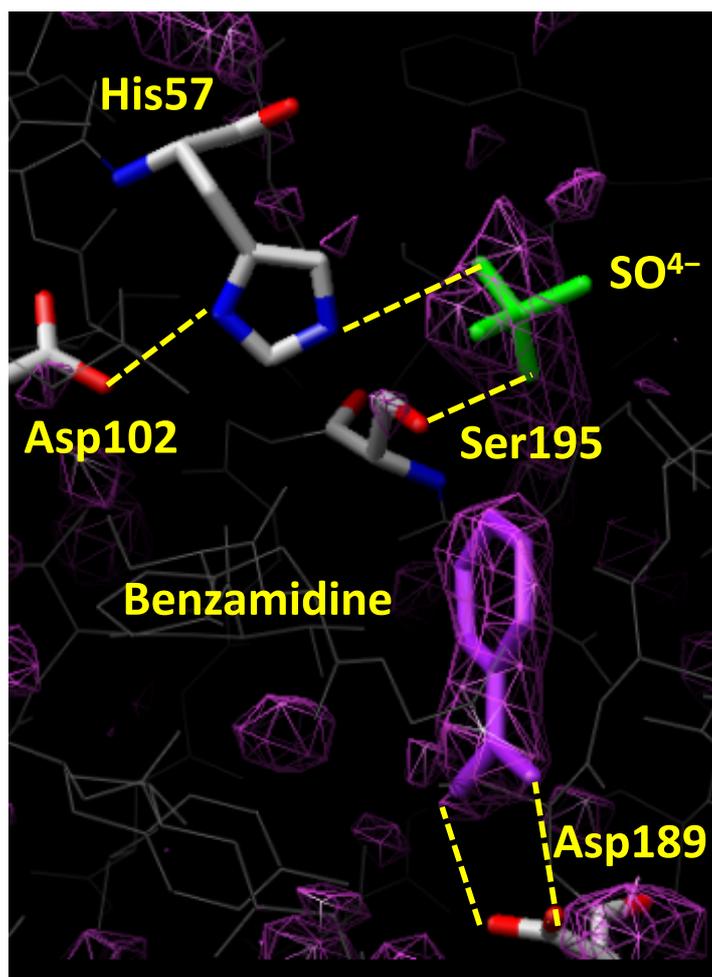


図 B-2-1. トリプシン低充填密度型斜方晶系結晶の活性部位近傍の構造

分解能 1.9 Å. 紫網線 : $F_o - F_c$ マップ (contour: 3σ), 紫太線 : ベンザミジン分子,

緑太線 : 硫酸イオン分子, 灰色太線 : トリプシン分子, 黄色点線 : 水素結合

付録 C 硫酸イオン除去条件の探索

第1節 方法

低充填密度型斜方晶系結晶中のトリブシン分子の活性部位から，結晶化剤に由来する硫酸イオンをバックソーキングする方法について検討した．尚，今回の検討に用いる結晶は，グルタルアルデヒドによって架橋処理していないものを用いた．

まず，析出した結晶を脱水し物理的強度を高めるため，結晶が析出しているハンギングドロップ用容器のリザーバー溶液を，結晶化剤としての濃度より濃い硫酸アンモニウムを含む緩衝剤 D (0.1 M クエン酸緩衝液 pH5.0, 3.2 M 硫酸アンモニウム) に置換し，20°C で1時間平衡化した．その後，リザーバー溶液（すなわち緩衝剤 D）を，結晶母液に 2 μ L 加えてさらに平衡化させ，これを3時間の間に3~5回繰り返した．その後，リザーバー溶液を，表 C-1-1 に示す硫酸イオン除去用溶液の候補に置換し，20°C で1時間平衡化した．これらの溶液は，0.1 M クエン酸緩衝液 pH 5.0 及びポリエチレングリコール (PEG) 等の結晶化剤や非共有結合性阻害剤であるベンザミジンで構成されている．その後，リザーバー溶液（すなわち硫酸イオン除去用溶液の候補）を結晶母液に 6 μ L 加え，再び蒸気平衡に置いた後，顕微鏡下で結晶を観察し，結晶の損傷の程度を，5段階（非常に良い：5，良い：4，普通：3，悪い：2，非常に悪い：1，*：その他）で評価した．

表 C-1-1. 硫酸イオン除去用溶液の候補 (2)

番号	緩衝液 (共通)		結晶化剤					阻害剤		
	クエン酸ナトリウム 緩衝液 (M)	pH	硫酸アンモニウム (M)	コハク酸アンモニウム (M)	PEG 4000 (%w/v)	PEG 8000 (%w/v)	2-プロパノール (%w/v)	ベンザミジン (M)		
d1	0.1	5.0	1.2	2.8	—	—	—	—		
d2			0.8	3.2	—	—	—	—		
d3			0.4	3.6	—	—	—	—		
d4			—	2.8	—	—	—	—		
d5			—	3.2	—	—	—	—		
d6			—	3.6	—	—	—	—		
d7			—	—	—	—	20	—	20	
d8			—	—	—	—	20	—	10	
d9			—	—	—	—	30	—	—	
d10			—	—	—	—	—	30	—	
d11			0.33	—	—	—	20	—	20	
d12			0.33	—	—	—	20	—	10	
d13			—	—	—	0.3	20	—	20	
d14			—	—	—	0.3	20	—	10	
d15			—	—	—	—	20	—	20	0.1
d16			—	—	—	—	20	—	10	0.1

(d1からd16の計16条件)

第2節 結果

架橋処理していない結晶中のトリプシンの活性部位から硫酸イオンを除去する条件を探索した結果、検討した範囲では、結晶の外形が保持されかつ損傷がない、結晶構造解析に適した結晶が得られる条件は見出せなかった (図 C-2-1)。

試行した条件のうち、30% w/v PEG8000 を含む緩衝液では、結晶の外形は保持され、実体顕微鏡下で観察した限り、結晶への影響が少ないものと考えられた。しかし、クライオルーブで結晶を掬ったところ、結晶は崩壊した。また、結晶母液に 10 mM ガベキサートを含む 30% w/v PEG 8000 溶液を加え顕微鏡下で観察したところ、結晶にひびが入ることが確認された。以上のことから、この結晶は、浸漬前と比べ非常にもろくなっているものと考えられた。しかし、何らかの方法であらかじめ結晶の物理的強度を高めてから当該溶液に浸漬すれば、

結晶の外形が保持され、かつ損傷も見られない可能性があると思われた。

試行した別の浸漬条件のうち、低濃度（330 mM）の硫酸アンモニウムを含む 20% w/v PEG4000 及び 10% v/v 2-propanol 溶液含有緩衝液では、結晶の外形は保持されたものの、損傷があることが確認された。

また、20% w/v PEG4000 と 10% v/v 2-プロパノールを含む緩衝液では、結晶がいったん油状溶液となりドロップレット中に溶解したが、数時間の後に、低充填密度型斜方晶系結晶とは異なる外観の結晶が析出した。

これ以外の硫酸イオン除去条件では、一晩で結晶は溶解した。

表 C-2-1. 硫酸イオン除去用溶液への結晶の浸漬の結果

番号	緩衝液（共通）		結晶化剤					阻害剤	評価	備考		
	クエン酸 ナトリウム 緩衝液	pH	硫酸アンモ ニウム (M)	コハク酸アン モニウム (M)	PEG 4000 (%w/v)	PEG 8000 (%w/v)	2-プロパノール (%w/v)	ベンザミジン (M)				
d1	0.1	5.0	1.2	2.8	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d2			0.8	3.2	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d3			0.4	3.6	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d4			—	2.8	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d5			—	3.2	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d6			—	3.6	—	—	—	—	1	一晩で結晶は溶解		
d7			—	—	—	—	20	—	20	—	1	一晩で結晶は溶解
d8			—	—	—	—	20	—	10	—	*	一度溶解したのち、新しい晶形の結晶が析出
d9			—	—	—	—	30	—	—	—	1	3時間以内に結晶は溶解
d10			—	—	—	—	—	30	—	—	4	溶解せず。ガベキサート溶液に浸漬したところ、結晶にひびが入った。
d11			0.33	—	—	—	20	—	20	—	1	3時間以内に結晶は溶解
d12			0.33	—	—	—	20	—	10	—	3	結晶は溶解しないものの、ひびが入った。
d13			—	0.3	—	—	20	—	20	—	1	3時間以内に結晶は溶解
d14			—	0.3	—	—	20	—	10	—	1	3時間以内に結晶は溶解
d15			—	—	—	—	20	—	20	0.1	1	3時間以内に結晶は溶解
d16			—	—	—	—	20	—	10	0.1	1	3時間以内に結晶は溶解

評価は5段階（非常に良い:5, 良い:4, 普通:3, 悪い:2, 非常に悪い:1, *:その他)で行った。

付録 D 結晶構造を初期構造とする水和熱力学解析

第1節 方法

結晶構造をそのまま初期構造として *WaterMap* により水和熱力学解析を行い，得られる熱力学的パラメータによって，阻害剤と基質様化合物が判別できるか否かを検討した．

まず，第1章で結晶構造解析を行ったガベキサートのアシルトリプシン中間体の結晶構造 (PDB ID: 3VPK⁵²) のほか，4つのトリプシンのアシル酵素中間体の結晶構造をPDBより得た (PDB ID: 2AGG¹⁹, 2AGE¹⁹, 1GBT²⁰及び2AH4¹⁹)．また，これらの共有結合性リガンドの k_{cat} を，文献^{19,22,23}より取得した．

PDBより得た結晶構造を，水和熱力学解析に先立ち，プログラム *Maestro* 10.3及びプログラム *Protein Preparation Wizard*⁵³ (Schrödinger suite 2015-3) を用いて以下のとおり準備した．まず，結晶構造中の2価のカルシウムイオン，及び共有結合性リガンド部分以外の非蛋白質残基は適切に構造から削除された．また，カルシウムイオンの配位水以外の全ての水分子もまた削除された．ジスルフィド結合は適切な位置に挿入された．結晶構造モデル中になく側鎖や残基は，必要に応じ，プログラム *Prime*^{54,55} 4.1 (Schrödinger suite 2015-3) によりモデリングされた．トリプシンの酵素反応の最適pHであるpH 8.0におけるイオン性のアミノ酸残基のプロトン化状態は，プログラム *PROPKA*⁵⁶により予測した．ただし，His57の側鎖は，N_δ原子のみプロトン化された状態とし，N_ε原子はプロトン化されていない状態とした．なぜなら，酵素

反応においてHis57 N_ε原子は、求核的水分子を脱プロトン化する一般塩基として働くためである¹⁸。最後に、顕でない溶媒中で、プログラム*Impact*⁵⁷ 6.8のImpref モジュール (Schrödinger suite 2015-3) を用いた制限つきエネルギー極少化計算により構造を緩和し、結晶中にパッキングされた構造への偏りを除いた。

その後、*WaterMap* による水和熱力学解析を行った。解析に先立ち、全ての水分子は削除された。注目すべき領域の中心として、共有結合性リガンドにより修飾された Ser195 を設定し、この残基から 10 Å 以内の水分子を解析の対象とした。解析に要する時間を短縮するため、蛋白質の構造は、*WaterMap* の標準的なプロトコルにより切り出し (トランケート) された。水モデルは、TIP4P 水モデル⁵¹ を用いた。2 ns の水和熱力学解析の結果、予測された複数の水サイトの座標から、求核的水サイトを第2章と同一の手法により決定し、そのサイトにおいて水分子が獲得するギブズ自由エネルギー (ΔG_{wat}) と酵素反応速度定数 (k_{cat}) との関係を調べた。

第2節 結果

結果を図 D-2-1 に示す。阻害剤ナファモスタットに相当する 2 点と基質様化合物 (suc-AAPK-*p*NA 及び suc-AAPR-*p*NA) に相当する 2 点は、 ΔG_{wat} によって判別できるが、ガベキサートの ΔG_{wat} (2.5 kcal/mol) は、基質様化合物の 2 点 (それぞれ、 $\Delta G_{\text{wat}} = 2.9$ kcal/mol 及び 2.6 kcal/mol) とほぼ同等の値を示した。また、*WaterMap* による水和熱力学解析によって得られる他のパラメータ (ΔH_{wat} , $-T\Delta S_{\text{wat}}$, 占有率及び#HB) と k_{cat} との関係も調べたが、い

ずれによっても、阻害剤と基質様化合物を十分に判別することはできなかった。よって、結晶構造をそのまま初期構造とする水和熱力学解析では、阻害剤と基質様化合物を判別することができないものと考えられた。

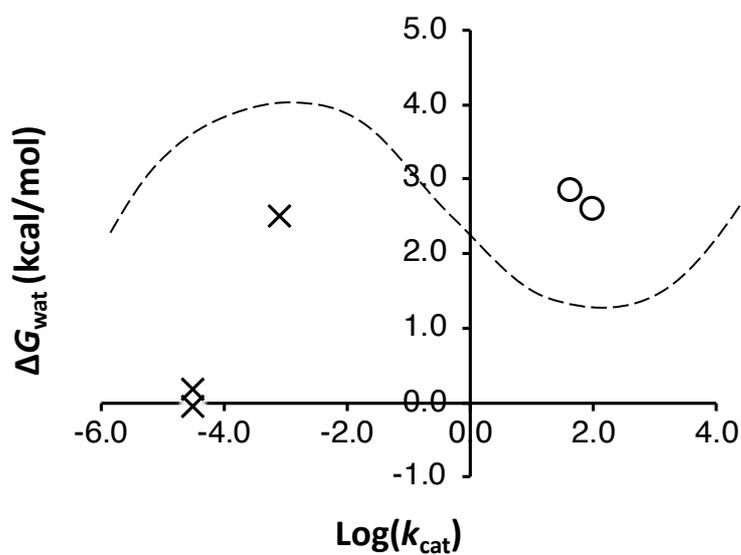


図 D-2-1. 結晶構造を初期構造とする水和熱力学解析

xは阻害剤，○は基質様化合物を表す。

曲線（点線）は， $\text{Log}(k_{cat})$ の大小を ΔG_{wat} のみを指標として線形判別できないことを示す。

謝辞

本研究に際し、終始、丁寧かつ親身に御指導、御鞭撻を賜りました、北里大学 薬学部 創薬物理化学教室 広野修一 教授 に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の活動において、日頃から御指導、御鞭撻を賜りました、北里大学 薬学部 創薬物理化学教室 山乙教之 講師、中込泉 助教、吉田智喜 助教、小澤新一郎 助教 に謹んで御礼申し上げます。

本研究に際し、終始、御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院 薬学系研究科 機能薬学専攻 蛋白構造生物学教室 佐藤能雅 名誉教授 に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の活動において、日頃から御指導、御鞭撻を賜りました、京都工芸繊維大学 大学院 工芸化学研究科 構造生物工学研究分野 原田繁春 教授、東邦大学薬学部 薬剤学教室 野口修治 教授、東海大学工学部 生命科学科水谷・構造生物学研究室 水谷隆太 教授 に謹んで御礼申し上げます。

本研究の貴重な機会を与えて下さり、御助言を頂きました、帝京平成大学薬学部 林譲 元教授、防衛装備庁 陸上装備研究所 小林松男 元所長、陸上装備研究所 國重博史 前研究企画官、先進技術推進センター 雑賀涼 元研究管理官、武田仁己 研究管理官に謹んで御礼申し上げます。

日頃から御指導を頂きました、大阪大学大学院 医学系研究科 小関準 助教、信州大学 先鋭領域融合研究群 内田太郎 助教、昭和大学薬学部 早川大地 助教に感謝致します。

最後に、本研究の遂行を陰ながら支えていただいた家族に、心より感謝致します。

参考文献

1. Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A. & Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 307–317 (2011).
2. Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **20**, 1061–1073 (2015).
3. Poordad, F. *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1195–1206 (2011).
4. Villhauer, E. B. *et al.* 1-[[[3-Hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. *J. Med. Chem.* **46**, 2774–2789 (2003).
5. Bull, H. G. *et al.* Mechanism-based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride: enzyme-catalyzed formation of NADP-dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2359–2365 (1996).
6. Linker, R. A. *et al.* Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* **134**, 678–692 (2011).
7. Kawabata, K. *et al.* ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 814–820 (1991).
8. Berman, H. M. *et al.* The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242 (2000).
9. Zhu, K. *et al.* Docking covalent inhibitors: a parameter free approach to pose prediction and

- scoring. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 1932–1940 (2014).
10. Ishida, T. & Kato, S. Theoretical perspectives on the reaction mechanism of serine proteases: the reaction free energy profiles of the acylation process. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12035–12048 (2003).
 11. Ishida, T. & Kato, S. Role of Asp102 in the catalytic relay system of serine proteases: a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7111–7118 (2004).
 12. Topf, M. *et al.* Theoretical studies on the geacylation step of serine protease catalysis in the gas phase, in solution, and in elastase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14631–14641 (2004).
 13. Hirano, Y., Shinmoto, N., Hata, M., Tsuda, M. & Hoshino, T. Quantum chemical study on the deacylation step of human chymase. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **757**, 19–27 (2005).
 14. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799 (2006).
 15. Bachovchin, D. A. & Cravatt, B. F. The pharmacological landscape and therapeutic potential of serine hydrolases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 52–68 (2012).
 16. Potashman, M. H. & Duggan, M. E. Covalent modifiers : an orthogonal approach to drug design. *J. Med. Chem.* **52**, 1231–1246 (2009).
 17. Sprang, S. *et al.* The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis. *Science* **237**, 905–909 (1987).
 18. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).

19. Radisky, E. S., Lee, J. M., Lu, C.-J. K. & Koshland, D. E. Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6835–6840 (2006).
20. Mangel, W. F. *et al.* Structure of an acyl-enzyme Intermediate during catalysis : (guanidinobenzoyl) trypsin. *Biochemistry* **29**, 8351–8357 (1990).
21. Northrop, J. H. & Kunitz, M. Crystalline trypsin II. general properties. *J. Gen. Physiol.* **16**, 295–311 (1932).
22. Ramjee, M. K., Henderson, I. M. J., McLoughlin, S. B. & Padova, A. The kinetic and structural characterization of the reaction of nafamostat with bovine pancreatic trypsin. *Thromb. Res.* **98**, 559–569 (2000).
23. Takeda, K. Antiproteases in the Treatment of Acute Necrotizing Pancreatitis : Continuous Regional Arterial Infusion. *J. Pancreas* **8**, 526–532 (2007).
24. 似内 靖. 東京大学大学院薬学系研究科 修士論文 (1993).
25. Bartunik, H. D., Summers, L. J. & Bartsch, H. H. Crystal structure of bovine β -trypsin at 1.5 Å resolution in a crystal form with low molecular packing density: active site geometry, ion pairs and solvent structure. *J. Mol. Biol.* **210**, 813–828 (1989).
26. Hartley, B. S. & Kilby, B. A. The reaction of nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin. *Biochem. J.* **56**, 288–297 (1954).
27. Bender, M. L., Kézdy, F. J. & Feder, J. The kinetics of the trypsin-catalyzed hydrolysis of

- p*-nitrophenyl α -N-benzyloxycarbonyl-L-lysinate hydrochloride. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4953–4954 (1965).
28. Blow, D. M., Birktoft, J. J. & Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **221**, 337–340 (1969).
29. Richards, F. M. & Knowles, J. R. Glutaraldehyde as a protein cross-linkage reagent. *J. Mol. Biol.* **37**, 231–233 (1968).
30. Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. & Waldron, K. C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* **37**, 790–802 (2004).
31. Quiocho, F. A. & Richards, F. M. Intermolecular cross linking of a protein in the crystalline state: carboxypeptidase-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **52**, 833–839 (1964).
32. Otwinowski, Z. & Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
33. Drenth J. "Principles of Protein X-ray Crystallography", Springer-Verlag, New York., 1994.
34. Brünger, A. T. *et al.* Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 905–921 (1998).
35. Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763 (1994).
36. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures.

- Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **67**, 355–367 (2011).
37. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
38. Schüttelkopf, A. W. & Van Aalten, D. M. F. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **60**, 1355–1363 (2004).
39. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).
40. Lovell, S. C. *et al.* Structure validation by C_{α} geometry: φ , ψ and C_{β} deviation. *Prot. Struct. Funct. Gen.* **50**, 437–450 (2003).
41. Bernhard, S. A. & Gutfreund, H. Steps in the reactions of proteolytic enzymes with their substrates. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **257**, 105–110 (1970).
42. Roberts, D. V & Elmore, D. T. Kinetics and mechanism of catalysis by proteolytic enzymes: a comparison of the kinetics of hydrolysis of synthetic substrates by bovine α - and β -trypsin. *Biochem. J.* **141**, 545–554 (1974).
43. Bodnarchuk, M. S. Water, water, everywhere... It's time to stop and think. *Drug Discov. Today* **21**, 1139–1146 (2016).
44. Srinivasan, J., Cheatham, T. E., Cieplak, P., Kollman, P. A. & Case, D. A. Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices. *J. Am. Chem. Soc.*

- 120**, 9401–9409 (1998).
45. Young, T., Abel, R., Kim, B., Berne, B. J. & Friesner, R. A. Motifs for molecular recognition exploiting hydrophobic enclosure in protein-ligand binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 808–13 (2007).
 46. Abel, R., Young, T., Farid, R., Berne, B. J. & Friesner, R. A. Role of the active-site solvent in the thermodynamics of factor Xa ligand binding. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2817–31 (2008).
 47. Beuming, T., Farid, R. & Sherman, W. High-energy water sites determine peptide binding affinity and specificity of PDZ domains. *Protein Sci.* **18**, 1609–19 (2009).
 48. Pearlstein, R. A., Sherman, W. & Abel, R. Contributions of water transfer energy to protein-ligand association and dissociation barriers: Watermap analysis of a series of p38 α MAP kinase inhibitors. *Prot. Struct. Funct. Bioinf.* **81**, 1509–1526 (2013).
 49. Lazaridis, T. Inhomogeneous fluid approach to solvation thermodynamics. 1. theory. *J. Phys. Chem. B.* **102**, 3541–3541 (1998).
 50. Lazaridis, T. Inhomogeneous fluid approach to solvation thermodynamics. 2. applications to Simple Fluids. *J. Phys. Chem. B.* **102**, 3542–3550 (1998).
 51. 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.* **79**, 926–935 (1983).
 52. Masuda, Y., Nitani, Y., Mizutani, R. & Noguchi, S. Crystal structure of 6-guanidinohexanoyl trypsin near the optimum pH reveals the acyl-enzyme intermediate to be deacylated. *Prot.*

- Struct. Funct. Bioinf.* **81**, 526–30 (2013).
53. Sastry, G. M., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R. & Sherman, W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **27**, 221–234 (2013).
54. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z. & Honig, B. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *J. Mol. Biol.* **320**, 597–608 (2002).
55. Jacobson, M. P. *et al.* A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. *Prot. Struct. Funct. Bioinf.* **55**, 351–367 (2004).
56. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
57. Banks, J. L. *et al.* Integrated modeling program, applied chemical theory (IMPACT). *J. Comput. Chem.* **26**, 1752–1780 (2005).
58. Bowers, K. J. *et al.* Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06), Tampa, Florida, November 11-17 (2006).*
59. Harder, E. *et al.* OPLS3: a force field providing road coverage of drug-like small molecules and proteins. *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 281–296 (2016).
60. Kam, C. M., Fujikawa, K. & Powers, J. C. Mechanism-based isocoumarin inhibitors for trypsin

- and blood coagulation serine proteases: new anticoagulants. *Biochemistry* **27**, 2547–2557 (1988).
61. Rai, R. & Katzenellenbogen, J. A. Guanidinophenyl-substituted enol lactones as selective, mechanism-based inhibitors of trypsin-like serine Proteases. *J. Med. Chem.* **35**, 4150–4159 (1992).
62. Duan, J., Dixon, S. L., Lowrie, J. F. & Sherman, W. Analysis and comparison of 2D fingerprints: insights into database screening performance using eight fingerprint methods. *J. Mol. Graph. Model.* **29**, 157–170 (2010).
63. Sastry, M., Lowrie, J. F., Dixon, S. L. & Sherman, W. Large-scale systematic analysis of 2D fingerprint methods and parameters to improve virtual screening enrichments. *J. Chem. Inf. Model.* **50**, 771–784 (2010).
64. Weininger, D., Weininger, A. & Weininger, J. L. SMILES. 2. Algorithm for generation of unique SMILES notation. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **29**, 97–101 (1989).
65. Dixon, S. L. *et al.* PHASE: A new engine for pharmacophore perception, 3D QSAR model development, and 3D database screening: 1. methodology and preliminary results. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **20**, 647–671 (2006).
66. Dixon, S. L., Smondyrev, A. M. & Rao, S. N. PHASE: a novel approach to pharmacophore modeling and 3D database searching. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 370–372 (2006).
67. Stewart J. J. P., MOPAC2016, Version: 16.230, Stewart Computational Chemistry.:

- <<http://OpenMOPAC.net>>, cited June 15, 2018.
68. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **19**, 1–32 (2013).
69. Klamt, A., Schüürmann, G. COSMO: a new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 799–805 (1993).
70. “Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D.”: <<http://www.jmol.org/>>, cited June 15, 2018.
71. R Core Team (2017). “R: A language and environment for statistical computing.” R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.: <<https://www.R-project.org/>>, cited June 15, 2018.
72. RStudio Team (2016). “RStudio: Integrated Development for R.” RStudio, Inc., Boston, MA.: <<http://www.rstudio.com/>>, cited June 15, 2018.
73. Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. K. & Cournia, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 1923–1938 (2014).
74. Spyrakis, F. *et al.* The roles of water in the protein matrix: a largely untapped resource for drug discovery. *J. Med. Chem.* **60**, 6781–6828 (2017).

75. Chan, A. W. E. & Golec, J. M. C. Prediction of relative potency of ketone protease inhibitors using molecular orbital theory. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 1673–1677 (1996).
76. Stewart, J. J. P. An investigation into the applicability of the semiempirical method PM7 for modeling the catalytic mechanism in the enzyme chymotrypsin. *J. Mol. Model.* **23**, 154 (2017).
77. Bode, W. & Schwager, P. The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1.8 Å resolution: II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *Journal of Molecular Biology* **98**, 693–717 (1975).