

学位論文

創薬への応用を目指した、
計算科学を利用したタンパク質と化合物の相互作用解析
—トランスグルタミナーゼの基質認識機構の解明および、
FABP4 とその阻害剤の相互作用解析—

味の素株式会社 イノベーション研究所 田上宇乃

1 目次

1	目次	1
2	緒言	3
3	研究事例1 トランスグルタミナーゼの基質認識機構の解明	9
3.1	背景	9
3.1.1	MTG の産業利用	9
3.1.2	MTG の構造特徴	10
3.1.3	MTG の反応機構	13
3.2	方法	15
3.2.1	ドッキングモデルの構築方法	15
3.2.2	MD 計算方法	19
3.2.3	ドッキングモデルの妥当性の検証方法	23
3.3	結果と考察	24
3.3.1	ドッキングモデル構築結果	24
3.3.2	MD 計算結果	27
3.3.3	MD 計算によるオキシアニオンホール Val65 の妥当性の検証	33
3.3.4	ドッキングモデルと基質特異性の考察	35
3.3.5	変異実験によるドッキングモデルの妥当性検証結果	37
3.4	結論	41
4	研究事例2 FABP4 とその阻害剤の相互作用解析	43
4.1	背景と目的	43

4.1.1	FABP4 について	43
4.1.2	FABP4 阻害剤について	44
4.1.3	計算手法について	45
4.1.4	阻害剤の創出の経緯と本研究の位置づけ	45
4.2	方法	47
4.2.1	FMO 計算に使用する立体構造の準備	47
4.2.2	FMO 計算方法	47
4.2.3	FMO 計算結果の解析方法	51
4.2.4	MM-GBSA 法による結合エネルギー値の算出方法	51
4.3	結果と考察	52
4.3.1	FABP4 と各阻害剤との複合体 X 線結晶構造解析結果	52
4.3.2	FABP4 と各阻害剤との相互作用エネルギー値と活性値との相関解析結果	54
4.3.3	各阻害剤と FABP4 のアミノ酸残基との相互作用解析結果	56
4.3.4	compound 1 の相互作用解析結果	58
4.3.5	compound 2 の相互作用解析結果	60
4.3.6	compound 3 の相互作用解析結果	62
4.3.7	各阻害剤と FABP4 のアミノ酸残基との IFIE 値の一覧	63
4.3.8	MM-GBSA 法による構造活性相関解析	68
4.4	結論	69
5	総括	71
6	引用文献	74
7	謝辞	83

2 緒言

タンパク質と化合物の相互作用を解析することは、酵素の反応機構や反応速度論を解明したり、結合エネルギーを理解したりするような学術的な興味だけではなく、そのタンパク質や化合物を応用して利用する産業界においても非常に重要である。相互作用を解析した後、そこから得られた知見を利用して、タンパク質改変によりタンパク質の活性や性質を制御することは、バイオ医薬品の製造や食品の改質に関わるような産業用酵素の創出につながり、一方で、化合物改変により化合物の活性や性質を制御することは低分子医薬品の創出につながるからである。

本論文では、タンパク質と化合物との相互作用を解析することで得られた、産業上重要な酵素の改変に役立つ知見を研究事例 1 で論じ、低分子医薬品開発に役立つ知見を研究事例 2 で論ずる。

産業用酵素は、洗剤、食品、検査薬、繊維など広範な分野で利用されている。2008 年の世界の酵素市場は 4,000 億円であり、その後の市場は、依拠するデータによりバラつきが見られるが、少しずつ増加している¹⁾。従来、酵素市場は洗剤や食品への用途が主であり、本論文の研究事例 1 で使用した微生物由来トランスグルタミナーゼ (microbial transglutaminase、以後 MTG) もその一つである²⁻⁴⁾が、近年はバイオ医薬品の開発のための用途も増え始めている。

バイオ医薬品は、バイオテクノロジーを用いて製造される医薬品の総称であり、一般的には、遺伝子組換え技術や細胞培養技術により生産されるタンパク質を高度に精製した医薬品を意味する。詳しくは、有効成分がタンパク質 (成長ホルモン、インスリン、抗体など) そのもの、あるいは、生物 (細胞、ウイルス、

バクテリアなど)に産生させた医薬品のことである。バイオ医薬品の世界の市場規模は、2013年にはすでに16兆円に達しており、2020年にはさらに30兆円にまで拡大すると言われている。世界の医薬品市場全体の中でバイオ医薬品が占める割合も年々高まっており、この傾向は今後も続くと予測されている⁵⁾。

更に、近年では、従来のバイオ医薬品をバイオテクノロジー技術により修飾して、もしくは、低分子を付加する修飾により高機能化させた次世代バイオ医薬品も登場してきた。例えば、抗体に薬剤を結合させた抗体薬物複合体 (Antibody Drug Conjugate、ADC)^{6,7)} や抗体にポリエチレングリコール (PEG) を結合させた PEG 化抗体⁸⁾、2種類の異なる抗原を認識するように設計された bispecific 抗体^{9,10)} などが開発されている。PEG 化抗 TNF α 抗体の CIMZIA や、ADC の抗 CD30 抗体の brentuximab vedotin、抗 HER2 抗体の Trastuzumab emtansine は既に上市されている。MTG は ADC¹¹⁻¹³⁾ や、タンパク質の PEG 化^{14,15)} にも使用されている例が報告されており、食品改質用途だけでなく、注目されている産業用酵素の一つである。

このように、タンパク質を利用して各種産業への応用が広がってきているが、従来に比べ次第に複雑なものとなってきている。そのため、望む性能を発揮させるためには、タンパク質あるいはタンパク質の基質を詳細に設計することが必要である。

そこで、研究事例1では、バイオ医薬品や産業用酵素等への応用を目指し、グルタミン側鎖とリジン等のアミノ基を共有結合する活性を有する MTG の基質認識機構の解明を試みた。現在、MTG が応用されている抗体医薬品はまだわずかであり、MTG の基質 (抗体と薬物) 結合活性や基質認識の特異性が課題となっている中、酵素改変による克服が望まれている。

従来、酵素改変はランダム変異導入法で行われてきたが、目的とする活性を持つ酵素を得るためには、膨大な実験によるコストと時間がかかることと、ハイスループットな活性評価法の構築が必須であることが課題であった。そこで近年では、酵素の立体構造を基にした効率的な変異提案手法が取り入れられてきている。そのためには酵素と基質の相互作用を詳細に見積もることが必要であり、本研究では、MTG と基質とのドッキングモデルを古典力学的な計算手法を用いて構築することにより相互作用解析を試みた¹⁶⁾。産業研究ではスピードが重要なため、今回は X 線結晶構造解析や NMR よりも早く結果を活用可能な計算科学を利用した。

研究事例 2 では、FABP4 (脂肪酸結合タンパク質アイソフォーム 4) とその阻害剤の相互作用解析を実施した¹⁷⁾。FABP4 は脂肪細胞やマクロファージに発現し、糖尿病、動脈硬化症の疾患に関与することが示唆されており¹⁸⁾、その阻害剤はそれらの疾患治療に有効であると考えられている^{19, 29)}。これまで報告されている FABP4 阻害剤は活性が不十分という問題があったため、より高活性な FABP4 の阻害剤を作るためには、複合体構造を基にした相互作用情報が必要であった。FABP4 と自社で得た阻害剤の X 線結晶構造は得られていたが、より詳細な相互作用情報が必要であったため、量子力学に基づいた分子計算手法を用いて、FABP4 とその阻害剤の相互作用解析を試みた。

分子計算には、粗視化計算、古典力学計算、量子力学計算の 3 種類の計算方法が存在する。3 種類の計算方法について概説する。

1. 粗視化計算：アミノ酸を 1 つの球として計算する。タンパク質の折り畳み等の解明を目的とし、タンパク質の動きを時間軸で解明することが可能だが、精度は低い。

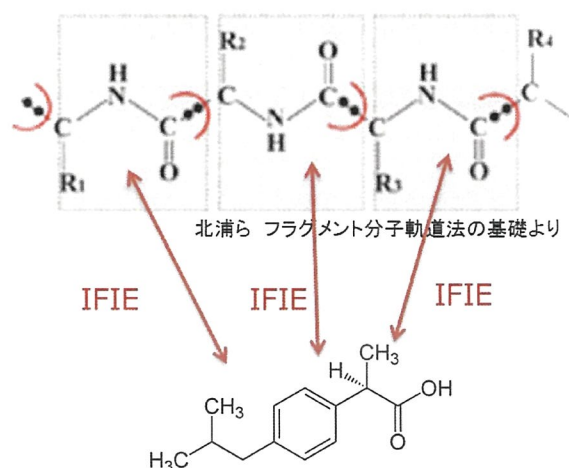
2. 古典力学計算：原子を計算対象とし、ドッキングや分子動力学（Molecular Dynamics、以後 MD）計算等、化合物との相互作用解析を目的とする。一般的に、よく使用されており精度も高いが、アミノ酸残基ごとの相互作用を算出することは不可能である。研究事例 1 では、古典力学計算であるドッキングと MD 計算により、MTG の基質認識機構を解明した。
3. 量子力学計算（＝分子軌道法（Molecular Orbital Method、MO））：電子雲を計算対象とし、電子の動き、即ち化学反応（電子が動くことによって起こる）の仕組みを明らかにすることを目的とする。精度は高いが、計算量が膨大なため、現状の計算機能力では低分子のみ計算が可能である。電子の状態は、シュレーディンガー方程式を解くことによって求められ、この方程式を解くのが量子力学計算である。シュレーディンガー方程式を解くことにより、分子の電子分布を表す「波動関数」と、安定度を表すエネルギーが得られ、分子の反応の起こりやすさや反応する部分を理解することができる。

研究事例 2 では、この量子力学計算（MO 法）を使用しているが、従来の MO 法ではなく、フラグメント MO 法（以後 FMO 法）²¹⁻²⁴⁾ を使用することにより、タンパク質の量子力学計算に成功した。

FMO 法は、1999 年に北浦ら²¹⁾により提案された。従来の MO 計算は低分子化合物の計算までが現実的に可能な範囲であり、タンパク質などの巨大分子の計算は不可能とされてきた。北浦らは、この課題を、計算対象をフラグメント化することにより解決した。即ち、タンパク質であればアミノ酸残基単位に分割（フラグメント化）し、フラグメント単体およびフラグメントペアの計算のみから、全体の相互作用エネルギー値を算出する。これにより、各アミノ酸残基とリガンドとの相互作用エネルギーを算出可能であると共に、それを合計してタン

パク質とリガンドとの相互作用エネルギーを算出することを可能にした方法であり、分子量の大きいタンパク質の量子力学計算を現実的な計算量で行う唯一の方法である。また、フラグメント単体およびフラグメントペアの計算が独立していることから並列計算が可能であることも、計算時間を大きく減少させた理由の一つである。全エネルギーの定式化の中で、フラグメント間相互作用エネルギー (Inter Fragment Interaction Energy (IFIE))^{25, 26)} が定義されており、更に、IFIE を4つのエネルギー成分 (静電相互作用エネルギー(ES), 交換反発エネルギー(EX), 電荷移動相互作用エネルギー(CT+mix), 分散エネルギー(DI)) に分割・解析できる機能 PIEDA (Pair Interaction Energy Decomposition Analysis)²⁷⁾ を使用することで、相互作用の内容を詳細に解析することが可能である (図1)。

1アミノ酸残基単位にフラグメント化



リガンドとフラグメントとの間のIFIEを算出

↓ Total IFIE

$$E = \sum_I^N E_I + \sum_{I>J}^N (E_{IJ} - E_I - E_J) + \dots$$

Kitaura, K. Chem. Phys. Lett. 1999

図1 FMO法のフラグメント化とIFIEの算出方法

このように、バイオ医薬品等への応用を目指した酵素改変のための研究として、研究事例 1 を、低分子医薬品の高活性化を目指した研究として研究事例 2 を、それぞれ、古典力学計算と量子力学計算という異なる分子計算手法で実施した。目的に応じた適切な分子計算方法を用いて、タンパク質と化合物の相互作用を解析することの重要性と共に、その解析結果から得られた知見と将来展望を論じる。

3 研究事例1 トランスグルタミナーゼの基質認識機構の解明

3.1 背景

3.1.1 MTG の産業利用

MTG は、タンパク質中のグルタミン残基 (Gln) とリジン残基 (Lys) 等のアミノ基を共有結合させる活性を持つ (図 2 (a))²⁸⁻³¹⁾。このタンパク質を架橋させるという機能的特徴を生かし、食品の分野では、豆腐、蒲鉾、ソーセージ等のタンパク質含有食品の物性の改善に広く利用されている。

医薬の分野では、PEG を結合させることでバイオ医薬品の可溶性や安定性の向上等の高機能化を行う PEGylation や、ADC の開発に使用されている。

ADC (図 2 (b)) は、抗体にリンカーを介して薬物を結合させた抗体医薬品で、抗がん剤として主に利用されている。抗原を発現する細胞に活性を保持したまま、かつ選択的に薬剤を送達することによって、優れた有効性を示すことが期待されている。また、目的の場所で薬効を発揮することが可能なことから、毒性がある、あるいは、溶解性が悪い薬物でも使用可能という安全性の面での利点がある。また、薬物の代わりに造影剤を結合させればイメージングにも利用可能である。

MTG を利用した抗体医薬品開発事例としては、Rinat-Pfizer 社で抗体の定常領域 (Fc 領域) に MTG 認識配列を挿入し、MTG で薬剤を結合した例³²⁾や、Paul Scherrer Institute と Innate Pharma の、Asn297 に付加した糖鎖を除去後、Gln295 に MTG で薬剤を結合する例が報告されている³³⁾。

しかしながら、MTG で結合する薬物の数を制御できない、あるいは、Gln295
しか薬物を結合することができない等の課題があり、MTG の改変によるこれら
の課題の克服が望まれている。

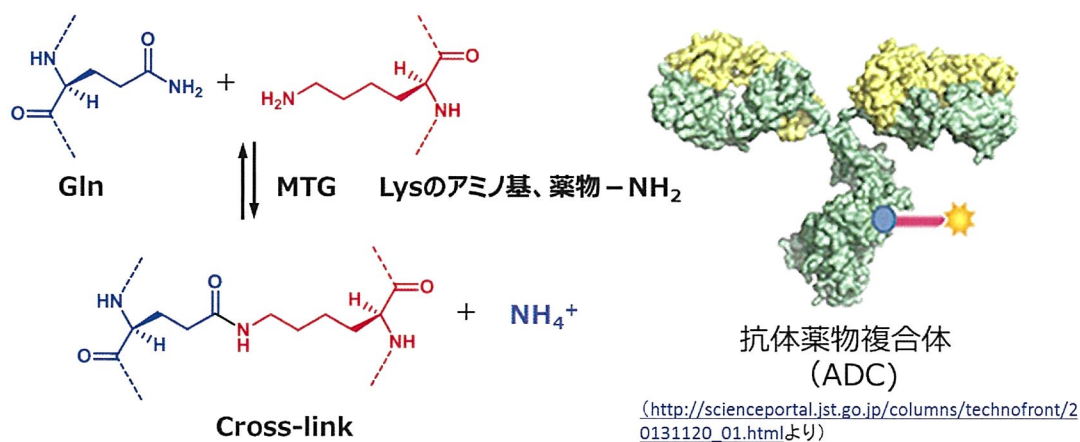


図 2 (a) MTG の触媒反応 (b) ADC の模式図

3.1.2 MTG の構造特徴

MTG の立体構造は、当グループにて決定された X 線結晶構造 (PDB コード :
1IU4) を使用した。MTG は、331 アミノ酸残基、分子量約 38,000Da の中程度の
大きさのタンパク質である。MTG のアミノ酸配列と全体構造を図 3 に示す。構
造的な特徴としては、円盤状の形をした単ドメイン構造をとり、円盤のへりには、
楔状に大きく窪んだクレフトが一箇所あり、その底には活性残基である
Cys64 が存在している。

二次構造の上では、MTG は 11 本の α ヘリックスと 8 本の β ストランドを含んでおり、タンパク質の 4 種の主要構造の内の $\alpha+\beta$ フォールドに属する。立体構造上は、 α ヘリックスが、中心部の 7 本鎖逆平行 β シートを取り囲むように配置されている。フォールディングトポロジー等の観点で立体構造が類似したタンパク質は見い出せず、MTG は新規な構造のタンパク質である³⁴⁾。

```
DSDDRVTTPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQQM  
TEEQREWLSYGCVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPRSGETR  
AEFEGRVAKESFDEEKGFQRAREVASVMNRALENAHDESAYLDNLKKELANGN  
DALRNEDARSPFYALSALRNTPSFKERNNGGNHDP SRMKAVIYSKHFWSGQDRSSS  
ADKRKYGDPDAFRPAPGTGLVDM SRDRNIPRSPTSPGEGFVNFDYGWFGAQTE  
ADADKTVWTHGNHYHAPNGSLGAMHVYESKFRNWSEGYSDFDRGAYVITFIP  
KSWNTAPDKVKQGWP
```

図 3 (a) MTG のアミノ酸配列

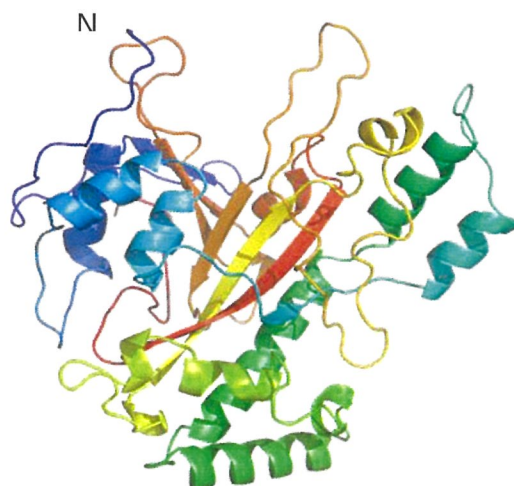


図 3 (b) MTG の全体構造 (正面から見た図) (PyMOL で描画)

また、N 末端を左側にして表示した MTG の構造を正面とすると、MTG の活性部位の存在するクレフトの裏側には、多くの酸性残基が集中し(Asp1、Asp3、Asp4、Glu249、Asp255、Glu300)、かなり負電荷に富んだ部分が存在する (図 4)。正面側には疎水性残基(Tyr62、Val65、Trp69、Tyr75、Ile240、Phe254)が存在し、疎水性のパッチが形成されている (図 5)。

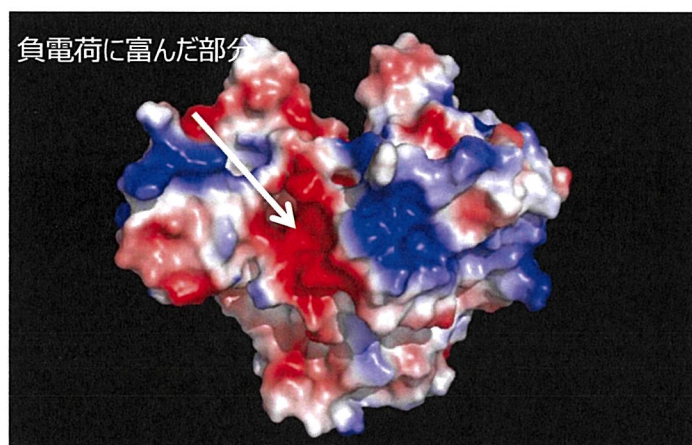


図 4 MTG の裏側から見た静電ポテンシャル表示図 (PyMOL で描画)

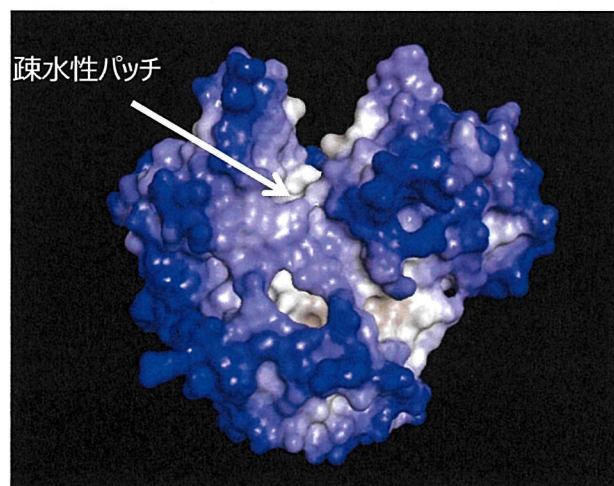


図 5 MTG の正面から見た疎水性度の表示 (Discovery Studio2016 で描画)

青：親水性 白：疎水性

一方、MTGの基質特異性に関する研究では、Gln残基の1つN末側のアミノ酸残基が疎水性で、1つC末側のアミノ酸残基がGlyであるペプチドが良い基質になることが、明らかにされている³⁵⁾。

このような構造の観察と基質特異性の実験結果も加味しながら、本研究では基質との複合体モデルを構築することにより、より詳細な基質認識機構の解明を試みた。

3.1.3 MTGの反応機構

クレフトの中心に活性中心のCys64が存在していることから、MTGの基質は、それぞれ活性部位クレフトの表裏の入り口付近に存在すると考えられる。MTGの全体構造の観察と基質特異性の研究結果より、MTGのクレフトの裏側の負電荷に富んだ部分に、Lys残基等のアミノ基のような正電荷を有する基質が近接し、表側の疎水性パッチ部分にGln残基の隣の疎水性残基が近接し、架橋反応が進行することが推察される。しかしながら、本構造は、基質との複合体で得られていないため、詳細に基質認識機構を考察することは困難であった。MTGの基質特異性等に役立つ知見を得るためには、反応機構の推定が重要であるため、計算科学的に基質との結合様式を推定した。

既にMTGの反応機構は推定されている³⁶⁾が、構造的にどのように反応が進行するかは不明であった。推定反応機構は、図6に示したように、まず、Cys64のチオレートアニオン($S\gamma^-$)が、反応の1段階目の基質であるGln残基の側鎖のカルボニル炭素を求核攻撃し、生じた四面体中間体(オキシアニオン中間体)に、Asp255がプロトンを供与し、アンモニアが遊離する。続いて、反応の2段

階目の基質である Lys 残基等のアミノ基が活性中心に近接し、Asp255 のカルボキシル基が、Lys 残基等のアミノ基のプロトンを引き抜き、四面体中間体を経て、Gln 残基と Lys 等のアミノ基が架橋した生成物が遊離し、反応が終結する。

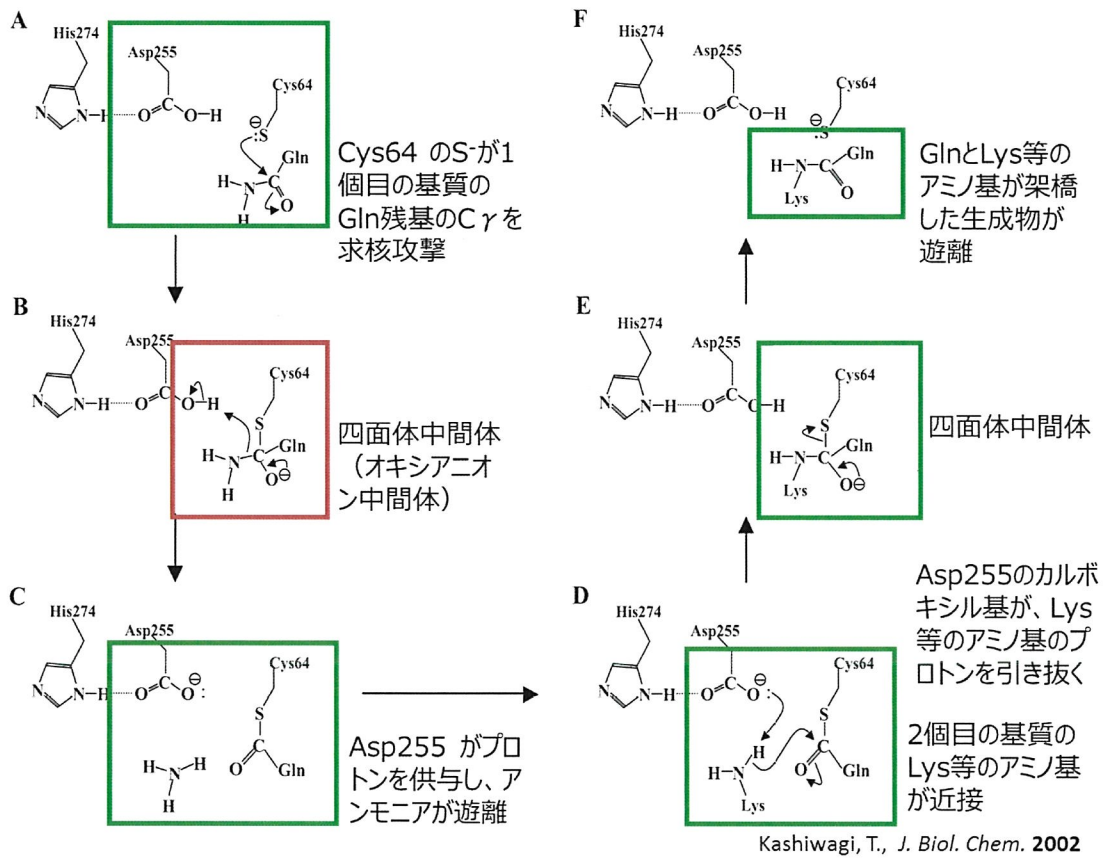


図 6 MTG の推定反応機構

本研究では、反応の1段階目の基質である Gln 残基の結合様式 (図 6 の B の状態) を解明することにより、MTG の基質認識機構の解明を試みた。

3.2 方法

3.2.1 ドッキングモデルの構築方法

MTG と一段階目の基質である Gln 残基との結合様式を解明するため、MTG の活性評価に使用しているモデル基質である CBZGlnGly のドッキングモデルの構築を行った。

まず、ドッキングで一段階目の基質である Gln 残基が活性中心の Cys64 に近づいた構造を取得し、次に、MD 計算で MTG と CBZGlnGly の水中での動的構造をシミュレーションし、図 6 の B の状態を再現すると共に、オキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基を推定した。

1) ドッキングモデルで再現する反応状態

ドッキングモデルで再現する反応状態は、一段階目の基質である Gln 残基が結合する図 6 の B の状態である。B の状態を拡大した図を図 7 (a) に示す。また、CBZGlnGly の構造を図 7 (b) に示す。

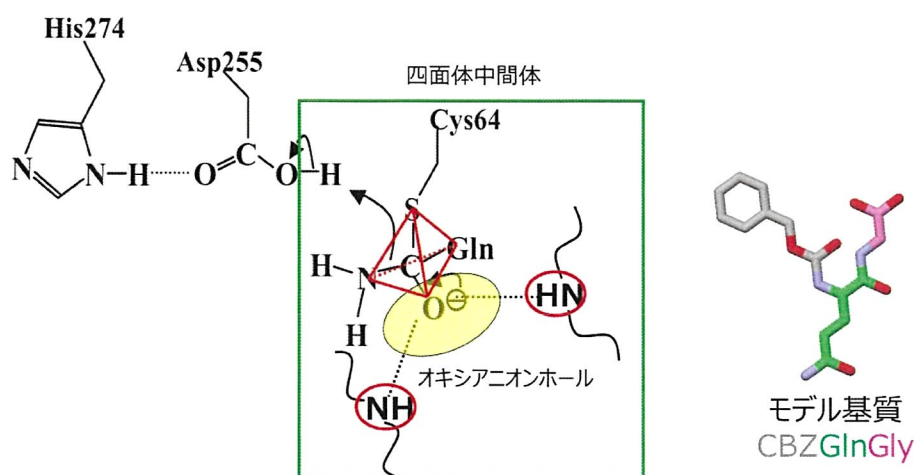


図7 (a) Gln 残基が MTG に結合するときの構造 (b) CBZGlnGly の構造

MTG の Cys64 の S γ が基質の Gln 残基の側鎖のカルボニル炭素に結合し、四面体中間体ができる際に Gln 残基のカルボニル酸素がオキシアニオンホールにはまりこみ、MTG のアミノ酸残基と水素結合を 2 か所同時に形成する。オキシアニオンホールは、セリンプロテアーゼやシステインプロテアーゼの場合同じような位置にあり、活性中心同様に重要なアミノ酸残基である。

オキシアニオンホールについては、中性子線を用いたセリンプロテアーゼの構造解析がなされている。セリンプロテアーゼの 1 種であるエラスターゼと阻害剤との複合体結晶を作製することによって反応中間体を作り、水素原子の観測を得意とする中性子ビームを用いた全原子構造解析（中性子構造解析）により、オキシアニオンホールの酸素原子から水素原子が消失した状態を確認している³⁶⁾。

MTG のオキシアニオンホールは未知なため、反応中間体状態のドッキングモデルを構築し、オキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基を解明することにより基質認識機構の解明を試みた。

2) MTG の立体構造の準備

ドッキングの前に、MTG の立体構造の計算準備を実施した。Maestro (Schrödinger 社) を使用し、計算に使用するタンパク質の準備として、水を削除し、全ての Asn 残基と Gln 残基のアミド基と His 残基の異性体を最適化し、プロトンの構造最適化 (minimization) を行った。pH は 7.0 に設定した。

活性中心のアミノ酸残基は、下記の 3 つの状態に設定し、それぞれの状態でドッキングを行った。① カルボン酸が水中で解離した通常の状態 (Asp255 をカルボニルイオンに設定した状態)、② 四面体中間体形成時の状態 (Asp255 が Cys64 のチオール基からプロトンを引き抜きカルボン酸となり、Cys64 のチオール基がチオレートアニオンとなり、His274 を Asp255 と水素結合しやすいように異性化した状態) に設定、③ ②の状態かつ、Cys64 の χ_1 を 68 度に設定し、チオール基を Asp255 の側鎖のカルボン酸側に回転させ、構造最適化した状態 (②の位置の場合、Asp255 のカルボン酸と Cys64 のチオール基が遠く、プロトンを引き抜きにくい)。○

3) ドッキング方法

次に、Cys64、Asp255 を Site centroid of selected residues として 17Å のグリッドを作製し、Glide (Schrödinger 社) の SP、XP、Induced Fit Docking の 3 種のドッキングモードで、各ドッキングモードにつき最大 100 ポーズを算出した。SP (standard precision) は標準的なモードである。XP (extra precision) モードは、分子力学計算が厳密なため、分子間力 (反発力) のパラメータが厳密な、リガン

ドの近接が限られる精度の高いモードである。Induced Fit Docking は、タンパク質とリガンドが結合する多くの場合で、Induced-Fit (誘導適合) が起きていることを考慮し、タンパク質側のドッキング部位のアミノ酸残基を全て Ala に置換して小さくすることにより Induced-Fit を模した状態でドッキングする方法である。ドッキング条件を図 8 にまとめた。

- Protein Preparation
 - Remove waters
 - Optimize hydroxyl, Asn, Gln and tautomer states of His
 - Constraint refinement with OPLS-AA force field
- Glide ver. 4.0.217
- Receptor Grid Generation
 - Site centroid of selected residues : Cys64, Asp255
 - size : 17Å
- Docking Mode
 - SP, XP, Induced Fit Docking
- Output
 - 各 Docking Mode で最大 100 ポーズ

図 8 Glide のドッキング条件

3.2.2 MD 計算方法

1) 初期構造の設定

Glide によるドッキングの結果、評価基準 (3.3.1 に記載) を満たした良好なドッキングモデルが得られたが、CBZGlnGly のカルボニル酸素と MTG の 2 残基のアミノ基とが水素結合を形成した状態であるオキシアニオンホールを形成していなかった。そこで、MD 計算により、水中での多数の溶液構造を発生させ、その MD トラジェクトリの中から CBZGlnGly の四面体中間体を安定化するドナーとオキシアニオンホールを形成する構造を探索した。

MD 計算とは、集団系を構成している全ての原子の運動について Newton の運動方程式を解くことにより、その運動の軌跡を追跡するものである。その軌跡はトラジェクトリとして構造が算出されるため、全トラジェクトリを観察することで構造の動きを推測することができる。MD 計算では、粒子間の力およびポテンシャルエネルギーは原子間ポテンシャル (分子力学力場) によって定義される。

まず、MD 計算を開始するに当たり、初期構造をドッキング結果から抽出した。SP モードで得られた結果に最も四面体中間体に近い構造が得られていたため、この中から初期構造を抽出した。

SP モードで得られた 100 ポーズから MOE (Chemical Computing Group Inc.) を使用して RMSD 値 4.5 \AA でクラスタリングし、9 個のクラスターに分け、Cys64 の S_{γ} から CBZGlnGly の Gln 残基の側鎖のカルボニル炭素までの距離 (以後、SC 間距離) が近い、5 個のクラスター (クラスター 1、2、3、4、6) を選択した。そして、各クラスターのセンター構造を MD 計算の初期構造

とした。

2) MD 計算プログラムと力場

MD 計算のプログラムは、AMBER8 プログラム、力場は parm96 を使用した。AMBER8 は、世界的に最も使用されている分子シミュレーションパッケージの一つで、タンパク、核酸などの生体高分子や低分子のシミュレーションに広く使用されているものである。

3) 水と電荷の調整

水中での MTG の挙動を観察するため、露わな水分子中での MD 計算を実施した。AMBER の LEaP プログラムを使用し、MTG の水中での電荷を再現するための計算準備を行った。MTG の周囲 15 Å に水の集合体の安定構造

(TIP3PBOX³⁷⁾) をつけた直方体を作製し、周期境界条件で計算した。周期境界条件を使用する利点は、対象となる系を多数の等価なセルに分割することができ、その中の一つのセルでの記述が、他のセルでの記述と全く同等になることである。

4) 電荷の調整

MD 計算を実施する前に、タンパク質全体の電荷を測定し、必ず全体の電荷が 0 となるように調整する必要がある。例えば、全体のうち、1 つだけ Glu が -1 に分極していれば Na⁺ を 1 個カウンターイオンとして設定する。MTG の Cys64 のチオール基がチオレートアニオン (S⁻) の場合、全体の電荷が -2 となったため、Na⁺ を 2 個カウンターイオンに設定した。

5) 構造最適化計算 (minimize)

水素、側鎖、全体の順で構造最適化計算を実施した。各段階で、RMSD (Root Mean Square Deviation、平均二乗偏差) が 0.02 \AA 以下になり、よく収束していることを確認した。

6) MD 計算

構造最適化計算後の構造から、MD 計算を 100K、200K、300K_NVP、300K_NVT の順に 10 ナノ秒 (ns) まで計算した。1 ステップを 1 フェムト秒 (fs) と換算して計算し、トラジェクトリは、1 ピコ秒 (ps) 毎で保存し、10000 トラジェクトリを得た。MD 計算環境を図 9 にまとめた。

- ソフトウェア
 - プログラム
 - AMBER8
 - 溶媒
 - TIP3P 15 Å
 - 力場
 - parm96
 - 静電相互作用計算
 - Particle Mesh Ewald 法
 - Dynamics
 - 300K/NVT アンサンブル
 - 10 ns、 time step 1 fs
- ハードウェア
 - IBM BlueGene/L 8192 CPU core (4096 computing nodes)
(産業技術総合研究所)

図9 MD 計算環境

7) 解析

MTG 全体の RMSD と、SC 間距離、NH 間距離を、グラフ作成プログラム gnuplot³⁸⁾ を使用してプロットした。また、基質 CBZGlnGly と相互作用しているアミノ酸残基と回数を、LIGPLOT³⁹⁾ の contact 回数 (CBZGlnGly から 3.9 Å

以内に入るアミノ酸残基とその回数) により算出した。

3.2.3 ドッキングモデルの妥当性の検証方法

MTG の活性中心のクレフト周辺のアミノ酸残基の Ala 変異体を QuikChange mutagenesis kit (Stratagene) を使用して作製した。

次に、2 種類の方法で Ala 変異体の活性を評価した。1 つは、小さなペプチド基質である CBZGlnGly との結合活性を評価可能なヒドロキサメート法⁴⁰⁾で、もう 1 つは、大きなタンパク質基質の結合活性を評価可能なオボアルブミン (chicken egg albumin) を使用した NMR 評価法^{41, 42)}である。

ヒドロキサメート法は、MTG で、CBZGlnGly と一級アミンであるヒドロキシルアミンを結合し、生成したヒドロキサム酸を、鉄でキレートして、A525 の吸光強度で定量する方法である。37°C、pH6.0 で、1 分間に 1 μ M のヒドロキサム酸を生成する酵素量を 1U と規定している。

NMR 評価法は、基質としてオボアルブミンと ¹⁵N 標識された塩化アンモニウムを用い、MTG の作用により ¹⁵N 標識されたオボアルブミン中の Gln 残基のスペクトルより、MTG の基質特異性や反応速度を比較する方法である。連続測定により得られた NMR スペクトルの解析により、1 分間に標識されるオボアルブミンの濃度 (μ M) を MTG の活性として表した。

3.3 結果と考察

3.3.1 ドッキングモデル構築結果

Gln 残基が MTG に結合するときの構造 (図 7 (a)) にできるだけ近い構造を目標として、下記の 4 項目でドッキングモデルを評価した。

<評価基準>

- ・ CBZGlnGly の Gln 残基の側鎖のカルボニル炭素と Cys64 の S γ の距離 (SC 間距離) が近い
- ・ CBZGlnGly の Gln 残基の側鎖の NH₂ と Asp255 の COOH 間距離 (NH 間距離) が近い
- ・ CBZGlnGly の Phe 基が π - π スタッキングをしている位置であること
- ・ エネルギー値 (ドッキングスコア) が低いこと

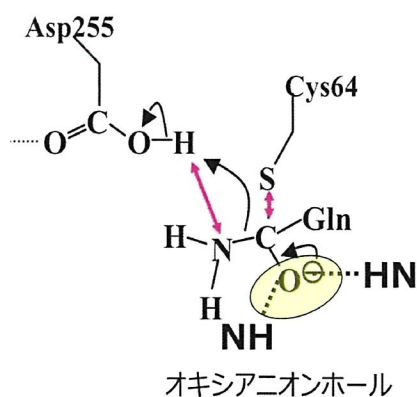


図 10 ドッキングモデルの評価基準

- ① 水中での解離状態 (Asp255 をカルボニルイオンに設定した状態) でのドッキング結果

SP (standard precision) モード :

ドッキングスコア 1 位のポーズは、CBZGlnGly の Gln 残基の側鎖のアミノ基が Asp255 と水素結合を形成したが、SC 間距離は遠かった。

XP (extra precision) モード :

ドッキングスコア 2 位のポーズは、CBZGlnGly の Gln 残基の側鎖のアミド基のアミノ基と酸素の向きが逆で良好なポーズとは言えなかった。

以上のことから、①の設定では、ドッキングスコアの上位に、一定の結果が得られてはいたが、SC 間距離が遠く、評価基準に適さなかった。反応機構を考慮すると Asp255 は解離していない状態を再現することが望ましいことを確認した。

② 四面体中間体形成時の状態 (Asp255 が Cys64 のチオール基からプロトンを引き抜きカルボン酸となり、Cys64 のチオール基がチオレートアニオンとなり、His274 が Asp255 と水素結合しやすいように異性化した状態) でドッキングした結果

SP モード :

ドッキングスコア 1 位のポーズは、Gln 残基の側鎖のカルボニル炭素と Cys64 の Sy は結合しにくい位置であったため、評価基準に不適合なポーズであった。

XP モード :

どのポーズも評価基準に不適合な構造であった。

Induced Fit Docking :

ドッキングスコア 6、7 位のポーズ (それぞれ $r_i_docking_score$: -9.184048 kcal/mol、-9.575888 kcal/mol) は、SC 間距離が近く (それぞれ 4.30 Å、3.74

Å)、CBZGlnGly の CBZ 基が Tyr62、Phe254 と π - π スタッキングしている構造が得られた。評価基準を満たしている。

- ③ ②の状態かつ、Cys64 の Sy を Asp255 の側鎖のカルボン酸側へ回転させた状態でドッキングした結果

SP モード：

ドッキングスコア 60 位に良いポーズが得られた (図 11)。エネルギー値は高いが ($r_i_docking_score$: -2.99268 kcal/mol)、中間体に近い構造の場合エネルギー値が高くなることも考慮し、ドッキングスコアよりも目視での評価を重視した。SC 間距離が近く (3.12 Å)、CBZ 基は Tyr278 と π スタッキングし、評価基準を満たしている。

XP モード：

評価基準に不適合な構造であった。

以上をまとめると、②の設定で Induced Fit Docking モードで得られたドッキングスコアが 6 位と 7 位のポーズと、③の設定で、SP モードでドッキングして得られたドッキングスコアが 60 位のポーズの 3 ポーズが評価基準に適合していた。

しかしながら、どの構造も MTG のアミノ酸残基と 2 か所同時に水素結合を形成する状態であるオキシアニオンホールは形成していなかった。そこで、MD 計算により多数の構造を発生させ、オキシアニオンホールを形成する構造を探索した。

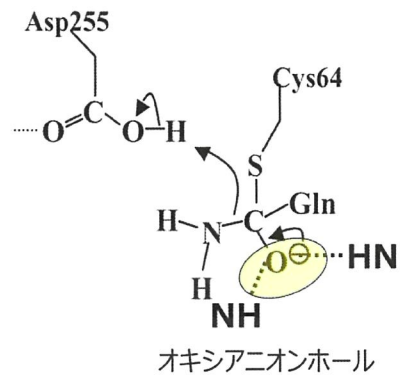
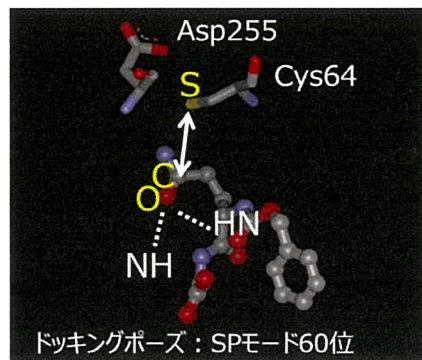


図 11 ③の設定で Glide の SP モードで得られたドッキングモデル

3.3.2 MD 計算結果

1) 初期構造の抽出

まず、MD 計算を開始するに当たり、3.2.2 に記載した方法で、初期構造をドッキングポーズの中から抽出した。100 ポーズを 9 個のクラスターに分け、SC 間距離が近い 5 個のクラスター（クラスター1、2、3、4、6）を選択した結果を図 12 に示す。

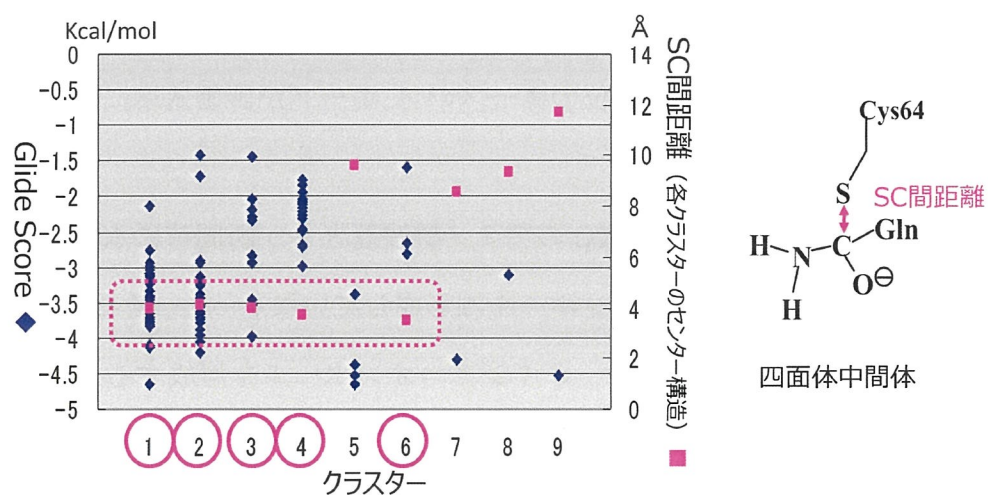


図 12 ドッキングポーズ（100 ポーズ）のクラスタリングによる MD 計算の初期構造の抽出

2) 最適な初期構造の選択

MD 計算の初期構造とした、クラスター1、2、3、4、6のセンター構造を図13 (a) ~ (e) に示す。各ポーズは、アミドの位置はほぼ同じであるが、CBZ基の位置で5種類に分類されたような構造である。

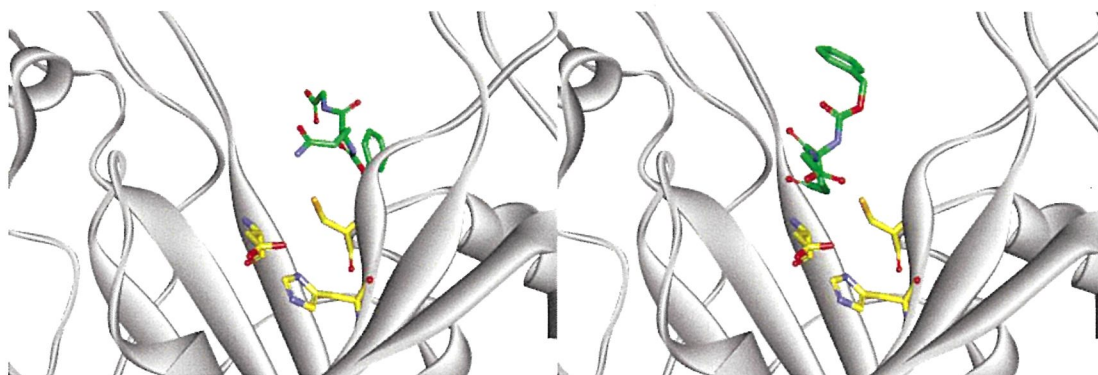


図13 (a) クラスタ1のセンター構造 (b) クラスタ2のセンター構造

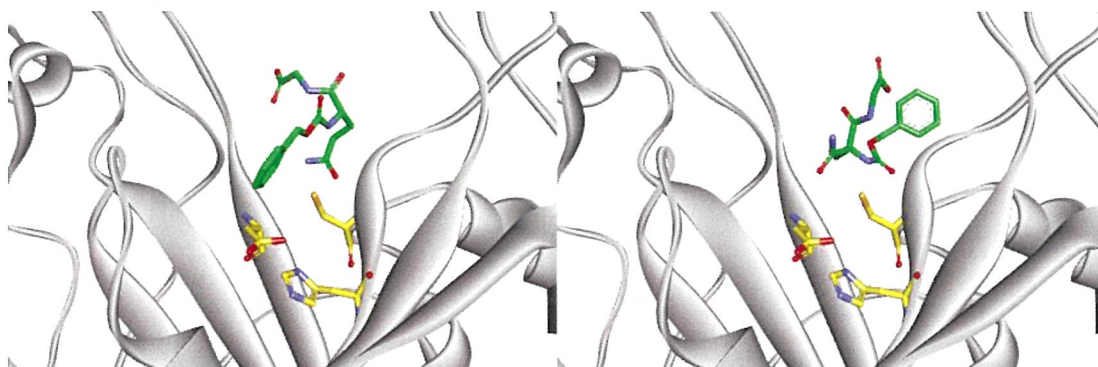


図13 (c) クラスタ3のセンター構造 (d) クラスタ4のセンター構造

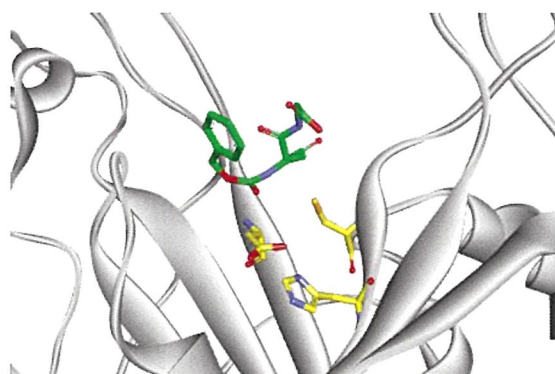


図13 (e) クラスタ6のセンター構造

緑 : CBZGlnGly 黄色 : Cys64、Asp255、His274

表1 各クラスターのセンター構造の SC 間距離とドッキングスコア

クラスター	センター構造の ドッキングスコア順位	SC 間距離 (Å)	ドッキングスコア (kcal/mol)
1	8	3.967	-4.118
2	10	4.087	-4.050
3	31	3.945	-3.545
4	77	3.687	-2.479
6	76	3.505	-2.669

次に、MD 計算結果を示す。横軸に時間 (ps)、縦軸に活性中心からの距離 (SC 間距離) をプロットした。

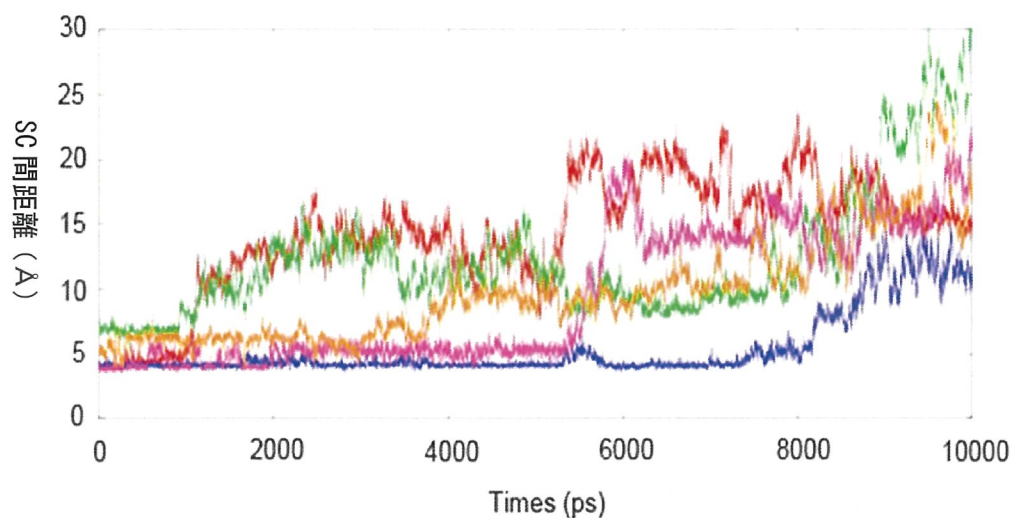


図14 各クラスターの MD トラジェクトリの SC 間距離のプロット図

赤：クラスター1 緑：クラスター2 青：クラスター3
 ピンク：クラスター4 オレンジ：クラスター6

クラスター1、2、4、6のように、計算開始後すぐに活性中心から脱離してい

く場合は、初期構造が不適切であり、クラスター3のように長時間活性中心付近に留まっている場合は、初期構造が適切と評価した。

尚、これらのクラスターのMDトラジェクトリについては、AMBERの MM-GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) 計算により、平均結合エネルギー値も算出した。その結果、クラスター1、2、3、4、6の平均結合エネルギー値は、それぞれ-5.42、-9.25、-16.48、-11.68、-5.30 kcal/molであり、これらのクラスターの中でクラスター3のドッキング構造が最適な構造であることがMM-GBSAの計算結果からも裏付けられた。

3) オキシアニオンホールの発見

そこで、クラスター3の全10000トラジェクトリからオキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基を探索した。CBZGlnGlyのGln残基の側鎖のカルボニル酸素と2か所同時に水素結合するアミノ酸残基を解析した結果、692トラジェクトリで、Cys64とVal65の主鎖アミノ基が水素結合を形成していた。よって、オキシアニオンホールのドナーとなるMTGのアミノ酸残基は、Cys64とVal65の主鎖アミノ基と判断した。これにより、四面体中間体となる直前の状態を再現した構造を構築することに成功した。

このような四面体中間体に近い構造は、ドッキングだけでMTG側を動かさずに得ることは困難であり、MD計算を行うことにより得ることができた。692トラジェクトリのうち、最もSC間距離の短いトラジェクトリNo.105325の構造を図15に示す。

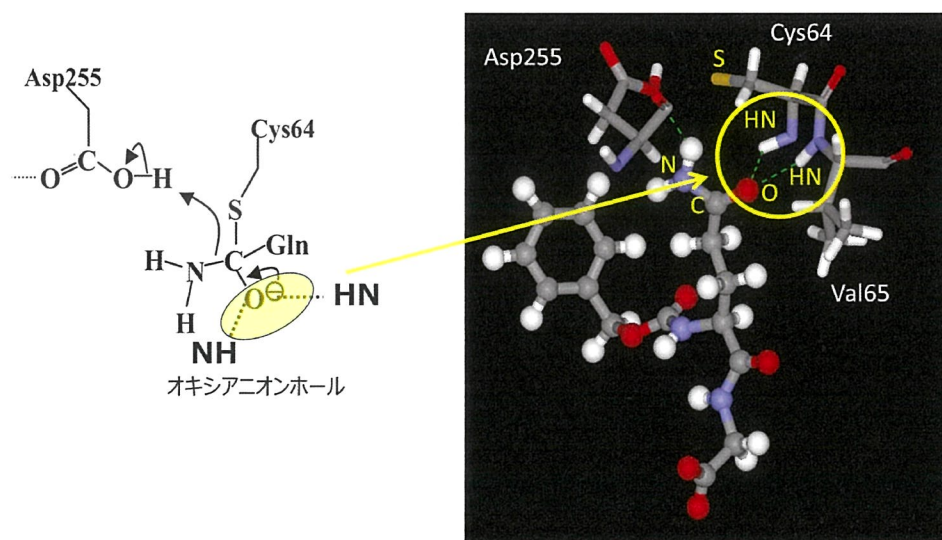


図15 (a) MD計算後、オキシアニオンホールを形成したドッキングモデル
(トラジェクトリ No. 105325)

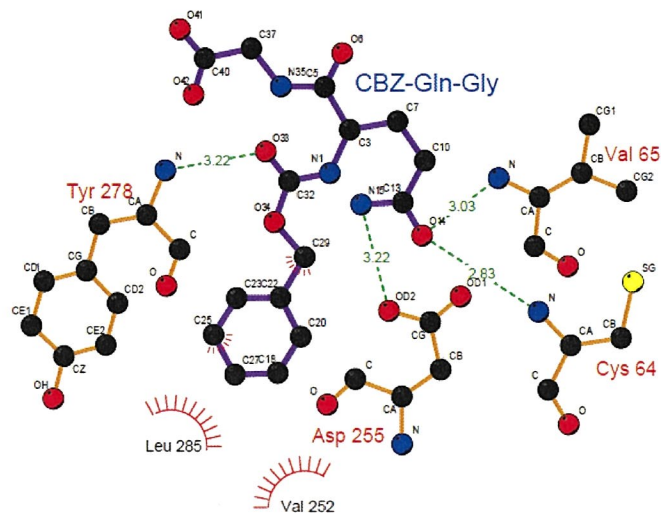


図 15 (b) MD 計算後、オキシアニオンホールを形成したドッキングモデルの 2 次元表示図 (LIGPLOT で描画)

オキシアニオンホールについては、MTG と同様のシステインプロテアーゼであるパパインなどのオキシアニオンホールにほぼ対応する位置にある Asn276 がそれに相当する可能性がある³⁴⁾と推定されていたが、本研究で Asn276 ではなく Val65 と推定された。オキシアニオンホールとなるアミノ酸残基には、一般的に活性中心のアミノ酸残基が含まれているため、Cys64 は妥当であるが、Val65 は大きな発見であった。そこで、Val65 については、Ala 変異体モデルを構築し、MD 計算でその妥当性を検証した。

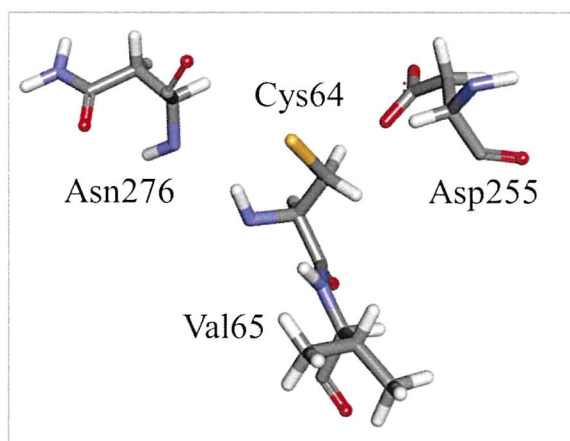


図 15 (c) X 線結晶構造の Asn276 の位置

3.3.3 MD 計算によるオキシアニオンホール Val65 の妥当性の検証

V65A 変異体モデルを作製し、MD 計算を実施した。計算の準備と計算方法は野生型と同様である。野生型と V65A の SC 間距離を比較した結果、野生型は 4 Å 付近に留まっているのに対し、V65A は、1 回目はすぐに離脱し、2 回目は留まっているという異なる結果となった。

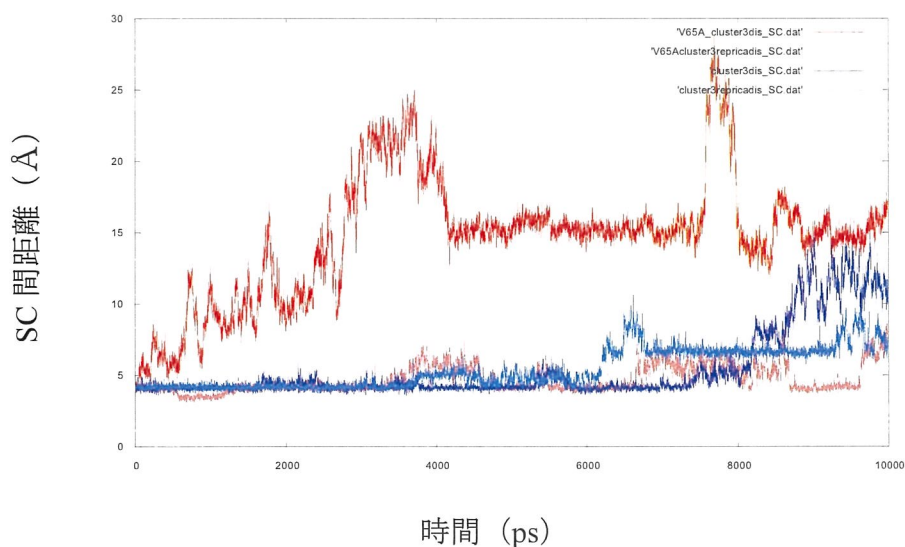


図 16 野生型と V65A の MD トラジェクトリの SC 間距離のプロット図
野生型：青（1回目）、水色（2回目） V65A：赤（1回目）、ピンク（2回目）

次に、両者についてオキシアニオンホールを形成しているトラジェクトリ数を比較した結果、野生型は 692 トラジェクトリ（2 回目は 328 トラジェクトリ）存在したのに対し、V65A は 0 トラジェクトリであった。（ただし 2 回目は 136 トラジェクトリであった。）

表2 オキシアニオンホールを形成しているトラジェクトリ数の比較

	オキシアニオンホールを形成している トラジェクトリ数
野生型 (1回目)	692
野生型 (2回目)	328
V65A (1回目)	0
V65A (2回目)	136

このように、オキシアニオンホールと推定された Val65 を Ala に変異すると、基質を認識することができない、あるいは、認識しても、オキシアニオンホールを形成する確率は低く、酵素反応が進行する確率も低くなった。このことから、Val65 が基質認識に重要であることが MD 計算からも裏付けられた。

3.3.4 ドッキングモデルと基質特異性の考察

ドッキングモデルを観察すると、Val65 のアミノ基は、Val65 の側鎖と Tyr62、Val67、Trp69、Tyr75、Pro76、Tyr25 との疎水性相互作用により適切な位置を保持している。また、CBZGlnGly は MTG の 239–253 残基目と 276–288 残基目のループによって構築されたポケットに位置し、周囲を Tyr62、Val65、Tyr75、Val252、Phe254、Tyr256、Tyr278、Leu285 といった疎水性や芳香族性アミノ酸残基により囲まれている。この結果は、基質の Gln 残基に Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp といった疎水性残基が近接していることが望ましいという MTG の基質特異性の実験結果³⁵⁾とも合致する。

また、MTG がタンパク質を基質とする際、ペプチド鎖がどのように認識されるかという知見はタンパク質改変には非常に重要である。本研究で得られた CBZGlnGly とのドッキングモデルでは、MTG の正面側にペプチド鎖の C 末端側、裏側に N 末端側という向きで入っていることから、基質のタンパク質もこのような向きで認識されると考えられる (図 17 (a))。

酵素反応機構としては、反応の 1 段階目の基質 (抗体等) の Gln 残基が MTG の正面側で認識され、2 段階目の基質である Lys 残基等のアミノ基 (薬物等) が裏側から活性中心へ近接し、架橋反応が進行する、といった一連の反応機構を明確に推定することができた (図 17 (b))。

これは、MTG の全体構造の観察と基質特異性の研究結果からの、MTG の裏側の負電荷に富んだ部分に、Lys 残基等のアミノ基のような正電荷を有する基質が近接し、正面側の疎水性パッチ部分に CBZGlnGly の CBZ 基が近接し、架橋反応が進行するという推察とも合う結果であった。

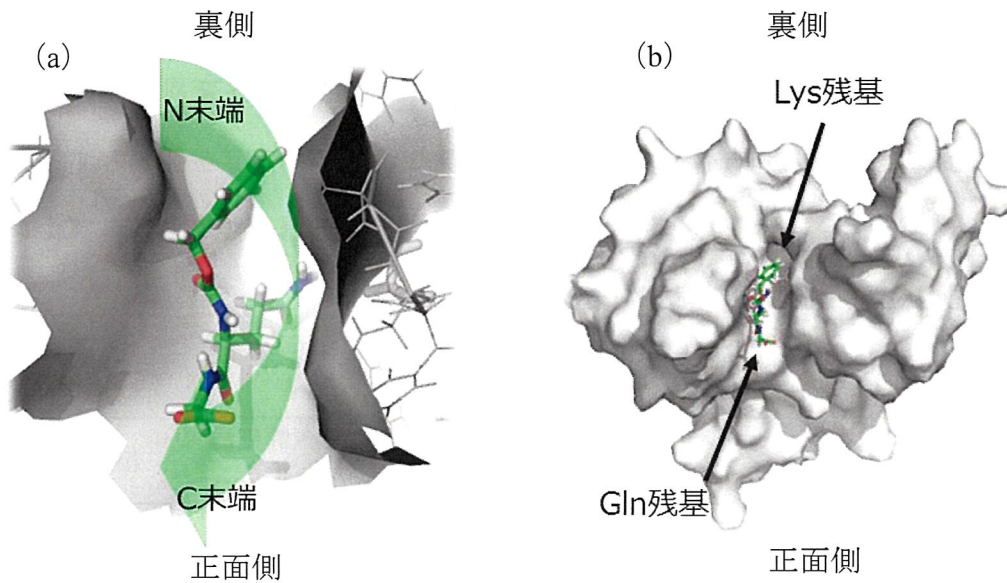


図 17 CBZGlnGly とのドッキングモデルを上から見た図

(a) タンパク質基質の認識される方向

(b) 基質の Gln 残基と Lys 残基が近接する方向

ただし、タンパク質基質の場合は、CBZGlnGly よりも大きいため、CBZGlnGlyが入っているポケットの外側でも基質として認識される可能性が考えられる。そこで、MTG の Ala 変異実験で、本ドッキングモデルの妥当性の確認と共に、タンパク質基質の場合の基質認識について解析した。

3.3.5 変異実験によるドッキングモデルの妥当性検証結果

ドッキングモデルの妥当性を検証するために、MTG の Ala 変異実験結果を行った。その結果を表 3 に示す。CBZGlnGly のようなペプチドを基質とする場合（ヒドロキサメート法）と、タンパク質を基質とする場合（オボアルブミンを使用した NMR 評価法）の両方の結果を示す。

表 3 Ala 変異実験結果

変異体	ヒドロキサメート法 (U/mg)	相対活性 (%)	NMR評価法 ($\times 10^{-3}$ U/mg)	相対活性(%)
野生型	26.3 \pm 0.2	100.0	44.8	100.0
D3A	21.0	80.0	N.D.	N.D.
D4A	25.5	97.0	N.D.	N.D.
R5A	24.4	92.6	N.D.	N.D.
R26A	26.6 \pm 0.6	101.1	8.1	18.0
Y62A	8.5 \pm 1.3	32.2	N.D.	N.D.
G63A	0.0	0.0	N.D.	N.D.
C64A	0.0	0.0	0.2	0.4
V65A	2.6 \pm 0.0	9.8	4.6	10.2
W69A	41.8 \pm 4.3	158.9	N.D.	N.D.
Y75A	31.6 \pm 0.3	120.2	2.4	5.3
N239A	17.9	68.2	N.D.	N.D.
I240A	31.1 \pm 0.1	118.3	30.6	68.3
P241A	31.4 \pm 1.3	119.3	N.D.	N.D.
G250A	20.3 \pm 1.4	77.4	N.D.	N.D.
V252A	7.1 \pm 0.0	26.8	2.7	6.0
N253A	0.3 \pm 0.1	1.1	0.5	1.1
F254A	0.5 \pm 0.1	2.1	N.D.	N.D.
D255A	0.4 \pm 0.4	1.6	0.1	0.2
Y256A	0.7 \pm 0.2	2.8	0.8	1.9
H274A	15.6 \pm 0.8	59.3	4.2	9.3
N276A	2.6 \pm 0.4	9.9	0.8	1.7
H277A	1.0 \pm 0.1	3.7	N.D.	N.D.
Y278A	4.6 \pm 0.4	17.6	1.8	3.9
S284A	24.5 \pm 1.2	93.3	N.D.	N.D.
L285A	28.6 \pm 0.2	108.7	16.5	36.8
E300A	29.9 \pm 0.2	113.7	24.5	54.7
Y302A	40.2 \pm 1.5	152.7	N.D.	N.D.
D304A	16.1 \pm 0.1	61.2	18.4	41.1
F305A	16.2 \pm 0.2	61.6	8.4	18.6

次に、クラスター3の全10000トラジェクトリについて、LIGPLOTで基質と相互作用しているアミノ酸残基と回数を算出し、左軸の相互作用回数順に棒グラフで表示した。相互作用回数とは、各アミノ酸残基のCBZGlnGlyから3.9Å以内に接近した原子の総数である。また、そのアミノ酸残基のAla変異体の野生型に対する相対活性を右軸に取り、プロットした。

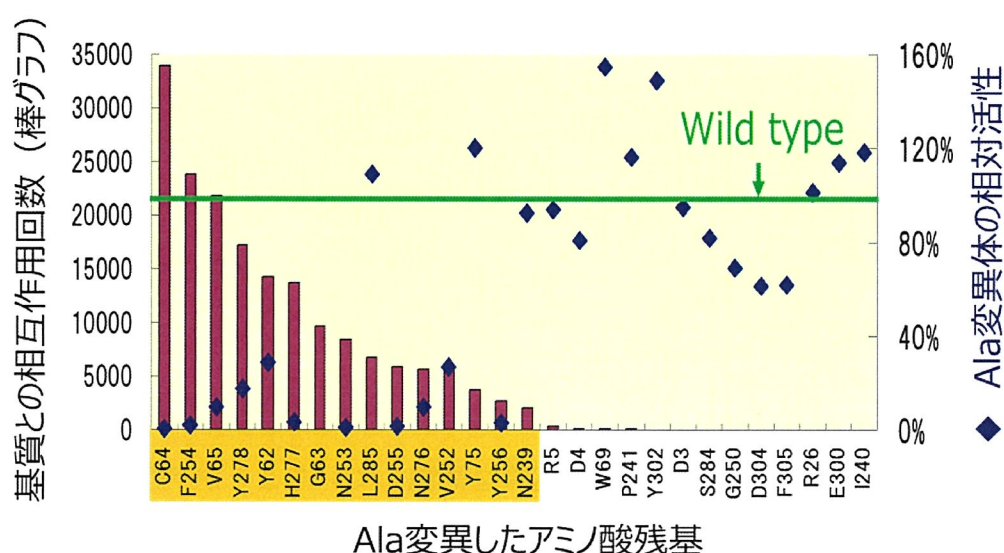


図 18 変異実験によるドッキングモデルの妥当性検証結果

棒グラフ：基質との相互作用回数 ◆：Ala 変異体の相対活性

オレンジ：MD 計算中、1000 回以上相互作用（CBZGlnGly から 3.9Å以内に接近）したアミノ酸残基

オレンジで示した、基質と相互作用している回数が多いアミノ酸残基は、Ala 変異を行うと相対活性が減少する傾向があり、相互作用回数の少ないアミノ酸残基は相対活性が野生型と大きく変わらないという結果が得られ、実験結果との整合性を確認することができた。ただし、Leu285 は、Ala に変異すると活性が

向上している。Leu285 は、活性ポケットの入り口で CBZ 基に近接した位置にあり、Ala になり小さくなることにより、CBZGlnGly が入りやすくなったことが考えられる。

オキシアニオンホール の Val65 の Ala 変異体の活性は低下しているが、消失してはいない。これは、Val65 の主鎖のアミノ基が重要であることから、Ala に変わっても一定の働きを保っていることを示していると思われる。ただし、Val65 の側鎖は周囲の疎水性残基と相互作用していることから、Ala に変異するとその相互作用が減少し、主鎖のアミノ基の位置に影響があり、活性が大きく低下したものと考えられる。MD 計算の結果も、1 回目は 0 であったが 2 回目は 136 トラジェクトリという少ない頻度でオキシアニオンホールを形成しており、本結果とも整合性がある。

また、活性が低下したアミノ酸残基を構造上にオレンジ色で表示した結果 (図 19 (a))、MTG は比較的広い範囲で基質を認識していることが判明した。

更に、MTG はタンパク質も基質とするが、オボアルブミンを基質とした MTG の Ala 変異体の活性評価結果では、Arg26、Tyr75、His274、Leu285、Asp304、Phe305 の Ala 変異体が野生型の半分以下に低下した (表 3)。これらのアミノ酸残基は活性ポケットの外側に広がっており、タンパク質基質の場合は、ペプチド基質の場合よりも広い範囲で認識されていることが判明した (図 19 (b) 黄色部分)。

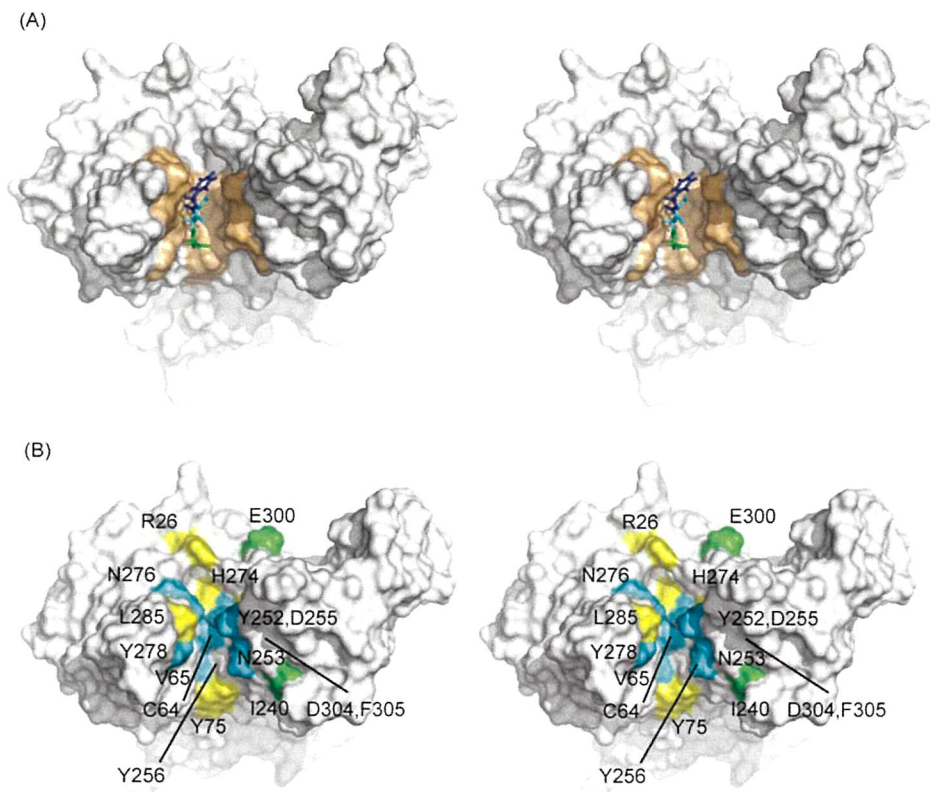


図 19 (a) MTG と CBZGlnGly とのドッキングモデル (ステレオ図)

青 : CBZ 基 水色 : Gln 残基 緑 : Gly 残基

オレンジ : CBZGlnGly と 1000 回以上相互作用した残基

図 19 (b) Ala 変異実験結果を MTG の X 線結晶構造上にマッピングした図
(ステレオ図)

水色 : CBZGlnGly とオボアルブミンの両方で野生型より半分以下に活性が低下したアミノ酸残基 (C64、V65、V252、N253、D255、Y256、N276、Y278)

黄色 : オボアルブミンのみで野生型より半分以下に活性が低下したアミノ酸残基 (R26、Y75、H274、L285、D304、F305)

緑 : 活性が変化しなかったアミノ酸残基 (I240、E300)

3.4 結論

ドッキングと古典力学手法である MD 計算の利用により、MTG と CBZGlnGly とのドッキングモデルを構築した。ドッキングのみでは、オキシアニオンホールを形成している構造を構築できなかったが、MD 計算で、MTG と CBZGlnGly の露わな水分子中での動的挙動を取得することにより、オキシアニオンホールを形成している構造の取得に成功した。

ドッキングモデルより、Cys64 と Val65 の主鎖のアミノ基がオキシアニオンホールを形成する重要なアミノ酸残基であることを推定した。

また、得られたドッキングモデルは、変異実験結果と整合性のある妥当性の高い構造であることを確認した。

これにより、MTG の基質認識機構が解明された。即ち、反応の 1 段階目の基質の Gln 残基が MTG の正面側で認識され、2 段階目の基質である Lys 残基等のアミノ基が裏側から活性中心へ近接し、架橋反応が進行する、といった一連の MTG の反応機構を明確に推定することができた。

また、MTG がバイオ医薬品等のタンパク質を基質とする際、基質タンパク質のペプチド鎖がどのように認識されるかという知見は MTG の改変において非常に重要である。本研究で得られた CBZGlnGly とのドッキングモデルでは、MTG の正面側にペプチド鎖の C 末端側、裏側に N 末端側という向きで入っていることから、基質のタンパク質もこのような向きで認識されると考えられる。これは、MTG の全体構造の観察と基質特異性の研究結果からの、MTG の裏側の負電荷に富んだ部分に、Lys 残基等のアミノ基のような正電荷を有する基質が近接し、正面側の疎水性パッチ部分に CBZGlnGly の CBZ 基が近接し、架橋反応が進行するという推察とも合う結果であった。

以上のように、本結果は、将来、抗体と薬物、あるいはタンパク質医薬品と PEG の架橋反応といったバイオ医薬品の創出を MTG で制御することを目指す際に、重要な情報として役立つことは間違いないであろう。

4 研究事例2 FABP4 とその阻害剤の相互作用解析

4.1 背景と目的

4.1.1 FABP4 について

FABP4 (別名 aP2、A-FABP) は、少なくとも 9 種類の分子種が知られている脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein) の一つである。脂肪細胞と活性化マクロファージに特異的に発現し、主として細胞質内での脂肪酸輸送を担っている^{18,44)}。

FABP4 欠損マウスはインスリン抵抗性が改善し、動脈硬化が抑制される等、糖尿病や動脈硬化症への FABP4 の関与が報告されている^{19,20)}。近年、structure-based drug design でいくつかの FABP4 阻害剤が報告されているが⁴⁴⁻⁴⁹⁾、更なる高活性化が望まれている。

そこで、高活性化阻害剤設計に必要な相互作用を明らかにし、更なる高活性化への知見を得ることを目的とし、X 線結晶構造解析と計算科学を使用して解析を行った。

FABP4 と数種の化合物との複合体結晶構造は決定されており^{46,51,52)}、リガンド結合部位への内在性リガンドや低分子阻害剤との結合様式は報告されている (図 20)⁵³⁻⁶⁰⁾。これらの結果から、一般的に、リガンドは FABP4 の内部のポケットに結合

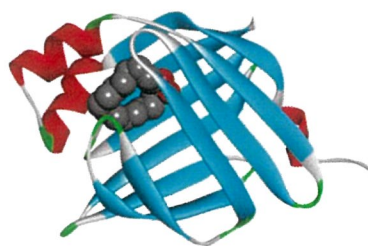


図 20 FABP4 とパルミチン酸の複合体 X 線結晶構造 (2HNX)

し、FABP4 の Arg126 と Tyr128 の側鎖とリガンドのカルボン酸との間に静電相互作用を有していることが明らかにされている。更に、また、これらの阻害剤では、 CO_2^- や SO_3^- や PO_3^- といったマイナス電荷を持つ置換基の重要性も報告されている⁶¹⁾。

4.1.2 FABP4 阻害剤について

FABP4 と阻害剤の相互作用解析には、当社で決定した複合体 X 線結晶構造を使用した。決定された FABP4 と 29 種の FABP4 阻害剤の複合体構造のうち、最高活性化化合物 compound 1 を含む 4 種⁶²⁾ (compound 1、compound 2、compound 3、compound 4) の複合体構造を選択し、解析した。これら 4 種は、構造の類似性が高いにもかかわらず、活性に差があるためである。

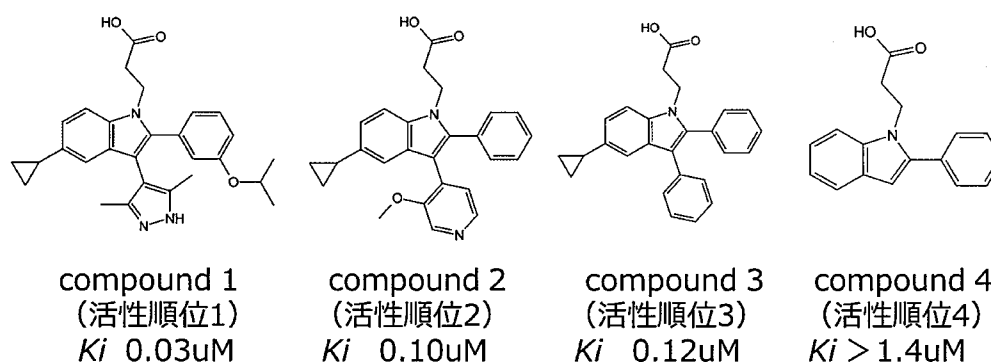


図 21 相互作用解析に用いた FABP4 阻害剤

特に、compound 1 と compound 2 については、compound 1 の方が、compound 2 よりも 3 倍程度阻害活性が高い (図 21) が、その理由を明らかにすることで、更なる高活性化阻害剤の創出につなげる知見を得る必要があった。

4.1.3 計算手法について

古典力学を利用した MM-GBSA⁴³⁾ 法は、タンパク質と化合物との相互作用エネルギー値を算出する一般的な方法である。精度もよく、非常によい相互作用エネルギー値算出方法であるが、エネルギー値の内訳（静電相互作用エネルギー値や分散力によるエネルギー値等）を数値として算出することは不可能である。特に、酵素改変やリガンドデザインをする際は、どのアミノ酸残基とどのくらいの強度でどのような相互作用の種類で相互作用しているかといった、詳細な情報があることが望ましいため、このような情報を得たい場合は FMO 計算が有用といえる。

そこで、特に高活性な 2 化合物 (compound 1 と compound 2) の解析に焦点を当てながら、4 つの化合物と FABP4 との複合体の FMO 計算を実施した。

4.1.4 阻害剤の創出の経緯と本研究の位置づけ

これらの阻害剤の創出の経緯と本研究の位置づけを簡単に示しておく。

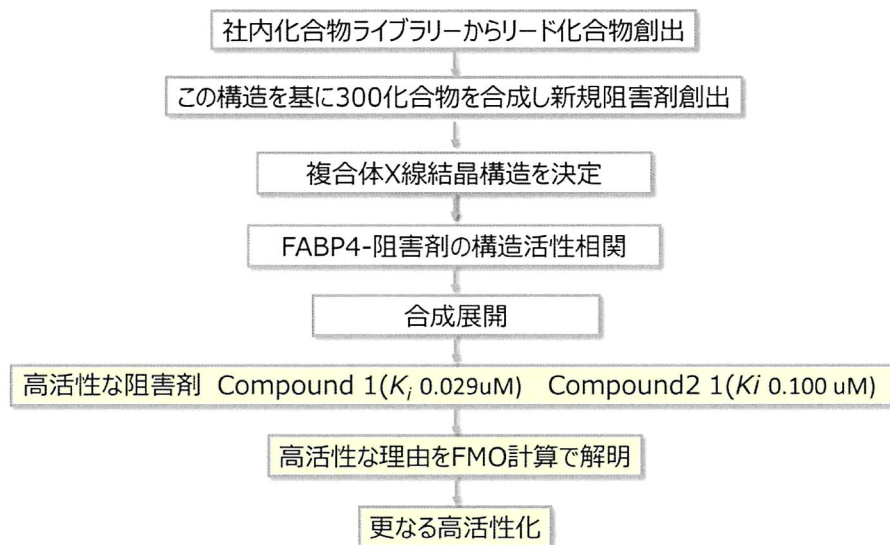


図 22 高活性阻害剤 compound 1、2 創出の経緯と、本研究の位置づけ

既知の FABP4 阻害剤やそれらと FABP4 の共結晶構造の情報を利用して、社内化合物ライブラリーからリード化合物を見出した。この構造を基に 300 化合物を設計し、FABP4 阻害活性を評価し、新規な FABP4 阻害剤を見出した。

本研究の目的は、図 22 の黄色部分、即ち、高活性な compound 1 と compound 2 が創出された後、その相互作用を FMO 計算で詳細に解明することにより、更なる高活性化のための情報を得ることである。

4.2 方法

4.2.1 FMO 計算に使用する立体構造の準備

FABP4 と阻害剤の相互作用解析には、当社で決定した複合体 X 線結晶構造を使用した。

FMO 計算を実施する前に、FMO 計算に適した構造を準備する必要がある。全ての作業は Maestro (Schrödinger 社) で実施した。

まず、4 つの阻害剤と FABP4 との複合体の X 線結晶構造より水分子を削除した。理由は、水分子が阻害剤と FABP4 の相互作用に露わに関与していなかったことと、水分子を入れることにより FMO 計算結果が過剰な影響を受けることを回避するためである。

次に、X 線結晶構造で得られたタンパク質構造には水素原子が存在しないため、Maestro の Protein Preparation を用いて水素原子を付加し、さらにその水素のみ構造最適化計算 (minimization) を行った。pH は 7.0 ± 2.0 に設定し、その他のパラメータは標準の設定値のまま使用した。

4.2.2 FMO 計算方法

FMO 計算は、みずほ情報総研の MIZUHO/BioStation 3.0 に実装されている MIZUHO/ABINIT-MP を使用した。インプットファイルの作成から解析までの一連の作業は MIZUHO/BioStation Viewer を使用して行った。

まず、タンパク質を BioStation Viewer の Generate Fragments/Auto/Generate

Fragments モジュールを使用して1アミノ酸単位でフラグメント化した。この際、図1に示したように、アミド結合を切断して分割するのではなく、 sp^3 炭素を含むC-C単結合を切断して分割するため、主鎖のカルボニル酸素はフラグメント番号の方がアミノ酸残基番号より1大きくなる。例を図23に示す。

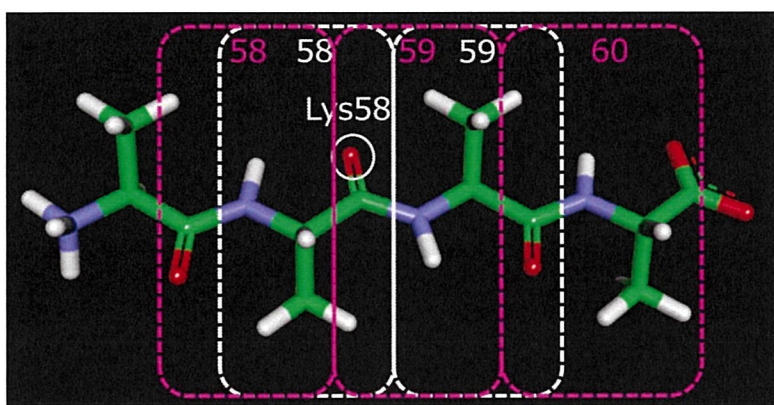


図23 フラグメント番号とアミノ酸残基番号のずれ

白：アミノ酸残基番号（アミド結合で切断）

ピンク：フラグメント番号（C-C結合で切断）

Lys58のカルボニル酸素はフラグメント59となる。

次に、各阻害剤をフラグメントに分割した。解析対象の4つの阻害剤は、共通してカルボン酸を有しておりFABP4への結合位置も同じである。カルボン酸とFABP4との相互作用は非常に強く、FMO計算では、電荷的な相互作用が非常に強く算出されるため、他の相互作用エネルギーが埋もれてしまう可能性がある。そこで、その他の部分の構造と活性との相関を解析しやすくするため、カルボン酸以外の部分の相互作用の違いを解析することとした。通常、共有結合を切断するようなフラグメント分割を行う場合、 sp^3 炭素原子の箇所を切断する。（この炭素原子のことをBDA（bond-detached Atom）と呼ぶ）。この時、結

合を形成している電子対は、切断部の sp^3 炭素原子ではない方のフラグメントに分配される (図 24)。

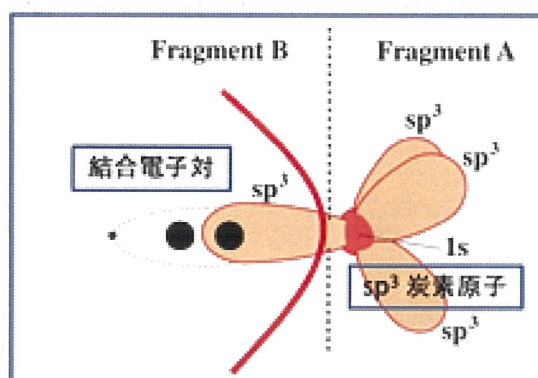


図 24 フラグメントの分割方法

http://www1.gifu-u.ac.jp/~ceid/homepage-calc/calc_example00.html より

そこで、図 25 のように、1 か所で切断し、カルボン酸を含むフラグメントとそれ以外のフラグメントに分割した。カルボン酸側のフラグメントの CH_2 の C を BDA、残りのフラグメントの CH_2 の C を BAA (bond-attached atom) とした。カルボン酸側ではない切断部分の炭素原子の Formal Charge は -1 、カルボン酸側の切断部分の炭素原子の Formal Charge は $+1$ 電荷であるが、 COO^- があるため、カルボン酸を含むフラグメントの Formal charge は 0 とした。

尚、化合物をこのようにフラグメント化して図 25 の下の部分の IFIE を計算することは、FMO 計算の中で、フラグメントペア (ダイマー) 計算で化合物全体の計算をしていることから化合物全体も考慮されており、妥当である。また、図 25 の下の部分が -1 電荷になることについても、BDA から BAA に電子を渡す (形式電荷を一つ減らす) 際には、核電荷も 1 つ渡して調整していることから、分割したフラグメントの実際の電荷が大きく変わることはない。微小な誤差は

あるが、フラグメント分割の誤差の範囲内と考えてよい⁶³⁾。

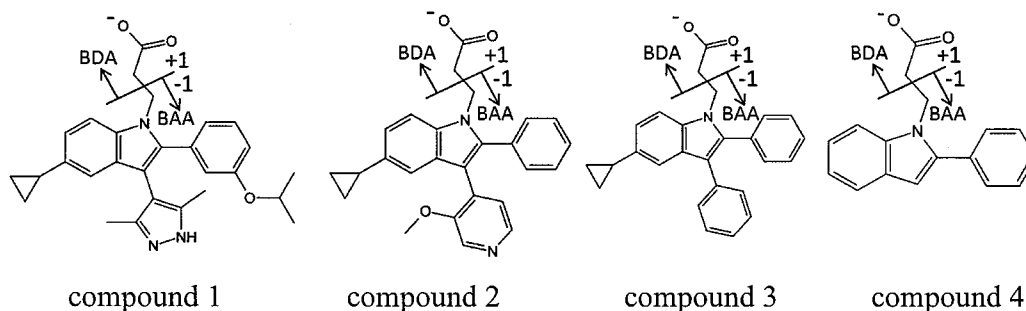


図 25 各阻害剤のフラグメント分割方法

FMO 計算には、Hartree-Fock 法では記述のできない分散力の効果を考慮することが可能な MP2 計算⁶⁴⁻⁶⁶⁾ を選択した。Hartree-Fock 法では、1 電子に近似して計算を行うが、実際は複数の電子が相互作用をしていることから、電子間の相関をも含めて計算をする必要があり、それを考慮した計算方法が MP2 計算である。計算パラメータは図 26 に記した。

プログラム : MIZUHO/BioStation 3.0
Method : MP2
FMO Level : FMO2
Basis set : 6-31G
ABINIT-MP Input file : Version 4
CPFVER=4.201

図 26 FMO 計算のパラメータ

4.2.3 FMO 計算結果の解析方法

BioStation Viewer のフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE) の可視化・解析機能を使用し、阻害剤と FABP4 の各アミノ酸フラグメントとの IFIE を算出した。まず、IFIE の合計値と活性との相関を解析した。次に、各阻害剤について相互作用をしているアミノ酸や相互作用エネルギー値を解析し、活性の根拠を構造から解析した。

4.2.4 MM-GBSA 法による結合エネルギー値の算出方法

Maestro9.7 (Schrödinger 社) の Prime を使用し、FMO 法 (量子力学) だけでなく、古典力学を使用した MM-GBSA 法でも、FABP4 と各阻害剤との結合エネルギーを算出した。

4.3 結果と考察

4.3.1 FABP4 と各阻害剤との複合体 X 線結晶構造解析結果

図 27 に、FABP4 と compound 1~4 の複合体 X 線結晶構造を示した。

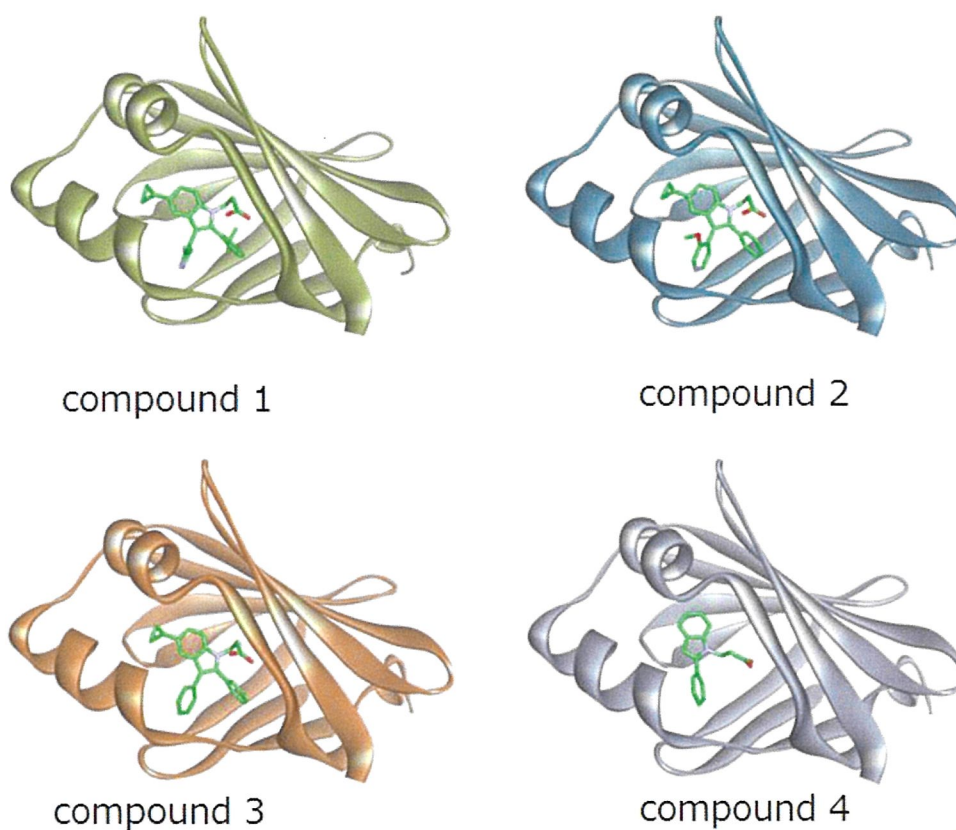


図 27 FABP4 と compound 1~4 の複合体 X 線結晶構造

図 28 に X 線結晶構造より、FABP4 と各阻害剤との相互作用を 2 次元で表示した。

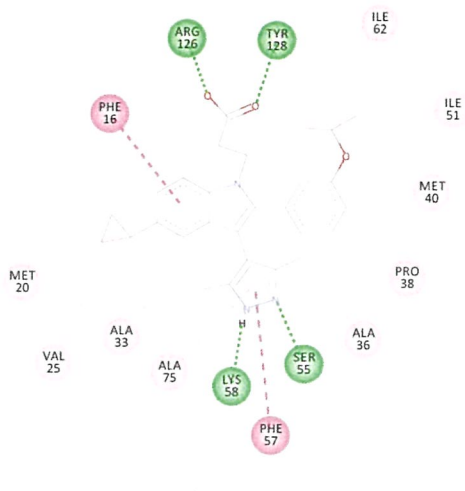


図 28 (a) compound 1 の相互作用

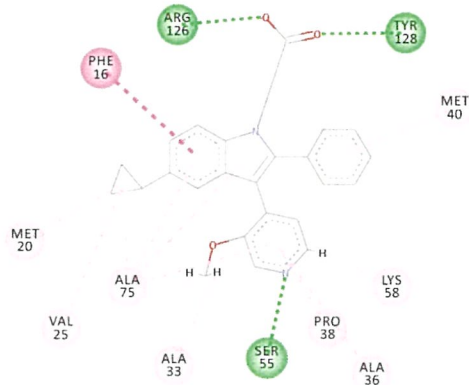


図 28 (b) compound 2 の相互作用

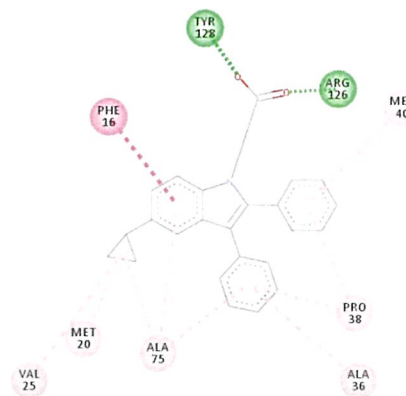


図 28 (c) compound 3 の相互作用

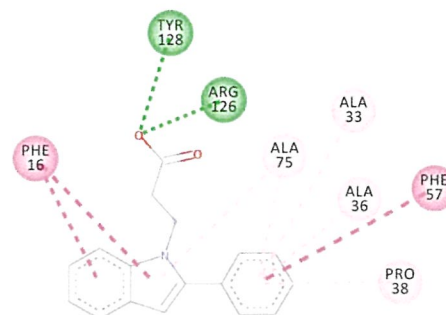


図 28 (d) compound 4 の相互作用

図 28 compounds 1 (a)、2 (b)、3 (c)、4 (d) の相互作用の 2 次元表示図

(Discovery Studio 4.5 (Dassault Systemes Biovia 社) を使用。

緑 : 水素結合 ピンク : 水素結合以外 (Pi-alkyl、Pi-Pi T-shaped、alkyl、
CH...O hydrogen bonds⁶⁷⁾)

尚、図中の compound 2 と compound 3 のカルボン酸の結合したアルキル鎖の炭素数は compound 1 と同様 2 炭素である。

compound 3 と compound 4 は相互作用の少なさから活性が低いことが目視にて容易に認識可能である。

一方、compound 1 と compound 2 については、例えば、両者の異なる部分である、compound 1 のピラゾール環は、Ser55、Lys58 と水素結合、それ以外に Ala36、Pro38、Phe57、Ala75 と相互作用が観察されており、compound 2 の 2-メトキシピリジン部位は、Ser55 との水素結合以外に、Ala33、Ala36、Pro38、Lys58、Ala75 との相互作用が観察されている。しかしながら、これらの水素結合や疎水性相互作用の数からは、compound 1 の方が高活性である理由を定量的に説明することは不可能である。

そこで、FMO 計算で相互作用エネルギー値を算出し、定量的に比較することを試みた。

4.3.2 FABP4 と阻害剤との相互作用エネルギー値と活性値との相関解析結果

まず、IFIE の用語の使い分けについて明記する。

- A) IFIE : アミノ酸残基ごとの阻害剤との相互作用エネルギー値 (静電エネルギー (ES)、反発エネルギー (EX)、電荷移動エネルギー (CT)、分極エネルギー (PL)、分散力エネルギー (DI))
- B) Total IFIE : アミノ酸残基ごとの阻害剤との各相互作用エネルギー値の合計値 (A の合計値)
- C) IFIEsum : タンパク質全体と阻害剤との相互作用エネルギー値 (全アミノ酸残基の Total IFIE 合計値=B の合計値)

表 4 に 4 種の阻害剤の FABP4 との相互作用エネルギーの合計値 (IFIE sum) と活性値 (K_i) と、その相関係数を示した。

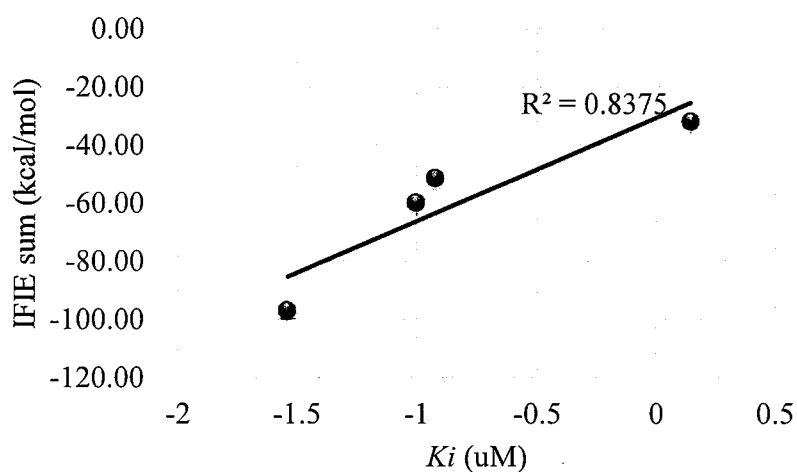
compound 1 が最も高く、次に compound 2、compound 3 の順で、compound 4 はほとんど活性がない。

表 4 (a) 4 種の阻害剤と FABP4 との相互作用エネルギー値 (IFIE sum) と活性値 (K_i)

compound	K_i (μM)	IFIE sum (kcal/mol)	ES (kcal/mol)	EX (kcal/mol)	CT+mix (kcal/mol)	DI (kcal/mol)
1	0.03	-97.06	-88.43	103.78	-43.13	-69.28
2	0.10	-59.84	-53.88	90.60	-29.28	-67.28
3	0.12	-51.29	-26.56	49.28	-18.64	-55.36
4	>1.4	-31.80	-10.51	26.23	-13.28	-34.23

ES:静電エネルギー、EX:反発エネルギー、CT:電荷移動エネルギー、
DI:分散力エネルギー

表 4 (b) 4 種の阻害剤と FABP4 との相互作用エネルギー値 (IFIE sum) と活性値 (K_i) との相関係数



K_i と IFIE sum とは、相関が得られ、 $\log K_i$ と IFIE sum との相関係数は 0.8375 と高かった。尚、compound 4 は K_i が 1.4 μM 以上であるため、compound 4 を除くと相関係数は 0.997 である。

このことから、初めて compound 1 が compound 2 よりも活性が高いことが FMO 計算で得られた相互作用エネルギー値より説明できた。

4.3.3 各阻害剤と FABP4 のアミノ酸残基との相互作用解析結果

次に、どのアミノ酸残基との相互作用が重要であったかを解析した。各阻害剤と各アミノ酸残基との相互作用エネルギー合計値 (Total IFIE) をグラフに表示した (図 29)。横軸がフラグメント番号 (≒アミノ酸残基番号)、縦軸は相互作用エネルギー合計値であり、マイナスであるほど、相互作用が強いことを示している。特に、相互作用エネルギー値の低い (相互作用の強い) アミノ酸残基に着目して解析を行った。

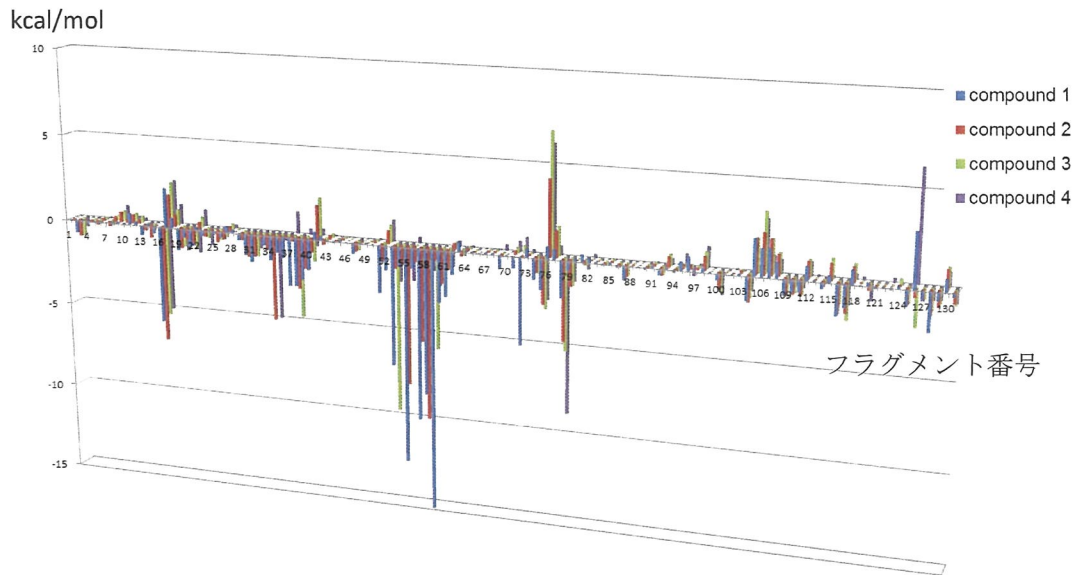


図 29 各阻害剤と各アミノ酸残基との相互作用エネルギー合計値
(Total IFIE)

相互作用エネルギー値の低いアミノ酸残基、即ち、阻害剤との相互作用が強いアミノ酸残基は、50-65 残基目に集中しているため、その周辺を拡大して表示した (図 30)。

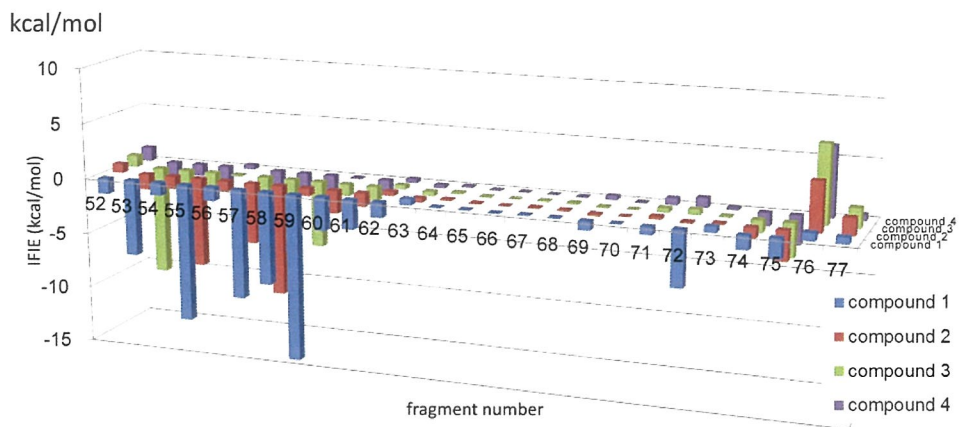


図 30 FABP4 と阻害剤の Total IFIE (活性部位の拡大図)

4.3.4 compound 1 の相互作用解析結果

compound 1 は強い相互作用が多く観測されており（フラグメント 53、55、57、58、59、72）、このことが、compound 1 が最も高活性な理由と言える。compound 1 は Ser55 の側鎖の酸素原子と Lys58 の主鎖と水素結合を形成しており（図 31 (a)）、その IFIE はそれぞれ -12.33 kcal/mol と -14.96 kcal/mol で最小であった（表 6 (a)）。

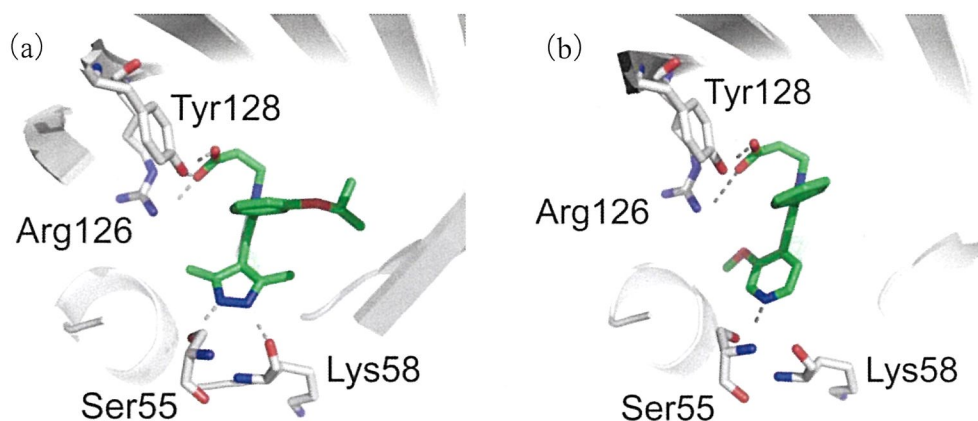


図 31 (a) FABP4 と compound 1 の X 線結晶構造 (PDB ID 5D48)

(b) FABP4 と compound 2 の X 線結晶構造 (PDB ID 5D47)

Lys58 との水素結合は既に Pimozide とのドッキングモデルから推定されていたが⁶⁸⁾、X 線結晶構造解析と FMO 計算で初めてその重要性が実証された。

Phe57 もまた、 π - π 相互作用が観測されていたが（図 28 (a)）その強さは不明であった。Phe57 の IFIE は -9.79 kcal/mol であり、Ser55 と Lys58 に次ぐ強い相互作用であることが分かった。

更に、フラグメント 76 (Asp76) は、全ての Total IFIE の中で最もプラスの

値が大きく、斥力が大きい (図 30)。その Asp76 の Total IFIE の中で、compound 1 の斥力は他の阻害剤に比べて最も小さい。X 線結晶構造では、compound 1 で Asp76 に近い部分はシクロプロパン部分であり、compound 1 と 2 と 3 で共通した部分構造である (図 32)。これらのシクロプロパンの位置を比較すると、compound 1 のシクロプロパンと Asp76 との距離 (2.521 Å) が compound 2 (2.090 Å) と compound 3 (2.072 Å) よりも 0.4 Å 以上長い。compound 1 は Ser55 と Lys58 との水素結合で固定されることによりこの距離が長くなり、斥力が最も小さくなったものと考えられる。

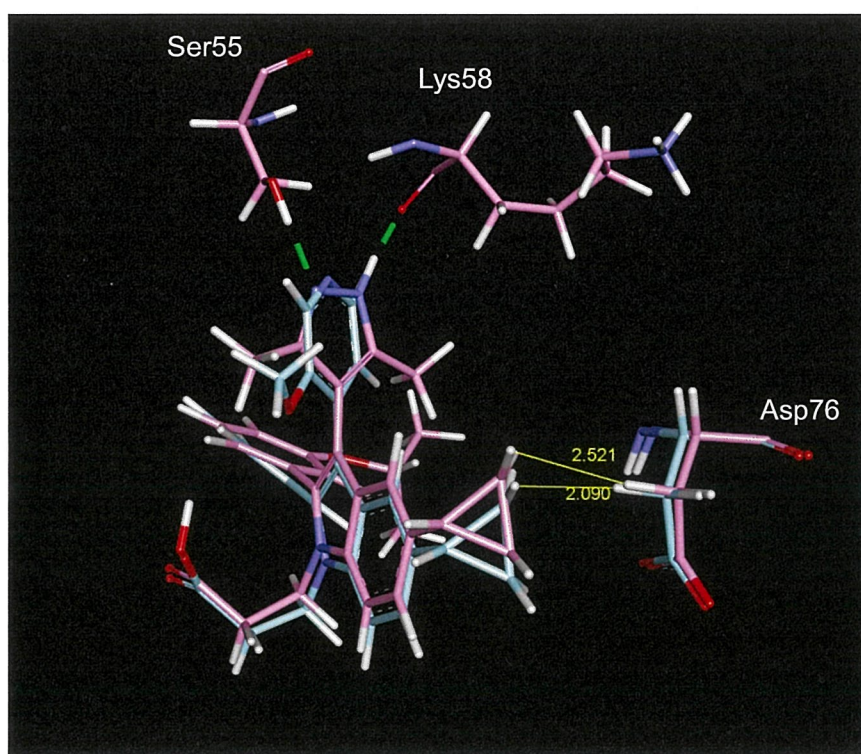


図 32 FABP4 の Asp76 近傍の compound 1 と compound 2 の位置比較

ピンク : FABP4 と compound 1 との複合体 X 線結晶構造

水色 : FABP4 と compound 2 との複合体 X 線結晶構造

緑点線 : 水素結合

尚、極めて小さな差異を議論しているが、解析に使用した X 線結晶構造の分解能は、表 5 に示したように十分小さく、また、Asp76 の温度因子 (B-factor) も十分に小さいことから揺らぎも小さい、信頼性の高い構造を基に議論していることを付け加えておく。

表 5 各阻害剤との複合体 X 線結晶構造の PDB コード、分解能、及び Asp76 の温度因子 (B-factor)

	PDBcode	Resolution (Å)	Asp76 の B-factor
compound 1	5D48	1.81	28.78
compound 2	5D47	1.70	17.84
compound 3	5D45	1.65	17.06
compound 4	5D4A	1.70	21.36

4.3.5 compound 2 の相互作用解析結果

一方、compound 2 については、X 線結晶構造からは認識されていない強い相互作用が 2 つ FMO 計算で確認された。1 つは、Lys58 との相互作用である。

compound 2 は Ser55 との水素結合が観測されており (図 28 (b)、図 33) その IFIE は -7.93 kcal/mol である。

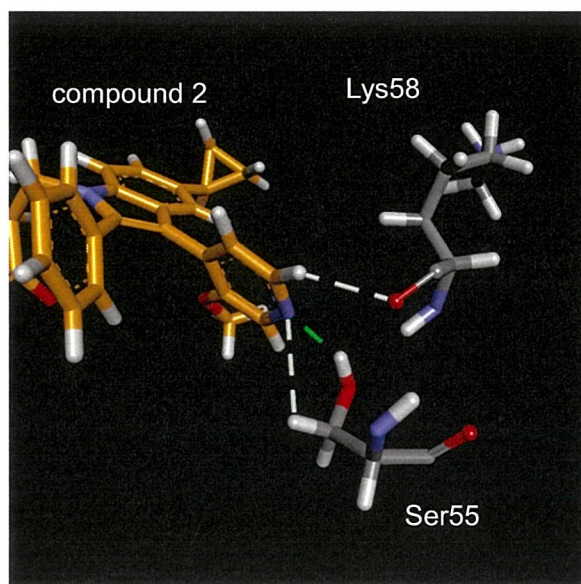


図 33 compound 2 と Ser55 と Lys58 の相互作用

(緑点線：水素結合 薄緑点線：CH...O 水素結合)

しかしながら、その IFIE よりも更に小さく、最も相互作用が強いのはフラグメント 58 (Lys58) との IFIE で -9.83 kcal/mol であった (表 6 (b))。このフラグメント 58 の IFIE の内訳を解析すると、ES (静電) エネルギーが -7.30 kcal/mol と、大きい。これは Lys58 のアミノ酸残基全体の正電荷に由来する強い相互作用によるものと考えられる。X 線結晶構造の観察では、Lys58 との相互作用は、Lys58 の主鎖の酸素原子と compound 2 の炭素に結合した水素との弱い CH...O 水素結合⁶⁶⁾ と認識されており (図 28 (b)、図 33)、強い相互作用があることは確認できない。このように、compound 2 は、Ser55 よりも Lys58 と大きな相互作用があることが、FMO 計算で Lys 残基全体の電荷を考慮した計算をすることにより、初めて確認することができた。

もう 1 つは、Phe57 である。フラグメント 57 (Phe57) の IFIE も -5.39 kcal/mol と大きい (図 30) が、X 線結晶構造の観察では何も相互作用が観測さ

れていない (図 28 (b))。フラグメント 57 (Phe57) の IFIE の内訳を見てみると、メインコンポーネントは DI (分散力) エネルギー (-3.62 kcal/mol) であることがわかる (表 6 (b))。FMO 計算では、相互作用エネルギーを電子状態に基づいて計算するため、分散力のような古典力学の原子間の距離や角度等で表現が困難な相互作用も見出すことが可能である。

このように、compound 1 と compound 2 の構造活性相関 (SAR) は、FMO 計算で得られる相互作用エネルギー値により説明することができた。この結果から、Lys58 との相互作用が、強い FABP4 阻害剤に重要である可能性が示唆された。

4.3.6 compound 3 の相互作用解析結果

compound 3 でも、古典力学では確認不可能な、量子力学計算である FMO 計算でのみ確認することができた相互作用が Ser53 との間で確認できたので示す。

compound 3 はフラグメント 53 (Ser53) と最も強い IFIE (-9.64 kcal/mol、表 6 (c)、図 29 緑の棒グラフ) が確認されているが、X 線結晶構造では Ser53 とは何も相互作用が確認されていない (図 28 (c)、図 33)。compound 3 と Ser53 との IFIE の内訳を解析すると、DI (分散力) エネルギーがメインコンポーネントで -6.04 kcal/mol と大きいことが分かる (表 6 (c))。分散力による相互作用は X 線結晶構造の原子間の距離や角度からは認識することは困難であるが、FMO 計算では算出することが可能であり、Ser53 との相互作用が大きいことを FMO 計算により初めて確認した。

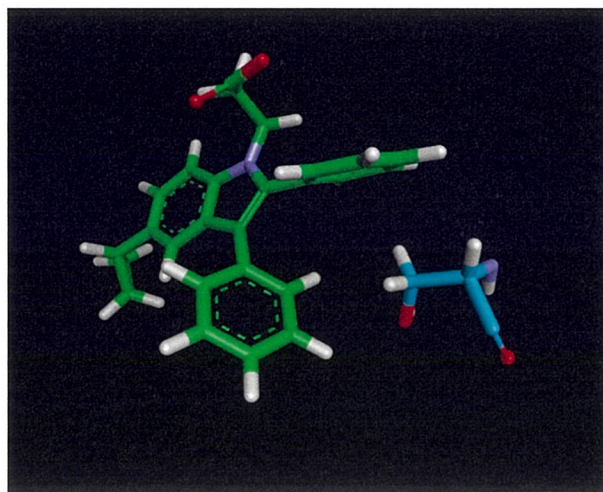


図 33 compound 3 (緑) と Ser53 (水色)

4.3.7 各阻害剤と FABP4 のアミノ酸残基との IFIE 値の一覧

最後に各阻害剤と FABP4 のアミノ酸残基との IFIE 値をまとめた表を示す。

表 6 (a) compound 1 と各アミノ酸残基との IFIE

フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component	フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component
1	CYS1	-0.071	-0.071	0.000	0.000	0.000	ES	66	LEU66	-0.035	-0.035	0.000	0.000	0.000	ES
2	ASP2	-0.721	-0.721	0.000	0.000	0.000	ES	67	GLY67	0.085	0.085	0.000	0.000	0.000	ES
3	ALA3	0.051	0.051	0.000	0.000	0.000	ES	68	GLN68	0.069	0.069	0.000	0.000	0.000	ES
4	PHE4	-0.071	-0.071	0.000	0.000	0.000	ES	69	GLU69	-0.768	-0.768	0.000	0.000	0.000	ES
5	VAL5	-0.050	-0.050	0.000	0.000	0.000	ES	70	PHE70	0.028	0.028	0.000	0.000	0.000	ES
6	GLY6	0.033	0.033	0.000	0.000	0.000	ES	71	ASP71	-0.663	-0.663	0.000	0.000	0.000	ES
7	THR7	-0.058	-0.058	0.000	0.000	0.000	ES	72	GLU72	-4.937	-4.367	0.013	-0.277	-0.307	ES
8	TRP8	0.059	0.059	0.000	0.000	0.000	ES	73	VAL73	0.485	0.485	0.000	0.000	0.000	ES
9	LYS9	0.087	0.087	0.000	0.000	0.000	ES	74	THR74	-1.203	-0.916	-0.001	-0.031	-0.255	ES
10	LEU10	0.054	0.054	0.000	0.000	0.000	ES	75	ALA75	-1.735	-0.652	2.897	-1.049	-2.931	DI
11	VAL11	0.649	0.649	0.000	0.000	0.000	ES	76	ASP76	0.691	2.101	3.552	-1.558	-3.404	EX
12	SER12	0.184	0.184	0.000	0.000	0.000	ES	77	ASP77	0.566	0.764	0.026	-0.026	-0.197	ES
13	SER13	-0.565	-0.565	0.000	0.000	0.000	ES	78	ARG78	-2.070	-1.493	0.039	-0.148	-0.467	ES
14	GLU14	0.087	0.087	0.000	0.000	0.000	ES	79	LYS79	-0.504	-0.504	0.000	0.000	0.000	ES
15	ASN15	-0.409	-0.409	0.000	0.000	0.000	ES	80	VAL80	0.137	0.137	0.000	0.000	0.000	ES
16	PHE16	-5.582	-2.578	3.046	-1.347	-4.703	DI	81	LYS81	0.404	0.404	0.000	0.000	0.000	ES
17	ASP17	2.273	2.273	0.000	0.000	0.000	ES	82	SER82	0.208	0.208	0.000	0.000	0.000	ES
18	ASP18	0.572	0.572	0.000	0.000	0.000	ES	83	THR83	0.062	0.062	0.000	0.000	0.000	ES
19	TYR19	-1.267	-0.316	0.348	-0.237	-1.063	DI	84	ILE84	-0.091	-0.091	0.000	0.000	0.000	ES
20	MET20	-0.511	-1.549	5.518	-1.692	-2.787	EX	85	THR85	0.103	0.103	0.000	0.000	0.000	ES
21	LYS21	-1.054	-1.007	-0.001	-0.004	-0.042	ES	86	LEU86	-0.126	-0.126	0.000	0.000	0.000	ES
22	GLU22	0.149	0.149	0.000	0.000	0.000	ES	87	ASP87	-0.789	-0.789	0.000	0.000	0.000	ES
23	VAL23	-0.319	-0.163	-0.001	-0.010	-0.146	ES	88	GLY88	-0.035	-0.035	0.000	0.000	0.000	ES
24	GLY24	-0.095	-0.095	0.000	0.000	0.000	ES	89	GLY89	-0.003	-0.003	0.000	0.000	0.000	ES
25	VAL25	-0.143	-0.623	2.626	-0.594	-1.552	EX	90	VAL90	-0.114	-0.114	0.000	0.000	0.000	ES
26	GLY26	-0.315	-0.284	-0.001	-0.005	-0.025	ES	91	LEU91	0.102	0.102	0.000	0.000	0.000	ES
27	PHE27	0.356	0.356	0.000	0.000	0.000	ES	92	VAL92	-0.350	-0.350	0.000	0.000	0.000	ES
28	ALA28	0.173	0.173	0.000	0.000	0.000	ES	93	HIS93	0.044	0.370	0.012	-0.074	-0.265	ES
29	THR29	-0.388	0.025	0.146	-0.091	-0.468	DI	94	VAL94	-0.140	-0.140	0.000	0.000	0.000	ES
30	ARG30	-1.202	-1.007	0.000	-0.041	-0.155	ES	95	GLN95	0.482	0.482	0.000	0.000	0.000	ES
31	LYS31	-1.592	-1.592	0.000	0.000	0.000	ES	96	LYS96	0.769	0.769	0.000	0.000	0.000	ES
32	VAL32	-0.092	-0.092	0.000	0.000	0.000	ES	97	TRP97	-0.037	-0.037	0.000	0.000	0.000	ES
33	ALA33	-0.573	0.744	0.410	-0.406	-1.322	DI	98	ASP98	0.225	0.225	0.000	0.000	0.000	ES
34	GLY34	-1.393	-0.296	0.134	-0.546	-0.684	DI	99	GLY99	0.032	0.032	0.000	0.000	0.000	ES
35	MET35	-0.936	-0.936	0.000	0.000	0.000	ES	100	LYS100	-0.356	-0.356	0.000	0.000	0.000	ES
36	ALA36	-1.200	-0.844	1.026	-0.390	-0.992	EX	101	SER101	-0.033	-0.033	0.000	0.000	0.000	ES
37	LYS37	-2.780	-2.589	0.002	-0.058	-0.135	ES	102	THR102	-0.024	-0.024	0.000	0.000	0.000	ES
38	PRO38	-2.762	-0.220	2.633	-1.280	-3.895	DI	103	THR103	0.077	0.077	0.000	0.000	0.000	ES
39	ASN39	-2.364	-2.066	0.000	-0.043	-0.255	ES	104	ILE104	-1.299	-0.546	0.538	-0.176	-1.116	DI
40	MET40	-1.750	0.207	2.490	-1.156	-3.292	DI	105	LYS105	2.026	2.026	0.000	0.000	0.000	ES
41	ILE41	0.445	0.493	0.025	0.215	-0.288	ES	106	ARG106	1.535	2.605	1.121	-0.599	-1.592	ES
42	ILE42	0.237	0.237	0.000	0.000	0.000	ES	107	LYS107	1.570	1.570	0.000	0.000	0.000	ES
43	SER43	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	ES	108	ARG108	0.858	0.858	0.000	0.000	0.000	ES
44	VAL44	-0.096	-0.096	0.000	0.000	0.000	ES	109	GLU109	-0.862	-0.862	0.000	0.000	0.000	ES
45	ASN45	0.095	0.095	0.000	0.000	0.000	ES	110	ASP110	-0.682	-0.682	0.000	0.000	0.000	ES
46	GLY46	-0.006	-0.006	0.000	0.000	0.000	ES	111	ASP111	-0.640	-0.640	0.000	0.000	0.000	ES
47	ASP47	-0.614	-0.614	0.000	0.000	0.000	ES	112	LYS112	0.786	0.786	0.000	0.000	0.000	ES
48	VAL48	-0.058	-0.058	0.000	0.000	0.000	ES	113	LEU113	0.055	0.055	0.000	0.000	0.000	ES
49	ILE49	0.058	0.058	0.000	0.000	0.000	ES	114	VAL114	-0.351	-0.351	0.000	0.000	0.000	ES
50	THR50	-0.083	-0.083	0.000	0.000	0.000	ES	115	VAL115	0.383	-0.023	0.003	0.687	-0.285	CT+mix
51	ILE51	-2.721	-0.456	1.471	-1.050	-2.685	DI	116	GLU116	-1.703	-1.703	0.000	0.000	0.000	ES
52	LYS52	-1.386	-1.991	4.079	-1.304	-2.170	EX	117	CYS117	-1.238	-1.701	0.038	0.996	-0.570	ES
53	SER53	-6.806	-3.966	7.075	-3.257	-6.658	EX	118	VAL118	0.782	0.782	0.000	0.000	0.000	ES
54	GLU54	-1.130	-0.805	0.105	0.164	-0.595	ES	119	MET119	-0.028	-0.028	0.000	0.000	0.000	ES
55	SER55	-12.334	-28.661	29.832	-10.251	-3.254	EX	120	LYS120	0.177	0.177	0.000	0.000	0.000	ES
56	THR56	-1.183	-1.039	0.000	-0.078	-0.065	ES	121	GLY121	-0.094	-0.094	0.000	0.000	0.000	ES
57	PHE57	-9.793	-4.951	2.696	-2.362	-5.176	DI	122	VAL122	-0.021	-0.021	0.000	0.000	0.000	ES
58	LYS58	-8.297	-5.536	0.796	-1.291	-2.266	ES	123	THR123	-0.102	-0.102	0.000	0.000	0.000	ES
59	ASN59	-14.959	-26.440	22.961	-9.125	-2.355	ES	124	SER124	0.136	0.136	0.000	0.000	0.000	ES
60	THR60	-2.944	-0.761	2.208	-1.422	-2.969	DI	125	THR125	-0.892	-0.892	0.000	0.000	0.000	ES
61	GLU61	-2.590	-1.318	0.837	-0.921	-1.189	ES	126	ARG126	3.040	4.138	1.242	-0.707	-1.633	ES
62	ILE62	-1.317	-0.395	1.997	-0.330	-2.590	DI	127	VAL127	-0.522	-0.522	0.000	0.000	0.000	ES
63	SER63	0.532	0.589	0.000	-0.004	-0.053	ES	128	TYR128	-2.156	-0.320	1.843	-1.248	-2.431	DI
64	PHE64	0.035	0.035	0.000	0.000	0.000	ES	129	GLU129	-0.461	-0.461	0.000	0.000	0.000	ES
65	ILE65	0.063	0.063	0.000	0.000	0.000	ES	130	ARG130	0.695	0.695	0.000	0.000	0.000	ES
								131	ALA131	-0.215	-0.215	0.000	0.000	0.000	ES

表 6 (b) compound 2 と各アミノ酸残基との IFIE

フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component	フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component
1	CYS1	-0.118	-0.118	0.000	0.000	0.000	ES	66	LEU66	-0.010	-0.010	0.000	0.000	0.000	ES
2	ASP2	-1.008	-1.008	0.000	0.000	0.000	ES	67	GLY67	0.092	0.092	0.000	0.000	0.000	ES
3	ALA3	-0.011	-0.011	0.000	0.000	0.000	ES	68	GLN68	0.100	0.100	0.000	0.000	0.000	ES
4	PHE4	-0.122	-0.122	0.000	0.000	0.000	ES	69	GLU69	-0.183	-0.183	0.000	0.000	0.000	ES
5	VAL5	-0.254	-0.254	0.000	0.000	0.000	ES	70	PHE70	-0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	ES
6	GLY6	0.157	0.157	0.000	0.000	0.000	ES	71	ASP71	0.236	0.236	0.000	0.000	0.000	ES
7	THR7	-0.281	-0.281	0.000	0.000	0.000	ES	72	GLU72	-0.113	-0.113	0.000	0.000	0.000	ES
8	TRP8	0.306	0.306	0.000	0.000	0.000	ES	73	VAL73	0.107	0.107	0.000	0.000	0.000	ES
9	LYS9	0.611	0.611	0.000	0.000	0.000	ES	74	THR74	-0.883	-0.479	0.001	-0.061	-0.344	ES
10	LEU10	0.157	0.157	0.000	0.000	0.000	ES	75	ALA75	-2.625	-0.706	1.633	-0.986	-2.566	DI
11	VAL11	0.519	0.519	0.000	0.000	0.000	ES	76	ASP76	4.325	3.551	6.938	-1.911	-4.254	ES
12	SER12	0.215	0.215	0.000	0.000	0.000	ES	77	ASP77	1.498	1.668	0.039	0.062	-0.270	EX
13	SER13	-0.390	-0.390	0.000	0.000	0.000	ES	78	ARG78	-4.621	-3.856	0.320	-0.325	-0.760	ES
14	GLU14	-0.769	-0.769	0.000	0.000	0.000	ES	79	LYS79	-1.516	-1.516	0.000	0.000	0.000	ES
15	ASN15	-0.037	-0.037	0.000	0.000	0.000	ES	80	VAL80	-0.046	-0.046	0.000	0.000	0.000	ES
16	PHE16	-6.786	-4.529	6.375	-2.170	-6.462	DI	81	LYS81	-0.229	-0.229	0.000	0.000	0.000	ES
17	ASP17	1.842	1.842	0.000	0.000	0.000	ES	82	SER82	0.067	0.067	0.000	0.000	0.000	ES
18	ASP18	0.674	0.674	0.000	0.000	0.000	ES	83	THR83	0.054	0.054	0.000	0.000	0.000	ES
19	TYR19	-1.238	-0.314	0.814	-0.326	-1.411	DI	84	ILE84	-0.167	-0.167	0.000	0.000	0.000	ES
20	MET20	-0.688	-0.221	3.448	-1.112	-2.803	EX	85	THR85	0.109	0.109	0.000	0.000	0.000	ES
21	LYS21	-0.841	-0.776	-0.001	-0.006	-0.058	ES	86	LEU86	-0.219	-0.219	0.000	0.000	0.000	ES
22	GLU22	0.380	0.380	0.000	0.000	0.000	ES	87	ASP87	-0.722	-0.722	0.000	0.000	0.000	ES
23	VAL23	-0.443	-0.151	0.005	-0.039	-0.257	ES	88	GLY88	-0.063	-0.063	0.000	0.000	0.000	ES
24	GLY24	-0.074	-0.074	0.000	0.000	0.000	ES	89	GLY89	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	ES
25	VAL25	-0.690	-0.098	0.837	-0.309	-1.119	EX	90	VAL90	-0.156	-0.156	0.000	0.000	0.000	ES
26	GLY26	-0.475	-0.475	0.000	0.000	0.000	ES	91	LEU91	0.145	0.145	0.000	0.000	0.000	ES
27	PHE27	0.271	0.271	0.000	0.000	0.000	ES	92	VAL92	-0.454	-0.454	0.000	0.000	0.000	ES
28	ALA28	0.025	0.025	0.000	0.000	0.000	ES	93	HIS93	0.606	0.606	0.000	0.000	0.000	ES
29	THR29	-0.462	-0.212	0.012	-0.048	-0.215	DI	94	VAL94	-0.169	-0.169	0.000	0.000	0.000	ES
30	ARG30	-1.389	-1.389	0.000	0.000	0.000	ES	95	GLN95	0.244	0.244	0.000	0.000	0.000	ES
31	LYS31	-1.340	-1.340	0.000	0.000	0.000	ES	96	LYS96	0.267	0.267	0.000	0.000	0.000	ES
32	VAL32	-0.288	-0.288	0.000	0.000	0.000	ES	97	TRP97	0.141	0.141	0.000	0.000	0.000	ES
33	ALA33	-0.902	-0.282	1.239	-0.455	-1.403	DI	98	ASP98	0.780	0.780	0.000	0.000	0.000	ES
34	GLY34	-4.944	-4.556	2.656	-0.988	-2.055	DI	99	GLY99	-0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	ES
35	MET35	-0.308	-0.214	-0.001	-0.016	-0.077	ES	100	LYS100	-0.940	-0.940	0.000	0.000	0.000	ES
36	ALA36	-0.090	-0.273	2.495	-0.894	-1.417	EX	101	SER101	-0.021	-0.021	0.000	0.000	0.000	ES
37	LYS37	-0.298	-0.118	0.000	-0.067	-0.114	ES	102	THR102	-0.047	-0.047	0.000	0.000	0.000	ES
38	PRO38	-2.998	0.156	2.678	-1.506	-4.326	DI	103	THR103	0.173	0.173	0.000	0.000	0.000	ES
39	ASN39	-1.798	-1.492	0.000	-0.060	-0.247	ES	104	ILE104	-1.485	-0.751	1.108	-0.289	-1.552	DI
40	MET40	-0.853	-1.710	7.287	-1.880	-4.550	DI	105	LYS105	1.975	1.975	0.000	0.000	0.000	ES
41	ILE41	1.891	1.293	0.048	0.879	-0.329	ES	106	ARG106	2.294	3.751	1.292	-0.986	-1.763	ES
42	ILE42	-0.322	-0.322	0.000	0.000	0.000	ES	107	LYS107	1.997	1.997	0.000	0.000	0.000	ES
43	SER43	0.234	0.234	0.000	0.000	0.000	ES	108	ARG108	1.200	1.200	0.000	0.000	0.000	ES
44	VAL44	-0.088	-0.088	0.000	0.000	0.000	ES	109	GLU109	-0.984	-0.984	0.000	0.000	0.000	ES
45	ASN45	0.105	0.105	0.000	0.000	0.000	ES	110	ASP110	-0.889	-0.889	0.000	0.000	0.000	ES
46	GLY46	0.031	0.031	0.000	0.000	0.000	ES	111	ASP111	-0.927	-0.927	0.000	0.000	0.000	ES
47	ASP47	-0.561	-0.561	0.000	0.000	0.000	ES	112	LYS112	0.969	0.969	0.000	0.000	0.000	ES
48	VAL48	-0.037	-0.037	0.000	0.000	0.000	ES	113	LEU113	0.041	0.041	0.000	0.000	0.000	ES
49	ILE49	-0.043	-0.043	0.000	0.000	0.000	ES	114	VAL114	-0.330	-0.330	0.000	0.000	0.000	ES
50	THR50	0.105	0.105	0.000	0.000	0.000	ES	115	VAL115	0.950	-0.148	-0.005	1.434	-0.332	CT+mix
51	ILE51	-0.965	-0.656	1.192	-0.342	-1.160	DI	116	GLU116	-1.665	-1.665	0.000	0.000	0.000	ES
52	LYS52	0.780	1.067	-0.001	-0.041	-0.245	EX	117	CYS117	-1.617	-2.238	0.040	1.196	-0.615	ES
53	SER53	-1.363	-12.047	27.526	-6.927	-9.915	EX	118	VAL118	0.881	0.881	0.000	0.000	0.000	ES
54	GLU54	-1.087	-0.730	0.107	0.265	-0.729	ES	119	MET119	0.057	0.057	0.000	0.000	0.000	ES
55	SER55	-7.931	-16.029	16.380	-4.731	-3.551	EX	120	LYS120	-0.319	-0.319	0.000	0.000	0.000	ES
56	THR56	-0.886	-0.690	0.000	-0.053	-0.142	ES	121	GLY121	-0.119	-0.119	0.000	0.000	0.000	ES
57	PHE57	-5.392	-2.476	2.093	-1.385	-3.623	DI	122	VAL122	-0.057	-0.057	0.000	0.000	0.000	ES
58	LYS58	-9.826	-7.301	0.200	-1.250	-1.474	ES	123	THR123	-0.032	-0.032	0.000	0.000	0.000	ES
59	ASN59	-0.662	1.048	1.651	-1.327	-2.034	ES	124	SER124	0.103	0.103	0.000	0.000	0.000	ES
60	THR60	-2.002	-0.158	0.114	-0.695	-1.263	DI	125	THR125	-0.887	-0.887	0.000	0.000	0.000	ES
61	GLU61	-1.171	-1.105	-0.001	-0.007	-0.058	ES	126	ARG126	-0.478	1.699	0.369	-0.884	-1.662	ES
62	ILE62	0.364	0.364	0.000	0.000	0.000	DI	127	VAL127	-0.610	-0.610	0.000	0.000	0.000	ES
63	SER63	-0.341	-0.341	0.000	0.000	0.000	ES	128	TYR128	-1.369	0.084	1.712	-1.044	-2.121	DI
64	PHE64	0.116	0.116	0.000	0.000	0.000	ES	129	GLU129	-0.898	-0.898	0.000	0.000	0.000	ES
65	ILE65	-0.068	-0.068	0.000	0.000	0.000	ES	130	ARG130	1.113	1.113	0.000	0.000	0.000	ES
								131	ALA131	-0.663	-0.663	0.000	0.000	0.000	ES

表 6 (c) compound 3 と各アミノ酸残基との IFIE

フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component	フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component
1	CYS1	-0.023	-0.023	0.000	0.000	0.000	ES	66	LEU66	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	ES
2	ASP2	-1.061	-1.061	0.000	0.000	0.000	ES	67	GLY67	0.082	0.082	0.000	0.000	0.000	ES
3	ALA3	-0.005	-0.005	0.000	0.000	0.000	ES	68	GLN68	0.106	0.106	0.000	0.000	0.000	ES
4	PHE4	-0.114	-0.114	0.000	0.000	0.000	ES	69	GLU69	-0.087	-0.087	0.000	0.000	0.000	ES
5	VAL5	-0.264	-0.264	0.000	0.000	0.000	ES	70	PHE70	-0.009	-0.009	0.000	0.000	0.000	ES
6	GLY6	0.126	0.126	0.000	0.000	0.000	ES	71	ASP71	0.346	0.346	0.000	0.000	0.000	ES
7	THR7	-0.305	-0.305	0.000	0.000	0.000	ES	72	GLU72	0.463	0.463	0.000	0.000	0.000	ES
8	TRP8	0.317	0.317	0.000	0.000	0.000	ES	73	VAL73	0.100	0.100	0.000	0.000	0.000	ES
9	LYS9	0.599	0.599	0.000	0.000	0.000	ES	74	THR74	-1.055	-0.526	0.002	-0.112	-0.418	ES
10	LEU10	0.076	0.267	-0.001	-0.005	-0.186	ES	75	ALA75	-2.975	-0.932	1.474	-0.931	-2.587	DI
11	VAL11	0.517	0.517	0.000	0.000	0.000	ES	76	ASP76	6.847	3.817	9.594	-1.981	-4.583	EX
12	SER12	0.382	0.382	0.000	0.000	0.000	ES	77	ASP77	1.707	1.879	0.032	0.047	-0.251	ES
13	SER13	-0.271	-0.271	0.000	0.000	0.000	ES	78	ARG78	-5.247	-4.662	1.181	-0.606	-1.160	ES
14	GLU14	-0.367	-0.367	0.000	0.000	0.000	ES	79	LYS79	-1.565	-1.565	0.000	0.000	0.000	ES
15	ASN15	-0.009	-0.009	0.000	0.000	0.000	ES	80	VAL80	-0.068	-0.068	0.000	0.000	0.000	ES
16	PHE16	-5.371	-3.551	5.073	-1.623	-5.269	DI	81	LYS81	-0.344	-0.344	0.000	0.000	0.000	ES
17	ASP17	2.464	2.464	0.000	0.000	0.000	ES	82	SER82	0.054	0.054	0.000	0.000	0.000	ES
18	ASP18	0.933	0.933	0.000	0.000	0.000	ES	83	THR83	0.042	0.042	0.000	0.000	0.000	ES
19	TYR19	-1.225	-0.485	1.322	-0.459	-1.603	DI	84	ILE84	-0.195	-0.195	0.000	0.000	0.000	ES
20	MET20	-0.949	0.219	1.813	-0.690	-2.291	DI	85	THR85	0.106	0.106	0.000	0.000	0.000	ES
21	LYS21	-1.241	-1.190	-0.001	-0.006	-0.044	ES	86	LEU86	-0.213	-0.213	0.000	0.000	0.000	ES
22	GLU22	0.608	0.608	0.000	0.000	0.000	ES	87	ASP87	-0.743	-0.743	0.000	0.000	0.000	ES
23	VAL23	-0.590	-0.165	0.028	-0.077	-0.376	DI	88	GLY88	-0.059	-0.059	0.000	0.000	0.000	ES
24	GLY24	-0.095	-0.095	0.000	0.000	0.000	ES	89	GLY89	0.008	0.008	0.000	0.000	0.000	ES
25	VAL25	-0.649	-0.148	0.865	-0.299	-1.068	DI	90	VAL90	-0.177	-0.177	0.000	0.000	0.000	ES
26	GLY26	-0.470	-0.470	0.000	0.000	0.000	ES	91	LEU91	0.158	0.158	0.000	0.000	0.000	ES
27	PHE27	0.344	0.344	0.000	0.000	0.000	ES	92	VAL92	-0.503	-0.503	0.000	0.000	0.000	ES
28	ALA28	0.094	0.094	0.000	0.000	0.000	ES	93	HIS93	0.658	0.658	0.000	0.000	0.000	ES
29	THR29	-0.411	-0.256	0.002	-0.024	-0.132	ES	94	VAL94	-0.199	-0.199	0.000	0.000	0.000	ES
30	ARG30	-1.440	-1.440	0.000	0.000	0.000	ES	95	GLN95	0.220	0.276	-0.001	-0.010	-0.045	ES
31	LYS31	-1.427	-1.427	0.000	0.000	0.000	ES	96	LYS96	0.181	0.181	0.000	0.000	0.000	ES
32	VAL32	-0.166	-0.166	0.000	0.000	0.000	ES	97	TRP97	0.163	0.163	0.000	0.000	0.000	ES
33	ALA33	-0.992	-0.093	0.046	-0.237	-0.709	DI	98	ASP98	0.942	0.942	0.000	0.000	0.000	ES
34	GLY34	-1.080	-0.028	0.034	-0.572	-0.514	CT+mix	99	GLY99	-0.006	-0.006	0.000	0.000	0.000	ES
35	MET35	-0.646	-0.646	0.000	0.000	0.000	ES	100	LYS100	-1.178	-1.178	0.000	0.000	0.000	ES
36	ALA36	-0.837	-0.841	1.661	-0.603	-1.054	EX	101	SER101	-0.060	-0.060	0.000	0.000	0.000	ES
37	LYS37	-0.421	-0.311	-0.001	-0.012	-0.097	ES	102	THR102	-0.010	-0.010	0.000	0.000	0.000	ES
38	PRO38	-4.740	-1.740	3.611	-1.746	-4.865	DI	103	THR103	0.136	0.136	0.000	0.000	0.000	ES
39	ASN39	-1.986	-1.485	0.005	-0.194	-0.312	ES	104	ILE104	-1.352	-0.892	1.164	0.024	-1.648	DI
40	MET40	-1.447	-1.183	4.908	-1.556	-3.616	EX	105	LYS105	1.906	1.906	0.000	0.000	0.000	ES
41	ILE41	2.253	1.374	0.048	1.083	-0.252	ES	106	ARG106	3.339	4.407	0.639	-0.590	-1.118	ES
42	ILE42	-0.284	-0.284	0.000	0.000	0.000	ES	107	LYS107	1.925	1.925	0.000	0.000	0.000	ES
43	SER43	0.239	0.239	0.000	0.000	0.000	ES	108	ARG108	1.208	1.208	0.000	0.000	0.000	ES
44	VAL44	-0.065	-0.065	0.000	0.000	0.000	ES	109	GLU109	-0.911	-0.911	0.000	0.000	0.000	ES
45	ASN45	0.098	0.098	0.000	0.000	0.000	ES	110	ASP110	-0.876	-0.876	0.000	0.000	0.000	ES
46	GLY46	0.039	0.039	0.000	0.000	0.000	ES	111	ASP111	-0.943	-0.943	0.000	0.000	0.000	ES
47	ASP47	-0.561	-0.561	0.000	0.000	0.000	ES	112	LYS112	0.968	0.968	0.000	0.000	0.000	ES
48	VAL48	-0.043	-0.043	0.000	0.000	0.000	ES	113	LEU113	0.035	0.035	0.000	0.000	0.000	ES
49	ILE49	-0.059	-0.059	0.000	0.000	0.000	ES	114	VAL114	-0.294	-0.294	0.000	0.000	0.000	ES
50	THR50	0.117	0.117	0.000	0.000	0.000	ES	115	VAL115	1.134	-0.096	0.024	1.538	-0.332	CT+mix
51	ILE51	-0.877	-0.362	0.549	-0.214	-0.850	DI	116	GLU116	-1.257	-1.257	0.000	0.000	0.000	ES
52	LYS52	1.015	1.317	0.000	-0.056	-0.245	ES	117	CYS117	-2.113	-2.567	0.078	1.027	-0.651	ES
53	SER53	-9.639	-5.877	5.656	-3.381	-6.037	DI	118	VAL118	0.957	0.957	0.000	0.000	0.000	ES
54	GLU54	-1.168	-1.291	0.142	0.501	-0.520	ES	119	MET119	0.036	0.036	0.000	0.000	0.000	ES
55	SER55	-1.318	-1.451	3.444	-1.433	-1.878	EX	120	LYS120	-0.403	-0.403	0.000	0.000	0.000	ES
56	THR56	-0.086	0.051	-0.001	-0.023	-0.113	DI	121	GLY121	-0.128	-0.128	0.000	0.000	0.000	ES
57	PHE57	-2.517	-0.445	1.488	-0.945	-2.616	DI	122	VAL122	-0.063	-0.063	0.000	0.000	0.000	ES
58	LYS58	-3.894	-2.529	0.181	-0.522	-1.024	ES	123	THR123	-0.038	-0.038	0.000	0.000	0.000	ES
59	ASN59	-5.854	-3.959	1.115	-1.301	-1.708	ES	124	SER124	0.343	0.343	0.000	0.000	0.000	ES
60	THR60	-1.030	0.276	0.033	-0.425	-0.915	DI	125	THR125	-0.929	-0.929	0.000	0.000	0.000	ES
61	GLU61	-1.234	-1.234	0.000	0.000	0.000	ES	126	ARG126	-2.162	0.301	0.228	-1.008	-1.684	DI
62	ILE62	0.359	0.359	0.000	0.000	0.000	ES	127	VAL127	-0.613	-0.613	0.000	0.000	0.000	ES
63	SER63	-0.389	-0.389	0.000	0.000	0.000	ES	128	TYR128	-1.212	-0.237	2.847	-1.223	-2.599	EX
64	PHE64	0.131	0.131	0.000	0.000	0.000	ES	129	GLU129	-0.815	-0.815	0.000	0.000	0.000	ES
65	ILE65	-0.070	-0.070	0.000	0.000	0.000	ES	130	ARG130	1.150	1.150	0.000	0.000	0.000	ES
								131	ALA131	-0.854	-0.854	0.000	0.000	0.000	ES

表 6 (d) compound 4 と各アミノ酸残基との IFIE

フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component	フラグメント番号	アミノ酸残基	合計 total IFIE	ES	EX	CT+mix	DI	Main component
1	CYS1	-0.024	-0.024	0.000	0.000	0.000	ES	66	LEU66	0.031	0.031	0.000	0.000	0.000	ES
2	ASP2	-0.611	-0.611	0.000	0.000	0.000	ES	67	GLY67	0.028	0.028	0.000	0.000	0.000	ES
3	ALA3	-0.037	-0.037	0.000	0.000	0.000	ES	68	GLN68	0.055	0.055	0.000	0.000	0.000	ES
4	PHE4	-0.085	-0.085	0.000	0.000	0.000	ES	69	GLU69	0.336	0.336	0.000	0.000	0.000	ES
5	VAL5	-0.175	-0.175	0.000	0.000	0.000	ES	70	PHE70	-0.045	-0.045	0.000	0.000	0.000	ES
6	GLY6	0.078	0.078	0.000	0.000	0.000	ES	71	ASP71	0.582	0.582	0.000	0.000	0.000	ES
7	THR7	-0.115	-0.115	0.000	0.000	0.000	ES	72	GLU72	0.833	0.833	0.000	0.000	0.000	ES
8	TRP8	0.143	0.143	0.000	0.000	0.000	ES	73	VAL73	0.190	0.190	0.000	0.000	0.000	ES
9	LYS9	0.837	0.837	0.000	0.000	0.000	ES	74	THR74	-1.145	-1.145	0.000	0.000	0.000	ES
10	LEU10	0.193	0.193	0.000	0.000	0.000	ES	75	ALA75	-2.546	-1.031	1.859	-1.053	-2.321	DI
11	VAL11	0.276	0.276	0.000	0.000	0.000	ES	76	ASP76	6.107	8.046	1.259	-0.942	-2.256	ES
12	SER12	0.194	0.194	0.000	0.000	0.000	ES	77	ASP77	0.519	0.664	0.000	-0.020	-0.125	ES
13	SER13	-0.591	-0.591	0.000	0.000	0.000	ES	78	ARG78	-8.910	-8.395	2.065	-0.770	-1.810	ES
14	GLU14	-0.067	-0.067	0.000	0.000	0.000	ES	79	LYS79	-1.406	-1.406	0.000	0.000	0.000	ES
15	ASN15	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	ES	80	VAL80	-0.022	-0.022	0.000	0.000	0.000	ES
16	PHE16	-5.104	-2.684	3.984	-0.936	-5.468	DI	81	LYS81	-0.661	-0.661	0.000	0.000	0.000	ES
17	ASP17	2.516	2.516	0.000	0.000	0.000	ES	82	SER82	0.201	0.201	0.000	0.000	0.000	ES
18	ASP18	1.156	1.156	0.000	0.000	0.000	ES	83	THR83	-0.119	-0.119	0.000	0.000	0.000	ES
19	TYR19	-1.529	-3.059	7.735	-2.480	-3.725	EX	84	ILE84	-0.013	-0.013	0.000	0.000	0.000	ES
20	MET20	-1.240	0.676	0.325	-0.758	-1.483	DI	85	THR85	0.047	0.047	0.000	0.000	0.000	ES
21	LYS21	-1.594	-1.560	-0.001	-0.003	-0.030	ES	86	LEU86	-0.107	-0.107	0.000	0.000	0.000	ES
22	GLU22	0.955	0.955	0.000	0.000	0.000	ES	87	ASP87	-0.144	-0.144	0.000	0.000	0.000	ES
23	VAL23	-1.100	-0.272	0.317	-0.256	-0.889	DI	88	GLY88	-0.033	-0.033	0.000	0.000	0.000	ES
24	GLY24	-0.245	-0.245	0.000	0.000	0.000	ES	89	GLY89	-0.019	-0.019	0.000	0.000	0.000	ES
25	VAL25	-0.707	-0.168	0.139	-0.164	-0.514	DI	90	VAL90	-0.111	-0.111	0.000	0.000	0.000	ES
26	GLY26	-0.275	-0.275	0.000	0.000	0.000	ES	91	LEU91	0.089	0.089	0.000	0.000	0.000	ES
27	PHE27	0.212	0.212	0.000	0.000	0.000	ES	92	VAL92	-0.196	-0.196	0.000	0.000	0.000	ES
28	ALA28	0.038	0.038	0.000	0.000	0.000	ES	93	HIS93	0.353	0.353	0.000	0.000	0.000	ES
29	THR29	-0.256	-0.256	0.000	0.000	0.000	ES	94	VAL94	0.092	0.092	0.000	0.000	0.000	ES
30	ARG30	-1.560	-1.560	0.000	0.000	0.000	ES	95	GLN95	0.650	0.915	0.002	-0.071	-0.196	ES
31	LYS31	-1.052	-1.052	0.000	0.000	0.000	ES	96	LYS96	-0.512	-0.512	0.000	0.000	0.000	ES
32	VAL32	-0.310	-0.310	0.000	0.000	0.000	ES	97	TRP97	0.165	0.165	0.000	0.000	0.000	ES
33	ALA33	-1.713	-0.512	0.630	-0.526	-1.305	DI	98	ASP98	1.135	1.135	0.000	0.000	0.000	ES
34	GLY34	-5.035	-3.058	0.670	-1.243	-1.403	ES	99	GLY99	-0.016	-0.016	0.000	0.000	0.000	ES
35	MET35	-0.475	-0.390	-0.001	-0.013	-0.072	ES	100	LYS100	-1.416	-1.416	0.000	0.000	0.000	ES
36	ALA36	-0.178	-0.501	2.364	-0.774	-1.267	EX	101	SER101	-0.090	-0.090	0.000	0.000	0.000	ES
37	LYS37	1.263	1.372	-0.001	-0.009	-0.099	ES	102	THR102	0.084	0.269	0.000	-0.045	-0.140	ES
38	PRO38	-1.584	-0.159	0.738	-0.522	-1.641	DI	103	THR103	-0.032	-0.032	0.000	0.000	0.000	ES
39	ASN39	0.322	0.416	0.000	-0.014	-0.079	ES	104	ILE104	-1.037	-0.218	0.386	-0.232	-0.972	DI
40	MET40	-0.644	-0.644	0.000	0.000	0.000	ES	105	LYS105	0.320	0.320	0.000	0.000	0.000	ES
41	ILE41	0.383	0.383	0.000	0.000	0.000	ES	106	ARG106	2.885	2.970	-0.001	-0.003	-0.082	ES
42	ILE42	-0.039	-0.039	0.000	0.000	0.000	ES	107	LYS107	0.929	0.929	0.000	0.000	0.000	ES
43	SER43	0.093	0.093	0.000	0.000	0.000	ES	108	ARG108	0.754	0.754	0.000	0.000	0.000	ES
44	VAL44	-0.010	-0.010	0.000	0.000	0.000	ES	109	GLU109	-0.501	-0.501	0.000	0.000	0.000	ES
45	ASN45	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	ES	110	ASP110	-0.603	-0.603	0.000	0.000	0.000	ES
46	GLY46	0.030	0.030	0.000	0.000	0.000	ES	111	ASP111	-0.681	-0.681	0.000	0.000	0.000	ES
47	ASP47	-0.258	-0.258	0.000	0.000	0.000	ES	112	LYS112	0.787	0.787	0.000	0.000	0.000	ES
48	VAL48	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	ES	113	LEU113	0.092	0.092	0.000	0.000	0.000	ES
49	ILE49	-0.049	-0.049	0.000	0.000	0.000	ES	114	VAL114	-0.300	-0.300	0.000	0.000	0.000	ES
50	THR50	0.092	0.092	0.000	0.000	0.000	ES	115	VAL115	0.123	0.202	-0.001	-0.002	-0.076	ES
51	ILE51	-0.154	-0.154	0.000	0.000	0.000	ES	116	GLU116	-0.304	-0.304	0.000	0.000	0.000	ES
52	LYS52	1.236	1.236	0.000	0.000	0.000	ES	117	CYS117	-1.377	-0.933	0.034	-0.125	-0.353	ES
53	SER53	-2.276	-1.053	0.293	-0.616	-0.900	ES	118	VAL118	0.325	0.325	0.000	0.000	0.000	ES
54	GLU54	-1.034	-0.946	-0.001	-0.004	-0.083	ES	119	MET119	0.182	0.182	0.000	0.000	0.000	ES
55	SER55	-2.161	-0.896	0.524	-0.692	-1.097	DI	120	LYS120	-1.065	-1.065	0.000	0.000	0.000	ES
56	THR56	0.353	0.444	-0.001	-0.011	-0.079	ES	121	GLY121	-0.089	-0.089	0.000	0.000	0.000	ES
57	PHE57	-3.609	-1.070	2.445	-1.292	-3.693	DI	122	VAL122	-0.115	-0.115	0.000	0.000	0.000	ES
58	LYS58	-1.490	-1.095	0.002	-0.063	-0.334	ES	123	THR123	0.253	0.253	0.000	0.000	0.000	ES
59	ASN59	-2.320	-2.039	0.001	-0.068	-0.213	ES	124	SER124	-0.093	-0.093	0.000	0.000	0.000	ES
60	THR60	-0.068	0.204	-0.001	-0.025	-0.247	DI	125	THR125	-0.261	-0.261	0.000	0.000	0.000	ES
61	GLU61	-1.168	-1.168	0.000	0.000	0.000	ES	126	ARG126	6.111	6.391	0.467	0.455	-1.203	ES
62	ILE62	0.326	0.326	0.000	0.000	0.000	ES	127	VAL127	-0.105	-0.105	0.000	0.000	0.000	ES
63	SER63	-0.261	-0.261	0.000	0.000	0.000	ES	128	TYR128	-0.762	-0.676	-0.001	-0.007	-0.078	ES
64	PHE64	0.112	0.112	0.000	0.000	0.000	ES	129	GLU129	-0.708	-0.708	0.000	0.000	0.000	ES
65	ILE65	-0.076	-0.076	0.000	0.000	0.000	ES	130	ARG130	0.790	0.790	0.000	0.000	0.000	ES
								131	ALA131	-0.868	-0.868	0.000	0.000	0.000	ES

4.3.8 MM-GBSA 法による構造活性相関解析

FMO 法以外にも、タンパク質と阻害剤との相互作用を算出する方法は存在する。古典力学に基づく従来の手法である MM-GBSA 法¹⁵⁾ である。

MM-GBSA 法でも、FABP4 と各阻害剤との結合エネルギーを算出した。結果を表 7 に示す。

表 7 FABP4 と各阻害剤との結合エネルギー (MM-GBSA) 結果

阻害剤名	K_i	結合エネルギー値 (MM-GBSA_dG_Bind)
		(kcal/mol)
compound 1	0.03	-125.702
compound 2	0.10	-91.109
compound 3	0.12	-85.206
compound 4	>1.4	-54.051

MM-GBSA による結合エネルギー値も活性値 (K_i) の順位と一致し、 $\log K_i$ と MM-GBSA の結合エネルギー値との相関係数は 0.968 と良好であった。MM-GBSA 法も非常によい結合エネルギー値の算出方法と言える。

4.4 結論

FABP4 は、糖尿病、動脈硬化症に関与すると考えられているが、その阻害剤は更なる高活性化が課題であった。本研究では、最高活性阻害剤である compound 1 と compound 2 について、FABP4 との相互作用を詳細に比較することにより、更なる高活性化への情報の取得を目的とした。

FABP4 と 4 種の FABP4 阻害剤の複合体 X 線結晶構造の FMO 計算を実施することにより、詳細に相互作用を解析した。FMO 計算により算出される相互作用エネルギーである IFIE の解析により、各阻害剤と相互作用しているアミノ酸残基とその相互作用の種類、強さが明確に解明された。

compound 1 が高活性である理由は、主に、Ser55、Phe57、Lys58 との相互作用であることが判明した。特に、Lys58 との EX（静電相互作用）エネルギーの寄与が大きかった。これらのアミノ酸残基は、水素結合や π - π スタッキングとして目視でも認識が可能であったが、その強さは不明であり、IFIE より最高活性である理由を説明することができた。

compound 2 は、2 番目に活性が高いが、大きな相互作用は、Ser55 との水素結合しか目視では確認されていなかった。FMO 計算により、Ser55 よりも大きな相互作用を Lys58 と形成していることが解明された。また、Phe57 とも主に分散力による相互作用で Ser55 の次に大きな IFIE で相互作用していることが判明した。

更に、compound 3 でも、目視では確認できなかった Ser53 と、分散力が主要な大きな相互作用があることも分かった。

本研究により、Lys58 との相互作用が、強い FABP4 阻害剤に重要である可能性が示唆された。この相互作用は、ドッキングモデルでは報告されていたが、X 線結晶構造と FMO 計算により初めて実証された。

また、上記のように FMO 計算で IFIE の解析をすることで初めて認識された相互作用があることから、今後、X 線結晶構造が得られている場合は、FMO 計算を実施し、古典力学では解明しきれない相互作用を解明することが化合物の設計に望ましいと考えられる。FMO 計算により重要な相互作用を見出し、高活性な化合物の設計に役立つ知見を得ることが可能となるであろう。

5 総括

産業上重要な 2 種のタンパク質と、そのタンパク質が認識する化合物との相互作用を、X 線結晶構造解析と計算科学を用いて詳細に解析した。

タンパク質側の改変を目指した研究として、研究事例 1 を、化合物側の改変を目指した研究として研究事例 2 を、それぞれ、古典力学計算と量子力学計算という異なる計算手法にて行った。

研究事例 1 では、MTG の基質認識機構を解明した。MTG は、食品等の改質のための産業用酵素あるいは、抗体医薬品等の医薬タンパク質の可溶性や安定性の向上といった高機能化や ADC に使用されているが、結合活性や特異性に問題があり、酵素改変が必要であった。酵素改変を効率的に行うためには、酵素と基質との相互作用様式を詳細に見積もることによる、論理的な設計が有効であるが、MTG と基質との複合体 X 線結晶構造は得られていなかった。そこで、ドッキングと MD 計算という古典力学を用いた計算手法を用いて複合体モデルを構築した。MTG と基質とのドッキングモデルより、反応に重要なオキシアニオンホールを形成するアミノ酸残基の推定に成功し、1 段階目の基質と 2 段階目の基質の認識機構を解明した。

将来、抗体と薬物、あるいはタンパク質医薬品と PEG の架橋反応といったバイオ医薬品の創出を MTG で制御することを目指す際に、重要な情報として役立つことは間違いないであろう。

研究事例 2 の標的である FABP4 は、糖尿病、動脈硬化症に関与すると考えら

れているが、その阻害剤は更なる高活性化が課題であった。本研究では、最高活性阻害剤である compound 1 と compound 2 について、FABP4 との相互作用を詳細に比較することにより、更なる高活性化への情報の取得を目的とした。X 線結晶構造解析と古典力学では、compound 1 の方が高活性である理由を定量的に説明することは不可能であったが、量子力学を使用した FMO 計算により、Lys58 との相互作用が、活性に大きく寄与していることが解明された。このことにより、今後の更なる高活性化阻害剤創出への大きな知見を得ることができた。この相互作用は、ドッキングモデルでは報告されていたが、X 線結晶構造と FMO 計算により初めて実証された。

このことより、化合物の高活性化のための設計に X 線結晶構造解析と FMO 計算が有用であることが示された。

今後、X 線結晶構造が得られている場合は、FMO 計算を実施し、古典力学では解明しきれない相互作用を解明することが、化合物の設計のために望ましいと考えられる。FMO 計算により重要な相互作用を見出し、高活性な化合物の設計に役立つ知見を得ることが可能となるであろう。

このように、研究事例 1 と研究事例 2 より分かることは、目的に応じた適切な分子計算方法を用いて、タンパク質と化合物の相互作用を解析することの重要性である。PDB (Protein Data Bank) への構造登録数は指数関数的に増加しており、多くの X 線結晶構造が解かれてはいるものの、X 線結晶構造解析が困難なタンパク質は依然存在する。X 線結晶構造解析が不可能な場合はドッキングや MD 計算による予測が有効であることが本研究より証明された。また、X 線結晶構造が解かれている場合は、その正確な構造を利用して、量子力学計算 (FMO 計算) により精密な相互作用情報を得ることが望ましいことも判明した。

このように、X線結晶構造を得た後に、計算科学的に解析することの重要性も増していると考えられる。

現在、コンピュータの計算速度は非常に速くなっており、GPU (Graphics Processing Unit) コンピューティングマシン等の高速な並列計算機も一般的になりつつある。本研究で使った MD 計算や FMO 計算は、計算量が膨大ではあるが、コンピュータの進歩と共に、更に活用されていくものと思われる。

世界中で、様々な分子構造やその相互作用の予測に関する概念や方法が研究されており、将来は細胞や組織といったもっと大きな単位でのシミュレーションなども可能となるかもしれない。今後も、適切な計算方法を取捨選択し、より精度の高い予測をすることで、研究の効率化に貢献していくことが重要である。

6 引用文献

1. シーエムシー出版 酵素応用の技術と市場 2015
2. Ikura, K.; Kometani, T.; Yoshikawa, M.; Sasaki, R.; Chiba, H. Crosslinking of Casein Components by Transglutaminase *Agric. Biol. Chem.*, **1980**, *44*, 1567–1573.
3. Motoki, M; Nio, N. Crosslinking Between Different Food Proteins by Transglutaminase *J. Food Sci.*, **1983**, *48*, 561–566.
4. Kurth, L.; Rogers, P. J. Transglutaminase catalyzed cross-linking of myosin to soya protein, casein and gluten *J. Food Sci.*, **1984**, *49*, 573–576.
5. OECD The Bioeconomy to 2030, **2009**
6. Carter, P. J.; Senter, P. D. Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Cancer J.* **2008**, *14*, 154-69.
7. Peters, C.; Brown, S. Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep.* **2015**, *35*.
8. Pasut, G.; Veronese, F. M. PEGylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules. *Drugs Today (Barc.)* **2009**, *45*, 687–695.
9. Clark, M. R.; Waldmann, H. T-cell killing of target cells induced by hybrid antibodies: comparison of two bispecific monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* **1987**, *79*, 1393-401.
10. Staerz, U. D.; Kanagawa, O.; Bevan, M. J.; Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* **1985**, *314*, 628-31.
11. Strop, P. Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjug Chem.* **2014**, *25*, 855-62.
12. Alicja, M. S.; Karolina, W. Ś.; Jacek, O. Current methods for the synthesis of

- homogeneous antibody–drug conjugates *Biotechnology Advances* **2015**, *33*, 775–784.
13. Schumacher, D.; Hackenberger, C.; Leonhardt, H.; Helma, J. *J Clin Immunol.*, **2016**, Epub ahead of print.
 14. Sato, H. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 487–504.
 15. Fontana, A.; Spolaore, B.; Mero, A.; Veronese, F. M. Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, 13–28.
 16. Tagami, U.; Shimba, N.; Nakamura, M.; Yokoyama, K.; Suzuki, E.; Hirokawa, T., *Protein Engineering, Design & Selection* **2009**, *22*, 747–752.
 17. Tagami, U.; Takahashi, K.; Igarashi, S.; Ejima, C.; Yoshida, T.; Takeshita, S.; Miyanaga, W.; Sugiki, M.; Tokumasu, M.; Hatanaka, T.; Kashiwagi, T.; Ishikawa, K.; Miyano, H.; Mizukoshi, T. Interaction Analysis of FABP4 Inhibitors by X-ray Crystallography and Fragment Molecular Orbital Analysis *ACS Med. Chem. Lett.*, **2016**, *7*, 435–439.
 18. Furuhashi, M.; Hotamisligil, G. S. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nature reviews, drug discovery*. **2008**, *7*, 489–503.
 19. Hotamisligil, G. S.; Johnson, R. S.; Distel, R. J.; Ellis, R.; Papaioannou, V. E.; Spiegelman, B.M. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* **1996**, *274*, 1377–1379.

20. Uysal, K. T.; Scheja, L.; Wiesbrock, S. M.; Bonner-Weir, S.; Hotamisligil, G. S. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology* **2000**, *141*, 3388–3396.
21. Kitaura, K.; Ikeo, E.; Asada, T.; Nakano, T.; Uebayasi, M. Fragment molecular orbital method: an approximate computational method for large molecules *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *313*, 701–706.
22. Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Extending the power of quantum chemistry to large systems with the fragment molecular orbital method *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6904–6914.
23. Fedorov, D. G.; Nagata, T.; Kitaura, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7562–7577.
24. Gordon, M. S.; Fedorov, D. G.; Pruitt, S. R.; Slipchenko, L. V. Fragmentation methods: a route to accurate calculations on large systems *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 632–672.
25. Nakano, T.; Kaminuma, T.; Sato, T.; Fukuzawa, K.; Akiyama, Y.; Uebayasi, M.; Kitaura, K. Fragment molecular orbital method: use of approximate electrostatic potential *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 475–480.
26. Hitaoka, M.; Harada, T.; Yoshida, T.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues with influenza virus neuraminidase-1 using ab initio MO calculations on their complex structures *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1796–1805.
27. Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Pair interaction energy decomposition analysis. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 222–237.
28. Lorand, L.; Konishi, K.; Jacobsen, A. Transpeptidation mechanism in blood

- clotting. *Nature*, **1962**, *194*, 1148–1149.
29. Folk, J. E. Transglutaminases. *Methods Enzymol.*, **1970**, *17*, 889–894.
 30. Folk, J. E. Transglutaminases. *Annu. Rev. Biochem.*, **1980**, *49*, 517–531.
 31. Dadabay, C. Y.; Pike, L. Rapid increases in the transglutaminase activity of A431 cells following treatment with epidermal growth factor. *Biochem. J.*, **1989**, *264*, 679–685.
 32. Strop, P. Versatility of Microbial Transglutaminase. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 855–862.
 33. Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Brégeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospice, F.; Romagne, F.; Schibli, R. Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody–drug conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 569–578.
 34. Kashiwagi, T.; Yokoyama, K.; Ishikawa, K.; Ono, K.; Ejima, D.; Matsui, H.; Suzuki, E. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 44252–44260.
 35. Ohtsuka, T.; Ota, M.; Nio, N.; Motoki, M. Comparison of substrate specificities of transglutaminases using synthetic peptides as acyl donors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*, 2608–2613.
 36. Tamada, T.; Kinoshita, T.; Kurihara, K.; Adachi, M.; Ohhara, T.; Imai, K.; Kuroki, R.; Tada, T. Combined High-Resolution Neutron and X-ray Analysis of Inhibited Elastase Confirms the Active-Site Oxyanion Hole but Rules against a Low-Barrier Hydrogen Bond. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11033–11040.
 37. Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem.*

- Phys.*, **1983**, *79*, 926–935.
38. gnuplot 公式ホームページ, <http://gnuplot.info/>.
 39. Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.*, **1995**, *8*, 127-134.
 40. Folk, J. E.; Cole, P. W. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5518–5525.
 41. Shimba, N.; Shinohara, M.; Yokoyama, K.; Kashiwagi, T.; Ishikawa, K.; Ejima, D.; Suzuki, E. Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site. *FEBS Lett.*, **2002**, *517*, 175–179.
 42. Shimba, N.; Yokoyama, K.; Suzuki, E. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 1330–1334.
 43. Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D.A.; Cheatham TE 3rd. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc Chem Res.* **2000** *33*, 889-97.
 44. Haurerland, N. H.; Spener, F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res.* **2004**, *43*, 328-349.
 45. Makowski, L.; Boord, J. B.; Maeda, K.; Babaev, V. R.; Uysal, K. T.; Morgan, M. A.; Parker, R. A.; Suttles, J.; Fazio, S.; Hotamisligil, G. S.; Linton, M. F. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med.* **2001** , *6*, 699–705.

46. Lehmann, F.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Lundbäck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. Discovery of inhibitors of human adipocyte fatty acid-binding protein, a potential type 2 diabetes target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4445–4448.
47. Ringom, R.; Axen, E.; Uppenberg, J.; Lundbäck, T.; Rondahl, L.; Barf, T. Substituted benzylamino-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4(1H)-ones: a novel class of selective human A-FABP inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4449–4452.
48. Sulsky, R.; Magnin, D. R.; Huang, Y.; Simpkins, L.; Taunk, P.; Patel, M.; Zhu, Y.; Stouch, T. R.; Bassolino-Klimas, D.; Parker, R.; Harrity, T.; Stoffel, R.; Taylor, D. S.; Lavoie, T. B.; Kish, K.; Jacobson, B. L.; Sheriff, S.; Adam, L. P.; Ewing, W. R.; Robl, J. A. Potent and selective biphenyl azole inhibitors of adipocyte fatty acid binding protein (aFABP). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3511–3515.
49. Barf, T.; Lehmann, F.; Hammer, K.; Haile, S.; Axen, E.; Medina, C.; Uppenberg, J.; Svensson, S.; Rondahl, L.; Lundbäck, T. N-Benzylindolo carboxylic acids: Design and synthesis of potent and selective adipocyte fatty-acid binding protein (A-FABP) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1745–1748.
50. Hertzfel, A. V.; Hellberg, K.; Reynolds, J. M.; Kruse, A. C.; Juhlmann, B. E.; Smith, A. J.; Sanders, M. A.; Ohlendorf, D. H.; Suttles, J.; Bernlohr, D. A. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of Fatty Acid binding proteins. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6024–6031.
51. Marr, E.; Tardie, M.; Carty, M.; Brown Phillips, T.; Wang, I. K.; Soeller, W.; Qiu, X.; Karam, G. Expression, purification, crystallization and structure of human

- adipocyte lipid-binding protein (aP2). *Acta Crystallogr., Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2006**, *62*, 1058–1060.
52. Ory, J. J.; Kane, C. D.; Simpson, M. A.; Banaszak, L. J.; Bernlohr, D. A. Biochemical and crystallographic analyses of a portal mutant of the adipocyte lipid-binding protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9793–9801.
53. Ory, J. J.; Banaszak, L. J. Studies of the ligand binding reaction of adipocyte lipid binding protein using the fluorescent probe 1, 8-anilinonaphthalene-8-sulfonate. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1107–1116.
54. Ory, J. J.; Mazhary, A.; Kuang, H.; Davies, R. R.; Distefano, M. D.; Banaszak, L. J. Structural characterization of two synthetic catalysts based on adipocyte lipid-binding protein. *Protein Eng.* **1998**, *11*, 253–261.
55. LaLonde, J. M.; Bernlohr, D. A.; Banaszak, L. J. X-ray Crystallographic Structures of Adipocyte Lipid-Binding Protein Complexed with Palmitate and Hexadecanesulfonic Acid. Properties of Cavity Binding Sites *Biochemistry* **1994**, *33*, 4885–4895.
56. LaLonde, J. M.; Levenson, M. A.; Roe, J. J.; Bernlohr, D. A.; Banaszak, L. J. Adipocyte lipid-binding protein complexed with arachidonic acid. Titration calorimetry and X-ray crystallographic studies. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25339–25347.
57. Xu, Z.; Bernlohr, D. A.; Banaszak, L. J. The adipocyte lipid-binding protein at 1.6-Å resolution. Crystal structures of the apoprotein and with bound saturated and unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7874–84.
58. Xu, Z. H.; Bernlohr, D. A.; Banaszak, L. J. Crystal structure of recombinant murine adipocyte lipid-binding protein. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3484–3492.

59. Xu, Z. H.; Buelt, M. K.; Banaszak, L. J.; Bernlohr, D. A. Expression, purification, and crystallization of the adipocyte lipid binding protein. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14367–14370.
60. Maria, J. P.; Jonas, U.; Stefan, S.; Thomas, L.; Tomas, Å.; Mats, W.; Johan, S.; Structure-Based Screening As Applied to Human FABP4: A Highly Efficient Alternative to HTS for Hit Generation *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11874–11880.
61. Furuhashi, M.; Tuncman, G.; Görgün, C.Z.; Makowski, L.; Atsumi, G.; Vaillancourt, E.; Kono, K.; Babaev, V.R.; Fazio, S.; Linton, M.F.; Sulsky, R.; Robl, J.A.; Parker, R.A.; Hotamisligil, G. S. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature.* **2007**, *447*, 959–965.
62. Miyanaga, W.; Sugiki, M.; Ejima, C.; Tokumasu, M.; Yoshida, T.; Takeshita, S. *patent number WO2014003158*, **2014**.
63. 中野達也、望月祐志、甘利真司、小林将人、福澤薫、田中成典 フラグメント分子軌道法に基づいた生体巨大分子の電子状態計算の現状と今後の展望 *J. Comput. Chem. Jpn.*, **2007**, *6*, 173–184.
64. Mochizuki, Y.; Nakano, T.; Koikegami, S.; Tanimori, S.; Abe, Y.; Nagashima, U.; Kitaura, K. A parallelized integral-direct second-order Moller-Plesset perturbation theory method with a fragment molecular orbital scheme. *Theor. Chem. Acc.*, **2004**, *112*, 442-452.
65. Mochizuki, Y.; Koikegami, S.; Nakano, T.; Amari, S.; Kitaura, K. Large scale MP2 calculations with fragment molecular orbital scheme *Chem. Phys. Lett.*, **2004**, *396*, 473-479.

66. Fedorov, D. G.; Kitaura, K. Second order Moller-Plesset perturbation theory based upon the fragment molecular orbital method, *J. Chem. Phys.*, **2004**, *121*, 2483-2490.
67. Pierce, A. C.; Sandretto, K. L.; Bemis, G. W.; Kinase inhibitors and the case for CH...O hydrogen bonds in protein-ligand binding. *Proteins*. **2002**, *49*, 567–576.
68. Yan, W.; Huang-Quan L.; Wai-Kit, L.; Wei-Cheng, L.; Jin-Fang, Z.; Jian-Shu, H.; Tsz-Ming, I.; Mary, M, W.; David, C, W. Pimozide, a Novel Fatty Acid Binding Protein 4 Inhibitor, Promotes Adipogenesis of 3T3-L1 Cells by Activating PPAR γ . *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 211–218.

7 謝辞

本研究を遂行し、学位論文にまとめるにあたり、多大なご支援とご指導を賜りました皆様に感謝申し上げます。

研究事例1では、研究の推進と論文化において、多大なご支援とご助言を頂きました味の素ノースアメリカ社の榛葉信久センター長に、深く感謝申し上げます。また、ドッキングやMD計算、その結果の解析方法までの一連の計算に関わる技術を親身にご指導下さり、研究事例2と合わせて、本学位論文へご助言を賜りました、産業技術総合研究所の広川貴次チーム長に、深く感謝申し上げます。計算結果を変異実験で実証して下さいました味の素株式会社研究開発企画部の横山敬一部長、味の素株式会社バイオ・ファイン研究所の中村美奈研究員に深く感謝申し上げます。

研究事例2と学位取得の全般に渡り、多くのご指導とご助言を頂きました、味の素株式会社イノベーション研究所の高橋一敏研究員、杉木正之主任研究員、水越利巳グループ長に感謝いたします。的確なご助言と共に、常に温かい励ましのお言葉を頂いたことに、言葉にならないほど感謝いたしております。NMRによるFABP4の検証をして頂いた味の素株式会社イノベーション研究所の五十嵐俊介研究員、阻害剤の合成と評価をして下さいました旧味の素製薬株式会社の宮永渉主任研究員、竹下亘主任研究員、江島智子研究員、吉田智美研究員、徳増宗孝主任研究員、畑中敏宏課長に深く感謝申し上げます。

私の研究者としての基盤を築いて下さいました、平山和雄氏、理化学研究所

の明石知子准教授、鈴木榮一郎氏、味の素株式会社イノベーション研究所の宮野博基盤技術研究所長、味の素株式会社の石川弘紀部長、味の素株式会社イノベーション研究所柏木立己主幹研究員、山田尚之主幹研究員、北里大学梅山秀明名誉教授に深く感謝申し上げます。博士取得の機会を下さった北里大学広野修一教授に深く感謝申し上げます。

最後に、これまで自分の目指す道を進むことに対し、温かく見守り、支援し続けて下さった父 新津秀男、母 新津昭子、妹 卯月文、夫 田上智行、長男 椋、長女 双葉、高校の恩師、上智大学理工学部の遠藤明准教授、友人に対し、深い感謝の意を表して謝辞といたします。

