

構造活性相関部会・ニュースレター <1 April, 2012>

SAR News No.22

「目次」

///// Perspective/Retrospective ///// X線自由電子レーザー・SACLA

石川 哲也 … 2

///// Cutting Edge /////

ヒトノイラミニダーゼーシアル酸誘導体複合体相互作用の非経験的フラグメント 分子軌道法計算に基づく相関解析 (LERE-QSAR) 比多岡 清司 ・・・8

United3D: 2つのコンセンサス法によるタンパク質予測構造評価プログラム

寺師 玄記 … 17

///// Activities /////

<報告> 第 39 回 構造活性相関シンポジウム開催報告 <会告> 構造活性フォーラム 2012「GPCR 研究の最前線」 第 40 回 構造活性相関シンポジウム 部会役員人事

X線自由電子レーザー・SACLA

理化学研究所播磨研究所·石川哲也

1. はじめに

本年3月に世界で2例目のX線自由電子レーザー・SACLA が兵庫県播磨科学公園都市の SPring-8の隣で共用運転を開始した。SACLA は SPring-8 Angstrom Compact free-electron Laser の 略で、当分の間世界最短波長のX線レーザーとなる。日本薬学会の皆様には、SPring-8 はある程 度ご利用いただいているものと思量するが、SACLA に関してもこのような形でご紹介する機会 を頂けたことを感謝する。ここでは、SACLA の概要と基本性能を紹介した上で、コヒーレント X線による原子分解能イメージングの原理を概説し、医学や薬学と関係しそうな SACLA の応用 の可能性について議論したい。

光を用いて物を観察する場合、どれだけ細かい物が分解できるかという量(これを解像度あるいは分解能という)は、観察に用いる光の波長の半分程度が限界である[1]。したがって、波長0.数ミクロンの可視光でいくら頑張っても原子や分子を見ることはできない。ところが、可視光の1/1000程度の波長のX線を用いると、0.数ナノメートルの解像度を持ち、分子中の原子の並びが見えてくる。これが、SPring-8などのX線放射光が非常に多くの方に利用されている最大の理由である。

SPring-8 のようなインコヒーレントな光源では、N 個の電子が出す光の強度は、1 個の電子が 出す強度のN倍になるが、SACLAのようなコヒーレント光源ではN²倍になる。このことから、 SACLAのピーク輝度はSPring-8 の 10 億倍となり、一方でパルス幅は 1/1000 以下となる。すな わち、非常に明るいX線が極短時間出るのがSACLAの特徴であり、波長が短いという特徴をあ わせて考えれば、原子・分子の世界の非常に高速で動き回っている現象の一瞬をとらえて観察す るための光を提供する装置といって良い。例えばタンパク分子の構造解析の場合SPring-8 では、 原子レベルの構造を結晶化することで平均として観察していたが、SACLAでは個々の分子を観 察することが原理的には可能となる。特に、一瞬を切り取って観察することを考えると、化学反 応などに伴う分子のダイナミクスの解析に利用されるものと考えられている。

2. SASE 型 X 線自由電子レーザーとしての SACLA

レーザーが 1960 年に発表されて[2]から長年にわたって、その短波長化に向けての努力が続け られてきた。X 線レーザーの可能性が拓けたのは 1980 年代半ばに、自己増幅自発放射原理 (Self-Amplified Spontaneous Emission; SASE)[3]が発見されたことによる。線形加速器と長いアン ジュレータの組み合わせでのX線自由電子レーザーが建設できる可能性が示された。1990年代 半ばに、米国の国立スタンフォード線形加速器センターで、高エネルギー物理研究に利用されて きた2マイル線形加速器を利用してX線自由電子レーザーを建設する計画が策定され、2009年 に 0.15nm でレーザー発振を観測した Linac Coherent Light Source (LCLS)計画に結実していく[4]。 一方で、1990年代後半にはドイツ・ハンブルグのドイツ電子シンクロトロン研究所(DESY)で、 超伝導線形加速器を用いた素粒子物理学研究のための電子・陽電子線形衝突器と X 自由電子レ ーザー施設を組み合わせた TESLA 計画が策定され、そのX線自由電子レーザー部分が後のヨー ロッパX線自由電子レーザー計画(Euro XFEL、2015年完成予定とされている)に繋がっていった [5]。この時期我が国では、ちょうど SPring-8 の運転が始まったころで、次世代光源としての X 線自由電子レーザーの話題は殆ど出なかった。しかし SPring-8 で長い真空封止型アンジュレー タを世界で初めて建設し[6]、また1kmの長尺ビームラインを建設[7]してコヒーレントX線の 基礎研究を開始すると、欧米の X 線自由電子レーザーに向けての検討会議などでこれらの紹介 依頼が多数寄せられるようになった。このような機会に、SPring-8 で開発された真空封止型アン

ジュレータを用いて磁場周期を短縮すると、欧米と比べて格段に小型化された X 線自由電子レ ーザーが建設可能であると発想したことが SACLA のそもそもの発端である[8]。

しかし、小型化するためには、欧米に比べ高品質な電子ビームを用意する必要があり、真空封 止型アンジュレータも、SPring-8の標準の半分程度の磁場周期を持つものを開発する必要があっ た。また、一層の小型化のために、加速勾配が大きい新しい加速管の開発を行うことにした。こ れらの要素技術を確立し SACLA に備えるための研究開発プログラムが、理研内で 2001 年度に 開始された。要素技術開発は比較的順調に進み、2003 年度末ころには、基礎的要素技術に目途 がついた。そこで、2004 年度に波長 0.1 ナノメートルをターゲットとする施設の概念設計をおこ なった上でレポートを作成し[9]、それに基づいてインターナショナルな評価を実施した。その 結果は非常に高い評価を頂いたが、評価委員会からそれまでの電子エネルギー6GeV を 8GeV に 上げて、SPring-8 への入射を可能にすべきとの提言を受け、設計変更を行った。これと並行して、 国内の評価委員会なども開かれたが、非常に野心的な計画であるため、いきなり実機建設を始め るのではなく、1/32 スケールのプロトタイプ機から始めよということになり、250MeV 線形加速 器をベースとする極紫外領域自由電子レーザーの建設を行うことになった。これが、現在でも波 長 60nm 領域で多くの方に利用されている SCSS 試験加速器[10]であるが、この建設と運転によ り実機建設に向けての多くの課題が解決され、いよいよ 2006 年から 5 年間での SACLA 実機建 設に向かうこととなった。

2006年は、国の第三期科学技術基本計画が始まった年であり、SACLAはその中で「国家基幹 技術」に指定され推進されることになった。完成後には、SPring-8と同様に供用施設として国内 外を問わずに利用者に開放することとされた。SPring-8との様々な相乗効果を考慮して、SPring-8 に隣接して設置することとなった。直接的な相乗効果の一つは、将来の低エミッタンス電子ビー ム入射に備えて SACLA線形加速器から SPring-8 蓄積リングへの入射路を整備したことであり、 もう一つは、SACLAの光と SPring-8の光を同一試料上に導くために、相互利用実験施設を整備 したことである。SACLA完成後の SPring-8 サイトの航空写真を図1に示す。



図 1. SACLA 完成後の SPring-8 サイト

SACLA は XFEL 加速器棟に設置された長さ約 400m の線形加速器で電子を 8GeV まで加速し て、XFEL 光源棟内の長いアンジュレータに通し、SASE 作用によってコヒーレント X 線を発生 させている。線形加速器の最後端に振り分けマグネットを配置し、5 つの FEL ラインと SPring-8 入射ラインに電子ビームを振り分ける(図 2)。現状のファーストフェイズでは、5 本の FEL ラ インの内の中央の BL3 と端の BL1 の整備が行われている。今後、利用者の動向を踏まえながら 順次 BL2, 4, 5 の整備を進めていく予定である。アンジュレータの後方では電子ビームと XFEL ビームが一緒に走るが、XFEL 光源棟の最後部に設置されたビームダンプで電子ビームをアース に落とし、XFEL ビームだけを XFEL 実験研究棟に導入する。実験研究棟内では、コンクリート 製の光学ハッチ内でビーム整形を行って、実験ホール内の実験ハッチに導いている。また、ビー ムラインは XFEL 実験研究棟の後方壁を貫通して SPring-8 のビームと XFEL のビームを同一試 料に当てる相互利用実験施設に導かれる。



SACLA での実験装置配置の基本的な考え方は、「固定された XFEL ビームに対して、実験装置を入れ替えて様々な実験手法に対処する」ことであり、実験ハッチをタンデムに配置して、複数個の実験装置を配置している。それぞれの実験装置はビームラインから比較的容易に退避することが可能であり、圧縮空気浮上の移動機構を備えたものも多い。それらを容易に動かすために、実験ハッチ内床面は特殊な平坦化加工が施されている。SACLA のこの考え方は、LCLS での「装置を固定して光学素子で XFEL ビームを振る」考え方とは対極をなすものであるが、コヒーレント光源に対しては、かねてから"No optics is the best optics"と言われてきた。

実験研究棟には、実験ハッチがタンデムに4つ配置されている。また、ポンプ・プローブ実験 を行うためのフェムト秒レーザー、マイクロメータ集光を行うための KB ミラーが配置されてい る。

3. コヒーレント X 線によるイメージング [11]

+分に周波数が大きい X 線電磁波に対しては、物質内の電子はあたかも自由電子のように振舞 うと近似して得られるのがトムソン散乱である。原点にある電子(質量 m、 電荷 e)が、単色 平面波の X 線を散乱する場合を考える。X 線電磁波の波数ベクトルを K_o、振動数をω、光速度 を c、振幅ベクトルを E_oとすると、単色平面波の電場ベクトル E、磁気誘導ベクトル B は次式 で表される:

$$E = E_o \exp[i(K_o \cdot r \cdot \omega t)]$$
(1)
$$B = \frac{K_o}{\omega} \times E_o \exp[i(K_o \cdot r \cdot \omega t)] = \frac{\hat{k}}{c} \times E$$
(2)

ここで、**k**は**K**_o方向の単位ベクトルを表す。この電磁波は、点電荷にローレンツ力を及ぼす。 ローレンツ力による変位をxとすると、運動方程式は

$$m\ddot{\mathbf{x}} = e\left(\mathbf{E} + \dot{\mathbf{x}} \times \mathbf{B}\right) \tag{3}$$

となる。**x**、**x**は電荷の加速度、速度である。電荷の速度が光の速度より十分小さい場合には、 (3)の第二項は第一項と比較して無視できるので、

$$\ddot{x} \approx \frac{eE}{m}$$
 (4)

となり、原点を始点とする位置ベクトル rの点に、(4)で与えられる加速度を持つ電荷が作る放射場 $E_{red}^{p.c.}$ は、

$$\boldsymbol{E}_{\rm rad}^{\rm p.c.} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_{\rm s}c^2} \frac{e(\boldsymbol{\ddot{x}} \times \boldsymbol{r}) \times \boldsymbol{r}}{r^3}$$
(5)

で与えられる。ここで ε_o は真空の誘電率、r = rである。

電荷が分布した場合、ある領域に電子が数密度 $\rho(\mathbf{x})$ で分布しているものとする。入射 X 線として、前と同じ単色平面波(1)を考え、波数ベクトル K_sの方向に散乱される電磁場を考えると、原 点から \mathbf{x} にある微小体積要素 $d^3\mathbf{x}$ 内の電子数は $\rho(\mathbf{x}) d^3\mathbf{x}$ であり、この位置で入射波の位相は原点 での位相から $iK_s \cdot \mathbf{x}$ 変化し、散乱波の位相は原点からの散乱波の位相と $iK_s \cdot \mathbf{x}$ 変化するので、 $\rho(\mathbf{x}) d^3\mathbf{x}$ からの散乱波への寄与は、(5)の $E_{red}^{pc.}$ を用いて

$$d\boldsymbol{E}_{\rm rad}^{\rm d.c.} = \boldsymbol{E}_{\rm rad}^{\rm p.c.} \rho(\boldsymbol{x}) \exp\left[-i(\boldsymbol{K}_s - \boldsymbol{K}_o) \cdot \boldsymbol{x}\right] d^3 \boldsymbol{x}$$
(6)

と表すことができる。従って、全体からの散乱は、分布電荷全体にわたって(6)を積分すること により求めることができ、

$$\boldsymbol{E}_{\text{rad}}^{\text{d.c.}} = \boldsymbol{E}_{\text{rad}}^{\text{p.c.}} \iiint \rho(\boldsymbol{x}) \exp\left[-i(\boldsymbol{K}_s - \boldsymbol{K}_o) \cdot \boldsymbol{x}\right] d^3 \boldsymbol{x}$$
(7)

で表される。この式は、分布電荷からの散乱電場が、原点に置かれた電子からの散乱電場に、電荷数密度のフーリエ変換をかけたものになっていることを示す。これは、初歩的な X 線結晶回 折の教科書に示されている方法であり、結晶回折の運動学的理論ではこの後*p*(*x*)に結晶の周期性 を導入し、積分を単位格子内の積分(=結晶構造因子)と位相のついた格子和に分解するプロセ スを辿り、格子和からラウエ関数を導出してブラッグ反射を導く。しかしながら、(7)式自体は 一般的な電荷分布を仮定するので、周期性を持たない物質からの X 線散乱でも成り立つ式であ る。但し、重要な仮定は単色平面波入射であり、入射波がコヒーレントであることを仮定するこ とによって、一つのフーリエ積分で表されるのである。

散乱電場を位相も含めて測定することが出来れば、(7)式の $E_{rad}^{d.c.}$ が直接計測できるので、それを逆フーリエ変換することによって電荷数密度 $\rho(\mathbf{x})$ を求めることができる。これは、構造を決定することと等価であり、空間分解能の理論的下限値は波長であるため、X線を使うと原子レベルでの顕微法となる。

しかしながら、現実に測定することができるのは位相が消えてしまった強度であり、真空の透 磁率をμ。とすると、次式によって与えられる量である。

$$I = \sqrt{\frac{\varepsilon_o}{\mu_o}} \left| \boldsymbol{E}_{\text{rad}}^{\text{d.c.}} \right|^2 = \sqrt{\frac{\varepsilon_o}{\mu_o}} \left| \boldsymbol{E}_{\text{rad}}^{\text{p.c.}} \right|^2 \left| \iiint \rho(\boldsymbol{x}) \exp\left[-i \left(\boldsymbol{K}_s - \boldsymbol{K}_o \right) \cdot \boldsymbol{x} \right] d^3 \boldsymbol{x} \right|^2$$
(8)

この測定量からは、散乱電磁場の振幅は求まっても、位相は求まらない。従って、先に述べたシ ナリオでの顕微法を完成させるためには、何らかの方法で位相を回復する必要がある。

コヒーレント X 線を有限な試料に照射した場合、(8)式で表されるフラウンホーファー回折強 度はナイキスト間隔[12]より細かい間隔でサンプリングすることが可能である。この間隔が十分 に小さくオーバーサンプリング比が 2 を超えている場合には、位相情報は強度情報の中に原理的 に埋め込まれていると考えることができる[13]。この位相情報は逐次近似法により回復可能であ ることが Gerchberg と Saxton により示され[14]、その後 Fienup は逐次近似の収束が早い方法とし てハイブリッド入出力法(HIO)を開発した[15]。この方法の詳細については紙数の都合で省略す るが、原理的には、測定強度から得られる振幅にランダムな位相を付けて逆フーリエ変換を行う と、ランダムな初期位相に対応する電荷数密度*p*(*x*)が得られる。密度は、負にならないので、負 になった点で0に置き換えてフーリエ変換を行うと、最初の振幅とは異なる散乱強度振幅と位相 を与える。この振幅を測定強度から得られる振幅に置き換えて逆フーリエ変換を行い、得られた 電荷数密度で負となる点で再び0に置き換える。この操作を繰り返した時に収束する場合、収束 した位相は測定された電場が持っていた位相と考えることができる。

位相回復法によって X 線コヒーレント散乱強度から散乱体の実空間分布を再構成するコヒー レント X 線散乱顕微法は Miao たちによって軟 X 線領域で示され[16]、その後 Miao と我々のグ ループの協力によって硬 X 線領域に拡張された[17]。X 線では高分解能の実空間再構成が可能で あること、不透明な物体の内部構造も再構成可能であること、光学素子作成技術の限界から結像 光学系による超高分解能顕微鏡の構築が困難であることから、大きな注目を集め、今後 X 線自 由電子レーザー光源からの強力なコヒーレント X 線源を利用することによって大きく発展する ことが期待されている。

4. 医学・薬学への応用

前節で示した、コヒーレント X 線散乱は、タンパク質単分子、タンパク一タンパク複合体、 タンパク一低分子複合体などでの原子分解能でのイメージングを原理的に可能とする。しかしな がら、X 線自由電子レーザーといえども、単一分子や単一複合体を試料としてシングルショット で原子分解能データを取得するのは強度的に困難であるので、非常に多くのショットでのデータ を並べ替え、さらに平均化するという作業が必要になる。具体的な実験方法としては、エアロゾ ルや、水滴包含物として試料を XFEL ビーム上に送り、コヒーレント散乱強度を記録する方法が LCLS で提案・開発され SACLA でも利用可能となっている。試料は、XFEL パルスでたたかれ ると電子が飛び出し、ある程度の時間後に陽イオンが静電反発力でばらばらになるクーロン爆発 を起こしてしまう。電子密度の構造が保たれるのは、照射後数十フェムト秒と見積もられており、 出来るだけ短い XFEL パルスでデータ収集を行う必要があることが指摘されている[18]。一方、 SACLA での独特の方法として、クライオ電子顕微鏡を同様に氷埋した試料からの散乱イメージ ングの平均化によって構造解析を行う手法の開発も進められている[19]。これらのイメージング 手法は、タンパク単分子やその複合体に留まらず、より大きな細胞小器官やウィルスなどの高分 解能イメージングに応用可能であり、XFEL の短パルス性の特徴を活かすと、「何かをしている 瞬間」の構造イメージを取得することが可能となろう。

とはいっても、全く未知の構造を、単分子状態で、XFEL 散乱データのみから決定するために は、莫大なデータ量と高いデータ処理能力が必要となり、神戸の「京コンピュータ」との連携を 視野に入れざるを得ない。一方で、複合体を作る構成要素タンパク構造が結晶構造解析で決定さ れているような場合には、結晶構造解析で決まった原子座標を動かすことによって観測されたコ ヒーレント散乱パターンと合致する座標を見つけるというアルゴリズムによって、比較的容易に 構造決定ができると予測されている。同様に、結晶構造解析で原子座標が決まったタンパクを単 分子にして構造イメージを作ると、タンパクの動きが見えてくる。タンパクは動きながら働いて いることを考えると、タンパクの動きを見ることは非常に重要であり、XFEL 利用の大きなター ゲットとなるものと考えられる。この考えを更に進めると、複合体のダイナミクス計測にも発展 するはずであり、タンパク科学が形を結晶構造解析で決めて、その後計算により機能を推測する 段階から、機能を発揮する様子をも観測してしまう段階に移行していくことが考えられる。そう なれば、まさに XFEL は「見てきたような話を本当にみてしまう」光となる。

タンパクの構造解析に関しては、2010年にLCLSで「ナノ結晶構造解析」が発表されて大きな話題となった[20]。一方向のスタッキングが10程度の小さな結晶でも、ラウエ関数での強度 増大は10⁶程度になるので、シングルショットデータである程度の高分解能データ取得が可能で あり、このようなナノ結晶からの回折パターンを非常に多く集めることによって、粉末結晶解析 と同様な手法での構造解析が可能となる。今まで結晶化が困難だとされてきた膜タンパク等であ っても、通常の放射光X線結晶構造解析には小さすぎるがXFELのナノ結晶解析には十分な大 きさの結晶ができている場合も多くあると考えられており、今後の展開が期待される。ナノ結晶 構造解析で原子座標が定まれば、それをもとに単分子にした場合のダイナミクス研究を展開できることは上で述べたとおりである。

SACLA ではまた単結晶構造解析をシングルショットで行うことで、ダメージフリーの構造データを取得する可能性についての開発が進められている。これは、従来の放射光計測でのあいまいな点をはっきりさせるものであり、XFEL と放射光施設の両方を同じ場所に持つ播磨の優位性を今後伸ばしていく実験手法だと思われる。

5. おわりに

SACLA は 2012 年 3 月に供用が開始され、現在まさに新しいサイエンスを開拓している最中である。ここで紹介した実験手法の多くは、SACLA 稼働前に検討されたものであり、SPring-8 での経験によれば、本物は実際に光を見た後で出来上がる。SAR News の読者諸賢から、たくさんの「本物を作る人たち」が現れることを期待している。

参考文献

- [1] 例えば、Born and Wolf, 'Principle of Optics', 7th edition, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1999).
- [2] T. H. Maiman, Nature (London) **187** (1960) 493-494.
- [3] J. B. Murphy and C. Pellegrini, J. Opt. Soc. Am. B 2 (1985) 259-264.
- [4] https://slacportal.slac.stanford.edu/sites/lcls_public/Pages/Default.aspx
- [5] http://www.xfel.eu/
- [6] H. Kitamura, T. Bizen, T. Hara, X. Marechal, T. Seike and T. Tanaka, Nucl. Instrum. Methods A467-468 (2001) 110-113.
- [7] T. Ishikawa, K. Tamasaku, M. Yabashi, S. Goto, Y. Tanaka, H. Yamazaki, K. Takeshita, H. Kimura, H. Ohashi, T. Matsushita and T. Ohata, SPIE Proceedings **4145** (2001) 1-10.
- [8] T. Ishikawa and H. Kitamura, "Beamlines for coherent x-ray applications at SPring-8", 7th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2000), Berlin, Gernmany, Aug. (2000).
- [9] http://xfel.riken.jp/pdf/SCSSCDR.pdf
- [10] T. Shintake, H. Tanaka, T. Hara, T. Tanaka, K. Togawa, M. Yabashi, Y. Otake, Y. Asano, T. Bizen, T. Fukui, S. Goto, A. Higashiya, T. Hirono, N. Hosoda, T. Inagaki, S. Inoue, M. Ishii, Y. Kim, H. Kimura, M. Kitamura, T. Kobayashi, H. Maesaka, T. Masuda, S. Matsui, T. Matsushita, X. Marechal, M. Nagasono, H. Ohashi, T. Ohata, T. Ohshima, K. Onoe, K. Shirasawa, T. Takagi, S. Takahashi, M. Takeuchi, K. Tamasaku, R. Tanaka, Y. Tanaka, T.Tanikawa, T. Togashi, S. Wu, A. Yamashita, K. Yanagida, C. Zhang, H. Kitamura and T. Ishikawa, Nature Photonics 2 (2008) 555-559.
- [11] 石川哲也、応用物理、77 (2008) 1449-1453.
- [12] 例えば、http://www.sice.jp/handbook/%E8%B6%85%E8%A7%A3%E5%83%8F
- [13] J. Miao, T. Ishikawa, E. H. Anderson and K. O. Hodgson, Phys. Rev. B 67 (2003) 174104-1-6.
- [14] R. W. Gerchberg and W. O. Saxton, Optik (Stuttgart) 35 (1972) 237-246.
- [15] J. R. Fienup, J. Opt. Soc. Am. A 4 (1987) 118-123.
- [16] J. Miao, P. Charalambous, J. Kirz and D. Sayre, Nature 400 (1999) 342-344.
- [17] J. Miao, T. Ishikawa, B. Johnson, E. H. Anderson, B. Lai and K. O. Hodgson, Phys. Rev. Lett. 89 (2002) 088303-1-4.
- [18] R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu, Nature **406** (2000) 752-757.
- [19] M. Nakasako et al. in preparation.
- [20] H. N. Chapman et al., Nature **470** (2011) 73-77.

///// Cutting Edge /////

ヒトノイラミニダーゼ-シアル酸誘導体複合体相互作用の非経験的 フラグメント分子軌道法計算に基づく相関解析 (LERE-QSAR)

徳島大学大学院薬科学教育部 創薬理論化学分野 比多岡 清司

1. はじめに

インフルエンザの治療には、Zanamivir (Relenza[®]), Oseltamivir (Tamiflu[®]), および Peramivir (Rapiacta[®]) (図 1)や, Laninamivir (Inavir[®])が代表的な抗インフルエンザ剤として広く使用されている. これら阻害剤は、インフルエンザウイルスの感染・増殖サイクルにおいて、子孫ウイルスの遊離を担う酵素であるノイラミニダーゼ (NA, Neuraminidase, EC 3.2.1.18)を選択的に阻害する目的で開発された. いずれの抗インフルエンザ剤も基質であるシアル酸の遷移状態アナログとして、NA の活性中心に競合的かつ強力に結合し、これを阻害する. 一方で、特に Oseltamivir 服用後の精神・神経症状の有害事象が報告されており、これら NA 阻害剤のヒトに対する影響が懸念される. 考えられる原因の一つとして、ヒトノイラミニダーゼ (hNEU)への影響が指摘され、抗インフルエンザ剤の hNEU に対する阻害効果の検討が行われている.

現在,ヒトにおいては細胞内局在性や基質特異性の異なる 4 種類のノイラミニダーゼ (hNEU1-4)が同定されており,これらは細胞増殖・分化およびアポトーシスなどの様々な細胞機 能に関与している.中でも,細胞質に局在するヒトノイラミニダーゼ 2 (hNEU2)は,特に筋分化 において重要な役割を担っており,動物NAにおいては初めて,またhNEU1-4のうちでは唯一そ の3次元立体構造が明らかとなっている.hNEU2とインフルエンザウイルスのN1ノイラミニダ ーゼ (N1-NA)を比べた場合,両者のアミノ酸残基の配列相同性はそれほど高くないものの (identity: ~16%, similarity: ~25%),タンパク質全体の構造的特徴 (NA に特有の 6 枚羽根の β-propeller 構造等)や活性部位のアミノ酸残基については比較的類似している.したがって,NA 阻害剤とhNEU2との間の相互作用メカニズムをN1-NAの先行研究 [1,2]と対照させて理解する ことは、高い選択性と副作用の少ない新規 NA 阻害剤の開発につながると思われる.

本研究では、hNEU2 と抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体との複合体について、 非経験的フラグメント分子軌道 (ab initio Fragment Molecular Orbital (FMO))法等による分子科学 計算ならびにその結果に基づく Linear Expression by Representative Energy terms (LERE)-QSAR 解 析 [3-5]から、複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動を支配する相互作用様式ならびに その変動に対するシアル酸誘導体の各部分構造の寄与を原子および電子レベルで定量的に明ら かにすることを目的とした.また、Oseltamivir のヒト (hNEU2)およびインフルエンザウイルス (N1-NA)に対する結合選択性の違いについても、先行研究ならびに詳細な相互作用解析の結果に 基づき議論する.



2. 化合物セット

Chavas らにより報告されているシアル酸誘導体 のhNEU2に対する阻害活性データ [6]に基づき,本 解析では 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetyl-neuraminic acid (Neu5Ac2en, DANA)とその誘導体を含む一連の シアル酸誘導体 (IEM (Compound 1), HEM (2), DEM (3), DANA (4)) (図 2)および抗インフルエンザ剤 (Zanamivir (5), Oseltamivir (6), Peramivir (7)) (図 1)の 合計 7 化合物 (阻害定数 *K*_i (mM): 0.88 (1), 0.74 (2), 1.4 (3), 0.14 (4), 0.017 (5), 5.0 (6), 0.33 (7))を使用した. 本解析における化合物セットは,図1および2に示 すように Fragments A, C部位の側鎖基の構造のみな らず, Fragment B 部位の母格構造も異なる多様な化 合物で構成される.



3. 阻害剤と hNEU2 の複合体構造のモデリング

Oseltamivir (Compound 6)以外の化合物 (Compounds 1-5,7)と hNEU2 の複合体の X 線結晶解析 構造は解明されているが, 中でも DANA (4)と hNEU2 の複合体構造 (PDB code: 1VCU, 図 3a, [7]) におけるB鎖は、欠落アミノ酸残基が最小であるため、これを各化合物の複合体の初期構造とし て使用した. DANA-hNEU2 複合体構造における DANA と IEM (Compound 1, PDB code: 2F11), HEM (2, 2F12), DEM (3, 2F13), Zanamivir (5, 2F0Z), Oseltamivir (6, 2HU4)および Peramivir (7, 2F10) の化合物同士の座標の重ね合わせ操作から、DANAの座標をそれぞれの化合物の座標に置き換え ることで、各化合物の複合体初期構造を構築した.得られた各複合体構造に対して構造最適化計 算を行う際には. 特に Fragment A 部位との水素結合あるいは静電相互作用に関与するアミノ酸 残基 (Glu111, Tyr179, Tyr181, Glu218, Gln270) (図 3b)については, 調和ポテンシャル型の原子位 置拘束 (10 kcal/mol/Å²)を設けることで X 線結晶解析構造からの大きな逸脱を防いだ. なぜなら, これら Fragment A 部位の近傍に位置する構造領域は, hNEU2の apo 構造における disorder 領域の 一部であり、リガンドの結合に伴い大きく構造変化する領域であるためである [7]. また、イン フルエンザウイルスのNAの場合と同様に、複数個のhNEU2-リガンド複合体のX線結晶解析構 造 (PDB codes: 2F11, 2F12, 2F13, 2F25 (dimer), 2F27 (dimer), 1VCU (dimer))において, リガンドと hNEU2 との間の相互作用を媒介する水分子が確認された.したがって, Fragment C 部位 (hydroxyl, amino, guanidino 基)に依存する特異的な水分子 (hydroxyl/amino 基: W1, W2; guanidino 基: W1)を考慮してそれぞれの複合体構造を構築した.



図 3. (a) hNEU2-DANA 複合体の X 線結晶解析構造 (PDB code: 1VCU)および (b) その活性部位近 傍における相互作用. W1 および W2 は水分子を, Pockets A, B, C は, それぞれ Fragments A, B, C の 近傍のアミノ酸残基を表す.

4. LERE-QSAR 解析

代表的な抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う結合 相互作用の全自由エネルギー変化 ΔG_{obs} (= 2.303 *RT* log *K*_i, *T* = 310 K)は,幾つかの相互作用エネ ルギー項の和として下式 (1a)で表すことができる (エネルギーの加成性).

$$\Delta G_{\rm obs} = \Delta G_{\rm bind} + \Delta G_{\rm sol} + \Delta G_{\rm diss} + \Delta G_{\rm others}$$

(1a)

 ΔG_{bind} は一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の結合相互作用エネルギー、 ΔG_{sol} は複合体形成に伴う 水和自由エネルギー変化、 ΔG_{diss} は各シアル酸誘導体の Fragment C 部位 (hydroxyl, amino, guanidino 基)の解離自由エネルギー変化を表す. ΔG_{others} は上記の 3 種類の代表自由エネルギー項 (representative energy terms)以外の相互作用自由エネルギー項の総和を表し、複合体形成前後にお けるタンパク質構造の変形に伴う変形エネルギーなどを含む penalty energy 項と考えられる. 我々はここで、一般に、骨格が同一である一連の構造類似体 (congeneric series)とタンパク質と の複合体形成においては、 ΔG_{others} は代表自由エネルギー項の総和 ($\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{diss}}$)に線形 あるいは正の定数と仮定する (LFEP, Linear Free-Energy Principle, $\Delta G_{\text{others}} = \beta (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \Delta G_{\text{diss}}$)+ *const*: $\beta < 0$ and/or *const* > 0) [3–5]. 本解析では、シアル酸誘導体の Fragments A, C 部位の 独立した置換基に応じて、 $\Delta G_{\text{others1}}$ は ($\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}$) + *const* ($\beta^1 < 0$ and/or *const* > 0) [3–5]. 本解析では、 γT ル酸誘導体の Fragments A, C 部位の 独立した置換基に応じて、 $\Delta G_{\text{others2}}$ は ΔG_{diss} に線形: $\Delta G_{\text{others1}} = \beta^1 (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + const$ ($\beta^1 < 0$ and/or *const* > 0)および $\Delta G_{\text{others2}}}$ は $\Delta G_{\text{others2}} = \beta^2 \Delta G_{\text{diss}} + const$ ($\beta^2 < 0$ and/or *const* > 0)と仮定した場合、 $\Delta G_{\text{others1}}}$ は $\Delta G_{\text{others2}}$ の和として表すことができる ($\Delta G_{\text{others1}} = \Delta G_{\text{others1}}$ + $\Delta G_{\text{others2}}$). 以上より、次式 (1b)が得られる.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta^{1}) \left(\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} \right) + (1 + \beta^{2}) \Delta G_{\text{diss}} + const$$
(1b)

ー般に、阻害剤とタンパク質の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})は、結合に伴う enthalpic 変化項 (ΔH_{obs})のみならず、温度に依存する entropic 変化項 ($-T\Delta S_{obs}$)も加わった自由エ ネルギーが支配していると考えられるが、本解析のような大規模分子系に対する entropic 変化項 を分子科学計算・シミュレーションにより定量的に評価することは現状では困難である。一方で、 糖化合物とその分解タンパク質の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})において、 entropic 変化項 ($-T\Delta S_{obs}$)と enthalpic 変化項 (ΔH_{obs})との間に entropy-enthalpy 補償則が良好に成立 すること ($T\Delta S_{obs} = \alpha \Delta H_{obs} + const$: $\alpha = 0.70 \pm 0.20$)が、多くの等温滴定熱量測定 (ITC, Isothermal Titration Calorimetry)の実験から報告されている [8–11]. そのため、本解析における一連のシアル 酸誘導体と hNEU2 の複合体形成においても entropy-enthalpy 補償則が成立することが期待され る. したがって、entropy-enthalpy 補償則から式 (1b)における ΔG_{bind} を変形し ($\Delta G_{bind} = \Delta H_{bind} - T\Delta S_{bind} = (1 - \alpha) \Delta E_{bind} + const$ (α お、溶液中では体積と圧力の変化が無視できるため $\Delta H_{bind} = \Delta E_{bind}$ と置き換えた))、また ΔG_{sol} を変形することで ($\Delta G_{sol} = \Delta H_{sol} - T\Delta S_{sol} = (1 - \alpha) \Delta G_{sol}$ ^{pol} + const (α お、 ΔH_{sol} は水和自由エネルギー変化の静電相互作用エネルギー項 (ΔG_{sol} ^{pol})とほぼ同等 (ΔG_{sol} ^{pol}/ $\Delta H_{sol} = 0.983$)[12, 13]であるため $\Delta H_{sol} = \Delta G_{sol}$ ^{pol} と置き換えた))、下式 (1c)が得られる.

$$\Delta G_{\rm obs} = (1 + \beta^1) (1 - \alpha) \left(\Delta E_{\rm bind} + \Delta G_{\rm sol}^{\rm pol} \right) + (1 + \beta^2) \Delta G_{\rm diss} + const \tag{1c}$$

ここで、 ΔE_{bind} は静電相互作用エネルギー項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$)および分散相互作用エネルギー項 (E^{disp})の 和として表される ($\Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + E^{\text{disp}}$). ΔG_{sol} については、水和自由エネルギー変化の静電相 互作用エネルギー項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}$)に加えて非静電相互作用エネルギー項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpol}}$)の寄与もあるが、 このエネルギー項は entropic 変化項に対応すると考えられ [14–16]、上述の entropy–enthalpy 補償 則の仮定において enthalpic 変化項に線形な項として潜在的に考慮されている. 最終的に式 (1c) から下式 (1d)を導き、これを LERE-QSAR 解析における基本式とした.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta^{1}) (1 - \alpha) \left(\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + E^{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}} \right) + (1 + \beta^{2}) \Delta G_{\text{diss}} + const$$
(1d)

基本式 (1d)において, ($\Delta E_{bind}^{HF} + E^{disp}$)および ΔG_{sol}^{pol} は, それぞれ FMO 法 (MP2/6-31G) [17–21]および連続誘電体モデル (GB, generalized Born モデル; PB, Poisson–Boltzmann 方程式) [22, 23]を用

いて算出した. ここで、 ΔG_{sol}^{pol} はシアル酸誘導体の結合部位以外のわずかな構造変化に対して敏 感であるため、この効果を分子動力学 (MD, AMBER)計算より得られる dynamics trajectory から 統計平均として算出することで考慮した. ΔG_{diss} は各シアル酸誘導体の Fragment C 部位 (hydroxyl, amino, guanidino 基)の解離自由エネルギー変化として、非経験的分子軌道法 (HF/6-31+G(d,p))– 連続誘電体モデル (SCRF-CPCM, Self-Consistent Reaction Field - Conductor-like Polarizable Continuum Model)により評価した. なお、各シアル酸誘導体の Fragment B 部位の carboxyl 基 (COO⁻, pK_a ~ 2.4)および Fragment C 部位の guanidino 基 (NHC(=NH₂⁺)NH₂, pK_a ~ 13)については、 至適 pH (= 5.6) [24]での hNEU2 との複合体形成前後においてほぼ完全に解離していると考えら れるため、本解析では Oseltamivir (Compound 6)の amino 基の解離自由エネルギー変化 (NH₂ + H⁺ → NH₃⁺)のみを評価した.

5. 阻害剤とhNEU2の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化に対するLERE-QSAR 解析

母格構造が異なる多様な化合物セットにも拘わらず,一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合 体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動に対して,物理化学的意味づけにつながる統計的に有意な LERE 相関式 (2)を得ることができた.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta^{1}) (1 - \alpha) (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + E^{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}) + (1 + \beta^{2}) \Delta G_{\text{diss}} - 1.02$$

$$n = 7, r = 0.971, s = 0.331, F = 32.7, (1 + \beta^{1}) (1 - \alpha) = 0.0600, (1 + \beta^{2}) = 0.0829$$
(2)

相関式 (2)において, 実測と計算による全自由エネルギー変化との間には良好な線形関係がある ことが確認できる. また, 式 (2)は entropy-enthalpy 補償則に基づいており, ITC の実験結果 [8–11]からαを 0.70 とした場合, 式 (2)の右辺の第 1 項 ($\Delta E_{bind}^{HF} + E^{disp} + \Delta G_{sol}^{pol}$)および第 2 項 ΔG_{diss} の係数における β^1 , β^2 の値はともに負の値を示す ($\beta^1 = -0.800$, $\beta^2 = -0.917$). このことは, 式 (1b)導出において仮定したとおり, 式 (2)の右辺の第 1 項および第 2 項に対してそれぞれ線形な penalty energy 項の存在を表している. なお, 式 (2)における ΔG_{sol}^{pol} については, GB モデルに基づ き算出した値を用いているが, PB 方程式を用いた場合も統計的に有意な LERE 相関式 (r = 0.985) が得られることを確認している.

全自由エネルギー変化 (ΔGobs)の変動に 対する各エネルギー項の寄与を図4に示す. Oseltamivir (Compound 6)の解離自由エネル ギー変化 (ΔG_{diss})の値は他と比べてわずか に大きいが、これは Fragment C 部位の amino 基の結合状態と非結合状態における 解離自由エネルギー差を反映している.分 散相互作用エネルギー (E^{disp})の寄与は小さ く. 実際にこのエネルギー項を除外した場 合においても、LERE 式が良好に成立する ことから、静電相互作用エネルギー項 $(\Delta E_{bind}^{HF} および\Delta G_{sol}^{pol})$ の寄与が、 ΔG_{obs} の変 動に対して支配的であることが示唆される. 一方で、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} \geq \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}} \geq 0$ 間には良好な 逆相関関係 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} = -1.11 \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}} - 9.10: n =$ 7,r=-0.971)が成立しているが、 *△E*_{bind}^{HF}の寄与 が ΔG_{sol}^{pol} の寄与よりも相対的に大きいことか ら,静電相互作用エネルギー項の中でも特に $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$ の寄与が支配的となる.したがって, 一連のシアル酸誘導体とhNEU2の複合体形成



図 4. 阻害剤と hNEU2 の複合体形成に伴う各エネ ルギー項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}, E^{\text{disp}}, \Delta G_{\text{sol}}^{\text{pol}}, \Delta G_{\text{diss}}, \Delta G_{\text{obs}}, \Delta G_{\text{calc}}$) の変動.

に伴う全自由エネルギー変化の変動に対して、両分子間における静電相互作用 (ΔE_{bind}^{HF})が支配的な役割を果たしていると結論づけられる.

阻害剤の各部分構造の全自由エネルギー変化に対する寄与 6.

FMO 法では、リガンドとタンパク質の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind})に加え、その計算過程 においてタンパク質をアミノ酸残基単位にフラグメント分割するため, リガンドと各アミノ酸 残基との間の相互作用エネルギー (IFIE, Inter-Fragment Interaction Energy)を定量的に解析するこ

とができる. 本節では、通常の FMO 法におけ るタンパク質側のフラグメント分割に加えて, 阻害剤であるシアル酸誘導体を図2で示す位置 において3つのフラグメント (Fragments A, B, C)に分割し、全静電相互作用エネルギー (ΔE_{bind}^{HF}) に対する各フラグメントの寄与およびそれらの全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs}) に対 する寄与を定量的に明らかにする. ΔE_{bind}^{HF}はシ アル酸誘導体とhNEU2の各アミノ酸残基との間の 静電相互作用エネルギー (IFIE^{HF})の総和 (ΣIFIE^{HF}) にほぼ対応し ($\Delta E_{bind}^{HF} = 0.823 \Sigma IFIE^{HF} + 23.6: n = 7$, r=0.996)、シアル酸誘導体を3つのフラグメントに 分割した場合においても、3 つのフラグメントと hNEU2 の各アミノ酸残基との間の IFIE^{HF} の総和 ($\Sigma\Sigma$ IFIE^{HF} (Fragment X), X = A, B, C)と ΔE_{bind}^{HF} との間の良好な相関関係 ($\Delta E_{bind}^{HF} = 0.877 \Sigma\Sigma$ IFIE^{HF} が可能となる. 図5には、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$ と ΔG_{obs} との間の

相関およびΔEbind^{HF}の変動に対する寄与 (割合)を 各フラグメントについて示しているが,相関が最 大であるのはFragment A, 一方で, 変動に対する寄 与が最大であるのは Fragment C であることが確認 できる.

最大の相関を示したシアル酸誘導体の Fragment Aとその近傍に位置する hNEU2の Pocket Aのアミ ノ酸残基との間の IFIE^{HF} 値を図 6a に示す. Fragment A部位に hydroxyl 基を有していない Compounds 1, 6, 7においては、大きな相互作用エネルギーは確認さ れないが、Fragment A 部位に hydroxyl 基を有する化 合物の中で, glycerol 基を有する Compounds 4,5 は Glu111 や Glu218 との間の水素結合による安定化相 互作用エネルギーが確認される (図 3b, 6a). 特に, Glu111 との間の水素結合による大きな安定化相互 作用エネルギーは、Fragment A が担う全安定化相互 作用エネルギーの中で最大である. したがって, 一 連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う 全自由エネルギー変化の変動に対して、特に Fragment A とその近傍の Pocket A との間の水素結 合が最も支配的な役割を果たしていると結論づけ られる.また、一連のシアル酸誘導体の中で DANA (Compound 4) ^(Compound 5) が高い阻害活性値を示すのは、これらが Fragment A 部位に有する glycerol 基における hydroxyl 基が, Glu111 のような Pocket A のアミノ 酸残基との間で,効果的かつ強力な水素結合を 形成できることに起因している.一方で,最大



図 5. 阻害剤と hNEU2 の相互作用における各 部分構造の寄与 (Fragment X: X = A, B, C).

(Fragment X) + 33.8: n = 7, r = 0.993)が存在することから,各フラグメントの寄与についての定量的な議論





の変動を示した Fragment C とその近傍の Pocket C のアミノ酸残基との間の IFIE^{HF}値を図 6b に示

す. Fragment C 部位に中性の hydroxyl 基を有する Compounds 1-4 においては、大きな相互作用エネルギーは確認されないが、正に荷電した amino/guanidino 基を有する Compounds 5-7 は Glu39 や Asp46 との間の水素結合による大きな安定化相互作用エネルギー, Arg41 との間では静電反発相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが確認される(図 3b, 6b). 概して、amino/guanidino 基の方が hydroxyl 基と比べて結合に有効に働いている. したがって、Fragment C が最大の変動を示すのは、DANA を含むシアル酸誘導体 (Compounds 1-4)が有する中性の hydroxyl 基と抗インフルエンザ剤 (Compounds 5-7)が共通に持つ正に荷電した amino/guanidino 基の相互作用の差に起因すると考えられる.

7. Oseltamivir のヒトおよびインフルエンザウイルスに対する結合選択性の違い

現在,臨床において最も使用されている代表的な抗インフルエンザ剤である Oseltamivir (Tamiflu[®]) (図 1)は, インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを選択的に阻害する目的で開発されていることから, ヒトノイラミニダーゼに対する阻害効果は小さいことが期待される. 実際, Oseltamivir のヒト (hNEU2)に対する阻害効果は, インフルエンザウイルス (N1-NA)に対するそれと比べた場合, 有意に小さいことが報告されている (hNEU2: K_i = 5000 (nM) [6]; N1-NA: IC₅₀ = 0.45 (nM) [25]). 本節では, Oseltamivir のヒト (hNEU2)およびインフルエンザウイルス (N1-NA)に対する結合選択性の違いを, N1-NA の先行研究 [1, 2]ならびに相互作用解析から定量的に明らかにする.

先行研究においても、LERE-QSAR 式 (1d)に基づき、Oseltamivir を含む一連のシアル酸誘導体 と N1-NA の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の変動に対して、物理化学的意味づけにつながる統計的に有意な LERE 相関式 (3)を得ている.

 $\Delta G_{\rm obs} = (1 + \beta^{1}) (1 - \alpha) (\Delta E_{\rm bind}^{\rm HF} + E^{\rm disp} + \Delta G_{\rm sol}^{\rm pol}) + (1 + \beta^{2}) \Delta G_{\rm diss} + 30.0$ $n = 8, r = 0.929, s = 0.915, F = 15.8, (1 + \beta^{1}) (1 - \alpha) = 0.517, (1 + \beta^{2}) = 0.589$ (3)

さらに、シアル酸誘導体を3つのフラグメントに分割した詳細な相互作用解析の結果、複合体形成に伴う ΔG_{obs} の変動は、両分子間において特に Fragment A と Pocket A との間の分散相互作用な どに対応する局所的な相互作用によって支配されることを定量的に明らかにしている [1, 2]. 一 方で、hNEU2 と N1-NA の活性部位近傍のアミノ酸残基を比べた場合、基質であるシアル酸の結 合に関与する arginine triad などの Pocket B のアミノ酸残基は両者において高度に保存されている が、Pockets A、C のアミノ酸残基は異なっていることが確認できる (図7). 相互作用エネルギーの 観点においては、正に荷電した amino 基を有する Fragment C と Pocket C との間の静電相互作用エネル ギーの方が、alkoxy 基を有する Fragment A と Pocket A との間の分散相互作用エネルギーに比べて、 Oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する結合選択性を担う要因になると考えられる.



図 7. (a) Oseltamivir-hNEU2 複合体および (b) Oseltamivir-N1-NA 複合体の活性部位近傍における 相互作用. W1 および W2 は水分子を, Pockets A, B, C は, それぞれ Fragments A, B, C の近傍のアミノ酸残基を表す.

先行研究ならびに前節と同様に Oseltamivir を 3 つのフラグメントに分割し,各部分構造の hNEU2 に 対する静電相互作用エネルギー (ΣIFIE^{HF} (Fragment A) = -1.8, ΣIFIE^{HF} (Fragment B) = -104.1, ΣIFIE^{HF} (Fragment C) = -118.6 kcal/mol)と, N1-NA に対するそれ (ΣIFIE^{HF} (Fragment A) = -9.3, ΣIFIE^{HF} (Fragment B) = -112.7, ΣIFIE^{HF} (Fragment C) = -157.1 kcal/mol)を比べた場合, Fragments A, B が担う静電相互作用エネル ギーに大きな差は確認されないが, Fragment C が担う静電相互作用エネルギーにおいて大きな差が確認 される. 図 8 には, Fragment C とその近傍の Pocket C のアミノ酸残基との間の IFIE^{HF} 値を示す. Fragment C の hNEU2 および N1-NA に対する共通した相互作用として, (hNEU2: Asp46; N1-NA: Asp151)との間の水素結合による大きな安定化相互作用エネルギー, (hNEU2: Arg41; N1-NA: Arg156)との間の静電反発相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが確認できるが (図 7, 8), これら共通した相互作用は Oseltamivir の両者に対する結合選択性を担う要因ではない と考えられる. 一方で, (hNEU2: Ile22, Glu39, Asn86; N1-NA: Glu119, Leu134, Glu227)との間には,

両者において相互作用エネルギー差が確認される. 正に荷電した amino 基 (Fragment C)と NI-NA の 酸性アミノ酸残基 (Glu119, Glu227)との間の静電相 互作用エネルギーは、対応する hNEU2 の中性アミノ 残基 (Ile22, Asn86)との間のそれと比べてより安定化 に寄与している. 一方で, hNEU2 の酸性残基 (Glu39) においては、対応する N1-NA の中性残基 (Leu134)と の間では確認されない静電相互作用エネルギーによ る安定化が確認されるが、その安定化の程度は上述 のN1-NA の酸性残基 (Glu119, Glu227)との安定化ほ どではない. これらhNEU2 に特異なアミノ酸残基は、 その他のヒトノイラミニダーゼ (hNEU1, 3, 4)におい てもおおよそ保存されていることから、上記と同様 な相互作用様式がhNEU1, 3, 4においても存在すると 考えられる. したがって, Fragment C とその近傍の ルギー.





図 8. Fragment C (Oseltamivir)と Pocket C (hNEU2, N1-NA)との間の静電相互作用エネ ルギー

Pocket Cのアミノ酸残基との間の静電相互作用エネルギーの違いが, Oseltamivir がヒト (hNEU2) よりもインフルエンザウイルス (N1-NA)に対して強い結合選択性を示す主な要因であると結論 づけられる.

近年,特に Oseltamivir 服用後の精神・神経症状の有害事象が報告されており,懸念される原因 の一つとして,ヒトノイラミニダーゼ (hNEU)への影響が指摘されているが,Oseltamivir がイン フルエンザウイルス (N1-NA)に対して強い結合選択性を示すという上記の解析結果からは,こ の可能性については解釈し難い.一方で,Li ら [26]はアジア人に多い hNEU2 の遺伝的多型 (Arg41Gln 変異体 hNEU2)においては,Oseltamivir の阻害効果が野生型 hNEU2 に比べて増大する ことを見出している.このことは,Oseltamivir の正に荷電した amino 基と Arg41 との間の静電反発 相互作用による大きな不安定化相互作用エネルギーが (図 8),Gln への変異によって消失すると の解釈から理解可能である.しかしながら,hNEU2 は骨格筋にのみ発現するという報告 [27]も あり,Oseltamivir による hNEU2 の阻害が精神・神経症状などの中枢性の有害事象に関与してい るとは考えにくい.したがって,Oseltamivir 服用後の有害事象については,既知の hNEU への影 響よりも、中枢性の症状を生じた患者における未知の hNEU の存在の有無についての検証やイ ンフルエンザ自体に伴い発現する症状の一つとして捉えるなどの検討が必要であると考える.

8. まとめ

本研究では、ヒトの hNEU2 と抗インフルエンザ剤を含む一連のシアル酸誘導体との複合体に ついて、FMO 法等の分子科学計算ならびにその結果に基づく LERE-QSAR 解析を行った.その結 果、一連のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動は、 Fragment A と Pocket A との間の水素結合ないしは静電相互作用によって支配されていること、また、 抗インフルエンザ剤が共通に持つ正に荷電した Fragment C は、hNEU2 の Pocket C との間の相互 作用においても、結合に有効に働いていることを定量的に明らかにした.さらに、Oseltamivir の hNEU2 および N1-NA に対する相互作用において、特に amino 基を有する Fragment C とその近傍 に位置する Pocket C のアミノ酸残基との間の静電相互作用エネルギーの違いが Oseltamivir の結 合選択性に大きく寄与していることを明らかにした.

9. おわりに

本稿ならびに前稿 [1]では, ノイラニミダーゼ (ヒト: hNEU2, インフルエンザウイルス: N1-NA)と一連のシアル酸誘導体との複合体について、分子科学計算に基づく LERE-QSAR 解析 の結果について示した. 両解析ともに, 構築した LERE-QSAR 式 (2)および(3)に基づき, 一連の シアル酸誘導体とノイラニミダーゼの複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の変動を支配す る相互作用様式を原子および電子レベルで定量的に明らかにすることができた.相関式 (2)およ び(3)において, entropy-enthalpy 補償則における α の値がほぼ等しいとした場合 ($\alpha = 0.70 \pm 0.20$), 両者における β^1 , β^2 , const の値は異なる (式 (2): $\beta^{1(2)} = -0.800$, $\beta^{2(2)} = -0.917$, const⁽²⁾ = -1.02; 式 (3): $\beta^{1(3)} = 0.723$, $\beta^{2(3)} = -0.411$, const⁽³⁾ = 30.0). 相関式 (2)における $\beta^{1(2)}$, $\beta^{2(2)}$, const⁽²⁾のそれぞれの 値は、式 (3)のそれらよりも小さいが ($\beta^{1(2)} < \beta^{1(3)}, \beta^{2(2)} < \beta^{2(3)}, const^{(2)} << const^{(3)}$)、このことは一連 のシアル酸誘導体と hNEU2 の複合体形成過程においては、代表自由エネルギーとほぼ線形な強 い penalty energy が存在することを反映しており, 全自由エネルギー変化の変動を支配する静電 相互作用が,活性部位のみならずタンパク質-阻害剤の系全体の変化に関連していると考えられ る. 一方で、相関式 (3)における $\beta^{1(3)}$ 、 $\beta^{2(3)}$ 、 const⁽³⁾の値が大きいことは、化合物によらずほぼ一定 の penalty energy が存在することを示しており、このことは一連のシアル酸誘導体と N1-NA の複 合体形成に伴う変動を支配する分散相互作用が.活性部位近傍において働く短距離相互作用に よるためと考えられる.

以上より、本稿ならびに前稿において示した分子科学計算・シミュレーション技術に基づく LERE-QSAR 解析は、従来の QSAR 解析では得ることが困難である阻害剤の詳細な作用メカニズ ムをより強固な物理化学的意味づけとともに高い化学的精度のもと原子および電子レベルにお いて定量的に理解可能であり、今後の高精度・高確度かつ低コストが要求される論理的創薬にお ける新しい体系的方法論として期待できる.

謝辞

最後になりますが,第 39 回構造活性相関シンポジウムへの参加の御支援ならびに本研究を昨 年に引き続き SAR Presentation Award に御選出いただきました日本薬学会構造活性相関部会,ま た研究の御指導を賜りました中馬 寛教授ならびに吉田 達貞助教をはじめとする諸先生方およ び共同研究者の皆様に心より御礼申し上げます.また,本研究内容を本誌に掲載する機会を与え てくださいました諸先生方ならびに本原稿を丁寧に査読していただきました編集委員の先生方 に深く感謝申し上げます.

参考文献

- [1] 比多岡清司 インフルエンザノイラミニダーゼ-シアル酸誘導体複合体相互作用の非経験的 フラグメント分子軌道法計算に基づく相関解析. SAR News 2011, 20, 8-14.
- [2] Hitaoka, S.; Harada, M.; 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.
- [3] Yoshida, T.; Munei, Y.; Hitaoka, S.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of substituted benzenesulfonamides with carbonic anhydrase using ab initio MO calculations on their complex structures. J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 850–860.
- [4] Munei, Y.; Shimamoto, K.; Harada, M.; Yoshida, T.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of substituted benzenesulfonamides with carbonic anhydrase using ab initio MO calculations on their complex structures (II). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 141–144.
- [5] Hitaoka, S.; Matoba, H.; Harada, M.; Yoshida, T.; Tsuji, D.; Hirokawa, T.; Itoh, K.; Chuman, H. Correlation analyses on binding affinity of sialic acid analogues and anti-influenza drugs with human neuraminidase using ab Initio MO calculations on their complex structures LERE-QSAR analysis (IV). J. Chem. Inf. Model. 2011, 51, 2706–2716.

- [6] Chavas, L. M. G.; Kato, R.; Suzuki, N.; von Itzstein, M.; Mann, M. C.; Thomson, R. J.; Dyason, J. C.; McKimm-Breschkin, J.; Fusi, P.; Tringali, C.; Venerando, B.; Tettamanti, G.; Monti, E.; Wakatsuki, S. Complexity in influenza virus targeted drug design: interaction with human sialidases. J. Med. Chem. 2010, 53, 2998–3002.
- [7] Chavas, L. M. G.; Tringali, C.; Fusi, P.; Venerando, B.; Tettamanti, G.; Kato, R.; Monti, E.; Wakatsuki, S. Crystal structure of the human cytosolic sialidase Neu2. Evidence for the dynamic nature of substrate recognition. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 469–475.
- [8] Schwarz, F. P.; Puri, K. D.; Bhat, R. G.; Surolia, A. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (Pisum sativum) lectin, and lentil (Lens culinaris) lectin. J. Biol. Chem. 1993, 268, 7668–7677.
- [9] Gupta, D.; Cho, M.; Cummings, R. D.; Brewer, C. F. Thermodynamics of carbohydrate binding to galectin-1 from Chinese hamster ovary cells and two mutants. A comparison with four galactose-specific plant lectins. *Biochemistry* 1996, *35*, 15236–15243.
- [10] Swaminathan, C. P.; Surolia, N.; Surolia, A. Role of water in the specific binding of mannose and mannooligosaccharides to concanavalin A. J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 5153–5159.
- [11] Gloster, T. M.; Meloncelli, P.; Stick, R. V.; Zechel, D.; Vasella, A.; Davies, G. J. Glycosidase inhibition: an assessment of the binding of 18 putative transition-state mimics. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 2345–2354.
- [12] Noyes, R. M. Thermodynamics of ion hydration as a measure of effective dielectric properties of water. J. Am. Chem. Soc. 1962, 84, 513–522.
- [13] Rashin, A. A.; Honig, B. Reevaluation of the Born model of ion hydration. J. Phys. Chem. 1985, 89, 5588–5593.
- [14] Hermann, R. B. Theory of hydrophobic bonding. II. Correlation of hydrocarbon solubility in water with solvent cavity surface area. J. Phys. Chem. 1972, 76, 2754–2759.
- [15] Chothia, C. Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins. *Nature* **1974**, 248, 338–339.
- [16] Sitkoff, D.; Sharp, K. A.; Honig, B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models. J. Phys. Chem. 1994, 98, 1978–1988.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Mazanetz, M. P.; Ichihara, O.; Law, R. J.; Whittaker, M. Prediction of cyclin-dependent kinase 2 inhibitor potency using the fragment molecular orbital method. *J. Cheminf.* **2011**, *3*, 2.
- [20] 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.
- [21] Fedorov, D. G.; Nagata, T.; Kitaura, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method. *Phys. Chem. Chem. Phys.* in press.
- [22] Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E., III. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Acc. Chem. Res.* 2000, *33*, 889–897.
- [23] Massova, I.; Kollman, P. A. Combined molecular mechanical and continuum solvent approach (MM-PBSA/GBSA) to predict ligand binding. *Perspect. Drug Discovery Des.* 2000, 18, 113–135.
- [24] Tringali, C.; Papini, N.; Fusi, P.; Croci, G.; Borsani, G.; Preti, A.; Tortora, P.; Tettamanti, G.; Venerando, B.; Monti, E. Properties of recombinant human cytosolic sialidase HsNEU2. The enzyme hydrolyzes monomerically dispersed GM1 ganglioside molecules. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 3169–3179.
- [25] Gubareva, L. V.; Webster, R. G.; Hayden, F. G. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 3403–3408.
- [26] Li, C.-Y.; Yu, Q.; Ye, Z.-Q.; Sun, Y.; He, Q.; Li, X.-M.; Zhang, W.; Luo, J.; Gu, X.; Zheng, X.; Wei, L. A nonsynonymous SNP in human cytosolic sialidase in a small Asian population results in reduced enzyme activity: potential link with severe adverse reactions to oseltamivir. *Cell Res.* 2007, 17, 357–362.
- [27] Monti, E.; Preti, A.; Nesti, C.; Ballabio, A.; Borsani, G. Expression of a novel human sialidase encoded by the NEU2 gene. *Glycobiology* **1999**, *9*, 1313–1321.

///// Cutting Edge /////

United3D: 2つのコンセンサス法による タンパク質予測構造評価プログラム

北里大学薬学部 生物分子設計学教室 寺師玄記

1. はじめに

本稿では、本研究室で開発された United3D[1]を用いてターゲットの実験構造が未知の状態で Model の精度を正確に予測する手法を紹介する。

X線結晶解析など実験によって決定されるタンパク質の立体構造情報が利用できない場面に おいて、コンピュータープログラムを用いてタンパク質の立体構造を予測する (Protein modeling) 手法が近年広く使われるようになった。コンピュータープログラムが予測したタンパク質立体構 造モデル (Model) は、薬物との相互作用解析、タンパク質間相互作用の研究、アミノ酸変異に よるタンパク質構造の安定性の研究など様々な研究で用いられている。そのため、現在までに多 くの研究者によって様々な Protein modeling の手法が開発されてきた。例として世界中の Protein modeling の研究者が参加する国際学会 CASP9 (9th Community Wide Experiment on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction[2]) では、全自動と手動の手法を含めると 173 の研究グループがそれぞれ異なる Protein modeling の手法を提案している。

これらの予測方法は、その手法の違いからターゲットのタンパク質の種類に応じて予測される Model の精度が異なることが明らかとなっている。アミノ酸配列検索によって類縁タンパク質が 検索される場合には、Template-based modeling 法により高い精度の Model を予測することが可能 である。一方類縁タンパク質を見つけることができないタンパク質においては、ab initio 法など が有効である。したがって研究者があるタンパク質の立体構造 Model を予測する場合、一つの 手法のみを用いるのではなく複数の手法を用いてタンパク質の立体構造を予測することが、精度 の高い Model を得るのに必須の条件となっている。一般的に複数の手法によって得られた複数 の Model は、精度の高い Model と低い Model が混在している。その中から精度の高い Model を 選択するには、研究者が Model を観察し知識知見に基づいて Model の精度を推測せざるを得な い。

Model を使用して解析を行う研究者が最も関心を持つのは、ターゲットとなるタンパク質の真 実の三次元構造が分からない状態で、選択した Model が「精度の高い」Model であるかどうかの 情報を得ることである。Protein modeling の精度向上のためには、複数の Model の中で最も精度 の高い Model を選択する技術(QA: Quality Assessment method)が重要である。

2. United3Dの手法

本研究により開発された United3D は、二つのコンセンサス法を用いている。コンセンサス法 とは、評価対象となる多数の Model 同士を比較した結果、三次元構造が保存されている箇所、 すなわちどの Model でも類似した構造が予測された部位の構造は信頼性が高いという考えに基 づく評価方法である。つまり、評価対象の Model 群の多数意見を最も反映した Model が、最も 精度が高いと考える。

United3D は、(1) 評価対象となる Model 間の全体的な構造類似度を用いたコンセンサス法 (S_{global}) と、(2) 局所的な残基間相互作用の保存性を用いたコンセンサス法 (S_{local}) を用いて Model の精度の予測を行っている。

Model 間の構造類似度を用いたコンセンサス法(Sqlobal)

精度を予測したい Model を M_{model} とし、他の Model の一つを M_i とする。 M_{model} と M_i の全体構造 (global) を重ね合わせたときに、対応するアミノ酸残基の C α 原子間の距離が dÅ 以下である割合を M_{model} と M_i 間の構造類似度 $SIM_d(M_{model}, M_i)$ とした。 $SIM_d(M_{model}, M_i)$ が 1 のときは、 M_{model} と M_i がすべての残基において dÅ 以下の差異であるあることを意味している。 M_{model} と他の Model ($M_{I}, M_{2}, ..., M_N$) との $SIM_d(M_{model}, M_i)$ を全て計算し以下のように S_{global} を定義した。

$$S_{global} = 1 - \sqrt[pow]{\frac{\sum \left(1 - SIM_d \left(M_{\text{mod}el}, M_i\right)\right)^{pow}}{N}}$$

例として図1は、〇で囲った M_{model} と他の Model (M_1, M_2, \dots, M_5)を比較した様子を意味して いる。構造の類似性が高いほど構造間の距離が短くなるように配置する。 $M_1 \sim M_5$ の中心付近に M_{model} があれば、多数の意見を反映した構造であるということができる。その場合、 S_{global} の値は 高くなる。逆に、他の Model とは類似した構造を持たない構造は、Model 群の中心から離れた構 造であることから S_{global} の値は低く計算される。



図1 $M_{moodel} \ge M_1 \sim M_5$ の構造類似度の計算

Model におけるアミノ酸間相互作用の保存性を用いたコンセンサス法(S_{local})

 S_{global} は Model の全体構造を使いその類似度を考慮していたのに対し、 S_{local} は、局所的なアミノ酸残基間の相互作用に注目したコンセンサス法である。例えば、ある特定の箇所のアミノ酸残

基*i*とあるアミノ酸残基*j*の相互作用が多くの Model で観察された場合、このアミノ酸間(*i,j*)の相互作用は実験構造でも同様に相互作用している可能性が高い、と評価される。そこで *S*_{local}を以下のように定義した。

$$S_{local} = \sum \sum \log \left(\frac{P(i, j)}{P(|i - j|)} \right)$$

P(i, j)は、i番目のアミノ酸残基とj番目のアミノ酸残基が相互作用している割合、P(|i-j|)は アミノ酸配列で|i-j|の残基数の差があるもので相互作用(C α 原子間の距離が 6 Å以下)をしてい る割合を表している。

二つのコンセンサス法から最終的に予測される Quality score (*Qscore*)は、以下である。

$$Qscore = S_{global} + w \cdot S_{local}$$

3. 結果

CASP9 における結果

United3D の性能を客観的に評価するため、完全なブラインドテストである CASP9 の Quality Assessment (QA) category に参加した。CASP9 では 129 ターゲットが出題され、CASP9 に参加した 78 の Protein modeling server により 39,702 個のタンパク質構造 Model が予測された。QA category に参加した研究グループはこれらの予測された Model の精度を、実験構造が隠された状態で予測する。キャンセルされたターゲットを除くと 116 ターゲットが評価対象となった。Model の実際の精度は、実験構造との比較による GDT_TS (Global Distance Test Total Score) である。 この GDT_TS の数値が大きくなるほど Model と実験構造がよく一致していることを意味している。

CASP9 では、評価者によって①Model の精度 (GDT_TS) と QA group が予測した評価値 (Quality score) との相関、②GDT_TS の高い Model を選ぶ能力 (ΔGDT)、の二つにより評価が行われた。

Quality score と GDT_TS の相関

116のターゲットにおける United3D の Kendall の順位相関 tau の平均値、Pearson の相関係数 r の平均値はそれぞれ 0.932 (4th/46)、0.682 (7th/46) であった。CASP9 の評価者は、United3D を含む特に優れた成績を示した上位 8 グループを解析し、Student's *t*-test から相関係数における 精度に差が見られない (indistinguishable) と述べている[3]。相関係数において United3D は世界 の上位グループに属していることが示された。

図2は、116ターゲットの Model を全て合わせた United3D の Quality score (横軸) と GDT_TS (縦軸)の分布図である。Kendall の順位相関 tau と Pearson の相関係数 r はそれぞれ 0.93, 0.78 であった。ターゲットが異なる Model を一つにまとめても高い相関性を示していることから、 United3D の Quality score は、Model の精度を絶対的に評価することが可能である。



図 2 CASP9 Server model の GDT_TS と United3D の Quality score の分布

$\Delta \, GDT$

各ターゲットにおいて最も GDT_TS が高い Model と United3D が最も精度が高いと予測した Model の GDT_TS の差が ΔGDT である。この値が低いほど、精度の高い Model を検出する能力 が高いことを意味している。前述したとおり、研究者が Protein modeling を行うときに注目する のは、多数の Model の中で最も精度が高い Model を検出する事である。そのため ΔGDT は、手 法の実用性を示す評価指標である。United3D は QA category に参加した 46 グループ中最も優れ た $\Delta GDT = 5.3$ の成績であった。

実際に研究に使用する場面を想定した解析

我々はさらに、「研究者が複数の Modeling server を使用して複数の Model を取得し、United3D によって Model の評価を行う」場合を想定し検証を行った。前述した CASP9 では 78 server が予 測した Model を使用して検証を行っている。しかし、実際に 2011 年 11 月に利用可能である Protein modeling server は、我々が確認したところ 22 server であった。そこで利用可能な 22 server の予 測した Model と、22 server の Model のみを使用して United3D の手法を適用した場合の比較を行 った。図 3 は、22 server が予測した Model のうち、United3D が最も精度が高いと予測した Model の GDT_TS の総和が United3D (赤) として表されている。他のデータは、特定の Modeling server の Model の GDT_TS の総和を表している。例として"ZHANG-SERVER_TS1"は、Modeling server である ZHANG-SERVER の Model の GDT_TS の総和を意味している。図 3 が示しているように、 United3D は他のどの 22 server の GDT_TS の総和よりも高い値を示している。これは、United3D の手法により、1 つの Modeling server を使用するよりも安定して精度の高い Model を選択でき ることを表している。



4. おわりに

本研究で開発した United3D は、Model の精度(GDT_TS)と高い相関性を持つ精度の予測値 (Quality score)を計算できた。CASP9の結果から、その精度は世界の上位グループに属するこ とが示された。特に、多数の Model の中から精度の高い Model を選び出す能力である *AGDT* に おいては、世界で最も優れた検出能力があることが示された。CASP9 に限らず、実際に使用す る場面を想定しての検証でも United3D は安定して精度の高い Model を選択することが可能であ ることが示された。

United3D の手法は、複数の手法を用いて Protein modeling を行った後、解析に使用する Model を選択するときに非常に有用であることが示された。我々は今後 United3D の手法をタンパク質 モデリングの手法改善に役立てていきたいと考えている。

謝辞

本研究のご指導を賜りました竹田-志鷹真由子教授ならびに共同研究者の皆様に心より御礼 申し上げます。SAR Presentation Award に御選出いただきました日本薬学会構造活性相関部会の 先生方、本稿を本誌に掲載する機会を与えてくださいました先生方に深く感謝申し上げます。

参考文献

[1] 寺師玄記、大澤誠、中村裕樹、加納和彦、竹田-志鷹真由子 United3D: 2 つのコンセンサ ス法によるタンパク質予測構造評価プログラム 第 39 回構造活性相関シンポジウム講演要旨集 2011; p27-30.

[2] http://predictioncenter.org/casp9/index.cgi

[3] Kryshtafovych A, Fidelis K, Tramontano A. Evaluation of model quality predictions in CASP9. Proteins 2011;79 Suppl 10:91-106.

第39回構造活性相関シンポジウム開催報告

第39回構造活性相関シンポジウム実行委員長 西谷 潔

千葉県野田市の東京理科大学野田キャンパスにおいて、第 39 回構造活性相関シンポ ジウム(会場:薬学部1311教室、2011年11月28日(月)~11月29日(火)、主催: 日本薬学会構造活性相関部会、共催:日本化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、 日本農薬学会)が開催されました。本年は、3月11日の東日本大震災のため日本薬学 会をはじめ多くの春期開催の学会が中止となり、本討論会の開催につきましても議論が ありましたが、むしろ開催することで元気を取り戻そうということとしました。まだま だ復興には遠く、被災された方々には心よりお見舞い申し上げます。本年度のシンポジ ウムは29日夜から開催される AIMECS11(東京)の日程との関係から単独開催となりま した。特別講演1件、招待講演5件、口頭発表11件、ポスター発表24件となり、AIMECS への発表を考慮すると例年に匹敵する件数になったと考えております。参加者も198名 (特別講演、招待講演、招待者含む)に達し、盛会のうちに終えることができました。

主催頂きました日本薬学会構造活性相関部会はじめ、共催、協賛頂きました学協会に 感謝致しますと同時に、ご講演頂きました先生方にお礼申し上げます。また、開催資金 のご援助を頂きました日本薬学会並びに企業の方々に感謝致します。これもひとえに、 参加頂きました皆様と、副実行委員長の内呂拓実先生(東京理大薬)はじめとした実行 委員の皆様、並びに日本薬学会構造活性相関部会常任幹事、幹事の先生方のご助力、ご 支援の賜と存じます。なかでも会場となった東京理科大学の寺田研究室、内呂研究室の 先生方,大学院生には、開催当日の運営に関して、一方ならぬご協力を賜りました。会 計担当の澤辺様にも大変お世話になりました。また、紙面を借りますこと失礼とは存じ ますが、ご参加頂きました皆様、ご助力、ご支援頂きました先生方、広告展示を行って 頂きました企業、団体の皆様に、深くお礼申し上げます。

特別講演をお願いしました小林利彦先生(元 PhRMA 日本代表)と招待講演の宮田満先 生(日経 BP 社)のお二方には世界における日本の医薬品開発について興味深く示唆に 富んだご講演を頂きました。田沼靖一先生(東京理大薬)、赤堀有美先生((一財)化学 物質評価研究機構)、三芳秀人先生(京大農)、村上聡先生(東工大生命理工)の4名の 先生方にはそれぞれのご専門の観点から医薬品開発のヒントとなる貴重なご講演を頂 きました。いずれも熱心な質疑応答がありました。

次年度の第40回構造活性相関シンポジウム(愛知)は、豊橋技術科学大学大学院の 加藤博明先生のお世話で、11月29日(木)~11月30日(金)に、岡崎市図書館交流 プラザで開催される予定です。皆様のご参加、ご講演、ご討論によって、より活発な討 論会になりますよう、どうか宜しくお願い申し上げます。

<会告> 構造活性フォーラム 2012

「GPCR研究の最前線」

Gタンパク質結合型受容体(GPCR)は最大の受容体ファミリーを形成し、医薬品標的として広く注目され、また味覚や嗅覚の受容体研究も進められており、広い分野の研究が進められている。さらに、機能的な構造解析に向けた結晶構造解析による受容体の構造変化とリガンドの認識様式などが解明されつつあるなど、より合理的なリガンド(医薬品など)のデザインにも応用される研究が進んでいる。本フォーラムでは、GPCR研究分野における第一線の研究者を招いて講演していただき、GPCR研究の最前線を体系的に理解し、分子設計・医薬品化学における応用について討論する。

- 主催:日本薬学会構造活性相関部会
- 協賛:日本薬学会、日本化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、日本農薬学会、 近畿化学協会
- 日時: 平成24年6月22日(金) 10:00-17:00
- 会場: コープイン京都 [〒604-8113 京都市中京区柳馬場蛸薬師上ル井筒屋町 411 フリーダイヤル: 0120-79-6600、Tel: 075-256-6600、Fax: 075-251-0120 E-mail: coopinn-k@univcoop.or.jp http://rcpt.kyoto-bauc.or.jp/coop-inn/kyoto/]
- 交通: JR「京都」駅→ 地下鉄烏丸線 →「四条」駅下車、(13 番出口から) 徒歩 5 分 JR「京都」駅より市バス A-2 のりば(5 番系統に乗車)「四条高倉」駅下車、徒歩 10 分 JR「京都」駅よりタクシーで 10 分 阪急電車「烏丸」駅(13 番出口から) 徒歩 5 分 京阪電車「三条」駅(三条通西へ、京都 YMCA を左折) 徒歩 16 分

講演:

- 1. 多様なGPCRの機能と構造 石黒正路(新潟薬大)
- 2. GPCRをターゲットにした「構造に指南された創薬」を目指すための三つの戦略 小林拓也(京大)
- 3. GPCRモデリングとインシリコスクリーニング 広川貴次(産総研)
- 4. 味覚受容体における味物質認識機構 三坂 巧(東大)
- 5. オーファンGPCR研究に基づく創薬ターゲット探索 森 正明(武田薬品)

申込み締切り:	定員	(140 名)	になり次第締切り
- 1 K / //// Jy / ·			

- 参加費: 一般 4,000 円、学生無料
- 参加申込み方法: 構造活性相関部会ホームページからお願いします
- 振替口座: 三井住友銀行 店番号 007、口座番号 7180812
- 構造活性フォーラム 2012 実行委員会 委員長 石黒正路
- 問合せ先: 〒956-8603 新潟市秋葉区東島 265-1 新潟薬科大学

構造活性フォーラム実行委員会 田宮 実

Tel: 0250-25-5000、Fax: 0250-25-5021、E-mail: sarforum2@nupals.ac.jp

〈会告〉

第40回構造活性相関シンポジウム

- 主 催:日本薬学会構造活性相関部会
- **共 催**:日本化学会、日本農芸化学会、日本分析化学会、日本農薬学会
- **会 期**: 2012 年 11 月 29 日 (木) ~2012 年 11 月 30 日 (金)
- 会場:岡崎市図書館交流プラザ・りぶら
- (〒444-0059 愛知県岡崎市康生通西 4-71 http://www.libra.okazaki.aichi.jp/) 討論主題:
 - 1. 生理活性物質の活性評価・医農薬への応用
 - 2. QSAR の基本パラメータ・基本手法・情報数理的アプローチ
 - 3. QSAR と吸収・分布・代謝・毒性・環境毒性
 - 4. コンビナトリアルケミストリーと創薬
 - 5. バイオインフォマティクス
 - 6. 分子情報処理 (データベースを含む)・データ予測

発表形式: 口頭およびポスター (優秀な発表には SAR Presentation Award を授与)

発表申込:6月1日(金)~8月3日(金)締切必着

(1)演題、(2)発表者氏名と所属、(3)連絡先(住所、Tel、Fax、E-mail)、(4)200字 程度の概略、(5)口頭・ポスターの別、(6)上記討論主題番号 を明記の上、Web サイトまたは E-mail でお申し込みください。詳細は、ホームページ上の発表申 込要領をご覧ください。

講演要旨:9月28日(金)締切必着

執筆要領はホームページに掲載します。

参加登録予約申込:11月9日(金)締切

詳細は、ホームページ上の参加登録予約申込要領をご覧ください。

- 参加登録費:[一般]予約8,000円、当日9,000円 [学生]予約2,000円、当日3,000円
 ※要旨集前送希望の場合は、郵送料1,000円を別途申し受けます。
 ※費用振込み後、参加取り消しによる返金には応じられません。
- **懇親会:**11月29日(木) 19:00頃

問合せ・申込先:

〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1
豊橋技術科学大学 情報・知能工学系 分子生命情報学研究室
第 40 回構造活性相関シンポジウム実行委員会 加藤博明
TEL: 0532-44-6879 FAX: 0532-44-6873
E-mail: sar40@mbi.cs.tut.ac.jp
http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/

[[]一般]予約 7,000 円、当日 8,000 円 [学生]予約 3,000 円、当日 4,000 円 詳細は、部会ホームページ(下記)をご参照ください。

部会役員人事

平成24年度から、部会長および副部会長(アカデミア)が交代することとなりました。 部会長:高橋由雅(豊橋技術科学大学大学院工学研究科) 副部会長(アカデミア):高木達也(大阪大学大学院薬学研究科) 副部会長(企業):清水良(田辺三菱製薬) (継続)

構造活性相関部会の沿革と趣旨

1970年代の前半、医農薬を含む生理活性物質の活性発現の分子機構、立体構造・電子構造の計算や活性 データ処理に対するコンピュータの活用など、関連分野のめざましい発展にともなって、構造活性相関と 分子設計に対する新しい方法論が世界的に台頭してきた。このような情勢に呼応するとともに、研究者の 交流と情報交換、研究発表と方法論の普及の場を提供することを目的に設立されたのが本部会の前身の構 造活性相関懇話会である。1975年5月京都において第1回の「懇話会」(シンポジウム)が旗揚げされ、 1980年からは年1回の「構造活性相関シンポジウム」が関係諸学会の共催の下で定期的に開催されるよう になった。

1993年より同シンポジウムは日本薬学会医薬化学部会の主催の下、関係学会の共催を得て行なわれることとなった。構造活性相関懇話会は1995年にその名称を同研究会に改め、シンポジウム開催の実務担当グループとしての役割を果すこととなった。2002年4月からは、日本薬学会の傘下組織の構造活性相関部会として再出発し、関連諸学会と密接な連携を保ちつつ、生理活性物質の構造活性相関に関する学術・研究の振興と推進に向けて活動している。現在それぞれ年1回のシンポジウムとフォーラムを開催するとともに、部会誌のSAR Newsを年2回発行し、関係領域の最新の情勢に関する啓蒙と広報活動を行っている。本部会の沿革と趣旨および最新の動向などの詳細に関してはホームページを参照頂きたい。(http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/index.html)

編集後記

日本薬学会構造活性相関部会誌 SAR News 第22号をお届けいたします。今回、Perspective/Retrospective では、石川哲 也先生(理化学研究所)に、X線自由電子レーザーSACLA についての解説と、医学・薬学への応用についての展望につ いてご寄稿いただきました。結晶構造解析への適用だけでなく、単分子のイメージングまでも可能ということで、SACLA の利用により、今後様々な分野での研究の進展がたいへん期待されます。Cutting Edge では、比多岡清司先生(徳島大学) に、*ab initio* FMOと LERE-QSAR によるノイラミニダーゼと阻害剤の相互作用解析についてご紹介いただき、また、寺 師玄記先生(北里大学)に、タンパク質予測構造のコンセンサス法による評価についてご紹介いただきました。分野は それぞれ異なりますが、どちらも独自の新規手法として、その有用性が示され、またこれからの発展・応用が期待され ます。お忙しい中ご執筆いただきました先生方に、心よりお礼申し上げます。この SAR News が今後とも構造活性相関 研究の先端情報と展望を会員の皆様にご提供できることを、編集委員一同願っております。(編集委員会)

SAR News No.22 平成 24 年 4 月 1 日 発行:日本薬学会 構造活性相関部会長 高橋 由雅

> SAR News 編集委員会 (委員長) 粕谷 敦 福島 千晶 飯島 洋 竹田-志鷹 真由子 久保寺 英夫

*本誌の全ての記事、図表等の無断複写・転載を禁じます。