

分子科学計算を用いた自由エネルギー変化の
線形表現による酵素触媒反応の研究:
Trypsin の Michaelis–Menten 複合体形成
および速度論的過程の詳細解析

2016

馬島 彬

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 序論.....	3
2.1 Protease 概説.....	3
2.1.1 Serine protease.....	6
2.1.1.1 Trypsin.....	12
2.1.1.1.1 触媒機構.....	15
2.1.1.1.2 電荷リレー仮説.....	18
2.1.1.1.3 低障壁水素結合仮説.....	19
2.1.1.1.4 His57 環反転仮説 (His57-ring-flip).....	21
2.1.1.1.5 短距離イオン性水素結合仮説.....	23
2.2 定量的構造活性相関概説.....	24
2.3 分子科学計算概説.....	27
2.3.1 分子力学計算.....	27
2.3.2 古典-量子化学 hybrid 法.....	28
2.3.3 非経験的フラグメント分子軌道法.....	30
2.3.4 結合相互作用エネルギー計算.....	31
2.3.5 分散相互作用エネルギー計算.....	32
2.3.6 水和自由エネルギー計算.....	33
2.4 Entropy-enthalpy 補償則.....	34
2.5 自由エネルギー変化のエネルギー代表項による線形表現解析.....	37
2.6 本研究の背景と目的.....	39
第 3 章 解析方法.....	42
3.1 基質化合物セットとその古典的定量的構造活性相関解析.....	43
3.2 Trypsin-基質複合体構造の構築.....	44
3.2.1 複合体初期構造.....	44
3.2.2 古典-量子化学 hybrid 法による構造構築の方法.....	47
3.3 Trypsin-基質に対する自由エネルギー変化の線形表現解析の方法.....	49
3.3.1 Michaelis-Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化の定量的構造活性相関の方法.....	49

3.3.2	遷移状態形成に伴う活性化自由エネルギー変化の定量的構造活性相関の方法	50
3.4	エネルギー代表項の算出法	52
3.4.1	結合相互作用エネルギー項	52
3.4.2	分散相互作用エネルギー項	53
3.4.2.1	分散相互作用エネルギーの補正	54
3.4.3	水和自由エネルギー変化項	62
3.4.4	遷移状態に関するエネルギー項	64
3.5	非経験的フラグメント分子軌道法によるフラグメント間相互作用の解析方法	65
第4章	結果および考察	66
4.1	アシル化過程における構造および自由エネルギー変化のプロファイル	66
4.1.1	状態間の構造遷移	66
4.1.2	エネルギー遷移	70
4.1.3	Proton 移動	76
4.2	自由エネルギー変化のエネルギー代表項による線形表現解析に基づく trypsin の加水分解反応機構の定量的解析	78
4.2.1	Michaelis-Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化の定量的構造活性相関式	78
4.2.2	遷移状態形成に伴う活性化自由エネルギー変化の定量的構造活性相関式	84
4.3	遷移状態形成に伴うアミノ酸残基の結合相互作用エネルギー変化	90
4.4	遷移状態構造における古典的定量的構造活性相関解析の記述子との相関解析	96
4.4.1	反応中心の構造パラメータとの相関	97
4.4.2	結合次数との相関	100
4.4.3	原子電荷との相関	103
第5章	総括	109
	謝辞	112
	引用文献	113

本論文で用いた省略形

○非経験的分子軌道法関連

BSSE	basis set superposition error
CC	coupled cluster
CP	counterpoise
EE	electro embedding
FMO	fragment molecular orbital
GAMESS	general atomic and molecular electronic structure system
HF	Hartree–Fock
IFIE	inter-fragment interaction energy
MAC	mulliken atomic charge
ME	mechanical embedding
MO	molecular orbital
MP2	second-order Møller-Plesset
NAC	natural atomic charge
ONIOM	our own <i>N</i> -layered integrated molecular orbital and molecular mechanics
QM	quantum mechanics
RESP	restrained electrostatic potential
SCRF	self consistent reaction field
VTZ	valence triple zeta
VQZ	valence quadruple zeta

○密度汎関数法関連

B3LYP	Becke-3–Lee-Yang-Parr
B97	Becke 97
BJ	Becke and Johnson damping
BMK	Boese–Martin for kinetics
DFT	density functional theory
GGA	generalized gradient approximation
M06-2X	Minnesota 06 functionals with doubled Hartree–Fock exchange
M11	Minnesota 11 functionals
PBE	Perdew–Burke–Ernzerhof
PW91	Perdew–Wang 91
TPSS	Tao–Perdew–Staroverov–Scuseria

○反応メカニズム関連

DPT	double proton transfer
EA	acyl enzyme
EP	enzyme product
ES	enzyme-substrate
LBHB	low barrier hydrogen bond
SIHB	short ionic hydrogen bond
SPT	single proton transfer
TET	tetrahedral intermediate
TS	transition state

○分子力場法関連

AMBER	assisted model building with energy refinement
CG	conjugate gradient
GAFF	general AMBER force field
MM	molecular mechanics
SD	steepest descent

○水和自由エネルギー計算関連

COSMO	conductor-like screening model
CPCM	conductor-like polarizable continuum model
GB	generalized Born
IEFPCM	integral equation formalism polarizable continuum model
PB	Poisson-Boltzmann
PCM	polarizable continuum model

○実験方法関連

ITC	isothermal titration calorimeter
ND	neutron diffraction
NMR	nuclear magnetic resonance

○化合物・タンパク質関連

EC	enzyme commission
HPE	hippuric acid phenyl ester
PDB	protein data bank
PSTI	pancreatic secretory trypsin inhibitor

○その他

GOLD	genetic optimization for ligand docking
LERE	linear expression by representative energy terms
LFEP	linear free-energy principle
LJ6	Lennard–Jones R^{-6}
MAE	mean absolute error
MPE	mean percentage error
QSAR	quantitative structure–activity relationship
RMSD	root mean square deviation
SAR	structure–activity relationship
TIP3P	transferable intermolecular potential 3 point
vdW	van der Waals

第 1 章 緒言

創薬化学は疾患の予防・治療に有効な化学物質の開発を目的とした化学であり、20 世紀に人類が感染症やウイルスを克服していく過程で著しい発展を遂げた。かつて創薬化学ではモルヒネに代表される天然化合物由来のスクリーニングが盛んに行われていたが、開発の発端は偶然の発見に頼るところが大きかった。これとは別に生体分子構造に基づく分子設計が始まると、propranolol, cimetidine および angiotensin 変換酵素阻害薬などの革新的な医薬品が次々と開発され、これらの研究は現在の創薬化学の先駆けとなった。さらに、21 世紀になると「ゲノム創薬時代」が到来し、遺伝子を網羅的に調べることで疾患関連遺伝子・タンパク質の同定が可能となり、開発ターゲットの探索効率が飛躍的に改善した。加えて、コンピューターや X 線結晶解析・nuclear magnetic resonance (NMR) などの測定機器の著しい性能向上は、標的タンパク質と候補化合物の立体構造情報に基づく創薬の進展に繋がった。また、薬理活性やタンパク質の立体構造データベースの充実、ならびに分子動力学 (molecular dynamics; MD) 法や非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO) 法などの計算手法による薬理活性の高度な予測法の確立により、従来の *in vivo* (生体内で) や *in vitro* (試験管内で) 創薬に対する *in silico* (コンピューター内で) 創薬もますます実用性が高まっている。したがって、ここ 30–40 年の間に創薬化学の理論的基盤は着々と整備されてきた。しかしながら、現在の医薬品開発には数百億もの莫大な費用と 10 年以上の歳月を要し、候補化合物が新薬として上市される確率は数万分の一といわれている。また、先に述べた理論的創薬の台頭にもかかわらず、開発の現場では未だ研究者の勘や経験に頼る経験的創薬が占める割合が多い。さらに、新たな薬剤耐性菌の出現や近年アフリカで起きたエボラ出血熱のアウトブレイクやアジアにおける MERS (中東呼吸器症候群) の流行に見られるよう、人類は依然として感染症やウイルスの脅威にさらされ続けており、新薬の開発に膨大な時間を費やせない事情がある。この現状を打破するため、創薬化学の新たな論理的方法論の確立による安全・有効かつ迅速な医薬品開発が望まれる。

一連の類似構造を有する薬物分子の生物活性をその化学構造に基づき定量的に予測する定量的構造活性相関 (quantitative structure–activity relationship; QSAR) は、創薬化学の論理的方法論の一つとして、実際に創薬の現場で用いられている。現在の QSAR 解析の手法のほとんどは 1964 年に提案された Hansch–Fujita 式を基盤としており、未知化合物の生物活性予測も可能なことから、現在までに医農薬で数々の成功例がある。しかし、従来の QSAR 解析では薬物分子の標的となる受容体 (タンパク質) 側の情報を十分に考慮できておらず、解析に用いた

パラメータ記述子の解釈が一義的でない場合があった。

以上の背景から、我々は近年の科学技術の著しい発展の一つである分子科学計算・シミュレーションを活用した新しい QSAR 解析を提案し、様々な薬物-受容体 (阻害剤-タンパク質)系において検証を行い、その有効性を証明してきた。この新規 QSAR 解析は受容体 (タンパク質)側の情報を十分に考慮し、薬物-受容体 (阻害剤-タンパク質)間の結合相互作用を原子・電子レベルで精密に解析可能である。すなわち、種々の分子科学計算により得られた各阻害剤の結合自由エネルギー変化の計算値と実測値との相関関係から、一連の阻害剤の結合自由エネルギー変化の変動を定量的に解析し、結合メカニズムを原子・電子レベルで説明することが可能である。しかしながら、これまでの検証範囲は、薬物が受容体と結合する平衡過程に限定されており、基質のように結合後にさらに分解を受ける過渡的な遷移状態 (transition state; TS)を包括した速度論的過程への適用は行っていない。“TS analog”として TS 構造の相互作用を模倣した強力な酵素阻害剤が多数開発されている事実からも、速度論過程を含めた解析を行うことは、高確度な創薬を行う上で有用である。

本研究では、新規 QSAR 解析を基質-タンパク質系に対して初めて適用し、酵素-基質 (enzyme-substrate; ES)複合体が形成される平衡過程、すなわち Michaelis-Menten 複合体形成過程と ES 複合体形成後の速度論的過程を対象とした解析を試みることで、方法論の適用範囲を検証するとともに、酵素触媒反応メカニズムを原子・電子レベルで解明することを目的とした。本研究の最大の特徴は、従来は計算時間が膨大となり困難であった丸ごとの酵素環境下での触媒反応を考慮し、さらには一連の基質を解析対象とすることでその反応メカニズムを体系的かつより明瞭に理解したところである。これは QSAR と分子科学計算・シミュレーションの二つの異なるアプローチを統合することで初めて可能であり、酵素触媒反応をこのような観点から解析した前例はなく、酵素触媒反応研究における新たな論理的方法の提案としてその成果を報告する。

第2章 序論

2.1 Protease 概説

酵素とは生体の触媒であり、触媒とは化学反応速度を増大させるが、一般に自分自身は反応前後で変化しない物質である。酵素研究は 1833 年にデンプンからジアスターゼ (現在のアミラーゼ) が分離されたことに始まる。1897 年に生体とは無関係に触媒作用を示すことが確認され、1930 年頃に酵素の本体がタンパク質であると証明された。すなわち、酵素は洗練された高度な機能性タンパク質である。生体内では何百種類もの酵素触媒反応が起きているが、これらの反応が混乱なく整然と行われるのは酵素の基質特異性のおかげであり、基質と酵素の対応関係は「鍵 (基質)」と「鍵穴 (酵素)」に例えられる。この「鍵と鍵穴」説は、後に X 線結晶解析により、酵素と基質の 3 次元立体構造が解明され概ね正しいことがわかった。また、コンピューター性能の著しい向上と相まった分子科学計算の信頼性と計算速度の向上により、分子レベルでの解析が進み、様々な酵素の触媒メカニズムが解明されている。現在、酵素を応用した研究は目覚ましい勢いで進んでおり、生活環境、農業、工業および医療分野などの発展に貢献している。

Protease (enzyme commission (EC) number 3.4) は peptide 結合の加水分解を触媒するタンパク質分解酵素の総称であり、動物、植物、バクテリアおよびウイルスなど広範囲に分布している [1]。ヒトではタンパク質の代謝、食物の消化、血液凝固、免疫応答、細胞のシグナル伝達、細胞分裂および apoptosis などの生理作用に関与しており、protease の異常は肺気腫、脳卒中、ウイルス感染、がんおよびアルツハイマー病などの疾患に繋がるといわれている [2, 3]。Protease を基質の切断部位に基づいて分類すると、タンパク質鎖の末端から順次アミノ酸を切り出す exoprotease とタンパク質内の peptide 結合を切断する endoprotease に分けられる。また、触媒機構に基づき、serine protease (EC 3.4.21), cysteine protease (EC 3.4.22), aspartic protease (EC 3.4.23), metallo protease (EC 3.4.24), threonine protease (EC 3.4.25) および glutamic acid protease (EC 3.4.23.19) の 6 つの大きな family に分類される (表 2.1) [4]。この中で threonine および glutamic acid protease は、ここ 20 年間に分類された新しい family である。Serine, cysteine および threonine protease は、触媒反応において基質と一時的に共有結合を形成するが (図 2.1 (a)), aspartic, metallo および glutamic acid protease は、水分子を介した触媒反応を行うため、基質と直接共有結合することはない (図 2.1 (b)) [5]。また、serine, cysteine および threonine protease は、活性部位に catalytic triad と呼ばれる触媒 3 残基が存在する

など共通点が多く、この特徴を利用した阻害剤開発も行われている [6, 7]. Catalytic triad のうち, serine protease では Ser 残基が (図 2.2 (a)), cysteine protease では Cys 残基が (図 2.2 (b))それぞれ触媒反応において中心的な役割を担うが [8], この Cys 残基の側鎖は基質を認識する際には proton が解離しているという報告もある [8–13].

表 2.1 触媒反応に基づいた protease の分類

Enzyme	EC number	Typical protein
Serine protease	3.4.21	Trypsin, Chymotrypsin, Subtilisin, Thrombin, Plasmin
Cysteine protease	3.4.22	Papain, Ficin, Bromelain, Calpain, Caspase
Aspartic protease	3.4.23	HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) protease, Cathepsin D, Renin
Metallo protease	3.4.24	MMPs (matrix metalloproteases), TACE (tumor necrosis factor- α -converting enzyme), Thermolysin, Horrilysin
Threonine protease	3.4.25	Proteasome, HsIU-HsIV peptidase
Glutamic acid protease	3.4.23.19	Aspergillopepsin 2

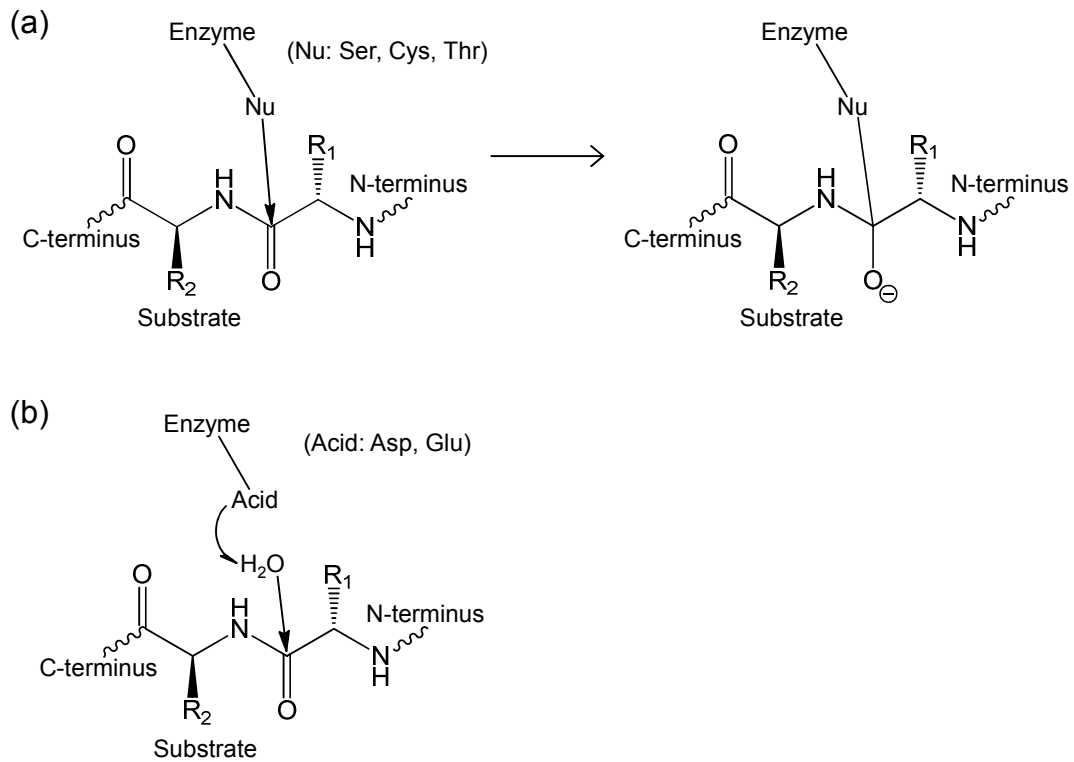


図 2.1 Protease による peptide 基質の触媒反応様式
 (a) Serine, cysteine および threonine protease,
 (b) Aspartic, metallo および glutamic acid protease.
 基質中の R₁ および R₂ はアミノ酸残基の側鎖を表す.

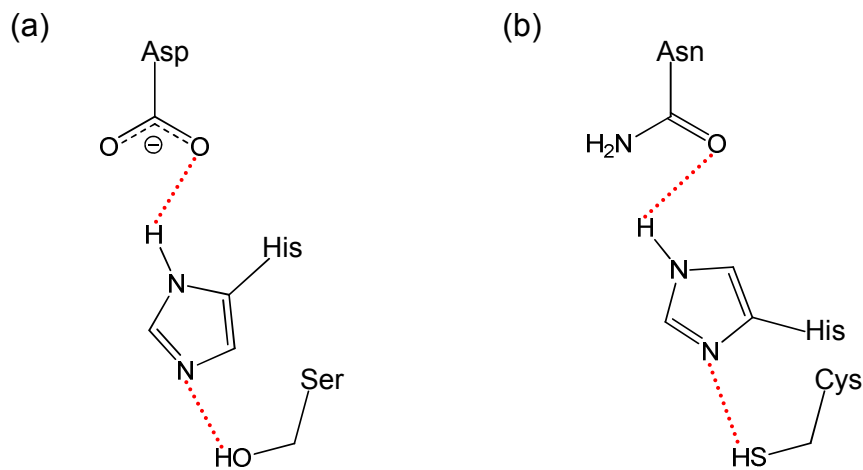


図 2.2 Catalytic triad の構成アミノ酸残基
 (a) Serine protease, (b) Cysteine protease.
 点線は水素結合を表す.

2.1.1 Serine protease

Serine protease (EC 3.4.21)は活性部位に Ser 残基を有する endoprotease の総称である。Serine protease には進化系統に基づいた多くの family が存在し、さらに、これらの family は 16 種類の clan という相同なタンパク質グループに分類される (表 2.2) [14]。Clan の中でも特に有名な PA と SB に属する protease は、それぞれ trypsin-like serine protease および subtilisin-like serine protease と呼ばれる [15]。この両者はアミノ酸配列が異なるものの、活性部位の構造が類似しているため、同じような触媒機能を有する [16]。Trypsin-like serine protease は、約 245 個のアミノ酸残基からなり、代表的なものに trypsin (EC 3.4.21.4) と chymotrypsin (EC 3.4.21.1) がある。また、食物の消化、免疫反応、血液凝固および血栓溶解など体内で様々な役割を担い (表 2.3) [17, 18]、がん、慢性炎症、補体欠損症、溶血性尿毒症、血友病、心臓発作、脳卒中および肺炎などの疾患に関与する [19, 20]。このため、serine protease 阻害剤は臨床薬として用いられており、C 型肝炎に対する抗ウイルス薬としてはウイルス性 serine protease の NS3/4A protease 阻害薬がある (図 2.3) [21, 22]。また、血液凝固阻害薬として間接的に第 Xa 因子 (EC 3.4.21.6) を阻害するもの、直接第 Xa 因子を阻害するもの、そして、直接 thrombin (EC 3.4.21.5) を阻害するものが市販されている (図 2.4) [23–25]。一方、subtilisin-like serine protease は subtilase とも呼ばれ、古細菌、細菌、酵母、真核生物およびウイルスなどに分布し、subtilisin BPN (EC 3.4.21.62)、thermitase (EC 3.4.21.66) および proteinase K (EC 3.4.21.64) が代表的なタンパク質である [26]。また、塩基性の高い subtilisin-like serine protease は洗剤として利用されている [27]。

表 2.2 Serine protease の分類

Clan	Family	Type enzyme
PA	S1	Chymotrypsin A (<i>Bos taurus</i>)
	S3	Togavirin (Sindbis virus)
	S6	IgA1-specific serine peptidase (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
	S7	Flavivirin (Yellow fever virus)
	S29	Hepacivirin (Hepatitis C virus)
	S30	Potyvirus P1 peptidase (Plum pox virus)
	S31	Pestivirus NS3 polyprotein peptidase (Bovine viral diarrhea virus 1)
	S32	Equine arteritis virus serine peptidase (Equine arteritis virus)
	S39	Sobemovirus peptidase (Cocksfoot mottle virus)
	S46	Dipeptidyl-peptidase 7 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
	S55	SpoIVB peptidase (<i>Bacillus subtilis</i>)
	S64	Ssy5 peptidase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	S65	Picornain-like cysteine peptidase (Breda virus)
	S75	White bream virus serine peptidase (White bream virus)
	PB	S45
S63		EGF-like module containing mucin-like hormone receptor-like 2 (<i>Homo sapiens</i>)
PC	S51	Dipeptidase E (<i>Escherichia coli</i>)
PE	P1	DmpA aminopeptidase (<i>Ochrobactrum anthropi</i>)
SB	S8	Subtilisin Carlsberg (<i>Bacillus licheniformis</i>)
	S53	Sedolisin (<i>Pseudomonas sp. 101</i>)
SC	S9	Prolyl oligopeptidase (<i>Sus scrofa</i>)
	S10	Carboxypeptidase Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	S15	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase (<i>Lactococcus lactis</i>)
	S28	Lysosomal Pro-Xaa carboxypeptidase (<i>Homo sapiens</i>)
	S33	Prolyl aminopeptidase (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
	S37	PS-10 peptidase (<i>Streptomyces lividans</i>)

表 2.2 (cont.)

Clan	Family	Type enzyme
SE	S11	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase A (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
	S12	D-Ala-D-Ala carboxypeptidase B (<i>Streptomyces lividans</i>)
	S13	D-Ala-D-Ala peptidase C (<i>Escherichia coli</i>)
SF	S24	Repressor LexA (<i>Escherichia coli</i>)
	S26	Signal peptidase I (<i>Escherichia coli</i>)
SH	S21	Cytomegalovirus assemblin (Human herpesvirus 5)
	S73	GpO peptidase (Enterobacteria phage P2)
	S77	Prohead peptidase gp21 (Enterobacteria phage T4)
	S78	Prohead peptidase (Enterobacteria phage HK97)
	S80	Prohead peptidase gp175 (Pseudomonas phage phiKZ)
SJ	S16	Lon-A peptidase (<i>Escherichia coli</i>)
	S50	Infectious pancreatic necrosis birnavirus VP4 peptidase (Infectious pancreatic necrosis virus)
	S69	Tellina virus 1 VP4 peptidase (Tellina virus 1)
SK	S14	Peptidase Clp (<i>Escherichia coli</i>)
	S41	C-terminal processing peptidase-1 (<i>Escherichia coli</i>)
	S49	Signal peptide peptidase A (<i>Escherichia coli</i>)
SO	S74	<i>Escherichia coli</i> phage K1F endosialidase CIMCD self-cleaving protein (Enterobacteria phage K1F)
SP	S59	Nucleoporin 145 (<i>Homo sapiens</i>)
SR	S60	Lactoferrin (<i>Homo sapiens</i>)
SS	S66	Murein tetrapeptidase LD-carboxypeptidase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
ST	S54	Rhomboid-1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)
unassigned	S48	HetR peptidase (<i>Anabaena variabilis</i>)
	S62	Influenza A PA peptidase (Influenza A virus)
	S68	PIDD auto-processing protein unit 1 (<i>Homo sapiens</i>)
	S71	MUC1 self-cleaving mucin (<i>Homo sapiens</i>)
	S72	Dystroglycan (<i>Homo sapiens</i>)
	S79	CARD8 self-cleaving protein (<i>Homo sapiens</i>)
	S81	Destabilase (<i>Hirudo medicinalis</i>)

VP4: Viral RNA polymerase 4, CIMCD: C-terminal Intramolecular Chaperone Domain, HetR: Heterocyst differentiation control protein, PIDD: Primary immunodeficiency diseases, MUC1: Mucin1, CARD: Caspase recruitment domain.

表 2.3 体内における trypsin-like serine protease の役割

Role in the body	EC number	Enzymes
Digestive proteases	3.4.21.4	Trypsin
	3.4.21.1	Chymotrypsin
	3.4.21.36	Pancreatic elastase
Immune response	3.4.21.59	Tryptase
	3.4.21.46	Complement factor D
	3.4.21.47	Complement factor B
	–	Complement factor C
	3.4.21.43	Complement component 2
	3.4.21.–	Mast cell protease
	3.4.21.20	Cathepsin G
	3.4.21.37	Neutrophil elastase
Blood coagulation	3.4.21.21	Coagulation factor VIIa
	3.4.21.22	Coagulation factor IXa
	3.4.21.6	Coagulation factor Xa
	3.4.21.38	Coagulation factor XIIIa
	3.4.21.5	Thrombin
	3.4.21.69	Protein C
Fibrinolysis	3.4.21.31	Urokinase
	3.4.21.68	Tissue plasminogen activator
	3.4.21.7	Plasmin
	3.4.21.34	Kallikrein
Reproduction	3.4.21.77	Prostate specific antigen
	–	Acrosein
Bacterial homologues	3.4.21.12	Alpha lytic protease
	3.4.21.80	Streptomyces griseus protease A
	3.4.21.81	Streptomyces griseus protease B

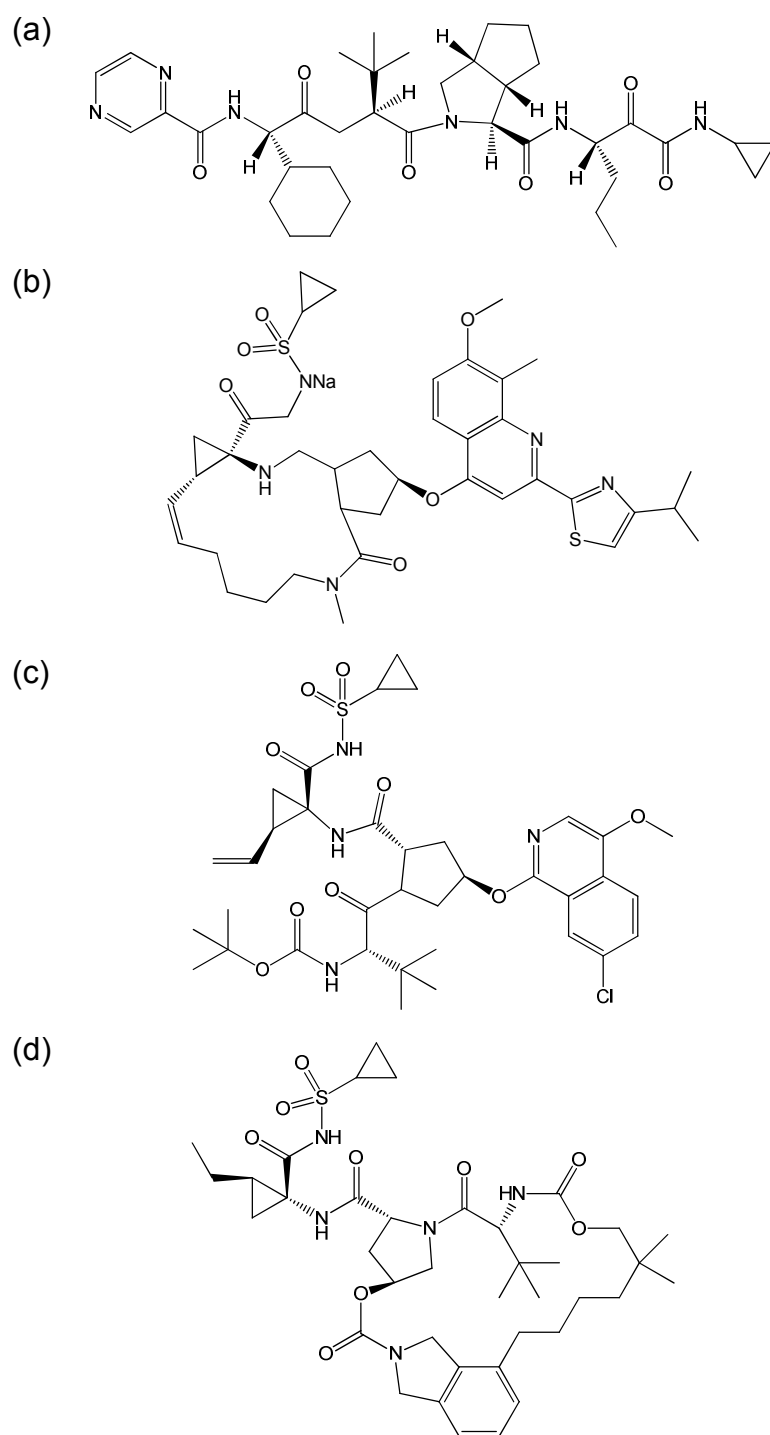


図 2.3 Serine protease 阻害剤の抗ウイルス薬

(a) Telaprevir (Telavic[®], 田辺三菱製薬), (b) Simeprevir (Sovriad[®], Janssen),
 (c) Asunaprevir (Sunvepra[®], Bristol-Myers), (d) Vaniprevir (Vanihep[®], MSD).

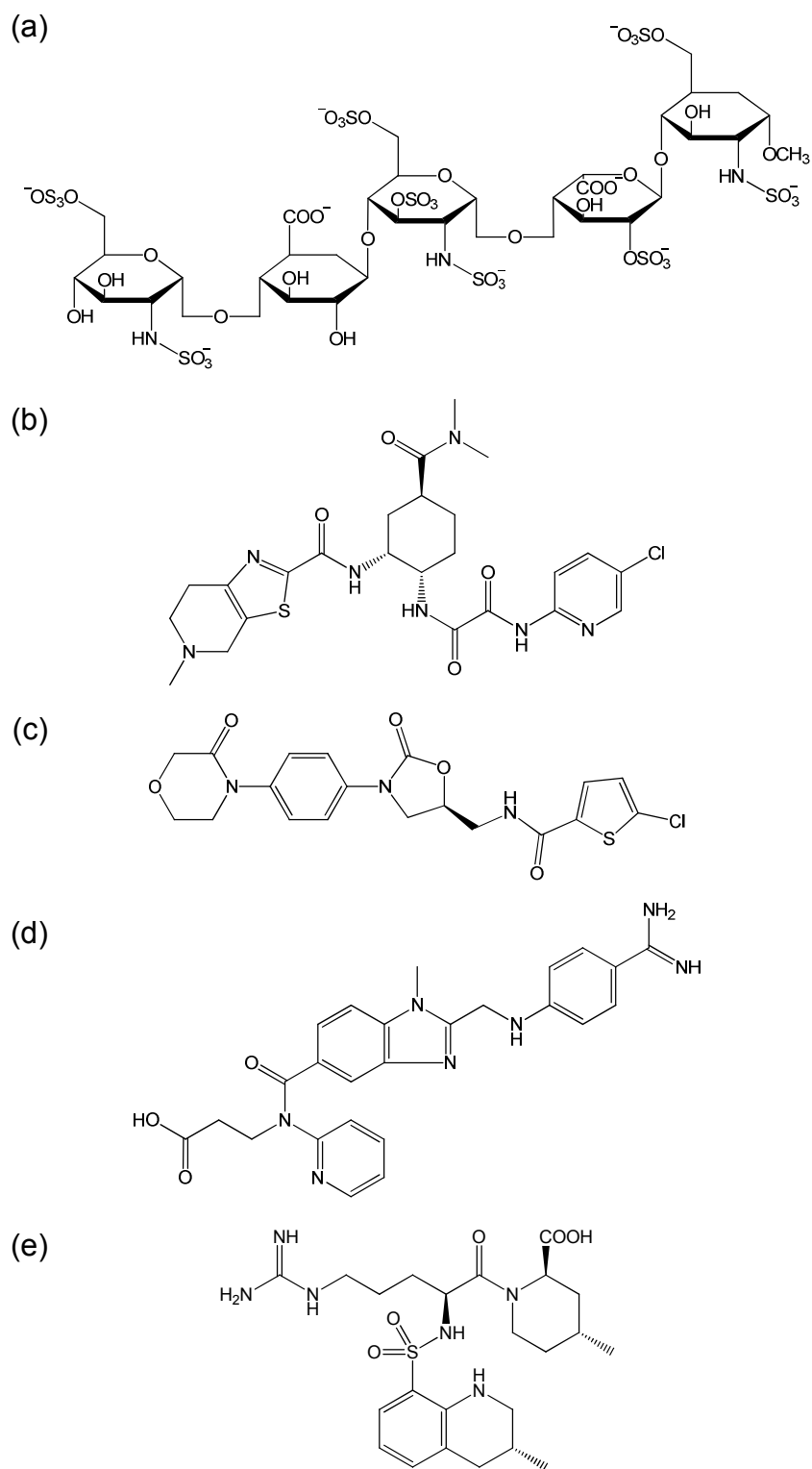


図 2.4 Serine protease 阻害剤の血液凝固阻害薬

(a) Fondaparinux (Arixtra[®], GlaxoSmithKline), (b) Edoxaban (Lixiana[®], 第一三共),
 (c) Rivaroxaban (Xarelto[®], Bayer), (d) Dabigatran (Praxa[®], Boehringer Ingelheim),
 (e) Argatroban (Novastan[®], 田辺三菱製薬).

2.1.1.1 Trypsin

Trypsin (EC 3.4.21.4)は clan PA の S1 family に属する serine protease であり、活性中心に catalytic triad の His57, Asp102 および Ser195 残基を有し、リガンドの ester 結合や peptide 結合を切断する酵素である (図 2.5, 表 2.4) [28, 29]. 体内では不活性な前駆体 (trypsinogen, EC 3.4.23.18/20/21/23/24/26)として膵臓で合成され、十二指腸に分泌される. そして、十二指腸粘膜細胞から分泌される enterokinase (EC 3.4.21.9)によって N 末端から 15 残基のアミノ酸が切断されると活性体である β -trypsin になる. さらに、 β -trypsin が自己消化的に加水分解されると特異的な酵素活性を有する α -trypsin が生成される. 同じ S1 family の消化酵素である chymotrypsin (EC 3.4.21.1)が前駆体 (chymotrypsinogen, EC 3.4.4.5/6)から生成される際には、enterokinase に加え trypsin も関与する. Trypsin は chymotrypsin よりも基質特異性が高く、弱アルカリ性 (pH = 8)で最も強い活性を示す [30]. Trypsin の基質を認識する活性ポケット (S1 pocket)は、細長く、底に位置する Asp189 によって、Lys や Arg のような塩基性残基からなる peptide を認識する (図 2.6 (a)) [31]. 一方、chymotrypsin の S1 pocket には trypsin のように荷電性の残基は存在せず、Tyr, Phe および Trp のような芳香環を有する残基や、疎水性 (hydrophobic)の側鎖を有する残基からなる peptide を好んで認識する (図 2.6 (b)).

何らかの病的要因で膵臓内の trypsinogen が trypsin へと活性化され、膵臓組織の自己消化を引き起こす病態を急性膵炎、慢性的な炎症により膵臓の細胞が非可逆的に線維化する病態を慢性膵炎という. Trypsin 阻害剤は膵炎の治療薬として用いられており、急性膵炎の治療薬として gabexate (Foy[®])や nafamostat (Futhan[®]), 慢性膵炎の治療薬として camostat (Foipan[®])が上市されている (図 2.7 (a)–(c)) [32, 33]. その他、ヒトの尿から分離・精製されるタンパク質型 trypsin 阻害剤の ulinastatin (Miraclid[®])も急性膵炎の治療薬として知られている (図 2.7 (d)) [34]. 一方、天然の trypsin 阻害剤には膵分泌性 trypsin 阻害剤 (pancreatic secretory trypsin inhibitor; PSTI)があり、膵臓の自己消化を防ぐ役割がある [20]. PSTI 値は急性膵炎で上昇するため、血中 PSTI 値を測ることで急性膵炎の重症度を把握することができる.

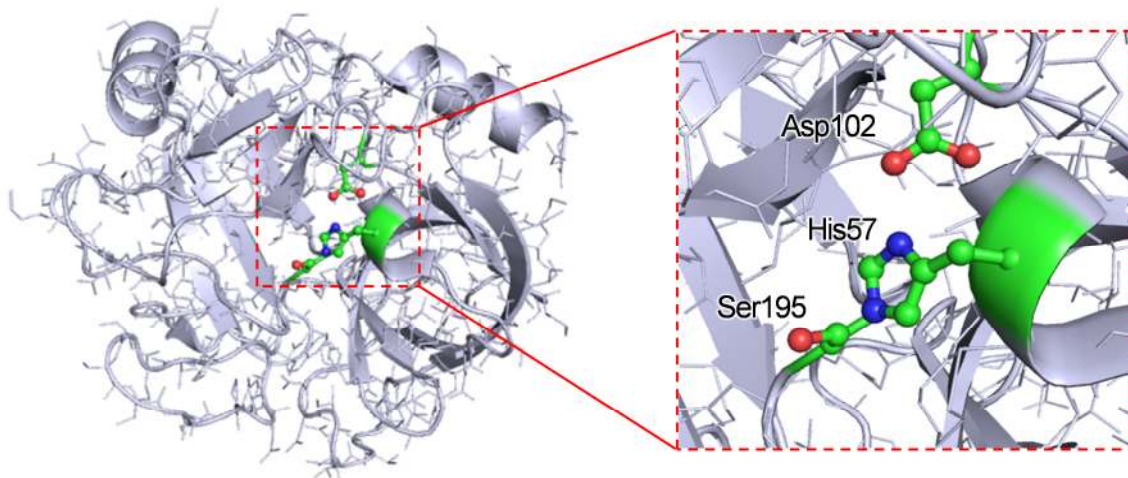


図 2.5 Trypsin の全系および catalytic triad の 3 次元立体構造
(PDB code: 1QCP)

表 2.4 Trypsin の一次配列 (赤字は catalytic triad)

IVGGYTCGANTVPYQVSLNSGYHFCGGSLINSQWVVSAA**H**CYKSGIQVRL
 GEDNINVEGNEQFISASKSIVHPSYNSNTLNN**D**IMLIKLSAASLNSRV
 ASISLPTSCASAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPDVLKCLKAPILSDSSCKS
 AYPGQITSNMFCAGYLEGGKDSCQGD**S**GGPVVCSGKLQGIWSWGSGCAQK
 NKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN

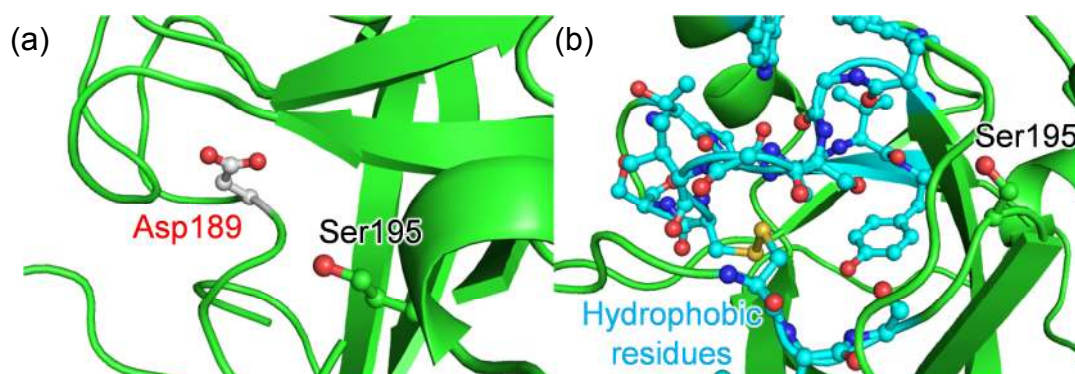


図 2.6 S1 pocket の 3 次元立体構造
 (a) Trypsin (PDB code: 1QCP),
 (b) Chymotrypsin (PDB code: 1KDQ).

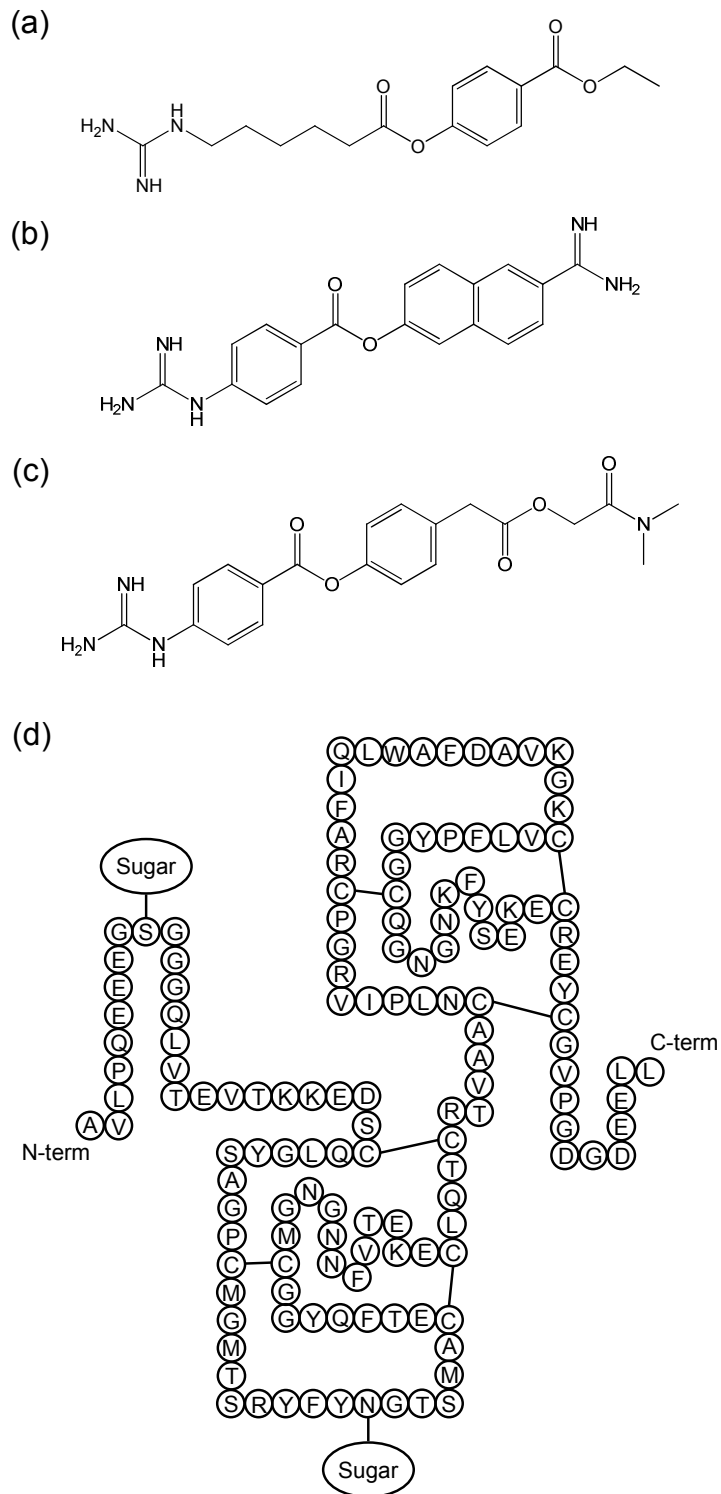


図 2.7 Trypsin 阻害剤の膵炎治療薬

(a) Gabexate (Foy[®], 小野薬品工業), (b) Nafamostat (Futhan[®], 鳥居薬品工業),
 (c) Camostat (Foipan[®], 小野薬品工業), (d) Ulinastatin (Miraclid[®], 持田製薬).

2.1.1.1.1 触媒機構

Trypsin の触媒機構では、前節で述べた活性部位の catalytic triad [28, 29]が中心的な役割を果たす。Ser195 の側鎖の水素原子 (H_γ)と His57 の imidazole 環の窒素原子 (N_δ)間、および His57 の imidazole 環の H_δ と Asp102 の側鎖の酸素原子 (O_δ)間には水素結合が形成されており、触媒反応中に catalytic triad 間で proton や電荷の移動が生じることが知られている。また、Asp102 の側鎖の O_δ と Ser214 の側鎖の H_γ の間にも水素結合が認められることから、かつて、Ser214 は 4 番目の catalytic triad という説も存在したが [35]、後に否定された [36]。

Trypsin の触媒反応はアシル化 (acylation) (図 2.8 (i)–(vi))および脱アシル化 (deacylation) (図 2.8 (vii)–(xi))の二段階反応である。基質が trypsin の S1 pocket (図 2.6 (a))に捉えられると、Michaelis–Menten 複合体 (酵素–基質 (enzyme–substrate; ES)複合体) が形成され (i)、基質の ester (peptide)結合の carbonyl の C が Ser195 の側鎖の O_γ から求核攻撃を受ける。それと協奏して Ser195 の側鎖の H_γ は、His57 の imidazole 環に移動するが、この時 His57 の imidazole 環の H_δ が Asp102 に移動するという説と、移動しないという説があり、前者は double proton transfer (DPT)、後者は single proton transfer (SPT)と称される。His57 に Ser195 の H_γ が移動すると、第一の遷移状態 (transition state; TS_1)となり、基質の ester (peptide)結合の carbonyl 部位は sp^2 混成から sp^3 混成へと変化していく (ii)。その後、基質の ester (peptide)結合の carbonyl の O が負に荷電した第一の四面体中間体 (tetrahedral intermediate; TET_1)が形成される (iii)。この時、荷電した基質の carbonyl の O が、Ser195 および Gly193 の主鎖の NH と水素結合を形成することで安定化し、この領域は oxyanion hole と呼ばれる [37]。さらに反応が進行すると、第二の遷移状態 (TS_2)を経て (iv)、アシル化酵素 (acyl enzyme; EA)が形成される (v)。EA では基質の ester (peptide)結合の carbonyl の C–O 間の結合が再び sp^2 混成に戻り、基質は切断され、生じた脱離基 (leaving group)は複合体から脱離する (vi)。ただし、ester 基質の場合は hydroxy 基を、peptide 基質の場合は amino 基を持つ leaving group がそれぞれ生成される。以上が acylation の機構である。

Acylation 後、EA の活性部位に水分子が侵入すると、deacylation が開始される (vii)。まず、水分子がアシル化した基質の切断部位の carbonyl の C を攻撃すると、水分子が自身の proton を His57 へ移動させ、第三の遷移状態 (TS_3)を形成する (viii)。その後、再び基質の carbonyl 部位が sp^3 混成に変化し、carbonyl の O が負に荷電した第二の四面体中間体 (TET_2)が形成される (ix)。最後にアシル結合が解裂し、第四の遷移状態 (TS_4)を経て (x)、proton が His57 から Ser195 に移動すると carboxyl 基を持つ生成物 (product)ができ、trypsin は初期の状態と同じになる

(enzyme product; EP) (xi). そして, product が離脱すると触媒反応開始前に戻り, 反応サイクルが一巡する (xii). 以上が一般的に知られている trypsin の触媒機構の概要である.

Trypsin と基質が単独状態から ES 複合体が形成されるまでを Michaelis–Menten 複合体形成過程 (i), それ以降の遷移状態・中間体が形成され, product が生成されるまでを速度論的過程 (ii–xi) という. Trypsin の触媒反応では律速段階が一様ではない. 一般的に ester を加水分解する場合は TET 分解時もしくは deacylation 過程が律速段階であり, amide を加水分解する場合は TET 形成時もしくは acylation 過程が律速段階だと考えられているが [38], それ以外の要因でも律速段階が変化することが報告されている [39].

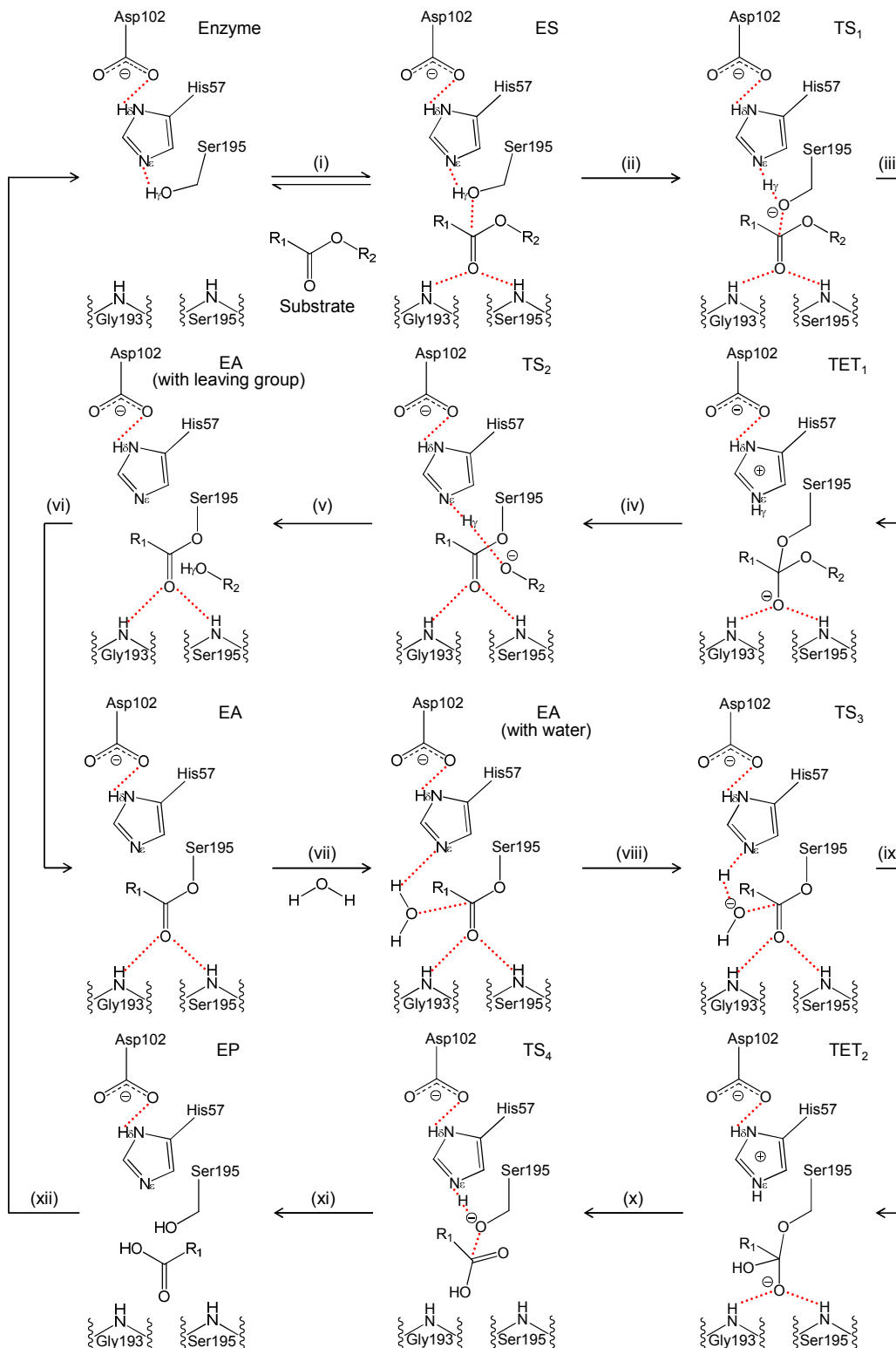


図 2.8 Trypsin による ester 基質の加水分解機構
 点線は水素結合, R_1 および R_2 は ester 部位以外の基質の構造を表す.
 acylation 過程: (i-vi), deacylation 過程: (vii-xi).

2.1.1.1.2 電荷リレー仮説

1969年にBlowら[40]は serine protease family 全体に共通する電荷リレー仮説を提唱した。彼らは chymotrypsin を用いた研究から、ES 複合体形成後、Asp102 が Ser195 から His57 への proton の移動を促進するために proton 受容体として働くという仮説を立てた。この仮説を基に、1973年にHunkapillerら[41, 42]はDPT仮説を提唱した。この仮説は触媒反応中に側鎖が非解離状態の neutral な His57 および Asp102 が同時に存在することで構造が安定し、触媒反応が促進されるというものである。つまり Ser195 から His57 への proton (H_γ)の移動と協奏的に His57 の proton (H_δ)が Asp102 へ移動するというものであり (図 2.9), 当時の理論計算に基づいた報告の中にも DPT を支持するものが多数存在する [43–45]。しかし、中性子回折 (neutron diffraction; ND)法や核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance; NMR)法を用いた実験から、DPT 仮説は次第に否定されるようになる [46–50]。その否定の根拠の多くが His57 と Asp102 の pK_a であり、水素結合を形成する原子間では通常 proton は pK_a が高い側に配位するため、His57 ($pK_a = 6.0$)から Asp102 ($pK_a = 3.7$)への proton の移動が起こりえないことが指摘された。さらに、1981年にKollmanとHayes[51]による分子軌道法計算から DPT 仮説が否定され、その後も数々の理論計算を用いた研究から DPT 仮説に否定的な報告が行われている [52–54]。したがって、現在 DPT 仮説およびその基となった電荷リレー仮説はほとんど支持されておらず、後に Blow 自身も否定している [55]。

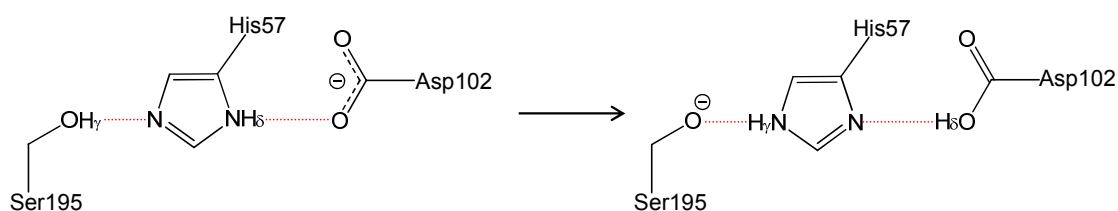


図 2.9 DPT の機構
点線は水素結合を表す。

2.1.1.1.3 低障壁水素結合仮説

電荷リレー仮説に代わる説として注目されたのが低障壁水素結合 (low barrier hydrogen bond; LBHB) 仮説である。この仮説は結合距離が短くかつ強固な水素結合が形成されることで触媒反応が促進されるというもので、通常の水素結合距離は水素結合形成に関わる重原子 (N, F, O) 間距離がおよそ 2.8 Å であるが、2.6 Å 以下になるとより強固な水素結合である LBHB が観測されるようになり、proton が両重原子間を自由に移動可能になる (図 2.10)。LBHB は小分子を用いた実験において、気相中で初めて観測された [56]。その後、タンパク質における LBHB 仮説は Cleland と Kreevoy らによって確立され [57]、さらに Frey らによって chymotrypsin 中で初めて観測された [58]。Chymotrypsin および trypsin における強固な水素結合は実に 10–20 kcal/mol ものエネルギーを有し、His57 の H_ε と Asp102 の側鎖の O_δ の間で形成され、TS が安定化されることで反応障壁が低下し、触媒反応が促進される。これは DPT 仮説と異なり、His57 から Asp102 への proton の移動が起こらないため SPT の挙動になる (図 2.11)。LBHB の根拠として His57–Asp102 間における NMR の化学シフトの異常な低磁場シフトが挙げられる [59–67]。また、1998 年には高分解能 X 線によって、His57–Asp102 間に LBHB が観測できる subtilisin-like serine protease の subtilisin BPN の結晶解析構造が得られた (図 2.12) [68]。

しかし、近年は触媒反応における LBHB の役割を疑問視する報告もなされている [69–72]。Ishida らは非経験的分子軌道法を用いた解析の結果、His57–Asp102 間の異常な低磁場シフトは静電相互作用によって説明でき、LBHB は無関係であることを報告した [71]。また、高分解能 X 線や中性子線を用いた解析からも LBHB を否定する報告が出されている [72]。その他、LBHB の観測条件についても問題が提起されており [73–76]、現在も LBHB 仮説が触媒反応を促進する要因だと言及することはできない。

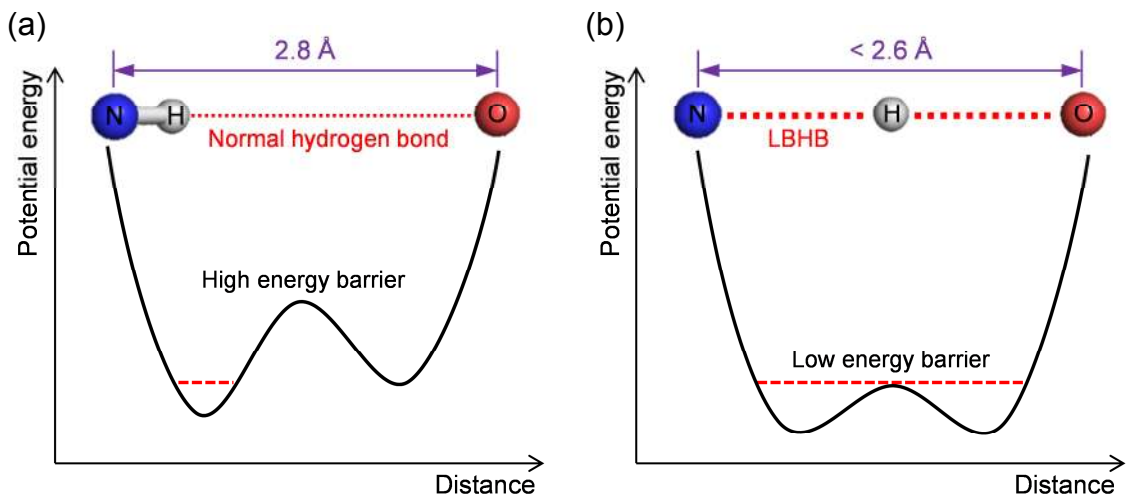


図 2.10 水素結合のエネルギー障壁
(a) 通常の水素結合, (b) LBHB.

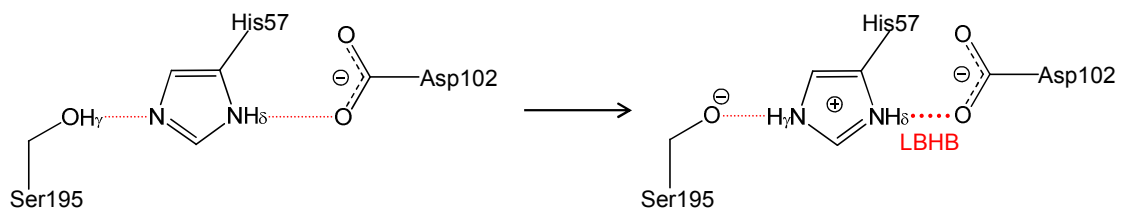


図 2.11 LBHB の機構
点線は水素結合を表す.

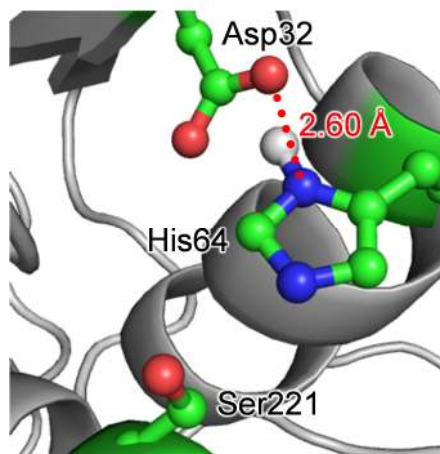


図 2.12 Subtilisin BPN の X 線結晶解析構造にて確認された LBHB [68]
点線は LBHB を表す (PDB code: 1GCI (resolution = 0.78 Å)).

2.1.1.1.4 His57 環反転仮説 (His57-ring-flip)

かつて考えられていた触媒機構では, TET の形成と分解の両過程を効率的に進めるメカニズムを十分に説明できないことが指摘されていた [77]. この問題の解決に期待されたのが His57-ring-flip 仮説である. この仮説では catalytic triad 間の水素結合に加え, Ser214 の主鎖の carbonyl の O と His57 の imidazole 環の H_ε 間の水素結合および水分子の O と His57 の H_δ間の水素結合が関与し, さらに, imidazole 環の C-H が水素結合形成に関与することが前提である. Ring-flip は図 2.13 に示すように acylation 過程および deacylation 過程のすべての状態で起こり, His57 の C_β-C_γ間で側鎖がおおよそ 180°回転することで反応が効率的に進むとされる. 図 2.13 の(a)は水素結合が 4 本で(b)よりエネルギー的に安定なため, (a) → (b) の反応は起こりにくい. したがって, まず, (a)から proton が移動した(c)が得られると最初の ring-flip が起こり, (d)が形成される. Ring-flip は逆反応を防ぐ役割もあり, 反応の方向性が定まるため, 効率よく TET₁ が形成および分解された後, deacylation (図 2.13 (e)–(h))が進行する. His57-ring-flip 仮説は Bachovchin ら [69, 78, 79]の NMR を用いた研究から導かれたもので, LBHB に代わり catalytic triad の異常な化学シフトを説明するものとされる [80].

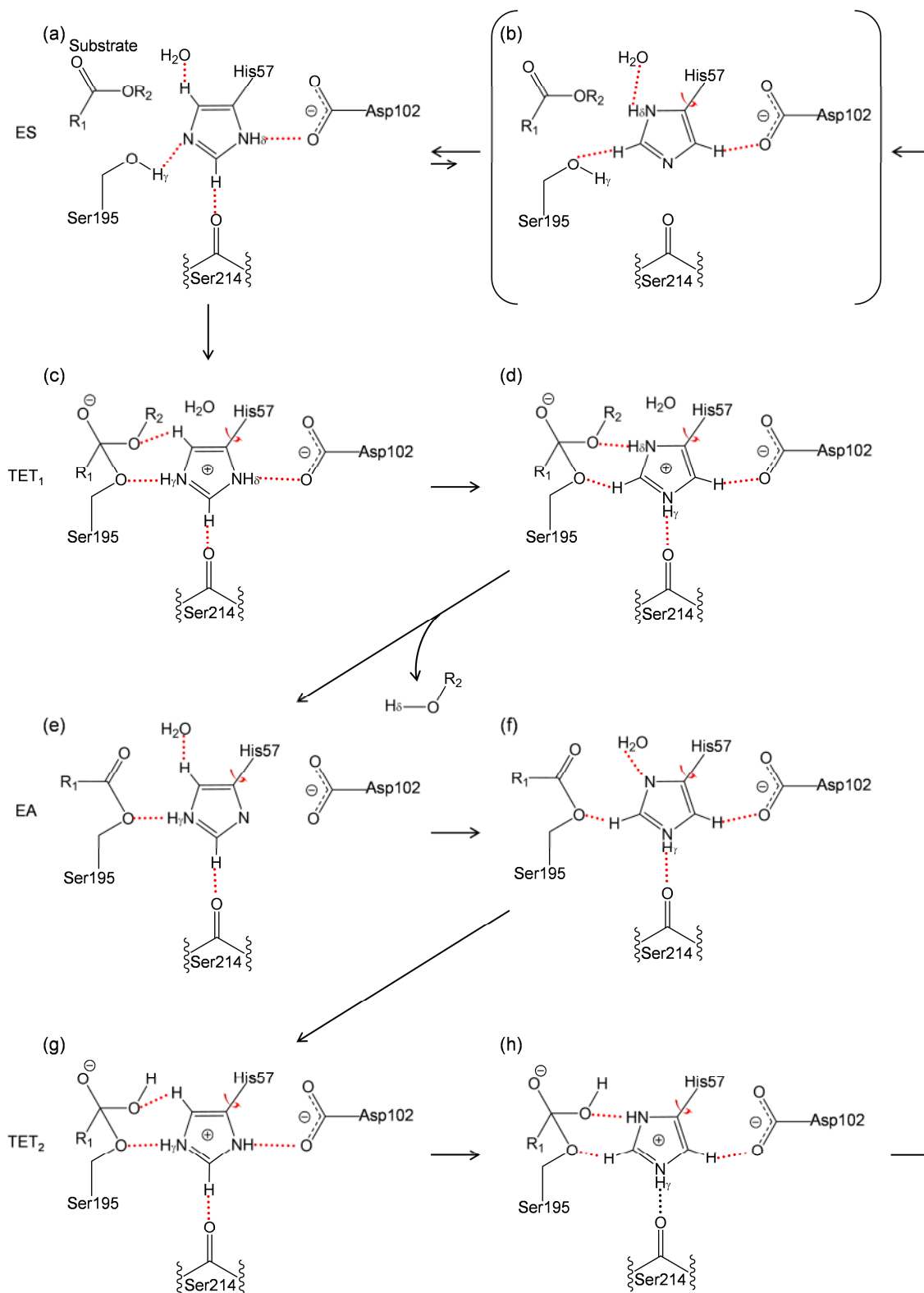


図 2.13 His57-ring-flip の機構

点線は水素結合を表す. R₁ および R₂ は ester 部位以外の基質の構造を表す.

2.1.1.1.5 短距離イオン性水素結合仮説

水素結合の中にはその構造的特徴から LBHB と区別された短距離イオン性水素結合 (short ionic hydrogen bond; SIHB)がある. 水素結合形成に関わる重原子 (N, F, O)間距離が 2.6 \AA 以下の結合距離で形成される LBHB と異なり, SIHB は通常の共有結合距離で観測され, その結合の強さは LBHB よりも弱い. 2006 年に Fuhrmann らは serine protease の触媒反応における SIHB の重要性を報告した [81]. これは His57 の N_{ϵ} と leaving group との間で形成される SIHB によって触媒反応が促進されるというものである (図 2.14). したがって, serine protease の触媒反応において, SIHB は LBHB に代わる特殊な水素結合として注目されている.

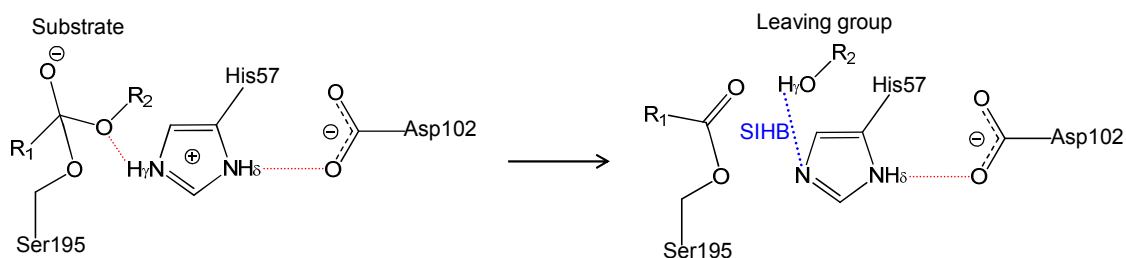


図 2.14 SIHB の機構

R_1 および R_2 は ester 部位以外の基質の構造を表す.

赤い点線は通常の水素結合, 青い点線は SIHB を表す.

2.2 定量的構造活性相関概説

薬物分子の化学構造と生物活性値との相関関係は構造活性相関 (structure-activity relationship; SAR) と呼ばれ、特に化合物の薬理活性をその分子構造に基づく物理化学的特性で数値化し、定量的に取り扱うものを定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship; QSAR) という。創薬研究において、QSAR は一連の類似構造を有する薬物の薬効を定量的に説明・予測することを目的とした論理的方法論であり、1964 年の Hansch と Fujita の論文が始まりとされる [82, 83]。この論文中で提唱された Hansch-Fujita 式 (2.1) は、現時点においても QSAR の最も代表的かつ体系的アプローチであり、自由エネルギーの線形則 (linear free-energy principle; LFEP) に基づき、芳香環上の置換基を系統的に変化させた一連の薬物分子の物理化学的性質と生物活性値との相関を表している。

$$\log (1/C) = a \pi^2 + b \pi + c \sigma + d E_s + const \quad (2.1)$$

ここで、左辺の C は特定の生理活性を発現する薬物濃度 (K_i , IC_{50} , ...) であり、 $\log (1/C)$ は薬物とその受容体との結合自由エネルギー変化に相当する。一方、右辺の π , σ および E_s は、それぞれ置換基の疎水効果、電子効果および立体効果を表す実験的に求められた物理化学パラメータであり、置換基固有の値をとる。また、 a , b , c , d および $const$ は、重回帰分析から求まる回帰係数および定数項である。式 (2.1) に説明変数として用いられている電子的パラメータ σ は、Hammett によって定義された *meta* または *para*-置換 benzoic acid の解離平衡定数から導かれたものである (式 (2.2))。

$$\sigma = \log K_X - \log K_H \quad (2.2)$$

ここで、 K_X および K_H は置換および無置換 benzoic acid の水中における解離定数であり、図 2.15 (a) の解離平衡から求められる。 $\sigma > 0$ のとき、置換基による芳香環の電子吸引効果を表し、一方、 $\sigma < 0$ のときは電子供与効果を表す。したがって、反応定数 ρ を用いて Hammett 式 (2.3) を得ることができる。

$$\log (K_X/K_H) = \rho \sigma \quad (2.3)$$

ρ は反応の性質に依存し、置換基の電子効果に対する反応の感度を表す尺度とし

て用いられる. また, 式 (2.3)の関係は反応速度定数 k_X , k_H でも成立し, 式 (2.4)が得られる.

$$\log(k_X/k_H) = \rho \sigma \quad (2.4)$$

式 (2.4)は $\rho > 0$ のとき, 反応が電子吸引効果により加速し, $\rho < 0$ のとき, 供与効果によって減速することを示す. ここで, 活性化 Gibbs 自由エネルギー (ΔG^\ddagger)を用いて式 (2.4)は次式で表される.

$$\rho \sigma = \log(k_X/k_H) = -1/2.303 RT \cdot (\Delta G_X^\ddagger - \Delta G_H^\ddagger) = -1/2.303 RT \cdot \Delta \Delta G^\ddagger \quad (2.5)$$

ΔG^\ddagger は活性化 enthalpy (ΔH^\ddagger)および活性化 entropy (ΔS^\ddagger)を用いて表すことができるが, 同族体間の ΔS^\ddagger が一定と見なせる場合, 式 (2.5)は式 (2.6)に近似可能となる.

$$\rho \sigma = \log(k_X/k_H) = -1/2.303 RT \cdot \Delta \Delta H^\ddagger \quad (2.6)$$

したがって, 式 (2.6)の右辺の $\Delta \Delta H^\ddagger$ は活性化 enthalpy である. また, 溶液反応では体積と圧力変化が無視できるので $\Delta \Delta H^\ddagger \approx \Delta \Delta E^\ddagger$ (活性化エネルギー)が成立する. 以上より, 式 (2.5)と式 (2.6)から反応速度過程における $\Delta \Delta G^\ddagger$ および $\Delta \Delta H^\ddagger$ が σ との間に比例関係が成立することがわかる.

Hammett 式は benzoic acid 系に類似の芳香族系で成立し, 特に反応中心が置換基の共鳴相互作用から離れている場合に良好に成立する. しかし, 図 2.15 (b) 置換フェノール (substituted phenol)の解離反応 [84, 85]および図 2.15 (c) 置換塩化クミル (substituted cumyl chloride)の加溶媒分解反応 [86]のように置換基が反応中心と直接共鳴する場合, σ と解離定数の相関は良好ではない. したがって, 図 2.15 (b), (c)のような系では σ の代わりに σ^- , σ^+ をそれぞれ定義する.

現在までに報告されている膨大な数の酵素に関する QSAR 式のほとんどは Hansch-Fujita 式を基盤にしており, 医薬・農薬開発において数々の成功実績がある. しかし, 薬物分子の標的となる受容体側の情報を十分に考慮していないため, 説明変数として用いた物理化学パラメータの解釈が不明瞭な場合がある. したがって, 薬物分子のみではなく, 標的受容体側の構造情報も考慮した新たな QSAR の方法論の確立が求められる.

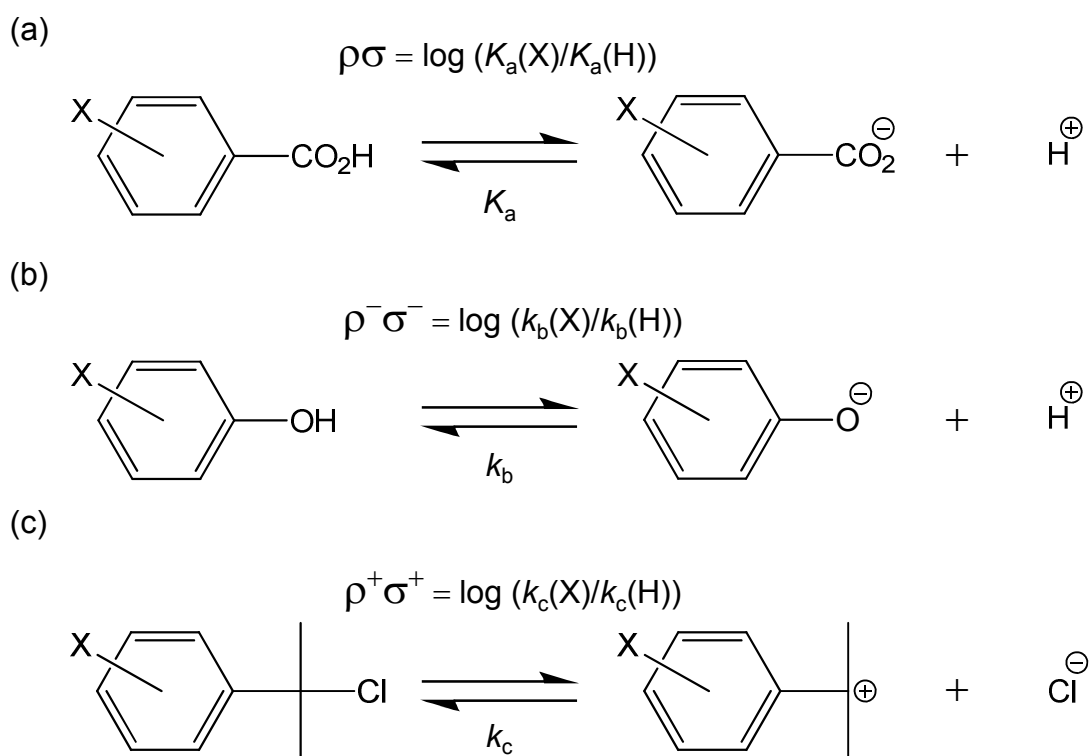


図 2.15 σ , σ^- および σ^+ の解離平衡定数 (反応速度定数) からの定義
 (a) Substituted benzoic acid, (b) Substituted phenol, (c) Substituted cumyl chloride.

2.3 分子科学計算概説

1946年に世界初のコンピューターENIACが開発されて以降、コンピューター性能は発展の一途をたどり、今や演算処理能力の優れたスーパーコンピューターを保有することは国力の象徴とされる。そして、コンピューターの進歩は創薬分野にも大きな影響を及ぼし、*in silico*創薬における分子科学計算の汎用性を高めた。分子科学計算を含む計算化学分野は、2013年にKarplus, Levitt およびWarshelの3氏が、生体高分子の化学反応をコンピューター上で効率的にシミュレーションすることを可能とする“for the development of multiscale models for complex chemical systems” (複雑な化学システムのためのマルチスケールモデルの開発)の功績からノーベル化学賞を受賞し、世間からの注目がますます高まっている。分子科学計算は、実験系では解釈の困難な分子の性質や機能を微視的なレベルで解明することを可能とする。以前は分子科学計算をタンパク質などの生体高分子系に適用することは計算コストの面から困難であったが、コンピューター性能の飛躍的進歩と新たな理論計算手法の開発により、比較的容易に適用できるようになった。例えば、分子力場 (molecular force field)を用いる分子力学 (molecular mechanics; MM)法 [87]は、古典的な手法に基づき高速に計算が可能である。古典-量子化学 hybrid 法 [88-91]は重要な部分を量子力学 (quantum mechanics; QM)的に、それ以外の部分を MM 的に取り扱うことで高速かつ高精度な計算が可能である。そして、非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO)法 [92-95]は、タンパク質などのアミノ酸残基を fragment 分割することで、非経験的分子軌道 (molecular orbital; MO)法の精度を落とすことなくタンパク質“丸ごと”のQM計算が可能である。*Ab initio* FMO法は従来の計算手法に比べ、計算コストを大幅に短縮でき、さらに、フラグメント間相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy; IFIE)の定量的解析を行い、アミノ酸残基ごとの寄与を算出することができる。

2.3.1 分子力学計算

分子力学 (molecular mechanics; MM)法 [87]は古典論に基づいた原子間相互作用ポテンシャルエネルギーの算出法であり、古典力学から導かれたポテンシャルエネルギー関数に従って構造の最適化を行う。ポテンシャルエネルギー関数は複数のエネルギー関数の和として以下のように表される。

$$E = E_{\text{bond}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{improper torsion}} + E_{\text{van der Waals}} + E_{\text{electrostatic}} \quad (2.7)$$

ここで、式 (2.7) の右辺 E_{bond} , E_{angle} , E_{torsion} , $E_{\text{improper torsion}}$, $E_{\text{van der Waals}}$ および $E_{\text{electrostatic}}$ は、それぞれ原子間の結合伸縮 (bond), 結合角 (angle), 捻れ角 (torsion), 面外変角 (improper torsion), van der Waals (vdW) 相互作用および静電相互作用 (electrostatic) の関数であり、エネルギー極小構造からのズレから生じるエネルギーを表す。ポテンシャルエネルギー関数は、分子力場 (molecular force field) と称され、実験データや量子化学計算から求められたものであり、使用目的に応じて、これまでに様々な種類の力場が開発されている。Assisted model building with energy refinement (Amber) 力場は、タンパク質などの生体分子シミュレーションを踏まえて開発され、量子化学計算から分子のポテンシャルエネルギー面を再現する汎用性の高い分子力場パラメータである。Amber 力場では分子全体のポテンシャルエネルギー (E) を式 (2.8) の関数を用いて記述する。

$$E = \sum_{\text{bonds}} K_{ij}^R (R_{ij} - R_{ij}^{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{eq})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_{ijkl}^n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \gamma_{ijkl})] \\ + \sum_{j=1}^{\text{atoms}} \sum_{i>j}^{\text{atoms}} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} \right] + \sum_{j=1}^{\text{atoms}} \sum_{i>j}^{\text{atoms}} \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \quad (2.8)$$

ここで、式 (2.8) の右辺の第一項は共有結合 (i, j) の原子間エネルギー、第二項は結合角 (i, j, k) のエネルギー、第三項は結合次数および結合のねじれ二面体角 (i, j, k, l) のエネルギー、そして第四項と第五項はともに非結合原子間のエネルギーを表しており、それぞれ Lennard-Jones 型の相互作用エネルギーおよび Coulomb の法則に基づく静電相互作用エネルギーを表す。

2.3.2 古典-量子化学 hybrid 法

Morokuma ら [96-98] が提案した量子化学計算と古典計算との hybrid 法である our own N -layered integrated molecular orbital and molecular mechanics (ONIOM) 法は、分子系を N 個の層に分割し、それぞれの層に異なる計算レベルを適用することで、分子の重要部分の計算精度を保ちつつ全体の計算コストを削減できる有用な手法である。ONIOM 法は、反応中心などの重要部分を量子力学 (quantum mechanics; QM) 的に取り扱い、それ以外の部分は MM 的に取り扱う QM/MM 法の一つである。計算対象分子を二層に分けた 2-layer ONIOM 法では、計算対象分子

に対して **real** 系 (対象分子そのもの) と **model** 系 (反応中心などの重要部分) を設定し, **real** 系に対する高精度な計算で得られるエネルギー $E(\text{real, high})$ を式 (2.9) で近似する (図 2.16).

$$E(\text{real, high}) = E(\text{real, low}) + E(\text{model, high}) - E(\text{model, low}) \quad (2.9)$$

ここで, **high** は高精度計算, **low** は低精度計算を表す. 式 (2.9) の近似では, **real** 系における計算精度は **model** 系の高精度計算で改善できる. また, ONIOM 法による高精度な QM 領域の計算には, MM 領域の静電場の分極効果を考慮しない **mechanical embedding (ME)** 法, 分極効果を考慮する **electro embedding (EE)** 法の二種類がある.

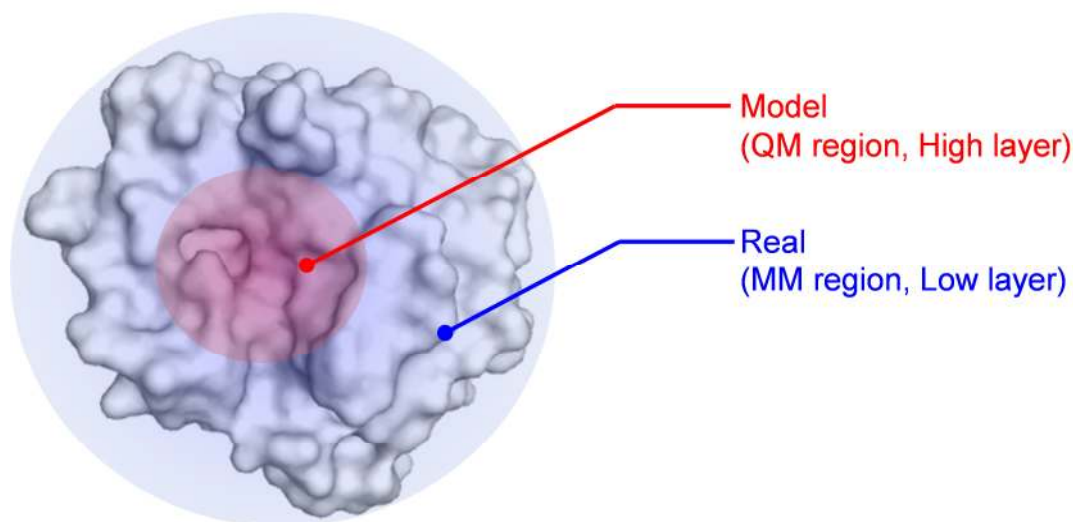


図 2.16 2-layer ONIOM 法の **model** および **real** 領域の概念図
High layer は QM による高精度計算,
Low layer は MM による低精度計算に対応する.

2.3.3 非経験的フラグメント分子軌道法

Kitaura ら [92–95] の開発した非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO)法は, タンパク質などの生体高分子系を数十原子程度の小さな N 個の fragment に分割し, fragment (monomer) と fragment pair (dimer) 毎の計算を行うことにより従来の非経験的分子軌道 (*ab initio* molecular orbital; MO)法の計算時間を大幅に短縮し, かつ精度を保ったままタンパク質“丸ごと”の分子の電子状態を計算可能な方法である. また, フラグメント間の相互作用解析が可能なことも FMO 法の特徴である. 解析対象とする系全体のエネルギー (E) を dimer ij のフラグメント間相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy; IFIE) ($\Delta\tilde{E}_{ij}$) と環境静電ポテンシャルの寄与を除いた monomer のエネルギー ($E'_i = E_i - \text{Tr}(\mathbf{P}^i\mathbf{V}^i)$) の和として次式 (2.10) で表すことができる.

$$E = \sum_{i>j} \Delta\tilde{E}_{ij} + \sum_i E'_i \quad (2.10)$$

ここで, $\Delta\tilde{E}_{ij}$ は monomer と dimer の電子密度行列の差分行列 ($\Delta\mathbf{P}^{ij}$) と環境静電ポテンシャルの寄与を除いた dimer のエネルギー ($E'_{ij} = E_{ij} - \text{Tr}(\mathbf{P}^i\mathbf{V}^i) - \text{Tr}(\mathbf{P}^j\mathbf{V}^j)$) を用いて次式 (2.11) で近似的に表すことができる.

$$\Delta\tilde{E}_{ij} = (E'_{ij} - E'_i - E'_j) + \text{Tr}(\Delta\mathbf{P}^{ij}\mathbf{V}^{ij}) \quad (2.11)$$

したがって, IFIE を用いることでリガンドとタンパク質の各 fragment との相互作用エネルギーの定量的解析が可能である. ただし, 電子共役効果の小さな結合で切断した方が, 計算誤差が小さいため, fragment 分割の単位はアミノ酸残基単位と異なる (図 2.17).

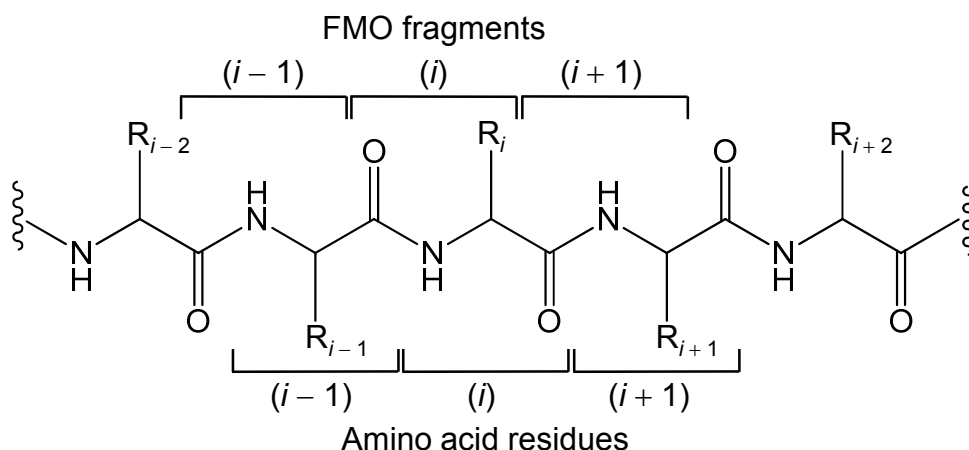


図 2.17 FMO 法における polypeptide の fragment 分割
 R_{i-2} , R_{i-1} , R_i , R_{i+1} および R_{i+2} はアミノ酸残基の側鎖を表す.

2.3.4 結合相互作用エネルギー計算

真空中で分子間に働く相互作用の種類には、静電相互作用、vdW 相互作用、水素結合および電荷移動相互作用があり、さらに、vdW 相互作用は双極子相互作用や分散相互作用に分けられる。結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}) はこれら相互作用のうち、分散相互作用以外の相互作用に由来するエネルギーである。タンパク質-リガンド間に働く ΔE_{bind} は、リガンドがタンパク質と結合することで安定化されるエネルギーであり、一般的に以下の式で定義される。

$$\Delta E_{\text{bind}} = E(\text{complex}) - [E(\text{protein}) + E(\text{ligand})] \quad (2.12)$$

ここで、 $E(\text{complex})$ は複合体のエネルギー、 $E(\text{protein})$ および $E(\text{ligand})$ はそれぞれタンパク質とリガンド単体のエネルギーである。 ΔE_{bind} は式 (2.12) に基づき分子科学計算によって算出可能であるが、タンパク質などの生体高分子系に適用することは計算コストの面から困難なため、その算出に ONIOM 法や *ab initio* FMO 法などの計算手法が用いられることがある。

分子軌道法計算によって ΔE_{bind} を評価した際、使用した複合体形成時のタンパク質およびリガンドが互いの基底関数の影響を受け、 ΔE_{bind} を過大評価することがあり、これを基底関数重なり誤差 (basis set superposition error; BSSE) という [99, 100]. 一般的に BSSE は安価な基底関数を用いた場合に大きくなり、基底関

数を大きく (高価に)すれば小さくなる. BSSE の補正法として Boys と Bernardi らの counterpoise (CP)法 [100, 101]が最も良く知られている.

2.3.5 分散相互作用エネルギー計算

タンパク質-リガンド間の分散相互作用エネルギー (E_{disp})は瞬間的な双極子によって形成される静電的なエネルギーであり, 分子間相互作用の中で最も弱く (≤ 1 kJ/mol), 中性分子間に働く vdW 相互作用エネルギーの引力項の大部分を占める. エネルギーは弱いものの, タンパク質-リガンド間の原子対の数は膨大になり, かつタンパク質とリガンドが静電的な相互作用で強固に結びつく場合, 特に E_{disp} の寄与が重要になるため, 分子間相互作用解析では E_{disp} を定量的に見積もることが重要となる.

タンパク質などの生体高分子系の E_{disp} を計算する場合, 計算コストの点から分子力学を用いた古典的評価が有用であり, Amber の Lennard-Jones 項中の r^{-6} 項のパラメータ (LJ6 パラメータ)は E_{disp} を良好に近似できることが報告されている [102]. また, E_{disp} の評価には摂動法の一つである Møller-Plesset (MP) n 法やクラスター演算子を用いる coupled cluster (CC)SD(T)法などの, いわゆる post Hartree-Fock (HF)法と高い基底関数を用いることが望まれるが, 膨大な計算コストがかかる. *Ab initio* FMO 法などの量子化学的評価法では, 電子相関を考慮することでより厳密に E_{disp} を評価することが可能であるが, 計算コストの点からタンパク質全系への適用は困難となる. B3LYP に代表される密度汎関数理論 (density functional theory; DFT)は, 一般化密度勾配近似 (generalized gradient approximation; GGA)に基づいたものが主流であるが, 電子相関項に由来する E_{disp} を十分に評価できないことが報告されている [103]. そこで, Grimme ら [104, 105]は DFT に対する経験的な damping function を用いた分散力補正 (DFT-D)法を提案しており, Becke and Johnson (BJ)-damping function を用いた DFT-D3(BJ)法 [106–112]などが知られている. 現在, 分散力補正が可能な DFT 法として, *meta*-GGA 型の PBEPBE, TPSSTPSS および BP86, hybrid-GGA 型の B3LYP, B97 および B3PW91, hybrid *meta*-GGA 型の BMK, M06-2X, ならびに range-separated hybrid *meta*-GGA 型の M11 などがある [113–119]. 一方, Hartree-Fock (HF)法に対する分散力補正では, HF エネルギーに LJ6 項を加えることで (HF + LJ6), MP2 のエネルギーを良好に再現可能であるが [102], 体系的な比較・検証に関する報告は少なく, その補正法には改善の余地がある.

2.3.6 水和自由エネルギー計算

生体内タンパク質は水などの溶媒中に存在するため、タンパク質-リガンド間の相互作用を解析する際、溶媒の与える影響を考慮する必要がある。真空中から溶媒中への分子の移動に伴う水和自由エネルギー変化 (ΔG_{sol})は、式 (2.13)の成分に分割される。

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{cav}} \quad (2.13)$$

ここで、 ΔG_{elec} と ΔG_{vdW} はそれぞれ溶質-溶媒間の静電相互作用エネルギーおよび分散相互作用エネルギーを表すが、 ΔG_{vdW} はさらに引力項 ΔG_{disp} と反発項 ΔG_{rep} に分割可能である。 ΔG_{cav} は溶媒内に溶質の空洞を作る際に必要な自由エネルギーを表す。これら3つの成分の中でも ΔG_{elec} は特に ΔG_{sol} に対する寄与が大きく、その寄与は様々な式で定義される。

Poisson-Boltzmann (PB)方程式に基づく PB法 [120, 121]は、溶質とそれを取り巻く溶媒に立体格子を重ね合わせたモデルを用い、各格子点におけるポテンシャルを計算し、そのポテンシャルから ΔG_{elec} を計算する手法である。一般化ボルン (generalized born; GB)式に基づく GB法 [122]は、原子の電荷と有効ボルン半径からなるモデルを用い、近似的に ΔG_{elec} を計算する手法である。これら二つの手法は、ともに分子力場モデルに組み入れられ古典的に ΔG_{sol} を算出する。一方、量子化学的に ΔG_{sol} を求める手法の一つに polarizable continuum model (PCM)法 [123]がある。PCM法は種々の半径 (Bondi, Pauling, UFF, UA0, ...)によって表される PCMモデルを用い、self-consistent reaction field (SCRF)法に基づき、自己無撞着的に ΔG_{elec} を算出する手法であり、通常 of integral equation formalism (IEF)PCM法 [124-127] および conductor-like screening model (COSMO)モデルを用いた conductor (C)PCM法 [128, 129]がある。しかし、量子化学的であるPCM法をタンパク質全体に適用することは計算コストの観点から現実的には困難である。

2.4 Entropy–enthalpy 補償則

熱力学平衡状態におけるタンパク質と基質の複合体形成に伴う Gibbs 自由エネルギー変化 (ΔG)は, 実測の平衡定数 K と関連し, ΔH と ΔS を用いて以下のように表される (式 (2.14)).

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (2.14)$$

ここで, R は気体定数, T は絶対温度を表す. また, 化学反応が自発的に進行するためには $\Delta H < 0$ および $\Delta S > 0$ の条件を満たす必要がある. さらに, 化学反応や化学平衡系について, ΔH と ΔS の間には経験的に線形関係が成立し, この関係は entropy–enthalpy 補償則として知られる (式 (2.15)).

$$-T\Delta S = -\alpha \Delta H + \text{const} (\alpha > 0) \quad (2.15)$$

Entropy–enthalpy 補償則は 1920 年頃に初めて提唱され, 以来, 多くの反応系で確認されてきた. 例えば, 阻害剤と標的タンパク質の結合に伴う ΔH を安定化させたとしても, 阻害活性の大幅な改善は必ずしも見られない. これは, ΔH の安定化と同時に, $-T\Delta S$ の損失を引き起こすからである. すなわち, ΔH は $-T\Delta S$ によって補償されるため, 結果として大きな自由エネルギー変化は生じない. したがって, 新規阻害剤開発などの創薬において entropy–enthalpy 補償則を考慮することは重要と考えられる. 一般的に ΔH と ΔS の測定法には, van't Hoff プロットを用いるものと, 等温滴定型熱量計 (isothermal titration calorimeter; ITC) を用いる二つの方法がある. Van't Hoff プロットを用いる測定法は, 式 (2.14) の両辺を $-RT$ で割ることによって導かれる式 (2.16) の傾き ($-\Delta H/RT$) と切片 ($\Delta S/R$) から, それぞれ ΔH と ΔS を算出する方法である.

$$\ln K = -\Delta H/R \cdot (1/T) + \Delta S/R \quad (2.16)$$

したがって, van't Hoff プロットを用いた測定法は間接的に ΔH と ΔS を求めるが, 独立に ΔH と ΔS を算出しないため, 誤差が大きくなりやすく, その信頼性が疑問視されている [130]. 一方, ITC はある温度における ΔH と ΔS を直接的に求める手法であり, 独立に ΔH と ΔS を算出するため, 誤差も小さく, その信頼性は高く, 現在多くの系の ITC 測定から求めた ΔH と $-T\Delta S$ の間に補償関係が成立することが報告されている.

ここで、以下に entropy–enthalpy 補償則の実例を挙げる。Talhout ら [131, 132] は、trypsin と *para*-alkylbenzamidinium chloride との結合定数 (K)および結合 enthalpy 変化 (ΔH)を、ITC により複数の温度条件下 ($T = 293, 298, 303, 310$ K)にて測定し、複合体形成に伴う全自由エネルギー変化 (ΔG)と結合 entropy 変化 (ΔS)を算出した。その結果、trypsin と *para*-alkylbenzamidinium chloride の複合体形成における entropy 変化と enthalpy 変化の良好な補償関係を報告した (式 (2.17), 図 2.18 (a)).

$$-T\Delta S = -\alpha_1 \Delta H - 5.94 \quad (2.17)$$

$$n = 32, r = 0.949, s = 0.401 \text{ kcal/mol}, \alpha_1 = 0.893$$

また、Brandt ら [132, 133]も ITC を用いた実験の結果、trypsin と一連の benzamidinium-type ligand の間に entropy 変化と enthalpy 変化の良好な補償関係が成立することを報告している (式 (2.18), 図 2.18 (b)).

$$-T\Delta S = -\alpha_2 \Delta H - 9.04 \quad (2.18)$$

$$n = 8, r = 0.992, s = 0.176 \text{ kcal/mol}, \alpha_2 = 1.04$$

以上より、trypsin とリガンドの相互作用を考える際、その複合体形成に伴う自由エネルギー変化が entropy–enthalpy 補償則に従うと予測できる。

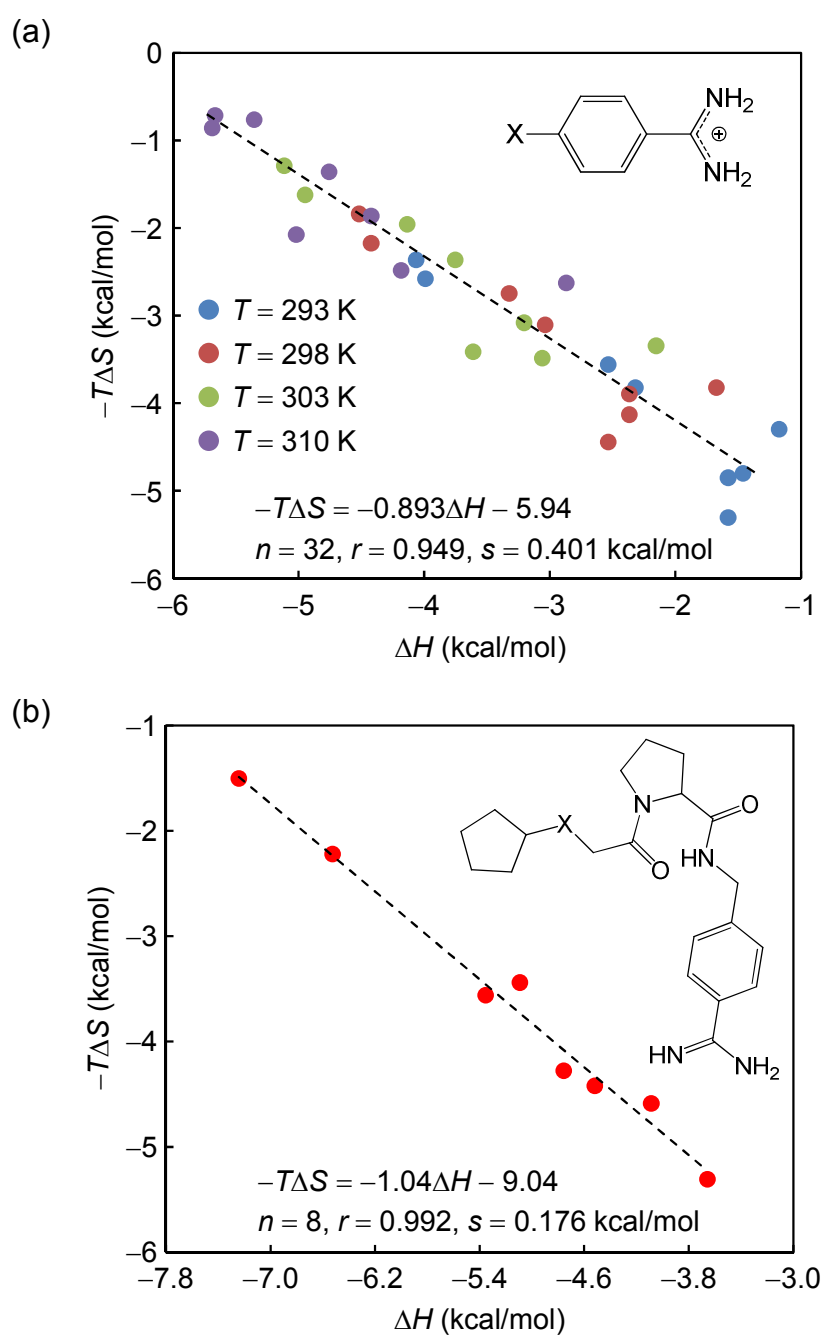


図 2.18 Trypsin とリガンドの複合体形成における entropy-enthalpy 補償則
 (a) *Para*-alkylbenzamidine chloride [131], (b) Benzamidinium-type ligand [133].

2.5 自由エネルギー変化のエネルギー代表項による線形表現解析

本研究室では、分子科学計算によるタンパク質と一連の阻害剤との複合体形成に関する自由エネルギー変化の定量的評価法として、LFEPに基づく新規解析法である linear expression by representative energy terms (LERE)-QSAR 解析を提案し、これまでにその有用性を N1-NA (influenza virus neuraminidase-1), CA (carbonic anhydrase), MMP (matrix metalloproteases)-9 および MMP-12 と各阻害剤との複合体系などで検証を行った [134–140]. LERE-QSAR 解析では、複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の実測値 ΔG_{obs} ($= -RT \ln K$, R : 気体定数, T : 絶対温度, K : 平衡定数 (K_i , K_D , K_m , (IC_{50}) , ...))は、自由エネルギーの線形性と加成性に基づき次式 (2.19)で表される (自由エネルギーの加成性).

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}} + \Delta G_{\text{others}} \quad (2.19)$$

ここで、 ΔG_{bind} はタンパク質-リガンド間の結合自由エネルギー変化、 ΔG_{sol} は複合体形成に伴う水和自由エネルギー変化を表し、この両者は複合体形成に伴う自由エネルギー変化の代表項 (representative energy terms)である. 一方、エネルギー代表項以外を含む ΔG_{others} は複合体形成に伴う penalty energy 項として、式 (2.20)のようにエネルギー代表項と線形関係にあると近似する (LERE 近似).

$$\Delta G_{\text{others}} = \beta (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1 \quad (2.20)$$

ただし、 $\beta < 0$ and/or $\text{const}_1 > 0$ ($\Delta G_{\text{others}} > 0$)と仮定する. 次に、式 (2.20)を式 (2.19)に代入して変形すると式 (2.21)を得ることができる.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1 \quad (2.21)$$

一般に ΔG_{obs} には enthalpy 変化項 (ΔH_{obs})に加え、entropy 変化項 ($-T\Delta S_{\text{obs}}$)も含まれると考えられるが、タンパク質のような巨大分子に対して分子科学計算による entropy 項の評価は現状困難である [141]. そこで、 ΔG_{bind} , ΔG_{sol} を enthalpy 項のみで表すため、前節の式 (2.15)に基づいた以下の式をそれぞれ定義する ($\alpha > 0$) (entropy-enthalpy 補償則).

$$-T\Delta S_{\text{bind}} = -\alpha \Delta H_{\text{bind}} + \text{const}_2 \quad (2.22)$$

$$-T\Delta S_{\text{sol}} = -\alpha \Delta H_{\text{sol}} + \text{const}_2 \quad (2.23)$$

さらに, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ より, 式 (2.22), 式 (2.23) から ΔG_{bind} , ΔG_{sol} をそれぞれ以下の式で表すことができる.

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H_{\text{bind}} - T\Delta S_{\text{bind}} = (1 - \alpha) \Delta H_{\text{bind}} + \text{const}_2 \quad (2.24)$$

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta H_{\text{sol}} - T\Delta S_{\text{sol}} = (1 - \alpha) \Delta H_{\text{sol}} + \text{const}_2 \quad (2.25)$$

以上より, $(1 - \alpha)$ は entropic なエネルギーを含む係数であり, 式 (2.24), 式 (2.25) の右辺のエネルギー代表項は enthalpy のみで表される. 式 (2.24), 式 (2.25) を式 (2.21) に代入すると式 (2.26) が得られる.

$$\Delta G_{\text{obs}} = (1 + \beta) (1 - \alpha) (\Delta H_{\text{bind}} + \Delta H_{\text{sol}}) + \text{const}_3 \quad (2.26)$$

溶液中では体積・圧力変化が一定のため, $\Delta H_{\text{bind}} \approx \Delta E_{\text{bind}} + E_{\text{disp}}$ の置き換えが可能である. また, 水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は, その大部分が enthalpy 項であるため [142], $\Delta H_{\text{sol}}^{\text{polar}} \approx \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ と見なすことができ, 一方, 非極性項 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}}$ の化合物間の変動は ΔG_{sol} の変動に比べて非常に小さいため [135], $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}} \approx 0$ と近似できる. 以上より, 式 (2.27) を得る.

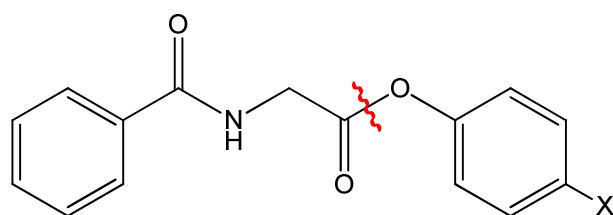
$$\Delta G_{\text{obs}} = A (\Delta E_{\text{bind}} + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + \text{const}_3 \quad (2.27)$$

ここで, 右辺の係数 $A (= (1 + \beta) (1 - \alpha), 0 < A < 1)$ は線形定数であり, A , α , β , const_1 , const_2 および const_3 の間には $\beta = (\alpha + A - 1)/(1 - \alpha)$, $\text{const}_1 = (\text{const}_2 + \text{const}_3)/(1 - \alpha)$ の関係が成立する. ΔE_{bind} は分散相互作用以外の相互作用に基づく結合相互作用エネルギー項, E_{disp} は分散相互作用エネルギー項, そして $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ は水和自由エネルギー変化の極性項であり, これらのエネルギー代表項はすべて enthalpy である. 以上より, 式 (2.27) は LERE-QSAR 解析の基本式として用いられる.

2.6 本研究の背景と目的

1985年に Selassie らは pH = 6, 7, 8 の条件にて trypsin による一連の基質の触媒活性値の変動に対して、説明変数に Hammett σ^- を用いた古典 QSAR 解析結果 (図 2.19) を報告した [143]. Selassie らは基質に馬尿酸フェニルエステル (hippuric acid phenyl ester; HPE) の芳香環の *para* 位を一連の置換基で変化させた *para*-置換馬尿酸フェニルエステル (*para*-substituted HPE) を用いた. 古典式の物理化学パラメータに σ^- が使われたのは, *para*-substituted HPE を加水分解する過程で substituted phenol が生成されるためである (図 2.15 (b)). 解析に用いた触媒活性値 ($\log(1/K_m)$, $\log k_{cat}$, $\log(k_{cat}/K_m)$) および σ^- の値を表 2.5 に示す.

表 2.5 *para*-substituted HPE の構造と古典 QSAR 解析に用いた化合物の触媒活性値ならびに Hammett σ^- (図中の赤い部分は切断部位)



Compound		$\log(1/K_m)^{a,b}$			$\log k_{cat}^{a,c}$			$\log(k_{cat}/K_m)^{a,d}$			σ^-
No.	-X	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8	
1	OCH ₃	2.88	2.99	3.30	-1.49	-0.96	-1.15	1.39	2.03	2.14	-0.16
2	NH ₂	3.20	3.11	3.22	-1.20	-1.12	-1.07	1.82	1.99	2.16	-0.15
3	CH ₃	3.00	3.20	3.37	-1.42	-1.08	-1.19	1.58	2.12	2.18	-0.15
4	H	3.00	3.36	3.31	-1.43	-1.30	-1.12	1.57	2.06	2.19	0.00
5	Cl	3.19	3.37	3.37	-1.42	-0.99	-0.75	1.72	2.38	2.63	0.27
6	CN	3.37	3.81	3.62	-1.20	-0.82	-0.66	2.17	2.99	2.96	1.00
7	NO ₂	3.56	3.69	3.83	-0.91	-0.40	-0.44	2.64	3.29	3.38	1.24
8	SO ₂ NH ₂	3.39	3.64	3.76	-1.20	-0.79	-0.44	2.19	2.86	3.32	0.94

^a Taken from ref. [143].

^b K_m in M.

^c k_{cat} in sec⁻¹.

^d k_{cat}/K_m in sec⁻¹ M⁻¹.

ここで、目的変数に用いられているパラメータ K_m , k_{cat} は、それぞれ触媒反応における Michaelis–Menten 定数および反応速度定数である。 K_m は“実験的に”求めた触媒反応の最大反応速度 (V_{max})の半分の速度 ($V_{max}/2$)を与える時の基質濃度として定義される。つまり、ある時点で酵素が触媒作用を示す割合を表していることから、酵素–基質間の親和性を表すと考えられる。また、 k_{cat} は酵素の最大速度反応時に 1 秒間あたりに処理する基質の割合、すなわち代謝回転数を、 k_{cat}/K_m は触媒反応効率を表す。一般的に触媒反応速度は pH によって影響を受け、至適 pH で最大となる。したがって、図 2.19 (a)–(c) のグラフの傾きは pH によって変化する。また、傾きが正であることから電子吸引基によって反応が加速することが示唆される。しかし、Selassie らが古典 QSAR 解析の説明変数に用いた σ^- は、本来置換フェノールのプロトン解離の反応速度定数から定義され、酵素反応における古典 QSAR 式で何故統計的に有意となるかは自明ではない。また、Selassie らは acylation の中間体分解過程が trypsin–*para*-substituted HPE 系の律速段階だと報告しているが、その根拠は明記されておらず議論の余地が残る。

従来 QSAR 手法による薬物分子の活性予測は、薬物分子の標的となる受容体 (タンパク質) 側の情報を十分に考慮しておらず、古典式の物理化学パラメータの解釈も一義的ではない。我々が提案する LERE-QSAR 解析は、分子科学計算・シミュレーションを用いてタンパク質–リガンド間の相互作用を原子・電子レベルで解析可能とし、QSAR を用いた創薬の新しい論理的方法論として期待される。本研究では LERE-QSAR 解析を酵素 trypsin–*para*-substituted HPE 系に適用し、触媒反応メカニズムに対する知見を得ることを目的とする。これにより、古典 QSAR 解析に用いられた σ^- のような記述子の速度論的過程における物理化学的意味を解明できると考えられる [144]。

まず、既知の X 線結晶解析構造に *para*-substituted HPE をドッキングさせ、MM 法および古典–量子化学 hybrid 法を用いて Michaelis–Menten 複合体 (ES 複合体) 構造を構築した。次に、ES 複合体構造を基に acylation 過程の残りの中間体構造 (TS₁, TET₁, TS₂, EA) を構築し、trypsin と ester 基質の加水分解反応の律速段階の同定、DPT 仮説や LBHB 仮説などで依然として議論が続いている catalytic triad の His57–Asp102 間の相互作用について検討した。また、Selassie らの化合物セットを用いて一連の複合体構造を構築し、LERE-QSAR 解析を用いて Michaelis–Menten 複合体形成過程および複合体形成後、律速段階が存在する速度論的過程のエネルギー変化を定量的に説明できるか検証を行った。LERE-QSAR 解析によって、Michaelis–Menten 複合体形成過程における自由エネルギー変化 (ΔG_{ES}) および速度論的過程における活性化自由エネルギー変化 (ΔG^\ddagger) のエネルギー支配項を特定し、さらに、*ab initio* FMO 法を用いることで、基質とその近傍の各アミノ酸残基との詳細な相互作用解析を試みた。

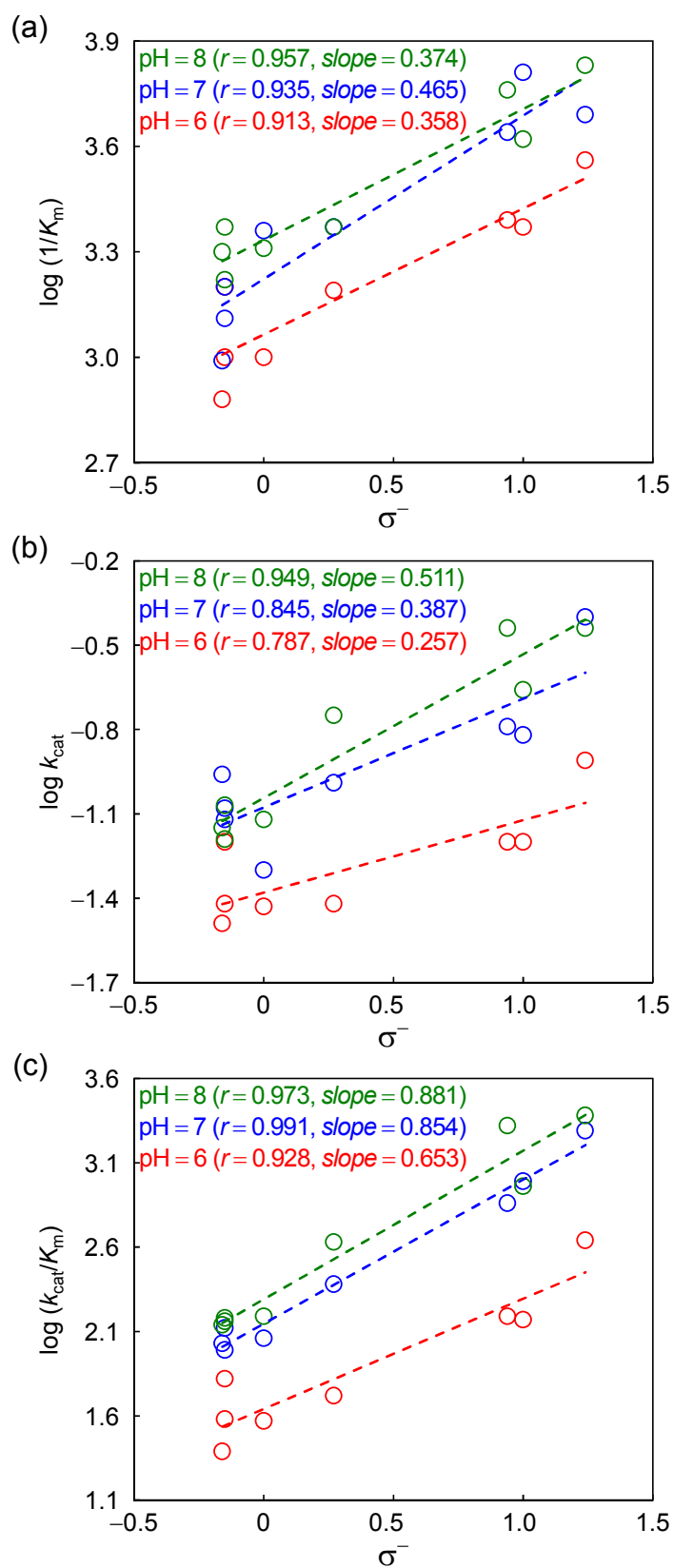
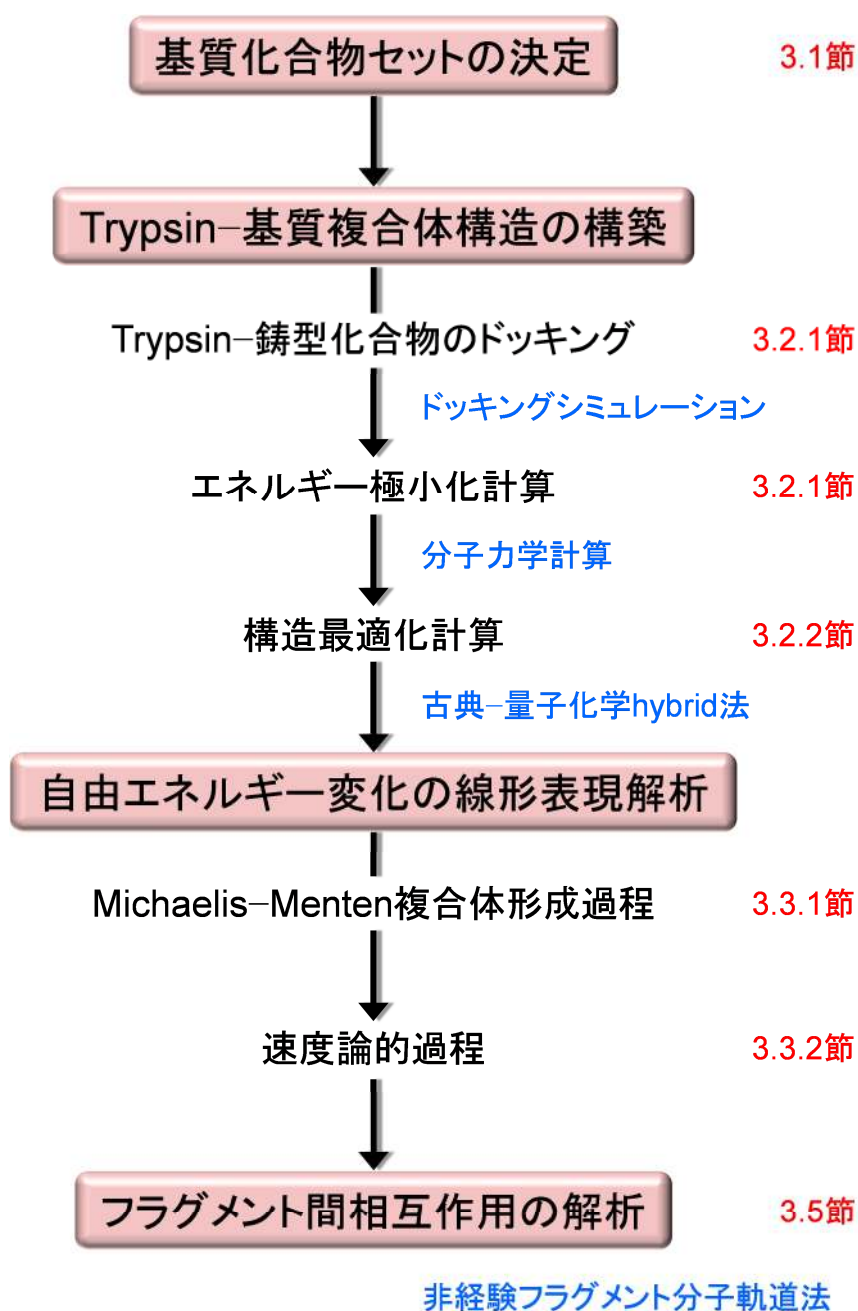


図 2.19 Trypsin の古典 QSAR 解析結果 [143]
 (a) $\log(1/K_m)$ - σ^- , (b) $\log k_{cat}$ - σ^- , (c) $\log(k_{cat}/K_m)$ - σ^- .

第3章 解析方法

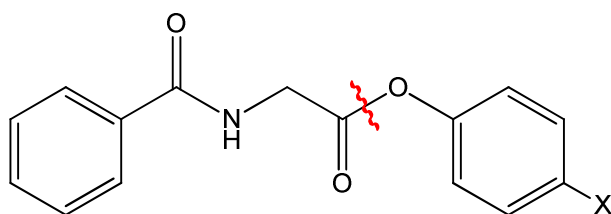
本研究の work flow を以下に示す。まず、本研究で用いる基質化合物セットを決定した後、複合体構造を構築し、その複合体に対して自由エネルギー変化の線形表現解析およびフラグメント間相互作用解析を行う。



3.1 基質化合物セットとその古典的定量的構造活性相関解析

本解析では, Selassie ら [143]が古典 QSAR 解析に用いた一連の *para*-置換馬尿酸フェニルエステル (*para*-substituted HPE)を化合物セット ($n = 8$)として使用した. 触媒活性値 ($\log (1/K_m)$, $\log k_{cat}$)には, trypsin の至適 pH 8, 室温 25 °C (298 K)にて測定したものを採用した. 本解析に用いた触媒活性値 ($\log (1/K_m)$, $\log k_{cat}$)および σ^- の値を表 3.1 に示す.

表 3.1 *para*-substituted HPE の構造と本解析に用いた触媒活性値 ($\log (1/K_m)$, $\log k_{cat}$)および Hammett σ^- (図中の赤い部分は切断部位)



pH = 8, $T = 298$ K

Compound				
No.	-X	$\log (1/K_m)^{a, b}$	$\log k_{cat}^{a, c}$	σ^-
1	OCH ₃	3.30	-1.15	-0.16
2	NH ₂	3.22	-1.07	-0.15
3	CH ₃	3.37	-1.19	-0.15
4	H	3.31	-1.12	0.00
5	Cl	3.37	-0.75	0.27
6	CN	3.62	-0.66	1.00
7	NO ₂	3.83	-0.44	1.24
8	SO ₂ NH ₂	3.76	-0.44	0.94

^a Taken from ref. [143].

^b K_m in M.

^c k_{cat} in sec⁻¹.

3.2 Trypsin-基質複合体構造の構築

3.2.1 複合体初期構造

2016年6月現在, trypsin-*para*-substituted HPE 複合体の X 線結晶解析構造は報告されていないため, 既知の X 線結晶解析構造を基に複合体初期構造を構築した. protein data bank (PDB) [145]からウシの膵臓由来 (bovine pancreatic) β -trypsin (PDB code: 1QCP) の X 線結晶解析構造を入手し, 1QCP 内の阻害剤 (cyclopentanecarboxylic acid [1-(benzothiazole-2-carbonyl)-4-guanidino-butyl]-amide; RWJ-51084) (図 3.1 (A)-(a))の部分構造の座標を参考に, 鋳型化合物として化合物セットの中で最も活性の高い *para*-nitro substituted HPE (Compound 7 ($X = \text{NO}_2$)) を構築した. RWJ-51084 は分子内に ester 結合を有さないが, trypsin の活性部位 (Ser195 の側鎖の O_γ)と adduct を形成するため, 図 3.1 (B)に示す赤い原子の座標を利用した. ただし, 図 3.1 (A)-(b)の R_1 部位が trypsin の S1 pocket に, R_2 部位が水層に向くよう Compound 7 を構築した. ここで, S1 pocket における基質の conformation (図 3.1 (A)-(a)の R_1 および R_2)の妥当性を検証するため, genetic optimization for ligand docking (GOLD)5.2 [146]によるドッキングシミュレーションを行った. ドッキングシミュレーションでは多数の conformation を構築し, その分子間相互作用に関わる原子や角度からスコアリング関数を使用して各構造の結合自由エネルギーを推定する. 本解析では, 500 個の conformation を発生させ, chemscore [147]により *para*-substituted HPE の結合ポーズの安定性について評価を行い, 図 3.1 (B)の conformation が妥当であることを定量的に確認した. R_1 が S1 pocket (図 2.6 (a))に配位するという結果は, 我々が以前に行った *para*-substituted HPE と papain とのドッキング解析の結果と同じである [144].

ドッキング後, 1QCP 内の結晶水はすべて削除し, Ca^{2+} も活性部位から 20 Å 以上離れており, 基質との相互作用は化合物によらず一定と考えられるため削除した. 解離性のアミノ酸残基 (Arg, Lys, Asp, Glu)および His のイオン化状態は trypsin の至適 pH 8 にて PDB2PQR server [148]を用いて予測を行った. 複合体の周囲 15 Å に transferable intermolecular potential 3 point (TIP3P)モデル [149]の水分子 9,901 個を配置し, 系全体の電荷状態は+6 であるため 6 個の Cl^- を counter ion として加え中性化した. 以上の操作により本解析の複合体初期構造を構築した.

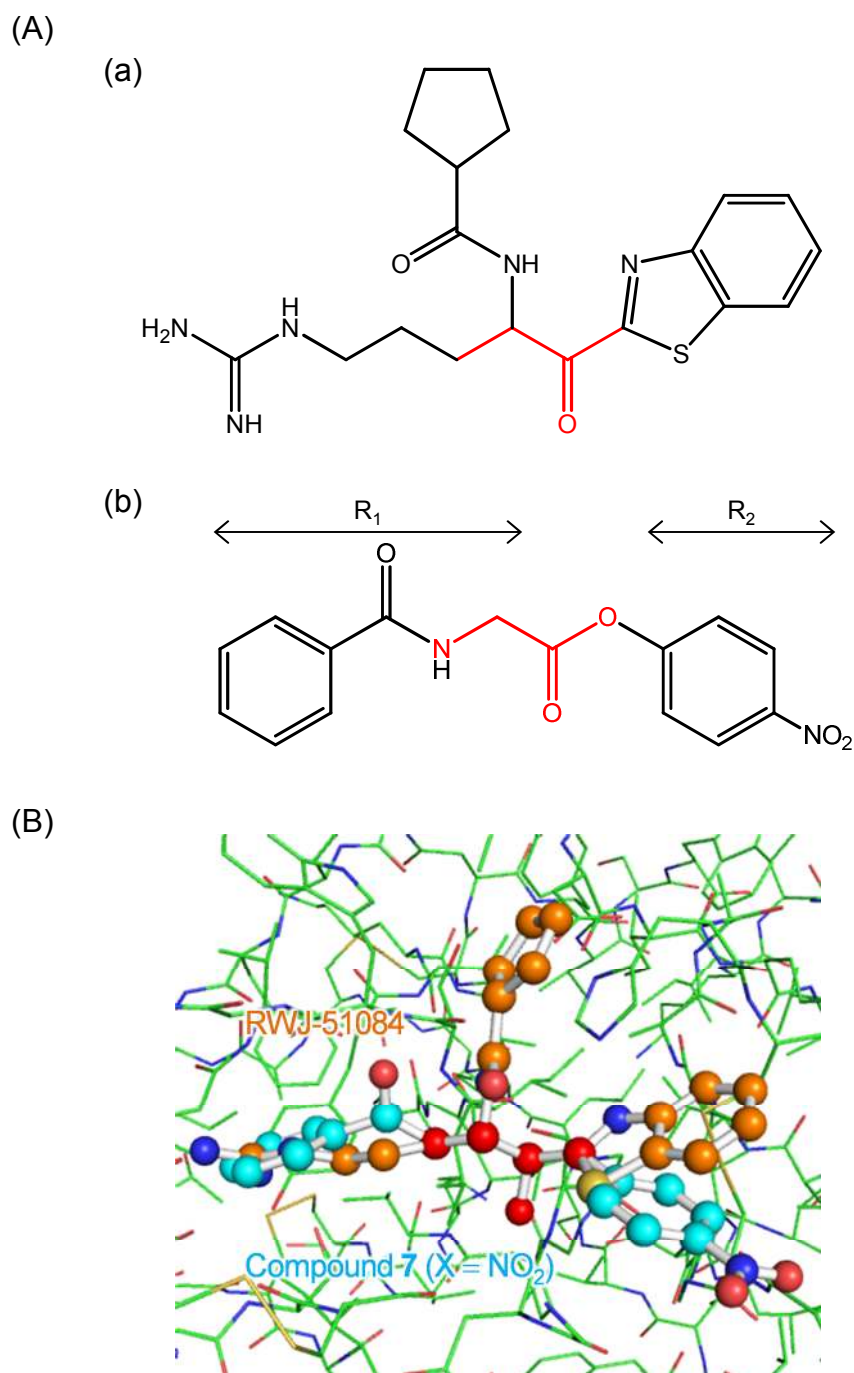


図 3.1 (A) 複合体初期構造構築に用いた阻害剤および基質の構造
 (a) 阻害剤 RWJ-51084 (PDB code: 1QCP), (b) 基質 Compound 7 (X = NO₂).

R₁ および R₂ は ester 部位以外の基質の構造を表す.

(B) 阻害剤と基質 (ball and stick) の 3 次元立体構造
 阻害剤はオレンジ, 基質は青, 阻害剤と基質の共通原子は赤で表す.

構築した trypsin-Compound 7 複合体への分子力学 (molecular mechanics; MM) 法によるエネルギー極小化計算には, AMBER11 [150]を使用し, 表 3.2 に示すように(1) 水素原子, (2) 水分子および counter ion, (3) 全系の順にそれぞれエネルギー極小化を行った. この際, 極小化対象原子以外の原子に対して調和ポテンシャル型の位置拘束 (force constant = 500 kcal/(mol·Å²))を設けたが, 全系の極小化計算においては拘束条件を設けなかった. 力場パラメータは trypsin に対しては parm99 [151]を, Compound 7 に対しては general amber force field (GAFF) [152]をそれぞれ使用した. また, Compound 7 中の原子電荷には HF/6-31G(d)レベルによる restrained electrostatic potential (RESP)電荷を使用した [153]. 各段階における極小化計算には最急降下 (steepest descent; SD)法および共役勾配 (conjugate gradient; CG)法を使用し, エネルギー勾配の収束閾値を 10⁻⁴ kcal/(mol/Å)に設定した. エネルギー極小化後の構造を Compound 7 の Michaelis-Menten 複合体 (酵素-基質 (enzyme-substrate; ES)複合体)鑄型構造とし, さらに, Compound 7 の置換基部分を Compounds 1-6, 8 の対応する置換基に置き換え, 残りの化合物の ES 複合体鑄型構造を得た.

表 3.2 エネルギー極小化計算条件

Force field	parm99 (trypsin), GAFF (Compound 7 (X = NO ₂))
Solvent	TIP3P shell water box (15 Å)
Cut-off	12 Å
Step 1. MM	水素原子の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles)
Step 2. MM	水分子および counter ion の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 5,000 cycles)
Step 3. MM	全系の極小化 (SD: 1,000 cycles, CG: 10,000 cycles)

3.2.2 古典-量子化学 hybrid 法による構造構築の方法

前節 3.2.1 にて構築された ES 複合体鑄型構造に対して 2-layer ONIOM 法を適用し, trypsin-*para*-substituted HPE 複合体系 (224 残基)の構造最適化を行った. High layer (QM 領域)は Grimme らの分散力補正 [106–112]を加味した B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d)レベルの density functional theory (DFT)法で, low layer (MM 領域)は古典論に基づく Amber (parm99)で取り扱った. QM 領域には MM 領域の静電場からの分極効果を考慮しない mechanical embedding (ME)を採用した. QM 領域は catalytic triad (His57, Asp102, Ser195)および Ser214 の側鎖, His57, Gly193, Asp194 および Ser195 の主鎖, ならびに *para*-substituted HPE とし (図 3.2), 残りは MM 領域とした. ここで, QM 領域に用いた残基は基質と接触する trypsin の第一層に位置している. ONIOM 法では QM 領域と MM 領域の境界は水素原子の link atom [154–159]によって隔てられ, 本解析では QM 領域の原子数は link atom を含めて 91 原子 (基質が Compound 4 (X = H)の場合)である (図 3.3). 構造最適化中, QM 領域は可動領域とし, MM 領域の原子座標は固定した. まず, ES 構造を構築し, 続いて ES 構造を基に, 同条件の ONIOM 法によって acylation 過程の残りの状態を構築した. また, 遷移状態 (transition state; TS)構造はポテンシャル面上の鞍点 (saddle point)であり, 虚の振動数を一つだけ有し, 振動数は基準振動解析によって確認することができる [160]. 振動数解析は B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d)レベルで行い, TS₁ および TS₂ の振動数を定量的に確認した. 以上の計算には Gaussian 09 D.01 [161]を使用した.

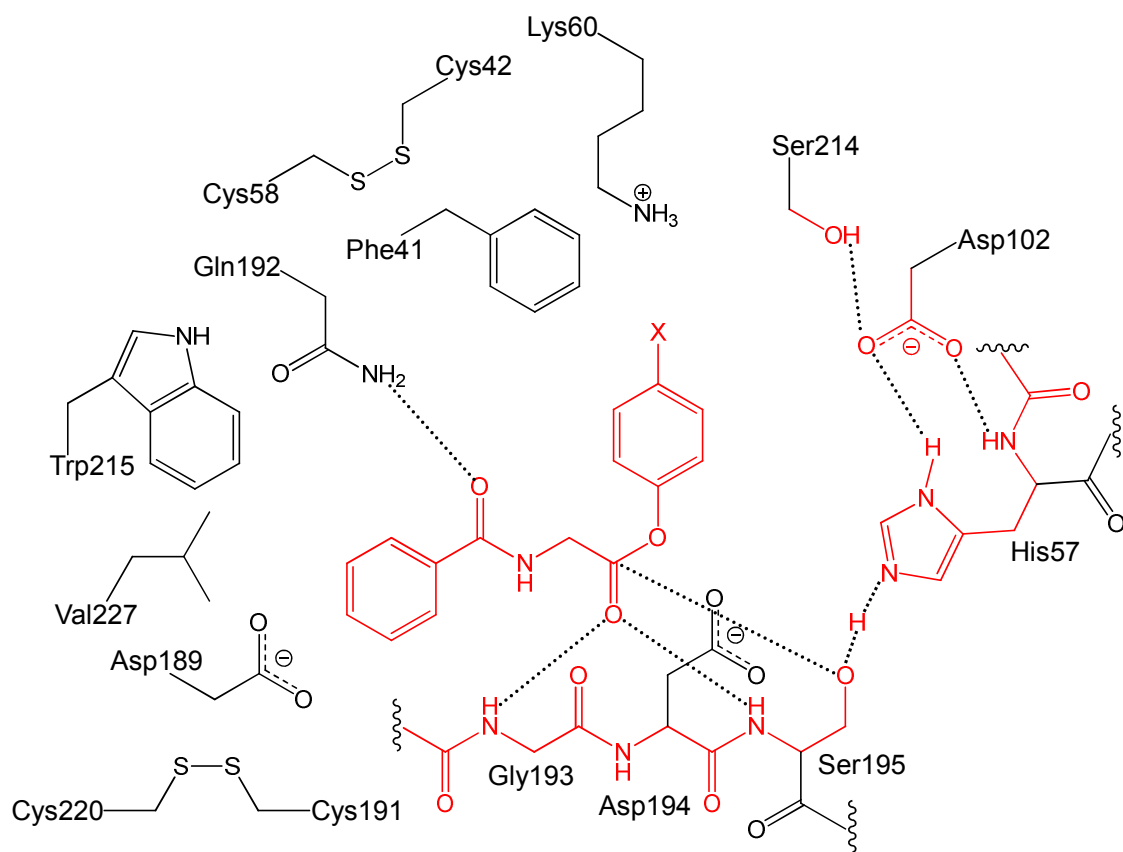


図 3.2 ONIOM 法による構造最適化での QM 領域 (赤字の原子)
点線は原子間距離を表す。

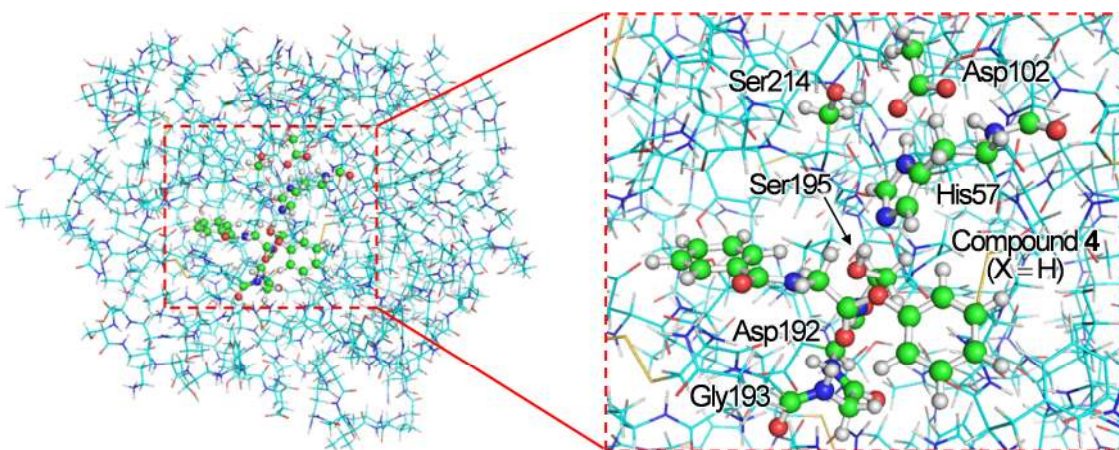


図 3.3 ONIOM 法による構造最適化での QM 領域 (ball and stick 表記)
基質 Compound 4 (X = H) のとき, 全 91 原子 (link atom を含む)。

3.3 Trypsin-基質に対する自由エネルギー変化の線形表現解析の方

法

Trypsin-*para*-substituted HPE 系の触媒反応における Michaelis-Menten 複合体 (ES 複合体) 形成過程および速度論的過程の実測値には, それぞれ Michaelis-Menten 定数 K_m および反応速度定数 k_{cat} を用い, これらを自由エネルギーに変換することで LERE-QSAR 解析を行った [162, 163]. ただし, 一般に $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ (k_1 : ES 複合体の形成過程における正反応の速度定数, k_{-1} : ES 複合体形成過程における逆反応の速度定数, k_2 : ES 複合体形成後における速度定数) と定義されており, E + S と ES 間の自由エネルギー差がそのまま K_m を変換したエネルギーに対応するわけではない (図 3.4). しかし, $k_{-1} \gg k_2$ の条件下では $K_m = k_{-1}/k_1$ と近似することができ, K_m は平衡定数 K_{ES} に等しくなる [16]. また, 図 3.4 の k_2 は k_{cat} に対応する.

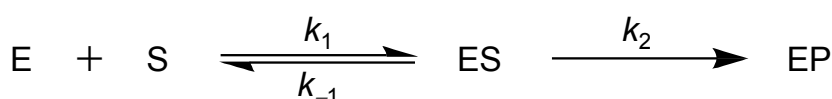


図 3.4 触媒反応の機構

k_1 : ES 複合体形成過程における正反応の速度定数,
 k_{-1} : ES 複合体形成過程における逆反応の速度定数,
 k_2 : ES 複合体形成後における速度定数.

3.3.1 Michaelis-Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化の

定量的構造活性相関の方法

Michaelis-Menten 定数 K_m を用いて表される触媒反応の ES 複合体形成に伴う全自由エネルギー変化の実測値 ΔG_{ES}^{obs} は, 上記に記載した仮定により $\Delta G_{ES}^{obs} = -RT \ln (1/K_m)$ (R : 気体定数, T : 絶対温度) と近似できるとしたとき, LERE-QSAR の基本解析式 (3.1) によって定義される.

$$\Delta G_{ES}^{obs} = A_1 (\Delta E_{bind} + E_{disp} + \Delta G_{sol}^{polar}) + const_3 \quad (3.1)$$

上式で、右辺の係数 $A_1 (= (1 + \beta_1)(1 - \alpha), 0 < A_1 < 1)$ は線形定数、 ΔE_{bind} は分散相互作用以外の相互作用に基づく結合相互作用エネルギー項、 E_{disp} は分散相互作用エネルギー項、そして ΔG_{sol}^{polar} は水和自由エネルギー変化の極性項である。 A_1 は LERE 近似 ($\Delta G_{others-1} = \beta_1 (\Delta G_{bind} + \Delta G_{sol}) + const_1$ ($\beta_1 < 0$ and/or $const_1 > 0$)) および entropy–enthalpy 補償則 ($-T\Delta S_{bind} = -\alpha \Delta H_{bind} + const_2$, $-T\Delta S_{sol} = -\alpha \Delta H_{sol} + const_2$ ($\alpha > 0$)) の仮定に基づいている。式 (3.1) は第 2 章の式 (2.27) に対応し、タンパク質–阻害剤系で検証された LERE-QSAR 解析法に従う。

3.3.2 遷移状態形成に伴う活性化自由エネルギー変化の定量的構造

活性相関の方法

式 (3.1) の導出に準じて反応速度定数 k_{cat} を用いて表される触媒反応の速度論的過程における全自由エネルギー変化の実測値 $\Delta G^{\#obs}$ ($= -RT \ln k_{cat}$, R : 気体定数, T : 絶対温度) は、自由エネルギーの線形性と加成性に基づき式 (3.2) で表すことができる (自由エネルギーの加成性)。

$$\Delta G^{\#obs} = \Delta G^{\#} + \Delta\Delta G_{sol} + \Delta G_{others-2} \quad (3.2)$$

ここで、 $\Delta G^{\#}$ および $\Delta\Delta G_{sol}$ はそれぞれ速度論的過程における活性化自由エネルギー一および水和自由エネルギー変化である。また、 $\Delta G_{others-2}$ は $\Delta G^{\#}$ および $\Delta\Delta G_{sol}$ 以外の自由エネルギーの総和である。さらに、LERE 近似 ($\Delta G_{others-2} = \beta_2 (\Delta G^{\#} + \Delta\Delta G_{sol}) + const_1$ ($\beta_2 < 0$ and/or $const_1 > 0$)) および entropy–enthalpy 補償則 ($-T\Delta S^{\#} = -\alpha \Delta H^{\#} + const_2$, $-T\Delta\Delta S_{sol} = -\alpha \Delta\Delta H_{sol} + const_2$ ($\alpha > 0$)) に基づき、式 (3.3) が導かれる。

$$\Delta G^{\#obs} = (1 + \beta_2)(1 - \alpha) (\Delta H^{\#} + \Delta\Delta H_{sol}) + const_3 \quad (3.3)$$

溶液中では体積・圧力変化が一定のため、 $\Delta H^{\#} \approx E_X^{\#} + \Delta E_{disp} + \Delta E_{vib0}$ の置き換えが可能である。また、速度論的過程における水和自由エネルギー変化の極性項 $\Delta\Delta G_{sol}^{polar}$ は、その大部分が enthalpy 項であるため [142], $\Delta\Delta H_{sol}^{polar} \approx \Delta\Delta G_{sol}^{polar}$ と見なすことができ、一方、非極性項 $\Delta\Delta G_{sol}^{nonpolar}$ の化合物間の変動は $\Delta\Delta G_{sol}$ の変

動に比べて非常に小さいため [135], $\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{nonpolar}} \approx 0$ と近似可能である. 以上より, 速度論的過程における LERE-QSAR 解析式 (3.4)を得ることができる.

$$\Delta G^{\# \text{obs}} = A_2 (E_X^{\#} + \Delta E_{\text{disp}} + \Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib0}}) + \text{const}_3 \quad (3.4)$$

ここで, 右辺の係数 $A_2 (= (1 + \beta_2)(1 - \alpha), 0 < A_2 < 1)$ は線形定数, $E_X^{\#}$ は分散相互作用エネルギー以外の相互作用に基づく活性化エネルギー項であり, $X = \text{TS}_1$ あるいは TS_2 である. ΔE_{disp} と $\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ はそれぞれ分散相互作用エネルギー項と水和自由エネルギー変化の極性項の ES 複合体からのエネルギー差, ΔE_{vib0} は零点振動エネルギー項である. ただし, 速度論的過程では活性中心の基質近傍にある残基のみが触媒メカニズムに関与すると考えられるため, 式 (3.4) のエネルギー代表項は ONIOM 法における QM 領域のエネルギーだけで評価した.

3.4 エネルギー代表項の算出法

3.4.1 結合相互作用エネルギー項

式 (3.1)の自由エネルギー代表項のうち, Michaelis–Menten 複合体 (ES 複合体) におけるタンパク質–基質間の結合相互作用エネルギー項 (ΔE_{bind})は, 分散相互作用以外の相互作用に基づくエネルギー項であり, 式 (3.5)に従って算出した (図 3.5).

$$\Delta E_{\text{bind}} = E(\text{complex})^{\text{ES}} - [E(\text{protein})^{\text{ES}} + E(\text{substrate})^{\text{ES}}] \quad (3.5)$$

ここで, $E(\text{complex})^{\text{ES}}$ はタンパク質と基質の複合体におけるエネルギー, $E(\text{protein})^{\text{ES}}$ および $E(\text{substrate})^{\text{ES}}$ はそれぞれタンパク質と基質が単独状態にあるときのエネルギーである. ΔE_{bind} は量子化学計算と古典計算の hybrid 法である ONIOM 法および量子化学計算の *ab initio* FMO 法により算出し, それぞれ $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ および $\Delta E_{\text{bind}}(\text{FMO})$ と定義した. $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ は ONIOM-ME (B3LYP/6-31G(d)//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber) レベルで算出し, 計算プログラムは Gaussian 09 D.01 [161]を使用した. 一方, $\Delta E_{\text{bind}}(\text{FMO})$ は HF/6-31G(d) レベルで算出し, 計算プログラムは general atomic and molecular electronic structure system (GAMESS) [164]を使用した. ただし, Michaelis–Menten 複合体形成過程における LERE-QSAR 解析の基本式 (3.1)では $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ を用いた.

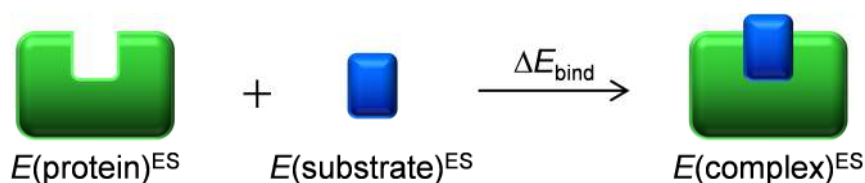


図 3.5 結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind})

3.4.2 分散相互作用エネルギー項

ES 複合体形成時は分散相互作用の影響が無視できないため、式 (3.1)の分散相互作用エネルギー項 (E_{disp})を式 (3.6)により算出した (図 3.6 (a)).

$$E_{\text{disp}} = E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{ES}} - [E_{\text{disp}}(\text{protein})^{\text{ES}} + E_{\text{disp}}(\text{substrate})^{\text{ES}}] \quad (3.6)$$

ここで、 $E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{ES}}$ は ES 複合体における分散相互作用エネルギー、 $E_{\text{disp}}(\text{protein})^{\text{ES}}$ および $E_{\text{disp}}(\text{substrate})^{\text{ES}}$ はそれぞれタンパク質と基質が単独状態にあるときの分散相互作用エネルギーである。また、式 (3.4)の分散相互作用エネルギー項 (ΔE_{disp})を式 (3.7)により算出した (図 3.6 (b)).

$$\Delta E_{\text{disp}} = E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{B}} - E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{A}} \quad (3.7)$$

ここで、 $E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{A}}$ および $E_{\text{disp}}(\text{complex})^{\text{B}}$ はそれぞれ acylation 過程における連続した A, B の状態を表し、状態 A が ES の時、状態 B は TS_1 、状態 A が TET_1 の時、状態 B は TS_2 に対応する ((A, B) = (ES, TS_1) or (TET_1 , TS_2)). ONIOM 法の QM 領域と同一領域の分散相互作用エネルギーは B3LYP-D3(BJ)法の D3(BJ)で、MM 領域は Lennard-Jones ポテンシャルの引力項 (LJ6)を用いて古典的に評価した。計算プログラムは Gaussian 09 D.01 [161]および AMBER11 [150]を使用した。

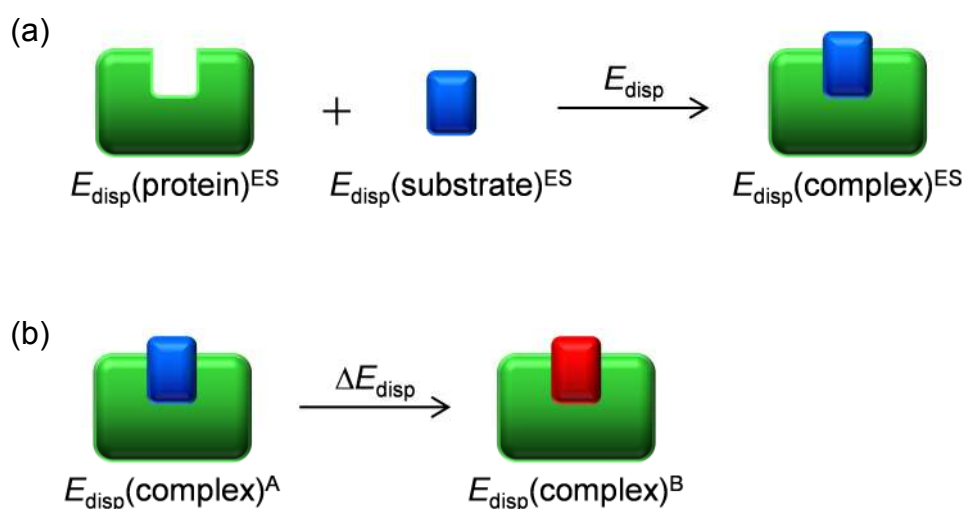


図 3.6 分散相互作用エネルギー

(a) E_{disp} , (b) ΔE_{disp} ((A, B) = (ES, TS_1) or (TET_1 , TS_2)).

3.4.2.1 分散相互作用エネルギーの補正

タンパク質と基質との結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind})をより明確に理解するためには、電子相関を含まない HF エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$)と E_{disp} の寄与を個々に評価することが望ましい ($\Delta E_{\text{bind}} = \Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}} + E_{\text{disp}}$). そこで我々は、大規模分子にも適用可能な計算コストの小さな HF 法に対する新しい分散力補正法 (HF-D_{tq}法)を提案した [165–167].

$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF}}$ に対する古典的な E_{disp} として、式 (3.8)に示す sigmoid 型の damping function を使用した.

$$E_{\text{disp}} = -s_6 \sum_{i,j} [a_1 + (1 - a_1)/(1 + \exp(-\alpha (R_{ij}/R_0 - \text{shift}_1)))] c_6^{ij}/R_{ij}^6 \quad (3.8)$$

($s_6 = 1.02$, $a_1 = 0.10$, $\alpha = 69$, and $\text{shift}_1 = 0.90$)

ここで、 s_6 は scaling factor, R_{ij} は原子 i と j の van der Waals 半径, R_0 は原子 i と j の van der Waals 半径の和を表す. 次に、水素結合系では静電相互作用の増大に伴い電子相関エネルギーの寄与は徐々に減衰すると考えられるため [168], 式 (3.9) に示すように極性水素原子 (H_p)の c_6 に damping function を導入した.

$$c_6(\text{H}_p) = c_6(\text{H}) [(\beta/(1 + \exp(-\alpha (R_{ij}/R_0 - \text{shift}_2))) + (1 - \beta))] \quad (3.9)$$

($\alpha = 69$, $\beta = 0.75$, and $\text{shift}_2 = 1.10$)

最後に、 π - π 相互作用の寄与を考慮するために、二つの共役 π 平面を含む原子 X_π と Y_π の c_6 に式 (3.10)を適用した.

$$c_6(X_\pi) = c_6(X) (1 + \gamma S) \quad (3.10)$$

($\gamma = 0.73$ when $X_\pi = Y_\pi = \text{C}_\pi$ (carbon π atom),
 $\gamma = 0.10$ when $X_\pi = \text{C}_\pi \neq Y_\pi$ or $Y_\pi = \text{C}_\pi \neq X_\pi$)

式 (3.10)において、 S は原子 X_π と Y_π の $2p_z$ 軌道間の重なり積分に比例すると近似し、 $S = \cos(\theta) \cdot \sin(\phi_1) \cdot \sin(\phi_2)$ として表す (図 3.7) [169].

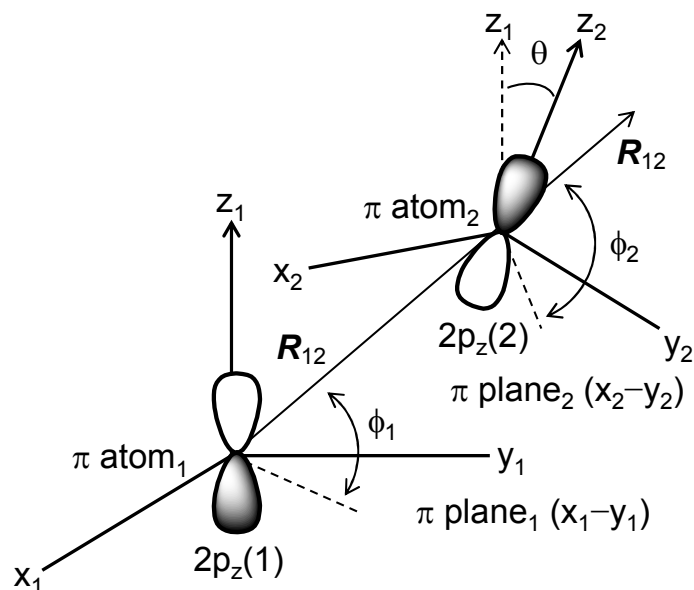


図 3.7 $2p_z(1)$ - $2p_z(2)$ 間軌道相互作用

θ : z_1 - z_2 間の角度, ϕ_1 : x_1 - y_1 平面- R_{12} ベクトル間の角度,
 ϕ_2 : x_2 - y_2 平面- R_{12} ベクトル間の角度.

分散力支配系 (DISP), 水素結合系 (HB), その他の相互作用系 (OTHERS)の計 68 個の小分子モデル (TQ set)を用いて HF- D_{tq} 法の精度の検証を行った. TQ set は S22 set [170]の全て, S66 set [171]の一部を含み, このHobzaらのS22およびS66 set は相互作用エネルギーの benchmark としてしばしば使用される. 表 3.3 に HF(- D_{tq})/6-31G(d), HF(- D_{tq})/6-31+G(d), CCSD(T)レベルで算出した TQ set の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind}), 図 3.8 に HF- D_{tq} 法の性能 ((a) mean absolute error (MAE) ($\langle |\Delta E_{\text{bind}} - \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T))} | \rangle$), (b) mean percentage error (MPE) (%) ($100 \langle (\Delta E_{\text{bind}} - \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T)})) / \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T)}) \rangle$), 図 3.9 に S22 benchmark set の MAE を示す. ただし, 算出した ΔE_{bind} には counterpoise (CP)法 [100, 101]により BSSE 補正を施し [99, 100], ΔE_{bind} の golden standard には CCSD(T)/CBS あるいは CCSD(T)/aug-cc-pVTZ [172]を使用した. 検証の結果, HF- D_{tq} 法の精度は, 計算コストの高い MP2 や他の DFT-D 法の結果と比較して遜色ないことを確認した. したがって, HF- D_{tq} 法を用いることにより, タンパク質-基質間の結合相互作用エネルギーを低コストかつ高精度に算出可能である.

表 3.3 HF-D_{tq}/6-31G(d), HF-D_{tq}/6-31+G(d)および CCSD(T)レベルで算出した TQ set の結合相互作用エネルギー (ΔE_{bind})

Complex		ΔE_{bind} (kcal/mol)							
		HF/ 6-31G(d) ^a	HF/ 6-31+G(d) ^a	E_{disp} ^b	Contribution from π - π correction energy ^c	HF-D _{tq} / 6-31G(d) ^{a, d}	HF-D _{tq} / 6-31+G(d) ^{a, d}	CCSD(T) ^a / Basis set	
Dispersion complexes (DISP)									
D-1	Methane dimer (D _{3d}) ^e	0.37	0.37	-0.84		-0.47	-0.47	-0.53	CBS ^{j, k}
D-2	Ethylene-Acetylene (C _{2v}) ^f	-0.66	-0.43	-1.04	0.00	-1.69	-1.46	-1.53	CBS ^{j, k}
D-3	Ethylene dimer stack, perpendicular (D _{2d}) ^f	0.82	0.90	-2.19	0.00	-1.37	-1.28	-1.51	CBS ^{j, k}
D-4	Benzene-Methane (C ₃) ^g	1.14	1.22	-2.24		-1.09	-1.02	-1.50	CBS ^{j, k}
D-5	Benzene dimer parallel displaced (C _{2h}) ^g	5.95	5.51	-8.22	-2.35	-2.27	-2.71	-2.73	CBS ^{j, k}
D-6	Benzene dimer T-shaped (C _{2v}) ^g	1.43	1.55	-3.80	0.00	-2.37	-2.25	-2.74	CBS ^{j, k}
D-7	Pyrazine dimer (C _s) ^g	4.19	4.09	-8.10	-1.67	-3.90	-4.01	-4.42	CBS ^{j, k}
D-8	Uracil dimer stack (C ₂) ^g	0.27	0.03	-11.0	-1.60	-10.78	-11.02	-9.88	CBS ^{j, k}
D-9	Indole-Benzene stack ^g	7.89	7.23	-12.0	-3.27	-4.16	-4.82	-5.22	CBS ^{j, k}
D-10	Indole-Benzene T-shaped (C _s) ^g	0.02	0.45	-5.84	0.00	-5.83	-5.39	-5.73	CBS ^{j, k}
D-11	Adenine-Thymine stack ^g	3.55	3.29	-16.3	-2.55	-12.80	-13.06	-12.23	CBS ^{j, k}
D-12	Ethylene-Pentane ^g	1.78	1.83	-3.57		-1.79	-1.74	-2.01	CBS ^{j, l}
D-13	Pentane dimer ^g	3.24	3.32	-7.22		-3.99	-3.90	-3.78	CBS ^{j, l}
D-14	Neopentane dimer ^g	1.61	1.69	-3.25		-1.64	-1.56	-1.78	CBS ^{j, l}
D-15	Cyclopentane dimer ^g	2.53	2.60	-5.63		-3.10	-3.03	-3.00	CBS ^{j, l}
D-16	Cyclopentane-Neopentane ^g	2.27	2.33	-4.66		-2.40	-2.34	-2.40	CBS ^{j, l}
D-17	Neopentane-Pentane ^g	2.27	2.34	-4.85		-2.57	-2.51	-2.61	CBS ^{j, l}
D-18	Benzene-Ethylene ^g	3.35	3.02	-3.92	-1.07	-0.57	-0.89	-1.43	CBS ^{j, l}
D-19	Benzene-Neopentane ^g	2.05	2.17	-4.27		-2.21	-2.10	-2.90	CBS ^{j, l}
D-20	Benzene-Cyclopentane ^g	2.85	2.92	-5.62		-2.77	-2.70	-3.58	CBS ^{j, l}
D-21	Peptide-Ethylene ^g	0.57	0.53	-3.28	0.00	-2.71	-2.75	-3.00	CBS ^{j, l}

Complex	ΔE_{bind} (kcal/mol)							CCSD(T) ^{a/} Basis set
	HF/ 6-31G(d) ^a	HF/ 6-31+G(d) ^a	$E_{\text{disp}}^{\text{b}}$	Contribution from π - π correction energy ^c	HF-D _{3q} / 6-31G(d) ^{a, d}	HF-D _{3q} / 6-31+G(d) ^{a, d}		
D-22 Peptide–Pentane ^g	2.83	2.85	-6.89	0.00	-4.06	-4.04	-4.26	CBS ^{i, l}
D-23 Peptide–Benzene ^g	0.18	0.58	-5.61	0.00	-5.43	-5.02	-5.28	CBS ^{i, l}
D-24 He dimer ^h	0.01	0.01	-0.02		-0.01	-0.01	-0.02	aug-cc-pVTZ
D-25 Ne dimer ^h	0.01	0.04	-0.15		-0.14	-0.11	-0.05	aug-cc-pVTZ
D-26 Ar dimer ^h	0.26	0.26	-0.39		-0.13	-0.13	-0.19	aug-cc-pVTZ
D-27 He–Ne ^h	0.02	0.02	-0.06		-0.05	-0.04	-0.03	aug-cc-pVTZ
D-28 He–Ar ^h	0.04	0.05	-0.07		-0.03	-0.03	-0.04	aug-cc-pVTZ
D-29 Ne–Ar ^h	0.08	0.09	-0.21		-0.13	-0.12	-0.08	aug-cc-pVTZ
D-30 Methane dimer (C _{2h}) ^h	0.22	0.25	-0.37		-0.15	-0.13	-0.18	aug-cc-pVTZ
D-31 Methane dimer (C _s) ^h	0.30	0.32	-0.57		-0.27	-0.25	-0.32	aug-cc-pVTZ
D-32 Ethane dimer (C _{2h}) ^h	1.44	1.46	-2.85		-1.41	-1.39	-1.28	aug-cc-pVTZ
D-33 Methane–Cyclopropane (C ₃) ^h	0.97	1.00	-1.80		-0.83	-0.80	-0.78	aug-cc-pVTZ
D-34 Cyclopropane dimer (S ₆) ^h	2.07	2.15	-4.45		-2.38	-2.30	-2.04	aug-cc-pVTZ
D-35 Acetylene dimer (C _{2v}) ^h	-0.47	-0.21	-1.20		-1.67	-1.41	-1.41	aug-cc-pVTZ
D-36 Ethylene dimer planar parallel (C _{2h}) ^h	1.08	1.20	-1.68	0.00	-0.59	-0.48	-0.62	aug-cc-pVTZ
D-37 Ethylene dimer stack, parallel displaced (C _{2h}) ^h	0.84	0.81	-1.36	-0.21	-0.53	-0.56	-0.63	aug-cc-pVTZ
D-38 Fluoromethane dimer (C _{2h}) ^h	-0.64	-1.03	-1.99		-2.63	-3.02	-2.17	aug-cc-pVTZ
D-39 Fluoromethane dimer (C _{3v}) ^h	-0.96	-1.13	-1.17		-2.14	-2.30	-1.60	aug-cc-pVTZ
D-40 Hydrogen sulfide dimer (C _s) ^h	0.02	0.05	-0.98		-0.96	-0.93	-1.51	aug-cc-pVTZ

Complex	ΔE_{bind} (kcal/mol)						
	HF/ 6-31G(d) ^a	HF/ 6-31+G(d) ^a	$E_{\text{disp}}^{\text{b}}$	Contribution from π - π correction energy ^c	HF-D _{3h} / 6-31G(d) ^{a, d}	HF-D _{3h} / 6-31+G(d) ^{a, d}	CCSD(T) ^{a/} Basis set
Hydrogen bonded complexes (HB)							
H-1 Ammonia dimer (C _{2h})	-2.10	-2.16	-1.34		-3.44	-3.50	-3.17 CBS ^{j, k}
H-2 Water dimer (C _s) ^f	-4.73	-4.33	-0.87		-5.60	-5.19	-5.02 CBS ^{j, k}
H-3 Formic acid dimer (C _{2h}) ^e	-14.80	-13.82	-3.66	0.00	-18.46	-17.49	-18.61 CBS ^{j, k}
H-4 Formamide dimer double HB (C _{2h}) ⁱ	-12.51	-11.95	-3.20	0.00	-15.70	-15.14	-15.96 CBS ^{j, k}
H-5 Uracil dimer (C _{2h}) ^g	-16.51	-16.09	-4.09	0.00	-20.60	-20.18	-20.47 CBS ^{j, k}
H-6 Phenol dimer ^g	-2.56	-2.20	-4.47	-0.18	-7.03	-6.66	-7.05 CBS ^{j, k}
H-7 2-pyridoxine-2-aminopyridine ^g	-11.09	-10.29	-4.53	0.00	-15.62	-14.82	-16.71 CBS ^{j, k}
H-8 Adenine-Thymine Watson-Crick ^g	-10.48	-9.88	-4.81	0.00	-15.29	-14.69	-16.37 CBS ^{j, k}
H-9 Methanol (HB donor)-Water (HB acceptor) (C _s) ^g	-4.70	-4.09	-0.97		-5.67	-5.06	-5.01 CBS ^{j, l}
H-10 Methanol (HB acceptor)-Water (HB donor) ^g	-4.43	-4.39	-1.45		-5.88	-5.84	-5.59 CBS ^{j, l}
H-11 Methanol dimer ^g	-4.35	-4.07	-1.70		-6.05	-5.78	-5.76 CBS ^{j, l}
H-12 Peptide (HB donor)-Water (HB acceptor) ^g	-4.48	-4.00	-1.24		-5.71	-5.23	-5.12 CBS ^{j, l}
H-13 Peptide (HB acceptor)-Water (HB donor) ^g	-5.95	-6.26	-2.29		-8.24	-8.55	-8.10 CBS ^{j, l}
H-14 Peptide (HB donor)-Methanol (HB acceptor) ^g	-3.91	-3.72	-2.49		-6.40	-6.21	-6.19 CBS ^{j, l}
H-15 Peptide (HB acceptor)-Methanol (HB donor) ^g	-5.50	-5.43	-2.78		-8.28	-8.20	-8.23 CBS ^{j, l}
H-16 Peptide-Methylamine ^g	-1.90	-1.83	-3.82		-5.72	-5.66	-5.42 CBS ^{j, l}
H-17 Peptide dimer ^g	-4.76	-4.75	-3.62	0.00	-8.38	-8.37	-8.63 CBS ^{j, l}
H-18 Water (HB acceptor)-Ammonia (HB donor) (C _s) ^h	-2.09	-1.89	-0.85		-2.94	-2.74	-2.30 aug-cc-pVTZ
H-19 Water (HB donor)-Ammonia (HB acceptor) (C _s) ^h	-5.81	-5.21	-1.11		-6.92	-6.32	-6.28 aug-cc-pVTZ
H-20 Ammonia dimer (C _s) ^h	-2.43	-2.14	-1.09		-3.52	-3.23	-2.96 aug-cc-pVTZ
H-21 Formamide dimer single HB ^h	-5.51	-5.38	-1.88	0.00	-7.39	-7.26	-7.00 aug-cc-pVTZ
H-22 Pyrole-Water (C _{2v}) ^h	-4.76	-4.18	-0.99		-5.76	-5.17	-5.13 aug-cc-pVTZ

Complex	ΔE_{bind} (kcal/mol)						
	HF/ 6-31G(d) ^a	HF/ 6-31+G(d) ^a	$E_{\text{disp}}^{\text{b}}$	Contribution from π - π correction energy ^c	HF-D _{tq} / 6-31G(d) ^{a, d}	HF-D _{tq} / 6-31+G(d) ^{a, d}	CCSD(T) ^{a/} Basis set
Other types of complexes (OTHERS)							
O-1 Benzene–Water (C _s) ^g	-1.44	-1.11	-2.53		-3.97	-3.64	-3.28 CBS ^{j, k}
O-2 Benzene–Ammonia (C _s) ^g	-0.07	0.12	-2.36		-2.44	-2.24	-2.35 CBS ^{j, k}
O-3 Benzene–Hydrogen cyanide (C _s) ^g	-2.18	-1.78	-3.36	0.00	-5.55	-5.15	-4.46 CBS ^{j, k}
O-4 Methane–Water (C _s) ^h	0.34	0.35	-1.44		-1.10	-1.08	-0.94 aug-cc-pVTZ
O-5 Methane (HCH ₃)–Ammonia (H ₃ N) (C _{3v}) ^h	0.21	0.26	-0.58		-0.37	-0.32	-0.34 aug-cc-pVTZ
O-6 Methane (H ₃ CH)–Ammonia (NH ₃) (C _{3v}) ^h	-0.18	-0.04	-0.53		-0.70	-0.57	-0.71 aug-cc-pVTZ

^a The CP correction was employed.

^b Dispersion correction calculated with Eqs. (3.8)–(3.10).

^c The π - π plane stacking correction calculated with Eq. (3.10).

^d $\Delta E_{\text{bind}}(\text{HF-D}_{\text{tq}}/6-31(+)\text{G}(\text{d})) = \Delta E_{\text{bind}}(\text{HF}/6-31(+)\text{G}) + E_{\text{disp}}$.

^e CCSD(T)/cc-pVTZ (Geometry optimization level).

^f CCSD(T)/cc-pVQZ (Geometry optimization level).

^g MP2-CP/cc-pVTZ (Geometry optimization level) (CP denotes the counterpoise corrected gradient optimization).

^h MP2/aug-cc-pVTZ (Geometry optimization level).

ⁱ MP2/cc-pVTZ (Geometry optimization level).

^j Complete basis set.

^k Taken from Ref. [171].

^l Taken from Ref. [170].

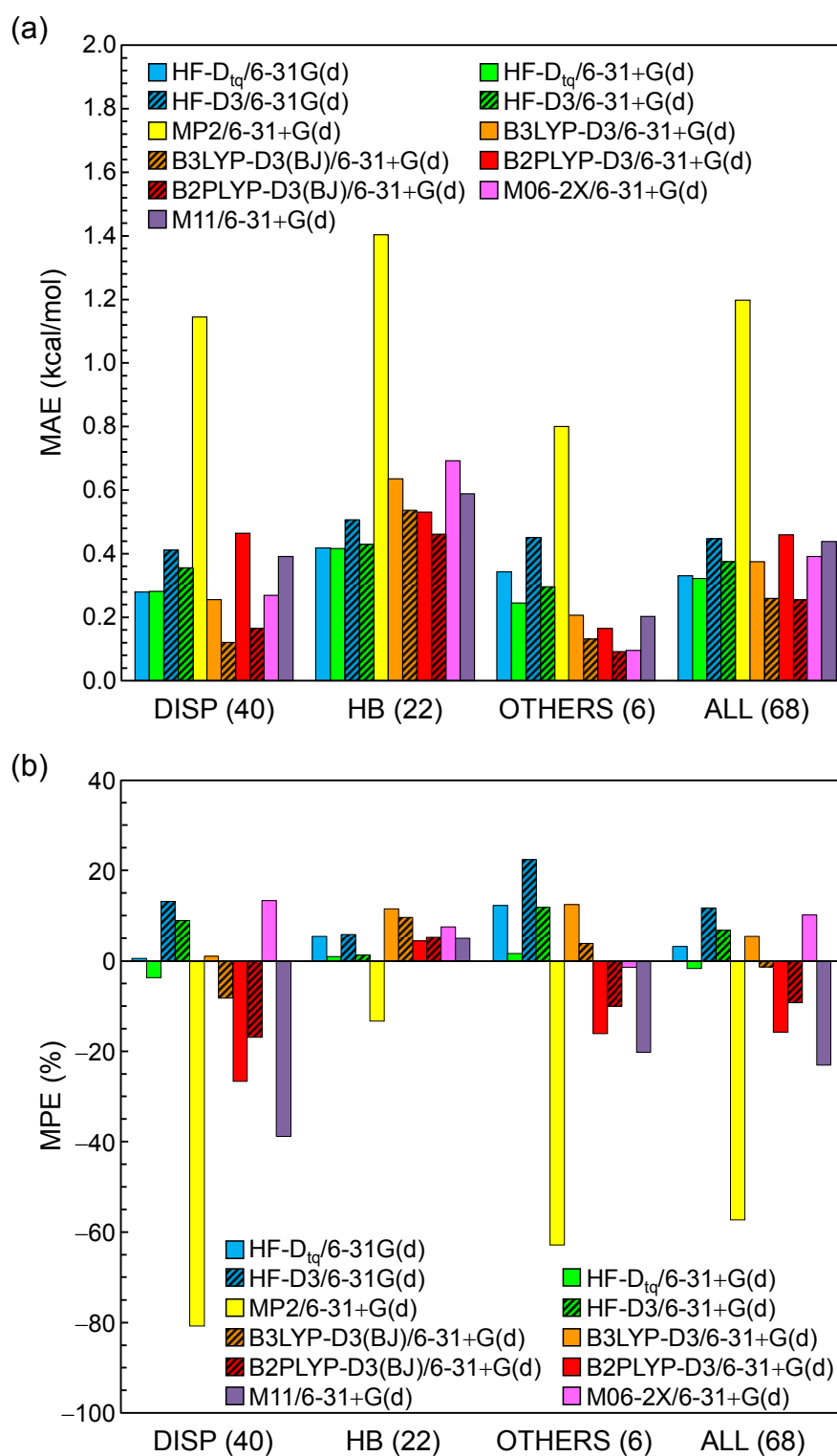


図 3.8 HF-D_{tq}法の性能

(a) MAE ($\langle |\Delta E_{\text{bind}} - \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T)})| \rangle$),

(b) MPE (%) ($100 \langle (\Delta E_{\text{bind}} - \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T)})) / \Delta E_{\text{bind}}(\text{CCSD(T)}) \rangle$).

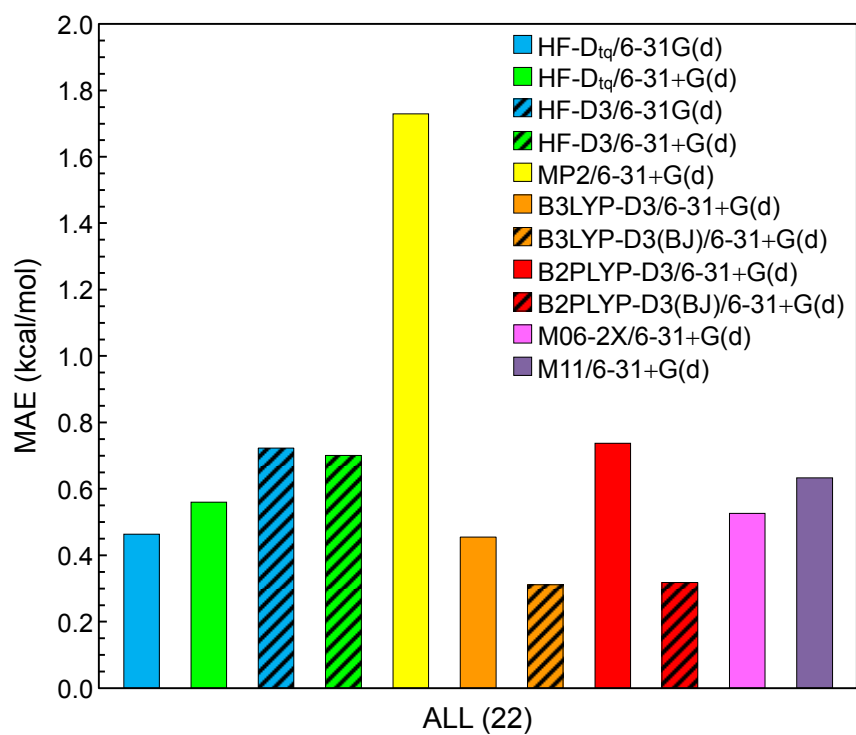


図 3.9 S22 benchmark set [170]の MAE

3.4.3 水和自由エネルギー変化項

タンパク質全系の水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)を量子化学的に算出することは、計算コストの問題から事実上困難である。したがって、触媒反応中心を polarizable continuum model (PCM) 法 の 一 種 である CPCM/B3LYP/6-31G(d) で 評 価 し、残りの部分は古典論に基づく Poisson-Boltzmann (PB)法によって評価した。すなわち、 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ を hybrid 評価法により算出した [162, 163]。Hybrid 法は ONIOM 法の考え方と同様に全系を計算コストの低い PB 法で、反応中心を PB 法と PCM 法の二つで計算し、計算結果は精度の高い PCM 法の結果を実行的に考慮している。 $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の算出法を以下に示す (図 3.10, 式 (3.11))。

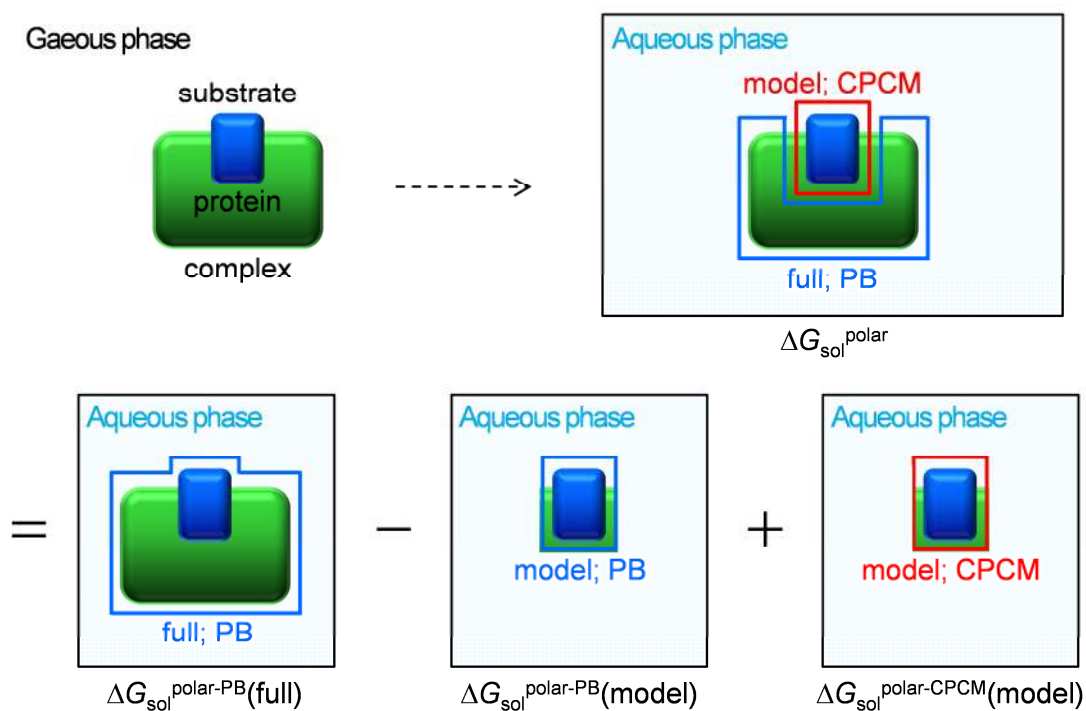


図 3.10 水和自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)の hybrid 評価法
full はタンパク質全系, model は ONIOM 法における QM 領域と同一領域。

$$\begin{aligned}
\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} &= [G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{full, complex}) - (G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{full, protein}) \\
&\quad + G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{full, substrate}))] \\
&\quad - [G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{model, complex}) - (G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{model, protein}) \\
&\quad + G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{model, substrate}))] \\
&\quad + [G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{model, complex}) - (G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{model, protein}) \\
&\quad + G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{model, substrate}))] \\
&= \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{full}) - \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar-PB}}(\text{model}) \\
&\quad + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{model})
\end{aligned} \tag{3.11}$$

ここで, full はタンパク質全系を, model は ONIOM 法における QM 領域と同一の領域を示す.

式 (3.4) の水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) を式 (3.12) により算出した (図 3.11).

$$\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} = G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{complex})^{\text{B}} - G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{complex})^{\text{A}} \tag{3.12}$$

ここで, $G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{complex})^{\text{A}}$ および $G_{\text{sol}}^{\text{polar-CPCM}}(\text{complex})^{\text{B}}$ はそれぞれ acylation 過程における連続した A, B の状態を表し, 状態 A が ES の時, 状態 B は TS₁, 状態 A が TET₁ の時, 状態 B は TS₂ に対応する ((A, B) = (ES, TS₁) or (TET₁, TS₂)). 以上の PB には mbondi2 半径を, CPCM には Bondi 半径を用い, 計算には Gaussian 09 D.01 [161] および AMBER11 [150] を使用した.

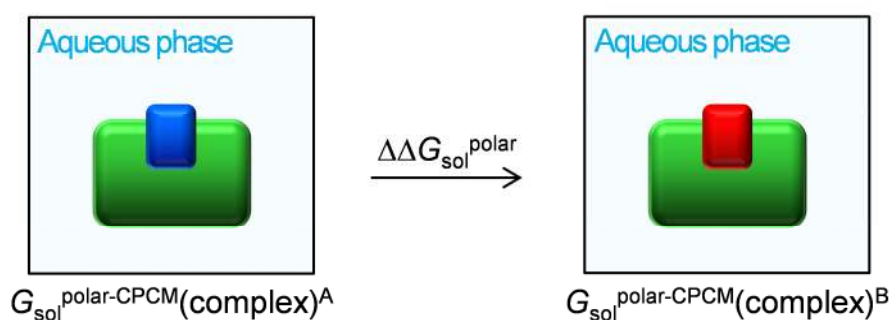


図 3.11 水和自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$)
(A, B) = (ES, TS₁) or (TET₁, TS₂).

3.4.4 遷移状態に関するエネルギー項

タンパク質-基質複合体が遷移状態 (TS)複合体へ遷移する際, その活性化エネルギー (E_X^\ddagger)は, 式 (3.13)によって算出した.

$$E_X^\ddagger = E(\text{complex})^B - E(\text{complex})^A \quad (3.13)$$

ここで, $E(\text{complex})^A$ および $E(\text{complex})^B$ はそれぞれ acylation 過程における連続した A, B の状態を表し, 状態 A が ES の時, 状態 B は TS₁, 状態 A が TET₁ の時, 状態 B は TS₂ に対応し ((A, B) = (ES, TS₁) or (TET₁, TS₂)), その場合活性化エネルギーはそれぞれ $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$, $E_{\text{TS}_2}^\ddagger$ となる. また, 本解析では両者とも ONIOM 法における QM 領域と同一領域のエネルギーであり, B3LYP/6-31G(d)レベルで算出した.

また, 零点振動エネルギー ($\Delta E_{\text{vib}0}$)によって, E_X^\ddagger の補正を行った. 二つの complex の基準振動解析計算から $\Delta E_{\text{vib}0}$ を式 (3.14)によって算出した.

$$\Delta E_{\text{vib}0} = E_{\text{vib}0}(\text{complex})^B - E_{\text{vib}0}(\text{complex})^A \quad (3.14)$$

計算レベルは構造最適化と同じ B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d)レベルを用い, 以上の計算には Gaussian 09 D.01 [161]を使用した.

3.5 非経験的フラグメント分子軌道法によるフラグメント間相互作用の解析方法

本解析では、非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO) 法 [92–95] を用いたフラグメント間相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy; IFIE) 解析 (FMO-IFIE 解析) により、trypsin–Compound **4** (X = H) の各アミノ酸残基との静電的な相互作用エネルギーの寄与を算出し、触媒反応に関わる重要残基の特定を行った [134, 135, 173–175]. 計算は HF/6-31G(d) レベルで行い、計算プログラムは GAMESS [164] を用いた.

第 4 章 結果および考察

4.1 アシル化過程における構造および自由エネルギー変化のプロファイル

4.1.1 状態間の構造遷移

図 4.1 に ONIOM-ME (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法によって構築した trypsin-Compound 4 (X = H)複合体の水素結合様式を、表 4.1 に trypsin-Compound 4 複合体のアシル化 (acylation)過程における Michaelis-Menten 複合体 (酵素-基質 (ES)複合体), 遷移状態 (TS₁, TS₂), 四面体中間体 (TET₁), アシル化酵素 (EA) の各状態の原子間距離 (d1-d15)および角度 (a1-a3)を、図 4.2 に各状態の 3 次元立体構造を示す. 表 4.1 に示す TET₁ の原子間距離 d1-d4 と TET analog である X 線結晶解析構造 (PDB code: 1QCP)の対応するそれらの距離を比較した結果, その誤差は最大で 0.52 Å であり, 類似した原子間距離を保っていることがわかる. したがって, 構築した構造は妥当であると判断できる. Acylation の進行に伴う d5 の変化は 1.55-1.79 Å, d6 の変化は 1.05-1.09 Å であり, ES から EA に遷移する間ほとんど変化しないことが示唆される. 一方, d7 の変化は 1.04-1.73 Å, d8 の変化は 1.01-2.59 Å と大きいことから, acylation 過程では His57-Ser195 間で proton の移動が起こるが, His57-Asp102 間では起きないことが示唆される. すなわち, double proton transfer (DPT)ではなく single proton transfer (SPT)の挙動であると推測される. 基質内の原子間距離 d11 は TET₁ で最長 (1.28 Å)になり, O₄は TET₁ において最も負に荷電していることが示唆される. これに伴い, 基質の O₄ と oxyanion hole との原子間距離 d13, d14 は, TET₁ で最小値 (d13 = 2.05 Å, d14 = 1.73 Å)をとることから, TET₁ において基質と oxyanion hole との間に強固な水素結合が形成されることがわかる. この結果は oxyanion hole が acylation 過程において, 水素結合を介して基質を安定化する役割を担うというメカニズムに一致する.

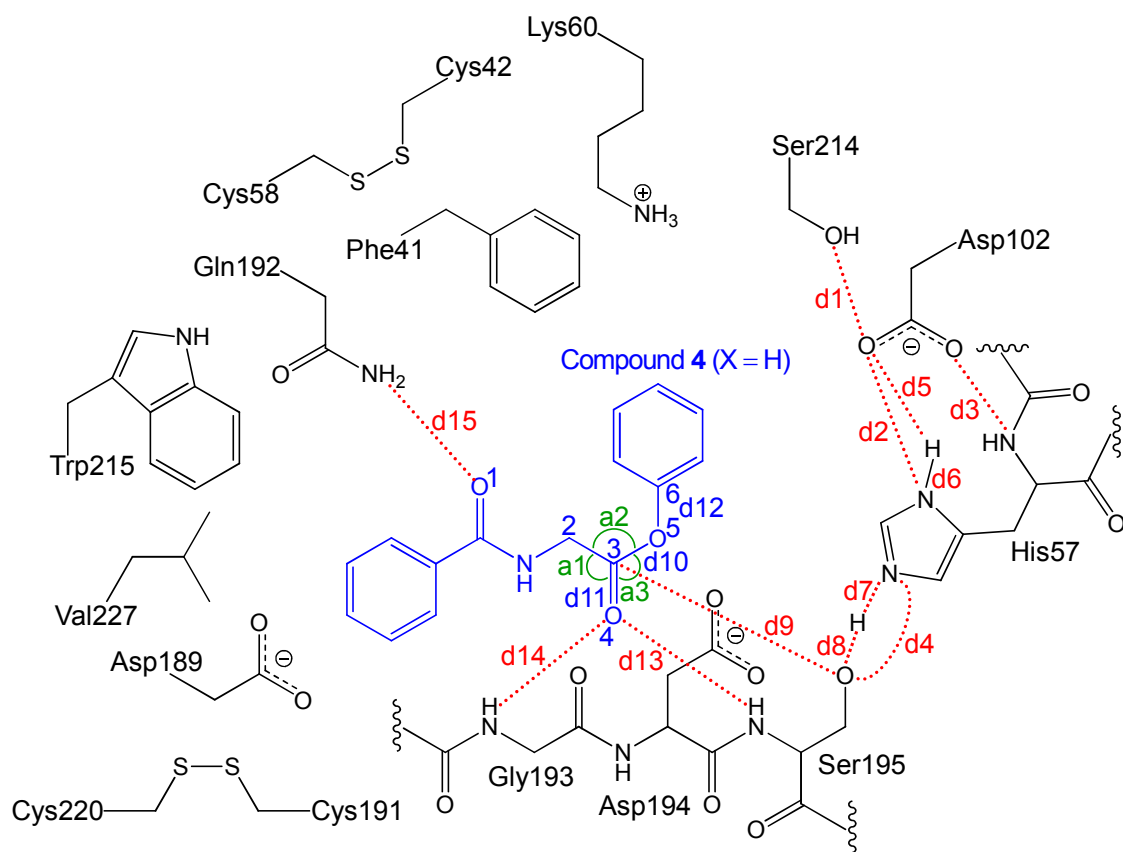


図 4.1 Trypsin-Compound 4 (X = H)複合体の水素結合様式
原子間距離 d1-d15 および角度 a1-a3 は表 4.1 と対応する。

表 4.1 Trypsin-Compound 4 (X = H)複合体の原子間距離 (Å)および角度 (deg)

distance ^a		ES	TS ₁	TET ₁	TS ₂	EA	X-ray ^b
d1	Ser214-O _γ ···O _{δ1} -Asp102	2.74	2.74	2.77	2.76	2.75	2.84
d2	Asp102-O _{δ1} ···N _δ -His57	2.71	2.62	2.62	2.67	2.83	2.55
d3	Asp102-O _{δ2} ···N _δ -His57	3.37	3.35	3.36	3.42	3.51	2.84
d4	His57-N _ε ···O _γ -Ser195	2.66	2.55	2.72	2.95	2.94	3.07
d5	Asp102-O _{δ1} ···H _δ -His57	1.68	1.56	1.55	1.59	1.79	
d6	His57 (N _δ ···H _δ)	1.05	1.08	1.09	1.09	1.05	
d7	His57-N _ε ···H _γ -Ser195	1.67	1.12	1.04	1.04	1.73	
d8	Ser195 (O _γ ···H _γ)	1.01	1.44	1.73	2.16	2.59	
d9	Ser195-O _γ ···C ₃ -Compound 4	2.74	1.98	1.49	1.40	1.33	
d10	Compound 4 (C ₃ ···O ₅)	1.35	1.41	1.51	1.84	2.57	
d11	Compound 4 (C ₃ ···O ₄)	1.21	1.23	1.28	1.25	1.22	
d12	Compound 4 (O ₅ ···C ₆)	1.39	1.38	1.36	1.34	1.36	
d13	Ser195-NH···O ₄ -Compound 4	4.18	2.98	2.05	2.15	2.15	
d14	Gly193-NH···O ₄ -Compound 4	1.90	1.80	1.73	1.76	1.92	
d15	Gln192-H _ε ···O ₁ -Compound 4	1.88	1.97	1.97	1.96	2.12	
angle ^a		ES	TS ₁	TET ₁	TS ₂	EA	
a1	Compound 4 (C ₂ ···C ₃ ···O ₄)	126.1	124.4	118.5	122.2	126.0	
a2	Compound 4 (C ₂ ···C ₃ ···O ₅)	108.5	106.8	104.0	94.2	90.6	
a3	Compound 4 (O ₄ ···C ₃ ···O ₅)	125.1	121.0	117.0	112.0	96.7	

^a Ref. Figure 4.1.

^b PDB code: 1QCP.

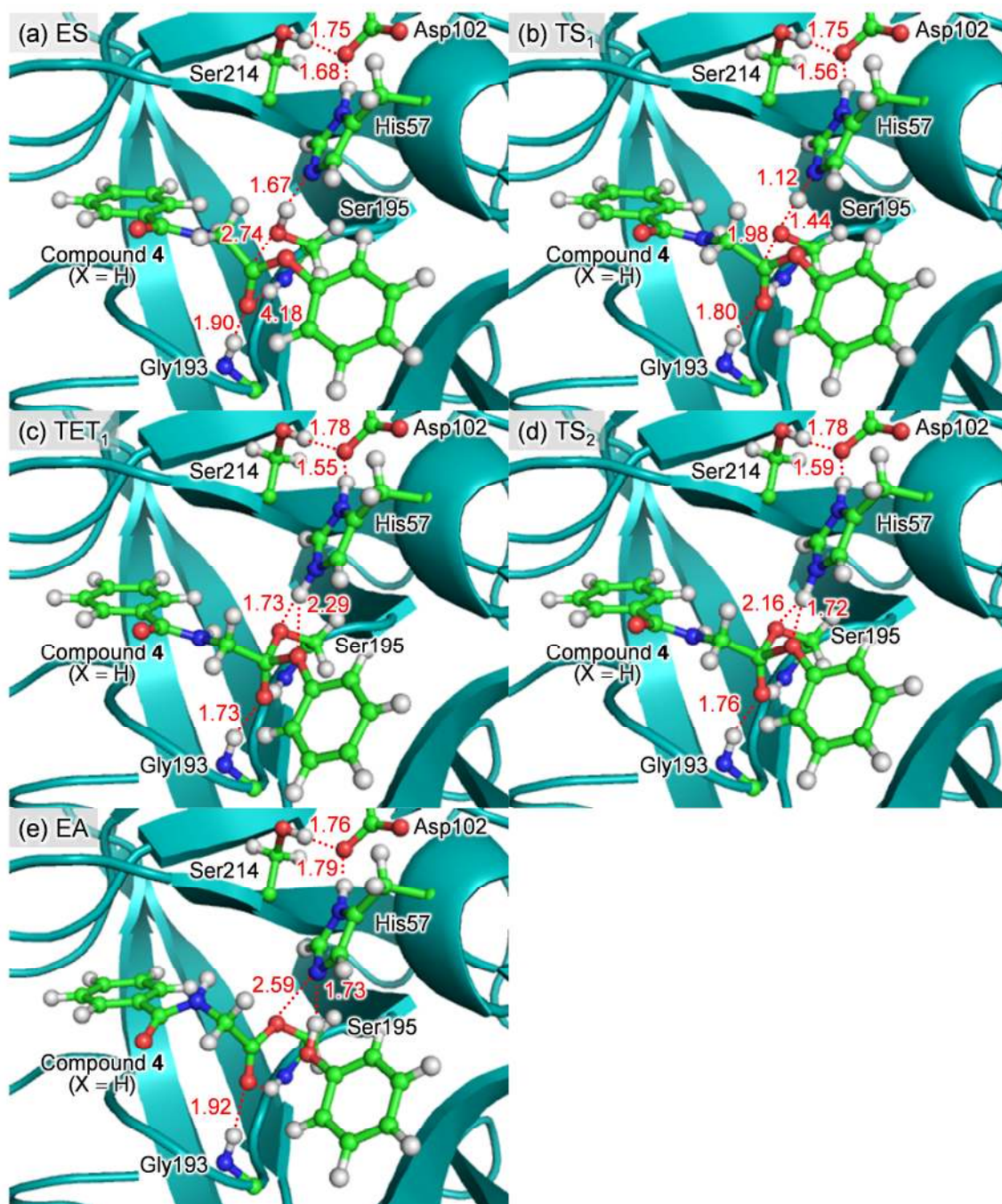


図 4.2 Trypsin-Compound 4 (X = H)複合体の 3 次元立体構造
 ONIOM-ME (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法による構造最適化によって構築.
 点線は水素結合を表し、原子間距離の単位は Å である.

4.1.2 エネルギー遷移

図 4.3 に ONIOM-ME (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法によって構築した trypsin-Compound 4 (X = H)複合体のエネルギーダイアグラムを、表 4.2 にそのエネルギー値および活性化エネルギーを示す。グラフ中のエネルギーは ES からの相対値であり、ONIOM 法における QM 領域だけで評価している。図 4.3 より、B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME レベルでは ES-TS₁間のエネルギー変化 ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$)の方が、TET₁-TS₂間のエネルギー変化 ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$)よりも大きいことがわかる ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (8.67 kcal/mol) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (3.30))。この結果は、より高価な基底関数 [176]を用いた場合も同じである (B3LYP-D3(BJ)/def2TZVPP ME//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME) ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (11.25) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (2.12))。B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME レベルのエネルギーダイアグラムに counterpoise (CP)法 [100, 101]による basis set superposition error (BSSE)補正 [99, 100]を行うと (B3LYP-D3(BJ)-CP/6-31G(d) ME), acylation 過程全体のエネルギーが約 5–9 kcal/mol ほど高くなるが、この場合も $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (13.50) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (4.58) である。B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) レベルの electro embedding (EE) (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) EE//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME)で評価した場合も $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (8.29) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (6.87)であり、この結果は B3LYP のエネルギーから D3(BJ)による分散力補正を除いた場合 (B3LYP/6-31G(d) ME//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME)でも変わらない ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (11.65) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (3.09))。さらに、他の DFT 法である M06-2X で評価した場合に (M06-2X/6-31G(d) ME//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME), $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (10.94) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (5.79)が成立すること、post Hartree-Fock (HF)法の MP2 で評価した場合も (MP2/6-31G(d) ME//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME), $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ (10.62) > $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ (4.75)が成立することが確認できる。したがって、いずれの計算方法でも $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1} > E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ が成立することから、acylation 過程における律速段階は ES-TS₁間であることが示唆される。

ここで、ME 法と EE 法が構造に及ぼす影響を確認するため、律速段階と考えられる ES, TS₁において、ONIOM-ME (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法および ONIOM-EE (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法による構造最適化によって構築した trypsin-Compound 4 複合体の QM 領域におけるヘテロ原子間の根平均二乗変位 (root mean square deviation; RMSD)を比較した。その結果、ME 法の構造を基準とした RMSD は、ES, TS₁ でそれぞれ 0.0384, 0.0898 Å であり、ME 法と EE 法の違いが構造に与える影響は小さいことがわかる。

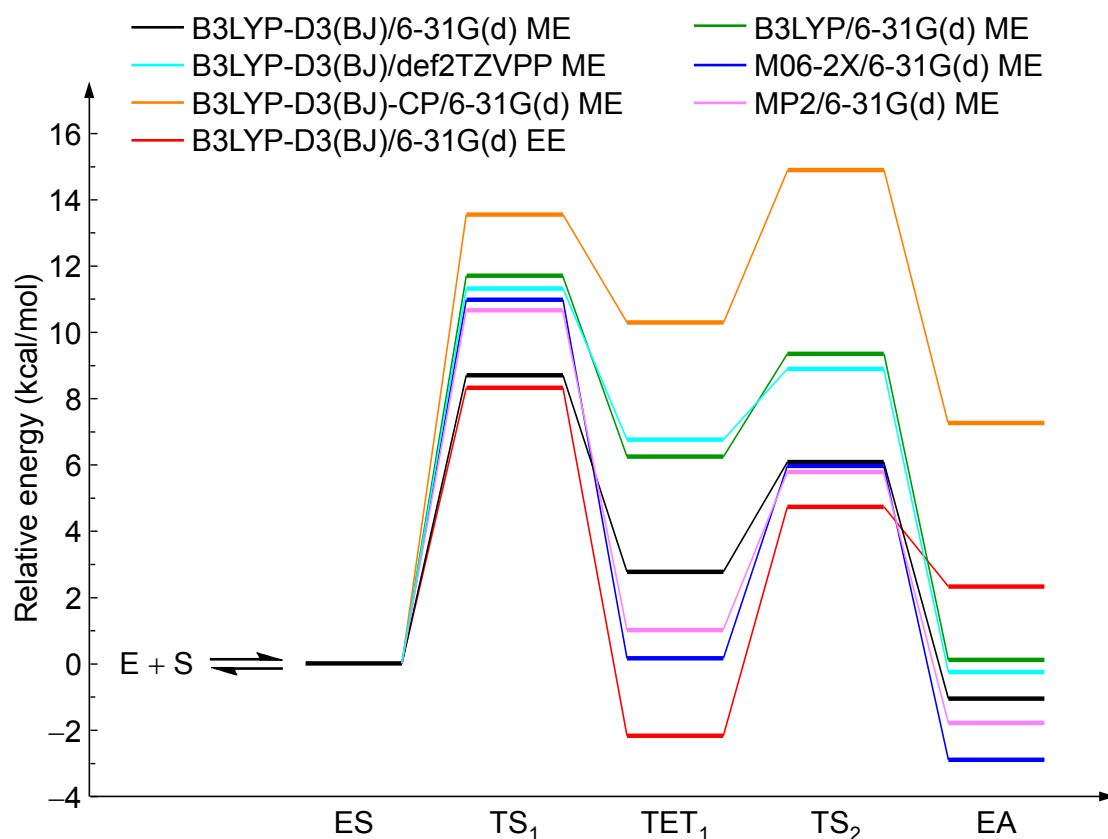


図 4.3 Trypsin-Compound 4 (X = H)複合体のエネルギーダイアグラム
構造は ONIOM-ME (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法によって構築. ES からの
相対エネルギーであり, QM 領域のエネルギーだけで評価している.

表 4.2 Trypsin-Compound 4 (X = H)複合体のエネルギー値および活性化エネルギー (kcal/mol)^a

	TS ₁ ^b	TET ₁ ^b	TS ₂ ^b	EA ^b	$E_{TS_1}^\ddagger$	$E_{TS_2}^\ddagger$
B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME	8.67	2.75	6.05	-1.05	8.67	3.30
B3LYP-D3(BJ)/def2TZVPP ME	11.25	6.72	8.84	-0.23	11.25	2.12
B3LYP-D3(BJ)-CP/6-31G(d) ME	13.50	10.25	14.83	7.23	13.50	4.58
B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) EE	8.29	-2.17	4.71	2.32	8.29	6.87
B3LYP/6-31G(d) ME	11.65	6.22	9.31	0.10	11.65	3.09
M06-2X/6-31G(d) ME	10.94	0.16	5.95	-2.90	10.94	5.79
MP2/6-31G(d) ME	10.62	1.00	5.76	-1.79	10.62	4.75

^a Structures constructed at B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME level.

^b Relative energy from ES complex.

次に、上記と同条件の ONIOM-ME 法にて構築した trypsin-Compounds (1-8) 複合体におけるエネルギー遷移について解析を行った。QM 領域におけるヘテロ原子間の RMSD は、すべての状態で十分に小さいと考えられ、構築した構造における化合物間の結合様式はほぼ同じであることがわかる (表 4.3)。図 4.4 に trypsin-Compounds (1-8) 複合体のエネルギーダイアグラム (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME)、表 4.4 にそのエネルギー値、表 4.5 に活性化エネルギーおよび振動数を示す。エネルギーは ES からの相対値であり、QM 領域のエネルギーだけで評価している。表 4.5 より、Compounds (1-8) の複合体の $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ は $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ より大きく、したがって、どの Compound を加水分解する場合でも ES-TS₁ 間が律速段階であることが示唆される。特に Compounds (6-8) の $E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ は 1.35 kcal/mol 以下であり、反応障壁がほとんどなく、TET₁ 形成後、すぐに EA へと触媒反応が進行することがわかる。Amide 結合を持つ基質の触媒反応では、活性化エネルギーが表 4.5 の $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ よりも 3-10 kcal/mol ほど高いことが報告されている [177, 178]。また、trypsin-Compounds (1-8) 複合体のエネルギーに BSSE 補正を行った場合も、すべての複合体で $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1} > E^{\ddagger}_{\text{TS}_2}$ が成り立つことがわかる (図 4.5, 表 4.6)。

表 4.3 各構造における trypsin-Compounds (1-8) 複合体の RMSD (Å)^{a, b}

	ES	TS ₁	TET ₁	TS ₂	EA
RMSD ^c	0.0915	0.0632	0.208	0.162	0.060
	(0.146)	(0.100)	(0.332)	(0.247)	(0.094)

^a Referenced to trypsin-Compound 4 (X = H) complex.

^b The heavy atoms in QM region.

^c (); RMSD of ligand heavy atoms.

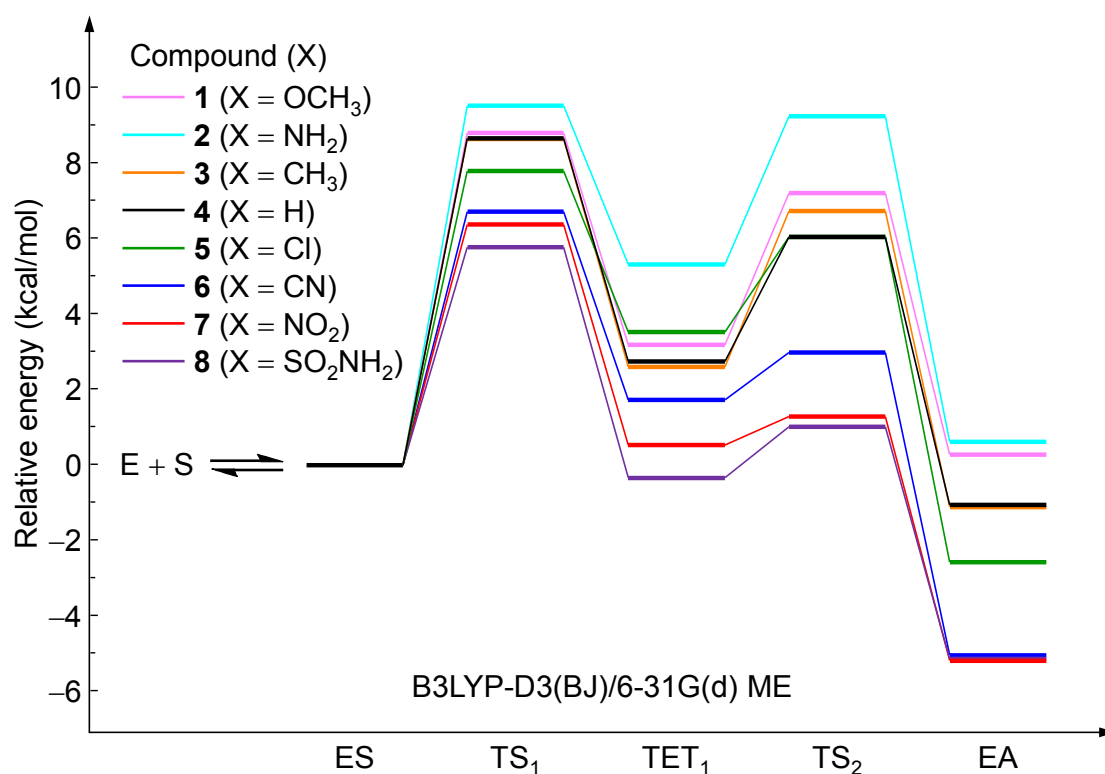


図 4.4 Trypsin-Compounds (1-8)複合体のエネルギーダイアグラム
ES からの相対エネルギーであり, QM 領域のエネルギーを示す.

表 4.4 Trypsin-Compounds (1-8)複合体のエネルギー値 (kcal/mol)^{a, b}

Compound		TS ₁	TET ₁	TS ₂	EA
No.	-X				
1	OCH ₃	8.81 (12.13)	3.19 (7.11)	7.21 (10.95)	0.28 (1.65)
2	NH ₂	9.53 (12.44)	5.32 (8.63)	9.25 (12.48)	0.62 (1.40)
3	CH ₃	8.65 (11.72)	2.60 (6.12)	6.74 (9.95)	-1.11 (0.05)
4	H	8.67 (11.65)	2.75 (6.22)	6.05 (9.31)	-1.05 (0.10)
5	Cl	7.80 (10.79)	3.53 (6.76)	6.05 (9.07)	-2.57 (-1.63)
6	CN	6.72 (9.43)	1.73 (4.75)	2.98 (5.71)	-5.14 (-4.11)
7	NO ₂	6.38 (9.12)	0.53 (3.43)	1.29 (3.91)	-5.18 (-4.47)
8	SO ₂ NH ₂	5.77 (7.97)	-0.33 (2.46)	1.02 (3.54)	-5.04 (-4.53)

^a Relative energy from ES complex.

^b (); Energy without D3(BJ) correction.

表 4.5 活性化エネルギーおよび振動数

Compound		TS ₁		TS ₂	
No.	-X	$E_{TS_1}^\ddagger$ ^{a, b}	frequency ^c	$E_{TS_2}^\ddagger$ ^{a, b}	frequency ^c
1	OCH ₃	8.81 (12.13)	70.9 <i>i</i>	4.03 (3.84)	119 <i>i</i>
2	NH ₂	9.53 (12.44)	182 <i>i</i>	3.93 (3.85)	122 <i>i</i>
3	CH ₃	8.65 (11.72)	58.9 <i>i</i>	4.14 (3.82)	159 <i>i</i>
4	H	8.67 (11.65)	79.4 <i>i</i>	3.30 (3.09)	168 <i>i</i>
5	Cl	7.80 (10.79)	92.5 <i>i</i>	2.51 (2.31)	148 <i>i</i>
6	CN	6.72 (9.43)	184 <i>i</i>	1.25 (0.96)	184 <i>i</i>
7	NO ₂	6.38 (9.12)	158 <i>i</i>	0.75 (0.48)	156 <i>i</i>
8	SO ₂ NH ₂	5.77 (7.97)	493 <i>i</i>	1.35 (1.08)	183 <i>i</i>

^a In kcal/mol.

^b (); Energy without D3(BJ) correction.

^c In cm⁻¹.

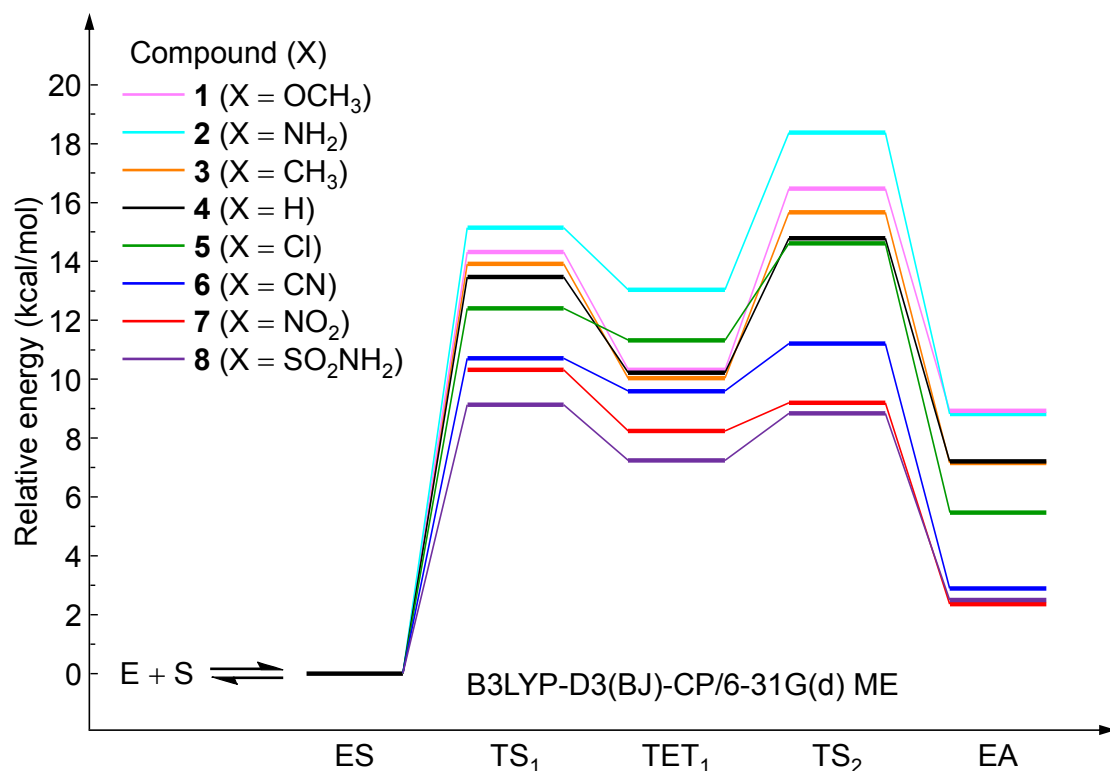


図 4.5 BSSE 補正を加えた trypsin-Compounds (1-8)複合体のエネルギーダイアグラム

ES からの相対エネルギーであり, QM 領域のエネルギーを示す.

表 4.6 BSSE 補正を加えた trypsin-Compounds (1-8)複合体のエネルギー値および活性化エネルギー (kcal/mol)^{a, b}

Compound		TS ₁ ^c	TET ₁ ^c	TS ₂ ^c	EA ^c	$E_{TS_1}^\ddagger$	$E_{TS_2}^\ddagger$
No.	-X						
1	OCH ₃	14.36	10.35	16.52	8.95	14.36	6.18
		(5.55)	(7.16)	(9.31)	(8.67)		
2	NH ₂	15.18	13.07	18.43	8.84	15.18	5.36
		(5.65)	(7.75)	(9.18)	(8.22)		
3	CH ₃	13.95	10.06	15.71	7.17	13.95	5.65
		(5.30)	(7.46)	(8.97)	(8.28)		
4	H	13.50	10.25	14.83	7.23	13.50	4.58
		(4.83)	(7.50)	(8.78)	(8.28)		
5	Cl	12.44	11.36	14.66	5.48	12.44	3.29
		(4.64)	(7.83)	(8.61)	(8.05)		
6	CN	10.74	9.62	11.23	2.89	10.74	1.61
		(4.02)	(7.89)	(8.25)	(8.03)		
7	NO ₂	10.35	8.26	9.22	2.36	10.35	0.95
		(3.97)	(7.73)	(7.93)	(7.54)		
8	SO ₂ NH ₂	9.15	7.26	8.86	2.50	9.15	1.60
		(3.38)	(7.59)	(7.84)	(7.54)		

^a Structures constructed at B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) ME level.

^b (); The CP correction value.

^c Relative energy from ES complex.

4.1.3 Proton 移動

図 4.6 に ONIOM (B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d) : Amber)法によって構築した Compounds (1-8)複合体の TS₁ の原子間距離 d2 (Asp102-O_{δ1}⋯N_δ-His57), d5 (Asp102-O_{δ1}⋯H_δ-His57), d6 (His57 (N_δ⋯H_δ)), d7 (His57-N_ε⋯H_γ-Ser195)および d8 (Ser195 (O_γ⋯H_γ))を示す. ただし, グラフ内の数値は原子間距離の平均および標準偏差である. 図4.6の d5 ($1.561 \pm 0.006 \text{ \AA}$)および d6 ($1.081 \pm 0.002 \text{ \AA}$)は化合物間ではほぼ一定であり, その値から His57-Asp102 間では proton 移動が起きないことがわかる. 一方, d7 ($1.125 \pm 0.033 \text{ \AA}$)および d8 ($1.430 \pm 0.067 \text{ \AA}$)の値から, 化合物間の変動は大きいものの, His57-Ser195 間の proton 移動が確認できる. したがって, 本研究結果は His57-Asp102 間および His57-Ser195 間の二箇所同時に proton 移動が起こる double proton transfer (DPT) [41, 42]のメカニズムに一致せず, His57-Ser195 間でのみ proton 移動が起こる single proton transfer (SPT)のメカニズムに一致する. また, His57-Asp102 間の重原子間距離 d2 (Asp102-O_{δ1}⋯N_δ-His57)の値は $2.622 \pm 0.003 \text{ \AA}$ であり, 全化合物において低障壁水素結合 (low barrier hydrogen bond; LBHB) [58]が形成される条件 ((重原子間距離) < 2.6 Å)を満たさないことがわかる. したがって, 本研究では LBHB の形成が見られない. 以上より, 本研究結果は DPT 仮説および LBHB 仮説に則するものではなく, SPT 仮説に則するものだと確認できる. この結果は acylation 過程の他の遷移状態・中間体でも同じである.

また, 表4.7に d2, d5-d8 と Hammett σ^- との相関関係を示す. 表4.7より, d2, d5-d8 と σ^- 間には相関係数の絶対値が 0.800 以上の良好な線形関係が成立し, これらの原子間距離はいずれも置換基の電子効果を強く受けることがわかる. 特に, d7, d8 の化合物間の変動は大きく, σ^- 依存性が強い.

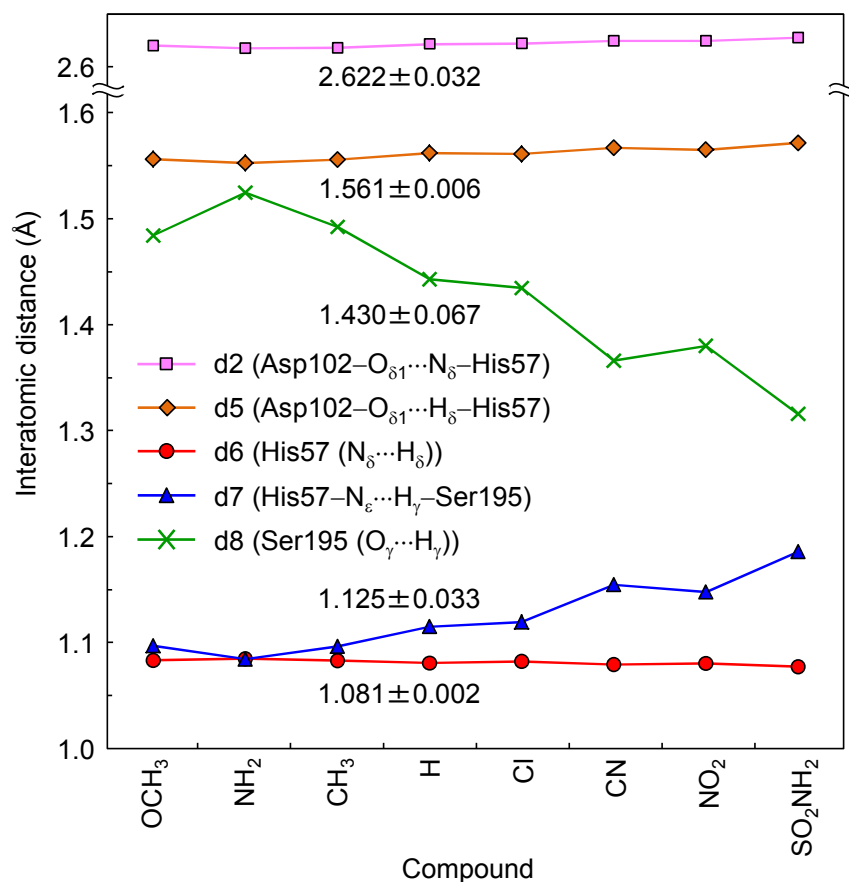


図 4.6 Trypsin-Compounds (1-8)複合体の TS₁ における原子間距離
 原子間距離 d2, d5-d8 は図 4.1 に対応する。
 グラフ内の数値は原子間距離の平均および標準偏差。

表 4.7 Trypsin-Compounds (1-8)複合体の TS₁ における原子間距離および
 Hammett σ^- との相関係数 (r)

	d2 ^a	d5 ^a	d6 ^a	d7 ^a	d8 ^a	σ^-
d2 ^a	1.000	0.981	-0.952	0.980	-0.988	0.876
d5 ^a	0.981	1.000	-0.988	0.983	-0.993	0.855
d6 ^a	-0.952	-0.988	1.000	-0.968	0.973	-0.804
d7 ^a	0.980	0.983	-0.968	1.000	-0.995	0.890
d8 ^a	-0.988	-0.993	0.973	-0.995	1.000	-0.896
σ^-	0.876	0.855	-0.804	0.890	-0.896	1.000

^a Ref. Figure 4.1.

4.2 自由エネルギー変化のエネルギー代表項による線形表現解析

に基づく trypsin の加水分解反応機構の定量的解析

4.2.1 Michaelis–Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化の定量的構造活性相関式

表 4.8 に trypsin–Compounds (1–8) 複合体の Michaelis–Menten 複合体 (ES 複合体) 形成に伴う自由エネルギー変化の実測値 ($\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}}$), LERE-QSAR 式を用いて得られた計算値 ($\Delta G_{\text{ES}}^{\text{calc}}$), ONIOM 法のエネルギーに基づく結合相互作用エネルギー項 ($\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$), 分散相互作用エネルギー項 (E_{disp}) および hybrid 評価法を用いて算出した水和自由エネルギー変化の極性項 ($\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$) を, 図 4.7 は ΔG_{ES} および各エネルギー代表項の変動を表す. 基本解析式 (3.1) に基づく LERE-QSAR 解析の結果, 式 (4.1) を得ることができ, $\Delta G_{\text{ES}}^{\text{calc}}$ の変動は $\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}}$ の変動を良好に再現している (式 (4.1), 図 4.7).

$$\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}} = A_1 (\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}) + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) - 1.78 \quad (4.1)$$

$n = 8, r = 0.919, s = 0.134 \text{ kcal/mol}, A_1 = 0.114$

ここで, n は化合物数, r は相関係数, s は標準偏差および A_1 は線形定数 ($0 < A_1 < 1$) である. 式 (4.1) の s は 0.134 kcal/mol と小さく, 非常に高い化学的精度である. また, 異なる DFT 法 [113–119] および基底関数にて $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ を算出し, LERE-QSAR 解析を行った結果, $r > 0.907, s < 0.143$, かつ回帰係数が $0.112 < A_1 < 0.122$ の狭い範囲で LERE-QSAR 式を得ることができる (表 4.9 (式 (4.2)–(4.27))). 式 (4.2)–(4.27) の $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ の値は, Pople 系の基底関数 (6-31G(d)) を用いた方が, Arlrichs 系 (def2TZVP, def2TZVPP) [176] を用いた場合より大きい (表 4.10). しかし, 全式を通して variance は約 $25.3\text{--}28.3 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$ 程度しか変化しないため, $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ の計算方法および基底関数の違いによる LERE-QSAR 解析結果への影響は少ないと考えられる.

次に, 式 (4.1) の $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ に BSSE 補正を加えた $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})\text{-CP}$ を用い, LERE-QSAR 解析を行うと式 (4.28) が得られる.

$$\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}} = A_1 (\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})\text{-CP} + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) - 2.57 \quad (4.28)$$

$n = 8, r = 0.919, s = 0.134 \text{ kcal/mol}, A_1 = 0.117$

式 (4.1)と式 (4.28)は r および s が同じであるため, BSSE の化合物間の変動は小さく, 定数になることが示唆される. さらに, HF-D_{tq} 法 [165–167]によって算出した結合相互作用エネルギー項 ($\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF-D}_{\text{tq}}}(\text{ONIOM})$)を用いた LERE-QSAR 解析式を以下に示す (式 (4.29)). ただし, $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF-D}_{\text{tq}}}(\text{ONIOM})$ には HF の分散相互作用エネルギーの補正項が含まれる.

$$\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}} = A_1 (\Delta E_{\text{bind}}^{\text{HF-D}_{\text{tq}}}(\text{ONIOM}) + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) - 1.88 \quad (4.29)$$

$n = 8, r = 0.913, s = 0.139 \text{ kcal/mol}, A_1 = 0.114$

式 (4.29)より, HF-D_{tq}法を用いた LERE-QSAR 解析でも $\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}}$ を良好に再現できることがわかる. 以上より, LERE-QSAR 解析は計算方法および基底関数に依存せず, Michaelis–Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化を良好に再現可能である.

式 (4.1)において, LERE 近似 ($\Delta G_{\text{others-1}} = \beta_1 (\Delta G_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1$)の $\beta_1 (= (\alpha + A_1 - 1)/(1 - \alpha))$ および $\text{const}_1 (= (\text{const}_2 + \text{const}_3)/(1 - \alpha))$ を, $A_1 = 0.114$ ($\text{const}_3 = -1.78$) および entropy–enthalpy 補償則の $\alpha = 0.893$ ($\text{const}_2 = 5.94$) (式 (2.17)) [131]を用いて求めると, $\Delta G_{\text{others-1}}$ について以下の式 (4.30)が得られる.

$$\Delta G_{\text{others-1}} = 0.0654 (\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}) + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + 38.9 \quad (4.30)$$

式 (4.30)は β_1 の値が小さく, 切片 (const_1)は比較的大きい. また, 式 (4.30)から算出した ΔG_{others} の variance も $0.0241 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$ と非常に小さいため, $\Delta G_{\text{others-1}}$ は $\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}}$ の変動に対してほとんど寄与しないことが示唆される.

表 4.8 Michaelis–Menten 複合体形成に伴う ΔG_{ES} と各エネルギー代表項^a

Compound						
No.	-X	$\Delta G_{ES}^{obs\ b}$	$\Delta G_{ES}^{calc\ c}$	$\Delta E_{bind}(ONIOM)$	E_{disp}	ΔG_{sol}^{polar}
1	OCH ₃	-4.50	-4.50	-20.67	-59.79	56.64
2	NH ₂	-4.39	-4.46	-23.05	-59.63	59.17
3	CH ₃	-4.60	-4.53	-16.92	-60.66	53.51
4	H	-4.51	-4.44	-18.12	-57.72	52.49
5	Cl	-4.60	-4.79	-21.79	-61.70	57.10
6	CN	-4.94	-5.01	-29.07	-64.56	65.31
7	NO ₂	-5.22	-5.00	-26.55	-67.65	66.01
8	SO ₂ NH ₂	-5.13	-5.16	-32.98	-71.23	74.58
Variance ^d		0.087	0.073	26.68	18.56	49.13

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G_{ES}^{obs} = -RT \ln(1/K_m)$.

^c Calculated from Equation 4.1.

^d In kcal²/mol².

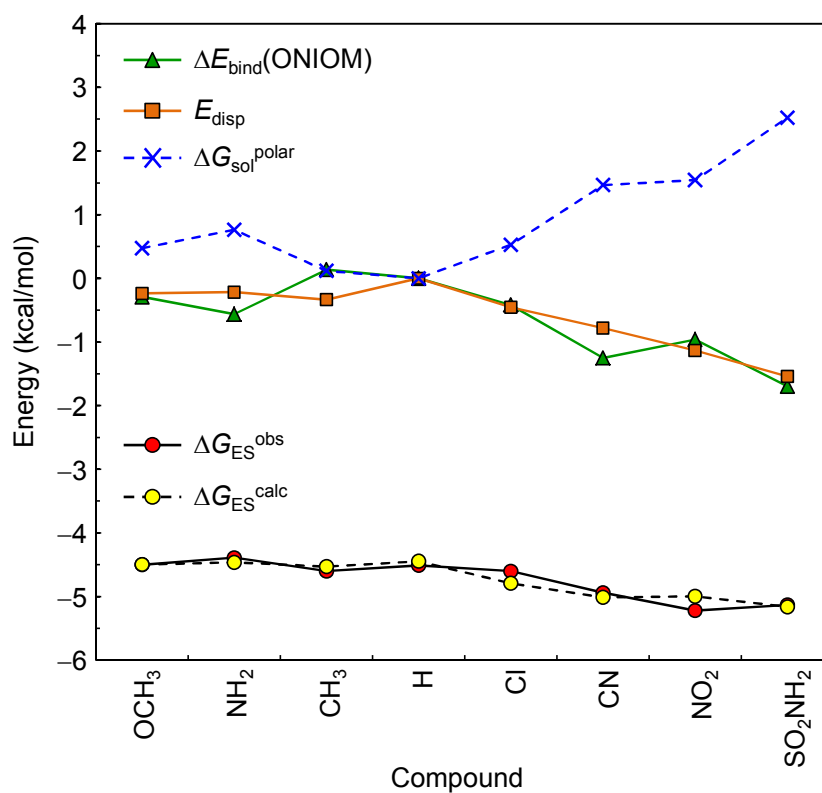


図 4.7 Michaelis–Menten 複合体形成に伴う ΔG_{ES} と各エネルギー代表項の変動
各エネルギー代表項は Compound 4 (X = H)からの相対値 (scaled)である。

表 4.9 異なる DFT 法および基底関数での Michaelis–Menten 複合体形成過程における LERE-QSAR 解析結果^a

Eq. No.	$\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})^{\text{b}}$	r	s^{c}	A_1	$const_3$
(4.1)	B3LYP/6-31G(d)	0.919	0.134	0.114	-1.78
(4.2)	B97/6-31G(d)	0.922	0.131	0.114	-2.06
(4.3)	PBEPBE/6-31G(d)	0.921	0.132	0.113	-1.95
(4.4)	TPSSTPSS/6-31G(d)	0.920	0.134	0.114	-2.02
(4.5)	BMK/6-31G(d)	0.912	0.140	0.112	-2.05
(4.6)	BP86/6-31G(d)	0.921	0.133	0.112	-2.03
(4.7)	B3PW91/6-31G(d)	0.919	0.135	0.114	-1.99
(4.8)	M06-2X/6-31G(d)	0.912	0.140	0.115	-2.27
(4.9)	M11/6-31G(d)	0.908	0.142	0.116	-2.23
(4.10)	B3LYP/def2TZVP	0.918	0.135	0.121	-2.34
(4.11)	B97/def2TZVP	0.921	0.133	0.120	-2.62
(4.12)	PBEPBE/def2TZVP	0.919	0.134	0.120	-2.51
(4.13)	TPSSTPSS/def2TZVP	0.918	0.135	0.120	-2.58
(4.14)	BMK/def2TZVP	0.910	0.141	0.118	-2.32
(4.15)	BP86/def2TZVP	0.919	0.134	0.118	-2.52
(4.16)	B3PW91/def2TZVP	0.917	0.135	0.120	-2.49
(4.17)	M06-2X/def2TZVP	0.910	0.141	0.122	-2.64
(4.18)	M11/def2TZVP	0.907	0.143	0.122	-2.62
(4.19)	B3LYP/def2TZVPP	0.918	0.135	0.121	-2.34
(4.20)	B97/def2TZVPP	0.921	0.133	0.121	-2.63
(4.21)	PBEPBE/def2TZVPP	0.920	0.134	0.121	-2.51
(4.22)	TPSSTPSS/def2TZVPP	0.918	0.135	0.120	-2.58
(4.23)	BMK/def2TZVPP	0.910	0.141	0.118	-2.34
(4.24)	BP86/def2TZVPP	0.919	0.134	0.118	-2.53
(4.25)	B3PW91/def2TZVPP	0.917	0.135	0.120	-2.49
(4.26)	M06-2X/def2TZVPP	0.910	0.141	0.122	-2.65
(4.27)	M11/def2TZVPP	0.907	0.143	0.122	-2.64

^a $\Delta G_{\text{ES}}^{\text{obs}} = A_1 (\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM}) + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}) + const_3$ (E_{disp} : D3(BJ) + LJ6, $\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$: CPCM/B3LYP/6-31G(d) + PB).

^b //B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d).

^c In kcal/mol.

表 4.10 異なる DFT 法および基底関数で算出した ΔE_{bind} (ONIOM)の値 (kcal/mol)

Compound		Basis set = 6-31G(d)								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	-20.67	-15.41	-22.38	-19.86	-20.35	-17.99	-17.78	-27.17	-27.34
2	NH ₂	-23.05	-17.44	-24.89	-22.22	-22.96	-20.35	-20.08	-30.08	-30.26
3	CH ₃	-16.92	-11.35	-18.77	-16.11	-16.94	-14.28	-13.97	-23.98	-24.18
4	H	-18.12	-12.54	-19.97	-17.31	-18.22	-15.49	-15.17	-25.24	-25.49
5	Cl	-21.79	-16.21	-23.71	-21.03	-21.81	-19.18	-18.82	-28.89	-29.06
6	CN	-29.07	-23.46	-31.03	-28.35	-29.28	-26.55	-26.14	-36.32	-40.62
7	NO ₂	-26.55	-21.03	-28.54	-25.81	-26.41	-23.98	-23.55	-33.55	-36.54
8	SO ₂ NH ₂	-32.98	-27.23	-35.00	-32.24	-33.11	-30.41	-30.00	-40.48	-29.06
Variance ^a		26.68	26.05	27.41	27.00	27.26	27.06	26.57	28.30	28.08

Compound		Basis set = def2TZVP								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	-14.88	-9.80	-16.61	-14.19	-17.16	-12.76	-12.77	-23.18	-23.27
2	NH ₂	-16.92	-11.53	-18.78	-16.24	-19.54	-14.83	-14.79	-25.79	-25.96
3	CH ₃	-10.90	-5.54	-12.76	-10.24	-13.56	-8.84	-8.77	-19.75	-19.92
4	H	-12.14	-6.78	-14.02	-11.49	-14.87	-10.11	-10.02	-21.04	-21.23
5	Cl	-15.58	-10.24	-17.51	-14.98	-18.29	-13.58	-13.47	-24.50	-24.64
6	CN	-23.00	-17.60	-24.96	-22.43	-25.81	-21.05	-20.90	-31.99	-32.15
7	NO ₂	-20.23	-14.95	-22.24	-19.67	-22.79	-18.28	-18.12	-29.08	-29.17
8	SO ₂ NH ₂	-26.55	-21.05	-28.58	-25.98	-29.41	-24.60	-24.45	-35.85	-35.99
Variance ^a		25.36	24.86	26.00	25.74	26.11	25.80	25.46	26.90	26.80

Compound		Basis set = def2TZVPP								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	-14.82	-9.73	-16.57	-14.17	-16.98	-12.70	-12.72	-23.12	-23.11
2	NH ₂	-16.86	-11.47	-18.74	-16.23	-19.34	-14.77	-14.74	-25.74	-25.80
3	CH ₃	-10.83	-5.47	-12.72	-10.21	-13.37	-8.77	-8.72	-19.69	-19.77
4	H	-12.08	-6.70	-13.98	-11.46	-14.68	-10.04	-9.97	-20.98	-21.09
5	Cl	-15.52	-10.16	-17.46	-14.96	-18.09	-13.51	-13.42	-24.45	-24.51
6	CN	-22.93	-17.52	-24.91	-22.41	-25.61	-20.98	-20.85	-31.94	-32.03
7	NO ₂	-20.17	-14.88	-22.20	-19.65	-22.59	-18.21	-18.07	-29.03	-29.03
8	SO ₂ NH ₂	-26.49	-20.97	-28.54	-25.97	-29.21	-24.53	-24.40	-35.80	-35.86
Variance ^a		25.35	24.85	26.00	25.75	26.07	25.78	25.45	26.91	26.88

^a In kcal/mol².

表 4.11 に ΔG_{ES} , 式 (4.1)に用いたエネルギー項および Hammett σ^- との相関係数 (r)を示す. 各エネルギー代表項と σ^- との相関はいずれも良好で, すべてのエネルギー項の変動が σ^- の変動に一致していることがわかる (表 4.11). 当研究室では先行研究において, 分子科学計算を用いて算出した一連の X-substituted acetophenone-*N*-methylacetamide 間のエネルギー項が, 古典 QSAR 解析にて実測された Hammett σ と良好な相関を持つことを確認しており [179], 本研究の結果は古典 QSAR 解析の解釈と定量的に一致する. 図 4.7 より, 電子供与性の置換基を持つ化合物 (Compounds (1-3))よりも電子吸引性の置換基を持つ化合物 (Compounds (5-8))との複合体の方が, $\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$ の値が低く, すなわち, Compounds (5-8)の導入によって Michaelis-Menten 複合体が安定化されることが示唆され, これは古典 QSAR 解析の解釈と一致する.

表 4.11 Michaelis-Menten 複合体形成に伴う自由エネルギー変化 (ΔG_{ES})と各エネルギー代表項ならびに Hammett σ^- との相関係数 (r)

	$\Delta G_{ES}^{\text{obs a}}$	$\Delta G_{ES}^{\text{calc b}}$	$\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$	E_{disp}	$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$	σ^-
$\Delta G_{ES}^{\text{obs a}}$	1.000	0.919	0.781	0.928	-0.835	-0.957
$\Delta G_{ES}^{\text{calc b}}$	0.919	1.000	0.893	0.941	-0.898	-0.935
$\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$	0.781	0.893	1.000	0.886	-0.979	-0.826
E_{disp}	0.928	0.941	0.886	1.000	-0.949	-0.865
$\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$	-0.835	-0.898	-0.979	-0.949	1.000	0.823
σ^-	-0.957	-0.935	-0.826	-0.865	0.823	1.000

^a $\Delta G_{ES}^{\text{obs}} = -RT \ln (1/K_m)$.

^b Calculated from Equation 4.1.

4.2.2 遷移状態形成に伴う活性化自由エネルギー変化の定量的構造

活性相関式

前節 4.1 より, trypsin-Compounds (1-8)複合体の触媒反応の acylation 過程における律速段階は ES-TS₁ 間であることが示唆された. したがって, TS₁ 形成に伴う活性化自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{TS}_1}^\ddagger$) に対して LERE-QSAR 解析を行った. 表 4.12 に trypsin-Compounds (1-8)複合体の TS₁ 形成に伴う活性化自由エネルギー変化の実測値 ($\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{obs}}$), LERE-QSAR 式を用いて得られた計算値 ($\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{calc}}$), ES-TS₁ 間の活性化エネルギー項 ($E_{\text{TS}_1}^\ddagger$), 分散相互作用エネルギー項 (ΔE_{disp}), 水和自由エネルギー変化項 ($\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$), 零点振動エネルギー項 (ΔE_{vib0})を示す. また, 図 4.8 は $\Delta G_{\text{TS}_1}^\ddagger$ および各エネルギー代表項の変動を表す. 基本解析式 (3.4) に基づく LERE-QSAR 解析の結果, 統計的に良好な LERE-QSAR 式 (4.31) を得ることができた.

$$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{obs}} = A_2 (E_{\text{TS}_1}^\ddagger + \Delta E_{\text{disp}} + \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib0}}) - 0.745 \quad (4.31)$$

$n = 8, r = 0.938, s = 0.162 \text{ kcal/mol}, A_2 = 0.249$

ここで, A_2 は線形定数 ($0 < A_2 < 1$) であり, s は 0.162 kcal/mol と小さく, 式 (4.31) は非常に高い化学的精度を誇る. 図 4.8 より, $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{calc}}$ の変動は $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{obs}}$ の変動を良好に再現していることがわかる. 表 4.12 から $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ の variance ($2.32 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$) は他のエネルギー項 ($\Delta E_{\text{disp}}, \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}, \Delta E_{\text{vib0}}$) の variance に比べて非常に大きく, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ は律速段階の支配要因であることが示唆される. また, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ と $\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ の間には式 (4.32) のような逆相関関係が成立する.

$$\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} = -0.206 E_{\text{TS}_1}^\ddagger + 4.06 \quad (4.32)$$

$n = 8, r = 0.881, s = 0.195 \text{ kcal/mol}$

すなわち, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ の増加分を $\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ が補償しているが, 式 (4.32) の回帰係数の絶対値は 0.2 程度であり, 大きな補償は受けず, やはり $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ がエネルギー支配項である. また, 異なる DFT 法 [113-119] および基底関数にて $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ を算出した LERE-QSAR 解析結果も $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\text{obs}}$ を良好に再現可能であり, いずれの式も $r > 0.820, s < 0.270$, かつ回帰係数が $0.167 < A_2 < 0.307$ の狭い範囲にある (表 4.13 (式 (4.33)-(4.58))). 表 4.14 より, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ の値は Arlrchs 系の基底関数 (def2TZVP, def2TZVPP) [176] を用いた方が, Pople 系 (6-31G(d)) を用いた場合より大きくなり,

結果, variance も大きくなることがわかる. しかし, 必ずしも Arrichs 系を用いた式の方が, Pople 系を用いた式よりも r が良好なわけではなく, したがって, variance が大きければ r が良好というわけではない.

次に, 式 (4.31)の $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ に BSSE 補正を加えた $E_{\text{TS}_1}^\ddagger\text{-CP}$ を用いて LERE-QSAR 解析を行った結果を式 (4.59)に示す.

$$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{obs}} = A_2 (E_{\text{TS}_1}^\ddagger\text{-CP} + \Delta E_{\text{disp}} + \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib}0}) - 0.887 \quad (4.59)$$

$n = 8, r = 0.936, s = 0.165 \text{ kcal/mol}, A_2 = 0.166$

$E_{\text{TS}_1}^\ddagger\text{-CP}$ の variance ($5.21 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$)も他のエネルギー項 ($\Delta E_{\text{disp}}, \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}, \Delta E_{\text{vib}0}$) の variance に比べて圧倒的に大きく, BSSE 補正を加えても $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ が支配要因であることが示唆される. さらに, HF-D_{tq} 法 [165–167]によって算出した活性化エネルギー ($E_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{HF-D}_{\text{tq}}}$)を用いた LERE-QSAR 式を以下に示す (式 (4.60)). $E_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{HF-D}_{\text{tq}}}$ は HF の分散相互作用エネルギーの補正項を含む.

$$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{obs}} = A_2 (E_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{HF-D}_{\text{tq}}} + \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib}0}) - 3.58 \quad (4.60)$$

$n = 8, r = 0.868, s = 0.233 \text{ kcal/mol}, A_2 = 0.250$

したがって, HF-D_{tq} 法を用いた LERE-QSAR 解析でも $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{obs}}$ を良好に再現可能である. 以上より, LERE-QSAR 解析は計算方法および基底関数に依存せず, TS₁ 形成に伴う活性化自由エネルギー変化を良好に再現可能であることを示した.

式 (4.31)において, LERE 近似 ($\Delta G_{\text{others-2}} = \beta_2 (\Delta G^\ddagger + \Delta \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}_1$)の $\beta_2 (= (\alpha + A_2 - 1)/(1 - \alpha))$ および $\text{const}_1 (= (\text{const}_2 + \text{const}_3)/(1 - \alpha))$ を, $A_2 = 0.249$ ($\text{const}_3 = -0.745$) および entropy–enthalpy 補償則の $\alpha = 0.893$ ($\text{const}_2 = 5.94$) (式 (2.17)) [131] を用いて求めると, $\Delta G_{\text{others-2}}$ について以下の式が得られる.

$$\Delta G_{\text{others-2}} = 1.33 (E_{\text{TS}_1}^\ddagger + \Delta E_{\text{disp}} + \Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib}0}) + 48.6 \quad (4.61)$$

式 (4.61)は β_2 の値は正であり, 切片 (const_1)は比較的大きい. また, 式 (4.61)から算出した $\Delta G_{\text{others-2}}$ の variance は $4.13 \text{ kcal}^2/\text{mol}^2$ と他のエネルギー代表項に比べて大きいため, $\Delta G_{\text{others-2}}$ で表される penalty energy は $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{obs}}$ の変動に対して寄与が大きいことが示唆される.

表 4.12 TS₁ 形成に伴う $\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ と各エネルギー代表項^a

Compound							
No.	-X	$\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ ^{obs b}	$\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ ^{calc c}	$E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$	ΔE_{disp}	$\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$	$\Delta E_{\text{vib}0}$
1	OCH ₃	1.57	1.54	12.13	-3.34	1.78	-1.40
2	NH ₂	1.46	1.56	12.44	-2.93	1.16	-1.42
3	CH ₃	1.62	1.43	11.72	-3.10	1.57	-1.48
4	H	1.53	1.42	11.65	-3.01	1.76	-1.74
5	Cl	1.02	1.22	10.79	-3.02	1.93	-1.81
6	CN	0.90	0.90	9.43	-2.73	2.27	-2.38
7	NO ₂	0.60	0.78	9.12	-2.76	2.12	-2.35
8	SO ₂ NH ₂	0.60	0.45	7.97	-2.23	2.29	-3.25
Variance ^d		0.165	0.145	2.32	0.0958	0.127	0.361

^a In kcal/mol.

^b $\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ ^{obs} = $-RT \ln k_{\text{cat}}$.

^c Calculated from Equation 4.31.

^d In kcal²/mol².

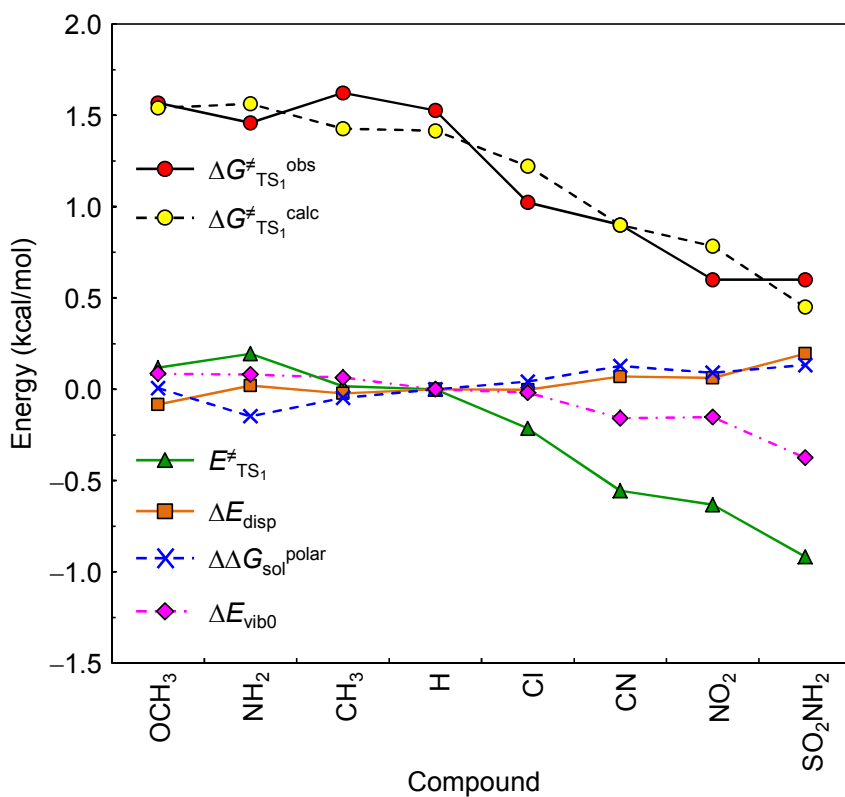


図 4.8 TS₁ 形成に伴う $\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ と各エネルギー代表項の変動
各エネルギー代表項は Compound 4 (X = H)からの相対値 (scaled)である。

表 4.13 異なる DFT 法および基底関数での TS₁ 形成過程における LERE-QSAR 解析結果^a

Eq. No.	$E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ ^b	r	s^c	A_2	$const_3$	correlation $\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$ with $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$
(4.31)	B3LYP/6-31G(d)	0.938	0.162	0.249	-0.745	-0.881
(4.33)	B97/6-31G(d)	0.940	0.160	0.217	-0.174	-0.903
(4.34)	PBEPBE/6-31G(d)	0.939	0.161	0.257	0.200	-0.898
(4.35)	TPSSTPSS/6-31G(d)	0.947	0.150	0.280	-0.0591	-0.877
(4.36)	BMK/6-31G(d)	0.899	0.206	0.307	-1.74	-0.758
(4.37)	BP86/6-31G(d)	0.943	0.156	0.268	0.373	-0.891
(4.38)	B3PW91/6-31G(d)	0.922	0.181	0.253	-0.446	-0.855
(4.39)	M06-2X/6-31G(d)	0.849	0.248	0.238	-1.13	-0.736
(4.40)	M11/6-31G(d)	0.824	0.266	0.266	-0.921	-0.652
(4.41)	B3LYP/def2TZVP	0.931	0.171	0.183	-0.651	-0.885
(4.42)	B97/def2TZVP	0.930	0.172	0.167	-0.248	-0.900
(4.43)	PBEPBE/def2TZVP	0.929	0.173	0.188	0.022	-0.894
(4.44)	TPSSTPSS/def2TZVP	0.936	0.165	0.204	-0.183	-0.882
(4.45)	BMK/def2TZVP	0.914	0.190	0.232	-1.35	-0.814
(4.46)	BP86/def2TZVP	0.933	0.169	0.197	0.161	-0.890
(4.47)	B3PW91/def2TZVP	0.918	0.185	0.189	-0.406	-0.867
(4.48)	M06-2X/def2TZVP	0.884	0.219	0.193	-1.02	-0.807
(4.49)	M11/def2TZVP	0.892	0.212	0.212	-0.910	-0.796
(4.50)	B3LYP/def2TZVPP	0.931	0.172	0.185	-0.731	-0.883
(4.51)	B97/def2TZVPP	0.930	0.172	0.169	-0.311	-0.899
(4.52)	PBEPBE/def2TZVPP	0.929	0.173	0.191	-0.0530	-0.892
(4.53)	TPSSTPSS/def2TZVPP	0.936	0.165	0.206	-0.255	-0.880
(4.54)	BMK/def2TZVPP	0.912	0.192	0.235	-1.46	-0.809
(4.55)	BP86/def2TZVPP	0.933	0.169	0.200	0.0849	-0.887
(4.56)	B3PW91/def2TZVPP	0.918	0.186	0.191	-0.486	-0.865
(4.57)	M06-2X/def2TZVPP	0.880	0.223	0.197	-1.11	-0.801
(4.58)	M11/def2TZVPP	0.888	0.216	0.216	-1.06	-0.785

^a $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger, \text{obs}} = A_2 (E_{\text{TS}_1}^\ddagger + \Delta E_{\text{disp}} + \Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}} + \Delta E_{\text{vib0}}) + const_3$ (ΔE_{disp} : D3(BJ), $\Delta\Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$: CPCM/B3LYP/6-31G(d), ΔE_{vib0} : B3LYP/6-31G(d)).

^b //B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d).

^c In kcal/mol.

表 4.14 異なる DFT 法および基底関数で算出した E_{TS1}^\ddagger の値 (kcal/mol)

Compound		Basis set = 6-31G(d)								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	12.13	12.62	7.05	8.17	12.48	7.39	10.96	10.45	8.45
2	NH ₂	12.44	12.97	7.39	8.32	12.38	7.64	11.11	10.55	8.40
3	CH ₃	11.72	11.92	6.61	7.64	12.23	6.88	10.49	10.46	8.45
4	H	11.65	11.53	6.49	7.66	12.68	6.74	10.49	10.94	9.12
5	Cl	10.79	10.57	5.73	6.83	11.87	5.97	9.73	10.20	8.35
6	CN	9.43	8.75	4.39	5.64	11.09	4.62	8.42	9.33	7.80
7	NO ₂	9.12	8.64	4.19	5.28	10.45	4.38	8.13	8.88	7.14
8	SO ₂ NH ₂	7.97	7.64	3.38	4.59	9.40	3.51	6.67	7.32	5.94
Variance ^a		2.32	3.54	1.94	1.77	1.18	2.07	2.22	1.26	0.87
Compound		Basis set = def2TZVP								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	14.99	15.44	9.97	10.97	14.34	10.08	13.46	12.64	10.98
2	NH ₂	15.39	15.87	10.36	11.19	14.37	10.41	13.72	12.82	11.10
3	CH ₃	14.39	14.57	9.35	10.27	13.99	9.42	12.84	12.46	10.79
4	H	13.92	13.80	8.85	9.91	14.09	8.91	12.45	12.57	11.04
5	Cl	13.12	12.92	8.16	9.15	13.34	8.20	11.77	11.89	10.26
6	CN	11.25	10.64	6.33	7.52	12.13	6.40	9.99	10.58	9.21
7	NO ₂	10.85	10.46	6.04	7.08	11.47	6.06	9.64	10.11	8.55
8	SO ₂ NH ₂	9.26	9.00	4.73	5.92	9.97	4.74	7.71	8.18	7.02
Variance ^a		4.25	5.64	3.66	3.31	2.27	3.73	3.95	2.37	1.93
Compound		Basis set = def2TZVPP								
No.	-X	B3LYP	B97	PBEPBE	TPSSTPSS	BMK	BP86	B3PW91	M06-2X	M11
1	OCH ₃	15.28	15.68	10.24	11.22	14.65	10.37	13.74	12.85	11.47
2	NH ₂	15.65	16.08	10.61	11.42	14.65	10.67	13.98	13.02	11.55
3	CH ₃	14.68	14.82	9.63	10.52	14.30	9.71	13.13	12.68	11.28
4	H	14.23	14.06	9.15	10.18	14.41	9.22	12.76	12.82	11.57
5	Cl	13.44	13.20	8.48	9.44	13.69	8.53	12.09	12.16	10.80
6	CN	11.60	10.94	6.68	7.82	12.51	6.75	10.33	10.90	9.81
7	NO ₂	11.19	10.75	6.37	7.38	11.83	6.40	9.98	10.42	9.11
8	SO ₂ NH ₂	9.61	9.30	5.08	6.22	10.35	5.09	8.06	8.51	7.61
Variance ^a		4.15	5.51	3.55	3.23	2.19	3.63	3.85	2.24	1.82

^a In kcal²/mol².

表 4.15 に $\Delta G_{\text{TS}_1}^\ddagger$, 式 (4.31)に用いたエネルギー項および Hammett σ^- との相関係数 (r)を示す. σ^- は $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ との相関が最も良好であり, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ は置換基効果を強く受けることが示唆される (表 4.15). 当研究室では先行研究において, 分子科学計算を用いて算出した一連の *para*-substituted phenol のラジカル反応の活性化エネルギーと, 古典 QSAR 解析の Hammett σ^+ が良好な相関を持つことを確認しており [180], 本研究も同様に, 活性化エネルギーと Hammett σ^- との相関を確認することができた. 図4.8 より, 電子供与性の置換基を持つ化合物 (Compounds (1–3)) よりも電子吸引性の置換基を持つ化合物 (Compounds (5–8))を導入した方が, $E_{\text{TS}_1}^\ddagger$ が低く, 触媒反応が進行しやすいことがわかり, これは $\Delta G_{\text{TS}_1}^\ddagger$ の変動が σ^- の変動と一致していることを示唆する.

表 4.15 TS₁形成に伴う活性化自由エネルギー変化 ($\Delta G_{\text{TS}_1}^\ddagger$)と各エネルギー代表項ならびに Hammett σ^- との相関係数 (r)

	$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger \text{ obs a}}$	$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger \text{ calc b}}$	$E_{\text{TS}_1}^\ddagger$	ΔE_{disp}	$\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$	ΔE_{vib0}	σ^-
$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger \text{ obs a}}$	1.000	0.938	0.941	-0.802	-0.793	0.883	-0.949
$\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger \text{ calc b}}$	0.938	1.000	0.997	-0.896	-0.849	0.980	-0.918
$E_{\text{TS}_1}^\ddagger$	0.941	0.997	1.000	-0.869	-0.881	0.971	-0.933
ΔE_{disp}	-0.802	-0.896	-0.869	1.000	0.582	-0.937	0.746
$\Delta \Delta G_{\text{sol}}^{\text{polar}}$	-0.793	-0.849	-0.881	0.582	1.000	-0.819	0.837
ΔE_{vib0}	0.883	0.980	0.971	-0.937	-0.819	1.000	-0.850
σ^-	-0.949	-0.918	-0.933	0.746	0.837	-0.850	1.000

^a $\Delta G_{\text{TS}_1}^{\ddagger \text{ obs}} = -RT \ln k_{\text{cat}}$.

^b Calculated from Equation 4.31.

4.3 遷移状態形成に伴うアミノ酸残基の結合相互作用エネルギー変化

節 4.2 における LERE-QSAR 解析の結果, Michaelis–Menten 複合体 (ES 複合体) および TS_1 複合体の変動を良好に再現し, 各エネルギー項の寄与を定量的に確認した. 本節では非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO) 法 [92–95] を用いたフラグメント間相互作用エネルギー (inter-fragment interaction energy; IFIE) 解析 (FMO-IFIE 解析) を trypsin–Compound 4 (X = H) 複合体に対して適用し, その結合相互作用エネルギーの寄与をアミノ酸残基単位で明らかにし, trypsin–Compound 4 複合体の ES および TS_1 における各アミノ酸残基の全エネルギー変化に対する寄与の違いについて議論する.

ES– TS_1 間では Ser195 の O_γ から His57 の N_ϵ に H_γ が移動する single proton transfer (SPT) が起こるため, fragment 分割に際し, H_γ が Ser195 に帰属し, His57 および Ser195 が荷電していない場合と, H_γ が His57 に帰属し, His57 および Ser195 が荷電している場合では解析結果が異なることが予測される. したがって, 本解析の前にモデル構造を用いて FMO fragment 分割の検証を行った.

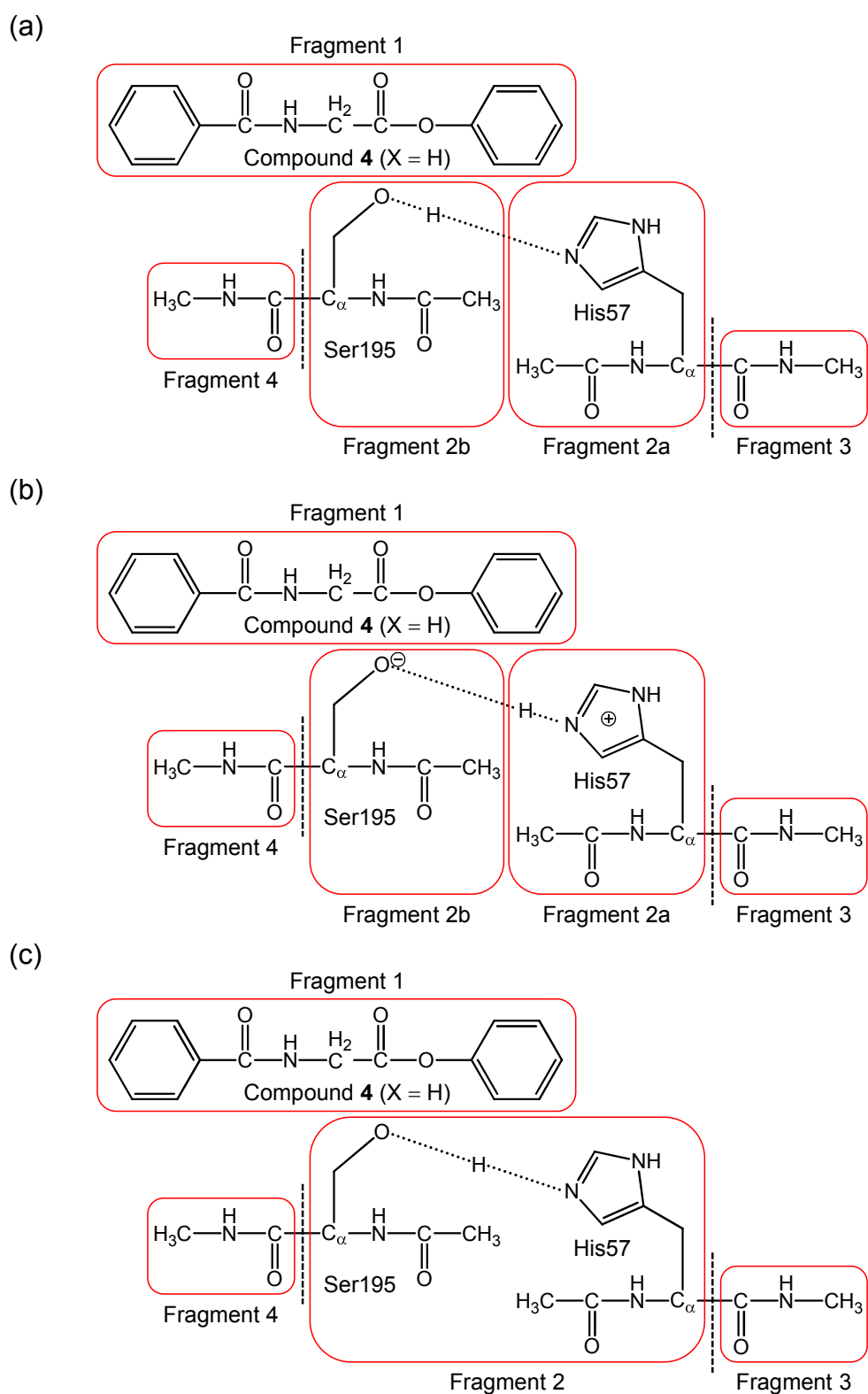
図 4.9 に FMO fragment 分割の検証に用いた 3 種類の FMO fragmentation scheme (a), (b), (c) を示す.

(a) H_γ を Ser195 に帰属した 5 fragmentation scheme (His57 [formal charge = 0], Ser195 [0]).

(b) H_γ を His57 に帰属した 5 fragmentation scheme (His57 [+1], Ser195 [-1]).

(c) His57–Ser195 を 1 fragment とした 4 fragmentation scheme (His57–Ser195 [0]).

上記の 3 種類の fragmentation scheme において, GAMESS [164] の FMO/HF/6-31G(d) レベルでエネルギーを算出し, fragment 分割しない Gaussian 09/HF/6-31G(d) レベルで算出したエネルギーとの比較を行った. 検証の結果, ES, TS_1 とも His57–Ser195 を 1 fragment としたモデル構造 (FMO fragmentation scheme (c)) のエネルギーが, fragment 分割を行わず同一基底関数で算出したエネルギーとの差 (error) が最も小さいことを確認した (表 4.16). 以上より, trypsin–Compound 4 複合体全系 (224 残基) の FMO-IFIE 解析では, His57–Ser195 を 1 fragment として取り扱うことが妥当と判断した.



☒ 4.9 FMO fragmentation scheme

(a) His57 [formal charge = 0] and Ser195 [0], (b) His57 [+1] and Ser195 [-1],
 (c) His57-Ser195 [0].

表 4.16 FMO fragmentation scheme (a), (b), (c)の検証結果

model	Total energy (hartree)		Error (kcal/mol) ^f	
	ES	TS ₁	ES	TS ₁
FMO fragmentation scheme (a) ^{a, d}	-2138.844033	-2138.762530	-0.38	10.28
FMO fragmentation scheme (b) ^{b, d}	-2138.847506	-2138.787473	-2.56	-5.37
FMO fragmentation scheme (c) ^{c, d}	-2138.843864	-2138.780242	-0.27	-0.83
Full structure ^e	-2138.843429	-2138.778914	0.00	0.00

^a 5 FMO fragments, Compound 4 (X = H) || His57 [formal charge = 0] || Ser195 [0] || (His57-)CONHCH₃ || (Ser195-)CONHCH₃ (Figure 4.9 (a)).

^b 5 FMO fragments, Compound 4 (X = H) || His57 [+1] || Ser195 [-1] || (His57-)CONHCH₃ || (Ser195-)CONHCH₃ (Figure 4.9 (b)).

^c 4 FMO fragments, Compound 4 (X = H) || His57-Ser195 [0] || (His57-)CONHCH₃ || (Ser195-)CONHCH₃ (Figure 4.9 (c)).

^d FMO/HF/6-31G(d) level.

^e *Ab initio* MO calculation (Gaussian 09/HF/6-31G(d)) without fragmentations.

^f Total energy (FMO fragment model) – Total energy (Full structure model).

上記, 3 種類の FMO fragmentation scheme における検証結果を参考に, trypsin-Compound 4 複合体 (全 224 残基) の ES, TS₁ のアミノ酸残基を 222 fragment (His57-Ser195 = 1 fragment) に分割し, FMO-IFIE 解析を行った. FMO/HF/6-31G(d) により算出した基質と trypsin 間の結合相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}}(\text{FMO})$) は, 基質と各 fragment 間の IFIE の総和 (ΣIFIE) と良好な線形関係を持つ (式 (4.62), (4.63)).

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{ES}}(\text{FMO}) = 0.687 \Sigma \text{IFIE}^{\text{ES}}(\text{substrate} : \text{trypsin}) + 2.51 \quad (4.62)$$

$n = 8, r = 0.993, s = 0.682 \text{ kcal/mol}$

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{TS}_1}(\text{FMO}) = 0.555 \Sigma \text{IFIE}^{\text{TS}_1}(\text{substrate} : \text{trypsin}) - 0.933 \quad (4.63)$$

$n = 8, r = 0.900, s = 1.85 \text{ kcal/mol}$

ここで, $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{ES}}(\text{FMO})$ および $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{TS}_1}(\text{FMO})$ は, それぞれ FMO/HF/6-31G(d) により算出した ES, TS₁ の ΔE_{bind} であり, $\Sigma \text{IFIE}^{\text{ES}}(\text{substrate} : \text{trypsin})$ および $\Sigma \text{IFIE}^{\text{TS}_1}(\text{substrate} : \text{trypsin})$ は, それぞれ ES, TS₁ の ΣIFIE である. 式 (4.62), (4.63) より, IFIE は $\Delta E_{\text{bind}}(\text{FMO})$ と対応することがわかる. さらに, ONIOM-ME (B3LYP/6-31G(d)//B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d)) 法により算出した結合相互作用エネルギー

ギー ($\Delta E_{\text{bind}}(\text{ONIOM})$)と $\Delta E_{\text{bind}}(\text{FMO})$ の間にも、以下のような良好な線形関係が成立する (式 (4.64), (4.65)).

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{ES}}(\text{FMO}) = 0.935 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{ES}}(\text{ONIOM}) - 2.52 \quad (4.64)$$

$$n = 8, r = 0.960, s = 1.59 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta E_{\text{bind}}^{\text{TS}_1}(\text{FMO}) = 0.938 \Delta E_{\text{bind}}^{\text{TS}_1}(\text{ONIOM}) - 1.63 \quad (4.65)$$

$$n = 8, r = 0.912, s = 1.73 \text{ kcal/mol}$$

ここで、 $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{ES}}(\text{ONIOM})$ および $\Delta E_{\text{bind}}^{\text{TS}_1}(\text{ONIOM})$ は、それぞれ ONIOM-ME 法により算出した ES, TS₁ の ΔE_{bind} である。したがって、IFIE は LERE-QSAR 解析における ΔE_{bind} と対応し、これは IFIE を用いて基質-trypsin 間の結合相互作用エネルギーを定量的に議論できることを意味する。

図 4.10 に Compound 4 と trypsin の各アミノ酸残基との IFIE を示す。図 4.10 (a), (b)ではともに Gln192, Gly193 の IFIE が確認できる。これらは Compound 4 と直接水素結合を形成するアミノ酸残基であり、特に Gly193 の IFIE には oxyanion hole としての安定化の寄与が表れている。また, S1 pocket (図 2.6)の底に位置する Asp189 の安定化の寄与も確認することができる。一方, 図 4.10 (c)では His57-Ser195 の fragment の安定化の寄与しか確認できず, ES-TS₁間で他のアミノ酸残基の寄与が変わらないことがわかる。つまり, ES-TS₁間では Ser195 の O_γ が基質の carbonyl の C₃ に近接し, H_γが His57 へ移動する局所的な変化だけが起こることが示唆される。また, IFIE に HF-D_{tq}法 [165-167]による分散力補正を加えた Compound 4 と trypsin の各アミノ酸残基との IFIE-D_{tq} (= IFIE + 分散相互作用エネルギー (D_{tq}))を図 4.11 に示す。図 4.11 (c)でも His57-Ser195 の fragment の寄与だけが顕著であり, ES-TS₁間における基質の安定化への寄与はこの二残基に局在していることがわかる。よって, 節 4.1.2 および節 4.2.2 で QM 領域のエネルギーのみを用いて議論することは妥当である。

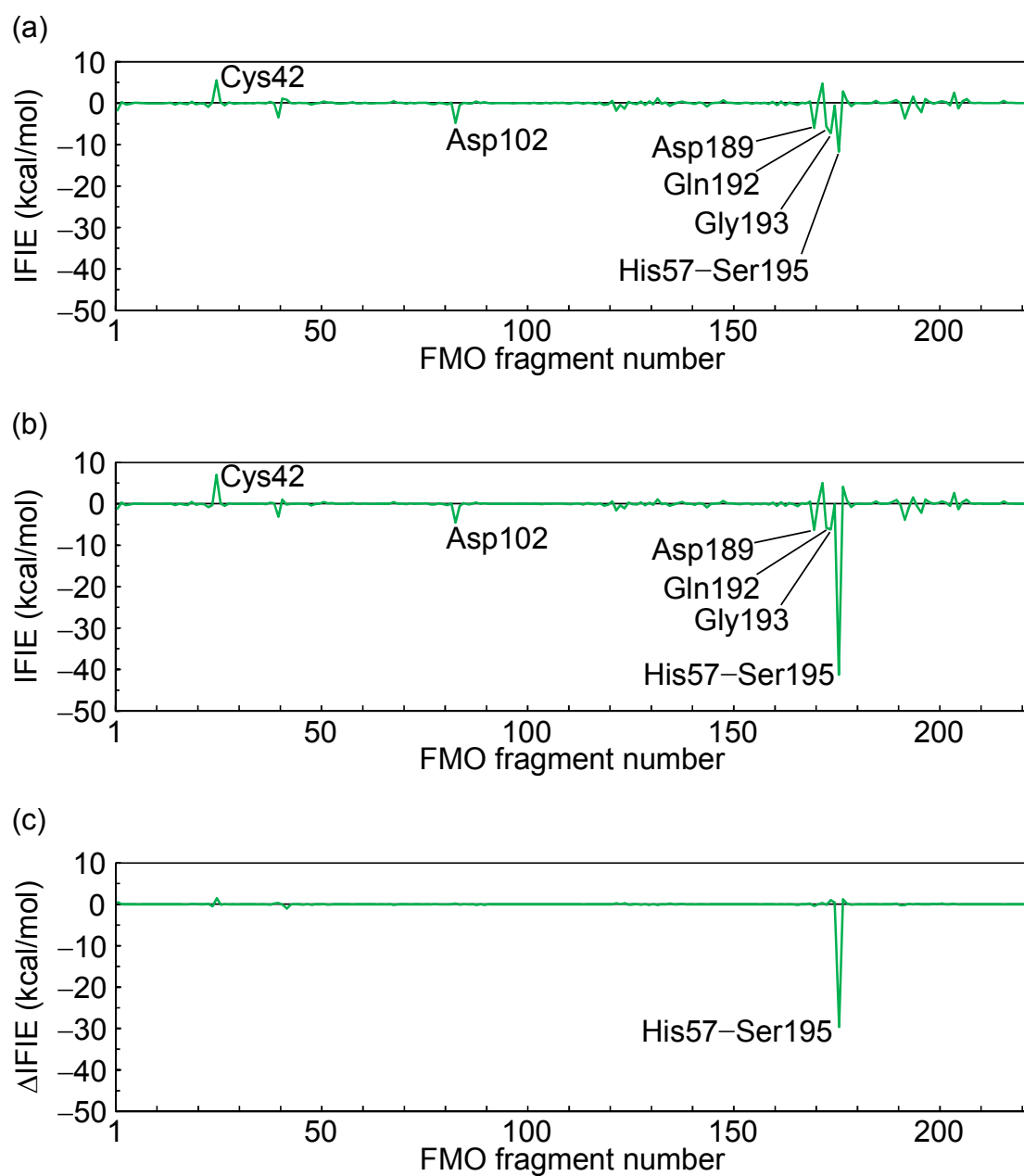


図 4.10 Compound 4 (X = H)と trypsin の各アミノ酸残基との IFIE

(a) ES, (b) TS₁, (c) TS₁ - ES.

His57-Ser195 = 1 fragment. FMO/HF/6-31G(d)で算出したエネルギー.

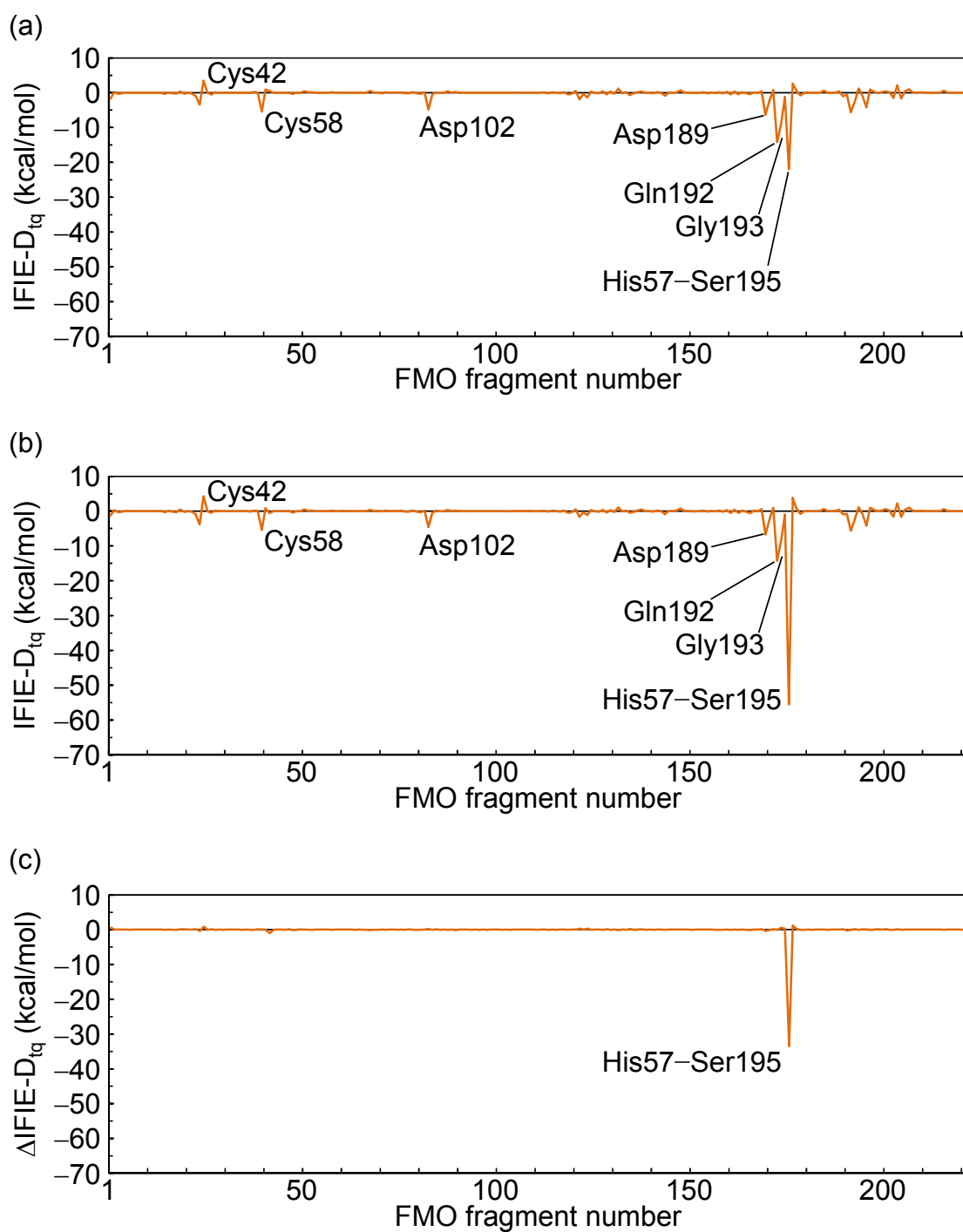


図 4.11 Compound 4 (X = H)と trypsin の各アミノ酸残基との IFIE-D_{tq} (= IFIE + 分散相互作用エネルギー (D_{tq}))
 (a) ES, (b) TS₁, (c) TS₁ - ES. His57-Ser195 = 1 fragment. FMO/HF/6-31G(d)で算出したエネルギーに HF-D_{tq} 法による分散力補正を加えたものである.

4.4 遷移状態構造における古典的定量的構造活性相関解析の記述

子との相関解析

節 2.6 における Selassie ら [143]の報告した古典 QSAR 解析では, 反応速度定数 k_{cat} と Hammett σ^- との間に良好な線形関係 (図 2.19 (b))が成立し, その傾きが正であることから電子吸引基の導入によって触媒反応が加速することが示唆された. σ^- は置換フェノールのプロトン解離の反応速度定数から定義されているにもかかわらず, 酵素反応における古典 QSAR 解析で何故統計的に有意となるかは必ずしも自明ではない. 一方, 節 4.2.2 では速度論的過程に関する LERE-QSAR 解析の結果から, 実測の活性化自由エネルギー変化 ($\Delta G^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$)の変動は活性化エネルギー ($E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$)に支配されること, $E^{\ddagger}_{\text{TS}_1}$ と σ^- との間には線形関係が成立することを述べた. 本節では trypsin による ester 基質の触媒反応において, σ^- が持つ実行的意味を, TS_1 の反応中心の構造パラメータ, 結合次数および原子電荷との関係からより詳細に議論する. 図 4.12 は trypsin-Compounds (1-8)複合体の反応中心近傍の模式図である.

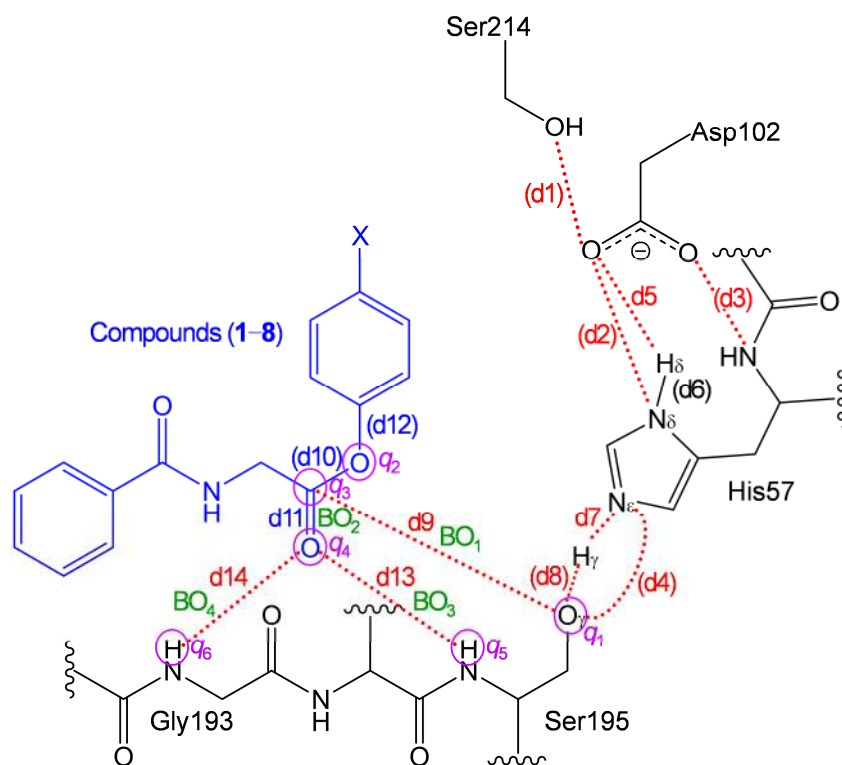


図 4.12 Trypsin-Compounds (1-8)複合体の反応中心近傍の模式図
dX (X = 1-14): 原子間距離, BO_X (X = 1-4): 結合次数, q_X (X = 1-6): 原子電荷.

4.4.1 反応中心の構造パラメータとの相関

図 4.13 に Hammett σ^- と TS_1 における原子間距離 dX ($X = 5, 7, 9, 11, 13, 14$) との相関関係を示す。また、図 4.14 には Hammett σ^- と原子間距離の変化 ΔdX ($= dX(TS_1) - dX(ES)$) との相関関係を示す。His57-Asp102 間の水素結合距離に相当する $d5$ は、節 4.1.3 において single proton transfer (SPT) のメカニズムに従い proton の移動が起こらないことが確認されたが、 σ^- と良好な相関 ($r = 0.855$) があることがわかる (図 4.13 (a))。一方、proton の移動が起こる His57-Ser195 間の $d7$ も σ^- と良好な相関 ($r = 0.890$) があることから、catalytic triad (His57, Asp102, Ser195) 間の proton 移動に置換基効果が反映されていることが示唆される (図 4.13 (b))。これは $\Delta d5$, $\Delta d7$ でも同じ結果が得られる (図 4.14 (a), (b))。 $d9$ は基質が Ser195 から求核攻撃を受ける際の原子間距離であり、電子吸引基を持つ化合物の方が $d9$ の距離が長いことがわかる (図 4.13 (c))。つまり、Ser195 の側鎖の O_7 が基質の carbonyl の C に接近する際、電子吸引基を持つ化合物の方が $d9$ の距離が長い状態で反応障壁を越えることが示唆される。対照的に $d11$ では電子吸引基を持つ化合物の方が短い (図 4.13 (d))。Oxyanion hole の水素結合距離 $d13$, $d14$ は、どちらも σ^- とそれぞれ 0.950, 0.938 の良好な相関を示す (図 4.13 (e), (f))。また、 $d13$ - $d14$ 間の相関も 0.988 であり、 $d13$ と $d14$ は oxyanion hole 内で協奏的に働くと考えられる。ただし、 $\Delta d13$ と $\Delta d14$ の値を比べると、 $\Delta d13$ が大きく、ES から TS_1 へと遷移する過程で Ser195 の主鎖の NH が基質に急激に近づくことが示唆される (図 4.14 (e), (f))。以上より、Hammett σ^- で表される置換基効果は、触媒反応メカニズムに関する重要な原子間距離に影響を及ぼすことが定量的に確認できる。

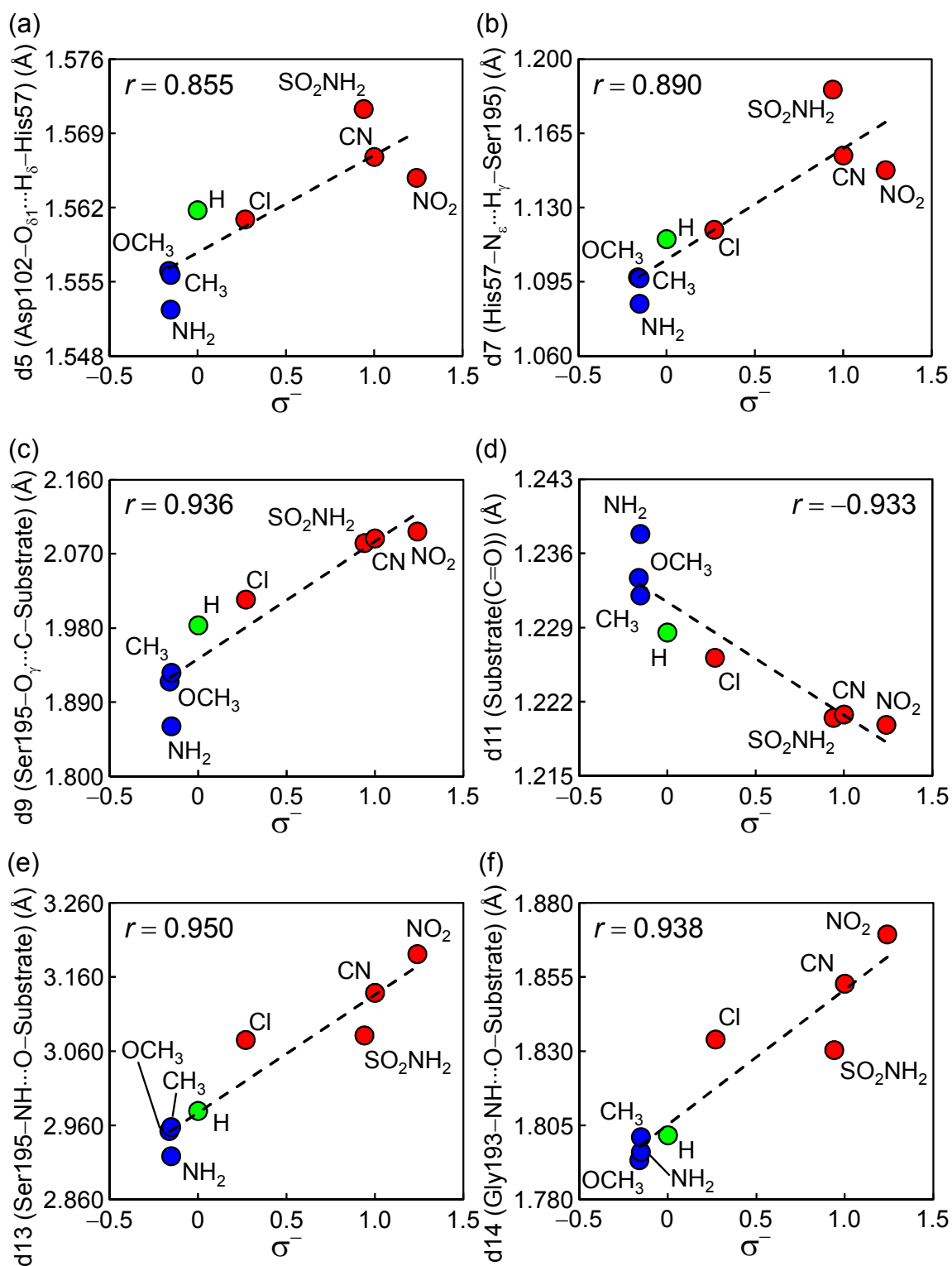


図 4.13 Hammett σ^- と TS₁ における原子間距離 dX との相関関係
 原子間距離 dX ($X = 5, 7, 9, 11, 13, 14$) は図 4.12 と対応する。

赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。

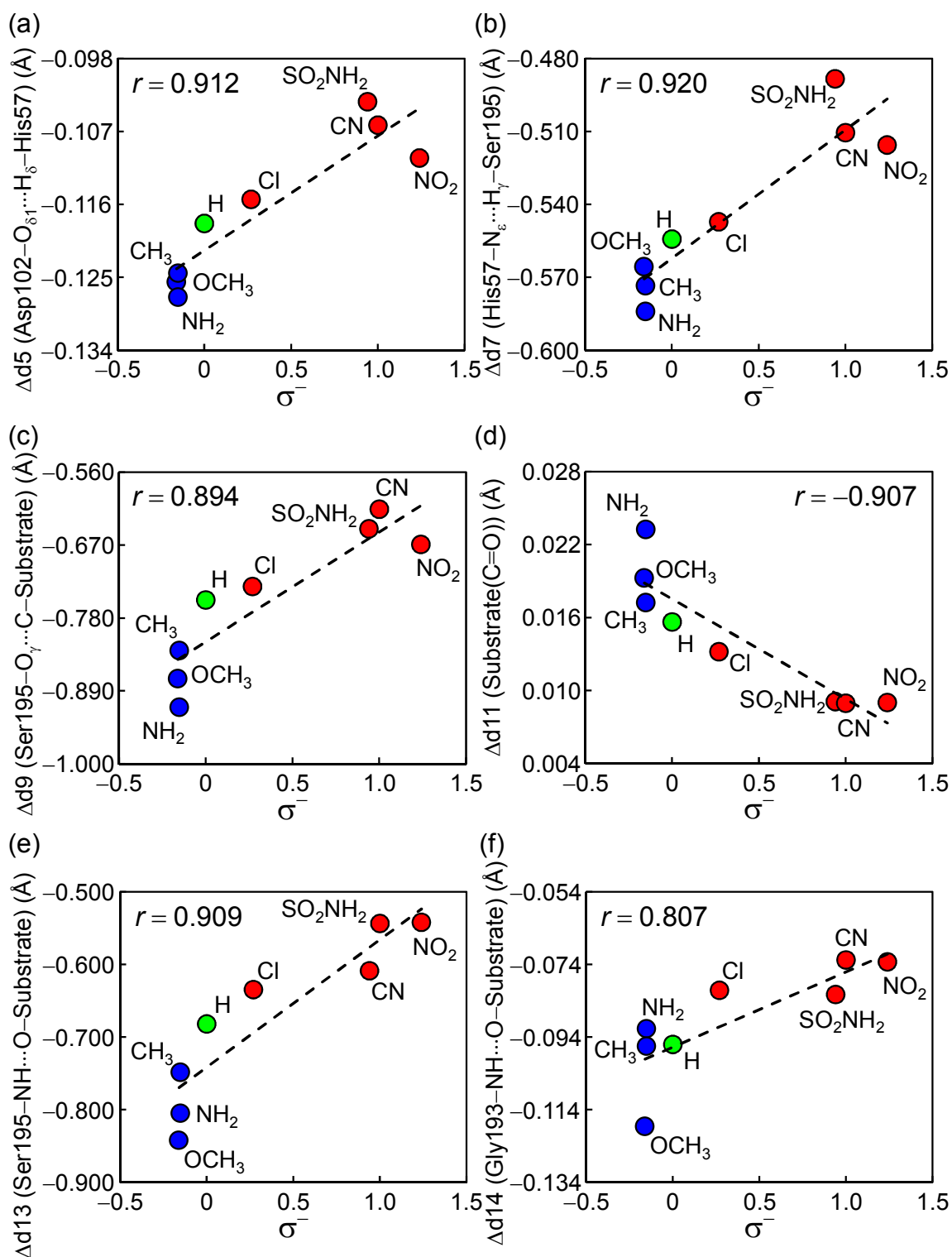


図 4.14 Hammett σ^- と原子間距離の変化 ΔdX との相関関係

原子間距離 dX ($X = 5, 7, 9, 11, 13, 14$) は図 4.12 と対応する。

赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。

4.4.2 結合次数との相関

期待されるように原子間距離と結合次数は関連し、その変化は同じ傾向を示す。図 4.15 に Hammett σ^- と TS_1 における結合次数 BO_X ($X = 1-4$) との相関関係を、図 4.16 には Hammett σ^- と ES- TS_1 間における結合次数の変化 $\Delta BO_X (= BO_X(TS_1) - BO_X(ES))$ との相関関係を示す。 BO_1 は Ser195 の側鎖の O_γ が基質の carbonyl の C に求核攻撃する O_γ -C 間の結合次数であり、 σ^- と良好な相関 ($r = -0.920$) があることから置換基効果の影響を強く受けることが示唆される (図 4.15 (a))。 BO_1 の値は電子供与基を持つ化合物が大きく、Ser195- $O_\gamma \cdots C$ -Substrate の結合が強いことが示唆され、これは電子供与基を持つ化合物は原子間距離 d_9 が短いという結果と一致する (図 4.13 (c))。 また、 BO_1 の値は 0.24-0.40 程度であることから、 TS_1 では完全には Ser195 と基質の間に共有結合が形成されていないと考えられる。ただし、 ΔBO_1 の値は正であり、ES から TS_1 へと遷移する過程で結合が強固になることが確認でき、これは触媒反応メカニズムに一致する (図 4.16 (a))。 BO_2 は基質の carbonyl 部位の結合次数であり、 σ^- と良好な相関 ($r = 0.953$) があり、電子吸引基を持つ化合物ほど結合が強いことがわかる (図 4.15 (b))。 Oxyanion hole を形成する BO_3 , BO_4 はいずれも σ^- と良好な相関がある (図 4.15 (c), (d))。 BO_3 , BO_4 の値はどちらも電子供与基を持つ化合物が、電子吸引基を持つ化合物より大きく、 TS_1 では電子供与基を持つ化合物の方が、oxyanion hole において trypsin と強い水素結合を形成していることがわかる。 また、電子供与基を持つ化合物の変化が大きいことが確認できる (図 4.16 (c), (d))。 以上より、Hammett σ^- と ES および TS_1 における結合次数の関係性を調べることで、 TS_1 の結合状態を確認するとともに、置換基効果の結合に及ぼす影響を定量的に解析することができた。

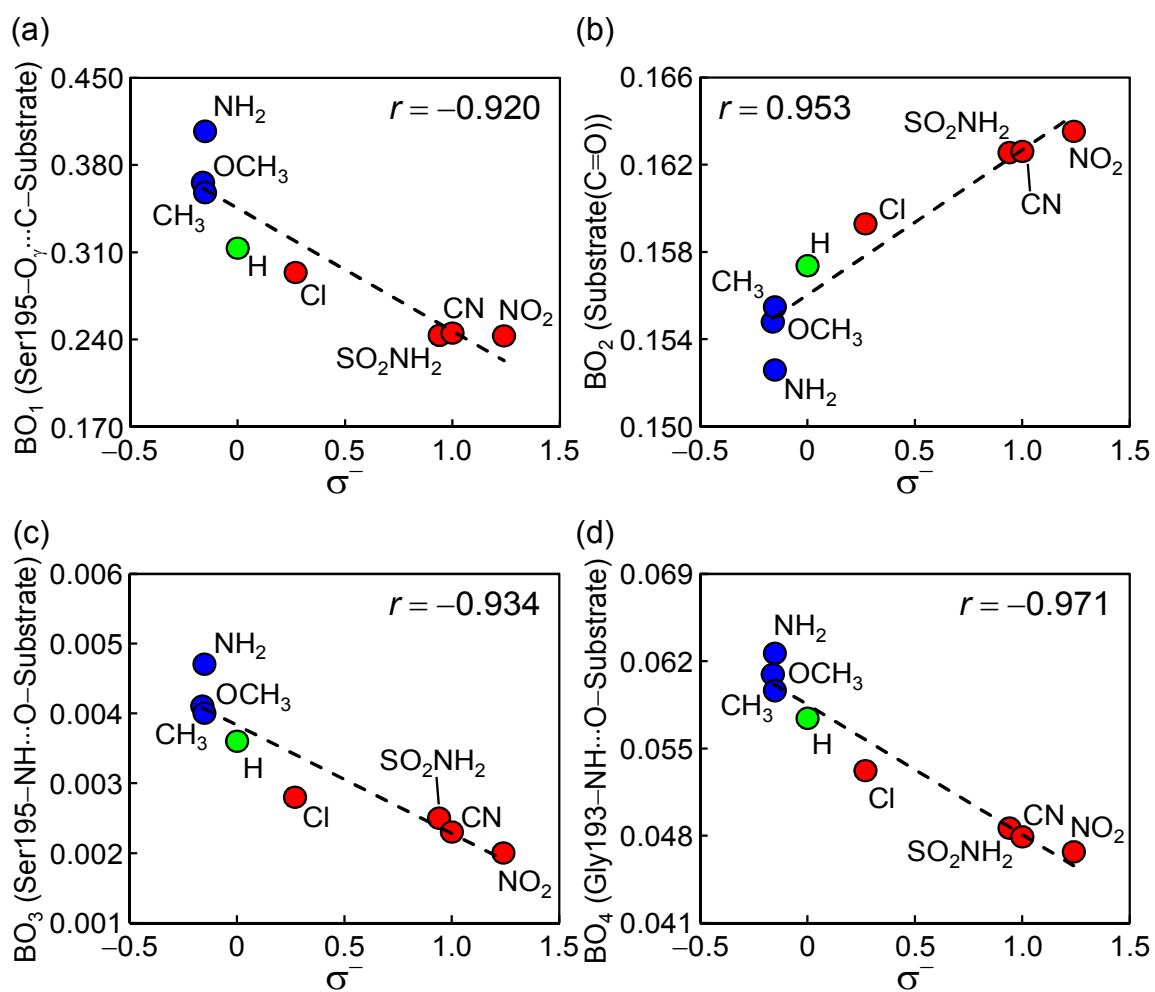


図 4.15 Hammett σ^- と TS₁ における結合次数 BO_X との相関関係

結合次数 BO_X ($X = 1-4$) は図 4.12 と対応する。

赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。

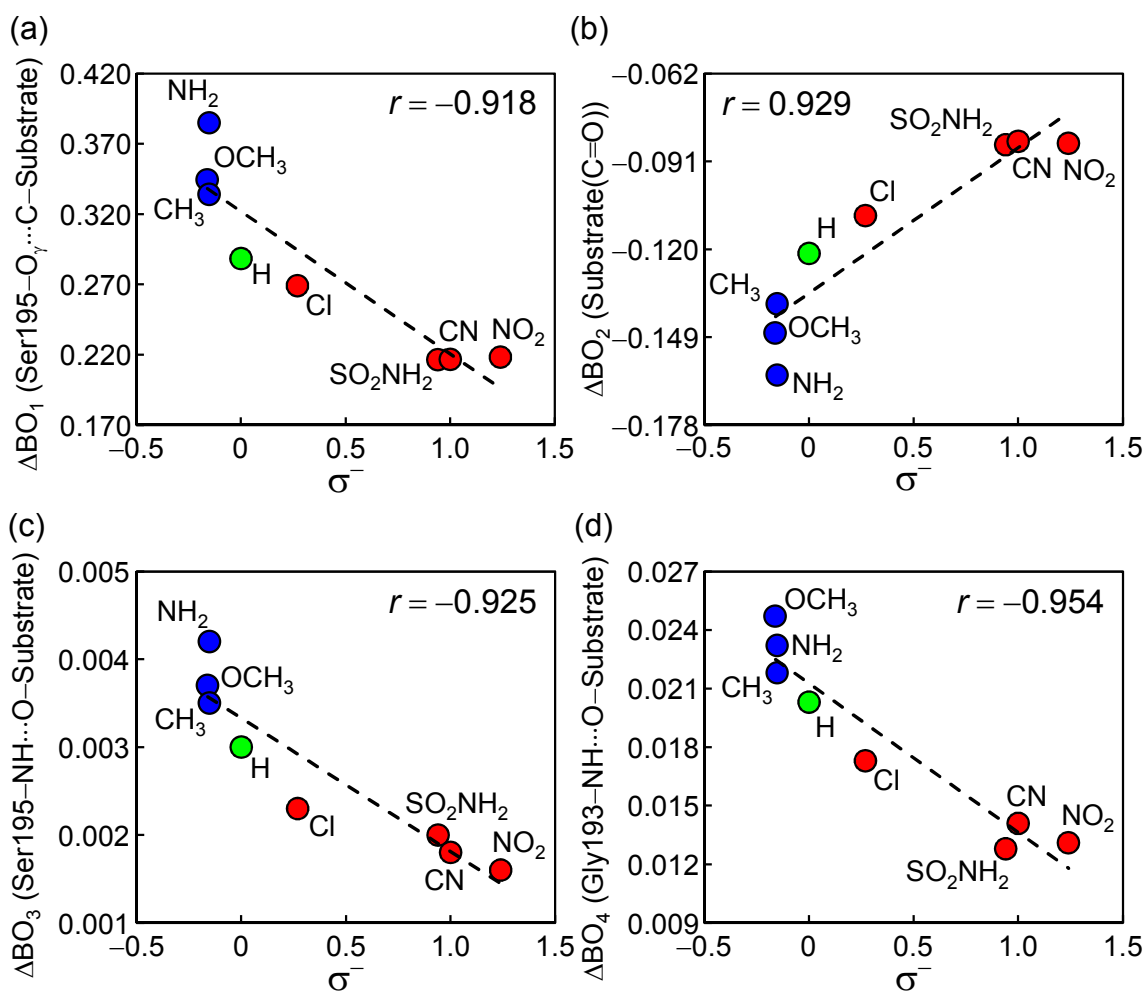


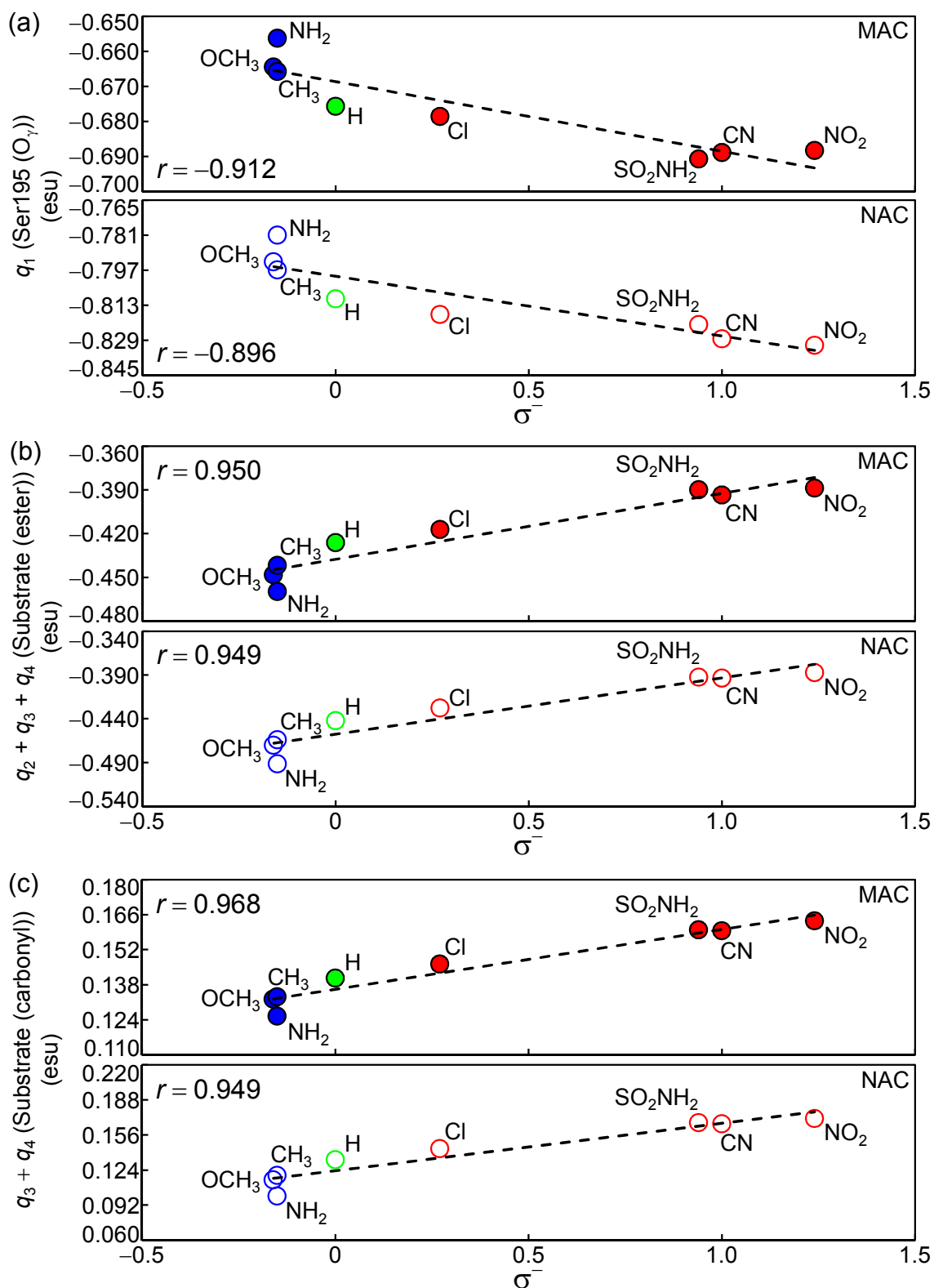
図 4.16 Hammett σ^- と結合次数の変化 ΔBO_x との相関関係

結合次数 BO_x ($X = 1-4$) は図 4.12 と対応する。

赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。

4.4.3 原子電荷との相関

図 4.17 に Hammett σ^- と原子電荷 q_X ($X = 1-6$) との相関関係を示す。また、図 4.18 に ES-TS₁ 間における Hammett σ^- と原子電荷の変化 $\Delta q_X (= q_X(\text{TS}_1) - q_X(\text{ES}))$ との相関関係を示す。原子電荷として Mulliken atomic charge (MAC) および natural atomic charge (NAC) [181] の二種類を算出した。Ser195 の O_γ 部分の電荷 (q_1) は σ^- と良好な相関があり (MAC ($r = -0.912$), NAC (-0.896)), TS₁ で負電荷を帯びている (図 4.17 (a))。 q_1 では電子吸引基を持つ化合物の方が電子供与基を持つ化合物より負電荷を強く帯びていることが確認でき、求核攻撃性が強いことがわかる。一方、 Δq_1 の値から ES-TS₁ 間では電子供与基を持つ化合物の電荷移動量が大きいことが示唆される (図 4.18 (a))。 TS₁ における基質の ester 部位の電荷 ($q_2 + q_3 + q_4$) は σ^- と良好な相関があり (MAC (0.950), NAC (0.949)), これは基質の carbonyl 部位の電荷 ($q_3 + q_4$) でも同じである (MAC (0.968), NAC (0.949)) (図 4.17 (b), (c))。ただし、ester 部位が負電荷を帯びているのに対し、carbonyl 部位は正電荷を帯びており、どちらも電子供与基を持つ化合物の電荷移動量が大きい (図 4.18 (b), (c))。 Oxyanion hole を形成する基質の carbonyl 部位の O の電荷 (q_4) は負電荷、Ser195 の主鎖 amide H の電荷 (q_5) および Gly193 の主鎖 amide H の電荷 (q_6) は正電荷であり、いずれも TS₁ において σ^- と良好な相関がある ((図 4.17 (d)-(f)))。以上より、TS₁ の原子電荷および ES-TS₁ 間の電荷移動量は、Hammett σ^- の置換基効果に影響を受けることがわかった。



(Continued)

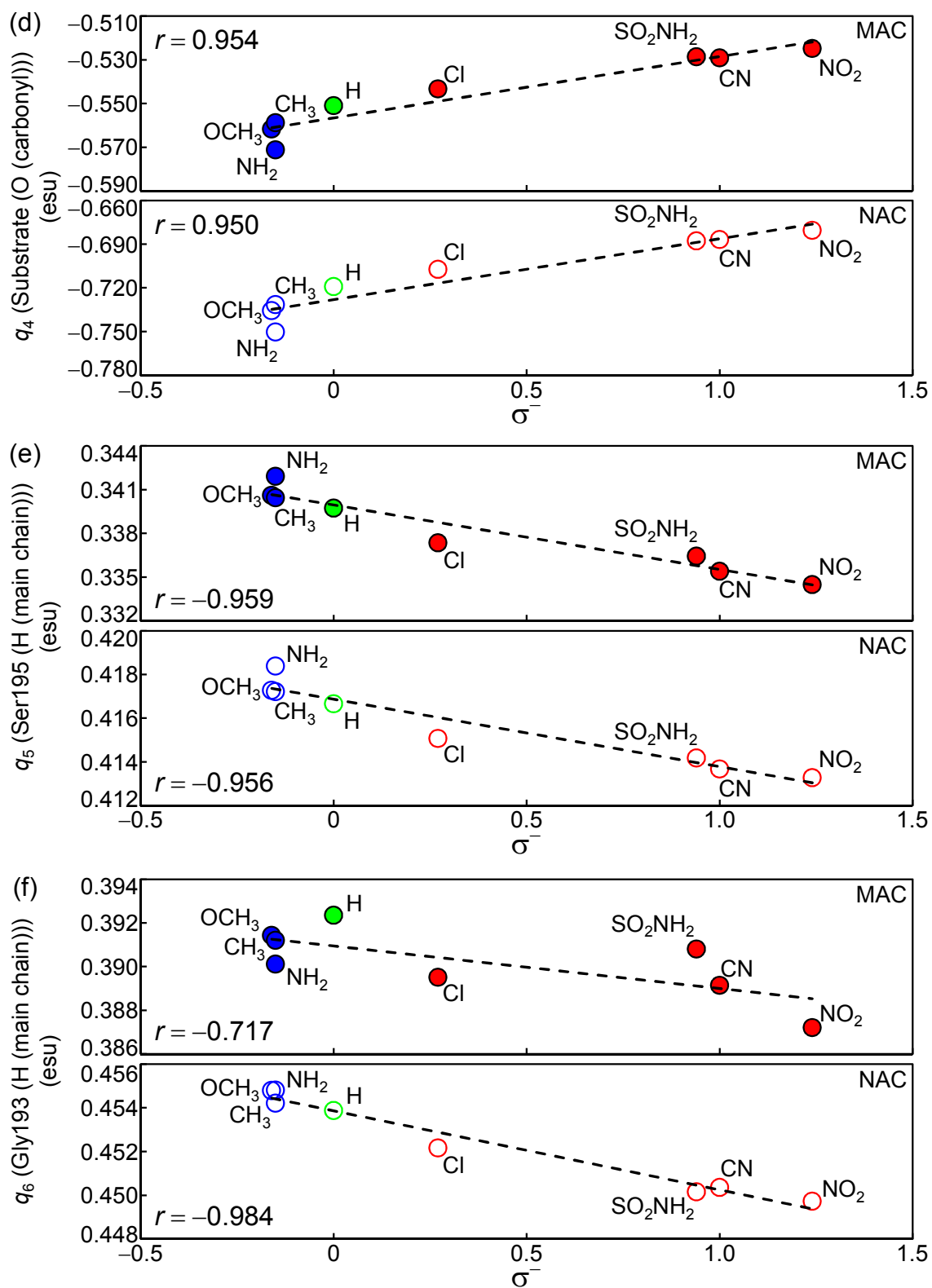
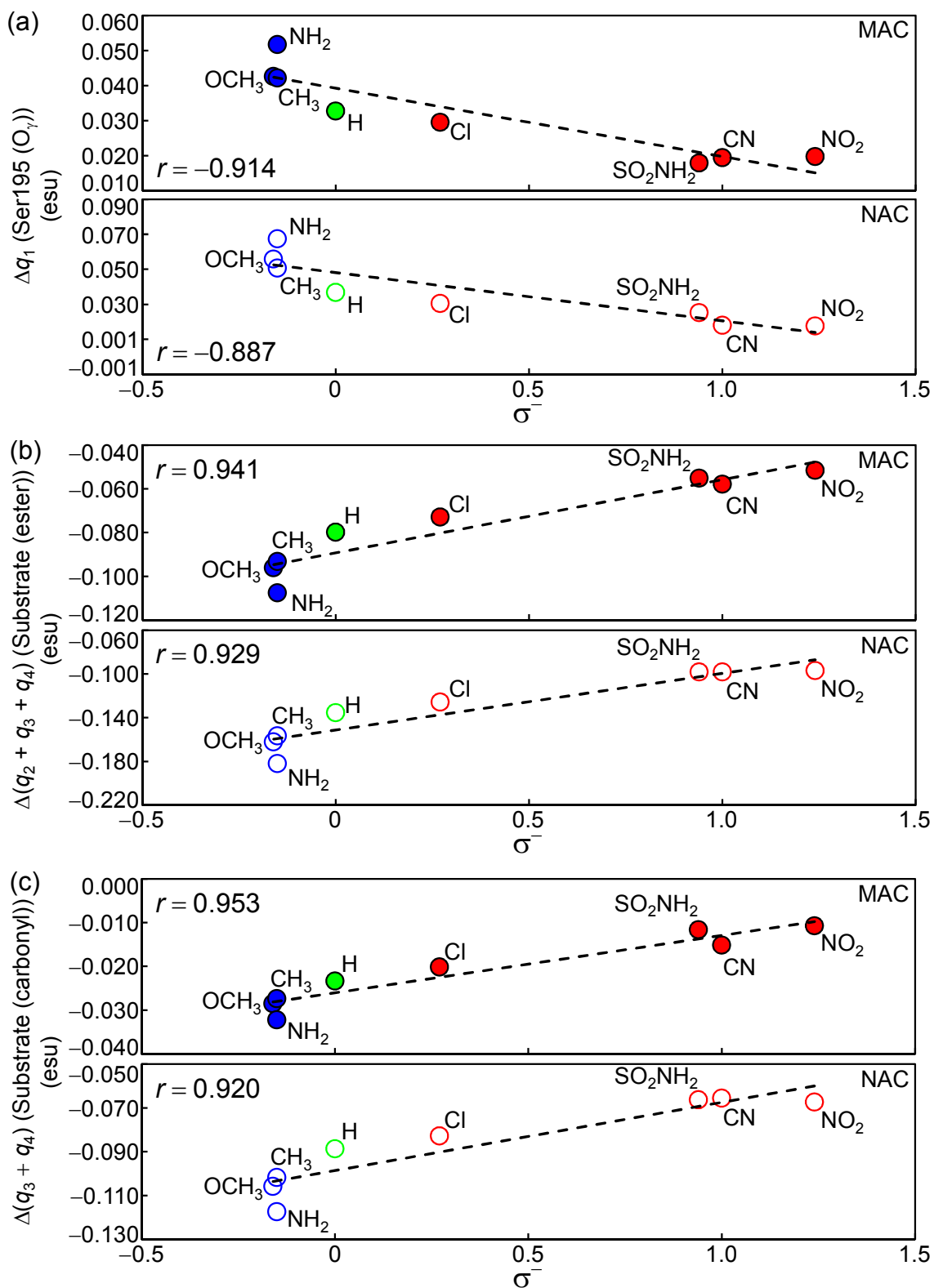


図 4.17 Hammett σ^- と TS₁ における原子電荷 q_X との相関関係
 原子電荷 q_X ($X = 1-6$) は図 4.12 と対応する。
 赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。



(Continued)

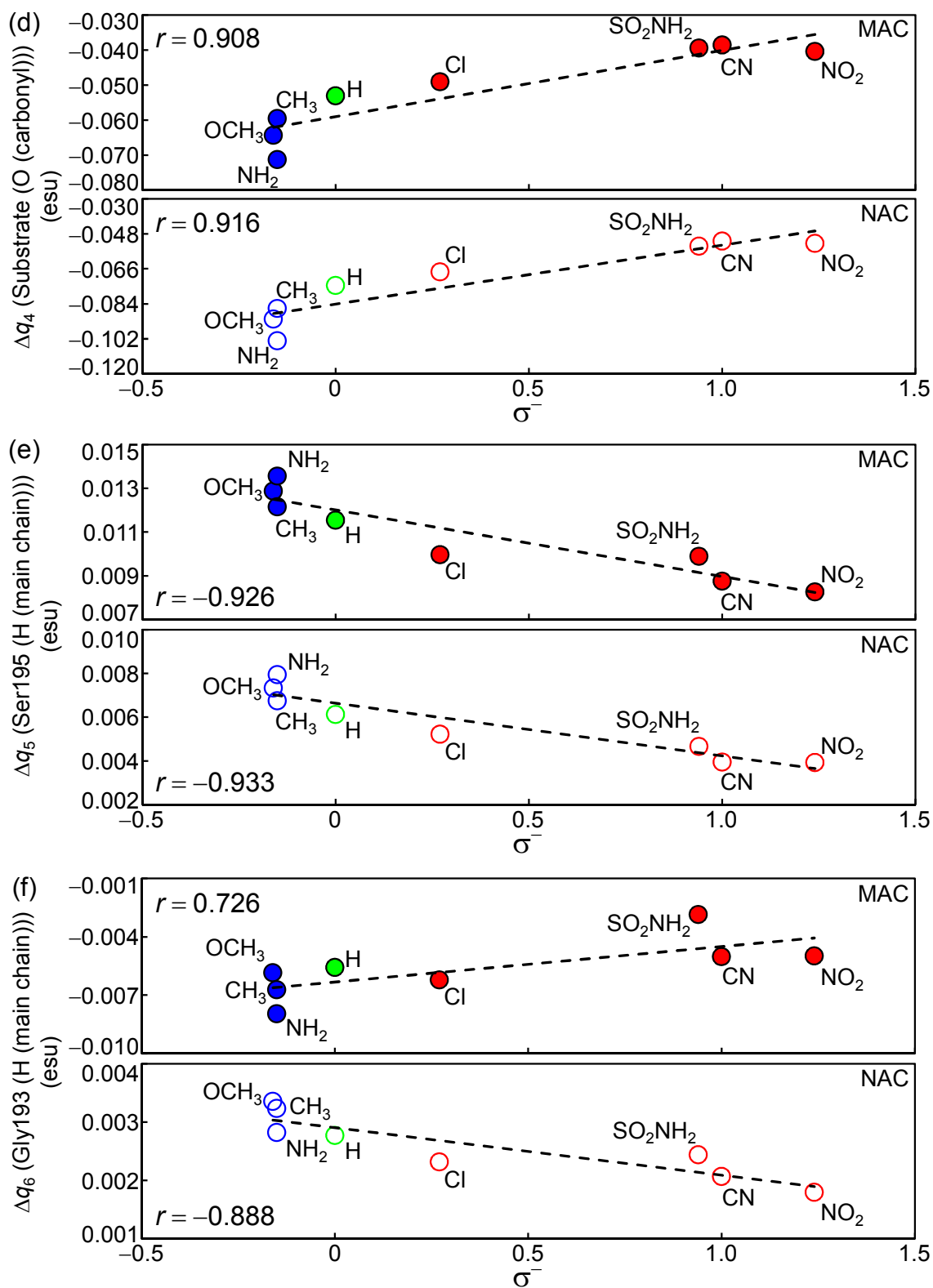


図 4.18 Hammett σ^- と原子電荷の変化 Δq_X との相関関係

原子電荷 q_X ($X = 1-6$) は図 4.12 と対応する。

赤: 電子吸引基, 青: 電子供与基, 緑: 無置換体。

節 4.4.1–4.4.3 において, Hammett σ^- が trypsin-*para*-置換馬尿酸フェニルエステル (*para*-substituted HPE) 複合体構造の分子科学計算から求めた種々のパラメータと線形関係にあることを確認した. すなわち, σ^- の電子効果が trypsin-各基質間の原子間距離, 結合次数および原子電荷に反映され, 電子吸引性の置換基を持つ化合物は反応中心からやや遠距離にもかかわらず, 基質中の carbonyl 部位の求電子性が高まることで, Ser195 側鎖から求核攻撃を受けやすくなるために小さな E_{TS1}^\ddagger を示すことが示唆される. 以上より, 複合体構造に基づき σ^- の持つ物理化学的意味を触媒メカニズムの観点からより明瞭に解釈することができた.

第5章 総括

創薬化学の開発ターゲットが天然物由来のものから、生体機能に基づいた化合物へと遷移し、遺伝子情報に基づいた医薬品開発を主流とするいわゆる「ゲノム創薬時代」を迎えたことで、創薬化学は著しい発展を遂げた。また、コンピューター技術の飛躍的な進歩は、標的タンパク質などの立体構造情報に立脚した創薬を推進し、*in silico* 創薬における分子科学計算・シミュレーションなどの計算手法による高速かつ高精度な薬理活性予測を可能にした。しかしながら、現在、新薬開発にかかる莫大な費用と開発期間の長期化が深刻な問題となっており、創薬化学の新たな論理的方法論の確立による有効・安全かつ迅速な新薬開発が望まれる。

我々は新薬開発で数々の成功実績がある定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship; QSAR) に、分子科学計算・シミュレーションを組み入れた新規 QSAR 解析 (linear expression by representative energy terms (LERE)-QSAR 解析) を提案し、様々な阻害剤-タンパク質系において検証を行ってきた。そして、LERE-QSAR 解析は一連の阻害剤の結合自由エネルギー変化の変動を定量的に解析し、結合メカニズムを原子・電子レベルで説明可能であることを確認した。ただし、従来の LERE-QSAR 解析の検証範囲は薬物が受容体に結合する平衡過程に限定されていたため、基質のように結合後にさらに分解を受ける遷移状態 (transition state; TS) を包括した速度論的過程における有用性は確認されていなかった。

そこで本研究では、LERE-QSAR 解析を結合後の化学反応を伴う基質-タンパク質系に対して初めて適用し、酵素触媒反応の Michaelis-Menten 複合体 (酵素-基質 (ES) 複合体) 形成過程および速度論的過程のそれぞれにおける分子間相互作用を原子・電子レベルで定量的に解析することを試みた。これにより、方法論の適用範囲を検証するとともに、生体酵素 trypsin の触媒反応メカニズムを体系的かつ明瞭に理解することを目的とした。

まず、trypsin と同族体の基質である一連の *para*-substituted hippuric acid phenyl ester (HPE) ($n = 8$) との触媒反応の acylation 過程における構造および自由エネルギー変化のプロファイルを構築し、trypsin の触媒反応の律速段階 (速度論的過程) の同定を行った。次に、LERE-QSAR 解析を用いて、Michaelis-Menten 複合体形成過程および速度論的過程のそれぞれにおける実測の自由エネルギー変化の変動を再現した。そして、触媒反応をより詳細に解析するために、LERE-QSAR 解析に用いたエネルギー代表項をアミノ酸残基単位に分割した。さらに、古典 QSAR 式に用いられた Hammett σ^- の物理化学的意味を trypsin と基質との分子間

相互作用の観点から理解するために、速度論的過程に関して、 σ^- と分子科学計算により得られたパラメータとの相関解析を行った。

本研究によって得られた成果を以下に記載する。

- ① 古典力学-量子化学 hybrid 法によって、trypsin-Compound 4 (X = H)複合体の acylation 過程におけるエネルギーダイアグラムを構築した結果、第一の遷移状態 (TS₁)が形成される過程が律速段階であり、この結果は計算理論の方法に因らず、かつ他の化合物を用いた場合においても統一的に同様の結果を与えることを確認した。
- ② ES 複合体形成後の触媒反応に関して、catalytic triad (His57, Asp102, Ser195)では His57-Ser195 間でのみ proton 移動が起こっていた。したがって、本研究結果は、double proton transfer (DPT)仮説や low barrier hydrogen bond (LBHB)仮説に則さず、single proton transfer (SPT)仮説に則することを確認した。
- ③ Trypsin-Compounds (1-8) 複合体に対する LERE-QSAR 解析の結果、Michaelis-Menten 複合体形成過程および速度論的過程の全自由エネルギー変化 (ΔG_{ES} および $\Delta G_{TS_1}^\ddagger$)の実測値をそれぞれ誤差 ~ 0.14 , ~ 0.17 kcal/mol 以内で極めて高い化学的精度で再現することができた。この結果はエネルギー代表項の算出法の違いや BSSE (basis set superposition error)補正の有無に関係なく同じであった。また、 $\Delta G_{TS_1}^\ddagger$ のエネルギー支配項が活性化エネルギー ($E_{TS_1}^\ddagger$)であることを特定した。
- ④ LERE-QSAR 解析に用いた trypsin-Compound 4 (X = H)複合体に対して非経験的フラグメント分子軌道 (*ab initio* fragment molecular orbital; FMO)法による電子的な相互作用エネルギーの各アミノ酸残基への分割解析を行った結果、基質への安定化の寄与は His57 および Ser195 が顕著であり、ES-TS₁間ではこの二残基が最も基質の安定化に寄与していることがわかった。これは、Hartree-Fock (HF)法に対する新たな分散力補正法 (HF-D_{1q}法)を用い、分散相互作用エネルギーを各アミノ酸残基に分割し、電子的な相互作用エネルギーに加えた場合も同じであった。
- ⑤ 古典 QSAR 式の説明変数に用いられた Hammett σ^- が、分子科学計算を用いて算出した trypsin-Compounds (1-8)複合体の反応中心の原子間距離、結合次数および原子電荷と線形関係にあることを確認し、 σ^- の持つ物理化学的意味を明らかにした。

以上より、本研究では分子科学計算・シミュレーションを活用した新規 QSAR 解析である LERE-QSAR 解析によって、trypsin (酵素)-*para*-substituted HPE (基質)間の触媒反応における Michaelis-Menten 複合体形成過程および速度論的過程そ

それぞれの結合自由エネルギー変化の変動を原子・電子レベルで解析し、その反応メカニズムの新たな知見を得ることができた。LERE-QSAR 解析の応用は酵素触媒反応研究における新しい体系的な方法論の一つとして期待される。Trypsin が属する serine protease family では、タンパク質を構成するアミノ酸配列はそれぞれ異なるものの、その活性部位はほとんどが共通であり、今回の研究から得られた知見は他の serine protease に応用できると考えられる。現在、serine protease の阻害剤は C 型肝炎の治療薬などに用いられているが、タンパク質の変異による薬剤耐性の出現や、膨大な開発コストによる薬価の高騰が問題となっている。よって、LERE-QSAR 解析を含めた新たな方法論がこれらの問題を解決する端緒になることを期待する。

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、時に厳しく、時に優しく、懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を賜りました、徳島大学 恩師 中馬 寛 名誉教授に心より感謝の意を表するとともに、先生の益々の御発展と御多幸をお祈り申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、良き理解者として長きにわたり御指導、御助言を頂きました、徳島大学大学院 医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 吉田 達貞 助教に深く感謝致します。先生の益々の御活躍と御健康をお祈り申し上げます。

博士後期課程において、就業しながら本研究を遂行する機会を賜りました、株式会社ボン・アーム 代表取締役 三谷 芳広 社長、そして、スタッフの皆様に深く感謝致します。

最後に、9年半もの長きにわたる学生生活において、不断の経済的援助ならびに終始暖かく見守って下さいました両親および家族、そして友人その他の方々に心より感謝致します。

2016年6月
馬島 彬

引用文献

- [1] Tyndall, J. D. A.; Nall, T.; Fairlie, D. P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 973–999.
- [2] Drag, M.; Salvesen, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 690–701.
- [3] Rakashanda, S.; Rana, F.; Rafiq, S.; Masood, A.; Amin, S. Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *7*, 90–101.
- [4] López-Otín, C.; Bond, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 30433–30437.
- [5] Deu E.; Verdoes, M.; Bogoyo, M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 9–16.
- [6] Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [7] Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 785–799.
- [8] Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459–4488.
- [9] Han, W. G.; Tajkhorshid, E.; Suhai, S. QM/MM study of the active site of free papain and of the NMA-papain complex. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1999**, *16*, 1019–1032.
- [10] Noble, M. A.; Gul, S.; Verma, C. S.; Brocklehurst, K. Ionization characteristics and chemical influences of aspartic acid residue 158 of papain and caricain determined by structure-related kinetic and computational techniques: multiple electrostatic modulators of active-centre chemistry. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 723–733.
- [11] Mladenovic, M.; Fink, R. F.; Thiel, W.; Schirmeister, T.; Engels, B. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8696–705.
- [12] Wei, D.; Huang, X.; Liu, J.; Tang, M.; Zhan, C. G. Reaction pathway and free energy profile for papain-catalyzed hydrolysis of *N*-acetyl-Phe-Gly 4-nitroanilide. *Biochemistry* **2013**, *52*, 5145–5154.
- [13] Paasche, A.; Zipper, A.; Schäfer, S.; Ziebuhr, J.; Schirmeister, T.; Engels, B.

- Evidence for substrate binding-induced zwitterion formation in the catalytic Cys–His dyad of the SARS-CoV main protease. *Biochemistry* **2014**, *53*, 5930–5946.
- [14] Rawlings, N. D.; Waller, M.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D503–D509.
- [15] Yousef, G. M.; Elliott, M. B.; Kopolovic, A. D.; Serry, E.; Diamandis, E. P. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.* **2004**, *1698*, 77–86.
- [16] Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501–4523.
- [17] Page, M. J.; Cera, E. D. Serine proteases. *eLS* **2007**, DOI: 10.1002/9780470015902.a0005902.pub2.
- [18] Whitcomb, D. C.; Lowe, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* **2007**, *52*, 1–17.
- [19] Heutinck, K. M.; ten Berge, I. J. M.; Hack, C. E.; Hamann, J.; Rowshani, A. T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol. Immunol.* **2010**, *47*, 1943–1955.
- [20] Hirota, M.; Ohmuraya, M.; Baba, H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *J. Gastroenterol.* **2006**, *41*, 832–836.
- [21] Perni, R. B.; Almquist, S. J.; Byrn, R. A.; Chandorkar, G.; Chaturvedi, P. R.; Courtney, L. F.; Decker, C. J.; Dinehart, K.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Heiser, A.; Kalkeri, G.; Kolaczkowski, E.; Lin, K.; Luong, Y. P.; Rao, B. G.; Taylor, W. P.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; Wei, Y.; Kwong, A. D.; Lin, C. Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 899–909.
- [22] Aghemo, A.; De Francesco, R. New horizons in hepatitis C antiviral therapy with direct-acting antivirals. *Hepatology* **2013**, *58*, 428–438.
- [23] Bauer, K. A.; Hawkins, D. W.; Peters, P. C.; Petitou, M.; Herbert, J. M.; van Boeckel, C. A. A.; Meuleman, D. G. Fondaparinux, a synthetic pentasaccharide: the first in a new class of antithrombotic agents—The selective factor Xa inhibitors. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2002**, *20*, 37–52.
- [24] Garcia, D.; Libby, E.; Crowther, M. A. The new oral anticoagulants. *BLOOD* **2010**, *115*, 15–20.
- [25] Yeh, C. H.; Fredenburgh, J. C.; Weitz, J. I. Oral direct factor Xa inhibitors. *Circ.*

Res. **2012**, *111*, 1069–1078.

- [26] Siezen, R. J.; Leunissen, J. A. M. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 501–523.
- [27] Maurer, K. H. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 330–334.
- [28] Polgár, L. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2161–2172.
- [29] Ekici, Ö. D.; Paetzel, M.; Dalbey, R. E. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein Sci.* **2008**, *17*, 2023–2037.
- [30] Masuda, Y.; Nitantai, Y.; Mizutani, R.; Noguchi, S. Crystal structure of 6-guanidinohexanoyl trypsin near the optimum pH reveals the acyl-enzyme intermediate to be deacylated. *Proteins* **2013**, *81*, 526–530.
- [31] Helland, R.; Czapinska, H.; Leiros, I.; Olufsen, M.; Otlewski, J.; Smalås, A. O. Structural consequences of accommodation of four non-cognate amino acid residues in the S1 pocket of bovine trypsin and chymotrypsin. *J. Mol. Biol.* **2003**, *333*, 845–861.
- [32] Tamura, Y.; Hirado, M.; Okamura, K.; Minato, Y.; Fujii, S. Synthetic inhibitors of trypsin, plasmin, kallikrein, thrombin, C1r-, and C1 esterase. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *484*, 417–422.
- [33] Fujii, S.; Hitomi, Y. New synthetic inhibitors of C1r, C1 esterase, thrombin, plasmin, kallikrein and trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *661*, 342–345.
- [34] Ohnishi, H.; Kosuzume, H.; Ashida, Y.; Kato, K.; Honjo, I. Effects of urinary trypsin inhibitor on pancreatic enzymes and experimental acute pancreatitis. *Dig. Dis. Sci.* **1984**, *29*, 26–32.
- [35] Meyer, E.; Cole, G.; Radhakrishnan, R.; Epp, O. Structure of native porcine pancreatic elastase at 1.65 Å resolution. *Acta Crystallogr. B* **1988**, *44*, 26–38.
- [36] McGrath, M. E.; Vásquez, J. R.; Craik, C. S.; Yang, A. S.; Honig, B.; Fletterick, R. J. Perturbing the polar environment of Asp102 in trypsin: consequences of replacing conserved Ser214. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3059–3064.
- [37] Bobofchak, K. M.; Pineda, A. O.; Mathews, F. S.; Cera, E. D. Energetic and structural consequences of perturbing Gly-193 in the oxyanion hole of serine proteases. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25644–25650.
- [38] Petrillo, T.; O’Donohoe, C. A.; Howe, N.; Malthouse, J. P. G. Importance of tetrahedral intermediate formation in the catalytic mechanism of the serine proteases chymotrypsin and subtilisin. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6164–6170.
- [39] Kawai, Y.; Matsuo, T.; Ohno, A. Kinetic study on conformational effect in

- hydrolysis of *p*-nitroanilides catalyzed by α -chymotrypsin. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **2000**, *2*, 887–891.
- [40] Blow, D. M.; Birktoft, J. J.; Hartley, B. S. Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin. *Nature* **1969**, *221*, 337–340.
- [41] Hunkapiller, M. W.; Smallcombe, S. H.; Whitaker, D. R.; Richards, J. H. Carbon nuclear magnetic resonance studies of the histidine residue in α -lytic protease. Implications for the catalytic mechanism of serine proteases. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4732–4743.
- [42] Hunkapiller, M. W.; Forgacs, M. D.; Richards, J. H. Mechanism of action of serine proteases: tetrahedral intermediate and concerted proton transfer. *Biochemistry* **1976**, *15*, 5581–5588.
- [43] Gordon, L. A. Theoretical calculations on an acetic acid, 5-methylimidazole, methanol hydrogen bond network: a model charge relay system. *J. Theor. Biol.* **1974**, *46*, 101–109.
- [44] Scheiner, S.; Kleier, D. A.; Lipscomb, W. N. Molecular orbital studies of enzyme activity: I: Charge relay system and tetrahedral intermediate in acylation of serine proteinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1975**, *72*, 2606–2610.
- [45] Umeyama, H.; Imamura, A.; Nagata, C. A molecular orbital study on the enzymic reaction mechanism of α -chymotrypsin. *J. Theor. Biol.* **1976**, *15*, 5581–5588.
- [46] Kossiakoff, A. A.; Spencer, S. A. Neutron diffraction identifies His57 as the catalytic base in trypsin. *Nature* **1980**, *288*, 414–416.
- [47] Kossiakoff, A. A.; Spencer, S. A. Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin. *Biochemistry* **1981**, *20*, 6462–6474.
- [48] Bachovchin, W. W. Confirmation of the assignment of the low-field proton resonance of serine proteases by using specifically nitrogen-15 labeled enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 7948–7951.
- [49] Cleland, W. W.; Frey, P. A.; Gerlt, J. A. The low barrier hydrogen bond in enzymatic catalysis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25529–25532.
- [50] Hosur, M. V.; Chitra, R.; Hegde, S.; Choudhury, R. R.; Das, A.; Hosur, R. V. Low-barrier hydrogen bonds in proteins. *Crystallogr. Rev.* **2013**, *19*, 3–50.
- [51] Kollman, P. A.; Hayes, D. M. Theoretical calculations on proton-transfer energetics: studies of methanol, imidazole, formic acid, and methanethiol as models for the serine and cysteine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 2955–2961.
- [52] Umeyama, H.; Nakagawa, S.; Kudo, T. Role of Asp102 in the enzymatic reaction

- of bovine β -trypsin a molecular orbital study. *J. Mol. Biol.* **1981**, *150*, 409–421.
- [53] Umeyama, H.; Hirono S.; Nakagawa S. Charge state of His-57–Asp-102 couple in a transition state analogue-trypsin complex: a molecular orbital study. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 6266–6270.
- [54] Ishida, T.; Kato, S. Role of Asp102 in the catalytic relay system of serine proteases: a theoretical study. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7111–7118.
- [55] Blow, D. M. The tortuous story of Asp...His...Ser: structural analysis of α -chymotrypsin. *Trends. Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 405–408.
- [56] Legon, A. C.; Millen, D. J.; Schrems, O. Hydrogen bonding in the gas phase. Infrared spectroscopic investigation of hydrogen fluoride alcohol–heterodimers. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans. 2* **1979**, *75*, 592–601.
- [57] Cleland, W. W.; Kreevoy, M. M. Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis. *Science* **1994**, *264*, 1887–1890.
- [58] Frey, P. A.; Whitt, S. A.; Tobin, J. B. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases. *Science* **1994**, *264*, 1927–1930.
- [59] Golubeva, N. S.; Denisov, G. S.; Gindinb, V. A.; Ligayb, S. S.; Limbachc, H.-H.; Smirnov, S. N. The role of short hydrogen bonds in mechanisms enzymatic action. *J. Mol. Struct.* **1994**, *322*, 83–91.
- [60] Halkides, C. J.; Wu, Y. Q.; Murray, C. J. A low-barrier hydrogen bond in subtilisin: ¹H and ¹⁵N NMR studies with peptidyl trifluoromethyl ketones. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15941–15948.
- [61] Cassidy, C. S.; Lin, J.; Frey, P. A. A new concept for the mechanism of action of chymotrypsin: the role of the low-barrier hydrogen bond. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4576–4584.
- [62] Lin, J.; Cassidy, C. S.; Frey, P. A. Correlations of the basicity of His57 with transition state analogue binding, substrate reactivity, and the strength of the low-barrier hydrogen bond in chymotrypsin. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11940–11948.
- [63] Lin, J.; Westler, W. M.; Cleland, W. W.; Markley, J. L.; Frey, P. A. Fractionation factors and activation energies for exchange of the low barrier hydrogen bonding proton in peptidyl trifluoromethyl ketone complexes of chymotrypsin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 14664–14668.
- [64] Mildvan, A. S.; Harris, T. K.; Abeygunawardana, C. Nuclear magnetic resonance methods for the detection and study of low-barrier hydrogen bonds on enzymes. *Methods Enzymology* **1999**, *308*, 219–245.
- [65] Neidhart, D.; Wei, Yaoming.; Cassidy, C.; Lin, J.; Cleland, W. W.; Frey, P. A.

- Correlation of low-barrier hydrogen bonding and oxyanion binding in transition state analogue complexes of chymotrypsin. *Biochemistry* **2001**, *40*, 2439–2447.
- [66] Mildvan, A. S.; Massiah, M. A.; Harris, T. K.; Marks, G. T.; Harrison, D. H. T.; Viragh, C.; Reddy, P. M.; Kovach, I. M. Short, strong hydrogen bonds on enzymes: NMR and mechanistic studies. *J. Mol. Struct.* **2002**, *615*, 163–175.
- [67] Westler, W. M.; Frey, P. A.; Lin, J.; Wemmer, D. E.; Morimoto, H.; Williams, P. G.; Markley, J. L. Evidence for a strong hydrogen bond in the catalytic dyad of transition-state analogue inhibitor complexes of chymotrypsin from proton–triton NMR isotope shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4196–4197.
- [68] Kuhn, P.; Knapp, M.; Soltis, S. M.; Ganshaw, G.; Thoene, M.; Bott, R. The 0.78 Å structure of a serine protease: *bacillus lentus* subtilisin. *Biochemistry* **1998**, *37*, 13446–13452.
- [69] Ash, E. L.; Sudmeier, J. L.; De Fabo, E. C.; Bachovchin, W. W. A low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad of serine proteases? Theory versus experiment. *Science* **1997**, *278*, 1128–1132.
- [70] Schutz, C. N.; Warshel, A. The low barrier hydrogen bond (LBHB) proposal revisited: the case of the Asp... His pair in serine proteases. *Proteins* **2004**, *55*, 711–723.
- [71] Ishida, T. Low-barrier hydrogen bond hypothesis in the catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in the acylation process. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5413–5420.
- [72] 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.
- [73] Guthrie, J. P. Short strong hydrogen bonds: can they explain enzymic catalysis? *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 163–170.
- [74] Perrin, C. L.; Nielson, J. B. “STRONG” HYDROGEN BONDS IN CHEMISTRY AND BIOLOGY. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, *48*, 511–544.
- [75] Perrin, C. L. Are short, low-barrier hydrogen bonds unusually strong? *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 1550–1557.
- [76] Graham, J. D.; Buytendyk, A. M.; Wang, D.; Bowen, K. H.; Collins, K. D. Strong, low-barrier hydrogen bonds may be available to enzymes. *Biochemistry* **2014**, *53*, 344–349.
- [77] Haddad, K. C.; Sudmeier, J. L.; Bachovchin, D. A.; Bachovchin, W. W. α -lytic protease can exist in two separately stable conformations with different His57

- mobilities and catalytic activities. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 1006–1011.
- [78] Ash, E. L.; Sudmeier, J. L.; Day, R. M.; Vincent, M.; Torchilin, E. V.; Haddad, K. C.; Bradshaw, E. M.; Sanford, D. G.; Bachovchin, W. W. Unusual ^1H NMR chemical shifts support (His) $\text{C}_{\epsilon 1}\text{-H}\cdots\text{O}=\text{C}$ H-bond: proposal for reaction-driven ring flip mechanism in serine protease catalysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 10371–10376.
- [79] Bachovchin, W. W. Contributions of NMR spectroscopy to the study of hydrogen bonds in serine protease active sites. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S199–S213.
- [80] Scheiner, S. Analysis of catalytic mechanism of serine proteases. Viability of the ring-flip hypothesis. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6837–6846.
- [81] Fuhrmann, C. N.; Daugherty, M. D.; Agard, D. A. Subangstrom crystallography reveals that short ionic hydrogen bonds, and not a His-Asp low-barrier hydrogen bond, stabilize the transition state in serine protease catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9086–9102.
- [82] Hansch, C.; Fujita, T. p - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616–1626.
- [83] Fujita, T.; Iwasa, Junkichi.; Hanch, C. A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5175–5180.
- [84] Jaffé, H. H. A reëxamination of the hammett equation. *Chem. Rev.* **1953**, *53*, 191–261.
- [85] Taft, R. W. Jr. Sigma values from reactivities. *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 1805–1815.
- [86] Brown, H. C.; Okamoto, Y. Electrophilic substituent constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4979–4987.
- [87] Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, S. Jr.; Weiner, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765–784.
- [88] Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227–249.
- [89] Lin, H.; Truhlar, D. G. QM/MM: what have we learned, where are we, and where do we go from here? *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 185–199.
- [90] Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM studies of enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 182–187.
- [91] Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM methods for biomolecular systems. *Angew. Chem.*

Int. Ed. **2009**, *48*, 1198–1229.

- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] Fedorov, D. G.; Nagata, T.; Kitaura, K. Exploring chemistry with the fragment molecular orbital method. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 7562–7577.
- [95] 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.
- [96] Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. ONIOM: a multilayered integrated MO + MM method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels–Alder reactions and Pt(P(*t*-Bu)₃)₂ + H₂ oxidative addition. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357–19363.
- [97] Morokuma, K. Theoretical studies of structure, function and reactivity of molecules—a personal account. *Proc. Jpn. Acad., Sci. Ser. B* **2009**, *85*, 167–182.
- [98] Chung, L. W.; Sameera, W. M. C.; Ramozzi, R.; Page, A. J.; Hatanaka, M.; Petrova G. P.; Harris, T. V.; Li, X.; Ke, Z.; Liu, F.; Li, H. B.; Ding, L.; Morokuma, K. The ONIOM method and its applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5678–5796.
- [99] Faver, J. C.; Zheng, Z.; Merz, K. M. Jr. Model for the fast estimation of basis set superposition error in biomolecular systems. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 144110-1–144110-8.
- [100] Riley, K. E.; Pitonák, M.; Jurecka, P.; Hobza, P. Stabilization and structure calculations for noncovalent interactions in extended molecular systems based on wave function and density functional theories. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5023–5063.
- [101] Boys, S. F.; Bernardi, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553–566.
- [102] He, X.; Fusti-Molnar, L.; Cui, G.; Merz, K. M., Jr. Importance of dispersion and electron correlation in *ab initio* protein folding. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5290–5300.
- [103] Grimme, S. Accurate description of van der Waals complexes by density functional theory including empirical corrections. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*,

1463–1473.

- [104] Grimme, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787–1799.
- [105] Grimme, S. Density functional theory with London dispersion corrections. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 211–228.
- [106] Johnson, E. R.; Becke, A. D. A post-Hartree–Fock model of intermolecular interactions. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 24101-1–24101-7.
- [107] Becke, A. D.; Johnson, E. R. A density-functional model of the dispersion interaction. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 154101-1–154101-9.
- [108] Johnson, E. R.; Becke, A. A post-Hartree–Fock model of intermolecular interactions: inclusion of higher-order corrections. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 174104-1–174104-9.
- [109] Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- [110] Goerigk, L.; Kruse, H.; Grimme, S. Benchmarking density functional methods against the S66 and S66x8 datasets for non-covalent interactions. *Chem. Phys. Chem.* **2011**, *12*, 3421–3433.
- [111] Kruse, H.; Grimme, S. A geometrical correction for the inter- and intra-molecular basis set superposition error in Hartree–Fock and density functional theory calculations for large systems. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, 154101-1–154101-16.
- [112] Goerigk, L.; Reimers, J. R. Efficient methods for the quantum chemical treatment of protein structures: the effects of london-dispersion and basis-set incompleteness on peptide and water-cluster geometries *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3240–3251.
- [113] Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Singh, D. J.; Fiolhais, C. Atoms, molecules, solids, and surfaces: applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1992**, *46*, 6671–6687.
- [114] Perdew, J. P.; Burke, K.; Wang, Y. Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1996**, *54*, 16533–16539.
- [115] Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized gradient approximation made simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.
- [116] Becke, A. Density-functional thermochemistry. V. Systematic optimization of exchange-correlation functionals. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 8554–8560.
- [117] Tao, J.; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, G. E. Climbing the density

- functional ladder: nonempirical meta-generalized gradient approximation designed for molecules and solids. *Phys. Rev. Lett.* **2003**, *91*, 146401-1–146401-4.
- [118] Boese, A. D.; Martin, J. M. L. Development of density functionals for thermochemical kinetics. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 3405–3416.
- [119] Peverati, R.; Truhlar, D. G. Performance of the M11 and M11-L density functionals for calculations of electronic excitation energies by adiabatic time-dependent density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 11363–11370.
- [120] Fogolari, F.; Brigo, A.; Molinari, H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 377–392.
- [121] Lu, B. Z.; Zhou, Y. C.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. Recent progress in numerical methods for the Poisson–Boltzmann equation in biophysical applications *Commun. Comput. Phys.* **2008**, *3*, 973–1009.
- [122] Jayaram, B.; Sprous, D.; Beveridge, D. L. Solvation free energy of biomacromolecules: parameters for a modified generalized born model consistent with the AMBER force field. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 9571–9576.
- [123] Mennucci, B. Polarizable continuum model. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 386–404.
- [124] Mennucci, B.; Cancès, E.; Tomasi, J. Evaluation of solvent effects in isotropic and anisotropic dielectrics and in ionic solutions with a unified integral equation method: theoretical bases, computational implementation, and numerical applications. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 10506–10517.
- [125] Cancès, E. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032–3041.
- [126] Cancès, E.; Mennucci, B. New applications of integral equations methods for solvation continuum models: ionic solutions and liquid crystals. *J. Math. Chem.* **1998**, *23*, 309–326.
- [127] Tomasi, J.; Mennucci, B. Polarizable continuum model (PCM) calculations of solvent effects on optical rotations of chiral molecules. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6102–6113.
- [128] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681.
- [129] Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation

- models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- [130] Olsson, T. S. G.; Ladbury, J. E.; Pitt, W. R.; Williams, M. A. Extent of enthalpy–entropy compensation in protein–ligand interactions. *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1607–1618.
- [131] Talhout, R.; Villa, A.; Mark, A. E.; Engberts, J. B. F. N. Understanding binding affinity: a combined isothermal titration calorimetry/molecular dynamics study of the Binding of a Series of Hydrophobically Modified Benzamidinium Chloride Inhibitors to trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10570–10579.
- [132] Chodera, J. D.; Mobley, D. L. Entropy–enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 121–142.
- [133] Brandt, T.; Holzmann, N.; Muley, L.; Khayat, M.; Wegscheid-Gerlach, C.; Baum, B.; Heine, A.; Hangauer, D.; Klebe, G. Congeneric but still distinct: how closely related trypsin ligands exhibit different thermodynamic and structural properties. *J. Mol. Biol.* **2011**, *405*, 1170–1187.
- [134] 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.
- [135] 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.
- [136] 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.
- [137] Yoshida, T.; Hitaoka, S.; Mashima, A.; Sugimoto, T.; Matoba, H.; Chuman, H. Combined QM/MM (ONIOM) and QSAR approach to the study of complex formation of matrix metalloproteinase-9 with a series of biphenylsulfonamides – LERE-QSAR analysis (V). *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10283–10289.
- [138] Hitaoka, S.; Shibata, Y.; Matoba, H.; Kawano, A.; Harada, M.; Rahman, M. M.; Tsuji, D.; Hirokawa, T.; Itoh, K.; Yoshida, T.; Chuman, H. Modeling of human neuraminidase-1 and its validation by LERE-correlation analysis. *Chem-Bio Informatics Journal* **2013**, *13*, 30–44.

- [139] Hitaoka, S.; Chuman, H. Revisiting the Hansch–Fujita approach and development of a fundamental QSAR. *J. Pestic. Sci.* **2013**, *38*, 60–67.
- [140] Hitaoka, S.; Chuman, H.; Yoshizawa, K. A QSAR study on the inhibition mechanism of matrix metalloproteinase-12 by arylsulfone analogs based on molecular orbital calculations. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 793–806.
- [141] Grünberg, R.; Nilges, M.; Leckner, J. Flexibility and conformational entropy in protein–protein binding. *Structure* **2006**, *14*, 683–693.
- [142] Noyes, R. M. Thermodynamics of ion hydration as a measure of effective dielectric properties of water. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 513–522.
- [143] Selassie, C. D.; Chow, M.; Hansch, C. Trypsin hydrolysis of X-phenyl hippurates. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *68*, 13–25.
- [144] Lepp, Z.; Chuman, H. Connecting traditional QSAR and molecular Simulations of papain hydrolysis – importance of charge transfer. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3093–3105.
- [145] Recacha, R.; Carson, M.; Costanzo, M. J.; Maryanoff, B.; DeLucas, L. J.; Chattopadhyay, D. Structure of the RWJ-51084-bovine pancreatic β -trypsin complex at 1.8 Å. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1999**, *55*, 1785–1791.
- [146] Jones G.; Willett P.; Glen R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- [147] Baxter, C. A.; Murray, C. W.; Clark, D. E.; Westhead, D. R.; Eldridge, M. D. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins* **1998**, *33*, 367–382.
- [148] Dolinsky, T. J.; Nielsen, J. E.; McCammon, J. A.; Baker, N. A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W665–W667.
- [149] 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.
- [150] Case, D. A.; Cheatham, T. E. 3rd.; Darden, T.; Gohlke, H. Luo, R.; Merz, K. M. Jr.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods. R. J. The amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1668–1688.
- [151] Wang, J.; Cieplak, P.; Kollman, P.A. How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1049–1074.
- [152] Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development

- and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157–1174.
- [153] Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A well behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269–10280.
- [154] Topf, M.; Várnai, P.; Richards, W. G. *Ab initio* QM/MM dynamics simulation of the tetrahedral intermediate of serine proteases: insights into the active site hydrogen-bonding network. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14780–14788.
- [155] Gleeson, M. P.; Hillier, I. H.; Burton, N. A. Theoretical analysis of peptidyl α -ketoheterocyclic inhibitors of human neutrophil elastase: insight into the mechanism of inhibition and the application of QM/MM calculations in structure-based drug design. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2275–2280.
- [156] Nemukhin, A. V.; Grigorenko, B. L.; Rogov, A. V.; Topol, I. A.; Burt, S. K. Modeling of serine protease prototype reactions with the flexible effective fragment potential quantum mechanical/molecular mechanical method. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 36–48.
- [157] Topf, M.; Richards, W. G. Theoretical studies on the deacylation step of serine protease catalysis in the gas phase, in solution, and in elastase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14631–14641.
- [158] Lundberg, M.; Sasakura, Y.; Zheng, G.; Morokuma, K. Case studies of ONIOM(DFT:DFTB) and ONIOM(DFT:DFTB:MM) for enzymes and enzyme mimics. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 1413–1427.
- [159] Xu, Q.; Li, L.; Guo, H. Understanding the mechanism of deacylation reaction catalyzed by the serine carboxyl peptidase kumamolisin-as: insights from QM/MM free energy simulations. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10594–10600.
- [160] 和佐田祐子, 和佐田裕昭 著, 分子軌道計算プログラム Gaussian 03 その 5, 名古屋大学情報基盤センターニュース **2007**, *6*.
- [161] Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A. *et al.* Gaussian 09 Revision D.01. Gaussian Inc.: Wallingford CT, **2009**.
- [162] Mashima, A.; Kurahashi, M.; Sasahara, K.; Yoshida, T.; Chuman, H. Connecting classical QSAR and LERE analyses using modern molecular calculations, LERE-QSAR (VI): Hydrolysis of substituted hippuric acid phenyl esters by trypsin. *Mol. Inf.* **2014**, *33*, 802–814.
- [163] 馬島彬, 学生優秀発表賞受賞寄稿「分子科学計算を用いた自由エネルギー変化の線形則に基づくトリプシンの触媒反応メカニズムの詳細解析」, 分

子シミュレーション研究会会誌アンサンブル, **2016**, *18*, 60–61.

- [164] Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. Jr. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- [165] Yoshida, T.; Mashima, A.; Sasahara, K.; Chuman, H. A simple and efficient dispersion correction to the Hartree–Fock theory. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1037–1042.
- [166] Yoshida, T.; Hayashi, T.; Mashima, A.; Chuman, H. A simple and efficient dispersion correction to the Hartree–Fock theory (2): incorporation of a geometrical correction for the basis set superposition error. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4179–4184.
- [167] Yoshida, T.; Hayashi, T.; Mashima, A.; Chuman, H. A simple and efficient dispersion correction to the Hartree–Fock theory (3): a comprehensive performance comparison of HF-D_{1q} with MP2 and DFT-Ds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 589–593.
- [168] Su, P.; Li, H. Energy decomposition analysis of covalent bonds and intermolecular interactions. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 014102-1–014102-15.
- [169] Kitaura, K. A procedure to generate *ab initio* intermolecular potential function. *Fluid Phase Equilib.* **1995**, *104*, 57–69.
- [170] Jurečka, P.; Šponer, J.; Černý, J.; Hobza, P. Benchmark database of accurate (MP2 and CCSD(T) complete basis set limit) interaction energies of small model complexes, DNA base pairs, and amino acid pairs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1985–1993.
- [171] Řezáč, J.; Riley, K. E.; Hobza, P. S66: a well-balanced database of benchmark interaction energies relevant to biomolecular structures. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 2427–2438.
- [172] Dunning, T. H. Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 1007–1023.
- [173] Yoshida, T.; Yamagishi, K.; Chuman, H. QSAR study of cyclic urea type HIV-1 PR inhibitors using *ab initio* MO calculation of their complex structures with HIV-1 PR. *QSAR Comb. Sci.* **2008**, *27*, 694–703.
- [174] Yoshida, T.; Fujita, T.; Chuman, H. Novel quantitative structure–activity studies of HIV-1 protease inhibitors of the cyclic urea type using descriptors derived from molecular dynamics and molecular orbital calculations. *Curr. Comput.-Aided*

Drug Des. **2009**, *5*, 38–55.

- [175] 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.
- [176] Zheng, J.; Xu, X.; Truhlar, D. G. Minimally augmented Karlsruhe basis sets. *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *128*, 295–305.
- [177] Ishida, T.; Kato, S. Theoretical perspectives on the reaction mechanism of serine proteases: the reaction free energy profiles of the acylation process. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12035–12048.
- [178] Zhou, Y.; Zhang, Y. Serine protease acylation proceeds with a subtle re-orientation of the histidine ring at the tetrahedral intermediate. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1577–1579.
- [179] Yoshida, T.; Shimizu, M.; Harada, M.; Hitaoka, S.; Chuman, H. Reassessment of Hammett σ as an effective parameter representing intermolecular interaction energy—links between traditional and modern QSAR approaches. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 124–128.
- [180] Yoshida, T.; Hirozumi, K.; Harada, M.; Hitaoka, S.; Chuman, H. Density functional theory study of hydrogen atom abstraction from a series of *para*-substituted phenols: why is the Hammett σ_p^+ constant able to represent radical reaction rates? *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4564–4570.
- [181] Glendening, E. D.; Landis, C. R.; Weinhold, F. Natural bond orbital methods. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 1–42.