

二環性ペプチド RA-VII の量子化学計算と
分子動力学シミュレーションを用いた構造解析

野口瑤

1	背景と目的.....	6
1.1	抗がん剤.....	6
1.2	ペプチド.....	6
1.3	環状ペプチド.....	7
1.4	RA-VII.....	8
1.4.1	RA-VII の単離.....	9
1.4.2	RA-VII の類縁体.....	9
1.4.3	RA-VII の構造.....	11
1.4.4	RA-VII の生理活性.....	13
1.4.5	RA-VII の構造活性相関.....	15
1.4.5.1	D-Ala1 と活性の関連性.....	15
1.4.5.2	L-Ala2 と活性の関連性.....	17
1.4.5.3	L-Tyr3 と活性の関連性.....	18
1.4.5.4	L-Ala4 と活性の関連性.....	19
1.4.5.5	L-Tyr5 と活性の関連性.....	20
1.4.5.6	L-Tyr6 と活性の関連性.....	21
1.4.5.7	その他の構造と活性の関連性.....	21
1.4.6	RA-VII の分子シミュレーションによる先行研究.....	22
1.4.6.1	分子動力学シミュレーション.....	23
1.4.6.2	モンテカルロシミュレーション.....	23
1.4.6.3	定量的構造活性相関.....	24
1.5	本論文の目的.....	24
2	手法.....	25
2.1	量子化学計算.....	25
2.1.1	量子化学.....	25
2.1.2	シュレーディンガー方程式.....	25
2.1.3	基底関数.....	29
2.1.4	密度汎関数法.....	30
2.1.5	溶媒効果.....	30

2.1.6	計算条件	31
2.2	分子動力学 (MD) シミュレーション	31
2.2.1	MD シミュレーション	31
2.2.2	周期境界条件	31
2.2.3	エワルド法	31
2.2.4	分子力場	32
2.2.5	運動方程式の近似	33
2.2.6	拘束	34
2.2.7	シミュレーション条件	35
2.2.8	解析した物理量	36
2.2.8.1	RMSD	36
2.2.8.2	二面角の計算	37
2.2.8.3	水素結合の判定	37
2.2.8.4	β ターン構造の判定	37
2.2.8.5	ラマチャンドラン・ダイアグラム	38
2.2.8.6	自由エネルギー地形	38
2.2.8.7	RMSF	38
3	結果・議論	41
3.1	量子化学計算	41
3.2	RMSD	42
3.3	Tyr ³ の側鎖の回転異性体	45
3.4	RMSF	47
3.5	ラマチャンドラン・ダイアグラム	48
3.6	自由エネルギーランドスケープ	51
3.7	水素結合	54
4	今後の展望	56
4.1	conf. C の構造について	56
4.2	RA-VII の構造と揺らぎ	56
4.3	Tyr ³ 側鎖の動き	56

4.4	水素結合	57
4.5	抗がん剤以外の RA-VII の展望について	57
4.6	環状ペプチド	58
謝辞		59
参考文献		61

用語集

• Ala	Alanine アラニン
• Tyr	Tyrosine チロシン
• conf.	Conformation コンフォメーション
• DMSO	Dimethyl sulfoxide ジメチルスルホキシド
• THF	Tetrahydrofuran テトラヒドロフラン
• IC ₅₀	Half maximal (50%) inhibitory concentration 半阻害濃度
• PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
• EF	Elongation factor 延伸因子
• MD	Molecular dynamics 分子動力学
• GAFF	General Amber Force Field 一般 Amber 力場
• RMSD	Root mean square deviation 平均二乗偏差
• RMSF	Root mean square fluctuation 平均二乗揺らぎ
• R _g	Radius of gyration 慣性半径

1 背景と目的

本章では本研究の対象である背景である抗がん剤、環状ペプチド、RA-VII、そして本研究の目的について述べる。

1.1 抗がん剤

悪性腫瘍 (がん) は、厚生労働省の人口動態統計より、30 年以上も日本人の死因の第 1 位である [1]。国立がんセンターの 2015 年の調べでは、生涯でがん罹患する可能性は男性で 62%、女性で 46%である [2]。この結果は、日本人の約 2 人に 1 人が、がん罹患する事を意味している。そのため、がんの治療は日本人の健康寿命増進、Quality of Life (QoL) の向上のために、必要不可欠である。

一般的ながん治療には化学療法、手術療法、放射線療法の大きく 3 つの方法が存在する。化学療法とは、抗がん剤を用いてがんを治療する療法、手術療法は外科的手術で悪性腫瘍を切除する療法である。放射線療法は、放射線によってがん細胞の死滅を試みる。近年では、免疫のメカニズムを用い、がん細胞の増殖を食い止める免疫療法が第 4 の療法として、注目されている。手術療法や放射線治療は、悪性腫瘍の箇所が明確に分かっている場合に有効な療法であり、化学療法や免疫療法は患部が不明である場合や全身に点在している際に有効な療法である。

2010 年の報告では、2273 件の治療において、約 80%のがん患者が化学治療を受けている事が分かっている [3]。抗がん剤での治療は、がん治療の主要な治療である。そのため、多くの製薬会社によって様々な抗がん剤が開発されている。

従来の抗がん剤は、がん細胞が他の細胞よりも薬剤感受性が高いことや、細胞分裂の周期が早い事に注目し開発が行われた。イリノテカンとはトポイソメラーゼを阻害し [4]、ビンブラスチンは微小管の生成を阻害する [5]。シスプラチンのようなプラチナ製剤も DNA の複製を阻害する事で抗がん作用を示している [6]。しかし、これらの薬剤は健常な細胞にも影響を及ぼしてしまう。そのため、がん細胞特異的に作用する薬剤の開発が望まれている。近年ではがん細胞特異的なタンパク質に作用する分子標的薬の開発が行われている。

1.2 ペプチド

低分子化合物は分子量 500 以下の化合物の総称である。生理活性を有する化合物の多くが低分子化合物である。そのため、一般的に薬剤として用いられる化合物は、低分子化合物である。この分子量と薬剤としての活用に関しては、Lipinski の法則が

示されている。これに関しては 1.3 で詳しく述べる。

薬剤として利用される化合物の作用機序として、酵素や DNA のような生体高分子に作用し活性を制御するものが多い。しかし、低分子化合物は生体高分子と比較すると大きさがきわめて小さい場合もある。そのため、低分子化合物では十分に作用が発揮しきれない場合もある。低分子化合物では制御できなかった生体物質を標的とする製剤が期待され、生物学的製剤が開発された。

しかし、生物学的製剤は製造コストが高いという欠点も有する。そこで、低分子化合物よりも分子量が大きく、生物製剤よりも製造が簡便な化合物に注目が集まった。それがペプチドである。ペプチドとは 2 個以上のアミノ酸が結合した化合物の総称である。(一般的には 50~100 個以上のアミノ酸が結合するとタンパク質と呼ばれる。) ペプチドは低分子化合物よりも分子量が大きいため、低分子化合物が対象とできなかったタンパク質と相互作用することにより機能を発揮する事ができる。また、ペプチドはアミノ酸を順次結合させて作成するため、設計や合成が比較的容易で生物学的製剤よりも作成コストが安いという利点がある。

ペプチドの大きな問題は、「生体中で分解される」「膜透過性が低い」の 2 点である。これらの欠点を補うために、環状ペプチドの研究が行われている。ペプチドの環状化によって、分解されにくく、膜透過しやすいことが指摘されている。これについては、1.3 で述べる。

1.3 環状ペプチド

環状ペプチドは、文字通り環状構造を有するペプチドである。環状構造は、ペプチドの N 末端と C 末端が分子内でペプチド結合を形成するか、または側鎖と末端が結合し環状構造を形成する。リボソームを介さない非リボソームペプチドでは環状構造のペプチドが多い事が知られている [7]。

環状ペプチドは抗生物質や免疫抑制剤として利用されている。一般的に、製剤として重要な要素として経口投与でも細胞の実験と同じ程度の作用を示すことが挙げられる。このように、体内に活性を有したまま吸収され循環することを bioavailability (生物学的利用) と呼ぶ。この生物学的利用は Lipinski の法則によって大まかな予測をすることができる [8]。Lipinski の法則とは、水素結合ドナーが 5 個以下、水素結合アクセプターが 10 個以下、分子量が 500 以下、分配係数が 5 以下の 4 つの項目を満たす化合物は優れた薬剤であるという経験則的な法則である。

あくまでも経験則的な法則であるために、例外的な化合物も存在する。その例として、シクロスポリン A をはじめとした環状ペプチドが挙げられる。シクロスポリン A

は 11 残基のアミノ酸からなる環状ペプチドである (図 1.17)。この化合物は、分子量やドナー・アクセプターの数が Lipinski の法則とは大きく反する。しかし、免疫抑制剤として高い効果を示すことが知られている [9]。

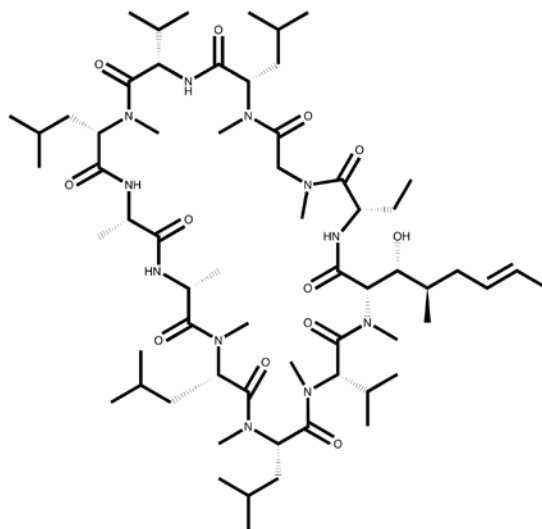


図 1.1 シクロスポリン A の構造式

このような環状ペプチドの化合物の高い生物学的利用について着目し、Hewitt や Rezai らによって環状ペプチドの膜透過について研究が行われた [10-13]。彼らは環状ペプチドに関して PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) を用いて膜透過性の評価を行った。PAMPA はメンブレンフィルターに塗布したリン脂質を細胞膜に見立てて膜透過性を評価する手法である [14]。彼らは、PAMPA で高い膜透過性を示した環状ペプチドと他の環状ペプチドとの構造比較を行った。その結果、高い膜透過性を示した環状ペプチドは分子内水素結合を形成していることが明らかとなった。分子内水素結合を形成している環状ペプチドは、他の分子との水素結合の機会が失われる。このことから、膜透過のためには外部環境との水素結合の機会が少ない事が有利に働く可能性が示唆される。

1.4 RA-VII

RA-VII は、アカネ科植物より単離された抗がん作用をもつ環状ペプチドである。本節では、本研究における構造解析の対象である環状ペプチド RA-VII について詳細を述べる。

1.4.1 RA-VII の単離

RA-VII はアカネ科植物 (*Rubia akane*) より単離された環状ペプチドである (図 1.2)。このペプチドは 1980 年代に東京薬科大学の天然医薬品化学教室が行ったスクリーニングによって発見された [15, 16]。このスクリーニングの目的は、植物由来の抗がん剤の開発であった。一次スクリーニングでは 300 種以上の植物の抽出物をマウス肉腫細胞株 Sarcoma180 の腹水腫瘍に用い、良好な結果を示した植物の抽出物に関しては白血病モデルマウス P-388 Luekemia による検定が行われた。これらのスクリーニングの結果より茜草根の抽出物に強い抗がん活性が認められた。この活性の活性本体を特定するために、化合物の単離が行われ、RA-VII をはじめとして複数の RA (*Rubia akane*) ペプチドが単離された [17]。

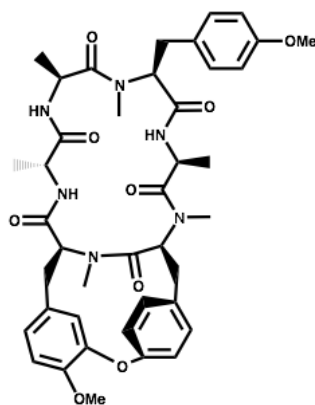


図 1.2 RA-VII の構造

1.4.2 RA-VII の類縁体

RA-VII には 20 種以上の類縁体が存在することが報告され (表 1.1)、その多くがアカネ科植物 (*Rubia akane*, *Rubia yunnanensis*, *Rubia cordifolia*) の根より発見されている。ほとんどの RA ペプチドにおいて、抗がん活性を有していることが報告されているが、その中でも RA-VII、bouvardin と RA-V (Deoxybouvardin) は強い抗がん活性を有していることが知られている [15, 24]。これらのペプチドに対しては抗がん剤としての利用を目的とした研究が行われた。東京薬科大学の天然医薬品化学教室では最も強い抗がん活性を示した RA-VII を抗がん剤として製剤化する事を目的とした研究が行われた [17]。

表 1.1 : RA-VII の類縁体

pyroGlu はピログルタミン酸を glc は β -D-グルコースを表す。R₁~R₇の箇所に関して

は図 1.3 に示す。RA-VII の 2 量体は図 1.4 に示す。

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	Ref.
RA-I	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₂ OH	18
RA-II	H	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	18
RA-III	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₂ OH	18
RA-IV	CH ₃	H	H	CH ₃	OH	CH ₃	CH ₃	18
RA-V	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃	17
RA-VI	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₂ OH	19
RA-VII	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	17
RA-VIII	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CHOHCH ₃	19
RA-IX	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	PyroGlu	20
RA-X	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ COOH	20
RA-XI	CH ₃	H	H	H	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ COOH	21
RA-XII	CH ₃	H	H	glc	H	CH ₃	CH ₃	21
RA-XIII	CH ₃	H	H	glc	H	CH ₃	CH ₂ CH ₂ COOH	21
RA-XIV	CH ₃	H	H	glc	H	CH ₃	PyroGlu	21
RA-XV	CH ₃	H	H	6-OAc-glc	H	CH ₃	CH ₃	22
RA-XVI	CH ₃	H	H	glc	OAc	CH ₃	CH ₃	22
RA-XVII	CH ₃	H	H	H	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃	23
bouvardin	CH ₃	H	OH	H	H	CH ₃	CH ₃	24
RA-VII 2 量体	CH ₃	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	25

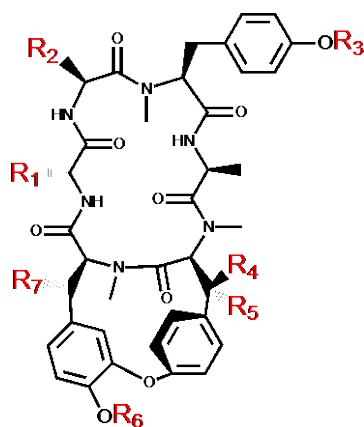


図 1.3 RA-VII の類縁体の構造
R₁~R₇の官能基などを表 1.1 に示す。

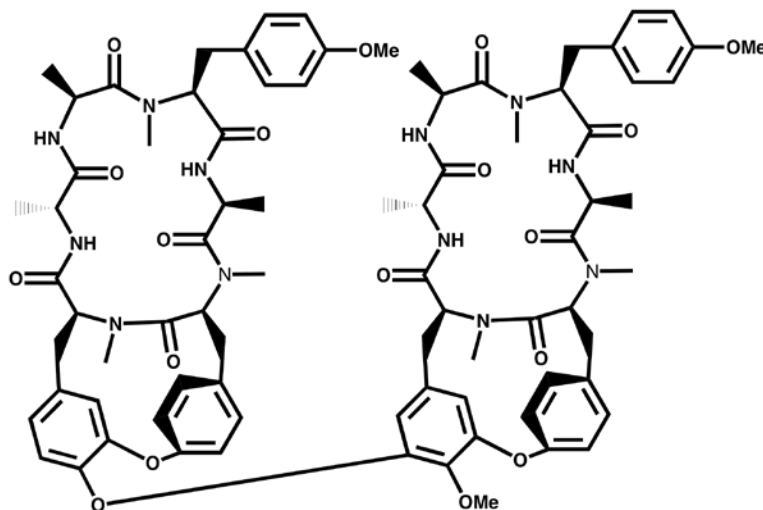


図 1.4 RA-VII の二量体の構造

1.4.3 RA-VII の構造

RA-VII は 1 つの D-Ala、 2 つの L-Ala、 3 つの L-Tyr から構成される環状ヘキサペプチドである (図 1.5 (a))。配列は D-Ala1、 L-Ala2、 L-Tyr3、 L-Ala4、 L-Tyr5、 L-Tyr6 である。L-Tyr5、 L-Tyr6 の側鎖によってシクロイソジチロシン構造の 14 員環を形成しており、ペプチド主骨格である 18 員環と合わせて二環性構造を有している。

RA-VII にはペプチド結合の立体配座に対応して 3 種類のコンフォメーションが存在する (図 1.5)。コンフォメーション A は Tyr5 と Tyr6 のペプチド結合が *cis* 型、それ以外のペプチド結合は *trans* 型である (図 1.5 (a))。コンフォメーション B は Ala2 と Tyr3 のペプチド結合と Tyr5 と Tyr6 のペプチド結合が *cis* 型、それ以外のペプチド結合は *trans* 型である (図 1.5 (b))。コンフォメーション C は Ala2 と Tyr3 のペプチド結合と Tyr5 と Tyr6 のペプチド結合に加えて Ala4 と Tyr5 のペプチド結合も *cis* 型、それ以外のペプチド結合は *trans* 型である (図 1.5 (c))。

RA-VII は Ala1 と Ala4 の間で 2 つの水素結合を形成すると考えられている [26]。この水素結合の強度は NMR による重水素置換によって観察されている。これは強固な水素結合ほど重水素が軽水素に置換される時間が遅くなることを利用している。Ala1 のアミド水素、Ala2 のアミド水素、Ala4 のアミド水素では半減期がそれぞれ 6 時間、13 分、2 日以上であった [26]。このことから Ala4 のアミド水素が形成する水素結合は非常に強固であることがわかる。

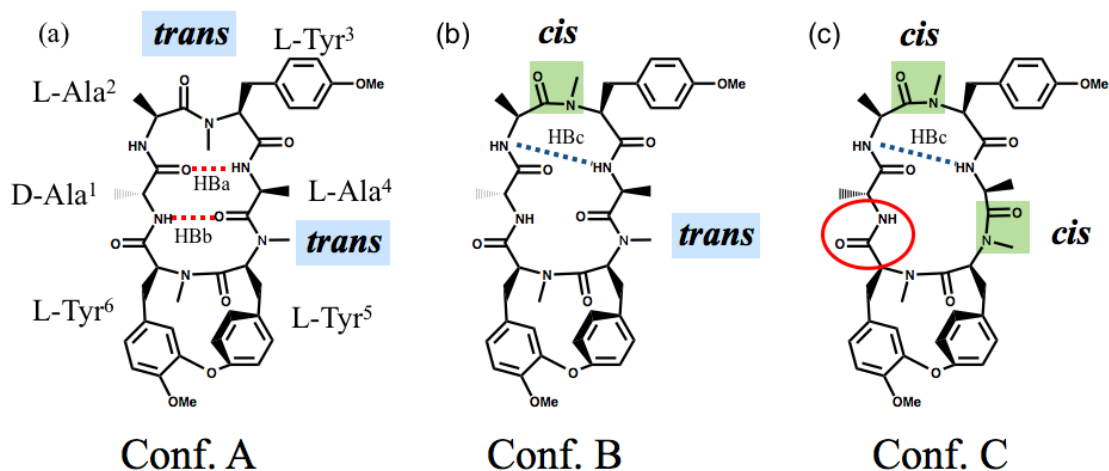


図 1.5 RA-VII のコンフォメーションの構造

先行研究 [26]で明らかとなっている RA-VII の分子内水素結合の結合個所を (a) の赤色の点線で示す。本研究で明らかとなった **conf. B** と **C** の分子内水素結合個所は (b) と (c) に示す。 (c) の赤色の円は **conf. C** の Tyr6 と Ala1 のペプチド結合を示す。

コンフォメーションの存在率は溶媒や溶質によって異なることが知られている [26, 27]。その溶媒や溶質ごとのコンフォメーションの存在率を表 1.2 に示す。これらの結果から、主要な構造は **conf. A** であることがわかっている。図 1.6 に 2007 年に報告された RA-VII の X 線結晶解析構造 (CCDC: 847331) を示す。この結晶構造のコンフォメーションは **conf. A** と同じコンフォメーションであった [28]。この結果から **conf. A** が主要でかつエネルギー的にも安定なコンフォメーションであると考えられる。他の 2 つのコンフォメーションと比較して **conf. C** は非常に限られた環境で観察されるコンフォメーションである。このコンフォメーションは dimethyl sulfoxide (DMSO, ジメチルスルホキシド) や tetrahydrofuran (THF, テトラヒドロフラン) 環境下のみで観察される。また LiCl を加えることは、THF 中の **conf. B** の存在率を減少させ **conf. A** の存在率を上昇させることが報告されている [27]。これは Ala1 のアミド基に Li が影響を与え、水素結合の形成を防ぐからであると想定されている。

表 1.2 RA-VII の溶媒と溶質ごとのコンフォメーションの存在割合 (%) [26, 27]

	conf. A	conf. B	conf. C	Ref.
CDCl_3	88.6	11.4	-	12
$\text{DMSO-}d_6$	63.7	31.8	4.5	12
$\text{Dioxane-}d_8$	79.2	20.8	-	12
30% $\text{DMSO-}d_6/\text{D}_2\text{O}$	76.0	24.0	-	12
$\text{THF-}d_8$	78	20	2	13
$\text{THF-}d_8/\text{LiCl}$	94	6	-	13

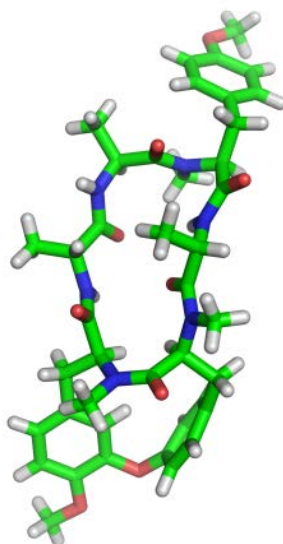


図 1.6 RA-VII の X 線結晶解析構造 (CCDC: 847331) [28]

1.4.4 RA-VII の生理活性

RA-VII は臨床開発の第 I 相試験が行われている。Majima ら [29]によって報告された臨床試験の結果、副作用として悪心、嘔吐、発熱、腹痛、および軽度の血圧低下が確認された。連日投与による体内の蓄積はないことが確認された。血圧低下に関して、様々な抗がん剤においても心毒性が報告されていることから RA-VII の心毒性について追加試験が行われた [30]。その結果、投与量と血行動態変化について一定の傾向は観察されなかったものの、心機能に関して影響が見られることが観察された。そのため、RA-VII の投与に関しては、心機能の継続的な測定が重要であると考えられている。

る。

RA-VII と類縁体である **bouvardin** は抗がん剤の開発のために作用機構の研究が行われている。RA-VII および **bouvardin** の抗がん作用は、リボソームにおけるタンパク質合成の阻害を介していることが報告されている [31, 32]。図 1.7 にリボソームでのタンパク質合成の概要を示した。1 段階目では E 部位の tRNA が解離し、A 部位に新しい tRNA が結合する。A 部位の tRNA の結合には伸長因子 (elongation factor) である EF1 が関わる。P 部位の tRNA には延伸中のペプチド鎖が結合している。2 段階目ではペプチジルトランスフェラーゼにより P 部位のペプチド鎖が A 部位の tRNA に結合する。3 段階目ではリボソームの大サブユニットが 3' 末端側にシフトする。4 段階目ではリボソームの小サブユニットが 3' 末端側にシフトする。EF1 により A 部位に mRNA の配列に該当する tRNA が結合し、1 段階目に戻る。先に挙げた 2 つの化合物でリボソームのタンパク質合成を阻害する箇所が異なっていることが知られている。RA-VII の類縁体である **Bouvardin** はアミノアシル tRNA の結合を阻害し、タンパク質の合成阻害をすることが報告されている [31]。一方、RA-VII はペプチジルトランスフェラーゼによるペプチド鎖の転移を阻害することが報告されている [32]。

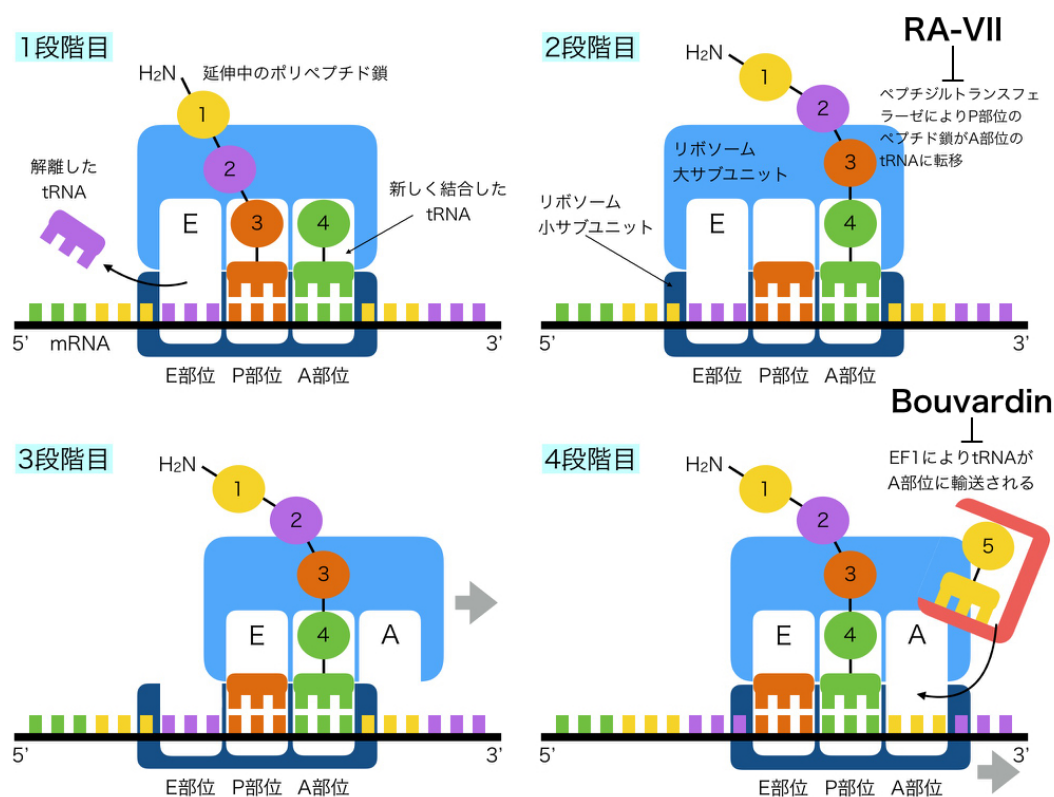


図 1.7 mRNA の翻訳の概要 [33]

また、RA-VII は F-actin に結合し、その構造を変化させることが報告されている [34]。この結果、RA-VII がアクチンの構造変化を引き起こすこと、細胞周期を G2 期で停止することが報告されている。

1.4.5 RA-VII の構造活性相関

RA-VII は臨床開発の結果、毒性があることが発見された。加えて、水溶性が低いため注射剤として用いることができないという欠点があった。製剤化のためには、強い活性と高い水溶性を持つ誘導体が求められている。本項では RA-VII の構造活性相関についての一部を、各残基ごとに述べる。

1.4.5.1 D-Ala1 と活性の関連性

自然界ではアミノ酸は通常 L 体のキラリティーを持つが、RA-VII では Ala 1 は D 体のアミノ酸である。このキラリティーが RA-VII の活性に重要であるかを解析するため、RA-VII にある 3 つの Ala についてそれぞれエピマーが合成された (図 1.8 (a)) [35]。エピマーとは 2 つ以上のキラル中心を持っている化合物で 1 つのキラル中心のみが異なるものを指す。CDCl₃ 中での NMR では 6 種のコンフォメーションが観察された。このエピマーの X 線結晶構造からコンフォメーションは Ala2 と Tyr3 の間のペプチド結合が *cis* 型で Tyr5 と Tyr6 の間のペプチド結合が *trans* 型であることがわかっている (図 1.9)。それら以外の構造では、Ala4 の側鎖の向きが RA-VII とは異なっている。このコンフォメーションは NMR の主要な構造と一致した。RA-VII の類縁体や誘導体で Tyr5 と Tyr6 の間のペプチド結合が *trans* 型のものは発見されておらず、非常に特殊な構造であることが報告された。P388 細胞 (マウス由来リンパ球様がん細胞) における実験では半阻害濃度 (IC₅₀) が 0.31 µg/ml と活性は、RA-VII (0.0023 µg/ml)¹ よりも 100 倍以上弱かった。IC₅₀ とは標的とする生化学的現象を半分まで抑制するために必要な濃度であり、阻害剤の活性強度を比較するために用いられる指標である。これらの結果から D-Ala1 の立体構造は構造と活性の維持のために極めて重要であると考えられる。

Ala1 の側鎖をエチル基または n-プロピル基に置換した誘導体を作成された (図 1.8 (b), (c)) [23]。P388 細胞における実験では IC₅₀ がそれぞれ 0.0076, 0.026 µg/ml であり、置換した残基の側鎖の炭素鎖が長くなるにつれて、活性が RA-VII (0.0023 µg/ml) よりも弱くなることが報告された。また、D-Ala1 をグリシンに置換した誘導体のコンフォ

¹ RA-VII の細胞毒性実験は論文ごとで改めて実験されており IC₅₀ の値にはばらつきがある

メーション (図 1.8 (d)) は RA-VII と主鎖の構造はほとんど変わらないことが NMR による観察によって知られている [36]。さらに、 CDCl_3 中での NMR で confs. A と B の存在比が A:B=89:11 と RA-VII と同じであった。活性を示す IC_{50} も $0.0014 \mu\text{g/ml}$ と RA-VII ($0.0038 \mu\text{g/ml}$) よりも若干弱い。これらの結果から Ala 1 の側鎖がエチル基または n-プロピル基に置換されることが構造や活性に与える影響は L 体に置き換わることに比べれば小さいことがわかる。

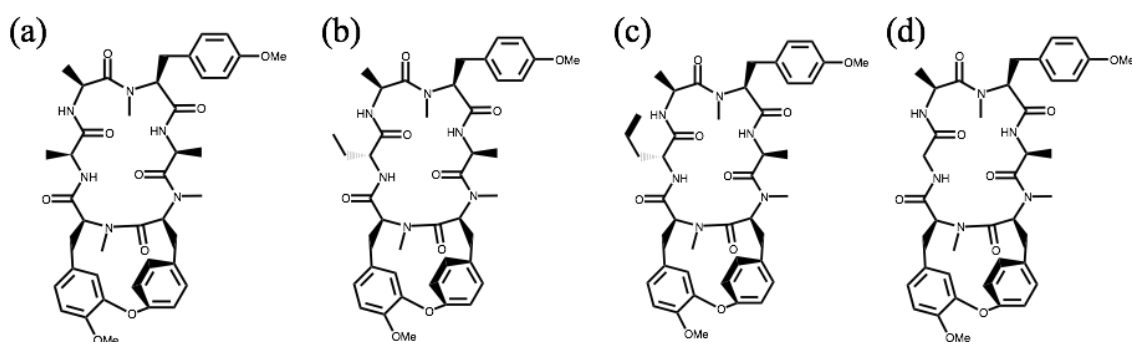


図 1.8 Ala1 誘導体の構造式

(a) Ala1 のエピマー (b) 1 残基目の側鎖をエチル基に置換した誘導体 (c) 1 残基目の側鎖をノルマルプロキル基に置換した誘導体 (d) Ala1 をグリシンに置換した誘導体

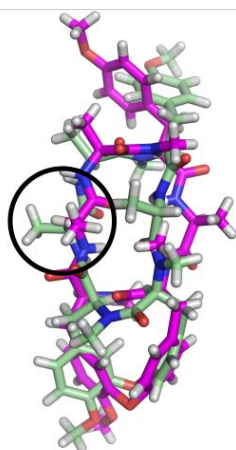


図 1.9 Ala1 のエピマーの X 線結晶構造 [28, 35]

マゼンタ：エピマー 薄緑：RA-VII

黒い円は置換された Ala1 の箇所を示す

1.4.5.2 L-Ala2 と活性の関連性

Ala2 も Ala 1 同様に L-Ala2 を D-Ala2 としたエピマーが合成された (図 1.10 (a)) [20]。NMR スペクトルでは単一のコンフォメーションが観察され、その主鎖は X 線結晶構造の主鎖と一致している (図 1.11)。このコンフォメーションにおけるペプチド結合の立体配座は、通常の RA-VII の conf. A の立体配座と同じであったが、Ala2 側鎖の立体位置が大きく異なっていた。P388 細胞における実験では IC_{50} が $8.5 \mu\text{g/ml}$ と RA-VII ($0.0023 \mu\text{g/ml}$) に比べて非常に弱く、1 残基目と 2 残基目の立体空間が活性に重要であることを示唆した。

グリシンに置換した誘導体 (図 1.10 (b)) は 3 個以上のコンフォメーションが存在し、構造の決定が行われていない [36]。しかし、P388 細胞における実験では IC_{50} が $0.032 \mu\text{g/ml}$ と RA-VII ($0.0038 \mu\text{g/ml}$) と比較して弱かった。

RA-VII の主要なコンフォメーションである conf. A と conf. B のどちらが活性構造であるかを明らかにするため、Ala2/Tyr3 間のペプチド結合の立体配座を固定するように設計された誘導体を作成された。RA-VII の conf. A と conf. B の主な違いは Ala2 と Tyr3 の間のペプチド結合の立体配座であり、conf. A は *trans* 型であるが conf. B は *cis* 型である。図 1.10 (c) と (d) の L-Ala2 をプロリンまたはピペコリン酸に置換することで、Ala2/Tyr3 間のペプチド結合を *trans* 型に固定した誘導体は conf. A の立体配座を取る誘導体である。P388 細胞における IC_{50} はどちらの誘導体も $0.079 \mu\text{g/ml}$ であった。

RA-VII ($0.0013 \mu\text{g/ml}$) と比較すると活性が 60 倍弱くなるが、活性が維持されていることがわかる [37]。この Ala2/Tyr3 間のペプチド結合をトリアゾールによって *cis* 型に固定した誘導体 (図 1.10 (e)) では、 IC_{50} が $10 \mu\text{g/ml}$ 以上で RA-VII の IC_{50} ($0.0027 \mu\text{g/ml}$) と比較して 3700 倍以上も活性が弱くなる [23]。これらの結果から conf. A が主要な活性構造であると考えられている。

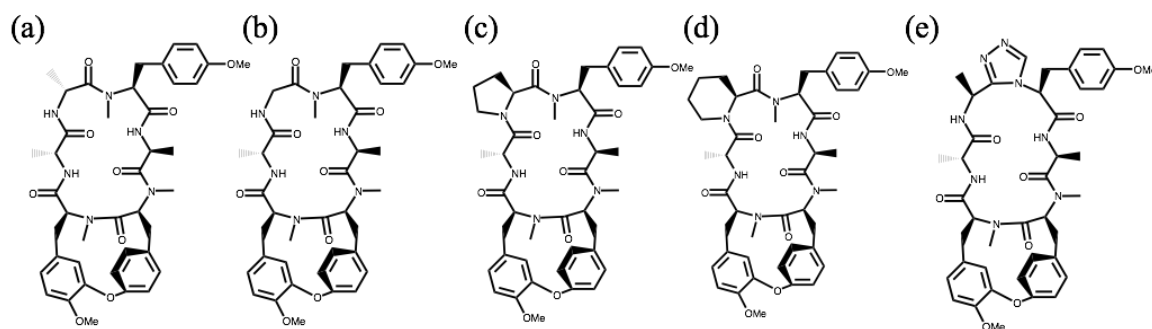


図 1.10 Ala2 の誘導体の構造

- (a) Ala 2 のエピマー (b) Ala 2 をグリシンに置換した誘導体 (c) Ala2 をプロリンに置換した誘導体 (d) 2 残基目にピペリジンを付加した誘導体 (e) ペプチド結合をトリアゾールによって固定した誘導体

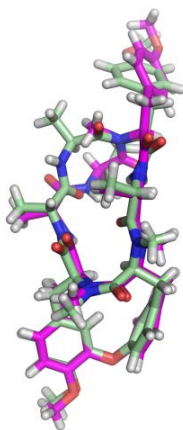


図 1.11 Ala2 のエピマーの X 線結晶構造 [28, 35]

マゼンタ：エピマー 薄緑：RA-VII

1.4.5.3 L-Tyr3 と活性の関連性

RA-VII の類縁体である RA-V の L-Tyr3 のメトキシ基が水酸基に置換された誘導体 (図 1.12 (a))、また水素に置換された誘導体 (図 1.12 (b)) が作成された [39]。水酸基に置換された誘導体の活性を示す IC_{50} の値は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上、水素に置換された誘導体での値は $0.031 \mu\text{g/ml}$ といずれも RA-VII ($0.0013 \mu\text{g/ml}$) および RA-V ($0.0027 \mu\text{g/ml}$) の活性よりも弱くなることが明らかとなった。

RA-VII の Tyr3 を Gly に置換されたペプチドが合成された (図 1.12 (c)) [40]。L1210 細胞 (マウス由来リンパ球性白血球) における活性を示す IC_{50} の値は $10 \mu\text{g/ml}$ 以上であった。加えて、Tyr3 の側鎖の動きを制限することを目的に 5 と 6 残基と同じようにシクロイソジチロシン構造で Tyr3 の側鎖を固定した誘導体 (図 1.12 (d)) が作成された [41]。P388 細胞の細胞毒性実験より得られた、この化合物の活性を示す IC_{50} の値は $7.5 \mu\text{g/ml}$ で、RA-VII ($0.0015 \mu\text{g/ml}$) よりも弱いことがわかった。これらのことから Tyr3 の側鎖は活性と密接な関係があることが考えられ、活性部位の 1 つであると考えられている。

RA-VII と RA-V の L-Tyr3 のカルボキシル基を硫黄に置換している誘導体 (図 1.12 (e)) が作成された。いずれの誘導体も元々の化合物よりも活性が高いことが P388 細

胞及び KB 細胞（ヒト由来口腔類表皮がん細胞）における毒性実験の結果により明らかとなっている [42]。しかし、水素に置換した誘導体（図 1.12 (f)）では P388 細胞の実験によって IC_{50} が 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった [43]。このことから活性に電気陰性度の高い原子の付加が重要であることが示唆される。

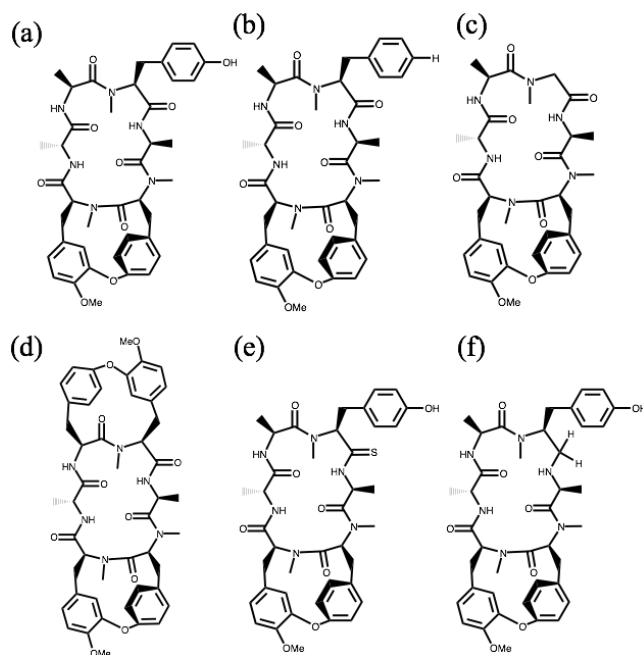


図 1.12 Tyr3 の誘導体の構造

(a) Tyr3 のメトキシ基が水酸基の誘導体 (b) Tyr3 のメトキシ基が水素の誘導体 (c) Tyr3 をグリシンに置換した誘導体 (d) Tyr3 側鎖の回転を制限した誘導体 (e) カルボニル基の酸素を硫黄に置換した誘導体 (f) カルボニル基の酸素を水素に置換した誘導体

1.4.5.4 L-Ala4 と活性の関連性

Ala4 のエピマー（図 1.13 (a)）は、NMR では 3 つのコンフォメーションが観察された [35]。その主要なコンフォメーションは、Ala4 のエピマーの X 線結晶構造と一致している。そのコンフォメーションの配座は RA-VII の conf. B と同じであった（図 1.14）。P388 細胞における実験では IC_{50} が 8.1 $\mu\text{g/ml}$ と非常に活性が低かった。

グリシンに置換した誘導体（図 1.13 (b)）ではコンフォメーションの存在率が RA-VII と大きく異なる [36]。RA-VII では confs. A と B の存在率の比は A:B=89:11 で

あるが、この誘導体では A:B=28:72 であった。P388 細胞における実験では IC_{50} が 0.16 $\mu\text{g/ml}$ と RA-VII と他のグリシン誘導体と比較して弱く、活性を持たない conf. B の存在率が高いことが要因の 1 つとして論文著者らは考えている。

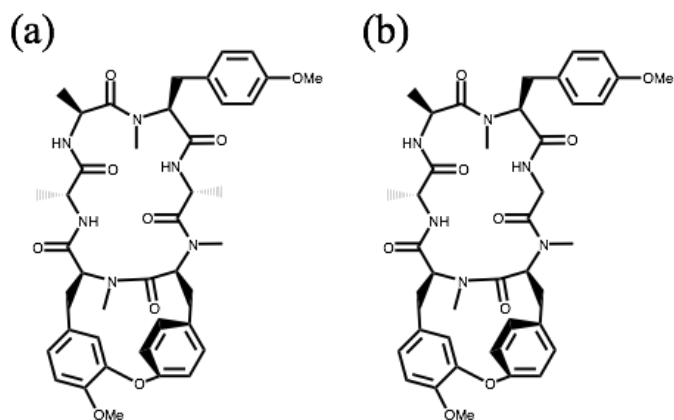


図 1.13 Ala4 の誘導体の構造

(a) Ala4 のエピマー (b) Ala 4 がグリシンに置換された誘導体

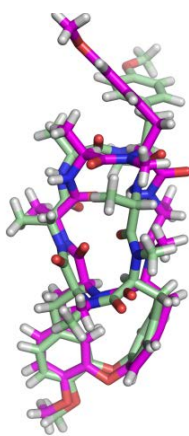


図 1.14 Ala4 のエピマーの X 線結晶構造 [28, 35]

マゼンタ：エピマー 薄緑：RA-VII

1.4.5.5 L-Tyr5 と活性の関連性

水溶性の向上を目的として Tyr6 のカルボニル基の酸素を水素に置換した [Tyr-5- ψ (CH₂NMe) -Tyr-6]RA-VII が作成された (図 1.15) [44]。この誘導体の活性は 5.0 $\mu\text{g/ml}$ で RA-VII の 0.0043 $\mu\text{g/ml}$ よりも約 1200 倍弱くなることが明らかとなった。

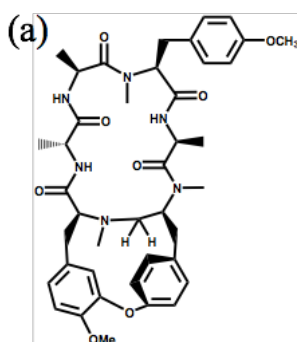


図 1.15 Tyr5 の誘導体の構造 [44]

1.4.5.6 L-Tyr6 と活性の関連性

L-Tyr6 の側鎖はメトキシ基がある。この箇所が水酸基である RA-V (図 1.16 (a) も RA-VII 同様に活性が高いことが知られている [17]。RA-V の水酸基に置換された誘導体 (図 1.16 (b))、言い換えると RA-VII のメトキシ基が水素に置換された誘導体の活性は $0.0025 \mu\text{g/ml}$ で RA-V の活性 ($0.0027 \mu\text{g/ml}$) と同等であった [39]。そのため、14 員環と Tyr3 の側鎖ではメトキシ基の役割が異なると考えられる。

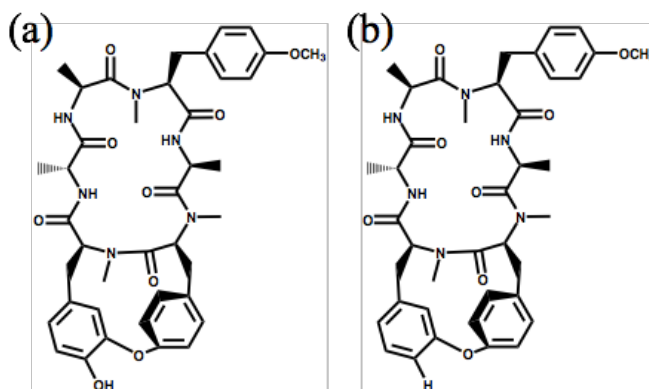


図 1.16 Tyr6 の誘導体の構造 [17, 39]

(a) Tyr6 のメトキシ基が水酸基になっている (RA-V)

(b) Tyr6 のメトキシ基が水素となっている

1.4.5.7 その他の構造と活性の関連性

Tyr5 と Tyr6 を Gly に置換した誘導体 (図 1.17 (a))、および Tyr5 と Tyr6 からな

る誘導体が作成された (図 1.17 (b)) [45]。これらの誘導体は 18 員環および 14 員環だけの誘導体となる。L1210 細胞における細胞毒性実験の結果、どちらの誘導体も活性が 500 倍以上弱かった。しかし、14 員環に *tert*-ブトキシカルボニル基のような長い側鎖がついた誘導体 (図 1.17 (c)) では RA-VII や RA-V よりも弱いながらも活性を有していた (IC_{50} 0.06 μ g/ml)。この結果から 14 員環が活性部位として重要であると考えられている。しかし、Tyr3 の側鎖がない誘導体 [40]、ないし 2 つの 14 員環と 18 員環しかない誘導体 (図 1.17 (d)) [41]では活性を示さなかった。

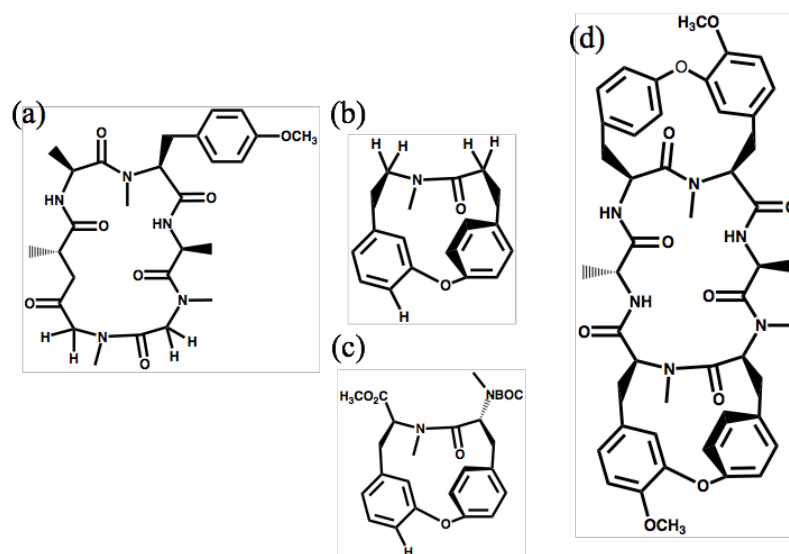


図 1.17 14 員環、18 員環の誘導体の構造

(a) 18 員環 (b) 14 員環 (c) 14 員環の誘導体

(d) 14 員環が 2 つ結合した誘導体

これらの結果から、活性部位は Tyr3 の側鎖と、14 員環であることが分かった。しかし、その 2 つの部位だけで活性を示す事は出来ず、強い活性を示すためには 18 員環の影響が大きい事が示された。よって、活性部位は Tyr3 と 14 員環であり、その 2 つの適切な立体位置を 18 員環が保つことで活性が示されることが重要であると考えられる。

1.4.6 RA-VII の分子シミュレーションによる先行研究

本項では RA-VII のこれまでの理論研究について述べる。

1.4.6.1 分子動力学シミュレーション

1990 年に Morita らによって分子動力学法 (MD) シミュレーションが行われた [26]。このシミュレーションは RA-VII のコンフォメーションの探索を目的としたものである。温度は 1000 K で 100 ps のシミュレーションであった。計算量を少なくするために、構造的な変化が大きいと考えられる Tyr3 を Ala に置換したペプチドを用いている。また、高い温度で水素結合の形成を維持するため Ala1 と Ala4 の距離を 3.5 Å 以内になるように制限している。

このシミュレーションの結果、2 つのコンフォメーションが観察された。そのコンフォメーションは conf. A と B と同じであると考えられた。このシミュレーションでは conf. C と同様のコンフォメーションは観察されなかった。この結果から森田らは conf. C は非常に不安定な構造であると報告している。

ラマチャンドラン・ダイアグラムでは conf. A は II 型 β ターン、conf. B は VI 型 β ターンを形成していることが明らかとなった。表 1.3 に β ターンを取っていた場合の二面角の平均値を示す [46]。VI 型 β ターンはそれぞれの分類分けより 40 度は異なる場合を指すため、一般的には未分類の β ターンは全て VI 型に含まれる [47]。

表 1.3 β ターンの二面角 (度) の平均値 [31]

	$\phi (i+1)$	$\psi (i+1)$	$\phi (i+1)$	$\psi (i+1)$
I	—64	—27	—90	—7
II	—60	131	84	1
VIII	—72	-33	—123	121
I'	55	38	78	6
II'	60	—126	—91	1
VIa1	—64	142	—93	5
VIa2	—132	139	—80	—10
VIb	—135	131	—76	157
IV	-61	10	—53	17

1.4.6.2 モンテカルロシミュレーション

Boger らによって THF 溶媒を考慮したモンテカルロシミュレーションが行われた [27]。その結果、conf. A と conf. B のエネルギー差、conf. A と conf. C のエネルギー差がそれぞれ 1.3 kcal/mol、2.4 kcal/mol であった。エネルギー差から求めた存在率

は THF の NMR での観察結果と定性的に一致していた。

1.4.6.3 定量的構造活性相関

2009 年に Yan らによって二次元と三次元の定量的構造活性相関 (QSAR) が行われた [48]。その結果、1 残基目と 4 残基目の間に形成される分子内水素結合が活性に重要であることが示された。

1.5 本論文の目的

RA-VII のコンフォメーションの探索についてはシミュレーションが行われている。しかし、RA-VII の 3 つのコンフォメーションが溶液中で、どの程度安定であり、どのような動きを示すのかについては明らかとなっていない。そこで RA-VII の 3 つのコンフォメーションにおいて量子化学計算と分子動力学計算を用いて溶液中での構造安定性および動きを解析する。

2 手法

本章では本研究で用いた2つの計算手法、量子化学計算と分子動力学シミュレーションについて述べる。

2.1 量子化学計算

本節では RA-VII の電子状態を計算するために用いた、量子化学計算について述べる。

2.1.1 量子化学

分子や原子、電子のような非常に小さな粒子に関する微視的な現象は、ニュートン力学で記述されるような巨視的な現象とは異なる部分があり、量子力学によって解析が行われる。その量子力学を化学現象の解析に用いる分野を量子化学と呼ぶ。量子化学計算によって化合物の電子状態を計算する事が可能となった。これを利用して化合物の構造や反応などについて解析することが可能である。

2.1.2 シュレーディンガー方程式

光は波動性と粒子性という2つの性質を併せ持つ事が知られている。これを二重性と呼ぶ。光の波動性については、光が回折や干渉を生じる事によって知られてきた。粒子性に関しては1905年、Einsteinによる光電効果によって示された。光電効果とは、金属表面に紫外線を当てた場合に放出される電子の初速度は、紫外線の波長だけにより決定する、という現象である。

de Broglie は二重性が光だけではなく、電子などの粒子にも適用できると考えた。この考えを Schrödinger が活かして、粒にも波動性があるという方程式を考案した。その思考過程についてみることにする。

位相速度 v で空間を伝わる波の方程式は

$$\nabla^2\psi - \frac{1}{v^2}\frac{\partial^2\psi}{\partial t^2} = 0$$

である。この時 ∇^2 はラプラシアンと呼ばれる演算子である。単色波の場合は

$$\psi(\mathbf{r}, t) = \varphi(\mathbf{r})e^{-2\pi i\nu t}$$

とおく。 ν は周波数である。この式を波の方程式に代入すると

$$\nabla^2 \varphi(\mathbf{r}) e^{-2\pi i \nu t} - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \varphi(\mathbf{r}) e^{-2\pi i \nu t}}{\partial t^2} = 0$$

となる。時間 t で二階微分を行うと

$$\nabla^2 \varphi + \frac{4\pi^2 \nu^2}{v^2} \varphi = 0$$

が得られる。 $\frac{v}{\nu} = \lambda$ より

$$\nabla^2 \varphi + \frac{4\pi^2}{\lambda^2} \varphi = 0$$

が得られる。de Broglie の関係式 $\frac{h}{p} = \lambda$ より

$$\nabla^2 \varphi + \frac{4\pi^2 p^2}{h^2} \varphi = 0 \quad (2.1)$$

が得られる。エネルギー ε は運動エネルギーとポテンシャルエネルギー $V(\mathbf{r})$ の和である。

$$\varepsilon = \frac{p^2}{2m} + V(\mathbf{r})$$

これを (2.1) の式に代入すると

$$\nabla^2 \varphi + \frac{2m}{\hbar^2} \{\varepsilon - V(\mathbf{r})\} \varphi = \varepsilon \varphi$$

となる。この際の \hbar はディラック定数というプランク定数 h を 2π で割った値である。上記の式を変形し

$$\nabla^2 \varphi + \frac{2m}{\hbar^2} \varepsilon \varphi - \frac{2m}{\hbar^2} V(\mathbf{r}) \varphi = 0$$

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}) \right\} \varphi(\mathbf{r}) = \varepsilon \varphi$$

という式となる。この式を、時間を含まない Schrödinger 方程式と呼ぶ。実際、実験との比較で、この式が正しいエネルギー準位を与えることが示された。

また、単色波の式に de Broglie の式 $\varepsilon = h\nu$ を加えると

$$\psi(\mathbf{r}, t) = \varphi(\mathbf{r}) e^{-\frac{i\varepsilon t}{\hbar}}$$

と書くことができる。これを時間 t で微分すると

$$i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t} = \varepsilon \psi$$

となる。時間を含まない Schrödinger 方程式の両辺の右側から $e^{-\frac{i\epsilon t}{\hbar}}$ をかけると

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}) \right\} \varphi(\mathbf{r}) e^{-\frac{i\epsilon t}{\hbar}} = \epsilon \varphi(\mathbf{r}) e^{-\frac{i\epsilon t}{\hbar}}$$

$\psi(\mathbf{r}, t) = \varphi(\mathbf{r}) e^{-\frac{i\epsilon t}{\hbar}}$ より

$$\left\{ -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}, t) \right\} \psi(\mathbf{r}, t) = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(\mathbf{r}, t)$$

となる。これが時間を含む Schrödinger 方程式である。こちらも実験との比較で、正しい答えを与えることが示された。

ポテンシャルエネルギー $V(\mathbf{r}, t)$ から導かれる場の中で運動する質量 m の粒子の振る舞いは上記の式より求める事ができる。時間を含む Schrödinger 方程式の左辺の括弧の中を H と置き換える。 H はハミルトニアンと呼ばれる演算子であり、

$$H \equiv -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}, t) = -\frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) + V(\mathbf{r}, t)$$

を意味する。粒子の運動エネルギーは $\frac{1}{2} m v^2$ であるから、粒子のエネルギーは

$$\frac{1}{2} m (\dot{x}^2 + \dot{y}^2 + \dot{z}^2) + V(\mathbf{r}, t)$$

である。ここで運動量 $\mathbf{p} = m\mathbf{v}$ を用いると

$$H_{cl}(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = \frac{1}{2m} (p_x^2 + p_y^2 + p_z^2) + V(\mathbf{r}, t)$$

となる。 H と H_{cl} を比較する。例えば、 x では

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2}{\partial x^2} = \frac{1}{2} m p_x^2$$

よって p_x は $-i\hbar \frac{\partial}{\partial x}$ と対応する。これは y や z でも同じであり、ベクトルとしてまとめると

\mathbf{p} は $-i\hbar \nabla$ と対応する。これを用いると時間を含めた Schrödinger 方程式は

$$H\psi = i\hbar \frac{\partial \psi}{\partial t}$$

となる。

ここまで電子が1つある件について考えてきた。複数の電子がある場合には、この方程式は多体のハミルトニアンを用いて、以下のように拡張される。

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N, t) = H(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N, t) \psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N, t)$$

この方程式の解を解析に用いることができる。これに対し、一般の場合には解析的な解を求めることができない。したがって、数値的に答えを求める必要がある。

水素原子の電子は、クーロン力によって原子核を中心に電子が周回していると考えられる。その電子の運動は Schrödinger 方程式によって求める事が可能である。電子の周回をハミルトニアンで表すと

$$H = \frac{p^2}{2m_e} + V(r)$$

となる。 m_e は電子の質量である。 $V(r)$ は原子核と電子のクーロン力である。そして周回の運動における固有関数の値は、

$$\psi_{\mathbf{p}}(\mathbf{r}) = Y_{\lambda}(\theta, \phi) R_{\mathbf{p}\lambda}(\mathbf{r})$$

と表される。 Y_{λ} は球面調和関数である。球面調和関数とは多項式を球面に制限した際に得られる関数である。

また、動径方向の Schrödinger 方程式は

$$\left(\frac{d^2}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{d}{dr} \right) R_{nl} + \frac{2m_e}{\hbar^2} \left[E + \frac{Ze^2}{r} - \frac{l(l+1)\hbar^2}{2m_e r^2} \right] R_{nl} = 0$$

となる。また、この場合に動径関数 $R_{\mathbf{p}\lambda}(\mathbf{r})$ は n と l で決定される関数

$$R_{nl}(r) = - \left[\left(\frac{2Z}{n} \right)^3 \frac{(n-l-1)!}{2n[(n+1)!]^3} \right]^{\frac{1}{2}} \exp\left(-\frac{Zr}{n}\right) \left(\frac{2Zr}{n} \right)^l L_{n+1}^{2l+1}\left(\frac{2Zr}{n}\right)$$

となる。 n を主量子数、 l を方位量子数と言う。この2つは動径固有関数を特徴づける数である。 L_{n+1}^{2l+1} はLaguerreの随伴多項式である。この多項式によって $n \geq 1$ 、 $n \geq l+1$ と制限を受けるため、固有エネルギー E は

$$E = \frac{m_e Z^2 e^2}{2\hbar^2 n^2}$$

となる。

電子数が2個以上の状態(多電子系)では、電子同士の相互作用を計算する必要がある。多電子系の計算量は膨大であり、電子の波動関数を決定する事は困難である。そのため、近似して計算を行う必要がある。この近似の中でも比較的簡便である近似がHartree-Fock近似である。Hartree-Fock方程式は全電子の波動関数を1つのSlater

行列式というもので与える。ある電子は他の電子からの平均場を感じながら動いているという独立電子モデルを採用している。この近似が量子化学計算ではより高精度な計算を行う上での土台となる。

2.1.3 基底関数

多電子の相互作用を計算する際に用いる近似的な分子軌道を表現するために、基底関数が用いられる。基底関数の線形結合によって対象となる関数を表現することができる。原子軌道の重ね合わせは原子軌道の線形結合 (LCAO: Linear Combination of Atomic Orbitals) に近似することが一般的である。

多電子系は各電子間の相互作用が近似されている。多電子系の電子といえども、水素原子の電子と同じ性質の電子であると想定される。そこで多電子系の電子も、水素原子の電子と同様の電子の広がりをするを仮定し、原子軌道関数として用いる。この多電子系を見積もるために用いる近似的な波動関数を Slater Type Orbital (STO) と言う。一般的には、この STO を Gauss 型関数で近似した Gaussian Type Orbital (GTO) を用いる事が一般的である。しかし、GTO は STO とは違い、原点では値が丸まってしまい、原点から離れると急速に値が減少してしまうという違いがある。そのため、GTO を用いる場合には複数の関数の重ね合わせが必要である。

$$\chi(r) = \sqrt{N}(x-X)^l(y-Y)^m(z-Z)^n \exp(-\alpha\{(x-X)^2+(y-Y)^2+(z-Z)^2\})$$

$$N = \frac{2^{2(l+m+n)+\frac{3}{2}}\alpha^{l+m+n+\frac{3}{2}}}{(2l-1)!!(2m-1)!!(2n-1)!!\pi^{\frac{3}{2}}}$$

X, Y, Z は原子核の座標、 x, y, z は電子の座標である。 $l+m+n$ は原子軌道の方位量子数を示している。 α は正の定数で基底関数の広がりを表しており、 α が大きいと電子分布が中心に集中していることを意味している。

本論文では 6-311G (d,p) を用いた。6-311G は内核軌道に 6 個の GTO を、原子価軌道を 3 分割し、それぞれに 3 個、1 個、1 個の GTO を割り当てている事を意味している。(d,p) は分極関数である。これは分子の軌道が実際は球対称ではない事を表現するために組み込まれた関数である。p 型関数は水素原子の分極を、d 型関数は水素以外の原子の分極を与える。p 型関数は方位量子数が 1 である。 x, y, z 軸のいずれかを軸とした団子状の形状をとる。d 型関数は方位量子数が 2 の関数で、クローバーの葉と揶揄される p 型関数よりも複雑な 5 つの形状をとる。

2.1.4 密度汎関数法

従来、エネルギー計算では複数の電子の状態を1つのスレータ行列式で近似するHartree-Fock法が用いられてきた。Hartree-Fock法ではfull CI計算による正確に算出された全エネルギーとの間で約1%の誤差が生じることが指摘されていた[49]。このエネルギー誤差を電子相関と呼ぶ。そこで電子相関を考慮した計算法(Møller-Plesset法、CI法、カップルドクラスター法など)が開発されたが、これらの計算量が膨大になる。

Hohenberg と Kohn によって電子密度が決まれば系の基底状態のエネルギーが決定されることが証明された[50]。その後、Kohn と Sham によってコーン-シャム方程式が提案され多用されるようになった。この密度汎関数理論を量子化学計算に用いたのが密度汎関数法である。

B3LYP 混成汎関数[51]は量子化学計算でよく使われている汎関数である。しかし、B3LYP にも様々な問題点がある。その1つとして、交換相互作用が不正確であることがあげられる。電子密度は各電子の配置によって決定するパラメータであり、各電子の間の相互作用を示すものではない。よって、長距離力が計算に組み込まれないため、長距離力の分だけ誤差が発生してしまう。そのため、この点を補正した計算手法が開発された。このような計算手法としてLC(Local-range corrected)-B3LYPがある。本研究ではYanaiらによってLC-B3LYPを改善したCAM(Coulomb-attenuating method)-B3LYP[52]を利用し、量子化学計算ソフトウェアGaussian[53]によって量子化学計算を行った。

2.1.5 溶媒効果

量子化学計算において、目的の物質の周囲に存在する溶媒分子を個々に計算すると膨大な計算量を必要とされる。一方、溶質にとって溶媒の作り出す誘電場の影響は非常に大きく、それを考慮する必要がある。そこで個々の溶媒分子の作り出す場の代わりに、溶媒を連続誘電体とみなし、その分極場の影響を考える。これを連続誘電体モデル(polarizable continuum model: PCM)と呼び、量子化学計算においては、溶媒効果を考慮した計算はよく用いられる[54]。本研究での量子化学計算における溶媒としてDimethyl sulfoxide(DMSO)の溶媒効果はPCMを用いた。後に説明する分子動力学シミュレーションでは、連続体モデルは用いず、個々の溶媒分子を計算している。

2.1.6 計算条件

3つのコンフォメーションのうち conf. A は、RA-VII の X 線結晶構造 (CCDC: 847331) [28]として既知の構造であるため、この座標情報を用いた。残り2つの構造については、conf. A の構造をソフトウェア Avogadro [55]を用いて Ala2/Tyr3 間、Ala4/Tyr5 間のペプチド結合の配座情報を変更し、conf. B と conf. C の初期構造を作成した。この後、計算量の少ない計算法を用いて構造最適化計算を行い、算出した構造をより精度の高い計算法で計算し直すという手順を繰り返した。以下が、この際に用いた計算法の並びである。(HF/STO-3G、HF/3-31G (d)、HF/6-31G (d,p)、B3LYP/6-31G (d,p)、CAM-B3LYP/6-31G (d,p)、CAM-B3LYP/6-311G (d,p))。これらの計算は全て溶媒効果を含んでいない。最終的に CAM-B3LYP/6-311G (d,p) で得られた構造を最適化構造とした。この構造を DMSO の溶媒効果を加えて CAM-B3LYP/6-311G (d,p) の条件で構造最適化計算を行った。また、この時に得られた構造を用いて振動解析を行い、Gibbs 自由エネルギーを得た。

2.2 分子動力学 (MD) シミュレーション

本節では MD シミュレーションについて述べる。

2.2.1 MD シミュレーション

ニュートンの運動方程式によって、主に原子の重心の位置と速度を数値的に解くことによって原子の振る舞いを求める。

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t) \quad (i = 1, 2, \dots, N)$$

\mathbf{r}_i は原子 i の位置、 m_i は原子 i の質量、 \mathbf{F}_i は原子 i に働く力を示している。

2.2.2 周期境界条件

生体分子は非常に多くの分子で構成されているが、MD シミュレーションの系を同等の環境にすることは計算量が膨大になり非常に難しい。そこで計算の系を基本セルとして、基本セルが連続して並んでいる領域として扱う。これによって多くの分子との相互作用を考慮することができる。

2.2.3 エワルド法

周期境界条件によって、計算が行われる基本セルを周囲にはあたかも無限大に分子

が存在するように扱われる。そのため、それぞれの分子との非結合的な相互作用の計算は膨大である。よって、通常の計算では距離 r を設定し、半径 r の範囲内にある分子との相互作用のみ考慮する。しかし、クーロン相互作用のように長距離に働く力では、カットオフ値を設定するよりもむしろ無限遠の長距離力を考慮した方が良い結果を得られる。

2.2.4 分子力場

分子力場とは、分子のポテンシャルエネルギーを算出するために用いられる関数である。分子シミュレーションの研究において広く普及している力場の 1 つに Amber 力場がある。Amber 力場のパラメータを下記に示す。

$$E_{\text{pair}} = \sum_{\text{bonds}} K_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 \\ + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]$$

r_{eq} と θ_{eq} は平衡構造における結合長と結合角の値である。 K_r と K_θ 、 V_n は定数である。 n は多重度、 γ はねじれ角の位相度を示している。式の右辺の第一項は結合長について、第二項は結合角について、第三項は二面角について、第四項は非結合の相互作用である van der Waals 力と静電力に関するポテンシャルエネルギーである。

van der Waals 力は Lennard-Jones (LJ) ポテンシャルによって表現される。LJ ポテンシャルは 2 つの原子間に働く力の経験的なモデルの 1 つである。LJ ポテンシャルの第一項は原子同士が接近する際に発生する斥力を示している。これは同じ状態の 2 つの粒子が 1 つの場所を占めることができないパウリの排他律に基づく。第二項はロンドン分散力による引力を示している。無極性分子であっても電子の存在は確率的に分布しているため、一時的に極性を帯びる可能性が存在する。第二項は、このような瞬間的な双極子相互作用を示す。静電相互作用は 2 つの電荷をもつ粒子の間に働く力である。

Amber 力場は生体物質の力場が主である。一般的に、それ以外の化合物に関しては、研究者自身で力場を作成する必要があった。しかし、この労力は非常に大きいという問題点がある。そのため、Amber 力場を利便的に生体物質以外の化合物に適応する事が出来る General Amber Force Field (GAFF) が開発された [56]。RA-VII も D 体アミノ酸や収束を受けたアミノ酸を含むため、通常の力場ではなく GAFF 力場を利用した。

RA-VII の力学的パラメータは AmberTools に含まれているアプリケーションの 1 つである Antechamber を用いて作成した。これによって構造式より、結合長、結合角、二面角にパラメータを割り振り、力場を構築する事が出来る。この際の力学的パラメータは Amber99 のものである。電荷パラメータは Gaussian によって HF/6-31G (d) の条件で RESP 電荷を計算して用いた。RESP 電荷とは原子電荷モデルの 1 つで、van der Waals 半径の外の評価点において量子化学計算の結果得られた静電ポテンシャルと、電子電荷から得られる静電ポテンシャルの差が小さくなるようにフィッティングされているモデルである [57]。

2.2.5 運動方程式の近似

分子動力学シミュレーションでは運動方程式を時間刻み Δt に対して数値的に解く。時刻 $t + \Delta t$ の時の原子位置を $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ を時刻に関し t の周りでテイラー展開すると

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} + \frac{\Delta t^2}{2!} \frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} + \frac{\Delta t^3}{3!} \frac{d^3\mathbf{r}_i(t)}{dt^3} + \dots$$

となる。3 次までの式にニュートンの運動方程式 $m_i \frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t)$ と $\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} = \mathbf{v}(t)$

を代入すると

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \Delta t \mathbf{v}_i(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i} \mathbf{F}_i(t) + \frac{\Delta t^3}{6} \frac{d^3\mathbf{r}_i(t)}{dt^3}$$

となる。この式の Δt を $-\Delta t$ に変化した式

$$\mathbf{r}_i(t - \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) - \Delta t \mathbf{v}_i(t) + \frac{\Delta t^2}{2m_i} \mathbf{F}_i(t) - \frac{\Delta t^3}{6} \frac{d^3\mathbf{r}_i(t)}{dt^3}$$

を加算すると

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_i(t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_i} \mathbf{F}_i(t)$$

となる。この式によって、現在の位置情報 $\mathbf{r}_i(t)$ と力 $\mathbf{F}_i(t)$ 、そして過去の位置情報 $\mathbf{r}_i(t - \Delta t)$ がわかっているならば、未来の位置情報である $\mathbf{r}_i(t + \Delta t)$ が計算できる。また、速度の計算に関しては

$$\mathbf{v}_i(t) = \frac{\mathbf{r}_i(t + \Delta t) - \mathbf{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t}$$

によって求めることができる。この 2 つの式が Verlet 法の基本式である。また、桁落ちなどの計算における工夫がなされた速度ベルレ法が存在する。

かえる跳び法は、時間刻み中点の平均加速度をその時間刻み内の加速度として扱う。

このため $t + \frac{\Delta t}{2}$ 後の速度は

$$\mathbf{v}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \frac{\Delta t}{m_i} \mathbf{F}_i(t)$$

となる。また、 $\mathbf{v}_i(t + \Delta t/2)$ を用いて、 $t + \frac{\Delta t}{2}$ 後の位置は

$$\mathbf{r}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t$$

となる。本研究ではかえる跳び法を用いた。

2.2.6 拘束

分子動力学シミュレーションでは原子間の距離や角度を保つために一定の値に保つ必要がある。原子 α と原子 β の距離を一定の値 d_k に保つ場合の拘束条件は

$$g_k = |\mathbf{r}_\alpha - \mathbf{r}_\beta|^2 - d_k = 0$$

を満たしながら運動方程式を解くことが必要となる。そのため、運動方程式は

$$m_\alpha \mathbf{a}_\alpha = \mathbf{F}_\alpha + \sum_{k=1}^K \lambda_k \frac{\partial g_k}{\partial \mathbf{r}_\alpha}$$

となる。 K は拘束条件の数を示しており、 λ_k はラグランジュの未定乗数である。ラグランジュの未定乗数とは条件付き関数の極値を求める方法に用いられる値である。この運動方程式を先に出た Verlet 法の基本式に当てはめると

$$\mathbf{r}_\alpha(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\alpha(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_\alpha} [\mathbf{F}_\alpha(t) + 2\lambda_k (\mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\beta(t))]$$

となる。非拘束の Verlet 法の値を $\mathbf{r}'_\alpha(t + \Delta t) = 2\mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\alpha(t - \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_\alpha} \mathbf{F}_\alpha(t)$ として代入すると

$$\mathbf{r}_\alpha(t + \Delta t) = \mathbf{r}'_\alpha(t + \Delta t) + \frac{\Delta t^2}{m_\alpha} \{\mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\beta(t)\} \lambda_k$$

となる。この \mathbf{r}_α と \mathbf{r}_β についての式を上記の拘束条件の式に代入すると

$$\left[2\Delta t^2 \left(\frac{1}{m_\alpha} + \frac{1}{m_\beta} \right) \{\mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\beta(t)\} \right]^2 \lambda_k^2$$

$$+ \left[2\Delta t^2 \left(\frac{1}{m_\alpha} + \frac{1}{m_\beta} \right) \{ \mathbf{r}_\alpha(t) - \mathbf{r}_\beta(t) \} \{ \mathbf{r}'_\alpha(t + \Delta t) - \mathbf{r}'_\beta(t + \Delta t) \} \right] \lambda_k \\ + \{ \mathbf{r}'_\alpha(t + \Delta t) - \mathbf{r}'_\beta(t + \Delta t) \}^2 - d_k = 0$$

となる。この式は λ_k の二次方程式である。拘束条件 K の数だけ λ_k が存在するため、実際には K 個の二次関数が存在することとなる。この二次元方程式を反復法の1つであるニュートン・ラフソン法を用いて計算を行うのが **SHAKE** と呼ばれる拘束アルゴリズムである。ニュートン・ラフソン法 (Newton-Raphson method) はある値 x_0 を取り、次の式を収束するまで解くと x の近似解が得られる。

$$x_{n+1} = x_n - \frac{f(x_n)}{f'(x_n)}$$

LINCS (Linear Constraint Solver) は Hess などによって開発された代替的な拘束アルゴリズムである [58]。ラグランジュ乗数を拘束力に適用し、ヤコビ行列の逆数を近似するために級数展開を使用して乗数を解く。この手法は **SHAKE** 法よりも約3倍速いことが知られている。本研究は **LINCS** 法を用いて計算を行った。

2.2.7 シミュレーション条件

本研究での **MD** シミュレーションはフローニンゲン大学によって開発された **Gromacs** (Groningen Machine for Chemical Simulations) を用いた [59]。無償のソフトウェアであるが、計算速度が速く、多様な力場の利用が可能である。また、後述する本研究で解析を行った物理量の多くは、本ソフトウェアを用いて計算を行った。

RA-VII の初期構造は各コンフォメーション (conf. A, B, C) について用意した。この理由であるが、中間体の活性エネルギーが 20 kcal/mol 程度あるとかがえられており [26]、通常の **MD** シミュレーションではコンフォメーションの構造転移は生じないと判断したためである。各コンフォメーション (conf. A, B, C) の初期構造のデータは 2.1.6 によって得られた最適化構造の座標情報を用いた。

ペプチドを中心とし 1.0 nm 立方の立方体の系を作製し、その周辺に **DMSO** 分子を配置した。各コンフォメーションと配置した **DMSO** 分子を表に示す。**RA-VII** の力場には **GAFF** を用いた。**DMSO** の力場は **FS** (Feller-Strader) モデルを用いた [60]。

この状態では、ペプチドと **DMSO** 分子は不安定な状態で配置されており、系のエネルギーは高い状態である。そこで最急降下法を用いて系のエネルギー最小化を行った。その後、**NVT** 条件で 100 ps と **NPT** 条件で 500 ps のシミュレーションを行い、温度と圧力の緩和を行った。その系を用いて引き続き、300 K, 1 bar の条件下で 300 ns の **MD** シミュレーションを行い、この 300 ns でのシミュレーションの結果から物理

量を計算した。

2.2.8 解析した物理量

本項では本論文で計算した物理量に関して説明する。

2.2.8.1 RMSD

平均二乗偏差 (Root Mean Square Deviation) は、参照構造とのズレを示している。

$$\text{RMSD}(t_1, t_2) = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2)\|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

m_i は原子 i の質量、 N は対象系に含まれる全原子数、 M は対象系に含まれる全原子の質量の和、 $\mathbf{r}_i(t_1)$ は時刻 t_1 での時の原子 i の位置 \mathbf{r}_i を示している。 $\mathbf{r}_i(t_2)$ は参照構造の時刻 t_1 での時の原子 i の位置 \mathbf{r}_i である。本論文での解析での参照構造は構造全体、18 員環、14 員環、Tyr3 の 4 つの構造 (図 2.1) に関して RMSD を計算した。18 員環と 14 員環の構造では水素原子を除いた構造を用いている。参照構造と各時刻との構造は最小二乗法で RMSD を最小とするような並進、回転操作をするフィッティングを行った。

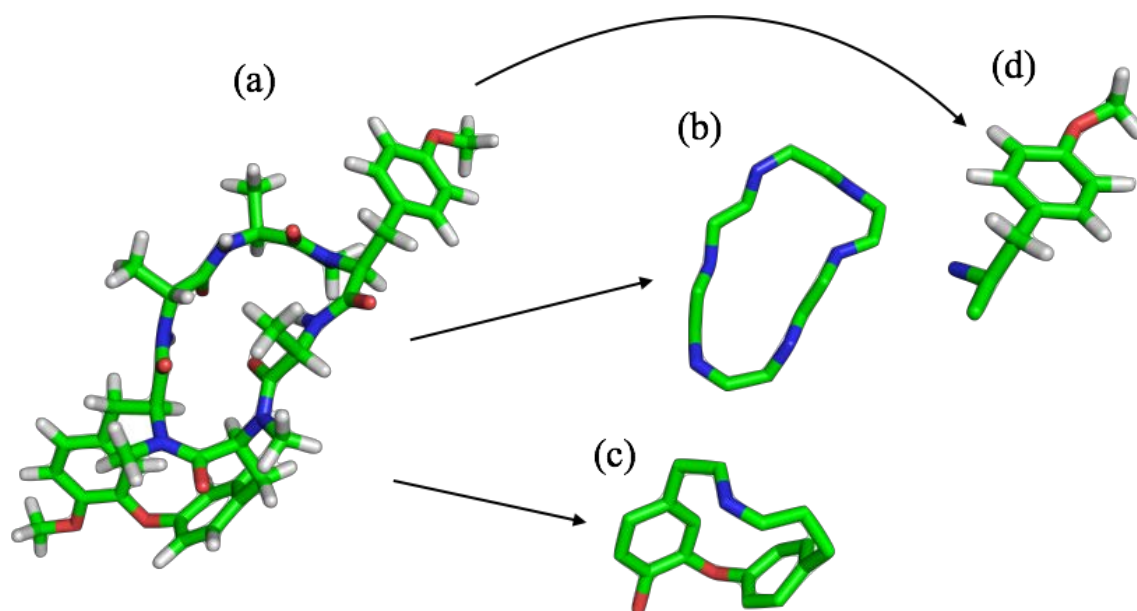


図 2.1 RMSD を計算した構造

(a) 全体構造 (b) 18 員環 (c) 14 員環 (d) Tyr3

2.2.8.2 二面角の計算

Tyr3 の側鎖について、各コンフォメーションで立体的な位置を比較するために χ_1 ($\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{C}_\gamma$) と χ_2 ($\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{C}_\gamma-\text{C}_\delta$) の二面角 (図 2.2) を計算し、時間依存的な変化と、シミュレーション時間中の分布を示した。

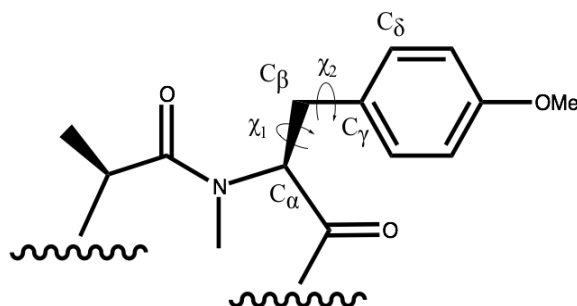


図 2.2 二面角 χ_1 ($\text{N}-\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{C}_\gamma$) と χ_2 ($\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta-\text{C}_\gamma-\text{C}_\delta$)

2.2.8.3 水素結合の判定

水素結合の判定は、アクセプターとドナーの距離が 0.35 nm 以下、かつアクセプターと水素、ドナーのなす角が 30° 以下の場合 (図 2.3) を水素結合が形成されたと判断した。2 ps ごとに水素結合の判定を行い、300 ns のシミュレーションの間に形成した割合を形成率とした。

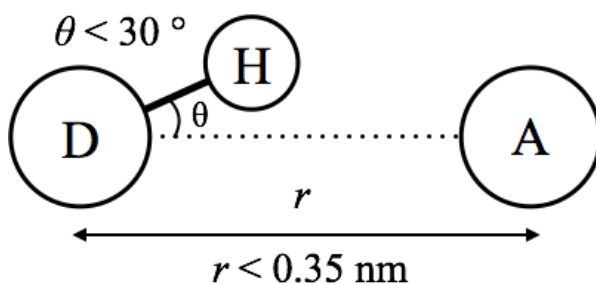


図 2.3 水素結合の判定

D はドナー、A はアクセプターを示している。

2.2.8.4 β ターン構造の判定

RA-VII の二次構造として β ターンの存在が知られている。二次構造の判定として、 i 番目と $i+2$ 番目の残基の C_α の距離が 7 Å 以下である場合を β ターンを形成していると判断した。また、 β ターンの分類分けとしては、対象となる 4 つの二面角が表 1.3

の4つの二面角の値の $\pm 15^\circ$ の範囲であれば、該当する β ターンに分類されるとした。

2.2.8.5 ラマチャンドラン・ダイアグラム

各コンフォメーションのラマチャンドラン・ダイアグラムを作成した。ラマチャンドラン・ダイアグラムは各アミノ酸の二面角 φ と ψ で表記し、立体構造の検証を行うことが可能である。この際の各残基の二面角 φ と ψ を用いた。 i 番目残基の二面角 φ_i は $N_i-C_{\alpha i}-C_i-N_{i+1}$ の二面角、二面角 ψ_i は $C_{i-1}-N_i-C_{\alpha i}-C_i$ で計算を行った。

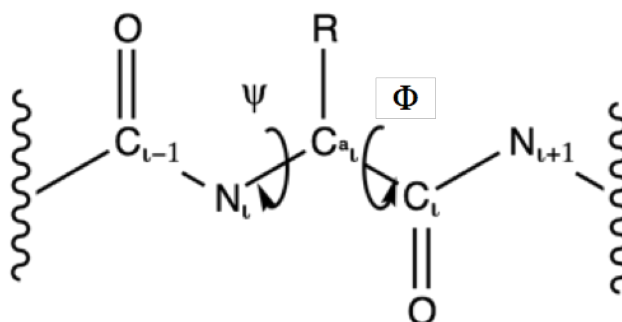


図 2.4 二面角 φ と ψ

2.2.8.6 自由エネルギー地形

自由エネルギー地形の算出を MD シミュレーション中の出現頻度を基にして行った。

$$\Delta G = k_B T \log \frac{P(x, y)}{P_{\max}}$$

k_B はボルツマン定数、 T は温度、 x, y は反応座標、 $P(x, y)$ は反応座標 x, y の場合の出現頻度、 P_{\max} は最大出現頻度である。反応座標平面への射影を行っている。反応した面の領域を小領域に分割し、各小領域の出現頻度を計算し $P(x, y)$ としている。 x, y は小領域の代表点である。

2.2.8.7 RMSF

平均二乗揺らぎ (root mean square fluctuation) は平均構造からの各原子 (表 2.1) の揺らぎを示している。

$$RMSF_i = \left[\frac{1}{N_t} \sum_{j=1}^{N_t} |\mathbf{r}_i(t_j) - \mathbf{r}_i^{\text{ref}}|^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

N_t は対象系に含まれる全原子数 $\mathbf{r}_i(t_j)$ は時刻 t_j での原子 i の位置を示している。 $\mathbf{r}_i^{\text{ref}}$ は参照構造の原子 i の位置を示している。本シミュレーションでは参照構造は MD シミュレーション 300 ns 間の平均構造である。

表 2.1 RMSF を計算した原子

Index of atoms	Amino acid	Atom type	Index of atoms	Amino acid	Atom type	Index of atoms	Amino acid	Atom type
1	D-ALA ¹	H _N	37	TYR ³	H _ε	73	TYR ⁵	C _ε
2	D-ALA ¹	N	38	TYR ³	C _ε	74	TYR ⁵	H _ε
3	D-ALA ¹	C _α	39	TYR ³	H _ε	75	TYR ⁵	C _ε
4	D-ALA ¹	H _α	40	TYR ³	C _ζ	76	TYR ⁵	H _ε
5	D-ALA ¹	C _β	41	TYR ³	O	77	TYR ⁵	C _ζ
6	D-ALA ¹	H _β	42	TYR ³	CO	78	TYR ⁵	O
7	D-ALA ¹	H _β	43	TYR ³	H	79	TYR ⁵	C _{C=O}
8	D-ALA ¹	H _β	44	TYR ³	H	80	TYR ⁵	O
9	D-ALA ¹	C _{C=O}	45	TYR ³	H	81	TYR ⁶	N
10	D-ALA ¹	O	46	TYR ³	C _{C=O}	82	TYR ⁶	C _{NMc}
11	ALA ²	H _N	47	TYR ³	O	83	TYR ⁶	H _{NMc}
12	ALA ²	N	48	ALA ⁴	H _N	84	TYR ⁶	H _{NMc}
13	ALA ²	C _α	49	ALA ⁴	N	85	TYR ⁶	H _{NMc}
14	ALA ²	H _α	50	ALA ⁴	C _α	86	TYR ⁶	C _α
15	ALA ²	C _β	51	ALA ⁴	H _α	87	TYR ⁶	H _α
16	ALA ²	H _β	52	ALA ⁴	C _β	88	TYR ⁶	C _β
17	ALA ²	H _β	53	ALA ⁴	H _β	89	TYR ⁶	H _β
18	ALA ²	H _β	54	ALA ⁴	H _β	90	TYR ⁶	H _β
19	ALA ²	C _{C=O}	55	ALA ⁴	H _β	91	TYR ⁶	C _γ
20	ALA ²	O	56	ALA ⁴	C _{C=O}	92	TYR ⁶	C _δ
21	TYR ³	N	57	ALA ⁴	O	93	TYR ⁶	H _δ
22	TYR ³	C _{NMc}	58	TYR ⁵	N	94	TYR ⁶	C _δ
23	TYR ³	H _{NMc}	59	TYR ⁵	C _{NMc}	95	TYR ⁶	H _δ
24	TYR ³	H _{NMc}	60	TYR ⁵	H _{NMc}	96	TYR ⁶	C _ε
25	TYR ³	H _{NMc}	61	TYR ⁵	H _{NMc}	97	TYR ⁶	H _ε
26	TYR ³	C _α	62	TYR ⁵	H _{NMc}	98	TYR ⁶	C _ε
27	TYR ³	H _α	63	TYR ⁵	C _α	99	TYR ⁶	H _ε
28	TYR ³	C _β	64	TYR ⁵	H _α	100	TYR ⁶	O
29	TYR ³	H _β	65	TYR ⁵	C _β	101	TYR ⁶	CO
30	TYR ³	H _β	66	TYR ⁵	H _β	102	TYR ⁶	H
31	TYR ³	C _γ	67	TYR ⁵	H _β	103	TYR ⁶	H
32	TYR ³	C _δ	68	TYR ⁵	C _γ	104	TYR ⁶	H
33	TYR ³	H _δ	69	TYR ⁵	C _δ	105	TYR ⁶	C _{C=O}
34	TYR ³	C _δ	70	TYR ⁵	H _δ	106	TYR ⁶	O
35	TYR ³	H _δ	71	TYR ⁵	C _δ			
36	TYR ³	C _ε	72	TYR ⁵	H _δ			

3 結果・議論

本章では、本研究の量子化学計算と MD シミュレーションでの結果について述べる。

3.1 量子化学計算

DMSO の溶媒効果を加味した量子化学計算による構造最適化計算の結果を示す。3 つのコンフォメーションの二次構造を調べるために、これらの構造の Ala1 と Ala4 の C α 間の距離を計算した。その結果、conf. A では 0.478 nm、conf. B では 0.455 nm、conf. C では 0.440 nm であった。いずれの構造も 0.7 nm 以下であるため、3 つのコンフォメーションは β ターン構造を有する (基準に関しては手法 2.2.9.4 で述べた)。そこで 3 つのコンフォメーションの β ターンが何型の β ターンに分類されるのかを調べた。3 つのコンフォメーションの $n+1$ 番目に該当する Ala2 と $n+2$ 番目に該当する Tyr3 の二面角を表 3.1 に示す。これらの結果より、conf. A は II 型 β ターンと非常に近い構造を取っていることがわかった。conf. B と C はいずれの基準とも大きく外れるため、VI 型の β ターンに分類されることがわかった。

表 3.1 Ala2 と Tyr3 の二面角の値 (degree)

	Ala2		Tyr3	
	φ	ψ	φ	ψ
conf. A	-115°	134°	58°	29°
conf. B	-138°	76°	-127°	41°
conf. C	-114°	74°	-126°	32°

振動解析を用いて、3 つのコンフォメーションの Gibbs 自由エネルギーを計算した。計算は気相中と DMSO の溶媒効果を加えた計算を行った (表 3.2)。気相中では、conf. A との Gibbs 自由エネルギー差は conf. B で +1.57 kcal/mol、conf. C では +1.86 kcal/mol であった。溶媒効果が加わると、conf. A との Gibbs 自由エネルギー差は conf. B で +2.79 kcal/mol、conf. C では +3.36 kcal/mol であった。気相中でも、溶媒効果を含めた場合でも、これらのエネルギー差は NMR で観察された存在率と定性的な一致を見せた [26]。

各コンフォメーションの構造を図 3.1 で示す。図の赤い円は conf. C が conf. A や B と大きく構造が異なっている Ala4 の側鎖について示している。これに関しては、Ala4

と Tyr 5 の間のペプチド結合の立体配座が *cis* である事が 1 つの要因とも考えられる。しかし、Ala2 と Tyr3 の間の立体配座によって Ala2 の側鎖の向きが異なっている事は確認できておらず、14 員環による環状構造の固定が周辺の側鎖の安定位置に影響している可能性がある。

表 3.2 振動解析による Gibbs 自由エネルギー (kcal/mol) と conf. A とのエネルギー差 (kcal/mol)

	気相	DMSO
conf. A	-1629444.032	-1629467.414
	-	-
conf. B	-1629442.459	-1629464.619
	+1.57	+2.79
conf. C	-1629442.173	-1629464.054
	+1.86	+3.36

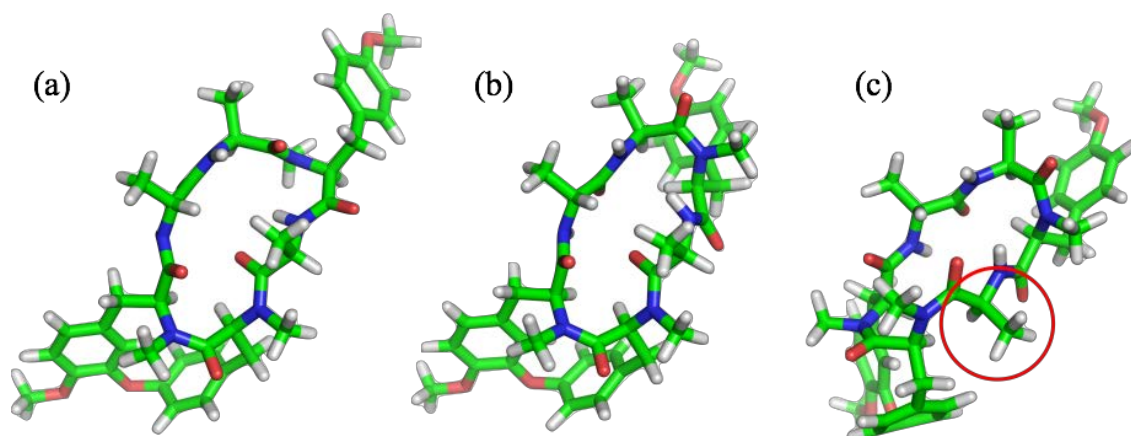


図 3.1 構造最適化によって得られた構造

(a) conf. A (b) conf. B (c) conf. C

(c) の赤い円は (a), (b) との向きの差が大きかった Ala4 の側鎖を示している。

3.2 RMSD

confs.A、B、C の初期構造とシミュレーションで得られた構造とのズレを RMSD として算出した。構造全体の RMSD では、いずれのコンフォメーションでも値の大きな変化が観察された。そこで 18 員環と 14 員環でそれぞれの RMSD を算出した。い

ずれのコンフォメーションでも 14 員環の RMSD の値は大きな時間変化が観察できなかった。この結果から、14 員環の構造は強固な構造であることがわかる。

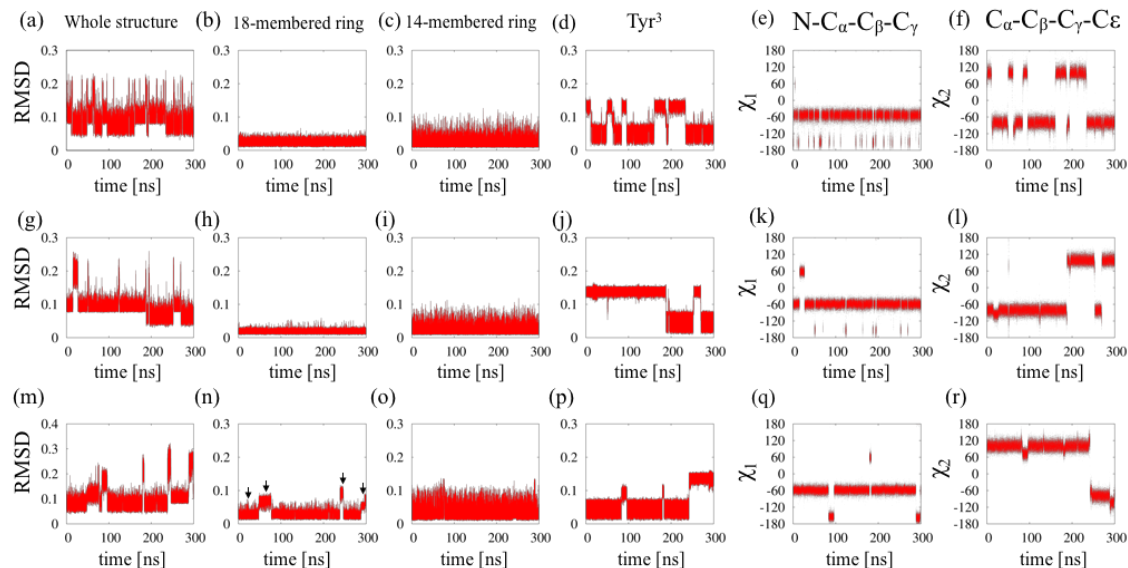


図 3.2 MD による RA-VII の RMSD

conf. A (a、b、c、d)、conf. B (g、h、i、j)、conf. C (m、n、o、p)；
 全体構造 (a、g、m)、18 員環 (b、h、n)、14 員環 (c、i、o) と Tyr3
 (d、j、p)。二面角 χ_1 と χ_2 (degrees) は、それぞれ conf. A (e、f)、conf.
 B (k、l)、conf. C (q、r) である。

一方、conf. C の 18 員環では、RMSD の値が変化していた。そこで変化している時間の構造のスナップショットを図 3.3 に示す。28-57 ns 時、296-300 ns 時の構造は初期構造と比較して、Ala1 と Tyr6 の間のペプチド結合の配向が反転していた。240-245 ns 時には Tyr3 と Ala4 の間のペプチド結合の配向が初期構造と反転していた。288-296 ns 時には Ala2 のカルボキシ基の向きが初期構造と反転していた。これらの立体構造の変化が conf. A と B で確認できないことから Ala4 と Tyr5 のペプチド結合が原因と考えられる。Ala4 と Tyr5 のペプチド結合が *cis* となったことによって 18 員環の横幅が広がった可能性がある。しかし、Ala1 と Ala4 の C α 間の距離の平均値では各コンフォメーションで 0.02 nm ほどしか変わらず、環状構造に単純な空間的な余剰が発生したことは確認できなかった。

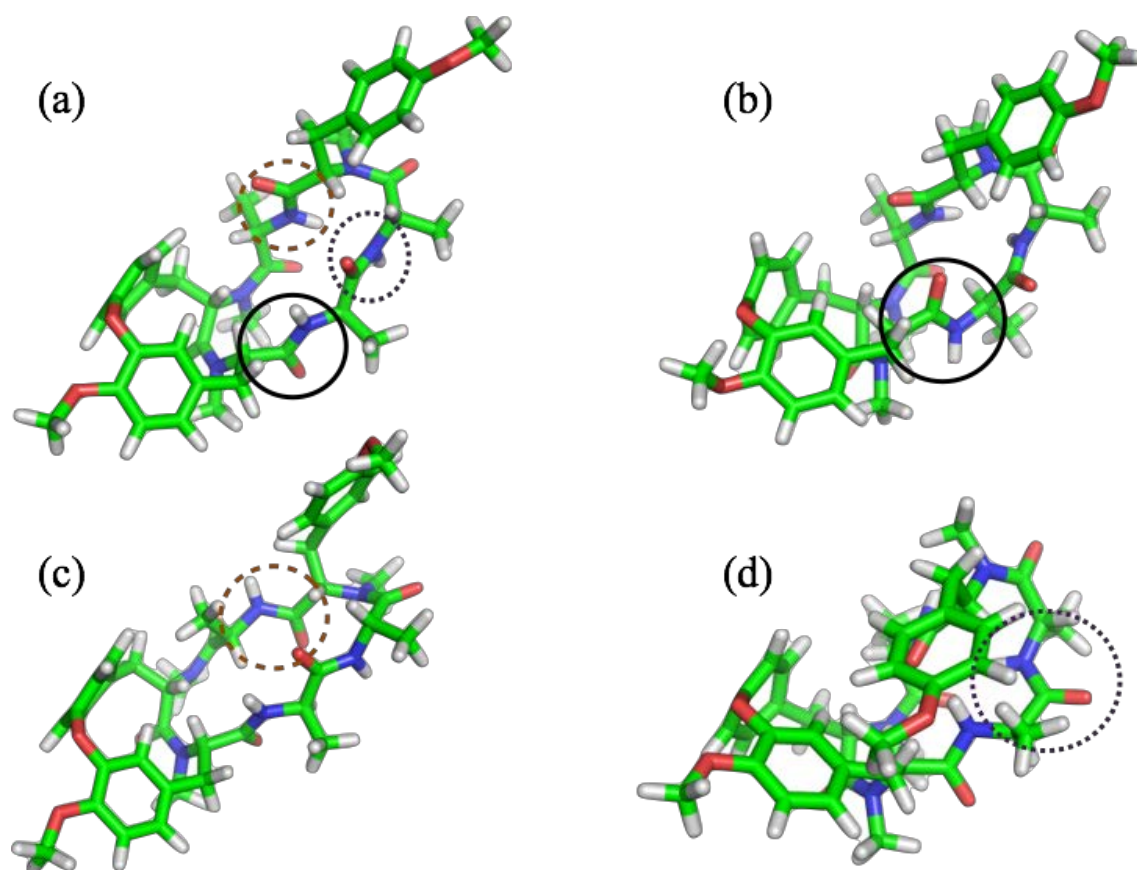


図 3.3 conf. C の 18 員環に構造変化が見られた時間のスナップショット
(a) 25 ns (b) 63 ns (c) 243 ns (d) 293 ns 時の構造。Ala1 と Ala2 のペプチド結合を紫色の点線、Tyr3 と Ala4 のペプチド結合を茶色の破線、Tyr6 と Ala1 のペプチド結合を黒の実線の円で示す。

conf. A と conf. B では 18 員環の RMSD で時間変化が確認できなかった。そのため、全体の RMSD の値の変化は 14 員環と 18 員環に含まれない Tyr3 の側鎖の動きによるものであると考えた。そこで、Tyr3 の側鎖の RMSD を算出した。その結果、conf. A, B そして C の、いずれのコンフォメーションでも大きな時間変化が観察された。Tyr3 の側鎖は Tyr5 や Tyr6 の様に固定されていないため、動く事が可能であると想定される。

conf. C の全体の RMSD の変化は 18 員環と Tyr3 の側鎖の RMSD 変化を反映しており、conf. A と conf. B の全体構造の RMSD の変化は Tyr3 の側鎖の RMSD の結果を反映している。

3.3 Tyr3 の側鎖の回転異性体

Tyr3 の側鎖の動きを 2 種の二面角を用いて比較した (図 2.2)。 χ_1 は側鎖全体の向き、 χ_2 は芳香環のベンゼンを面として考えた場合、その面の向きを示している。これらの変化は全体構造の RMSD の値の変化とおおよそ一致していた (図 3.2)。Morita らは、NMR のカップリング定数の変化より回転異性体の割合を計算する手法を用い [61]、conf. A と B には 3 つの回転異性体が存在する事を報告している。その回転異性体は χ_1 の値は -60° 付近 (Rotamer I)、 $\pm 180^\circ$ 付近 (Rotamer II)、 60° 付近 (Rotamer III) と定義されている [26]。図 3.4 に Newman 投影式を示す。

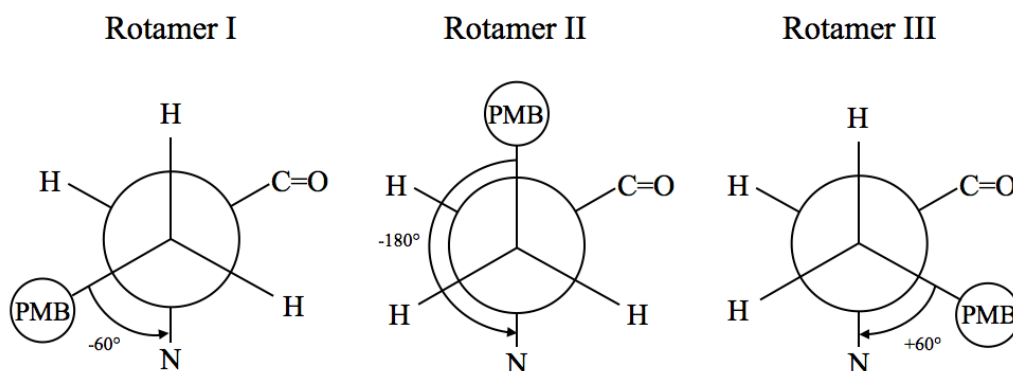


図 3.4 Tyr3 の側鎖の回転異性体

そこで、MD シミュレーションで得られた χ_1 を用いて、conf. A, B, C の回転異性体の存在比率を算出した (図 3.5)。いずれのコンフォメーションでも Rotamer I の分布が最も多いことは共通していた。この結果は Morita らの結果とも一致している。他の回転異性体に関しては Rotamer III の存在は conf. B、C の存在率が conf. A における存在率の約 20 倍、約 8 倍も多かった。

conf. A や C では Rotamer II が次に多く、Rotamer III は少ない。しかし、この 2 つのコンフォメーションでも存在の仕方には違いが見られ、conf. A の Rotamer II の分布は conf. C のものに比べて幅が広がっていることが分かる。このことから、conf. A では Rotamer I と Rotamer II の揺らぎが他のコンフォメーションよりも大きいことが予想される。

Tyr3 は活性部位の 1 つであり、リボソームとの結合に重要であることが考えられている。conf. A において Rotamer I と Rotamer II の間の構造遷移が柔軟であることは、リボソームとの接着において有利に働く可能性が考えられる。

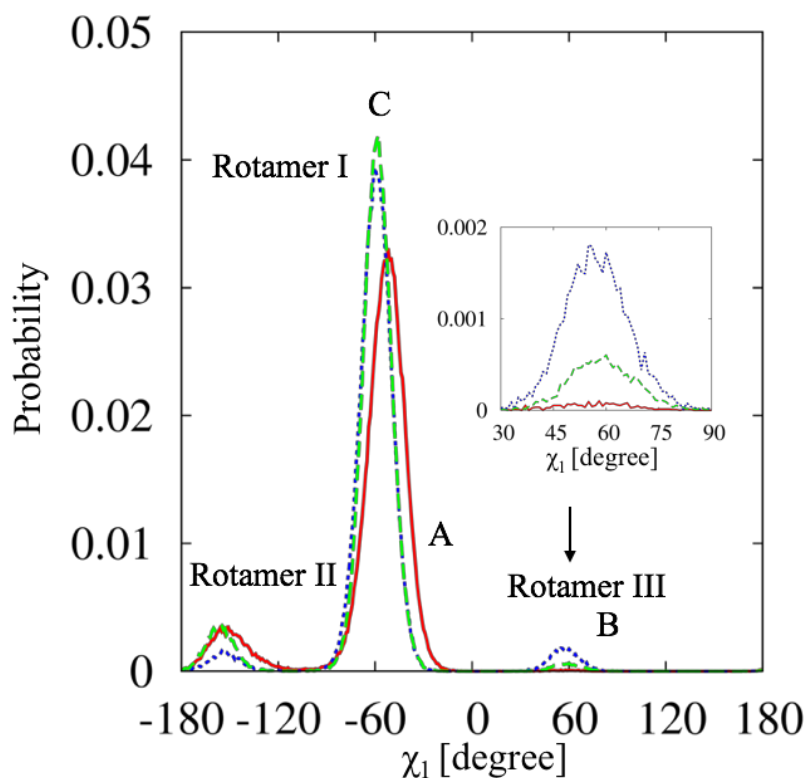


図 3.5 二面角 χ_1 の分布

各コンフォメーションでの回転異性体の分布量の違いを検討するにあたり、 χ_1 の値の変化させた場合にポテンシャルエネルギーがどのように変化するかを計算した。エネルギーは 3.1 節で得られた最安定構造を出発点とし、 χ_1 を 15 度ずつ変化させた構造に対して、溶媒効果を含まない量子化学計算で構造最適化を行った。それぞれの最適化構造のエネルギーを 3.1 節で得られた構造とのエネルギーとの差分をエネルギー差とした。基準とした構造も、溶媒効果を含まない計算によって求めた。この結果、conf. B と C では Rotamer III 付近でのエネルギーが conf. A よりも小さいことが明らかとなった。このことから、conf. B と C の Rotamer III の分布量の多いことは、conf. A に比べてエネルギー差が小さいことが要因であると考えられる。

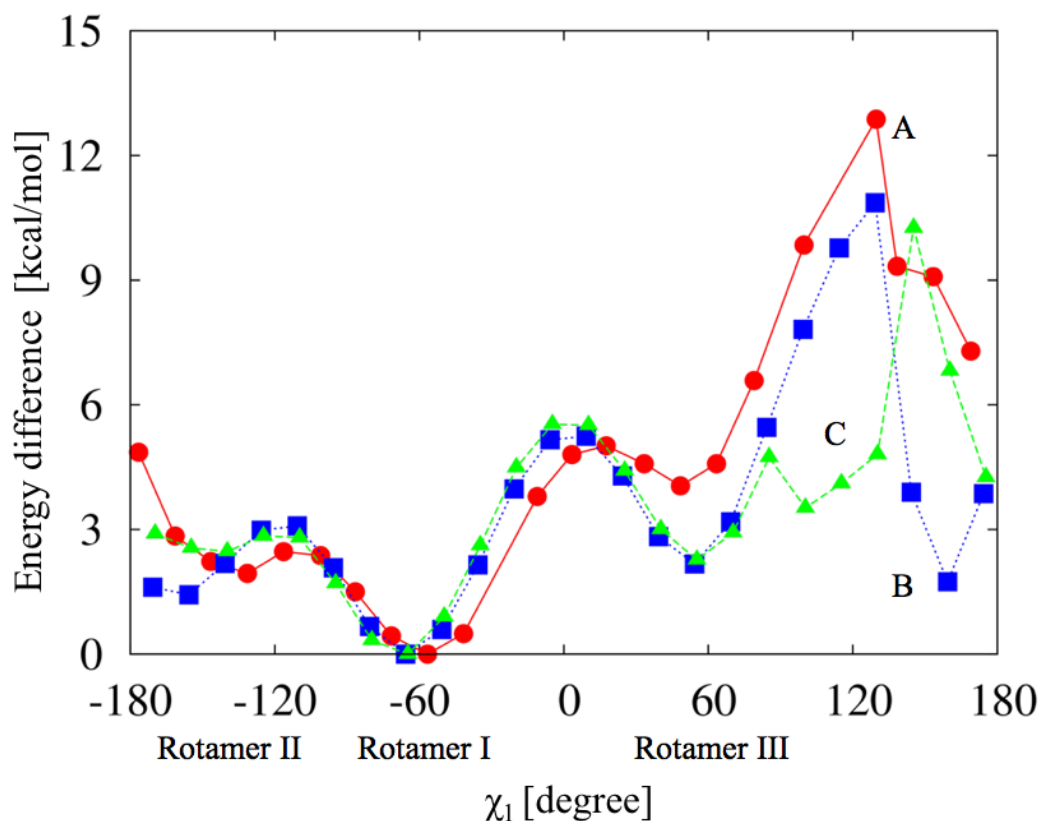


図 3.6 量子化学計算による二面角 χ_1 とポテンシャルエネルギーの関係
横軸は Tyr3 の二面角 χ_1 である。縦軸は conf. A, B, C の各々の最安定構造の際とのエネルギー差である。conf. A (赤:実線) 、conf. B (青:点線) 、conf. C (緑:破線)

3.4 RMSF

各原子の RMSF を算出した (図 3.7) 。 Tyr3 の側鎖を除いて、全体的な原子の揺らぎは conf. A が他のコンフォメーションと比較して大きかった。 Tyr3 の側鎖の値はどのコンフォメーションでも概ね同等の値であった。 Ala1、Ala2、Tyr6 の揺らぎに関しては conf. C は conf. A と同様に大きな揺らぎが観察された。しかし、Tyr3、Ala4、Tyr5 に関しては conf. C は、conf. B と傾向が似通っており、揺らぎが小さい。 14 員環は RA-VII の活性部位の 1 つであると考えられている。抗がん活性を有するとされる conf. A の 14 員環の揺らぎが大きいことは、リボソームのような標的との結合確率を高める可能性が想定される。

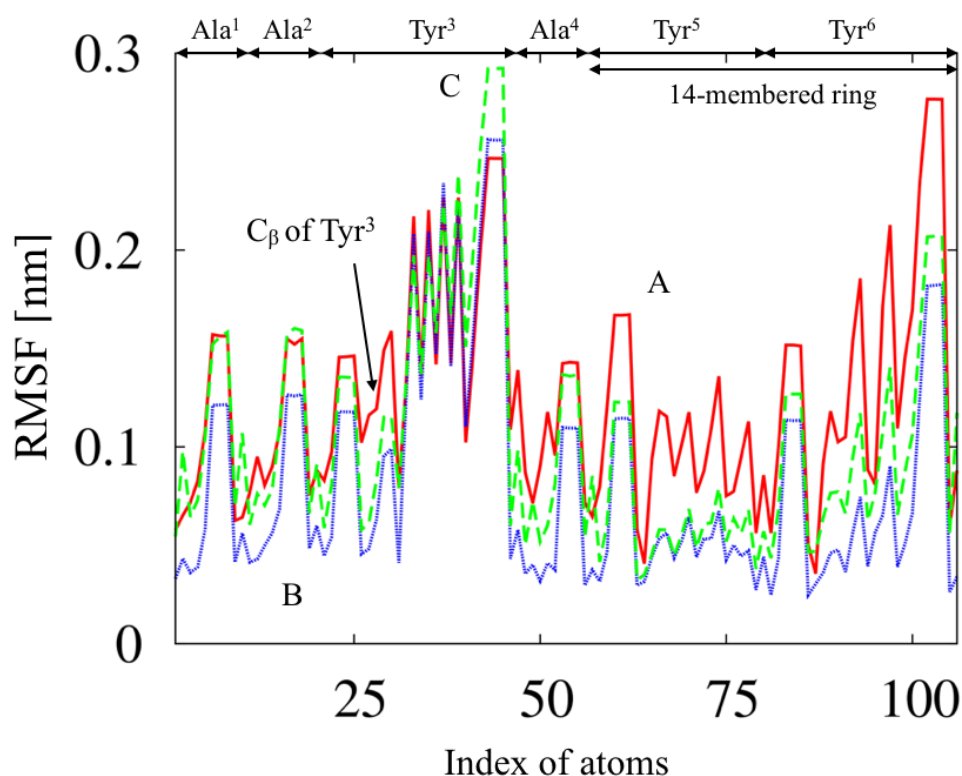


図 3.7 MD シミュレーションによる RMSF
conf. A (赤:実線) 、conf. B (青:点線) 、conf. C (緑:破線)

3.5 ラマチャンドラン・ダイアグラム

図 3.8 は MD シミュレーションにより求めた RA-VII のラマチャンドラン・ダイアグラムである。conf. C の Tyr5 と Tyr6 の二面角 ϕ と ψ の値では、conf. A と conf. B の ϕ と ψ の値よりも広い値で分布している。この二面角の差異は、conf. C の Tyr 6 と D-Ala 1 間のペプチド結合の配向が反転したことによるものであると考えられる (図 3.3)。

conf. A の Ala2 と Tyr3 の二面角は、conf. B と conf. C の同じ箇所の二面角と値が異なっている。これは conf. A のペプチド結合が *trans* 型であり、conf. B のペプチド結合が *cis* 型であるためである。

Ala4 の ϕ の値は、conf. A と conf. B の間で異なっている。この違いは Ala4 のアミド基の水素と関係がある。後述するが、この水素は分子内水素結合の形成に重要である。この水素が形成する分子内水素結合は conf. A と conf. B で大きな差がある。

conf. C のラマチャンドランの二面角 (ϕ と ψ) は通常 conf. A と同様の値をとるが、conf. B と近い値をとる場合もある。これは Ala4 で確認される。図 3.8 の実線の円と波線の円で示している。

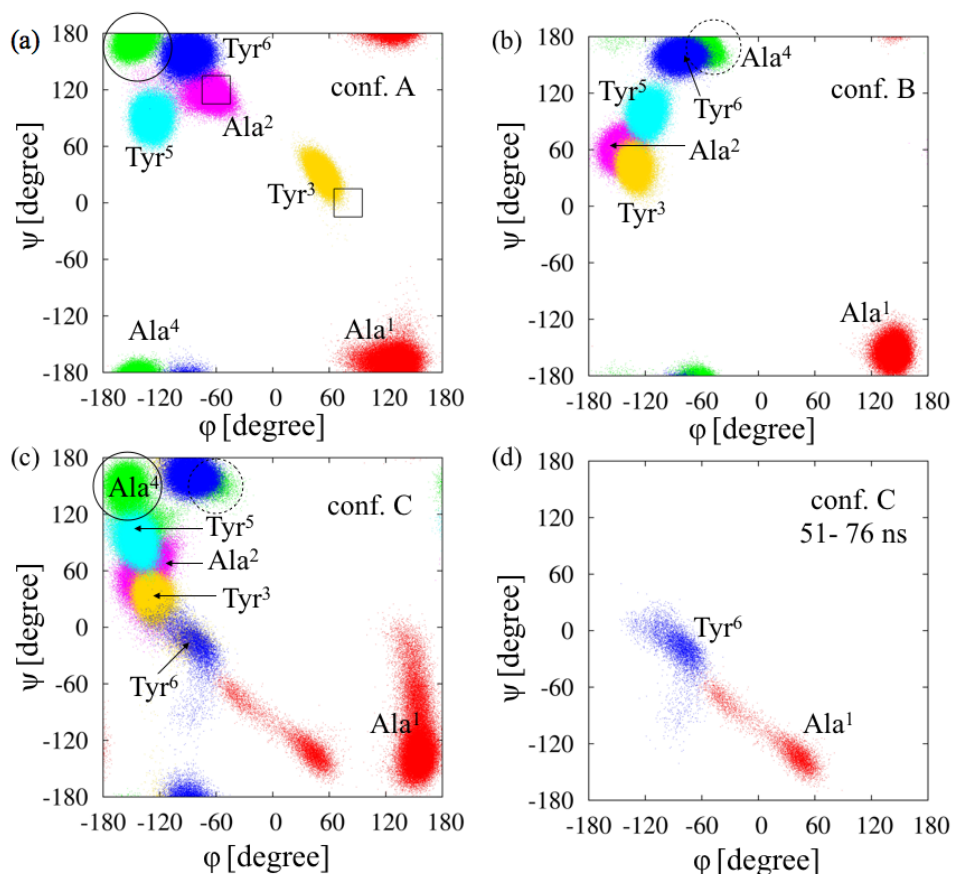


図 3.8 ラマチャンドラン・ダイアグラム

(a) conf. A (b) conf. C (c) conf. B (d) conf. C の 51-76 ns 間

赤 : Ala1 マゼンタ : Ala2 黄 : Tyr3 緑 : Ala4 シアン : Tyr5 青 : Tyr6

黒い四角形は II 型 β ターンの二面角の範囲を示している。

二次構造について分析を行った。Ala1 と Ala4 の間の C α の最大距離は conf. A では 0.567 nm, conf. B では 0.582 nm, conf. C では 0.654 nm であった。全ての場合で 0.7 nm 以下であることから、3つのコンフォメーションは全ての時間で β ターン構造を形成していると考えられる。

先行研究において、conf. A では II 型の β ターンが確認されている。そこで II 型 β ターンを特徴付ける Ala2 と Tyr3 の二面角の分布を分析した (図 3.9)。その結果、conf. A は II 型 β ターンを形成している時間があることがわかった。この結果は、Morita らの論文を支持する [26]。II 型 β ターンを形成していた時間は全体の 1.35%であった。conf. B と conf. C の二面角は Tyr3 の ψ を除いて、II 型の β ターンの該当範囲から外れている。そのため、この 2 つのコンフォメーションは II 型 β ターンを形成していなかったと判断した。表 1.3 で挙げた、その他の β ターンの二面角とも外れていることから、VI 型 β ターンに分類されると考えられる。VI 型は一般的に未分類の β ターンの総称である。conf. B が VI 型 β ターンに分類される点に関して、Morita らの論文と一致している。

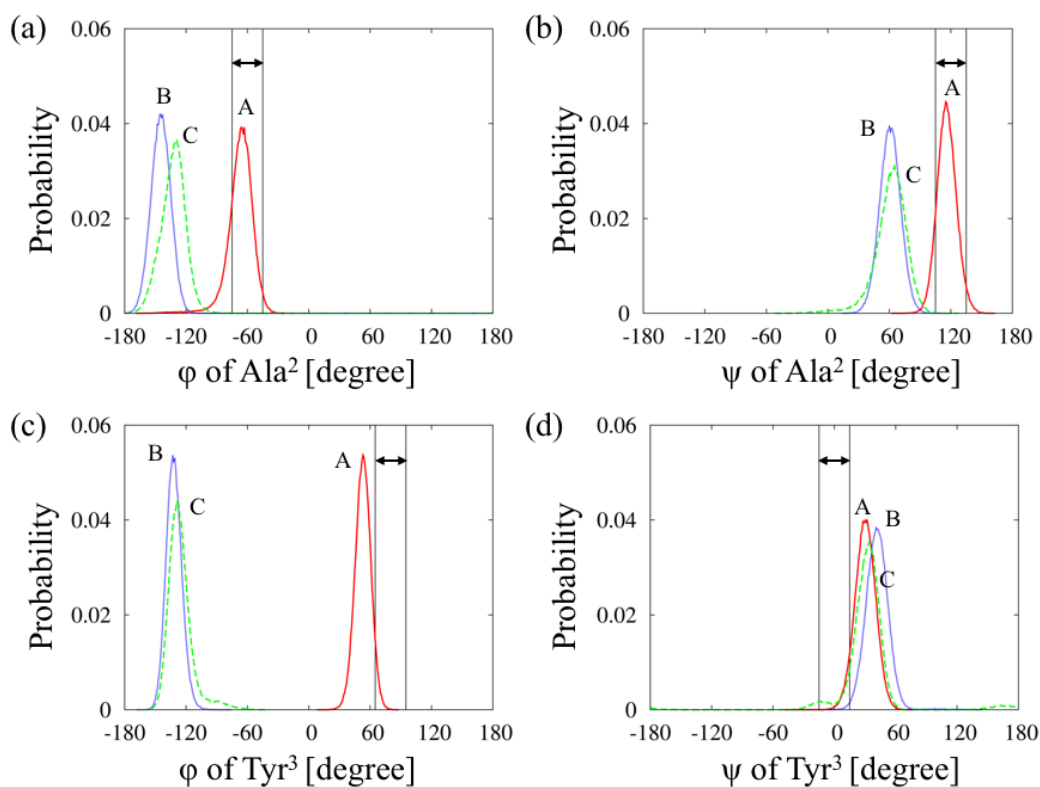


図 3.9 Ala2 と Tyr3 の二面角の分布

黒い実線は表 1.3 に示した II 型 β ターンを形成する場合の二面角 $\pm 15^\circ$ の範囲を示している。conf. A (赤:実線)、conf. B (青:点線)、conf. C (緑:破線)

図 3.10 に示すように、II 型 β ターンと 14 員環の RMSD の相関について検討を行った。これは Morita らが、14 員環が II 型 β ターンの形成に重要であることを言及したためである。我々のシミュレーションの結果、14 員環と II 型 β ターンとの間に関係は見られなかった。

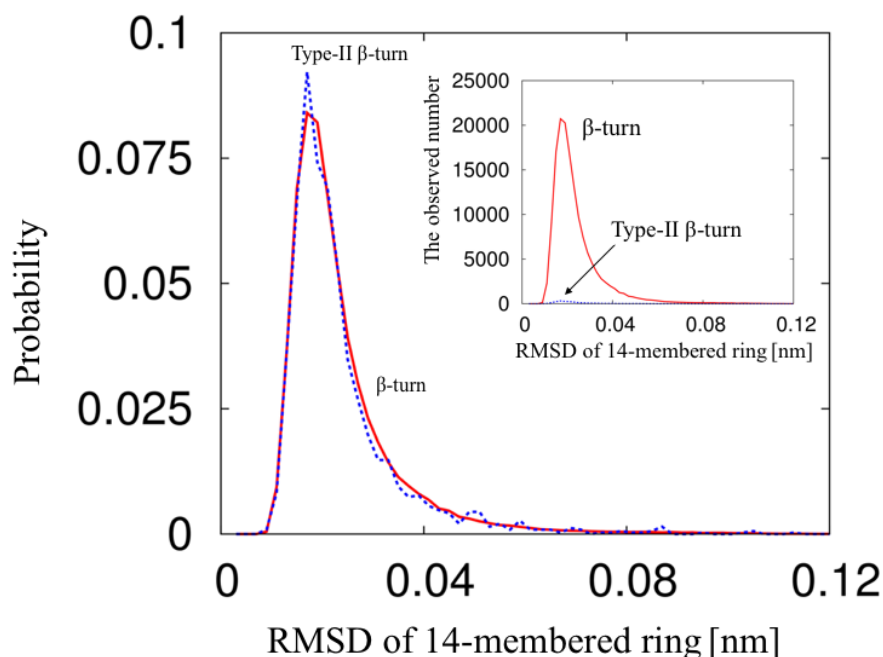


図 3.10 conf. A の II 型 β ターンの分布と 14 員環の RMSD の関係
横軸が 14 員環の RMSD が β ターンまたは II 型 β ターンの形成確率を示している。

3.6 自由エネルギーランドスケープ

自由エネルギーランドスケープを図 3.11 に示す。また、自由エネルギー地形により得られた局所構造を図 3.12 に示す。conf. A には 3 つの局所構造が観察された。この局所構造はいずれも $\chi_1 = -60, 60, -150^\circ$ であり回転異性体である Rotamer I、Rotamer II、Rotamer III と同一であると考えられる。局所構造が回転異性体と一致することに関して conf. B も同様であった。しかし、Rotamer II の Tyr3 の側鎖の構造に関しては conf. A と B では違いが観察された。Conf. A では側鎖が横向きに曲がっているが、conf. B では 14 員環との距離が短くなるように曲がっていることがわかった。

Conf. C でも 3 つの Rotamer が存在する。この Rotamer は conf. B と近いものであった。しかし、C_d3、C_d5 では Tyr3 の側鎖の回転以外の構造変化も観察された。C_d3 は 18 員環の構造が曲がった構造であり、Tyr3 の側鎖と 14 員環の距離が小さくなっている。また C_d5 では Tyr6 と Ala1 の間のペプチド結合の配向が反転していることがわかった。これら 2 つの構造を量子化学計算で構造最適化計算を行った結果、それらの特徴は維持されていた。conf. C の初期構造との自由エネルギー差は、C_d3 は 5.38 kcal/mol、C_d5 は 6.75 kcal/mol であった。どちらの局所構造も不安定な構造であると考えられる。

量子化学計算による最適構造と、MD シミュレーションの最頻出構造を比較した (図 3.13) 。その結果、いずれのコンフォメーションでも違いは Tyr3 または Tyr6 の芳香環に構造の差異が確認できた。それ以外の構造、特に 18 員環部では構造がほとんど保持されていると考えられる。これらの量子化学計算と MD シミュレーションで違いが見られた箇所は RMSF の値が変化する箇所と一致していた。

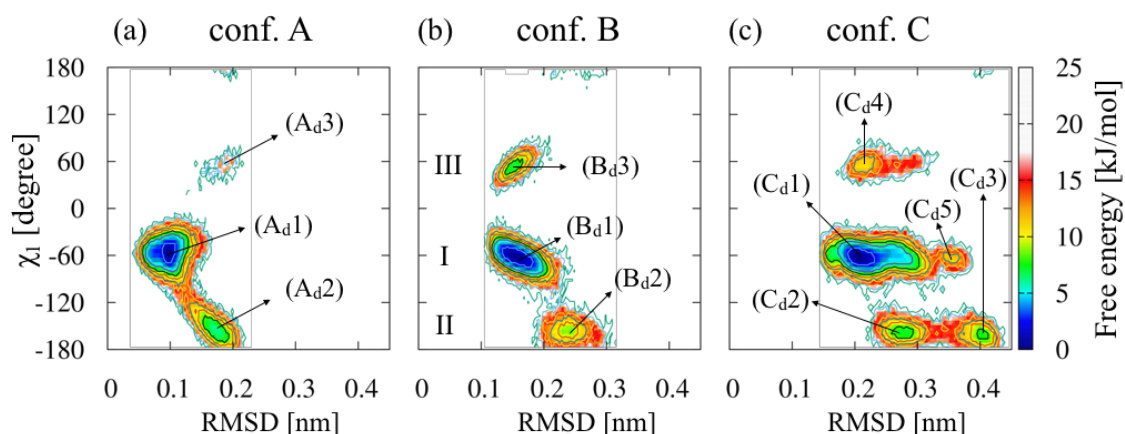


図 3.11 RMSD と二面角 χ_1 を反応座標とした自由エネルギー地形
横軸は X 線結晶構造を参照構造にした RMSD、縦軸は二面角 χ_1 である。

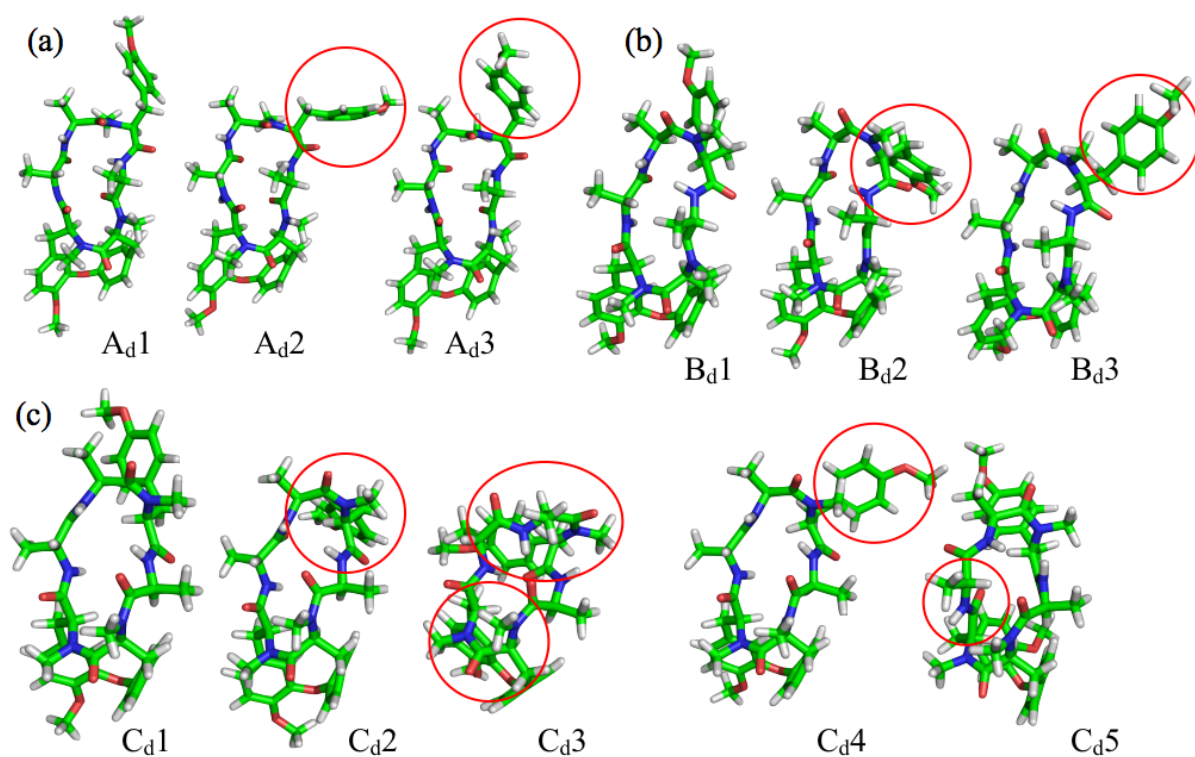


図 3.12 自由エネルギーランドスケープにおける局所構造

(a) conf. A (b) conf. B (c) conf. C

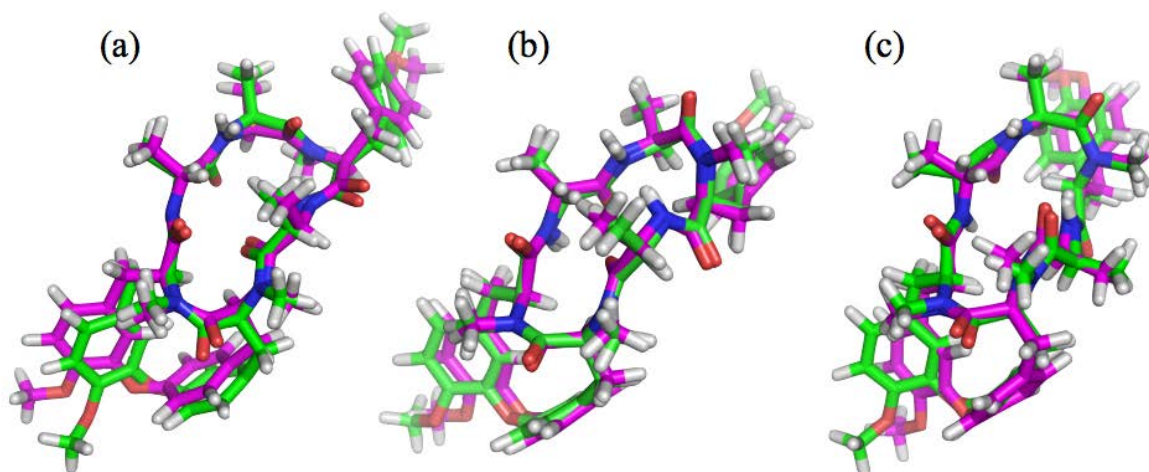


図 3.13 MD の最頻出構造と量子化学計算の構造の比較

(a) conf. A (b) conf. B (c) conf. C

緑：MD より得られた最頻出構造 マゼンタ：量子化学計算による最安定構造

3.7 水素結合

表 3.3 に、RA-VII の水素結合の形成率について示す。RA-VII には水素結合のドナーとして D-Ala1、 L-Ala2 そして L-Ala4 のアミド基が存在する。その中でも L-Ala4 のアミド基の水素が分子内水素結合を形成している。これは Morita らは L-Ala4 のアミド基が強力な水素結合を形成することを重水素置換の観測によって確認している [26]。

各コンフォメーションで L-Ala4 のアミド基が分子内水素結合を形成していることを確認した。conf. A は conf. B や C に比べて形成率が非常に高いことが明らかとなった。

表 3.3 RA-VII の各コンフォメーションのドナーごとの水素結合の形成率

	donor	Intra	Inter	None	Total
conf. A	Ala ¹	0.115	91.43	8.46	100.01
	Ala ²	0.00	97.55	2.45	100.00
	Ala ⁴	67.83	0.00	32.17	100.00
conf. B	Ala ¹	0.00	88.77	11.23	100.00
	Ala ²	0.00	97.97	2.03	100.00
	Ala ⁴	10.32	59.63	30.05	100.00
conf. C	Ala ¹	2.84	87.22	9.94	100.00
	Ala ²	4.08	89.34	6.58	100.00
	Ala ⁴	5.63	21.07	73.3	100.00

表 3.4 に、それぞれのコンフォメーションがどのような組み合わせの水素結合を形成したのかを示す。conf. A は D-Ala1 のカルボニル基の酸素と Ala4 のアミド基の水素が水素結合を形成していた。conf. B や conf. C では Ala4 のアミド基の水素と Ala2 のアミド基の窒素との間で水素結合が存在した。窒素間同士の水素結合は頻繁に存在するものではないが、ジヒドロ葉酸レダクターゼにおいてはプロリンとアルギニンの

窒素間で分子内水素結合を形成していることが報告されている。**conf. C**は全体としての割合では少ないが、他にも **Ala1** や **Ala2** の分子内水素結合が存在した。

表 3.4 水素結合の組み合わせ

	donor	acceptor	ratio (%)	total (%)
conf. A	Ala1 NH	Ala4 CO	0.115	0.115
	Ala4 NH	Ala1 CO	67.81	67.83
		Ala2 CO	0.02	
conf. B	Ala4 NH	Ala2 NH	10.07	10.32
		Ala1 CO	0.25	
conf. C	Ala1 NH	Ala4 CO	2.74	2.84
		Tyr5 N	0.10	
	Ala2 NH	Tyr3 CO	3.90	4.08
		Ala4 NH	0.13	
		Ala4 CO	0.050	
	Ala4 NH	Ala2 NH	5.63	5.63

4 今後の展望

本章では、今後の展望について述べる。

4.1 conf. C の構造について

RA-VII の量子化学計算と分子動力学シミュレーションを行った。その結果、conf. C ではTyr3の回転異性体とは異なる2種類の局所構造を発見した。RA-VIIにおいてconf. Cは限られた溶媒条件でしか観察されず、存在率の低いコンフォメーションである。Ala2/Tyr3間のペプチド結合の立体配座を固定された誘導体は存在し、活性は確認されているが、Ala4/Tyr5間のペプチド結合の立体配座が固定化された誘導体は未だ合成されていない。そのため、conf. Cが強力な抗がん活性を示すかどうかは、明らかとなっていない。本結果で得られた2種類の局所構造は、conf. Cの構造解析という点に留まらず、今後作成される誘導体の構造決定においても有益であると考えている。

4.2 RA-VII の構造と揺らぎ

RA-VIIの活性部位と想定されている14員環とTyr3側鎖についても各コンフォメーションで比較を行った。その結果、14員環部分のRMSFについてconf. Aの値はconf. Bの値よりも大きいことが明らかとなった。これは、conf. Aの14員環がconf. Bの14員環に比べて、柔軟な構造であることを示唆していると考ええる。この構造の柔軟性は、RA-VIIがリボソームへ結合する際に有利に働き、そのため活性に影響を及ぼす可能性がある。加えて、conf. CのTyr6の側鎖に該当する原子のRMSFの値はconf. Bよりも大きい値を示していた。また、Tyr6/Ala1間のペプチド結合は他2つのコンフォメーションでは確認されなかった、配向の反転が観察された。これは他2つのコンフォメーションとの大きな違いである、Ala4/Tyr5間のペプチド結合の影響であると考えられる。将来、RA-VIIの立体配座の固定によって分子構造の構造変化を人為的に制御する事が可能になるかもしれない。

4.3 Tyr3 側鎖の動き

Tyr3側鎖は、RA-VIIの中で最も柔軟に動く箇所である。そのため、リボソームとの結合時には最も積極的に動く部位であると考えられる。そのTyr3側鎖の回転異性体の存在比率も各コンフォメーションで特色があった。最も安定なRotamer Iの存在率が特別に大きいconf. Bやconf. Cに比べて、conf. AではRotamer IIの分布が大きく

存在している事が観察された。しかし、Rotamer III の存在率は2つのコンフォメーションと比較して著しく小さかった。一方、conf. B と conf. C では Rotamer III の存在率が大きいことから、Ala2/Tyr3 間のペプチド結合の影響であると伺える。この回転異性体の存在率の結果は、量子化学計算の結果とも大体の一致が見られた。この conf. A の Tyr3 側鎖は rotmerI と Rotamer II の間を柔軟に行き来できると考えられる。14 員環の柔軟性と同じく、この特性はリボソームとの結合に大きな影響を与えている可能性がある。ただし、立体配座の影響だけであるすると、conf. C の Rotamer II の存在率は conf. B と同程度になるべきである。しかし、結果は conf. A に近いものであり、Ala2/Tyr3 間のペプチド結合の影響以外の効果が存在する。本研究では溶媒分子の振る舞いについては殆ど議論できていない。Tyr3 側鎖は RA-VII の分子から突き出した構造であり、溶媒分子の影響を受けるはずである。そのため、RA-VII と非共有結合する溶媒の存在を解析する必要があるのではないかと考える。

4.4 水素結合

conf. A の分子内水素結合は他の2つのコンフォメーションよりも形成率が高いことが明らかとなった。他の環状ペプチドの研究より、分子内水素結合は膜透過の重要な要素であることがわかっている。この結果から conf. A が conf. B よりも高い抗がん活性を有する理由として膜透過性が関わっていることを示唆する。今後、生体膜のモデルを利用した MD シミュレーションを行う事が出来れば、conf. A と conf. B の膜透過性の違いにのみならず、分子内水素結合と膜透過性の関係性についても重要な知見が得られる事となる。この結果は、製剤化を目的とする他の多くの環状ペプチドの構造活性相関に影響を与えるだろう。また、conf. C は活性を有するのか現段階では明らかではない。RMSF や回転異性体の特性は部分的に conf. A に類する箇所があるが、分子内水素結合は conf. B と同程度である。この事から、膜透過性も conf. B と同程度であると想定される。conf. B と conf. C の膜透過性を比較する事は分子内水素結合が膜透過性に影響するのか、他の立体配座がどの程度影響を与えることができるのかを知るために重要である。

4.5 抗がん剤以外の RA-VII の展望について

RA-ペプチドの多くは抗がん活性が示されているが、その他に抗菌作用など複数の活性が報告されている。抗菌作用の主要な薬理作用は明らかではないが、RA-VII のリボソームの阻害作用はマクロライド系、テトラサイクリン系、アミノグリコシド系のタンパク質の合成阻害をする抗菌剤を彷彿とさせる。このような抗菌作用に示す為

にも膜透過は必須である。そのため、RA-VII の 3 つのコンフォメーションの膜透過性について研究を行う事は、他の RA-ペプチドの抗菌剤としての製剤化に向けても重要であろう。

4.6 環状ペプチド

ペプチドは低分子化合物では結合する事が出来ない大きな生体分子にも影響を与え、かつ合成がしやすいため製剤として注目をされている。その中で分解されやすいというペプチドの欠点を克服した、環状ペプチドは医薬品として多くの可能性を秘めている。RA-VII のような特殊な構造の環状ペプチドが溶液中でどのように振る舞い、また立体配座によって構造の揺らぎや膜透過にどのような影響が出るかは、今後の環状ペプチドの製剤化にとって有益な知見となる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた生命物理科学研究室 高須昌子先生に感謝致します。稚拙な英語や論理構成で論文作成に関しては、多大なご迷惑を御かけしました。また、博士課程から移動したい、という私の我が儘に対して前向きにお話を聞いて下さった日をいまだに覚えています。ありがとうございました。

同研究室の宮川毅先生からは、タンパク質のシミュレーションにおいて丁寧かつ熱心な指導を承りました。博士課程からの研究で、右も左も分からない中で研究が行え、ここまで辿りつけたことは、宮川先生がいらっしゃらなければ成し遂げられませんでした。深く御礼申し上げます。

日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた同研究室の森河良太先生にも感謝します。先生の明るい言動によって、前向きに研究に取り組むことができました。本当にありがとうございます。

加えて、山田寛尚さんを始めとした生命物理科学研究室の皆様にも、皆様のおかげで厳しい局面も楽しく乗り越えることができました。感謝いたします。

RA-VII や化学的な知見に関して東京薬科大学薬学部天然医薬品化学教室の一柳幸生先生より御指導を賜りました。ポスターやプロシーディングの作成時に、緻密な御指導を頂きました。至らぬ点が多くご迷惑ばかりおかけし、申し訳ありませんでした。誠にありがとうございます。また、竹谷孝一先生には御指導や励ましのお言葉を度々頂戴しました。誠にありがとうございます。

同学部 横島智先生には量子化学計算を始めとした計算科学全般について御指導を賜りました。量子化学計算の Gaussian は横島先生の教えが無ければ進みませんでした。また、解析した物理量に関してのディスカッションに多くの時間を割いて頂きました。また、論文作成において、全体の方向性を示唆して頂いたことに深く感謝します。

また、修士課程において指導して頂いた基礎生命科学研究室 (現 分子生物化学研究室) の井上英史先生、尹永淑先生、藤川雄太先生に感謝いたします。学部生時代は、井上先生に憧れて大学院進学を決めました。先生の御指導により、真摯に研究に取り組む姿勢を学ぶことができたことは、自分自身の誇りであり、楽しい思い出の日々です。また、尹先生には修士課程から悩みを聞いて頂き、その過程で RA ペプチドの存在を教えて下さいました。本当にありがとうございました。藤川先生は修士修了までの短い期間でしたが、「実験をする」ということの根幹のロジカルな部分をご指導頂きました。非常に貴重な経験だったと思います。最後に、部外者の私にも優しく接して下さった多くの後輩の方々、貴重な時間を割いて下さりありがとうございます。改

めて教員、学生の皆様に深く感謝申し上げます。

天然化合物の興味を駆り立てて下さったのは、アドバイザーの環境動態化学研究室(当時)の故・貝瀬利一先生でした。ゼミの紹介で学生を叱っていたことを今でも覚えています。国際学会に和服で参加してくるなど、良い意味で破天荒なお話を聞いて、物事の概念に捉われすぎないことを学びました。実験系から理論系の研究室に移動し、広い視点で研究に取り組めたことは先生のおかげです。また、当時の毒物の講義の影響によって、天然化合物の研究を行うに至りました。誠にありがとうございました。

最後に、博士課程の進学を認めて下さり、研究活動を陰ながら支えてくれた家族と彼女、そして寝食供にしてきた2人の友人。本当にありがとうございます。

本研究は多くの皆様の御協力によって行えました。皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。本当にありがとうございました。

参考文献

- 1 平成 28 年人口動態統計月報年計 (概数) の概況 厚生労働省
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai16/index.html>
- 2 最新がん統計 国立がん研究センター
http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- 3 厚生労働省委託事業 平成 22 年度 がん対策評価・分析事業
- 4 Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2006;6 (10) :789-802.
- 5 Hailing Y, Anutosh G, Fernando C. Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlates with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285 (42) :32242–32250.
- 6 Britta S, Mary D. Understanding cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life*. 2007;59 (11) :696-699.
- 7 Dirk S, Robert F and Mohamed A M. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*. 2003;20 (3) :275-87.
- 8 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev*. 1997;23;3-25.
- 9 Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, McKenzie N, Stiller CR. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Can Med Assoc J*. 1982;126:1041-1046
- 10 Bockus AT, Lexa KW, Pye CR, Kalgutkar AS, Gardner JW, Hund KCR, Hewitt WM, Jchwochert JA, Glassey E, Prince DA, Mathiowetz AM, Liras S, Jacobson MP, Lokey RS. Probing the physicochemical boundaries of cell permeability and oral bioavailability in lipophilic macrocycles inspired by natural products. *J. Med. Chem.*, 2015; 58: 4581-4589.
- 11 Rezai T, Yu B, Millhauser GL, Jacobson MP, Lokey RS. Testing the conformational hypothesis of passive membrane permeability using synthetic cyclic peptide diastereomers. *J. AM. CHEM. SOC.*, 2006; 128: 2510-2511.
- 12 Hewitt WM, Leung SSF, Pye CR, Ponkey AR, Bednarek M, Jacobson MP, Lokey RS. Cell-permeable cyclic peptides from synthetic libraries inspired by natural products. *J. Am. Chem. Soc.*, 2015; 137: 715-721.
- 13 Rezai T, Bock JE, Zhou MV, Kalyanaraman C, Lokey RS, Jacobson MP. Conformational flexibility, internal hydrogen bonding, and passive membrane permeability: successful in

- silico prediction of the relative permeabilities of cyclic peptides. J. AM. CHEM. SOC., 2006; 128: 14073-14080.
- 14 Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. J Med Chem. 1998;41:1007-1010.
 - 15 Itokawa H, Watanabe K, Mihara K. Screening Test for antitumor activity of crude drugs (I) . Shoyakugaku Zasshi. 1979;33 (2) :95-102.
 - 16 Itokawa H, Watanabe K, Mihara K. Screening Test for antitumor activity of crude drugs (II) . Shoyakugaku Zasshi. 1979;36 (2) :145-149.
 - 17 Itokawa H, Takeya K, Mihara K, Mori N, Hamanaka T, Sonobe T, Iitaka Y. Studies on the antitumor cyclic hexapeptides obtained from rubiae radix. Chem. Pharm. Bull. 1983; 31: 1424-1427.
 - 18 Itokawa H, Takeya K, Mori N, Sonobe T, Mihashi S, Hamanaka T: Studies on Antitumor cyclic hexapeptides RA obtained from Rubiae Radix Rubiaceae. VI: minor antitumor constituents. Chem. Pharm. Bull. 1986; 34:3762–3768.
 - 19 Itokawa H, Morita H, Takeya K, Tomioka N, Itai A, Iitaka Y: New antitumor bicyclic hexapeptides, RA-VI and -VIII from *Rubia cordifolia*; conformation-activity relationship II. Tetrahedron 1991; 47:7007–7020.
 - 20 Itokawa H, Yamamiya T, Morita H, Takeya K: New antitumour bicyclic hexapeptides, RA-IX and -X from *Rubia cordifolia*. Part 3. Conformation–antitumour activity relationship. J Chem Soc, Perkin Trans 1 1992;4:455–459.
 - 21 Morita H, Yamamiya T, Takeya K, Itokawa H. New antitumor bicyclic hexapeptides, RA-XI, -XII, -XIII and -XIV from *Rubia cordifolia*. Chem Pharm Bull. 1992; 40 (5) : 1352-1354.
 - 22 Takeya K, Yamamiya T, Morita H, Itokawa H. Two antitumor bicyclic hexapeptides from *Rubia cordifolia*. Phytochemistry. 1993;33 (3) :613-615.
 - 23 Hitotsuyanagi Y, Ishikawa H, Hasuda T, Takeya K., Isolation, structural elucidation, and synthesis of RA-XVII, a novel bicyclic hexapeptide from *Rubia corolla*, and the effect of side chain at residue 1 upon the conformation and cytotoxic activity, 2003; Tetrahedron Letters: 935-938.
 - 24 Shivanand DJ, Joseph JH, Sterling JT, Richard MW, Jack RC, Satish KA, Robert BB, Robin LG, George RK. Bouvardin and deoxybouvardin, antitumor cyclic hexapeptides from *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae) . J Am Chem Soc. 1977;23:8040-8044.

- 25 Hitotsuyanagi Y, Aihara T, Takeya K. RA-dimer A, a novel dimeric antitumor bicyclic hexapeptide from *Rubia cordifolia* L.. Tetrahedron Lett. 2000;41:6127-6130.
- 26 Morita H, Kondo K, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Itokawa H, Tomioka N, Itai A, Iitaka Y. Conformational analysis of antitumor cyclic hexapeptides, RA series. Tetrahedron, 1990;16/17; 2757-2772.
- 27 Boger DL, Patane MA, Zhou J. Solution phase conformational studies of the cyclic peptide RA-VII: lithium chloride perturbation of the conformational equilibria. J. Am. Chem. Soc. 1995; 117: 7357-7363.
- 28 Hitotsuyanagi Y, Odagiri M, Kato S, Kusano J, Hasuda T, Fukuya H, Takeya K. Isolation, structure determination, and synthesis of Allo-RA-V and Neo-RA-V, RA-series bicyclic peptides from *Rubia cordifolia* L.. Chem. Eur. J. 2012; 18: 2839-2846.
- 29 Majima H, Tsukagoshi S, Furue H, Suminaga M, Sakamoto K, Wakabayashi R, Kishino S, Niitani H, Murata A, Genma A, Nukariya N, Uematsu K, Furuta T, Kurihara M, Yoshida F, Isomatsu S, Asai R. Phase I study of RA-700. Jpn. J Cancer Chemother. 1994; 21: 67-78.a*
- 30 Yoshida F, Asai R, Majima H, Tsukagoshi S, Furue H, Suminaga M, Sakamoto K, Niitani H, Murata A, Kurihara M, Izumi T, Nakao I, Ohhashi Y, Ito K. Study of cardiac function in first stage examination of RA-700. Jpn J cancer chemother. 1993;20 (1) :67-78.*
- 31 Zalacain M, Zaera E, Vazquez D, Jimenez A. The mode of action of the antitumor drug boubardine, an inhibitor of protein synthesis in eukaryotic cells. FEBS letters. 1982;148 (1) :95-97.
- 32 Sirdeshpande BV, Toogood PL. Inhibition of protein synthesis by RA-VII. Bioorg. Chem., 1995; 23: 460-470.
- 33 Bruce A, Alexander J, Julian L, Martin Raff, Keith R, Peter Walter. 「細胞の分子生物学 第5版」 (中村桂子・松原謙一 監訳) 2010 ニュートンプレス社
- 34 Fujiwara H, Sato S, Hitotsuyanagi Y, Takeya K, Ohizumi Y. RA-VII, a cyclic depsipeptide, changes the conformational structure of actin to cause G2 arrest by the inhibition of cytokinesis. Cancer Letters. 2004; 209: 223-229.
- 35 Hitotsuyanagi Y, Sasaki S, Matsumoto Y, Yamaguchi K, Itokawa H, Takeya K. Synthesis of [L-Ala-1]RA-VII, [D-Ala-2]RA-VII, and [D-Ala-4]RA-VII by epimerization of RA-VII, an antitumor bicyclic hexapeptide from *Rubia* plants, through oxazoles. J. AM. CHEM., 2003;125:7284-7290.

- 36 Hitotsuyanagi Y, Hasuda T, Aihara T, Ishikawa H, Yamaguchi K, Itokawa H, Takeya K. Synthesis of [Gly-1]RA-VII, [Gly-2]RA-VII, and [Gly-4]RA-VII. Glycine-containing analogues of RA-VII, an antitumor bicyclic hexapeptide from *Rubia plamts*. J. Org. Chem. 2004;69:1481-1486.
- 37 Itokawa H, Kondo K, Hitotsuyanagi Y, Isomura M, Takeya K. Studied on RA derivatives. V. Synthesis and antitumor activity of Ala²-modified RA-VII derivatives. Chem. Pharm. Bull. 1993; 41 (8) : 1402-1410.
- 38 Hitotsuyanagi Y, Motegi S. Hasuda T, Takeya K. Semisynthesis of an analogue of anti tumor bicyclic hexapeptide RA-VII by fixing the Ala-2/Tyr-3 bond to Cis by incorporating a triazole cis-amide bond surrogate. Org. Lett., 2004; 6 (7) : 1111-1114.
- 39 Itokawa H, Kondo K, Hitotsuyanagi Y, Nakamura A, Morita H, Takeya K. Preparation and Cytotoxicity of Cyclic Hexapeptides, RA Derivatives. Chem. Pharm. Bull. 1993; 41: 1266-1269.
- 40 Boger DL, Zhou J. Key analogues of the tetrapeptide subunit of RA-VII and deoxybouvardin. Bioorg. Med. Chem., 1996;4 (10) :1597-1603.
- 41 Lee JE, Hitotsuyanagi Y, Nakagawa Y, kato S, Fukuya H, Takeya K. Design and synthesis of a bis (cycloisodityrosine) analogue RA-VII, an antitumor bicyclic hexapeptide. Bioorg Med Chem Lett. 2008;18:6458-6461.
- 42 Hitotsuyanagi Y, Suzuki J. Matsumoto Y, Takeya K, Itokawa H. Studies on *Rubia akane* (RA) derivatives. part 7. thioamide analogues of RAs: antitumor cyclic hexapeptides. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1994: 14; 1887-1889.
- 43 Hitotsuyanagi Y, Matsumoto Y, Sasaki S, Suzuki J, Takeya K, Yamaguchi K, Itokawa H. Studies on *Rubia akane* (RA) derivatives. Part 10. Backbone transformation of RA-VII, an antitumour cyclic hexapeptide, through thionation. X-Ray crystal structure of [Tyr-3-Ψ (CH₂NH) -Ala-4]RA-VII. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1996; 1749-1755.
- 44 Hasuda T, Hitotsuyanagi Y, Shinada M, Takeya K. Synthesis of [Tyr-5-Ψ (CH₂NMe) -Tyr-6]RA-VII, a reduced peptide bond analogue of RA-VII, an antitumor bicyclic hexapeptide. Bioorg. Med. Lett., 2012; 22: 2757-2759.
- 45 Boger DL, Patene MA, Jin Q, Kitos PA. Design, sythesis and evaluation of bouvardin, deoxybouvardin and RA-I-XIV pharmacophore analogs. Bioorg. Med. Chem. 1994; 2 (2) : 85-100.
- 46 Hutchinson EG, thornton JM. A revised of potentials for β-turn formation in proteins. Protein science. 1994;3:2207-2216.

- 47 Lewis ON, Momany FA, Scheraga HA. Chain reversals in proteins. *Biochim Biophys acta*. 1972;303:211-229.
- 48 Yan H, Pan X, Tan N, Fan J, Zeng G, Han H. 2D- and 3DQSAR studies on 54 anti-tumor Rubiaceae-type cyclopeptied. *European journal of Medicinal Chemistry*, 2009; 44: 3425-3432.
- 49 Löwdin PO. Quantum Theory of Many-Particle Systems. III. Extension of the Hartree-Fock Scheme to Include Degenerate Systems and Correlation Effects *Phys Rev*. 1995;97;1509
- 50 Hohenberg P and Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev*. 1964;136;B864.
- 51 Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. Ab initio calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J Phys Chem*. 1994;98 (45) :11624-11627.
- 52 Yanai T, Tew DP, Handy NC. A new hybrid exchange-correlation functional using the coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP) . *Chem Phys Lett*. 2004;393:51-57.
- 53 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. Gaussian 09 [CD-ROM] Revision D.01. Wallingford (CT) , USA: Gaussian; 2009. Extent: Physical description.
- 54 Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem Rev*. 2005;105:2999-3094.
- 55 Hanwell MD, Curtis DE, Lonie DC, et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminf*. 2012;4 (17) :1–17.
- 56 Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *J Comput Chem*. 2004;25 (9) :1157-1174.
- 57 Bayly CI, Cieplak P, Cornell WD, et al. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J Phys Chem*. 1993;97:10269–10280.
- 58 Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, et al. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem*. 1997;18 (12) :
- 59 Hess B, Kutzner C, Spoel DVD, Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput*. 2008; 4 (3) : 435-447.
- 60 Strader ML, Feller SE. A flexible all-atom model of dimethyl sulfoxide for molecular dynamics simulations. *J Phys Chem A*. 2002;106 (6) :

- 61 Pachler KGR, Nuclear magnetic resonance study of some α -amino acids-II. Rotational isomerism. *Spectrochimica Acta*. 1964;20:581-587.