

Fig. 5-03 PM3 法による水和反応 $\text{Gd}^{3+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6 \rightarrow \text{Gd}^{3+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_7 + \text{H}_2\text{O}$ における標準生成熱(H_f)の変化
()内は 9 配位構造を 0.0 kJ/mol としたときの相対値

安定な 9 配位構造から遷移状態を経て 10 配位構造に至る間に、系の H_f は 70.5 kJ/mol 上昇した後、67.2 kJ/mol 下降している。従って、この水和反応の活性化エネルギーに相当するエネルギー障壁は 70.5 kJ/mol (16.9 kcal/mol) と見積もられる。遷移状態構造では切断されつつある Gd-O 結合の結合距離は、 Gd^{3+} イオンの大きなイオン半径を反映して 3.648 Å である。隣接する二つの配位水分子の水素が離れつつある水分子の酸素原子を水素結合 ($\text{RH}\cdots\text{O}$: 1.770 Å, 1.778 Å) で挟み込むような立体配座を取って系の不安定化を抑えている。実際の水素結合では $\text{O-H}\cdots\text{O}$ 結合の核間距離は $\text{RO-H} = 1.0$ Å, $\text{RH}\cdots\text{O} = 1.7$ Å 程度であることが知られており、かなり正確に水素結合を評価していることが分かる。

遷移状態構造においても、Gd-N 平均核間距離はほとんど変化していないので ($R_{\text{Gd-N}}: 2.559 \pm 0.001$ Å)、標準生成熱の上昇は一つの配位水分子が 9 配位している配位子間に割り込んでくることによる不安定化によるものである。また、この過程で生成する 10 配位構造のイオンはわずかながら低いエネルギー障壁 (67.2 kJ/mol; 16.1 kcal/mol) を通ってもとの 9 配位構造に戻ることができる。従って、安定な 9 配位構造の Gd(III) 錯体に媒質分子である水が攻撃して、わずかながら不安定な過剰に水和した 10 配位構造の Gd(III) 錯体を生成した後、再び脱水して 9 配位構造に戻るといった反応機構は可能である。この過剰水和構造にある時に Gd(III) の 8 重項状態と配位水分子との磁気相互作用により磁氣的に飽和した水素核を急速に緩和することができる。しかしながら、ここで求められたエネルギー障壁 (70.5 kJ/mol; 16.9 kcal/mol) は室温で速やかに起こる反応としてはかなり大きい値である。

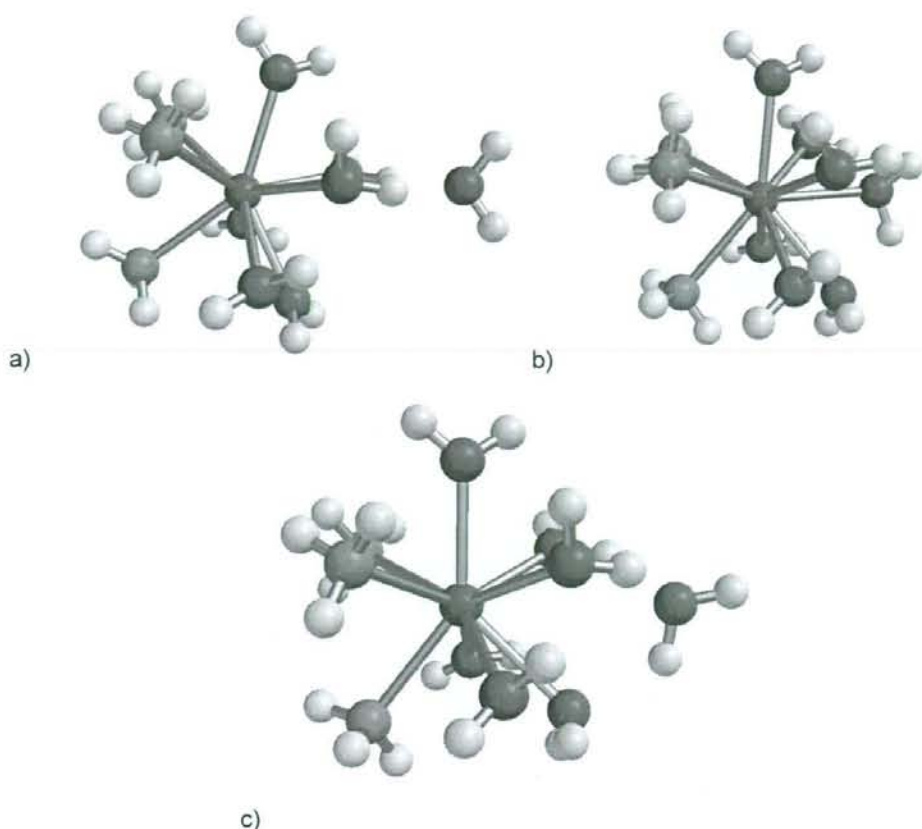


Fig. 5-04 PM3 法による $\text{Gd}^{3+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6$ の水和反応における最適化構造
 a) 9 配位構造, b) 10 配位構造, c) 遷移状態構造

この過大な活性化エネルギーの原因としては半経験的分子軌道計算法としてのPM3法のパラメータの不適正が考えられる。半経験的分子軌道計算法は、まだ電子計算機の性能が低かった1970年代に発達した計算法である。分子軌道法では、Schrödinger 方程式を近似解として解く。しかしながら、正当な近似解法である非経験的 *ab initio* 法でも指数関数の多大な積分計算を必要とし、電子計算機の性能が飛躍的に向上した現在でもタンパク質のような巨大分子系や今回の計算対象にも含まれる、多くの内殻電子をもつ希土類元素を含む系には *ab initio* 法やそこから派生した密度汎関数法を適用することが難しい。さらに、使用した計算パッケージ Spartan'06 for Linux には、今回の計算の対象となった錯体化合物に含まれるガドリニウムの基底原子波動関数が *ab initio* 計算用モジュールに含まれていなかった。しかし、半経験的分子軌道法モジュールのうちのPM3法モジュールにはガドリニウム用のパラメータが用意されていたのでこれを用いることにした。半経験的分子軌道法の特徴は *ab initio* 法で計算される基底原子波動関数の数値積分をあらかじめ用意したパラメータ群やパラメータを使った代替関数で計算することである。一般に、これらのパラメータ群は、それぞれの基底原子波動関数の積分値の意味するところをイオン化ポテンシャルや双極子モーメントを基にして計

算式が定義され、その計算値が現実に実在する分子の熱力学的な実測値に適合するように決められている。しかし、ガドリニウムのように実測例が豊富でない原子の場合、パラメータの適正さには疑問が残る。また、実在分子の熱力学的データは、安定な分子にのみ得られるもので、遷移状態構造のように現実には得られない分子構造やエネルギー値には誤差が大きくなるものと考えられる。さらに、PM3 法やそのプロトタイプのパラメータセットである AM1 法や MNDO 法では NDDO 近似(Neglect of Diatomic Differential Overlap: 異原子間の電子反発積分 $\langle\mu\nu|\lambda\sigma\rangle$ を無視することで計算の高速化を図る)を用いており、もともと、非常に高精度な計算方法というわけではない。すでに MNDO 法の段階から遷移状態構造のような実測パラメータが得られない分子については分子エネルギー値が高めに見積もられ、実際より高い活性化エネルギーが算出されることが指摘されていた。従って、この PM3 法計算で得られたエネルギー障壁の値 70.5 kJ/mol (16.9 kcal/mol)に対して、実際の活性化エネルギーはかなり低く、反応は体温程度ではかなり速やかに配位水分子の交換が起きているものと推定される。

5-3 非経験的分子化学計算による反応機構解析

5-3-1 密度汎関数法によるマンガン(II)錯体の水和-脱水機構の解明と半経験的分子軌道法計算の評価

前節では、水分子が配位子したガドリニウム錯体上での配位水分子の交換反応機構を、半経験的分子軌道計算 PM3 法を用いて検討した結果を示した。半経験的分子軌道計算の精度の中では、算出されたエネルギー障壁がやや高いながら、反応機構としては十分ありうるという結論を得た。次に、さらにこの結論を補強するため半経験的分子軌道計算 PM3 法と高精度な密度汎関数法(Density Functional Theory: DFT)を用いて計算を行い、これら二つの結果を比較して PM3 法による計算から得られる結果の信頼性を評価した。しかしながら、前述のとおり、ガドリニウム原子の *ab initio* 計算のための基底原子波動関数が、今回利用している分子軌道法計算プログラムパッケージ Spartan'06 for Linux には用意されていない。そこで、近縁の化学種をモデル物質として用い PM3 法の評価を行うこととした。

MRI 造影剤は、電子スピン多重度の高い原子と水素核スピンとの常磁性相互作用による水素核スピンの速やかな緩和を促す物質である。ガドリニウム(III)は 4f 軌道の対 7 電子によるスピン相互作用を利用するものであるが、マンガン(II)も 3d 軌道に 5 個の対電子を持つ 6 重項化学種でありその錯体も MRI 造影効果を示す。そこで、6 配位 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ 錯体をモデル構造として、PM3 法と DFT 法による計算を行い、その結果を比較することで、このような遷移金属アンミン錯体に対する PM3 法による計算結果の妥当性について検証した。

5-3-2 方法

先の計算と同等の計算環境下、正八面体型 6 配位マンガン(II)アンミン錯体 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ の初期構造を GUI 上に構築し、基底関数系を 6-31G*として DFT 計算モジュール(ポテンシャル関数: B3LYP)を使って、ジカチオン・6 重項状態の条件で構造最適化を行った。6 配位安定構造から出発して、1 個の配位水分子の酸素原子と中心マンガン原子間距離

を延ばしながら構造最適化を行った。Mn-O 核間距離と相対エネルギー値をプロットし 6 配位・5 配位の安定構造と遷移状態構造およびこの反応のエネルギー障壁を見積もった。この計算過程を、半経験的分子軌道計算でも、この 6 配位安定構造から出発して PM3 法を用いてジカチオン・6 重項状態の条件で同様に行い、両者の結果を比較した。

5-3-3 結果と考察

Fig. 5-05 に、DFT 計算の全エネルギーの相対値、Fig. 5-6 に構造最適化された 6 配位構造、構造最適化された 5 配位構造と脱離した水分子、遷移状態構造の分子模型図を示す。

相対エネルギー値は 5 配位構造が 6 配位構造よりも安定であることを示した。従って、反応としては、水素結合で安定化した 5 配位構造 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2 + \text{H}_2\text{O}$ の状態から出発して 6 配位構造 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ に至る過程の方が遅いことを示している。そして、そのエネルギー障壁は 8.5 kJ/mol と非常に小さくなった。また、6 配位構造と水素結合で安定化した 5 配位構造のエネルギー差は、1.2 kJ/mol とほとんど差がない。このような小さなエネルギー差やエネルギー障壁は水素結合(-20 kJ/mol)よりもはるかに小さいエネルギー差で、室温程度でも両者間で速やかに平衡が起こっていることを物語っている。

一般に、基底関数に中程度の精度の 6-31G*を用い B3LYP ポテンシャル関数系で行ったハイブリッド DFT 計算は、短い計算時間で、電子相関補正のために *ab initio* 法で用いられる各種のポスト SCF 計算をした場合に匹敵する計算精度を示すことが知られており、正確な分子構造やエネルギーを再現できる。しかし、欠点として、van der Waals 相互作用や弱い水素結合のような分子間相互作用エネルギーを正確に与えることができないことが知られている。そのため水素結合を含むこの系では 5 配位構造の真のエネルギー値に多少の変動がある可能性があるが、いずれにしても熱力学的には 5 配位、6 配位いずれの構造も安定でほとんど活

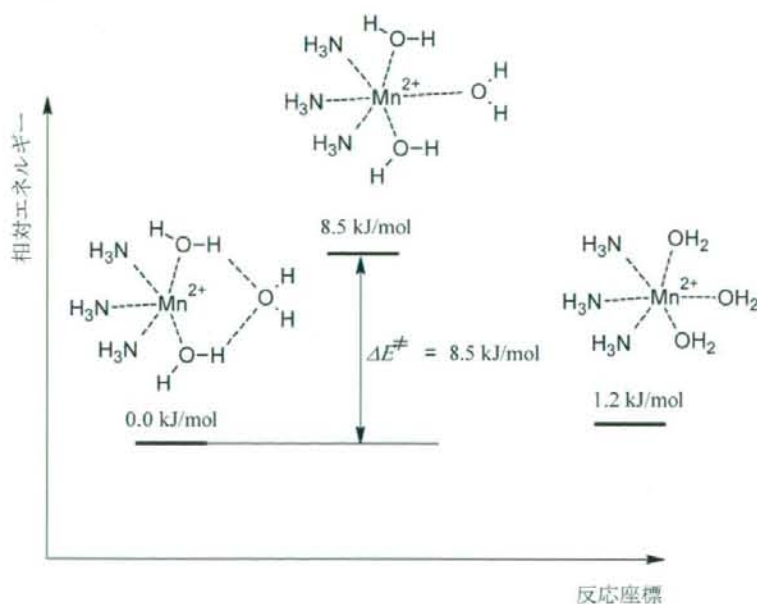


Fig. 5-05 DFT(6-31G*/B3LYP)計算による水和反応 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ における全エネルギーの変化

性化エネルギーを必要とすることなく配位水分子の水和・脱水和が速やかに起こることを示している。

構造的には、6 配位構造はほとんど変形のない正八面体構造を示す。Table 5-01 にそれぞれの結合距離と結合角を示す。 $RMn-O$ 核間距離($2.287 \pm 0.005 \text{ \AA}$)も $RMn-N$ 核間距離($2.277 \pm 0.009 \text{ \AA}$)もそれぞれ大きな変動はない。原子半径が酸素より大きい窒素原子を含む $Mn-N$ 結合の方が、わずかに結合距離が短いのは、水分子の酸素原子よりアンモニア分子の窒素原子の方が配位力が高く、より強く Mn^{2+} イオンに結合しているからである。結合角では H_2O よりかさ高い NH_3 を含むので $\angle N-Mn-N$ 結合角の方が $\angle O-Mn-O$ 結合角より大きくなったが、その差はわずかである。一方、5 配位構造では Table 5-02 に示すように、ほとんど対称な三角両錐体構造を示した。やはり、 $RMn-O$ 核間距離($2.274 \pm 0.003 \text{ \AA}$)、 $RMn-N$ 核間距離($2.206 \pm 0.012 \text{ \AA}$)とも配位数の減少に伴って結合距離の短縮が見られる。アンモニア 3 分子のうち二つが脱水和した水分子を挟むように水素結合しており、 $\angle N-Mn-N$ 結合角はこのためかなり不均一となっている。 $N-H \cdots O$ 水素結合の距離は実際にはかなり短い($RN-H = 1.0 \text{ \AA}$, $RH \cdots O = 1.8 \text{ \AA}$)が、計算結果はやや長く($RH \cdots O = 2.020, 2.022 \text{ \AA}$)、わずかに分子間相互作用を小さく見積もっているのがわかる。

遷移状態構造では 5 配位構造から接近しつつある水分子の酸素原子とマンガン原子との核間距離は $RMn-O = 2.80 \text{ \AA}$ であり、先のガドリニウム(III)錯体の、水和反応の遷移状態構造における $RGd-O$ (3.65 \AA)よりもかなり小さくなった。 Mn^{2+} と Gd^{3+} のイオン半径比は $82 \text{ pm}(Mn^{2+}; 6 \text{ 配位高スピン状態})/94 \text{ pm}(Gd^{3+})$ でこれほどの差は生じないと考えられる。この遷移状態に至る途中の反応段階でも連続的に構造が変化し、エネルギー変化も単調増大の後、単調下降していることや、酸素原子や窒素原子の原子半径から考えられる結合距離と、計算された構造パラメータが妥当なことから、この遷移状態構造全体も、かなり妥当性が高いものであると考えられる。

これに対して PM3 計算は全く異なる結果を示した。Fig. 5-07 に示すようにその相対エネルギー値は 6 配位構造で最低になり、強制的に配位水分子を引き離して 5 配位構造に移行すると単調にエネルギー増大して不安定化するのみであり、相当する遷移状態や安定な 5 配位の幾何構造は得られず、最終的な 5 配位構造+水 1 分子の状態の出発構造である 6 配位構造に対する相対エネルギー差は $+37.3 \text{ kJ/mol}$ であった。5 配位側からはエネルギー障壁が存在しないため、このまま、 $Mn-O$ 結合距離の制限を外して構造最適化計算を行うと出発の 6 配位構造に戻ってしまう。

Fig. 5-08 は PM3 法を用いてこの $Mn^{2+}(NH_3)_3(H_2O)_3$ 錯体を計算して得られた幾何構造の分子模型図である。6 配位構造(Fig. 5-08a)および 5 配位構造(Fig. 5-08b)はそれぞれ辛うじて正八面体、三角両錐体構造を示しているが、その構造はかなり変形していて DFT 計算で得られた構造とは異なる。さらに Fig. 5-08b の構造を出発点として $Mn-O$ 結合距離の制限をはずして構造最適化するともとの 6 配位構造に戻ってしまうため、水分子を 1 分子除いて構造最適化した 5 配位構造 $[Mn^{2+}(NH_3)_3(H_2O)_2]$ を Fig. 5-08c に示す。期待通り、三角両錐体構造であることを示しているが、三つの $\angle N-Mn-N$ 結合角は理想的な対称型の 120° ではなくかなり歪んだ構造をしている ($110.58, 111.34, 138.08^\circ$)。このような変形した安定構造を算出する原因として計算に用いるパラメータの不適切が考えられる。先述したように、もともと、半経験的分子軌道法は粗い近似を使っている。PM3 法では d 軌道電子も考慮されるようになったが、その計算結果

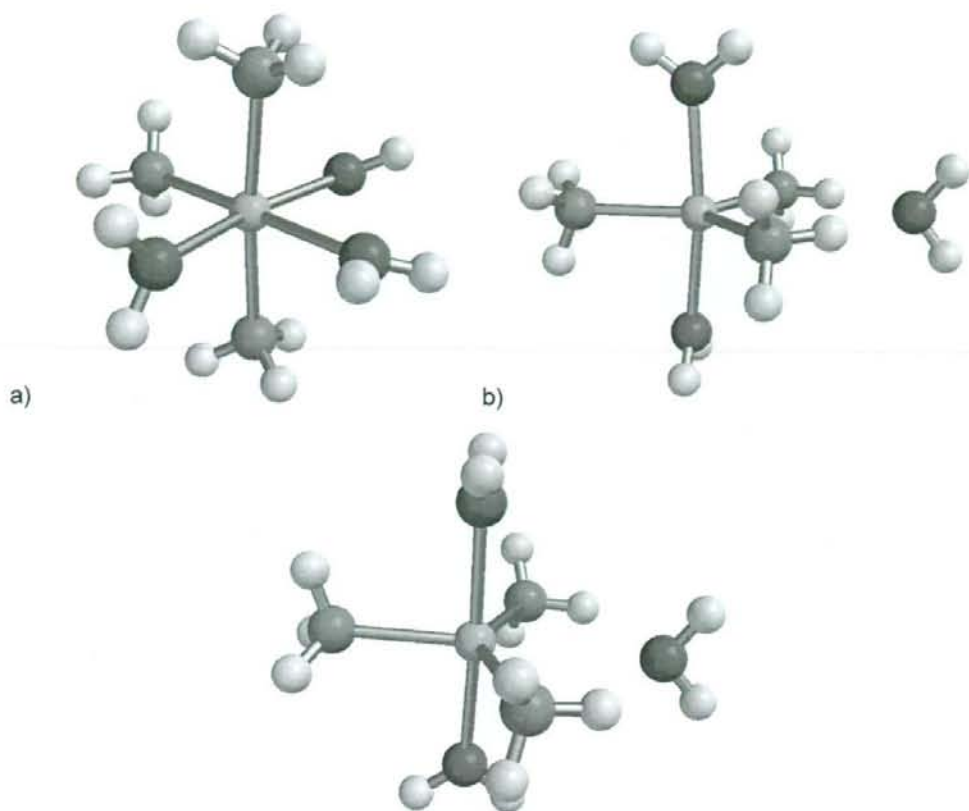


Fig. 5-06 DFT(6-31G*/B3LYP)計算による脱水和反応 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3 \rightarrow \text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_2 + \text{H}_2\text{O}$ 過程における最適化構造
a) 6 配位構造, b) 5 配位構造, c) 遷移状態構造

結合	結合距離(Å)	結合	結合角(°)
Mn-O1	2.282	$\angle\text{O1-Mn-O2}$	87.76
Mn-O2	2.292	$\angle\text{O2-Mn-O3}$	81.10
Mn-O3	2.287	$\angle\text{N1-Mn-N2}$	92.54
Mn-N1	2.275	$\angle\text{N2-Mn-N3}$	94.16
Mn-N2	2.286	$\angle\text{O1-Mn-N1}$	88.00
Mn-N3	2.271	$\angle\text{O1-Mn-N3}$	91.19
		$\angle\text{O2-Mn-N1}$	87.04
		$\angle\text{O2-Mn-N3}$	86.27

Table 5-01 DFT(6-31G*/B3LYP)計算によるマンガン(II)アンミン錯体 $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ の
主な構造パラメータ

結合	結合距離(Å)	結合	結合角(°)
Mn-O1	2.271	∠N1-Mn-N2	127.49
Mn-O2	2.277	∠N1-Mn-N3	127.91
Mn-N1	2.222	∠N2-Mn-N3	104.55
Mn-N2	2.199	∠O1-Mn-N1	87.46
Mn-N3	2.198	∠O1-Mn-N2	90.37
N2H-O3	2.020	∠O2-Mn-N1	86.22
N3H-O3	2.022		

Table 5-02 DFT(6-31G*/B3LYP)計算によるマンガン(II)アンミン錯体 $Mn^{2+}(NH_3)_3(H_2O)_2 + H_2O$ の主な構造パラメータ

の精度に寄与する効果はs軌道やp軌道電子より低いであろう。したがって、PM3法でd電子を有する錯体の計算では、s性やp性が相対的に高い多配位構造のほうがより正確な結果を与えやすい可能性がある。このことをもとにガドリニウム錯体を考えると、前述のようにPM3法ではf軌道は考慮されていない。また、 Gd^{3+} ではspd電子が存在しない無電子構造が仮定される。構造的に誤った結果を与える可能性のあるf電子やd電子の寄与が考慮されていないので、却って結果に正確性を期待できるとも考えられる。以上のように考えると、 $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_6$ の水和反応のPM3法による解析は、不安定なはずの10配位構造を安定な構造と予想し、かなり大きなエネルギー障壁を示したが、反応機構としては比較的妥当性を有しているのではないかと考えられる。

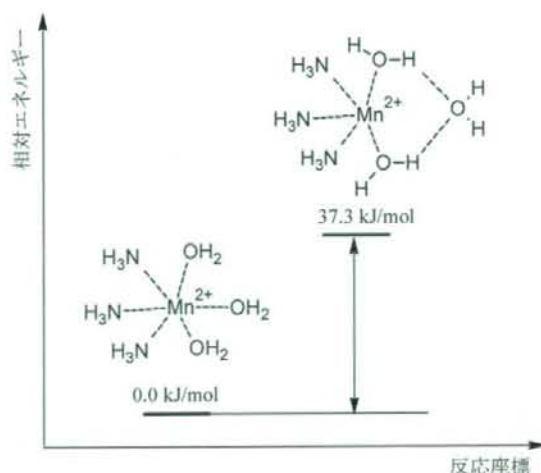


Fig. 5-07 PM3法による脱水和反応 $Mn^{2+}(NH_3)_3(H_2O)_3 \rightarrow Mn^{2+}(NH_3)_3(H_2O)_2 + H_2O$ における標準生成熱(H_f)の変化(相対エネルギー差)

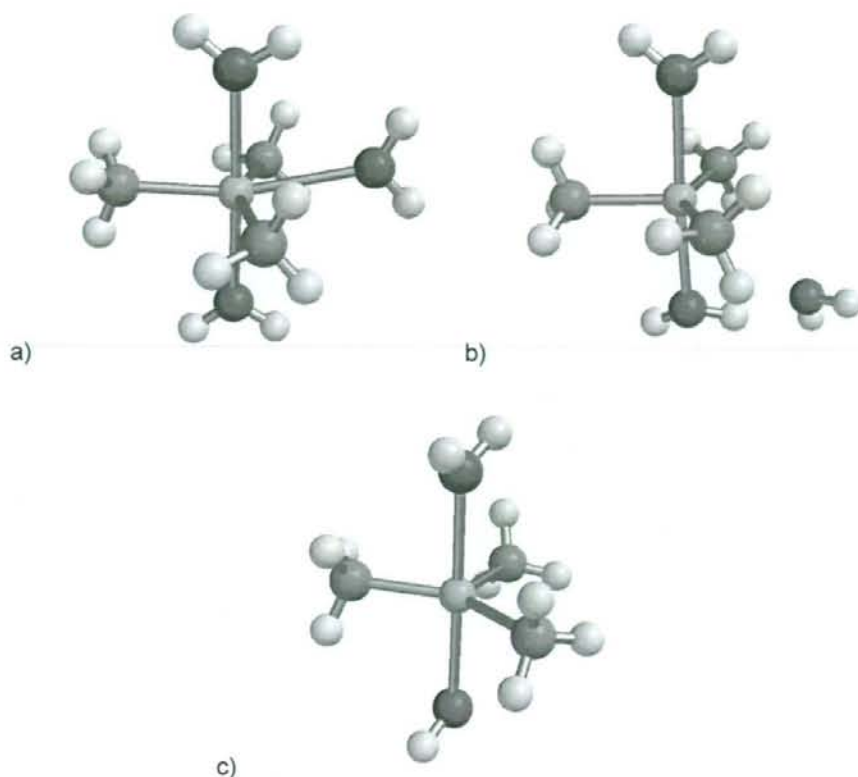


Fig. 5-08 PM3 法による $\text{Mn}^{2+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_3$ の脱水和反応における最適化構造

- a) 6 配位構造, b) 5 配位構造(非配位水分子との Mn-O 結合距離を制限している),
c) 最安定 5 配位構造

5-4 分子力学法による分子間相互作用解析

5-4-1 シュガーボールデンドリマー-DTPA-Gd(III) 錯体とヒト血清アルブミンの親和性評価

以上のように、アミン配位子を有する Gd(III)錯体の MRI における造影効果は、多配位構造に由来する配位水分子が体温程度で非常に速やかに水和-脱水和を繰り返すことにより、磁氣的に飽和した水素核を有する水分子が 8 重項ガドリニウムイオン近傍に位置する間に常磁性磁気相互作用による速やかな緩和を受けることで生じるという反応機構が PM3 計算やその検証のために行ったマンガン錯体での DFT 計算から支持された。

本研究事業では、毒性のある MRI 造影剤であるジエチレントリアミンペンタカルボン酸ガドリニウム(Gd-DTPA)錯体を核として、その周囲にグルコン酸アミド基によるシュガーボールデンドリマーの殻を作り、ガドリニウムイオンと生体構成成分との直接的な相互作用の阻

害や水溶性の増加等の効果による新規 MRI 造影剤の開発を目指している。その過程で、このような化合物 (Gd-DTPA-sugar) には、特に血管特異的な強い造影効果や代謝・排出速度の遅延効果が見られることが分かってきた。このような効果は、血液中に存在するタンパク質と特異的に相互作用して安定な基質-タンパク質複合体を形成しているために起こるのであろうと考えられる。血液中のタンパク質の 50-60% を占める水溶性タンパク質であるヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA) はそのようなタンパク質の最も有力な候補である。

HSA は、584 アミノ酸からなる分子量 69,000 のかなり大きな水溶性タンパク質で等電点 4.9 のやや酸性を示す。分子表面はいくらか疎水性で、脂肪酸や脂質等の難溶性物質と疎水的相互作用を利用して複合体を形成し、血液中でのこれら難溶性物質の輸送を担っている。従って、親水性の糖部の存在に関わらず Gd-DTPA-sugar にも、あるいは、親構造物質 Gd-DTPA 自体にも HSA との疎水的相互作用や水素結合の存在が期待される。そこで、Gd-DTPA-sugar 誘導体と HSA との相互作用による複合体形成とその安定性の差を比較検討し、高活性 MRI 造影剤として最適な分子構造を検討した。

しかし、このような巨大な複合分子系を、半経験的分子軌道法を含む分子軌道法を適用して解析するには極めて膨大な計算機資源を必要とするので、今回は、分子科学計算のために量子力学的取扱いを避け古典力学を適用することで近似解を得られるように開発された、分子力学法 (力場計算) を適用した。しかし、分子力学法をもってしても HSA は巨大すぎて多大な計算時間を必要としたため、分子構造にはいくつかの制限を加えた。また、同時に、HSA の巨大さにより Gd-DTPA-sugar 誘導体との安定複合体を形成する箇所が分子表面にきわめて多数の分子認識部位として存在し、多数の複合体構造の可能性が存在する。そのため、多数の安定複合体構造を作り出して、結合定数 K_i に対する寄与を疑似的に統計処理することで平均的な K_i を算出し、対数 $\log K_i$ を比較することで Gd-DTPA-sugar 誘導体の最適分子構造を導き出した。

5-4-2 方法

分子力学計算に用いた Gd-DTPA-sugar 誘導体モデル構造は Fig. 5-09 に示す 1-6 の 6 種類の分子構造 (9 配位構造) である。1 は親構造分子 DTPA、2 はそのテトラキスグルコン酸アミド、3-5 はグルコン酸の水酸基を半分アセチルエステル化した構造でそのエステル部位の位置が異なる異性体である。6 は 2 の水酸基をすべてアセチル化した構造である。錯体構造 2-6 については 2 か所でアミド基がガドリニウムに配位している。このような場合、アミドの窒素原子が配位原子となるか、カルボニル基の酸素原子が配位原子となるかの二つの可能性があるが、あらかじめ、両方の可能性について力場計算を試みたところ窒素原子が配位した場合の方が数 kJ/mol 安定であったためアミド窒素からの配位構造を用いている。

分子力学計算では実測値から算出したパラメータ系 (力場) を用いるが、いくつかの力場が知られている。使用した計算パッケージ (Spartan'06 for Linux) では MMFF 力場 (Merk 社製)、および、その改良版で安定構造算出には影響しないが水溶媒中での歪みエネルギーを補正した MMFFaq 力場 (Merk 社製)、さらに生体分子への適合性が良いといわれている SYBYL (Tripos 社製) の三つが用意されている。1-6 について SYBYL 力場で構造最適化すると水の H-O-H 結合角が異常に小さくなるなど正常とは考えられない構造を与えたので、血液中での挙動を見

るために MMFFaq 力場を選択した。

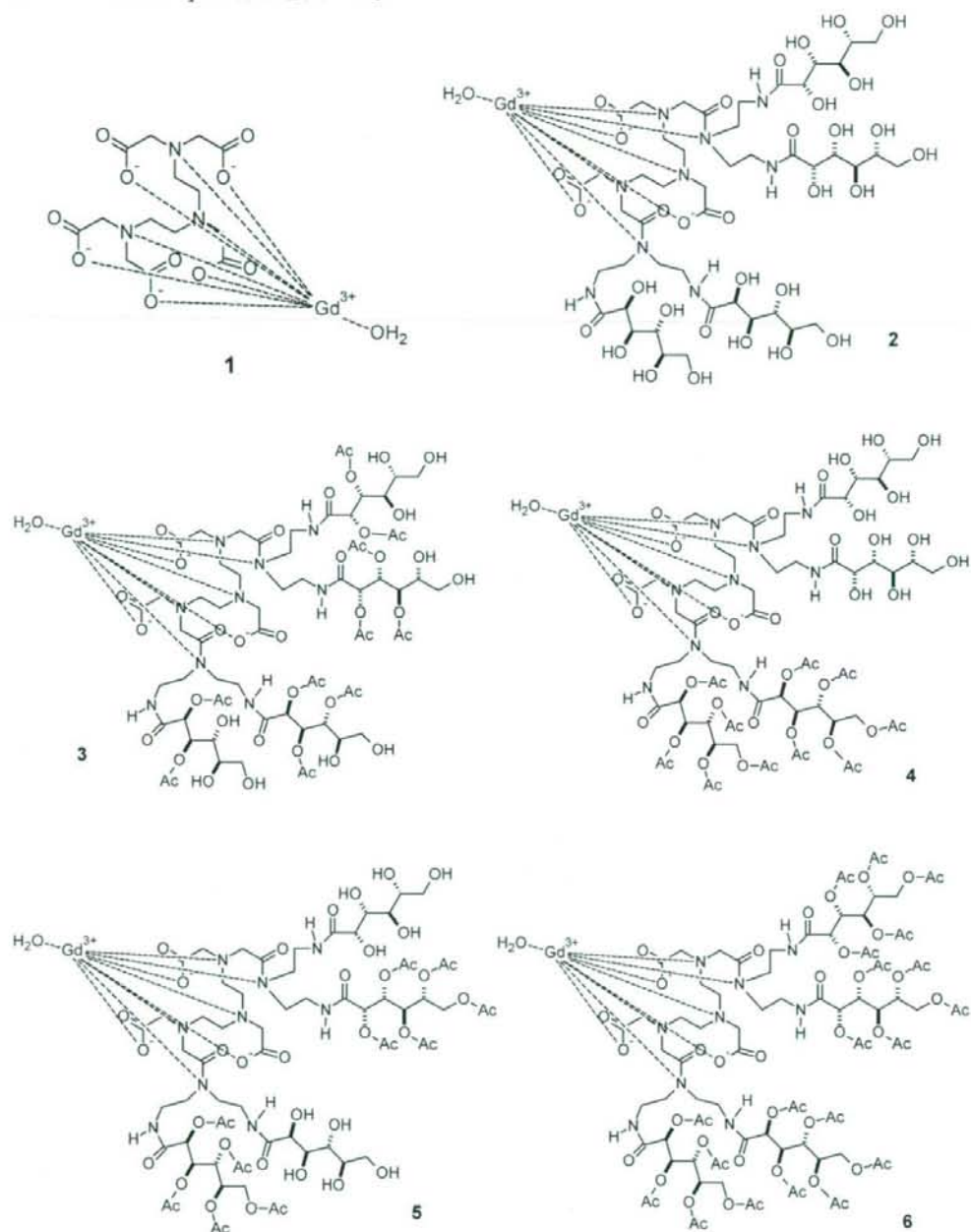


Fig. 5-09 Gd-DTPA (1)および高選択的MRI造影剤のためのGd-DTPA-sugar誘導體2~6。

まず、1-6についてMMFFaq力場を用いて慎重に構造最適化を行った。2-6については、糖部が環状に固定されていないため、可動性に富み、その立体配座には無数の配座異性体が存在する。Spartan'06 for Linuxには、可能な配座異性体を発生させ複数の立体配座の統計的解

析が可能なモジュールが含まれるが、取りうる自由度が設定を越えたために立体配座のシミュレーションができなかった。そのため、手動で主骨格の炭素-炭素結合を動かしながら最適構造を探索した。

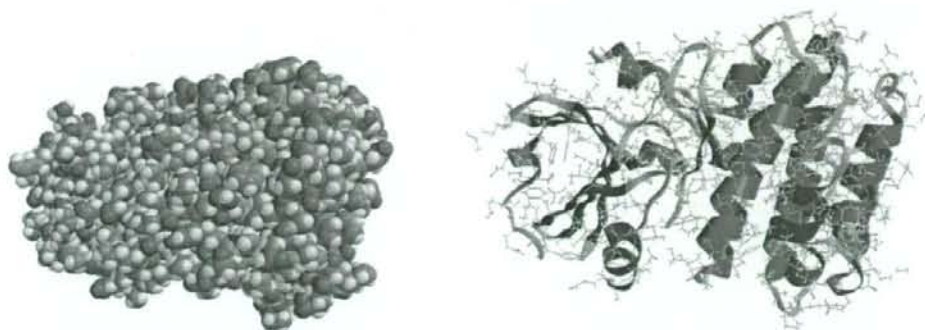


Fig. 5-10 PDB データ(1AO6)によるヒト血清アルブミン(HSA)のX線結晶構造
Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. *Protein Eng.* 1999 12 439-446.

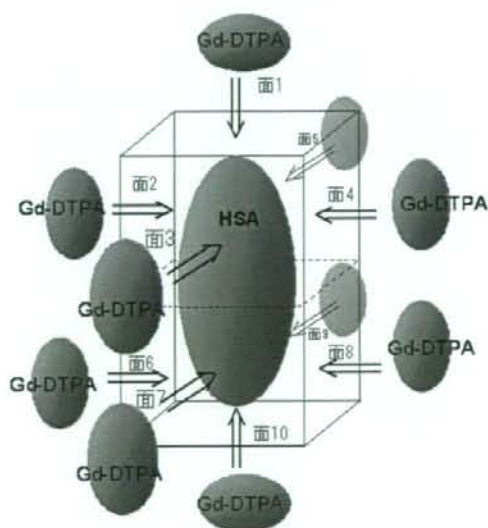


Fig. 5-11 HSA-Gd-DTPA-sugar 安定複合体初期構造発生のための分子アプローチ方向

HSA の構造データには、RCSB タンパク質構造データバンク(PDB)所収の X-結晶解析データ(1AO6)を用い、Spartan`06 for Linux に含まれる水素付加機能を利用して必要な水素を付加した後、不要な結晶水分子を除いた分子構造を用いた(Fig. 5-10)。Gd-DTPA-sugar 誘導体-HSA 複合体の構造最適化の際には、HSA 分子の無意味な構造変化の防止と計算時間の短縮化のためこの構造は固定して計算した。一般にタンパク質に含まれる酸性あるいは塩基性の側鎖は水溶液中で解離あるいはプロトン化しているため、すべての原子に水素を付加するのは好ま

しくないが、選択的に電離構造を設定することは困難であったため、酸性のカルボキシル基-COOH、塩基性のアミノ基は-NH₂、グアニジン基は-NH(=NH)NH₂の構造のまま計算した。従って、これらのアミノ酸残基が分子表面に露出している部分では水素結合が適正に評価されていない可能性がある。

HSA と Gd-DTPA-sugar 誘導体の複合体形成は次のような反応式で表わされる。



分子力学法で、まず、両分子間に十分に距離 (~30 nm) をおいた初期構造のエネルギーを算出し相互作用のない系 (左辺の状態) を E_0 とする。相互作用のある系 (右辺の状態) は HSA の構造を固定しておいても Gd-DTPA-sugar 分子が HSA に吸着する場所や方向には無数の可能性が生じる。正確に検討するには分子動力学法や Monte Carlo 法という分子シミュレーション解析を行う必要があるが、計算機資源や計算時間の問題から、出来るだけ短時間に統計的な安定性解析を行うため、次のような方法で安定構造を指向的に生成する「指向性疑似 Monte Carlo 法」ともいえる分子シミュレーション手法をとった。

- (1) Fig.5-11 のように HSA の分子表面を大まかに 10 枚の部分面に分け、それぞれ対象となる Gd-DTPA-sugar 分子をその方向から接近させた幾何構造を 10 種発生させ、各々構造最適化する。
- (2) (1) で得られる初期安定化構造をもとに、Gd-DTPA-sugar 誘導体の方向や位置を変化させた幾何構造をそれぞれ、さらに 10 種合計 100 種発生させ、すべて構造最適化する。
- (3) 以上の方法で発生させた、一つの Gd-DTPA-sugar 分子あたり合計 110 種の安定幾何構造のエネルギー $E_1 \sim E_i \sim E_{110}$ を平均する。ただし、エネルギーの低い幾何構造ほどその存在確率は Boltzman 分布に従って高まるので、平均する際に次式のように重みづけするとその平均値は E_0 状態と平均の複合体状態の存在確率比であり上の反応式の平衡定数(結合定数) K_i である。

$$K_i = \left[\sum_i \exp\{-(E_i - E_0)/RT\} \right] / 110 \quad \text{ただし、} R: \text{気体定数、} T: \text{絶対温度}$$

ここで、温度は体温の 310K として計算して複合体の平均結合定数が算出されるが、莫大な値になるので、ここではその対数を取り $\log K_i$ として比較した。計算環境の制限からこのような解析手法をとらざるを得ないが、初期幾何構造発生の際にできるだけ分子間の接触面積を大きく取るように分子を配置しているので、Monte Carlo 計算に似た手法をとりながら計算時間は大きく短縮できる方法であろうと考えられる。

5-4-3 結果と考察

Fig.5-12 に MMFFaq 力場で構造最適化した Gd-DTPA-sugar 誘導体 1-6 の分子模型図を示す。孤立分子系なので水酸基やカルボニル基は分子内水素結合を形成するような立体配座を取っ

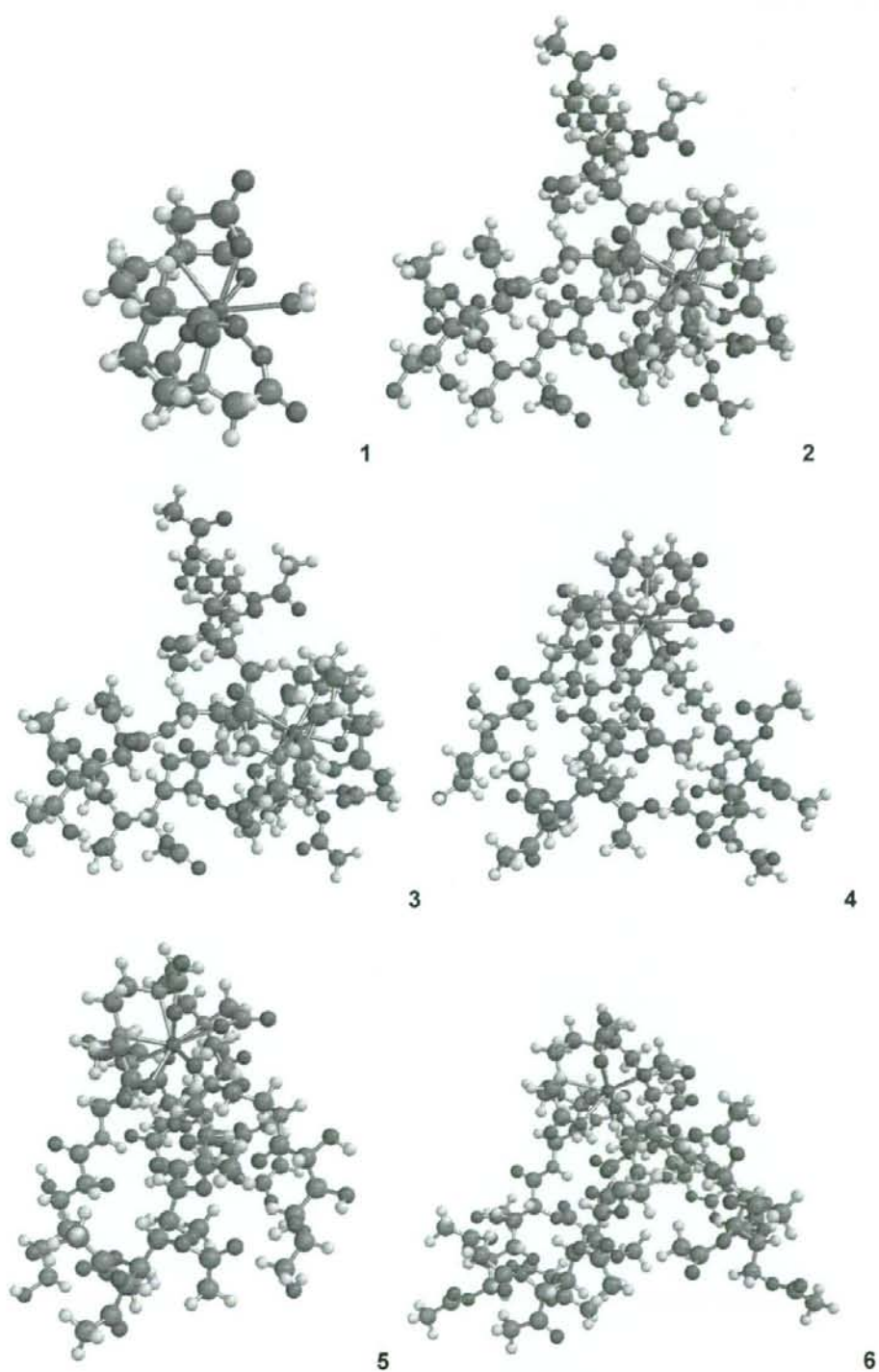


Fig. 5-12 MMFFaq 力場計算による Gd-DTPA-sugar 誘導体 1~6 の安定構造

ている。Gd-DTPA (1)は分子表面にジエチレントリアミン配位子の C-H 結合が突出しているため、かなり疎水的な表面を形成している。この Gd-DTPA の疎水的表面は糖を結合しても変わらず、Gd-DTPA-sugar 誘導体 2-6 は疎水的部分とグルコン酸アミド部分による親水的な部分の二極化した構造を持つ。Gd-DTPA (1)は HSA に比較して小さい分子なので Gd-DTPA-sugar 誘導体 2-6 と HSA の複合体では四つのグルコン酸部分との接触面積が大きい。

Gd-DTPA-sugar 錯体	$-\Delta E$ (kJ/mol)(平均値)	$\log K_i$
1	116.16	19.57
2	215.19	36.26
3	203.97	34.37
4	290.89	49.01
5	204.86	34.52
6	261.32	44.03

Table 5-03 MMFFaq 力場計算による、Gd-DTPA-sugar 誘導体(1~6)-HSA 複合体形成によるエネルギー低下と結合定数 $\log K_i$ 。

Table 5-03 に Gd-DTPA-sugar 誘導体 1-6 の MMFFaq 力場により算出された複合体エネルギーを、Boltzman 分布を考慮して平均した相対エネルギー値と結合定数 $\log K_i$ をまとめた。また、Fig. 5-13 には、計算された Gd-DTPA-sugar 誘導体 1-6-HSA 複合体のうち最も安定な幾何構造の分子模型図（空間充填模型）を示す。

Table 5-3 の $\log K_i$ の値はいずれも莫大な数値となり一見極めて安定な複合体形成を示しているが、これは、相互作用のモデル上の問題である。実際には、解離した状態でも複合体の状態でも、すべての溶質分子は水溶液中で水分子と溶媒和している。MMFFaq 力場は水中での補正を含んでいるが、積極的に水分子を計算系に含まない限りその影響は考慮されない。すなわち、水分子による溶媒和（水素結合）を無視しているため、エネルギー計算されていない水分子との水素結合で安定化している表面を、Gd-DTPA-sugar 誘導体 1-6 で置換することで相互作用安定化によるエネルギー低下が生じ、この新たな相互作用エネルギーの大きさを比較している。バルク媒質としての多数の水分子の計算分子系への添加は、多大な計算資源を要するので現実的ではない。分子によって表面積があまり変わらなければ、水素結合する水分子の個数に大きな変化はなく水分子の影響はすべての誘導体間であまり変わらないと考えられる。従って、実際にはこのような莫大な結合定数はあり得ないが、算出された $\log K_i$ 値は分子間相互作用の強さの傾向をある程度再現しているものと考えられる。また、今回は計算時間の制限から構造最適化したサンプル幾何構造は各モデル錯体分子について 110 種であったが、より正確な統計的データを取るためには最低でも 1000 種以上のサンプルを計算するのが望ましい。

Table 5-3 からは、Gd-DTPA-sugar 誘導体の HSA への親和性は水酸基をアセチル化したグルコン酸鎖とアセチル化していないグルコン酸鎖が分かれている半アセチル化誘導体 4 が最も高く、全アセチル化体 6、非アセチル化体 4 が続いている。糖部を持たない Gd-DTPA(1)は分

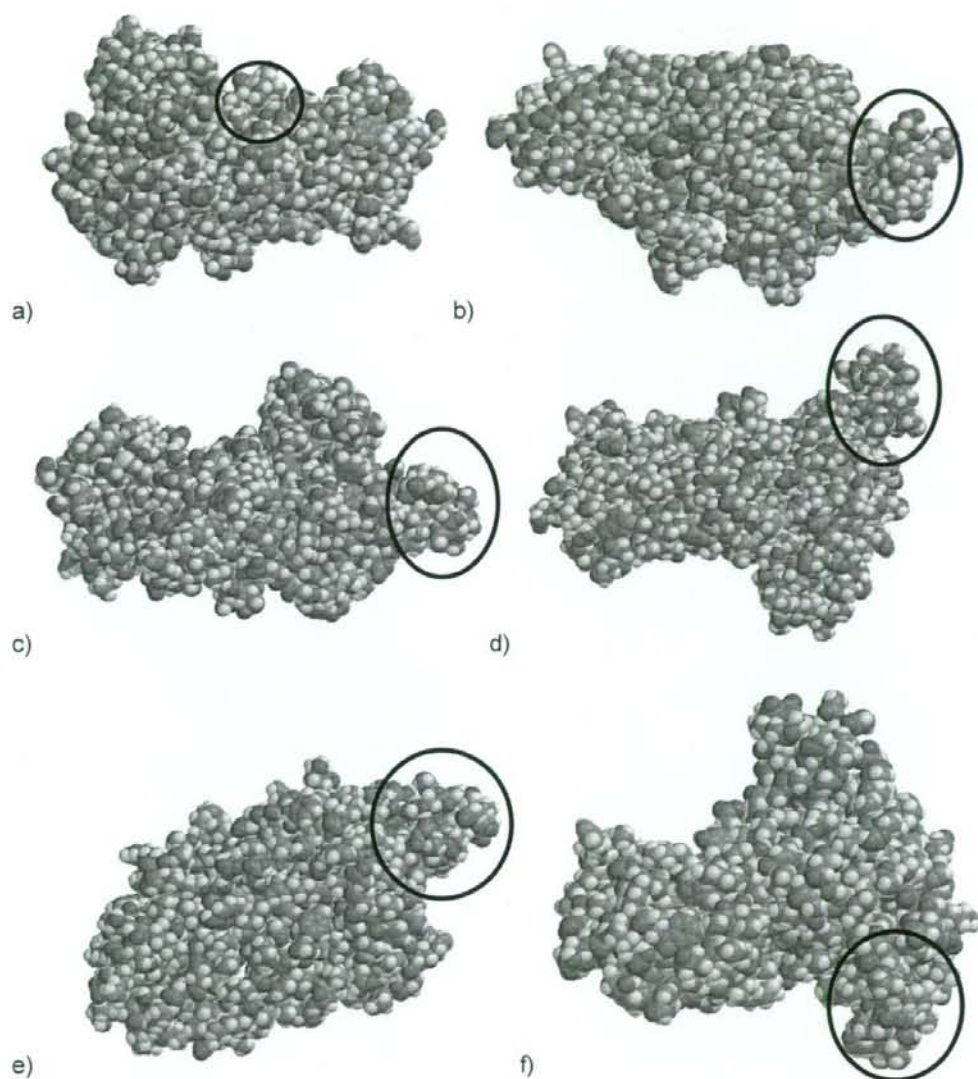


Fig. 5-12 MMFFaq 力場計算による Gd-DTPA-sugar 誘導体 1~6/HSA 複合体の最安定構造
 ○印は HSA 分子表面に相互作用接着している Gd-DTPA-sugar 誘導体分子
 a) 1/HSA, b) 2/HAS, c) 3/HSA, d) 4/HSA, e) 5/HSA, f) 6/HSA

子が比較的小さいので HSA と相互作用できる面積が小さいため、分子のどの面を HSA 分子表面に向けてもその相互作用は小さかった。HSA 分子と Gd-DTPA-sugar 誘導体分子との分子間相互作用は分子間水素結合と非極性残基間の分散力による疎水効果による。本来は荷電化学種である Gd-DTPA 錯体と HSA 表面に存在するイオン化した酸性・塩基性アミノ酸残基による強い静電的相互作用も考慮されなければならないが、前述の構造制限からこの相互作用

は無視している。水素結合は結合エネルギーが 10~30 kJ/mol の比較的強い分子間相互作用で複合体のエネルギー低下の最も大きな要因である。構造的な条件が合って水素結合が 10 か所程度存在すれば非常に安定な複合体が形成される可能性がある。実際には、Fig. 5-13 に示す各複合体の最安定構造では HSA 分子の比較的突出した表面部分で相互作用した構造が目立つ。これは、当然ながら HSA 分子の窪んだ表面部分で結合する方が、接触面積が大きく安定化は大きくなると期待されるが、それだけ構造的には不適合となる可能性が高いため、今回実施した計算サンプル数の規模では見つからなかった可能性がある。

三種類の半アセチル化 Gd-DTPA-sugar 誘導体 3-5 間でもその適合性は大きく異なった。半アセチル化体では、その水酸基は HSA のカルボニル基等の極性結合、逆に HSA のプロトン性アミノ酸残基とカルボニル基との水素結合、さらにアセチル基のメチル基や Gd-DTPA 錯体頭部と HSA の疎水的アミノ酸残基との疎水性相互作用が複合体エネルギーの低下に寄与している。2 や 5 のように同じグルコン酸鎖内あるいは近傍にあるグルコン酸鎖に親水的な遊離水酸基と疎水的なアセトキシ基が位置すると上記の分子間相互作用が幾何学的条件により制限され効果的な相互作用が困難であるが、最も HSA と親和性が高かった 4 のように比較的離れた位置関係にあり構造的な自由度が高いと相互作用構造を取りやすくなる。実際に、最も親和性が高かった Fig. 5-13d の構造では疎水性のアセチル鎖や Gd-DTPA 錯体頭部は HSA 表面の比較的疎水的なわずかに窪んだ表面に位置し、複数の遊離水酸基がグルタミン酸残基との水素結合を示している。

以上の考察から、HSA と親和性の高い Gd-DTPA-sugar 誘導体の分子設計では、糖部の部分構造としては親水性・疎水性の官能基を可動性のある構造にバランスよく配置することが重要であると結論することができる。

5-5 まとめ

計算化学的手法を用いて、高活性高選択性 MRI 造影剤の造影機構および最適分子構造の探索を行った。半経験的分子軌道法を用いた計算では、水分子が 9 配位ガドリニウム(III)錯体に攻撃して 10 配位構造を形成した後、再び脱水和することで配位水分子が速やかに交換される機構を明らかにした。この反応機構では、算出されたエネルギー障壁がやや高すぎる傾向が問題であったが、これは半経験的分子軌道法に特有の問題で、マンガン(II)錯体の水分子の水和/脱水和過程の汎密度関数法による解析では、5 配位構造と 6 配位構造の間をほとんどエネルギー障壁なく相互変換可能であることを示した。このような速い配位水分子の配位子交換の間に、常磁性金属イオンとの緩和機構により、磁氣的に飽和した水素核の速やかな緩和が実現される。

Gd-DTPA-sugar デンドリマー分子の血管内キャリアーとして血清アルブミンを標的とするとき、複数のグルコン酸アミド鎖に水酸基を残したものとアセチル化したものを複合的に備えていると、計算環境の制限から十分な数の計算サンプルが確保できなかったが、分子力学法による解析では、水素結合や疎水性相互作用を組み合わせることにより安定な複合体の形成が可能であることが示された。

参考文献

- 1) 初心者のための分子モデリング A. Hinchliffe 江崎俊之訳 (地人書館 2008)
- 2) 分子軌道法計算プログラム Gaussian 03 -その 1-5-
和佐田(筒井) 祐子 和佐田裕昭
名古屋大学情報連携基盤センターニュース Vol.5, No.2 ~ Vol.6, No.2 (2006, 2007)
- 3) 分子軌道法 MOPAC ガイドブック 平野恒夫、田辺和俊編 (海文堂 1991)
- 4) 無機化学—その現代的理解のために— C. F. Bell, K. A. K. Lott 奥野久輝ほか訳 (東京化学同人 3rd Ed. 1976)
- 5) 有機化学のための分子間力入門 西尾元宏 (講談社サイエンティフィク 2000)
- 6) ^1H および ^{13}C NMR 概説 R. J. Abraham, P. Loftus 竹内敬人 (化学同人 1978)
- 7) Spartan'06 for Windows and Linux Tutorial and User's Guide (Wavefunction, Inc. 2006)
- 8) Biochemistry, R. H. Garrett, C. M. Grisham (Saunders College Publishing 1995)

6. 生体分子の認識

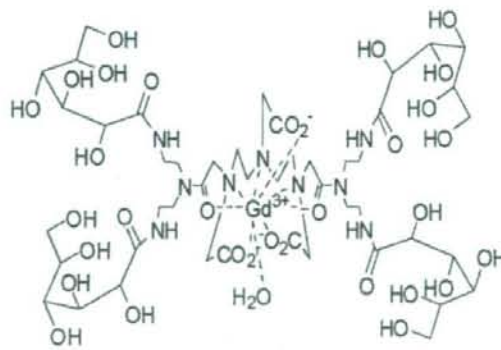
6. 生体分子の認識

6-1 新規非対称型及びロングブランチ型造影剤における生体分子認識

6-1-1 造影剤との生体分子認識

我々はこれまで MRI 造影剤として糖鎖を付加した、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)系列に基づいた、造影効果が高い新規の造影剤を開発して来た。それは肝臓がん組織や生体内の大小血管を特異的に造影できるものである。我々が開発した新規の造影剤がどのような理由から、高い造影効果があるのかは不明なことが多い。そこには血液成分やがん細胞とのインタラクションが考えられるが、未だにはっきりしない事も多々ある。今回新たに合成した造影剤を用いて、生体分子の認識について検討を行なったので報告する。

これまでジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 骨格にガドリニウムを配位し、その骨格に4分子のグルコースがアミド結合した構造をし、グルコース以外にもガラクトースやマンノースなどいくつかの糖を結合したものを我々が開発し作製した。組織や血管に高い造影効果があった。その中でも、4分子のグルコース型 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)が血管貯留性やコントラスト面において優れている (Fig. 6-1-01)。また、分子イメージング及び分子モデリングである (Fig. 6-1-02)。



Chemical Formula: $C_{45}H_{82}GdN_9O_{32}^-$

Exact Mas: 1430.43

Molecular Weight: 1430.43

m/z: 1430.43 (100.0%), 1428.43 (82.4%), 1429.43 (80.3%), 1432.43 (68.4%), 1427.43 (45.4%), 1431.43 (42.5%),
1433.44 (37.0%), 1434.44 (13.5%), 1432.44 (12.7%), 1430.44 (10.5%), 1431.44 (10.3%), 1426.43 (6.3%),
1429.44 (5.9%), 1435.44 (3.8%), 1433.43 (2.5%), 1434.43 (1.1%)

Elemental Analysis: C, 38.62; H, 5.78; Gd, 10.99; N, 8.81; O, 35.79

Fig. 6-1-01 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の分子構造

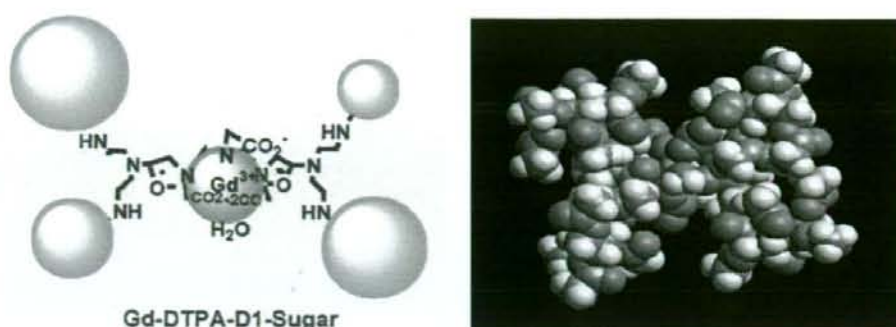


Fig. 6-1-02 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子イメージング及び分子モデリング

6-1-2 非対称型造影剤における血液成分との分子認識

非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) と Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH)

今回、我々は新たに MRI 造影剤を合成した。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を軸にコア部分はそのままだけに糖鎖を付加した構造である。これを非対称型造影剤と命名した。糖が 2 個の付加したタイプである Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) (Fig. 6-1-03) と糖が 1 個の付加したタイプ Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) (Fig. 6-1-04) を合成した。そしてその造影効果を評価した。いくつかの糖を結合した Gd-DTPA-D1-Sugar(OH) も作製した。

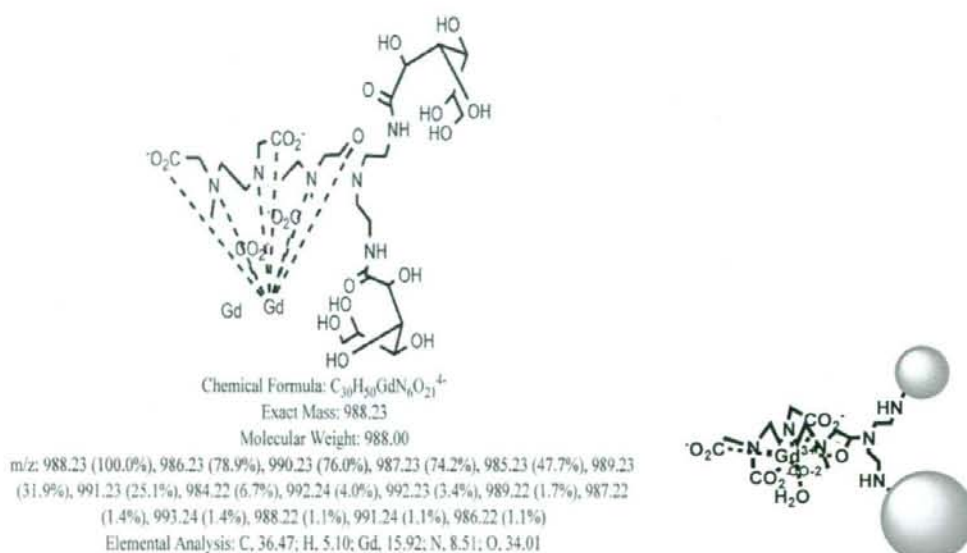


Fig. 6-1-03 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 構造式と分子イメージング