

分子表面積計算プログラムの開発と疎水性相互作用への応用

石川 誠 司

京都薬科大学, 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

Software Development for Calculation of Molecular Surface Area and Its Application to Hydrophobic Interaction

Seiji ISHIKAWA

Kyoto Pharmaceutical University, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received October 2, 2000)

A novel method of calculating the water-accessible molecular surface area from the number of points generated on the molecular surface was developed. This method yielded a molecular surface area with high accuracy and speed. The molecular surface area of lecithin shows an excellent linear correlation with the logarithm of the critical micelle concentration for many lecithins having different acyl chains. The solution structure of oxyphenonium bromide estimated from the molecular surface area approach was close to that obtained from NMR. Furthermore, the change of molecular surface area, $\Delta S(\text{HG})$, with docking of host and guest was defined and its calculation method was developed. Because both the host and the guest generally consist of hydrophilic and hydrophobic atomic groups, $\Delta S(\text{HG})$ was divided into such four terms as $\Delta S_{\text{Soo}}(\text{HG})$, $\Delta S_{\text{Sow}}(\text{HG})$, $\Delta S_{\text{Swo}}(\text{HG})$, and $\Delta S_{\text{Sww}}(\text{HG})$. For instance, $\Delta S_{\text{Soo}}(\text{HG})$ is the decrease in surface area with contact between the hydrophobic surfaces of the host and the guest. When the guest molecule was moved along the symmetry axis of cyclodextrin (CyD), the structure of a complex having the maximum value of $\Delta S_{\text{Soo}}(\text{HG})$ corresponds with the crystal structure. The solution structures of several inclusion systems were predicted by this method. For various systems including α -CyD, β -CyD, γ -CyD, and aromatic and aliphatic guests, the maximum values of $\Delta S_{\text{Soo}}(\text{HG})$ showed a good correlation with the logarithms of the binding constants. This relationship will be used for the prediction of the binding constants for CyD and other host-guest systems.

Key words—molecular surface area; hydrophobic interaction

1. はじめに

Hermann は、溶質分子のファンデルワールス表面上を球状近似した水分子が辿っていくときに中心が描く曲面を水接触分子表面と定義している。¹⁾水の半径は低分子では 0.15 nm が、¹⁻⁴⁾タンパク分子などでは 0.14 nm が⁵⁻⁹⁾主に用いられ、CPK 分子模型の水素原子半径 0.10 nm を用いた報告もある。^{3,10)}分子表面積は様々な用途に用いられてきた。例えば、疎水性相互作用の実質的な機構は未だに不明なもの、疎水性の強度や溶質分子の水和による自由エネルギーの変化は経験的に水接触表面積と関連することが知られている。^{1,6,8,11,12)}プロテインの折り畳みによる構造変化^{5-7,13)}や熱力学解析,^{7,8)}基質や阻害剤などの結合^{6,7,9,14-16)}などが分子表面積と電荷によって説明付けられる。また、有機低分子の水溶性,^{1,2,17)}油水分配平衡,^{3,4,10,17,18)}及び臨界ミセル濃度¹⁹⁻²²⁾などの水和の熱力学が関与している物性は溶質分子の水接触表面積と密接に対応している。Langmuir 以来,²³⁾吸着^{24,25)}やミセル形成¹⁹⁻²¹⁾など

のコロイドと界面化学の分野でも分子表面積が用いられ、薬物の様々な生物活性と関連することが知られている。²⁶⁾逆相高速液体クロマトグラフィーでは疎水性物質の保持時間がその分子表面積の増加とともに延びることから立体異性体の分離度を的確に予測することが可能である。^{27,28)}また、ファンデルワールス表面積は結晶のパッキングエネルギーとも関係がある。²⁹⁾

分子表面積は 3 つの方法を用いて求めることができる。1 つ目は分子を球又は球状のものとして分子体積の実測値から求める方法で、^{20,23)}分子会合の研究に用いられてきた。^{20,21)}2 つ目は CPK で組んだ分子表面に実際に貼り付けられる球を数える方法。^{2-4,10)}そして 3 つ目はコンピュータを用いて解析的、^{1,17,30-33)}又は積算的^{24,29,34,35)}に求める方法である。後者 2 つの方法によって得られた分子表面積の間には直線的な相関関係がある。²⁻⁴⁾Hermann は球の集合体である分子の表面積を、2 つの球の重なりによる排除面積は解析的に、3 つ以上の重なり部分

は近似的な手段を用いて求め、^{1,30)} 誤差 0.001 nm^2 以内としている。しかし、この方法はパーソナルコンピュータで計算すると長時間を要した。Pearlman は Hermann のアルゴリズムの高速化を計った。¹⁷⁾ 他に、球の重なりによる排除面積を解析的に計算する手段を Perrot ら³³⁾ や Connolly³¹⁾ が発表している。解析的手法と積算法の組み合わせを用いる方法としては、分子を微細な等間隔 (0.001 nm) にスライスし、切り出された断片を円筒形の集合体として近似し、その側面積を合計して全表面積とする長尾の方法や、³⁵⁾ 重なりによって排除される部分の面積の球面上にドットを発生させて調べる Smith の方法³²⁾ などがある。積算的な計算法としては、Meyer が分子を完全に含む空間を細かい立方単位に分割し、分子表面上にある立方の数から表面積を、分子表面の内側にある立方の数から体積を同時に求めることができるようにしたが、面を表すのに立方を用いているため表面積の精度は良くない。^{24,25)} Gavezzotti²⁹⁾ らや Merz³⁴⁾ はそれぞれに、球面上の等緯度等経度間隔あるいは任意の位置の多くの点で球面を表し、他の球によって排除されない点の割合を球の面積にかけて球の有効な表面積とする、いわば統計的な手法をとっている。

以上まとめると、解析的手段は分子表面をそれぞれが解析的に計算できる断片に分割して表面積を求めようとする方法であり、分子表面すべての領域が計算可能な断片に分割できれば正確な値が求められるが、不可能な断片がある場合、何らかの近似を用いて計算を行わなければならない。一方、積算法の場合は分子表面を数多くの均一微細な断片に分割し、それらを集計して全表面積としているため分子表面の形状によらず一定方法で計算可能であるが、分割断片が十分に小さくしなければ断片の不均一性が増し、全体の精度が損なわれる。断片を小さくするほど多くの計算時間を要するので速度と精度の両立が困難な方法である。このようにどの方法も多かれ少なかれ長所と短所があり、長尾のもの以外はもともと大型計算機用に書かれたプログラムである。

我々はパーソナルコンピュータ上で高速に走るコンパクトなプログラムを開発するために記述言語は DOS 版ではアセンブラを用いた。そのため、分子の形状による複雑な場合分けや浮動小数演算が必要な解析的手段は使わないことが望ましい。そこで、基本的には積算法を用いながら精度に影響する部分を半解析的に取り扱う手段を考案した。結果として我々は比較的大きな分子の表面積計算をパーソナルコンピュータ上でかなりの精度と速度で行うことを可能とした。更に、この表面積計算法を複合体形成による分子表面の減少を計算できるように拡張した。それにより、直接的には溶媒-溶質間の相互作用のみを扱っていた分子表面積の応用範囲を溶質分子間へと拡張することができた。

界面活性物質の臨界ミセル濃度 (cmc) はその物質の疎水性の尺度で、多くの物質の値が文献から入手可能である。³⁶⁻⁴³⁾ 血小板活性化因子 (PAF) 及びその誘導体も水中でミセルを形成しその活性が疎水性に依存する。³⁹⁾ 薬物その他の物質ではオクタノール-水分配係数もその物質の疎水性を示す指標として広く使用され、^{3,4,10,26,44)} その値は薬物分子を構成する個々の原子団の分配係数の合計から得られるとされているが、この算出法は分子の立体構造が分配係数に及ぼす影響を無視している。⁴⁴⁾ 舟崎らは CPK 分子モデルにより求めた分子表面積を用いて脂肪族エーテルの分配係数を説明し、分子の立体構造が疎水効果に大きく影響することを示した。⁴⁾ このことについて、今回開発した分子表面積計算法を用い、レシチンのミセル形成の定量的説明を試みた。

また、薬物の水中におけるコンフォメーションの決定についても分子表面積を適用できる可能性がある。抗アセチルコリン薬である Oxyphenonium-bromide (OB) はレセプターに対しアセチルコリンと競合的に結合することによって効力を発揮すると考えられるが、結合前の水中におけるコンフォメーションはレセプターへの親和性に少なからず影響を与えることが考えられる。OB は親水基と疎水基を有しており、それぞれの基の水和水との相互作用がそのコンフォメーションに関与していることが予想される。そこで、OB のコンフォメーション変化に対する水親和性別露出表面積を算出し、水和効果が最大となるコンフォメーションと NMR により測定された構造を比較した。

次に、複合体形成時の水接触可能表面積の変化から CyD 複合体の安定構造と結合定数を説明することを試みた。シクロデキストリン (CyD) はサイズの異なる円筒状の構造を持つ。最も良く知られているのは α -CyD、 β -CyD 及び γ -CyD の 3 つで、それぞれ 6 個、7 個、8 個のグルコースユニットから成る。円筒台形の狭い端の 6 位炭素には 1 級の、広い端の 2, 3 位炭素には 2 級の水酸基が付き、親水的な表面を持ち水に可溶である。その一方、グルコシド酸素やメチレン水素からなる内孔部は無極性である。これらの結果、CyD は空洞に見合った無極性分子を包接することが可能で、溶解度の向上、不安定ゲストの安定化、揮発、昇華の制御、異分子の物理的分離などの有益な変化をゲスト分子に与えることができ、事実上無毒であるために薬剤や食品に添加されている。^{45,46)} いくつかの総説や書籍に CyD 包接複合体の結晶構造や溶液構造と結合定数がまとめられている。⁴⁵⁻⁴⁹⁾ Connors は α -CyD と様々なゲストの複合体について、分子表面積変化と結合定数の相関について研究した。^{49,50)} Mayer らは β -CyD とフェノールのメチル置換体との複合体の水接触表面積のデータを用いて、その立体構造を理論的に解析した。¹¹⁾ 駆動力として挙げられているのは、CyD 環に

よる拘束やファンデルワールス力、疎水性相互作用、そして分子間の水素結合などである。多くの報告がこの問題について触れているが、このような複合体形成の駆動力についてはまだ完全には解明されていないのが現状である。⁴⁵⁻⁴⁹ 分子動力学計算によって複合体構造を求めた報告もある。通常包接複合体において、ゲスト分子は疎水的な部分が CyD の疎水的な空洞と最大限接触するように配向している。ゲスト分子は親水性部分をできるだけ複合体の外表面部分に留めることにより溶媒水やホストの水酸基と最大限の接触を保つことができる。⁴⁶ このことを定量的に検証するためにはホスト-ゲスト間の分子接触表面積を求める必要があるが、現在知る限りにおいてこのような重なり部分の表面積を算出する方法はない。¹¹ この方法は他のホスト-ゲストの系にも適用できるはずである。

2. 分子表面積計算法とその応用

2-1. 新しい分子表面積計算方法の開発 まず積算法によってどのように球の表面積が計算できるかを示す。Fig. 1 のように極座標上において中心を原点に持つ半径 r の半球を考える。この半球表面を緯度方向の幅が Δl になるように xy 平面に平行な面で分割し、 xy 平面から i 番目のリングの面積を ΔS_i とする。更にこのリング中心線上の経度方向の幅が Δl になるように z 軸を含む平面で N_i 個の面積素片に分割する。このように分割された i 番目リング上 j 番目の面積素片の中心を表す点を P_{ij} とする。この P が表す曲面領域は平面台形として近似すれば、それぞれ $(\Delta l)^2$ の面積を持つことになる。それゆえ球の総面積は面積素片の総数をかけて

$$S = 2 \sum_{i=1}^n N_i (\Delta l)^2 \quad (1)$$

で表すことができる。ここで、リングの数 n は

$$n = \pi r / 2 \Delta l \quad (2)$$

で求められ、各リングの面積素片数 N_i は

$$N_i = 2\pi r \sin \theta_i / \Delta l \quad (3)$$

から求めることができ、更に

$$\theta_i = \pi/2 - (i-1/2)\Delta\theta \quad (i=1, 2, \dots, n) \quad (4)$$

である。ここで n 及び N_i は式(2), (3)より必ずしも整数値になるとは限らないので、端数にあたる分割部分に対しては補正を加えた。

また、点 P_{ij} の直交座標は

$$(x, y, z) = (r \sin \theta_i \cos \varphi_j, r \sin \theta_i \sin \varphi_j, r \cos \theta_i) \quad (5)$$

で表され、ここで

$$\varphi_j = j\Delta\varphi_i \quad (j=1, 2, \dots, N_i) \quad (6)$$

である。

しかしながら式(1)は近似であるため、 $n=1$ (Δl 最大) での値は $2^{1/2}\pi^2 r^2$ となり真の値 $4\pi r^2$ よりもかなり大きな値をとる。逆に $n \rightarrow \infty$ ($\Delta l \rightarrow 0$) のとき式(1)は

$$\begin{aligned} S &= \lim_{\Delta l \rightarrow 0} 2 \sum_{i=1}^n \Delta S_i = \lim_{\Delta l \rightarrow 0} 2 \sum_{i=1}^n 2\pi r \sin \theta_i \Delta l \\ &= \lim_{\Delta\theta \rightarrow 0} 2 \sum_{i=1}^n 2\pi r^2 \sin \theta_i \Delta\theta \\ &= 4\pi r^2 \int_0^{\pi/2} \sin \theta d\theta = 4\pi r^2 \quad (7) \end{aligned}$$

と真の値に収束するが、その分積算回数が膨大になり、計算時間の浪費を招くこととなるので、適切な値を吟味する必要がある。

次に、 r_1, r_2 をそれぞれ半径に持つ 2 原子から成る分子を考える。これらは各原子核間の距離が半径の和より小さい、つまり交わっている状態にある。Fig. 2a はその様子を 2 原子核 O_1, O_2 を通る平面で切った断面で示しており、 P は球面 O_1 を Fig. 1 で示したとおりに分割した任意の面積素片の中心点である。2つの球が交わるとき、それぞれの球面は分

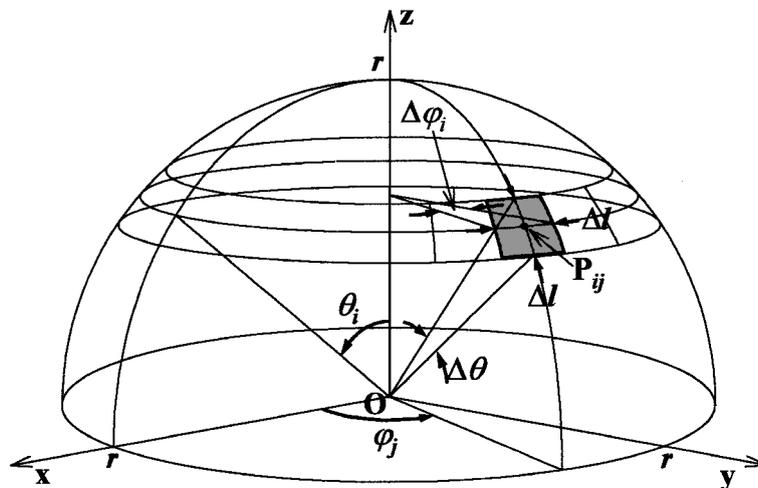


Fig. 1. Area Element ij Centered at Point P_{ij} on Ring i Defined in Spherical Polar Coordinates

The increment of ring i in θ direction is $\Delta\theta$ and the increment of the area element in φ direction is $\Delta\varphi_i$, so that the width ($r \sin \theta_i \Delta\varphi_i$) and the height ($r\Delta\theta$) of each area element are both Δl .

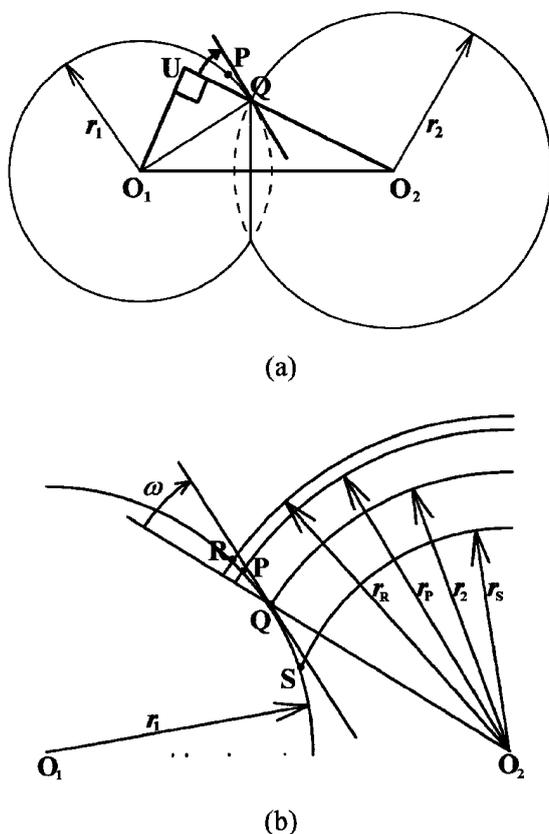


Fig. 2. (a) A Cross-Section of a Diatomic Molecule Cut by a Plane Passing through the Points O_1 , O_2 , and P and (b) an Expansion of Its Boundary Region

The points P , Q , R , and S are on the circle 1. The angle between the line O_2Q and the tangent to the circle 1 at the point Q is denoted by ω and the lengths of the arcs QR and QS are both $\Delta l/2$.

子表面に露出し表面積に寄与する部分(実線)と分子内に隠蔽されて表面積としては寄与しない部分(破線)の2つに分けられる。これら2領域の境界は球面上の座標点(点としての P)にとっては単なる2つの球の交点 Q であるが、幅 Δl の大きさを持つ領域(面積素片としての P)にとってはひとまたぎに越えられない。そこで我々はこの境界に Δl の幅を持たせた。

Fig. 2bは交点 Q の他に $RQ = QS = \Delta l/2$ となる O_2 を中心とする半径 r_R と r_S の球面とそれぞれに対応する交点 R と S を加えたものである。これら R と S が Q を挟むようにできた球 O_1 上の帯領域内に幅 Δl の面積素片 P が入ってきたとき面積素片は境界線 Q によって分断される。この面積素片 P ($R > P > S$)の帯領域 RS 内での位置から面積素片 P 中の露出面の割合を P の形状や向きを無視して定義すると

$$PS/RS = PS/\Delta l \quad (8)$$

となる。ここで PS は空間内の円周と点の球面上で

の距離という大変厄介な量なので、 RS が非常に狭い範囲であるという前提で、 R , S の位置を角度 ω で O_2 からの距離として表すと

$$r_R = r_2 + \Delta l \cos \omega / 2 \quad (9)$$

$$r_S = r_2 - \Delta l \cos \omega / 2 \quad (10)$$

これらと P の位置 r_P を用いて式(8)は

$$RS/PS \approx (r_P - r_S)/(r_R - r_S) \quad (11)$$

と書き直すことができる。また、 ω の余弦はFig. 2aにおいて三角形 O_1UO_2 から

$$(r_1 \cos \omega)^2 + (r_2 + r_1 \sin \omega)^2 = d^2 \quad (12)$$

$$\sin \omega = \{d^2 - (r_1^2 + r_2^2)\} / 2r_1 r_2 \quad (13)$$

$$\cos \omega = \{(2r_1 r_2)^2 - [d^2 - (r_1^2 + r_2^2)]\}^{1/2} / 2r_1 r_2 \quad (14)$$

のように求めることができるので、式(9)、式(10)はそれぞれ

$$r_R = r_2 + \Delta l \{(2r_1 r_2)^2 - [d^2 - (r_1^2 + r_2^2)]\}^{1/2} / 4r_1 r_2 \quad (15)$$

$$r_S = r_2 - \Delta l \{(2r_1 r_2)^2 - [d^2 - (r_1^2 + r_2^2)]\}^{1/2} / 4r_1 r_2 \quad (16)$$

となる。これらの値に対して P の O_2 からの距離 r_P が $r_P \leq r_S$ のとき面積素片 P は全く表面積には寄与しないし、 $r_P \geq r_R$ のとき面積素片 P の全面積が寄与する。一方、 $r_S \leq r_P \leq r_R$ のときは部分的に寄与するとし、その割合は(11)式で与える。同様の処理を O_2 球面に対しても実行してこの2原子分子の表面積を得る。また、 ω の余弦の算出過程で出てくる ω の正弦式(13)は2原子の位置関係の判定にも用いることができる。式(13)の $\sin \omega$ が1より大きい場合2原子は全く接触していないし、 $\sin \omega$ が-1より大きい場合は小さい方の原子が大きい方の原子に完全に含まれる。更にこの方法を3原子以上の多原子分子に対しても拡張適用し、個々の原子が分子表面に露出する面積を求めてそれらを加算したものが分子表面積となる。このとき、親水性原子、疎水性原子の別に集計すれば、親水性分子表面積 S_w と疎水性分子表面積 S_o が決定できる。

今回開発した分子表面積計算法を検証するためにアルカンの表面積を求めて文献値¹⁾との比較を行った。我々の方法による表面積は Δl を小さくしていけば、計算値は真の値に近づく。1原子分子について計算したところ計算値は Δl の減少とともに上から真の値に近づいた。しかし多原子分子においてはこの真の値からのずれの符号は逆転する。Hermannの方法が真の値を与える n -octane(all-trans), 2,2-dimethylpropane, cyclohexane(chair)について Δl 変化に対し計算させたときのHermannの値との比をFig. 3aに示す。 $\Delta l < 0.01$ nmの領域において我々の値はHermannのものほとんど等しいが、 Δl の増加とともにわずかな振幅を伴って少しずつ減少している。この1原子分子と多原子分子間の傾向の違いは、球の交わりによる削除領域の過大評価に起因していると思われる。また、同様の傾向が他の直鎖状、分枝状、環状アルカンにも見られた。以上の結果から特に断らない限り本研究では $\Delta l = 0.01$ nmを採用することにした。更にこのような方

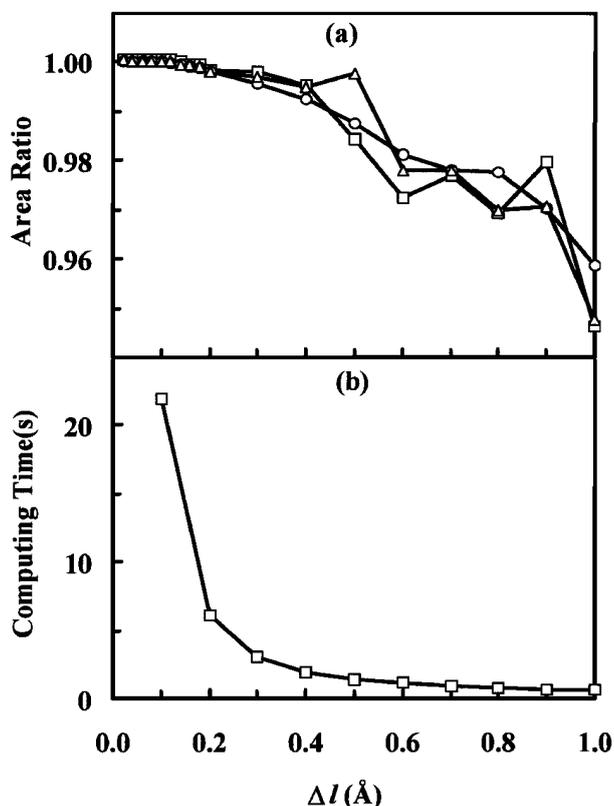


Fig. 3. (a) Ratio of Our Molecular Area to Hermann's (b) the Computing Time for Octane (□), 2,2-Dimethylpropane (○), and Cyclohexane (△) as a Function of the Dividing width Δl

法では分子表面の分割方向によっても計算結果に何らかの影響が出ることが考えられる。先のオクタンの表面積は分子の長軸に対して垂直に分割のz軸をとった場合の結果で、 $\Delta l = 0.01$ nmでのSの値は 3.8230 nm²である。これに対してz軸を長軸方向にとった場合の値は 3.8232 nm²である。

我々の計算プログラムは理論上分子構築後の表面積計算に要する時間は Δl の2乗に反比例するはずであるが、オクタンの計算に要した時間 (Fig. 3b)はこの予想をほぼ満足するものである。計算速度の比較のために同一のコンピュータ上で動作する他のプログラムによる計算も行った。Hermannのプログラム (Molarea) はFORTRANで書かれ、数値演算プロセッサを用いて計算を行うようにコンパイルされている。このプログラムでオクタんに 0.15 nmの溶媒半径を加えた表面積を計算した結果 140.7 sを要した。長尾のプログラムもFORTRANで書かれ数値演算プロセッサを用いるが、同様の計算をスライス幅 0.001 nmで行かせたところ 96 sを要し、算出値は 3.8265 nm²であった。これらに対し我々のプログラムは数値演算プロセッサを使用しないにもかかわらず $\Delta l = 0.01$ nmで 21.9 sで計算を終了した。直鎖状分子よりも分枝状分子の方が計算時間を要する傾向があるらしく、2,2,4-trimethylpentane

については 28.5 sを要した。以上のように我々の方法はパーソナルコンピュータ上で速く、精度良い分子表面積計算法を比較的大きな分子に対しても提供できる方法である。

Hermannによる手法によれば誤差 0.001 nm²以内であり、その計算値は我々のものと非常に近い値である (Fig. 3a)。¹⁾このことはこれらの方法がほぼ 0.1% 以内の精度で分子表面積を計算できていることを示唆するものである。この程度の精度を有している分子表面積であれば十分に化学及び生化学の様々な分野で応用可能であると考えられる。また我々の計算方法はHermannのものよりも速く計算可能であるが、これはアルゴリズムの単純さゆえにアセンブラでのプログラムの記述 (DOS版) が十分に可能であったところが大きい。更にほとんどの応用目的において 1% という誤差範囲が許されるなら、 Δl を 0.01 nm以上にとることにより、更なる速度向上が可能である。この分子表面積計算プログラムは独自に開発した分子モデリングソフトウェアの一機能であり、計算時の原子半径は $r_H(\text{aliphatic}) = 0.120$ nm, $r_H(\text{aromatic}) = 0.100$ nm, $r_O(\text{ether}) = 0.152$ nm, $r_O(\text{carbonyl}) = 0.150$ nm, $r_C(\text{aliphatic}) = 0.170$ nm, $r_C(\text{aromatic}) = 0.177$ nm, $r_N(\text{aliphatic}) = 0.155$ nm, 分子を構成する原子団はすべて親水性原子団、疎水性原子団のいずれかに分類定義される。カルボニル基、水酸基、エーテル酸素、アンモニウム窒素を親水性の原子団、アルキル基、フェニル基、ベンゼン環などを疎水性原子団として扱う。このソフトウェアは開発当初、NECのPC-9801シリーズでのみ使用可能なDOS用のものであった。後にWindowsの普及に伴いWindows 3.1で同様な機能が使用可能なWin16版が開発された。分子ドッキングによる表面積減少の計算法を組み込んだバージョンはWindows 95/98/NT/2000で使用可能なWin32版である。Windows版においてはVisual C++を用いて開発を行った。

2-2. レシチンのミセル形成への応用 レシチン (1,2-diacyl-glycero-3-phosphocholine) は Fig. 4に示す構造を持つ生体膜を構成する主要な脂質であり、1分子中に2本のアルキル鎖を有しており、水溶液中のモノマーではこれらが分子内会合していると言われている。²⁰⁾ Fig. 5に示したDMPC(dimyristoylphosphatidylcholine)の2つの構造は結晶中で2分子の水和水と共に非対称の単位格子を構成するものである。これら構造の重原子の配置はX線による構造解析から求められたもので、⁵¹⁾その骨格に水素原子を付加して分子構造を完成させた。更にこれらDMPCのアルキル鎖中のメチレン基の削除及び付加によりTable 1にある13個のレシチンの構造群を導いた。これらレシチンモノマーの水中での立体構造は結晶状態のそれと類似しているため、^{31,51-54)}このような構造構築法は妥当であると

える. このとき用いた構造パラメータは $d_{C-C} = 0.154$ nm, $d_{C-H} = 0.109$ nm, $\angle HCH = 109.5^\circ$, エーテル型の誘導体は基となる構造がなかったため用意できなかった.

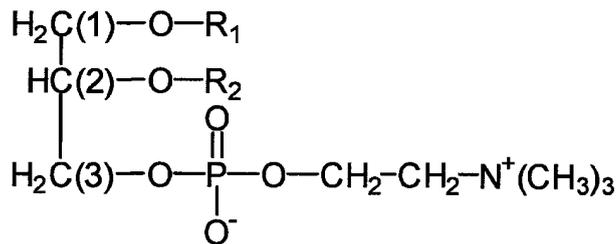


Fig. 4. Chemical Structure of Lecithin and PAF
Lecithin: $\text{R}_1 = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CO}$, $\text{R}_2 = \text{C}_m\text{H}_{2m+1}\text{CO}$, PAF: $\text{R}_1 = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{CO}$, $\text{R}_2 = \text{CH}_3\text{CO}$.

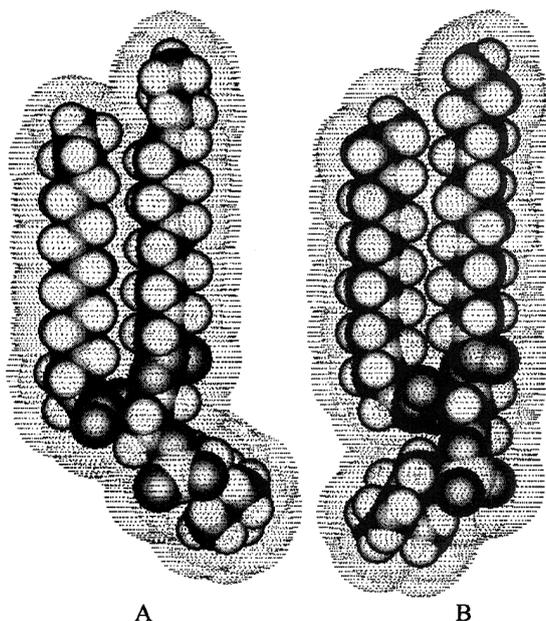


Fig. 5. Water Accessible Surface and van der Waals Surface for Two Conformations of Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)

レシチンはミセル及びリポソームを形成し, 血小板活性化因子 (PAF) として知られている 1-O-alkyl-2-acetyl-glycero-3-phosphocholine もミセルを形成する. これらフォスホリピドの cmc 値のほとんどは表面張力法と光散乱法により求められているが, いくつかは限外ろ過, 透析率, 密度勾配超遠心, 屈折率, スペクトルシフトなど³⁶⁻⁴³⁾から求められている. 25°C 付近の cmc の文献値に対して解析を加えた. それらデータの内訳は, 10 個のレシチンに対して 17 の cmc 値, 4 個のリゾレシチンに対して 4 つの cmc 値, 8 個のリゾエーテル誘導体に対して 8 つの cmc 値, 4 個の PAF に対して 5 つの cmc 値である. cmc 値のデータとしての質は測定法, データ処理法, レシチンの純度, 塩や緩衝剤などの添加物などによって左右されるが, 本研究においてこれらの要素は無視した. 更に, ミセル形成の代わりにリポソームを形成する長鎖レシチンは³⁶⁾臨界リポソーム濃度を cmc と見なすこととした.

Table 1 中のフォスホリピドの cmc 値は界面活性剤に経験的に適用される式に従いアシル鎖の炭素数 n_c の増加に伴い減少するが,

$$\log \text{cmc} = -an_c + b \quad (36)$$

同じ極性原子団を持つレシチンとそのエーテル誘導体でありながらアシル鎖側の構成タイプごとに, この係数 a と定数 b は Table 1 と Fig. 6 に示す通り違う値をとる. ここで, タイプ I はグリセロールの 1 位に 1 本だけ側鎖を持つリゾレシチン, タイプ IIL は 2 位に短いアセチル基を持ち長い 1 位の鎖長が変化する群, タイプ IIS は 1 位の固定長の長い側鎖に対し 2 位の短い側鎖が変化する群, そしてタイプ IIE は 1 位 2 位とも同じ鎖長を持つ群である. このような係数 a の違いはアルキルスルフォキサイド¹⁹⁾ やオリゴエチレングリコールジエーテル³⁾ など 2 本のアルキル鎖を持つ化合物でも同様に見られる. また, Guo らはフッ化炭素鎖及び炭化水素鎖の両方を持つ界面活性剤が炭化水素鎖 1 本のものに比べて低い a 値を示すことを見出した.⁵⁵⁾ これらはモノマー状態での側鎖の分子内会合によることが予想される. この分子内会合がミセル形成に及ぼす効果が分子表面積で説明できることを以下に示す.

Table 1. Dependence of Cmc Values and Molecular Surface Areas on the Total Number of Carbon Atoms in Acyl and Alkyl Chains for Lecithins and Ether Analogues

Type	Lecithin			Ether analogue	
	Compd	a	$A(\text{nm}^2/\text{CH}_2)$	Compd	a
I	$\text{C}_n\text{C}_0(n=12, 14, 16, 18)^a)$	0.506	0.2981	$\text{C}_n\text{C}_0(n=16, 18)^a)$	0.475
IIL	$\text{C}_n\text{C}_2(n=12^{a,b}), 14^a), 16^a), 18^a)$	0.485	0.2981	$\text{C}_n\text{C}_2(n=12, 16, 18)^a)$	0.418
IIE	$\text{C}_n\text{C}_n(n=6^{c,d,e,f}), 7^{b,c,e,f}), 8^{c,e}), 9^e), 10^g), 16^h)$	0.378	0.2181		
IIS	$\text{C}_{16}\text{C}_n(n=2, 3, 4, 6)^a)$	0.191	0.1658	$\text{C}_{16}\text{C}_n(n=3, 4, 6)^a)$	0.131

a) Ref. 54, b) Ref. 36, c) Ref. 35, d) Ref. 37, e) Ref. 38, f) Ref. 51, g) Ref. 52, h) Ref. 53.

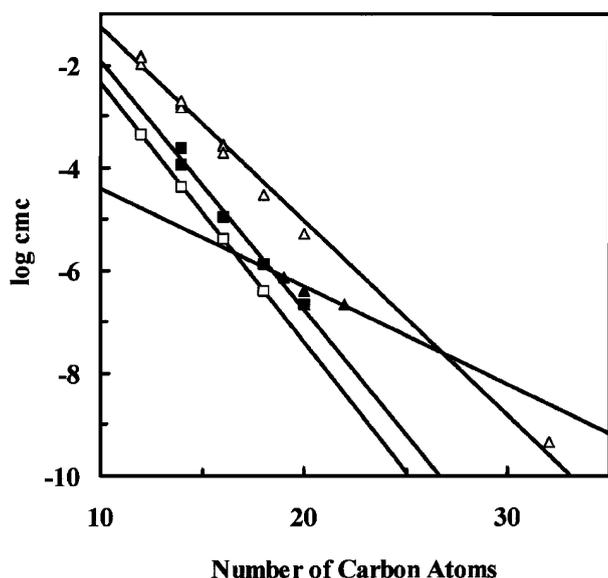


Fig. 6. Dependence of the Logarithm of cmc on the Total Number of Carbon Atoms in the Acyl Chains for Lecithins
The types of lecithins: □: I, ■: IIL, △: IIE, ▲: IIS.

レシチンのタイプごとに表面積とアシル鎖総炭素数はそれぞれの直線関係を示した。

$$S = An_c + B \quad (37)$$

Table 1 における A の値は DMPC の B のコンフォーマーを元に得られた構造によるものであるが、この増減が係数 a とほぼ比例している。この A の値はメチレン基 1 個当たりの表面積を表している訳であるが、タイプ IIL のレシチンの A 値 0.2981 nm^2 は全トランス体の直鎖状アルカンの A 値 0.318 nm^2 に比べ小さい。これは C-C 原子間の距離の違いに起因している。

Fig. 7 は水の半径 r_w を $0 \rightarrow 0.15 \text{ nm}$ としたときの S と cmc の常用対数値との相関を示したもので、適当な r_w の適用により、ここに挙げた様々なタイプの飽和型レシチンの cmc 値が唯 2 つのパラメータ α, β によって論ずることができることを意味している。

$$\log \text{cmc} = -aS + \beta \quad (38)$$

また、このことはレシチンの水中でのモノマー構造が結晶構造と類似しているということを示している。この $r_w = 0.15 \text{ nm}$ における α 値は、アルカンの水溶性^{1,2} やジエチレングリコールジエーテルのオクタノール/水分分配係数³ 及び界面活性剤のミセル形成能^{20,21} などにより得られた値と非常に近い値を示している。

β の物理的意味を考えると、いくつかの因子を考慮に入れる必要がある。まず、熱力学的見地から言えば、モル濃度よりモル分率を用いるべきところである。²⁰ 2 つ目は β の値が極性基の種類によって変わりうるということである。つまり極性基の cmc

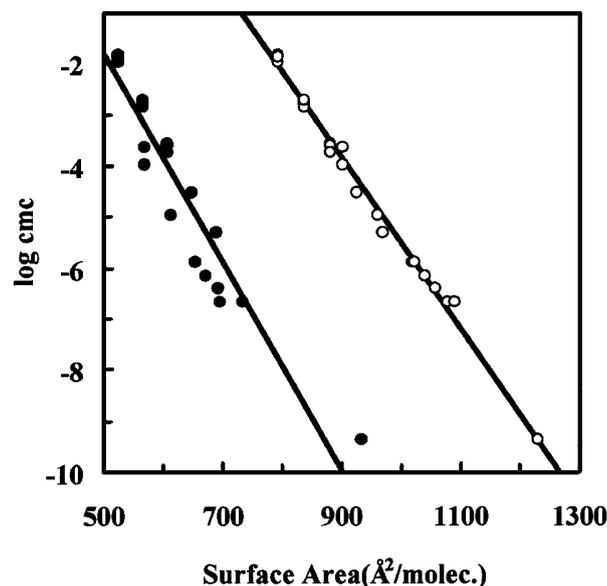


Fig. 7. Dependence of the Logarithm of cmc on the Molecular Surface Area for Lecithins

The molecular area: ○: conformation B at $r_w = 0.15 \text{ nm}$; ●: conformation A at $r_w = 0.0 \text{ nm}$.

への寄与がその種類によって異なってくるので、アシル鎖部分と極性基部分とに分けて表面積を取り扱うべきところである。もちろん、このことは原子ごとの表面積を求めることで可能であったが、今回の cmc 値に対しては分子表面積を用いた。ゆえにレシチンとリゾレシチンの間に見られる β 値の差は、アシル鎖グループの表面積とグリセロフォスホコリン部の表面積の cmc への寄与の違いを反映したものであり、将来極性基の cmc に対する寄与の定量的な解明に役立つものと思われる。

係数 a はミセル化におけるメチレン基 1 個当たりの標準自由エネルギーの増加分に比例していると思なして良く、 b はヘッドグループの種類に依存している。レシチンの cmc 予測において Marsh と King⁵⁶ そして Tanford²⁰ が同様の取り扱いを提唱しているが、クラス分けは我々のものより簡単である。Table 1 に示したようなクラス分けによる利点は係数 a と A の比例関係に表れている。長いアシル鎖を 2 本持つレシチンは 25°C においては液晶状態にある。例えば dioctanoylphosphatidylcholine はミセルを形成するが, dinonanoylphosphatidylcholine は液晶を形成する。レシチンのミセル会合数は炭素数の増加とともに増加し、ミセル形成の標準自由エネルギーに影響を及ぼす。³⁶ Dihexanoylphosphatidylcholine のミセル会合数は濃度とともに増加し 30 以上になるが、³⁶ ミセル会合数が大きくなるとミセル形成の標準自由エネルギーはほとんど変化しなくなる。本研究では大きなミセルやリポソームを形成する長鎖のレシチン及び誘導体を主に扱っているので、分子熱力学理論の見地から炭素原子数が変化し

でもミセル中のヘッドグループ間の立体的及び静電的反発は変化しないことが期待される。^{20,21)}

水分子の半径として 0.14 nm 又は 0.15 nm が一般的に用いられているが、¹⁻⁸⁾ scaled particle 理論によれば、25°C における水のファンデルワールス半径は 0.145 nm であり、¹⁾ Bondi はエーテル酸素原子の最密詰め込み半径として 0.152 nm を与えている。⁵⁷⁾ 我々は表面積と cmc の常用対数値の対応関係においてレシチンの構造と水分子の半径がどのように影響するかを調べた。我々の知る限り水分子の半径の影響に関する系統的研究はほとんど無く、³⁾ レシチンはこのような研究に適した化合物である。レシチンやリゾレシチンはともにグリセロフォスホコリン部を有している。それゆえそれら cmc 値は主にアシル鎖によって影響を受けている。Table 2 の DMPC の B コンフォーマーからによるレシチン群の α 値はリゾレシチン群の α 値に近い値を示しているが、A のコンフォーマーについては多少ずれていた。このことはこれらフォスホリピドが水溶液中では B コンフォーマーの状態にあることを示唆するものである。そしてその B コンフォーマーの相関係数から判断する限り水分子の半径としては 0.14 nm ~ 0.15 nm が適当と思われる。

PAF とその関連フォスホリピドは血小板の活性化を引き起こすが、この活性は 10^{-9} — 10^{-12} M で現れ、これは cmc の値 10^{-6} — 10^{-7} M よりもかなり低い。^{39,58)} また、1 位のアルキル側鎖が hexadecyl 又は octadecyl のものが最大活性を持つが、これはその強い疎水性に起因するものと推測される。⁵⁸⁾ 2 位のアシル側鎖についてはどの誘導体よりもアセチル誘導体のものが最も活性が強く、これは PAF 受容体への親和性が考えられる。⁵⁸⁾

2-3. OB の溶液構造の推定 OB の初期構造は Insight II の Builder モジュールにより構築し、Discover モジュールにより CVFF 力場を用い最適化した。⁵⁹⁾ Fig. 8 に示すように不斉炭素に付くフェニル基の回転角を ϕ_1 シクロヘキシル基の回転角を ϕ_2 と定義する。最適化した OB を 2 nm の層状の水分子 975 個で覆って系全体の最適化を行った。この水存在下の最適化により ϕ_1 と ϕ_2 がわずかに変化

し、この構造を Ew とした。このときの最適化法は conjugate gradients method で、derivative が 0.001 kcal mol⁻¹ 以下になるまで van der Waals' cut off distance=0.95 nm, electrostatic cut off distance=0.95 nm で行った。更に、水分子を取り去った Ew を最適化し真空中の構造 Ev とした。

用意した初期構造について ϕ_1 と ϕ_2 を 360° にわたって変化させた。角度の変化量は 30° ごとで、詳細に必要な部分は 10° ごとにした。各構造に対して露出表面積 S_w , S_o を算出した。回転過程で化学結合していない原子同士がお互いの Bondi 半径を越えて接近した構造は不安定な構造と見なした。また、我々のモデリングソフトウェアは、Bovey-Johnson の理論に基づいた環電流効果による化学シフト変化を算出する機能も有しており、その算出も各構造に対して行った。OB の各構造における生成熱は MNDO 静電ポテンシャルを用い MOPAC モジュールで算出した。

NMR の測定では、重水 (Aldrich 製) と R-, S-OB (Sigma 製) は製品をそのまま用いた。この OB は逆相 HPLC において鋭い 1 本のピークを示すものである。Tetramethylammonium chloride (TMA) は Nacalai Tesque の製品を用いた。NMR 測定はすべて測定温度 309.7 ± 0.1 K で行った。この温度は OB の苦味の実験にも用いられたため採用した。^{60,61)} 1D 測定では OB の濃度を 1 mM—60 mM の範囲で変化させて TMA 基準 ($\delta=3.176$ ppm)⁶²⁾ で ¹H の化学シフト値 (Δ) を決定した。得られたデータは Nuts NMR data-processing software (Acorn NMR Inc.) を用い処理、解析をした。これらの測定は日本電子 (JEOL) 製の Lambda 500 分光器を使用し 500 MHz で行った。測定されたシフト値はベンゼン環の環電流効果の定量に用いられた。2D 測定では OB 60 mmol dm⁻³ (mM) 重水溶液に対して ¹H-¹H shift correlated spectroscopy (H-H COSY) と ¹³C-¹H shift correlated spectroscopy (C-H COSY) はそれぞれ delay times=93.0 μ s, 17.4 μ s と transients=16, 64 で、標準的なパルスシーケンスを用い測定した。Phase-sensitive nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) も transients=8, data points=2048,

Table 2. Variation of the Constants (α and β) and the Correlation Coefficient (R) of Eq 38 with the Radius of the Water Molecule for Conformations A and B of Lecithins

r_w (nm)	Conformation A			Conformation B		
	α (molec. nm ⁻²)	β	R	α (molec. nm ⁻²)	β	R
0.00	2.04	8.38	0.9469	1.98	8.47	0.9288
0.10	1.93	11.52	0.9964	1.90	11.29	0.9939
0.14	1.75	11.63	0.9961	1.72	11.24	0.9966
0.15	1.71	11.63	0.9955	1.67	11.23	0.9964
0.16	1.66	11.63	0.9947	1.63	11.23	0.9960

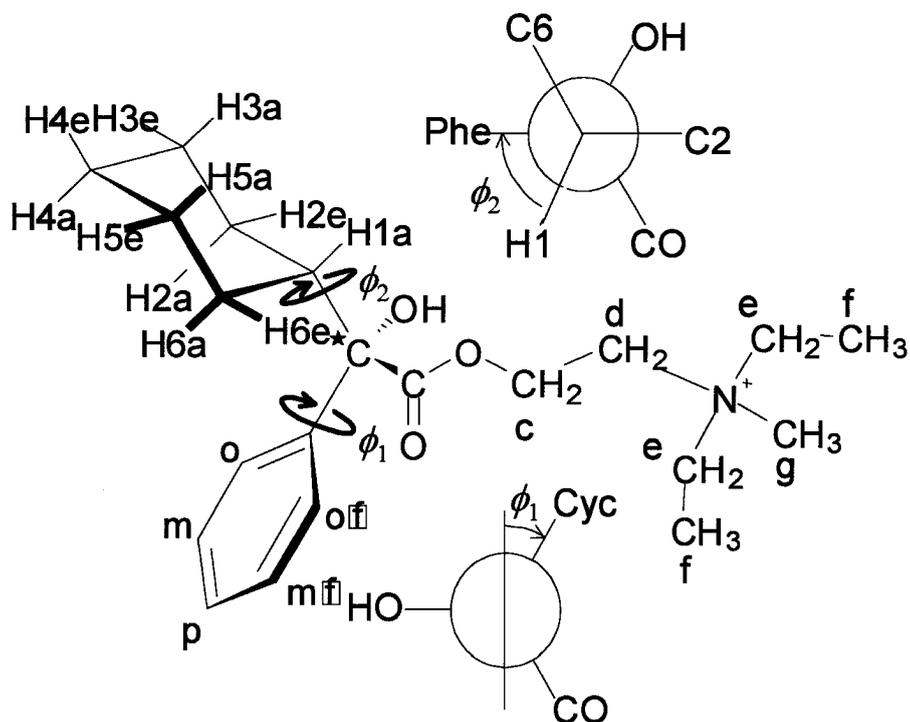


Fig. 8. Labeling of the Hydrogen Atoms of *S*-OB and Definitions of the Rotational Angles of the Cyclohexyl and Phenyl Groups around the Chiral Carbon Atom

Table 3. Chemical Shift Differences between the Paired Protons of the Cyclohexyl Group, Heats of Formation, and Hydrophobic and Hydrophilic Molecular Surface Areas for Six Probable Conformations

Struct	φ_1 (degree)	φ_2 (degree)	$\Delta\delta$ (ppm)				SS	ΔH_f (kJ/mol)	S_o (nm ² /molec)	S_w
			6e-2e	6a-2a	5e-3e	5a-3a				
Obsd			-0.152	-0.378	-0.026	-0.140	—	—	—	—
Ew	-44	68	-0.234	-0.120	-0.013	-0.083	0.0767	412.5	5.848	0.538
Ev	-52	62	-0.756	-0.191	-0.112	-0.167	0.4074	412.2	6.123	0.479
N	-64	102	-0.150	-0.350	-0.021	-0.122	0.0011	444.3	5.857	0.548
Dw	-44	59	-0.255	-0.086	-0.024	-0.079	0.0993	415.6	5.858	0.529
Sc	0	120	0.283	0.466	0.012	0.080	0.9512	731.1	5.636	0.641
Sn	-60	100	-0.099	-0.325	-0.013	-0.110	0.0070	443.0	5.854	0.551

mixing time=400 ms で同様に標準的な測定及び処理をした。これらの測定は Lambda 500 で行った。また、NOESY 測定についてはノイズレベルが大きく小さなクロスピークを拾うのが困難であったため、Varian の Inova 400 分光器を用いて 400 MHz でも行った。Transients=8, data points=1024, mixing time=500 ms で測定したところ、ノイズレベルが抑えられ、小さなクロスピークを測定することができた。これらの結果はシクロヘキシル基のプロトンの帰属及び、シクロヘキシル基—フェニル基プロトン環の距離情報に用いられた。

NMR による構造決定において最も注目したのは、本来ほとんど化学的には等価であるはずのシクロヘキシル基の 4 つのプロトン対 (Fig. 8: 6e-2e,

6a-2a, 5e-3e, 5a-3a) である。これらの化学シフトの差 $\Delta\delta$ (Table 3) が主に隣接するフェニル基の環電流効果に起因するとして、その理論的計算値が一番近い φ_1 と φ_2 の値を持つ構造を N (Fig. 9) とした。この構造 N についてフェニル基とシクロヘキシル基のプロトン間距離を測ったところ、その大小は観測された NOE の結果とよく一致した。以上のことから、OB のフェニル基及びシクロヘキシル基の水中でのコンフォメーションを再現している構造は N であり、その構造は分子力学的に求めた構造と少々異なると言える。しかしながら、1 つのコンフォメーションから測定値を説明する際に前提となるのは、そのコンフォメーションの安定性であり、いくつものコンフォメーションが同程度の確率で存在

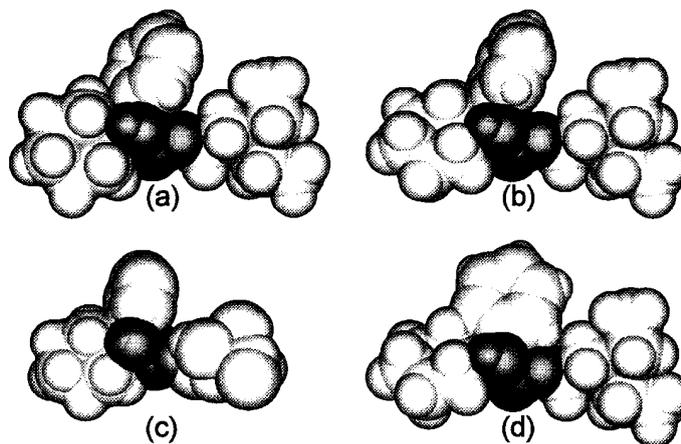


Fig. 9. Structures (a) Ew, (b) N, (c) Dw, and (d) Sc of S-OB, Where the View of the Hydroxyacetyloxy-*N,N*-Diethyl-*N*-Methylethanaminium Group is Kept Unchanged
Hydrophilic surfaces are shown in white and hydrophobic surfaces are in gray.

する、つまり、回転をしてしまっているようでは、測定値とコンフォメーションとを1対1に結びつけることはできない。そこで、N構造に対し分子動力的シミュレーションを行った。平衡状態に達してからのOB構造をサンプリングしたところ、C*-C(phenyl)とC*-Clの結合軸回りの回転はかなり制約を受けているのに対し、C-OH、C-CH₃、C*-COなど他の単結合は自由に回転していることが分かった。このことは、先の結果を支持するものである。サンプリングした平均構造をDwとしてTable 3とFig. 9に示す。Dw自体は構造Nよりも構造Ewに近い。

構造ScはSo最小、Sw最大になるが原子間の衝突を無視しているため生成熟がかなり大きく存在確率の低い構造と思われるが、原子間衝突を起こす ϕ_1 と ϕ_2 の角度範囲を除外したときのSw最大の構造Snは構造N(Fig. 9)に非常に近かった。構造Ewは構造Evに比べて構造Nに近く、小さいSo値と大きなSw値を持つことから、分子力学計算も水を付加することによりOBのコンフォメーションに与える水和の影響を考慮でき、真空条件で計算するよりも妥当な構造を予測できることが分かる。

3. シクロデキストリンによる包接

3-1. ホスト-ゲストの結合による表面積変化の定義と計算方法の開発 溶質分子が親水性原子と疎水性の原子から成るとすれば、水接触分子表面積Sは親水性面積Swと疎水性面積Soから構成されることになる。このような定義はホスト分子(H)とゲスト分子(G)の等モル複合体(HG)にも当てはまる。複合体の分子表面積は、 $S(HG) = S_w(HG) + S_o(HG)$ である。複合体の分子表面積はホストの部分とゲストの部分にも分けることができ、 $S(HG) = S(Hc) + S(Gc)$ である。さらに、 $S_o(HG) = S_o(Hc) + S_o(Gc)$ である。

次に、Fig. 10におけるホストとゲストのドッキング時にそれらの分子構造が変化しないと仮定した場合の表面積変化を考える。するとSのドッキングによる減少は

$$\Delta S(HG) = S(Hf) + S(Gf) - S(HG) \quad (17)$$

のように書いて、この減少はホストとゲストの量に割り振る($\Delta S(Hc) + \Delta S(Gc)$)ことができる。ドッキングによるホストの疎水性面積の減少は

$$\Delta S_o(Hc) = S_o(Hf) - S_o(Hc) \quad (18)$$

のように書ける。同様に、 $\Delta S_o(Gc)$ 、 $\Delta S_w(Hc)$ 及び $\Delta S_w(Gc)$ が定義できる。

ホストの疎水性面積の減少 $\Delta S_o(Hc)$ は $\Delta S_{oo}(Hc)$ と $\Delta S_{ow}(Hc)$ から成る。 $\Delta S_{oo}(Hc)$ はゲストの疎水性原子と接触している疎水性面積を示しており、 $\Delta S_{ow}(Hc)$ はゲストの親水性原子と接触している疎水性面積に対応している。更にホストとゲストについて $\Delta S_{oo}(Gc)$ 、 $\Delta S_{ow}(Gc)$ 、 $\Delta S_{wo}(Gc)$ 、 $\Delta S_{ww}(Gc)$ 、 $\Delta S_{wo}(Hc)$ 及び $\Delta S_{mww}(Hc)$ などが定義可能である。これらの面積を隠蔽水接触表面積と呼ぶこととする。

Fig. 10の太い実線は疎水性水接触表面を示しており、細い破線は親水性のファンデルワールス面を示す。ゲスト分子は親水性原子、疎水性原子1つずつから成り、ホスト分子は2つの親水性原子と1つの疎水性原子から構成されている。例えば、フリーのゲストの太い弧ABは面積 $S_o(Gf)$ の構成部分ということになる。このゲスト分子がホスト分子と複合体を形成すると、弧AB(Gf)は弧AG(Gc)、GI(Gc)、IK(Gc)及びKB(Gc)に分かれる。ここで、太い弧AG(Gc)は $S_o(Gc)$ の構成部となり、ホストにより隠されない部分である。弧IK(Gc)はホスト分子の疎水性部分に取り込まれており、 $\Delta S_{oo}(Gc)$ の構成部分となる。弧GI(Gc)とKB(Gc)は ΔS_{ow} の構成部分となる。一方ホスト側で、細い弧EF(Hf)は弧

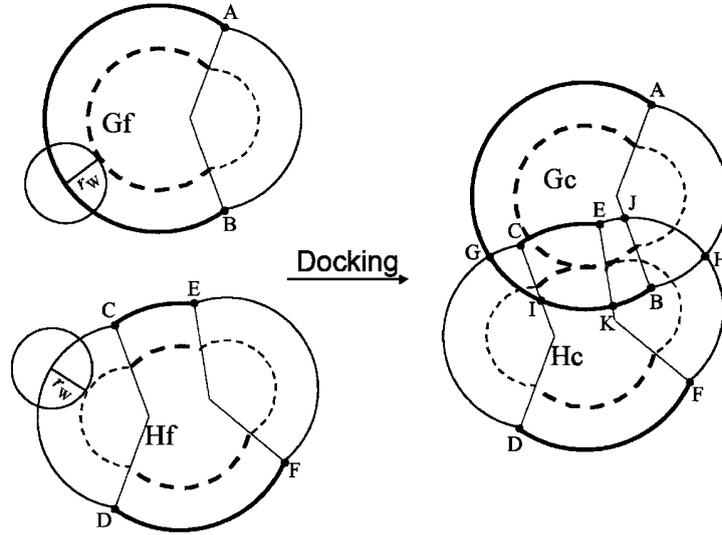


Fig. 10. Definitions of Hydrophilic and Hydrophobic Surface Areas for Free Guest (Gf), Free Host (Hf), and Complex (HG)

The hydrophilic surface is shown in thin lines and the hydrophobic surface in thick lines. The dashed lines denote the van der Waals surface and the solid lines depict the water accessible surface. For the complex, each arc constitutes part of the following area: arc AG: $So(Gc)$, arc AH: $Sw(Gc)$, arcs BK and GI: $\Delta Sow(Gc)$, arc IK: $\Delta Soo(Gc)$, arc BH: $\Delta Sww(Gc)$, arc DF: $So(Hc)$, arcs DG and FH: $Sw(Hc)$, arc CE: $\Delta Soo(Hc)$, arcs CG and EJ: $\Delta Swo(Hc)$, arc HJ: $\Delta Sww(Hc)$.

EJ(Hc), JH(Hc)及びHF(Hc)となり, それぞれ $\Delta Swo(Hc)$, $\Delta Sww(Hc)$ 及び $Sw(Hc)$ の構成部分となる. これらすべての隠蔽表面積を計算するには, ゲスト側原子の隠蔽部分がホストの親水性, 疎水性どちらの原子と接触しているのかを決める必要がある. これはホスト側の原子についても同様である.

この問題の説明のために Fig. 11 のような3つの原子からなる特殊な複合体分子を想定する. すべての原子は z 軸上に位置し, ホスト分子の親水性原子 A_{HW} はゲスト分子の疎水性原子 A_{GO} とファンデルワールス面で接触している. A_{HW} と A_{GO} の中心はそれぞれ O_{HW} と O_{GO} . これらの原子の水接触面は

$$\text{distance } O_{GO}O_{HW} < r_4 + r_6 \quad (19)$$

を満たすときに重なり合う. また, A_{GO} と A_{HO} の水接触面が重なり合うときには

$$\text{distance } O_{GO}O_{HO} < r_2 + r_6 \quad (20)$$

を満たす. 原子 A_{HO} , A_{HW} , A_{GO} の中心の位置ベクトルをそれぞれ $O_{HO}[x_{HO}, y_{HO}, z_{HO}]$, $O_{HW}[x_{HW}, y_{HW}, z_{HW}]$, $O_{GO}[x_{GO}, y_{GO}, z_{GO}]$ と定義する. すると z 軸は可変パラメータ t を用いて $[O_{HO} + t(O_{HW} - O_{HO})]$ と表せる. A_{HW} と A_{HO} の間の原子間距離 d は次式を満たす必要がある.

$$|r_1 - r_3| < d < r_1 + r_3 \quad (21)$$

ゲスト分子の疎水性水接触面積 $So(Gf)$ はホスト分子とのドッキングにより $So(Gc)$, $\Delta Soo(Gc)$ 及び $\Delta Sow(Gc)$ に分かれることとなる. $So(Gc)$ はフリー分子の表面積計算と同じ要領⁶⁾で単純に計算できるが, 残りの部分 [$So(Gf) - So(Gc)$] を $\Delta Soo(Gc)$ と $\Delta Sow(Gc)$ に分割するとき, これら隠蔽部分の境界を決めなければならない.

まず, ゲスト分子の水接触表面上に点 P をと

り, この点がホスト分子にどれだけ近いかをみる. ワールド座標系において, P は以下の位置ベクトルによって示される.

$$P_w[w_x, w_y, w_z] = O_{GO}[x_{GO}, y_{GO}, z_{GO}] + \Phi[r_6, \theta, \varphi] \quad (22)$$

ここで, Φ は球面極座標系から直行座標系への良く知られた変換演算子である. Fig. 11a で示すように, ホスト分子において2つの円錐を考慮することができる. 1つ目は A_{HO} と A_{HW} の水接触面の交わりによってできた円 AB を底面として持つもので, 円 AB は次の式を満たす.

$$z_1 = \{(r_2^2 - r_4^2)/d + d\}/2 \quad (23)$$

$$x^2 + y^2 = r_2^2 - z_1^2 \quad (24)$$

2つ目の円錐は A_{HO} と A_{HW} のファンデルワールス表面の交わりによってできた円 CD を底面として持つもので, 円 CD は次の式を満たす

$$z_2 = \{(r_1^2 - r_3^2)/d + d\}/2 \quad (25)$$

$$x^2 + y^2 = r_1^2 - z_2^2 \quad (26)$$

これら2つの円錐 IAB と ICD は共通の頂点 I を持ち, Fig. 11b の平面図においては2つの相似な三角形 ΔABI と ΔCDI で表される.

Fig. 11c は平面座標上で重なり部分を示したものの拡大図である. ここで A 点, C 点の x 座標 y 座標のこの座標系での座標 ρ は次式で与えられる.

$$\rho_2 = (r_2^2 - z_2^2)^{1/2} \quad (27)$$

$$\rho_1 = (r_1^2 - z_1^2)^{1/2} \quad (28)$$

この $\rho - z$ 座標系で次の関数を定義する.

$$f(\rho, z) = (\rho_1 z_2 - \rho_2 z_1) \{(\rho - \rho_1)(z_2 - z_1) - (z - z_1)(\rho_2 - \rho_1)\} \quad (29)$$

そして, 直線 AC は次式を満たす.

$$f(\rho, z) = 0 \quad (30)$$

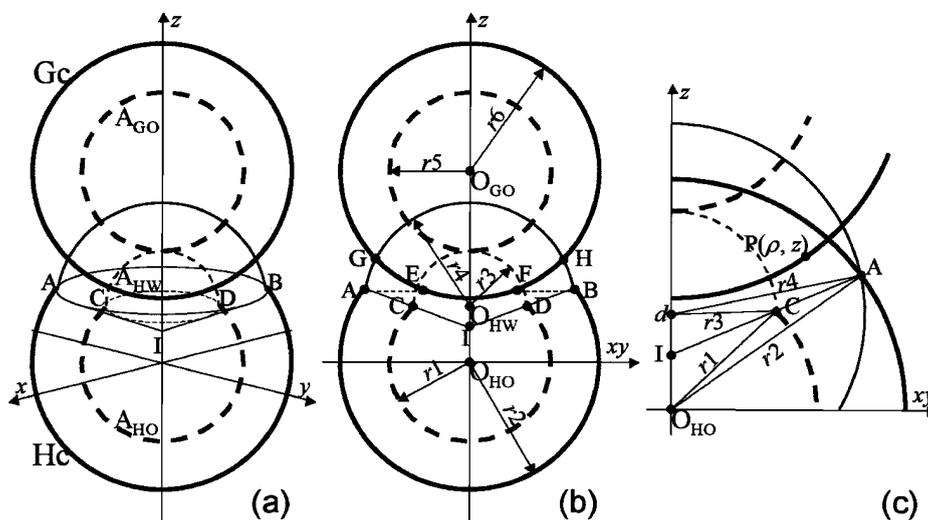


Fig. 11. Boundary between Different Water-Accessible Surfaces of the Host Molecule Composed of Two Hydrophilic and Hydrophobic Atoms, Where Its Hydrophilic Atom is in the van der Waals Contact with the Hydrophobic Atom of the Guest

(a) A three-dimensional view of the complex molecule composed of three atoms whose centers (O_{HO} , O_{HW} , and O_{GC}) are located on the z axis, (b) a cross-section of Fig. 4a by a plane passing the z axis, and (c) a partial expansion of the overlapping region in Fig. 4b. Here d =distance between the atomic centers of the host molecule, r_1 =van der Waals radius of the hydrophobic atom of the host, $r_2=r_1+r_w$, r_3 =van der Waals radius of the hydrophilic atom, and $r_4=r_3+r_w$. The Cartesian coordinate centered at the hydrophobic atom of the host is based on the intramolecular coordinate for the host molecule. In Fig. 4b points E and F are the intersections of line AB and the water-accessible surface of the host molecule. In Fig. 4c point I is defined as the intersection of line AC and the z axis, and point P can move on the water-accessible surface of the guest molecule.

点Iは直線ACの z 切片である。そして、この直線が原子 A_{HO} と A_{HW} の境界を示す。この定義により、点Pがこの直線より下にある、つまり $[f(\rho, z) < 0]$ のとき、点Pは A_{HO} の水接触体積内にあり、上に位置する、つまり $[f(\rho, z) > 0]$ のとき、 A_{HW} の水接触体積内にあることになる。図に示した各原子の配置においては、Pは常に上部領域にあるため弧GEFHは $\Delta Sow(Gc)$ の構成部分となり、 $\Delta Soo(Gc)$ に相当する部分はない。

ここまで境界問題をFig. 11cの平面上だけで考えてきた。次に、Fig. 11aに立ち返って立体的にこの問題を考える。境界は円錐IABによって示される。点Pが宿主分子のどちらの原子に含まれるかを判定する方法を以下に示す。まず、点Pの3次元絶対座標系における座標(ワールド座標)を宿主分子の内部座標系の座標に変換する。この内部座標系はFig. 11aに示すようにその中心を O_{HO} に持つ。点Pのこの座標系における位置ベクトルは

$$\mathbf{P}_m[px, py, pz] = \mathbf{M}\mathbf{P}_w \quad (31)$$

で示され、Mはワールド座標から分子内座標への変換演算子

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} y_m/\rho_m & -x_m/\rho_m & 0 \\ -x_m z_m/\rho_m d & -y_m z_m/\rho_m & \rho_m/d \\ x_m/d & y_m/d & z_m/d \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 1-x_{HO}/wx & 0 & 0 \\ 0 & 1-y_{HO}/wx & 0 \\ 0 & 0 & 1-z_{HO}/wx \end{bmatrix} \quad (32)$$

である。ここで

$$[x_m, y_m, z_m] = \mathbf{O}_{HW} - \mathbf{O}_{HO} \quad (33)$$

$$\rho_m = (x_m^2 + y_m^2)^{1/2} \quad (34)$$

である。この分子内座標への変換によって点Pから境界を z 軸、つまりホストの2つの原子について対称的に見ることができる。更に2次元の分子内座標系でのPの座標を決めるために、 z 軸とPとの間の距離 ρ を求める。

$$\mathbf{P}(\rho, z) = [\{(\rho x)^2 + (\rho y)^2\}^{1/2}, (pz)] \quad (35)$$

これらの対称処理の結果、3次元の問題を最終的に2次元のものとして扱え、更に ρ の負の値も考慮する必要がなくなる。もっと複雑なホストとゲストからなる複合体についても、Fig. 11の複合体と同じ方法で露出、隠蔽水接触表面積を計算できる。もし、Fig. 11bにおいて直線AEFBを境界として採用してしまうと、弧GE、FHと弧EFはそれぞれ $\Delta Sow(Gc)$ と $\Delta Soo(Gc)$ の構成部分となってしまう、接触のないはずの疎水性表面同士の $\Delta Soo(Gc)$ が値を持ってしまい、結果として不適切となる。本研究における複合体の表面積計算とその過程の表示はおよそ25秒程度を要した(Pentium II/233, NT 4.0)

3-2. シクロデキストリン包接複合体の構造の推定 CyD包接系では、 α -CyD-methanol,⁶³⁾ α -CyD-propanol,⁶⁴⁾ β -CyD-ethylene glycol,⁶⁵⁾ β -CyD-glycerol,⁶⁵⁾ β -CyD-benzyl alcohol,⁶⁶⁾ 及び β -CyD-4-tert-butylbenzyl alcohol⁶⁷⁾の6個の結晶構造が入手可能であった。これらの系でのゲストは割と単純な脂肪族、芳香族アルコールである。 α -CyDとhexanol, octanol及びphenolの複合体については結晶

構造が得られなかったため、その α -CyD の構造は α -CyD-propanol 複合体の結晶構造⁶⁴⁾ のものと等しいとし、propanol の代わりに構造最適化したゲストを配置した。 β -CyD、 γ -CyD の系についても結晶構造が得られなかったものはそれぞれの水和物の結晶構造^{68,69)} の CyD 構造から同様に複合体構造を構成した。

CyD 複合体の立体構造は CyD の重心を原点とした直交座標系上で表す。CyD 分子は x 軸についてほぼ対称的な構造となる。1 級水酸基側は負の x の値を持ち、2 級水酸基側は正の x の値を持つ。ゲスト分子は対称軸 x に沿って移動させた。負の Δx 値は結晶構造よりもゲスト分子が CyD の 1 級水酸基側へ移動したことを、正の値はその逆の方向へ移動したことを示す。ドッキングによるホスト分子、ゲスト分子の構造変化はないものとする。

Fig. 12 に、3 つの CyD 複合体系における Δx 値に対する $\Delta S_{oo}(\text{HG})$ の変化を示す。 $\Delta S_{oo}(\text{HG})$ はホスト-ゲスト間での疎水性原子同士の接触の大きさを表しているため、その値が最大となるゲストの位置 Δx は溶液中の複合体構造と対応することが予想される。この安定構造を与える Δx と各種表面積を Table 4 に示す。 Δx の絶対値が小さいことから、この推定構造が結晶構造に近いことが分かる。 Δx の変化に伴い、 $\Delta x=0$ 付近で $S_o(\text{HG})$ が最小値、 $\Delta S_o(\text{HG})$ が最大値を示す。これらの表面積は溶液中の安定構造の予測に使える。水接触表面積計算に用いた水分子の半径の違いはわずかながらも求められる溶液中複合体構造に影響を与える。 $r_w=0.10$ 及び 0.14 nm での Δx の値を Table 4 に示す。Fig. 13 に複合体構造が得られなかった 6 つの系について推定構造を示すが、わずかな構造変化では $\Delta S_{oo}(\text{HG})$ が大きく変化しないために、正確な CyD 複合体の溶液構造は決定できない。

3-3. シクロデキストリンとゲストの結合定数の

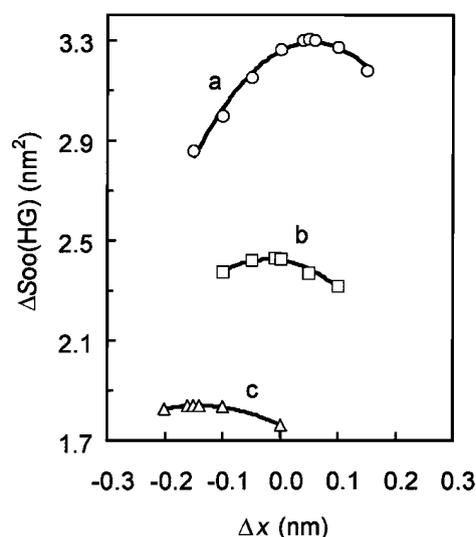


Fig. 12. Molecular Surface Area Changes at $r_w=0.14$ nm, $\Delta S_{oo}(\text{HG})$, with the Penetrating Depth of Guest into the CyD Cavity for (a) α -CyD-Propanol System, (b) β -CyD-Benzyl Alcohol System, and (c) β -CyD-4-*tert*-Butylbenzyl Alcohol System Where the Penetrating Depth is Shown as the Displacement from Their Crystal Structures.

推定 CyD 複合体の当モル結合定数 K_1 と $\Delta S_{oo}(\text{HG})$ 最大値の間の相関を見るために、11 の系を文献から⁷⁰⁻⁷⁶⁾ 選んだ (Table 5)。これらは 5 つの α -CyD 系、4 つの β -CyD 系、2 つの γ -CyD 系で、4 つの芳香族分子と 7 つの脂肪族分子をゲストとして含む。1 つの系で 2 つ以上の文献値がある場合があるが、そのような値は大抵受け入れがたいもので、大きさも数桁違う。例えば、sodium dodecyl sulfate と β -CyD の系では 3 桁以上の開きがある。しかしながら、最近では妥当な値が導き出されている。⁷⁷⁾

Table 4 中に示した 11 の系での推定構造を与え

Table 4. Various Water-Accessible Molecular Surface Areas for Three CyD Complexes Whose Structures Have Maximum $\Delta S_{oo}(\text{HG})$ Values

	α -CyD + C ₃ OH		β -CyD + BzIOH		β -CyD + 4- <i>t</i> -C ₄ -BzIOH	
	0.10	0.14	0.10	0.14	0.10	0.14
$r_w(\text{nm})$	0.10	0.14	0.10	0.14	0.10	0.14
$\Delta x(\text{nm})$	-0.20	-0.15	0.02	-0.01	0.00	0.05
$S(\text{HG})(\text{nm}^2)$	9.321	9.887	10.931	11.465	11.342	12.059
$S_w(\text{HG})(\text{nm}^2)$	5.806	6.463	6.793	7.501	7.118	8.061
$S_o(\text{HG})(\text{nm}^2)$	3.516	3.424	4.138	3.964	4.223	3.998
$\Delta S(\text{HG})(\text{nm}^2)$	2.210	2.693	2.659	3.507	3.165	3.784
$\Delta S_w(\text{HG})(\text{nm}^2)$	0.325	0.427	0.163	0.361	0.105	0.057
$\Delta S_o(\text{HG})(\text{nm}^2)$	1.885	2.266	2.496	3.147	3.060	3.727
$\Delta S_{ww}(\text{HG})(\text{nm}^2)$	0.203	0.238	0.054	0.149	0.000	0.000
$\Delta S_{wo}(\text{HG})(\text{nm}^2)$	0.123	0.186	0.109	0.145	0.105	0.057
$\Delta S_{ow}(\text{HG})(\text{nm}^2)$	0.268	0.427	0.406	0.624	0.332	0.426
$\Delta S_{oo}(\text{HG})(\text{nm}^2)$	1.599	1.839	2.090	2.428	2.729	3.301

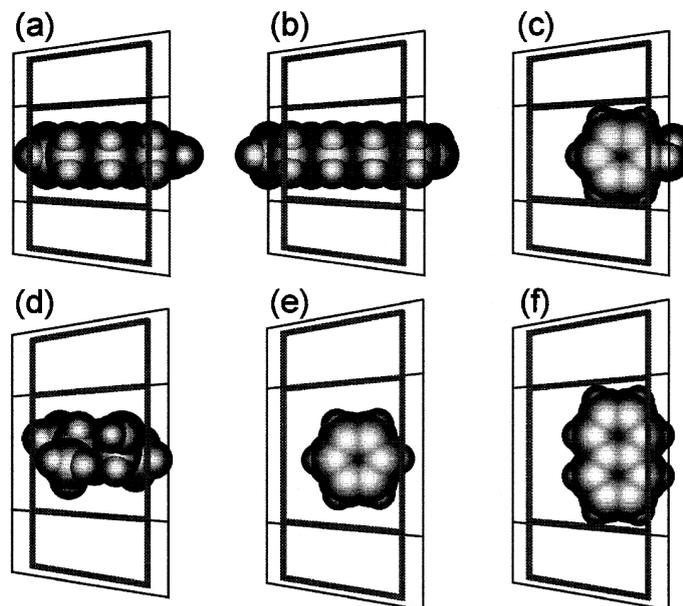


Fig. 13. Predicted Solution Structures of Complexes of (a) α -CyD-Hexanol, (b) α -CyD-Octanol, (c) α -CyD-Phenol, (d) β -CyD-4-Methyl-2-Pentanol, (e) γ -CyD-Benzene, and (f) γ -CyD-Naphthalene, Where a Water Radius of 0.14 nm is Used.

Table 5. Maximum $\Delta S_{\text{So}}(\text{HG})$ Values at $r_w=0.10$ and 0.14 nm and Binding Constants for 11 CyD Inclusion Systems

Host	Guest	$\Delta S_{\text{So}}(\text{HG})(\text{nm}^2)$		$\Delta x(\text{nm})$		$\log K_1$	Ref
		0.10	0.14	0.10	0.14		
α -CyD	Methanol	0.865	1.046	0.25	0.31	-0.05	76
	Propanol	1.599	1.839	-0.20	-0.15	1.37	76
	Hexanol	2.393	2.651	— ^{a)}	— ^{a)}	2.94	71
	Octanol	2.613	2.962	— ^{a)}	— ^{a)}	3.80	70
	Phenol	1.701	1.868	— ^{a)}	— ^{a)}	1.57	72
β -CyD	4-methyl-2-pentanol	1.943	2.170	— ^{a)}	— ^{a)}	2.04	70
	Ethylene glycol	0.870	1.012	0.08	0.06	-0.15	73
	Glycerol	1.047	1.087	-0.18	-0.05	-0.30	73
	Benzyl alcohol	2.083	2.428	0.02	-0.01	2.33	74
γ -CyD	Benzene	1.358	2.235	— ^{a)}	— ^{a)}	1.08	75
	Naphthalene	2.296	2.805	— ^{a)}	— ^{a)}	2.11	76

^{a)} No crystal structure is available.

る $\Delta S_{\text{So}}(\text{HG})$ の最大値に対して結合定数の対数値をプロットしたのが Fig. 14 である (なお, $r_w=0.10$ nm). 結合定数の対数値は $\Delta S_{\text{So}}(\text{HG})$ の最大値と直線関係を示した.

$$\log K_1 = 1.074 \Delta S_{\text{So}}(\text{HG}) - 2.016 \quad (R=0.9741) \quad (39)$$

$r_w=0.14$ nm の場合, この相関は悪くなる.

$$\log K_1 = 1.803 \Delta S_{\text{So}}(\text{HG}) - 2.023 \quad (R=0.9087) \quad (40)$$

ここで注目すべきは, Fig. 14 で様々なゲスト (monohydroxy, dihydroxy 及び trihydroxy アルコール類と脂肪族及び芳香族化合物) 及び宿主 (α -CyD, β -CyD 及び γ -CyD) を含んでいることで

ある. この結果は他の CyD 包接系においても $\Delta S_{\text{So}}(\text{HG})$ の値から結合定数を予測できる可能性を示している.

4. おわりに

水接触可能表面積は分子表面に水和可能な水の量を表しているため, 水和によるエネルギー変化を見積もるのに有効な量であると言える. また, 分子構造の変化とも密接に関係がある. それゆえに, OB のコンフォメーションやレシチンの分子内会合⁷⁸⁾ など, 分子内の構造に関する問題をうまく説明できたと思われる. また, レシチン分子がその構造をほとんど変えずに親水基は親水基同士, 疎水基は疎水基同士整然と並んで集合するミセル形成では, モノ

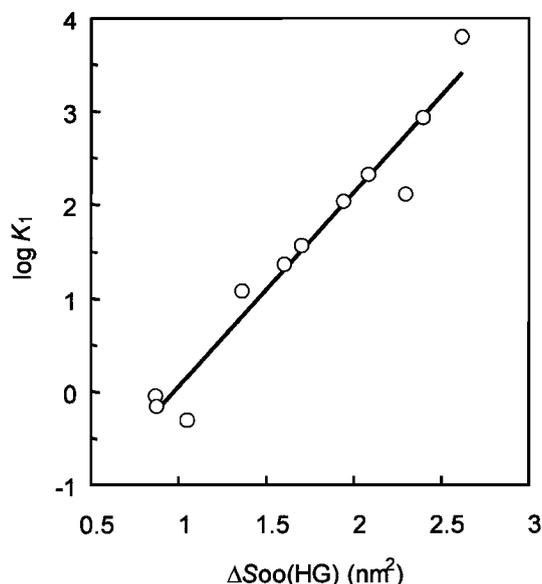


Fig. 14. Correlation between the Logarithm of the Binding Constant and $\Delta S_{oo}(HG)$ at $r_w=0.10$ nm (\square) for the 11 Host-Guest Systems Shown in Table 4. The Line Shows eq 39.

マーの分子表面積を用いることで、会合による水和量変化を見積り、その cmc を説明できた。⁷⁸⁾ 更に一般的な分子間会合であるホスト-ゲストの系については、水和量の変化を会合表面の性質ごとに分けて扱うことにより説明できた。⁷⁹⁾ 本研究では $\Delta S_{oo}(HG)$ の値のみに焦点を絞ったが、無視した他の ΔS の値についても安定構造と結合定数の決定に寄与する可能性がある。表面積と自由エネルギー変化との相関係数は表面張力や表面間張力などの物理的な解釈において意味を持ち、この相関係数の大きさは分子表面の性質による。例えば、芳香族炭化水素における相関係数は脂肪族炭化水素におけるそれより小さくなるであろう。¹⁾ この問題についてはいくつかの相関係数の組が示されている^{12,16,80,81)}が、更なる研究が必要である。また、水の半径はプロテインに対しては 0.14 nm が広く用いられ、^{6,8,12)} 低分子化合物に対しては 0.10 及び 0.15 nm が用いられている。^{1,3,4,27)} 0.10 nm は水素原子の半径に対応する。しかしながら、これらのうちどれが最も実測結果と対応するかは未だ定まっていない。

本研究における方法は他の CyD 包接系や蛋白質-リガンド系にも応用できる。分子間のドッキング問題における有効な説明は分子認識や材料科学及び薬剤開発などにおいて重要な意味を持つ。分子表面間応力のみを用いたモデルでは、特に大きな系において必要計算時間を大幅に削減できる。実際、このようなモデルは蛋白質の折り畳に関する研究⁶⁾において大きな成果をあげている。

謝辞 本研究は、京都薬科大学薬品物理化学教

室において行われたものであり、終始、ご指導、ご鞭撻を賜りました舟崎紀昭教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を推進するにあたりご協力いただきました根矢三郎助教授、プログラム開発に当たり多くの助言を頂きました故秦さかえ先生に深く感謝いたします。

REFERENCES

- Hermann R. B., *J. Phys. Chem.*, **76**, 2754-2759 (1972).
- Funasaki N., Hada S., Neya S., Machida K., *J. Colloid Interface Sci.*, **106**, 255-258 (1985).
- Funasaki N., Hada S., Neya S., Machida K., *J. Phys. Chem.*, **88**, 5786-5790 (1984).
- Funasaki N., Hada S., Neya S., *J. Phys. Chem.*, **89**, 3046-3049 (1985).
- Chothia C., *Nature*, **248**, 338-339 (1974).
- Eisenberg D., McLachlan A. D., *Nature*, **319**, 199-203 (1986).
- Ooi T., Oobatake M., Nemethy G., Scheraga H. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 3086-3090 (1987).
- Honig B., Sharp K., Yang A.-S., *J. Phys. Chem.*, **97**, 1101-1109 (1993).
- Wildnauer R., Canady W. J., *Biochemistry*, **5**, 2885-2892 (1966).
- Harris M. J., Higuchi T., Rytting J. M., *J. Phys. Chem.*, **77**, 2694-2703 (1973).
- Mayer B., Marconi G., Klein C., Koeler G., Wolschann P., *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, **29**, 79-93 (1997).
- Hawkins G. D., Cramer C. J., Truhlar D. G., *J. Phys. Chem.*, **101**, 7147-7157 (1997).
- Serrano L., Neira J.-L., Sancho J., Fersht A. R., *Nature*, **356**, 453-455 (1992).
- Doucet J.-P., Weber J., "Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications," Academic Press, London, 1996, Chapters 8, 13.
- Searle M. S., Williams D. H., Gerhard U., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10697-10704 (1992).
- Ajay, Murcko M. A., *J. Med. Chem.*, **38**, 4953-4967 (1995).
- Pearlman R. S., "In Physical and Chemical Properties of Drugs," ed by Yalkowsky S. H., Sinkula A. A., Valvani S. C., Marcel Dekker, New York, 1980, pp. 321-347.
- Simonson T., Bunger A. T., *J. Phys. Chem.*, **98**, 4683-4694 (1994).
- Funasaki N., Hada S., *J. Colloid Interface Sci.*, **64**, 454-460 (1978).
- Tanford C., "The Hydrophobic Effect," 2nd

- ed., John Wiley and Sons, New York, 1980, Chapters 2–11.
- 21) Funasaki N., Shim H.-S., Hada S., *J. Phys. Chem.*, **96**, 1998–2006 (1992).
 - 22) Tanford C., “The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes,” 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1980, Chapter 6.
 - 23) Langmuir I. M., *Colloid Symp. Monograph*, **3**, 48–75 (1925).
 - 24) Meyer A. Y., *J. Comput. Chem.*, **7**, 144–152 (1986).
 - 25) Meyer A. Y., *Chem. Soc. Rev.*, **15**, 449–474 (1986).
 - 26) Funasaki N., Hada S., *J. Med. Chem.*, **26**, 686–693 (1983).
 - 27) Funasaki N., Hada S., Neya S., *J. Chromatogr.*, **361**, 33–45 (1986).
 - 28) Funasaki N., Hada S., Neya S., *Anal. Chem.*, **65**, 1861–1867 (1993).
 - 29) Gavezzotti A., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 962–967 (1985).
 - 30) Hermann R. B., *QCPE Bull.*, **11**, 225 (1973).
 - 31) Connolly M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1118–1124 (1985).
 - 32) Smith H. G., QCPE 509.
 - 33) Perrot G., Cheng B., Gibson K. D., Vila J., Palmer K. A., Nayeem A., Maigret B., Scheraga H. A., *J. Comput. Chem.*, **13**, 1–11 (1992).
 - 34) Le Grand S. M., Merz K. M. Jr., *J. Comput. Chem.*, **14**, 349–352 (1993).
 - 35) Nagao T., *J. Assoc. Personal Comput. Chemists (Japan)*, **7**, 62–80 (1985).
 - 36) Tausk R. J. M., Karmiggelt J., Oudshoorn C., Overbeek J. Th. G., *Biophys. Chem.*, **1**, 175–183 (1974).
 - 37) Reynolds J. A., Tanford C., Stone W. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3796–3799 (1977).
 - 38) Smith R., Tanford C., *J. Mol. Biol.*, **67**, 75–83 (1972).
 - 39) Kramp W., Pieroni G., Pinkard R. N., Hanahan D. J., *Chem. Phys. Lipids*, **35**, 49–62 (1984).
 - 40) De Haas G. H., Bensen P. P. M., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 252–266 (1971).
 - 41) Bian J., Roberts M. F., *J. Phys. Chem.*, **95**, 2572–2577 (1991).
 - 42) Roholt O. A., Schlamowitz M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 364–379 (1961).
 - 43) Bensen P. P. M., de Haas G. H., Pieterse W. A., van Deenen L. L. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 364–382 (1972).
 - 44) Rekker R. F., “The Hydrophobic Fragmental Constant,” Elsevier, Amsterdam, 1977, p. 55.
 - 45) Bender M. L., Komiyama M., “Cyclodextrin Chemistry,” Springer-Verlag, Berlin, 1978, Chapters 2, 3.
 - 46) Szejtli J., “Cyclodextrin Technology,” Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1988, Chapters 2, 3.
 - 47) Saenger W., “In Inclusion Compounds,” ed by Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., Oxford University Press, Oxford, 1984, Vol. 2, Chapter 8.
 - 48) Harata K., “In Inclusion Compounds,” ed by Atwood J. L., Davies J. E. D., MacNicol D. D., Oxford University Press, Oxford, 1991, Vol. 5, Chapter 9.
 - 49) Connors K. A., *Chem. Rev.*, **97**, 1325–1357 (1997).
 - 50) Connors K. A., *J. Pharm. Sci.*, **85**, 796–802 (1996).
 - 51) Seddon J. M., “In Phospholipids Handbook,” ed by Cevc G., Marcel Dekker, New York, 1993, p. 909.
 - 52) Hauser H., Pascher I., Pearson R. H., Sundell S., *Biochim. Biophys. Acta*, **650**, 21–51 (1981).
 - 53) Hauser H., Pascher I., Sundell S., *Biochemistry*, **27**, 9166–9174 (1988).
 - 54) Pascher I., Pearson R. H., *Nature*, **281**, 499–501 (1979).
 - 55) Guo W., Li Z., Fung B. M., O’Rear E. A., Harwell J. H., *J. Phys. Chem.*, **96**, 6738–6742 (1992).
 - 56) Marsh D., King M. D., *Chem. Phys. Lipids*, **42**, 271–277 (1986).
 - 57) Bondi A., *J. Phys. Chem.*, **68**, 441–451 (1964).
 - 58) Braquet P., Touqui L., Shen T. Y., Vargaftig B. B., *Pharmacol. Rev.*, **39**, 97–145 (1987).
 - 59) Insight II version 98, San Diego, Biosym Technologies, 1998.
 - 60) Funasaki N., Kawaguchi R., Hada S., Neya S., *J. Pharm. Sci.*, **88**, 759–762 (1999).
 - 61) Funasaki N., Kawaguchi R., Ishikawa S., Hada S., Neya S., Katsu T., *Anal. Chem.*, **71**, 1733–1736 (1999).
 - 62) Matsui Y., Tokunaga S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 2477–2480 (1996).
 - 63) Hingerty B., Saenger W., *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3357–3365 (1976).
 - 64) Saenger W., McMullan R. K., Fayos J., Mootz D., *Acta Crystallogr.*, **B30**, 2019–2028 (1974).

- 65) Gessler K., Steiner T., Koellner G., Saenger W., *Carbohydr. Res.*, **249**, 327–344 (1993).
- 66) Hirata K., Uekama K., Otagiri M., Hirayama F., Ohtani Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **58**, 1234–1238 (1985).
- 67) Mentzafos D., Mavridis I. M., Tsoucaris G. G., *Acta Crystallogr.*, **B47**, 746–757 (1991).
- 68) Lindner K., Saenger W., *Carbohydr. Res.*, **99**, 103–115 (1982).
- 69) Harata K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 2763–2767 (1987).
- 70) Matsui Y., Mochida K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 2808–2814 (1979).
- 71) Rekharsky M. V., Schwartz F. P., Tewari Y., Goldberg R. N., Tanaka M., Yamashoji Y., *J. Phys. Chem.*, **98**, 4098–4103 (1994).
- 72) Bertrand G. L., Faulkner J. R. Jr., Han S. M., Armstrong D. W., *J. Phys. Chem.*, **93**, 6863–6867 (1989).
- 73) Buvári A., Szejtli J., Barcza L., *J. Inclusion Phenom.*, **1**, 151–157 (1983).
- 74) Rymden M., Carlfors J., Stilbs P., *J. Inclusion Phenom.*, **1**, 159–167 (1983).
- 75) Tucker E. E., Christian S. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1942–1945 (1984).
- 76) Fujiki M., Deguchi T., Sanemasa I., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 1163–1167 (1988).
- 77) Funasaki N., Yodo H., Hada S., Neya S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 1323–1330 (1992) and references cited therein.
- 78) Ishikawa S., Hada S., Funasaki N., *J. Phys. Chem.*, **99**, 11508–11514 (1995).
- 79) Ishikawa S., Hada S., Neya S., Funasaki N., *J. Phys. Chem. B*, **103**, 1208–1215 (1999).
- 80) Wesson L., Eisenberg D., *Protein Sci.*, **1**, 227–235 (1992).
- 81) Sitkoff D., Sharp K. A., Honig B., *J. Phys. Chem.*, **98**, 1978–1988 (1994).