

論文の内容の要旨

論文題目 分子動力学法を用いた生体分子のシミュレーション

氏名 小田切 庸正

はじめに

ヒト・ゲノムプロジェクトによる人の遺伝情報の解明は終わりを迎えつつあり、注目すべき対象が遺伝情報そのものから遺伝情報から作られるタンパク質の機能へと移ってきている。タンパク質を含めた生体分子の機能発現や反応機構を分子/原子レベルで詳細に調べることは今後の研究課題である。これまで生体分子の構造や活性部位の情報は主に NMR や X 線構造解析などの実験で、機能は分子生物学での研究により得られてきたが、生体中でおこる分子の動的特性を原子レベルまで掘り下げて調べることには限界があった。

この動特性を実験的に調べることは現状では非常に難しい。幸いにも近年、コンピュータの計算性能が急速に向上したことで、生体分子のシミュレーションにより分子の動特性が解析できるようになってきた。すなわち、生体分子のような大きな系に対して分子動力学(MD)法を用いた計算手法を適用できるようになってきた。本研究では、生体分子に特化した分子動力学プログラム AMBER[1]を用いて研究を行った。

本研究の目的

MD シミュレーションで生体分子の動的性質を解析し、分子の機能に関わる情報を得ることを目的とする。はじめに、近年のコンピュータ性能の向上により高速計算が可能となってきたことから、(1)タンパク質を用いた MD シミュレーションを行うことで、計算時間の短縮のための近似計算に関してその効果と精度に関する調査を行った。

次に、DNA の湾曲には塩基配列に特有なものがあるという議論に注目した。(2) その中でもアデニンの連続部(A-tract)に関する DNA の湾曲についての実験結果に注目し、MD シミュレーションによる結果の解析との比較を行った。

最も大きな関心を寄せている課題に、放射線による DNA 障害の修復過程解明に MD シミュレーションが適用できるかどうかがある。(3)すなわち適用を行うためにいかなる方法があるかなどを検討することを目的とした。ここでは、DNA の二重らせんの一方が切断された損傷(single strand break)を持つ DNA の MD シミュレーションについて研究を行った。

1 MD シミュレーションにおける近似計算法の効果

1-1.目的

i) SHAKE 法の効果

生体分子の MD シミュレーションでは、高周波数で動く結合距離や結合角を拘束することで運動方程式の時間刻み(Time Step)を長くとり、計算コストの削減を行う SHAKE 法(2)がよく用いられる。SHAKE 法による分子運動に与える影響は少ないとされているが、近似計算であるためその精度を確認する必要がある。計算機の能力が向上していることで長い時間間隔の MD シミュレーションが短時間で可能になってきたため、MD シミュレーションに対する SHAKE 法の効果を再度確認した。

ii) PME 法の効果

クーロン力などの長距離力を計算するために、計算対象の原子から一定距離以内にある原子だけを計算の考慮に入れる cutoff 法が使用されることがあるが、定めた距離以遠にある原子との相互作用を無視したため結果の再現性に問題があった。そこで、cutoff 距離以遠の長距離力成分の近似と計算速度を上げた Particle Mesh Ewald(PME)法[3]が提案され、周期的境界条件とともに近似の向上がはかられた。しかし、水溶液中における生体分子の MD シミュレーションの場合、周期的境界条件によって作られる自分自身の虚像 box が実像 box に対し強く影響するといわれている。これは自分と同じものが周囲に高濃度に存在する状態であり、

生体中と異なる構造の揺らぎが懸念される。そこで、タンパク質周囲の水分子の量を変化させることでその影響について調べた。

1-2 方法

i) Shake 法の効果

タンパク質の大きさに依存する可能性があるため、小さい psv (designed small protein, 図 1A)と中程度の Hpr (Histidine containing phosphocarrier protein, 図 1B)を用いた。MD シミュレーションでは、cutoff 法と PME 法を用いる区別に加え、

SHAKE_{all}: 全ての原子間距離を拘束

SHAKE_H: 水素原子を含む結合のみを拘束

の区別を行った。計算条件の概略を表 1 に示す。SCUT、SPME はそれぞれ cutoff 法または PME 法を適用した MD シミュレーションである。8 つの MD シミュレーションは温度が 300K、周期的境界条件下で 2[ns]のシミュレーションを行った。

ii) PME 法の効果

ここでは psv を用いた。psv を構成するどの原子からも Box の端までの距離 (Lmin)が最低 8,10,15[Å]離れている 3 種類の Box を初期構造とした。その 3 種類の初期構造に対して cutoff 法、PME 法を適用した計 6 種類のシミュレーションを、300 K の温度でそれぞれ 2[ns]のシミュレーションを行った。計算条件の概略を表 1 に示す。

1-3 計算結果

i) Shake 法の効果

8 つのシミュレーションにおいて、タンパク質を構成する原子位置の初期構造からの Root mean square deviation(RMSD)を比較しても SHAKE の有無による差は見いだせなかった。そこで、シミュレーションの最後の 500[ps]の構造に関して、平均構造の原子位置からの揺らぎを表す Root mean square fluctuations (RMSF)を用いて構造の揺らぎを求めた。図 2 は HPr の RMSF のグラフで、黒の太線 : SPME with SHAKE_H、灰色の太線 : SPME with SHAKE_{all}、黒の細線 : SCUT with SHAKE_H、灰色の細線 :

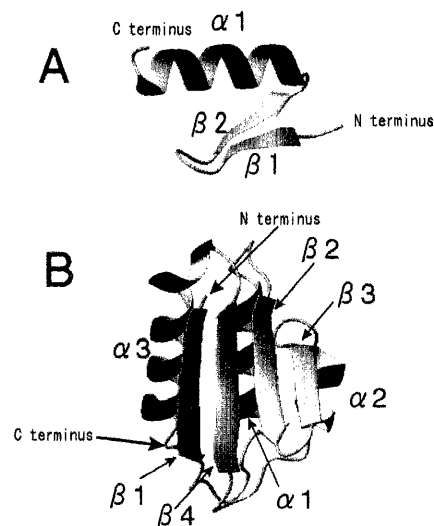


図 1 psv と Hpr の構造のリボン表示

SCUT with SHAKE_{all}、黒く太い破線:は X 線構造解析の温度因子から求められてい

るものを比較に用いた。その結果、PME法を用いて SHAKE_H を適用したものがより実験結果と合っていることがわかった。

(ii) PME法の効果

Lminを変えた6種類のシミュレーションのそれぞれからタンパク質を構成する原子同士のエネルギーを求めた。その中でも van der Waals エネルギーの変化は特徴的であり、Lmin が長くなるにつれて双方が収束するように見える(図3)。このことから、cutoff法を用いた

場合には計算を考慮する水の分子数が増えるほどタンパク質の構造が固くなり、PME法の場合は box が大きくなるほどイメージ box からの影響が少なくなりタンパク質の構造が堅くなるようである。また、PME法を用いた Lmin=8, 10, 15Å のシミュレーションで後半のタンパク質の平均構造をとった場合、Lmin=8Å では構造が変化したため不十分であることがわかった。

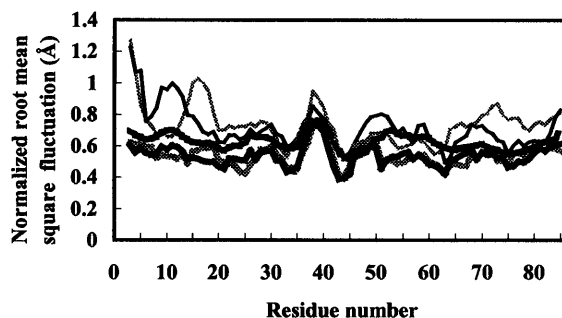


図 2: HPr の RMSF 値

Protein		Bond constraint	Lmin (Å) [§]	Box size (Å ³)
SCUT	psv	SHAKE_{all}^*	10	52 x 44 x 42
		$\text{SHAKE}_H^\#$		
	HPr	SHAKE_{all}	10	59 x 51 x 51
		SHAKE_H		
SPME	psv	SHAKE_{all}	10	52 x 44 x 42
		SHAKE_H		
	HPr	SHAKE_{all}	10	59 x 51 x 51
		SHAKE_H		
BCUT8		SHAKE_H	8	48 x 40 x 37
BCUT BCUT10	psv	SHAKE_H	10	52 x 44 x 42
BCUT15		SHAKE_H	15	62 x 54 x 51
BPME8		SHAKE_H	8	48 x 40 x 37
BPME BPME10	psv	SHAKE_H	10	52 x 44 x 42
BPME15		SHAKE_H	15	62 x 54 x 51

表 1: 計算条件

1-4 結論

このような MD シミュレーションの解析の結果、タンパク質のシミュレーションには、PME 法を用い、水素を含む原子の結合長のみを固定し、より大きな box を用いることが望ましいという事がわかった。

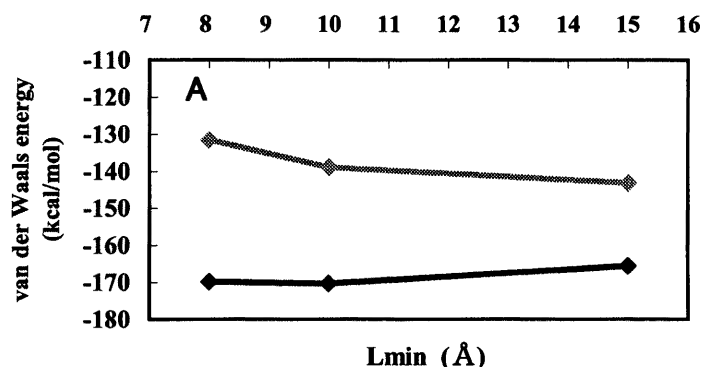


図 3 : Lmin の変化に対する van der Waals エネルギー (灰色:BCUT, 黒:BPME)

2) A-tract を含む DNA

2-1 背景

DNA の構造や特徴は DNA を構成する塩基配列に依存するものがある。その中でも、アデニン(A)の連続部である A-tract はタンパク質などが結合しやすい部分であり、配列によって特徴的な湾曲を示すことが実験で示されている。その一つとして、P.J.Hagerman らの行った実験[4]に注目した。Hagerman らは、

(i) octamer : [GAAATTC]_N

(ii) decamer : [GGAAATTC]_N (N=1,2,3...)

(iii) dodecamer : [GGGAAATTC]_N

という中心に A-tract をもつ DNA を用い、それぞれを繰り返し単位として N(1,2,3,...)個結合させたものに対して電気泳動実験を行った。その結果、10 量体の DNA のみが 50 塩基対以上(N>50)になった時に湾曲するという解釈であった。50 塩基対以下では 3 種類の DNA は直線であるとの解釈であった。そこで本研究では、この結果の解釈を確認するために、次の様な中心に Hagerman らが示した A-tract を含む 3 種類の 16 塩基対の DNA に対して MD シミュレーションを行った。(1) TTTCGAAATTCGAAA, (2) TCCGGAAATTCGGA, (3) CCGGAAATTCGG

2-2 方法

計算は粒子数(N)、水と DNA を入れる箱にかかる圧力(P)、温度(T=300K)のそれぞれが一定の MD シミュレーションを 1[ns]の時間について行った。計算条件はそれぞれの通りである。(1)DNA(1018)、カウンターイオン(NA+)(30)、水分子(3517)、(2) DNA(1016)、カウンターイオン(NA+)(30)、水分子(3526)、(3) DNA(1012)、カウンターイオン(NA+)(30)、水分子(3529)である。

2-3 結果と考察

それぞれのシミュレーションにおいて、DNA を構成する原子の位置の初期構造からの Root Mean Square Deviation (RMSD)の経時変化は、およそ 700[ps]以降で平衡化した。そこで、(1),(2),(3)のシミュレーションの 700[ps]~1.0[ns]区間について解析を行った。

(1) 平均構造から A-tract を含む繰り返し単位の共通部分(GAAATTC)のらせん軸を求めた。その軸の端点間の距離(End to End length)、およびその軸に沿った長さ(Path length)の比を取り、湾曲の割合について調べた所、それぞれの A-tract 部分にわずかに湾曲があることが確かめられ、他の実験やシミュレーションで言及されている特徴は再現できていた。DNA の構造をらせん上部および横より見たものを図 4 に示す。左から octamer, Decamer, dodecamer である。

次に、3種類の DNA の、それぞれのくり返し単位の平均構造を結合して、仮想的に長い DNA を構築した。その結果、Hagerman らが実験結果を基に Decamer の連続体で起こると仮定していた弓形の構造が、MD シミュレーションの結果からは dodecamer で起こった(図 5)。DNA の構造について詳細に調べた結果、DNA の構造全体にわたり、塩基対間のパラメータが X線結晶構造解析などで得られた結果と異なっていることがわかった。また、DNA の電荷を中和するための Na^+ は、数十 ps で DNA から大きく離れてゆくことがわかった。これらの結果、特に塩基対間のねじれの角度が小さくなっていることの原因は、DNA 周囲の Na^+ の影響つまり、塩濃度が原因であろうと考えられる。

それ故、電気泳動などの実験で得られた DNA の構造情報をそのまま生体中の構造に適用するには注意が必要であることがわかる。

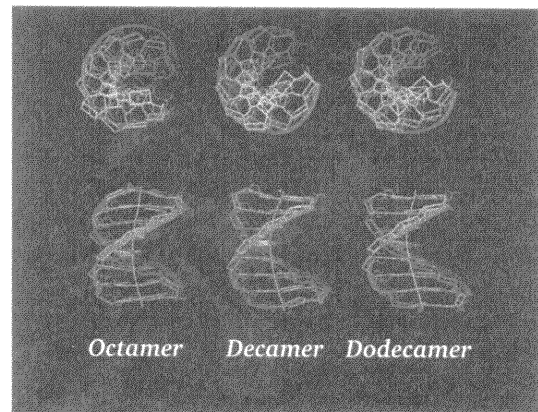


図 4 : A-tract 部分の DNA の構造とらせん軸の表示

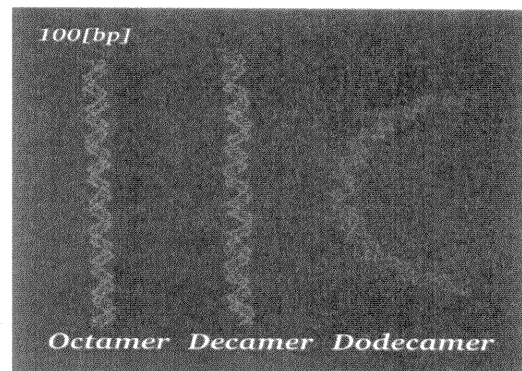


図 5 : 100 塩基対まで結合させた DNA の構造

3) 鎖切断を含む DNA の分子動力学シミュレーション

DNA の放射線による障害に関するシミュレーションには、これまで放射線の飛跡シミュレーションが主に使われてきた。飛跡構造シミュレーションによるラジカルの空間分布に DNA 構造を重ね合わせることで、DNA の鎖切断の収量などが推定されるようになったが、飛跡構造シミュレーションによって示されたことは、DNA 損傷の多様性と非特異性である。そこで、次の問題は放射線損傷のある DNA の生体中における形態と、その修復過程に関心が移行しつつあるため、まず障害を持つ DNA について MD シミュレーションの適用を試みた。

MD シミュレーションには塩基配列が TCGCGTTGCGCT である DNA を使用し、中央部のチミン(T)の連続部の中間に一つの鎖切断(Single strand break : SSB)があると仮定した。AMBER では次式で Force field を計算する。左から順番に原子間の結合の伸縮、結合角の曲がり、4 つの原子で作る二面角、van der Waals、静電相互作用のエネルギーである。

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

当初は切断した部分には AMBER の持つデータベースの force field パラメータをそのまま適用していた。その結果 DNA の構造が壊れたがその壊れかたに再現性がみられなかったため、生涯が起きた部分の force field パラメータの不正確性を疑った。そこで、非経験的分子軌道法などを用いて新たにパラメータを見積もったところ、角度の force field パラメータである K_θ が大きく異なることがわかった。そこで新たな force field パラメータを用いてシミュレーションを行ったところ、1 ns のシミュレーションでも構造が安定し、さらに鎖切断のある塩基対間の距離が通常より狭くなるなどの変化がみられた。

4) まとめ

本研究により、まずタンパク質の MD シミュレーションに対する最適化条件を求めた。この条件は DNA の MD シミュレーションに対しても有用である。また、2 種類の DNA のシミュレーションにより、DNA の特徴的な構造が原子レベルで再現できる事が確認でき、今後、障害を持つ DNA とその修復酵素を含む複合系というさらに複雑な生体反応機構に応用できると思われる。

参考文献

- [1] Case, D. A., D. A. Pearlman, J. W. Caldwell, T. E. Cheatham III, W. S. Ross, C. L. Simmerling, T. A. Darden, K. M. Merz, R. V. Stanton, A. L. Cheng, J. J. Vincent, M. Crowley, D. M. Ferguson, R. J. Radmer, G. L. Seibel, U. C. Shingh, P. K. Weiner, and P. A. Kollman. 1997. AMBER5. University of California, San Francisco.
- [2] Ryckaert, J. P., G. Ciccotti, and H. J. C. Berendsen. *J. Comput. Phys.* 23,327(1977)
- [3] Darden, T., D. York, and L. Pedersen.. *J. Chem. Phys.* 98, 10089(1993)
- [4] Hagerman, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4632(1984)