

## 論文の内容の要旨

論文題目      核酸および核酸タンパク質複合体の  
                   ダイナミクス解析に関する研究

氏名            中村 周 吾

核酸分子については、塩基配列ベースの研究が主に行われており、そのコンピュータ・シミュレーションによる解析は、タンパク質に比べると研究例が少ないのが実情である。しかし核酸分子の立体構造やダイナミクスが機能を果たす上で重要な役割を担っていることは数多く報告されている。一方で、コンピュータの高速化と並列計算技術の進歩により、大規模な計算を行うことが可能となり、より現実に近い系でのシミュレーションができるようになってきている。

そこで本研究では、核酸および核酸タンパク質複合体を対象として、シミュレーションに必要な並列計算アルゴリズムを開発し、それをを用いて構築した解析システムを用いて、構造モデリングと自由エネルギー解析およびダイナミクス解析を行うことを目的とする。

まず、並列計算技術を用いた生体分子の構造モデリング・ダイナミクス解析システムを構築した。このシステムは、生体分子の立体構造を二面角系で扱い、配座エネルギーとその1次・2次微分、一般化固有値問題などの行列演算、基準振動モード解析などの並列計算アルゴリズムを実装している。これを用いることで、大規模分子の構造モデリングやダイナミクス解析を高速に行うことが可能となった。

またその際必要となる要素技術として、二面角系 Hessian 行列の並列計算アルゴリズムを開発した。Hessian は生体分子のエネルギー関数の2次微分行列のことであり、エネルギー関数の形状情報を与える重要な量である。しかし Hessian の計算には大きな計算コストがかかるため、とくに大規模な分子の計算では高速解法が必要である。そこで筆者らは、「Unify 方式」と呼ばれる Hessian の並列計算アルゴリズムを新たに開発した [1]。このアルゴリズムを用いることで、Hessian 計算およびアルゴリズム内に Hessian 計算を含むニュートン・ラフソン法によるエネルギー極小化計算において6～12倍程度の並列化効率を達成することができた。

また Unify 方式では、とくに小さい系において、プロセッサ数の増加に伴って通信コストが原因で性能低下がみられるケースがあることがわかった。そこで、これを改良した「サブタスク

ループ方式」を開発した。これは Hessian 計算を複数の部分問題 (サブタスク) に分割し、サブタスク間の依存関係を解析することで通信量を必要最小限に抑えるものである。さらに遺伝的アルゴリズムを用いて、プロセッサの負荷分散と通信量の低減を同時に達成できるように、サブタスクのプロセッサ割り当てを最適化する。このサブタスクグループ方式を tRNA 分子の Hessian 計算に適用したところ、プロセッサ数 60 で 32.6 倍の並列化効率を達成し、Unify 方式からさらに大きく性能を改善することができた (図 1)。

次にこのシステムを用いて、核酸ミニヘアピン分子の熱安定性解析、核酸タンパク質複合体の基準振動モード解析を行った。DNA ミニヘアピン分子 dGC(GAA)GC は高い熱安定性を示すことが知られており、ループ部の塩基をシステムティックに置換した生化学実験から、3 番目と 5 番目の塩基がそれぞれ G, A であることが高い熱安定性の必要十分条件であることが明らかになっている。そこで、高い熱安定性を示す配列とそうでない配列を与えたときに、モデリングした構造の相違およびループ部塩基の相互作用の解析によって両者を区別できるかどうかを検証した。

この DNA ミニヘアピン分子の立体構造は、ループ部が GAA のものが NMR で解かれている。そこで、まずループ部配列が GAA, GGA, GCA, GTA, GAG, GAC の 6 つについて、筆者らが開発した「Two-Stage 法」で構造モデリングを行った [2]。この方法はエネルギー最小化をベースにしており、塩基対を作る塩基などの事前知識なしに構造モデリングを行うことが可能であるという特長をもつ。Two-Stage 法によって得られた GAA のモデリング構造は、NMR 構造に極めて近く、Two-Stage 法の有効性を確認できた (図 2)。また高い熱安定性を示す GGA, GCA, GTA についても、NMR 解析結果と矛盾しないモデリング構造を構築することができた。一方、高い熱安定性を示さない GAG, GAC についても、モデリング構造はヘアピン構造となった。またループ部の塩基間相互作用を解析したところ、熱安定なヘアピンを形成する配列とそうでない配列との間に大きな差はみられなかった [3]。このことは、これらの分子の熱安定性の理解には、エネルギーだけでなく、エントロピーの効果も考慮することが必要であることを示唆する。

そこで、ループ部配列が GAA と GAG のものについて、筆者と同じ研究グループの Tazaki らが開発した「Poisson-Boltzmann 分子動力学法」を用いて、多数の構造サンプリングを行い、得られたデータを Weighted Histogram Analysis Method (WHAM) で統合して、ヘアピン形成自由エネルギープロファイルを求めた (図 3)。反応座標は分子の両端にあたる G<sub>1</sub> の H1 と C<sub>7</sub> の N3 の間の距離に設定する。その結果、安定なヘアピンを形成する GAA では、ヘアピン構造付近が自由エネルギーの谷となり (図 3A)、ヘアピンが open 構造に近づくにしたがって自由エネルギーは増加した。一方 GAG では、ヘアピン構造付近に自由エネルギーの谷はあるものの、ヘアピンが崩れた構造付近に自由エネルギーのより深い谷が存在していた (図 3B)。従来の自由エネルギー

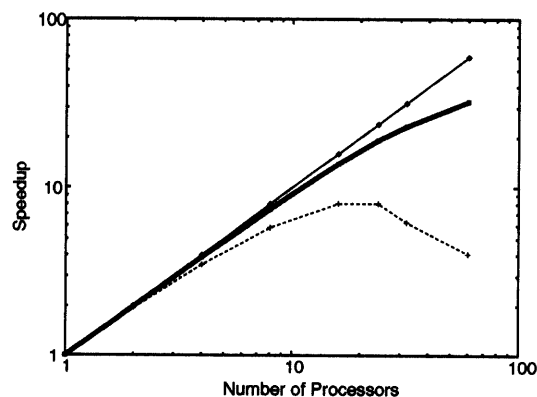


図 1 サブタスクグループ方式による tRNA<sup>Gln</sup> の Hessian 計算時間の並列化効率。(細実線) 理想直線。(破線) Unify 方式。(太実線) サブタスクグループ方式。

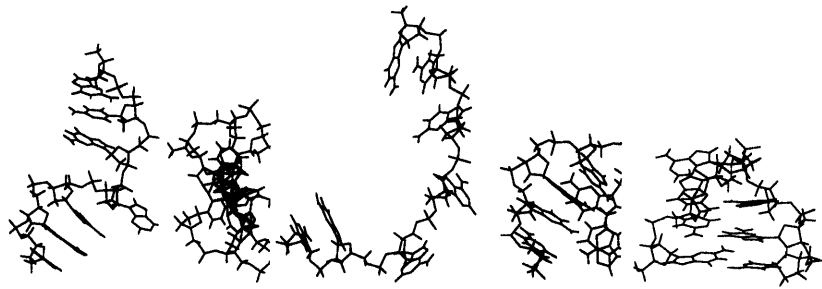


図 2 dGC(GAA)GC の Two-Stage 法による構造モデリングの過程. 左端: 初期構造. 右端: 最終構造.

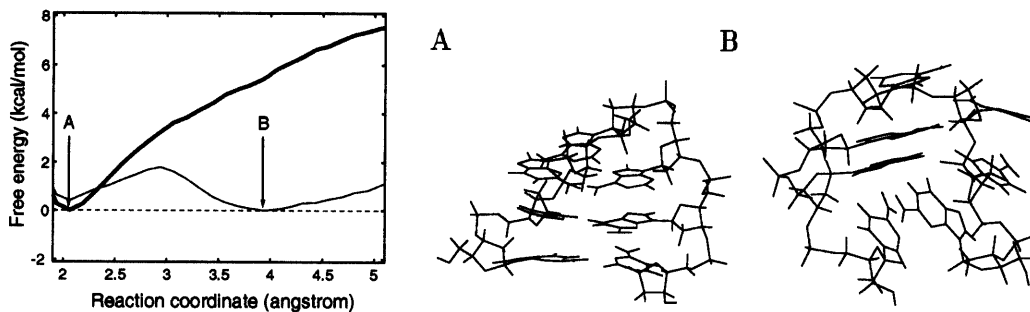


図 3 WHAM により求められた自由エネルギープロファイルと自由エネルギーの谷付近でサンプリングされた構造の例. 左図で, 太線は dGC(GAA)GC, 細線は dGC(GAG)GC.

計算では安定な構造 (今の場合はヘアピン構造) 同士の自由エネルギー差をみるのがほとんどであったが, 本研究では, 対象とした DNA ミニヘアピン分子においては, 分子動力学計算を用いた自由エネルギー解析によって求めたヘアピン形成自由エネルギープロファイルを直接比較することで熱安定性の配列依存性を議論できることを明らかにした.

アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) は似たような立体構造をもつ多数のトランスファー RNA (tRNA) の中から, 自分が担当する種類のものだけを非常に正確に認識し, アミノ酸を付加することができる. tRNA の ARS との接触面から離れた部位を置換した場合もアミノアシル化効率や ARS との結合定数に影響をおよぼすことが明らかになっており, この分子認識に tRNA のダイナミクスが関与している可能性が指摘されている. そこで, この分子認識機構の中でダイナミクスの果たしている役割を理解するための手がかりとして, ダイナミクス解析手法である基準振動モード解析をフリー状態の tRNA, ARS および tRNA-ARS 複合体に適用して, フリー状態と複合体形成状態のダイナミクスの違いを解析した.

基準振動モード解析によって求めた各原子の熱ゆらぎの大きさは, X 線結晶解析から得られる温度因子データと高い相関を示し, 本研究による解析の妥当性を示した. フリー状態の tRNA のダイナミクス解析では, tRNA 分子が球状タンパク質の  $1/4 \sim 1/10$  の低いモード周波数でゆっくりとした大きな運動をしていることが明らかになった [4,5].

また, tRNA<sup>Gln</sup>-GlnRS 複合体について, フリー状態のモード運動と複合体状態のモード運動の詳細な解析を試みた. 複合体形成によって, 両分子が接触している広い範囲で原子の熱ゆらぎの大きな減少がみられた. 低周波数領域では, tRNA<sup>Gln</sup> のアクセプタシステム, アンチコドンアーム, 中央部分の各領域と, GlnRS の触媒ドメイン, アンチコドン認識ドメインなどの各ドメインが, カップリングして大きく協調的に運動していた (図 4).

複合体状態とフリー状態でのモード運動を相互に比較すると (図 5), GlnRS は複合体形成によっ

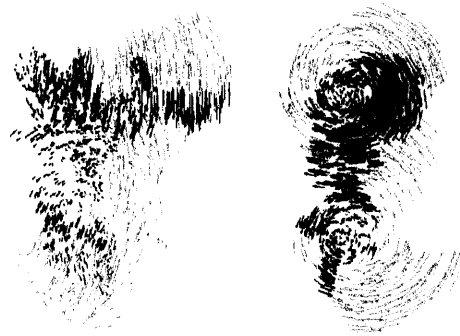


図 4 グルタミニル tRNA-ARS 複合体の最低周波数モードにおける各原子の運動. 右の図は, 左の図を紙面に向かって左側の方向から見たもの. tRNA<sup>Gln</sup> を黒い矢印で, GlnRS をグレーの矢印で表示している. 見やすいように運動のサイズは 5 倍に拡大している.

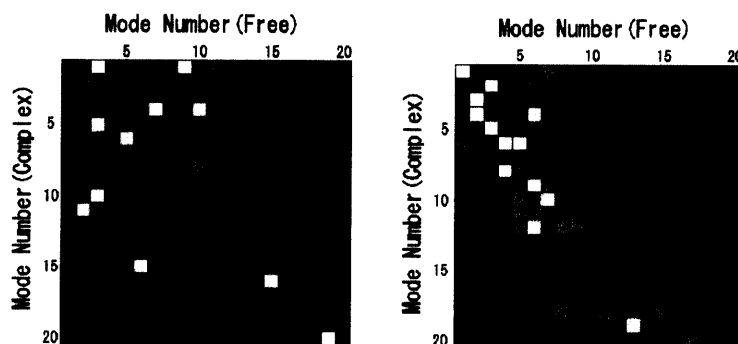


図 5 グルタミニル tRNA-ARS の複合体状態 (縦軸) とフリー状態 (横軸) のモード運動の類似性解析. 類似性が高いほど白く色づけがしてある. (左) tRNA<sup>Gln</sup>. (右) GlnRS.

ても低周波数領域でのモード運動の保存性が高く, 複合体形成によってそのダイナミクスは大きな影響を受けていないことがわかった. tRNA<sup>Gln</sup> では, フリー状態のダイナミクスに, いくつかの複合体状態のモード運動が内在していることが明らかになった. また, 複合体状態とフリー状態に対応するモードの周波数の大小関係は保存しておらず, tRNA<sup>Gln</sup> のダイナミクスは複合体形成によって大きな影響を受けていた.

本研究をさらにすすめて, 多数のアミノ酸系について同様の解析を行い, その結果を比較することで, これまで両分子の接触部位周辺の静的な解析が中心だった tRNA-ARS の分子認識メカニズムの解析に, ダイナミクスの観点からの新たな知見をもたらす可能性があると思われる.

さらに, 本研究で開発したシステムや並列計算アルゴリズムは汎用的な利用が可能であり, 本研究で扱った分子以外の核酸や核酸タンパク質複合体などを対象とした幅広い応用が期待される.

#### 参考文献

- [1] S. Nakamura, M. Ikeguchi, K. Shimizu (1998) *J. Comput. Chem.*, *19*, 1716–1723.
- [2] S. Nakamura, H. Hirose, M. Ikeguchi, J. Doi (1995) *J. Phys. Chem.*, *99*, 8374–8378.
- [3] S. Nakamura, H. Hirose, M. Ikeguchi, K. Shimizu (1999) *Chem. Phys. Lett.*, *308*, 267–273.
- [4] S. Nakamura, J. Doi (1993) *Comput. Aided Innovation of New Materials II*, 1203–1206.
- [5] S. Nakamura, J. Doi (1994) *Nuc. Acids Res.*, *22*, 514–521.