

## 論文内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成 16 年度博士課程 進学  
氏名 山崎 智  
指導教員名 清水 謙多郎

## 論文題目

分子動力学シミュレーションを用いた  
DNA ミニヘアピン分子の折れ畳み及び熱安定性の解析

### 1. 序

核酸は生体内で様々な構造を取り、遺伝子の複製、転写、調節などに関わっていると考えられる。そのような核酸の構造の中で最も基本的なものの一つに核酸ヘアピン構造がある。核酸ヘアピン構造は、二本鎖のステム領域と、3~5ヌクレオチド長ほどの一本鎖のループ領域からなる構造である。このようなヘアピン構造は、RNAではより高次の立体構造を構成する基本的な要素の一つとして様々な分子に見られ、そのフォールディング過程や、タンパク質との相互作用に深く関わっていると考えられている。また、ヘアピン構造はDNAにおいてもしばしば観察されており、とりわけ複製開始点やプロモーター領域付近に、安定なヘアピン構造をとる配列が存在する事が様々な生物種において明らかになっている。これらのヘアピン構造は、DNAの複製・転写などの際に核酸結合タンパク質が認識し結合する部位であると考えられている。このヘアピン構造の安定性を左右する要因として、ステム領域の長さ・配列組成などが挙げられるが、それだけでは無く、ループ領域の配列によってもその安定性に大きな差が現れる事が知られている。このようなヘアピン構造の中で、配列長が短くかつ安定性の高いものは特にミニヘアピン構造と呼ばれている。

このDNAミニヘアピン構造を切り出したような短いDNA断片はDNAミニヘアピン分子と呼ばれている。DNAミニヘアピン分子は、溶液中で同様のヘアピン構造をとり、やはりステム領域の長さ・配列組成だけでなく、ループ領域の配列によってもその安定性に差

が現れる。このように DNA ミニヘアピン分子は、DNA ヘアピン構造の構造的・熱力学的性質を非常によく現す小分子であるので、ヘアピン構造、ひいては核酸全般に関する構造的・熱力学的性質を知るための系として広く研究されている。DNA ミニヘアピン分子のうち、単体で構造をとる最小のものは、2塩基対のステムと3ヌクレオチド長のループから成る分子である。Yohizawa らによる dGC(NNN)GC 分子の網羅的解析によると、ループ部分の配列が GNA のものは他のものに比べて熱安定性が高く、その中でも GAA は特に熱安定性が高い、という事実が知られている。

本研究では、この安定な DNA ミニヘアピン分子 dGC(GNA)GC に特に着目し、分子動力学法に基づく種々の手法を用いて、この分子の熱力学的特性、また折れ畳み過程を明らかにする事を試みた。

## 2. 拡張アンサンブル法を用いた dGC(GAA)GC 分子のシミュレーション

任意の温度における正しい構造分布が得られれば、その自由エネルギー地形から熱力学的特性、折れ畳み過程等様々な知見が得られる。その目的で、まず本研究では dGC(GAA)GC 分子に対して、レプリカ交換法及びマルチカノニカル法を用いた分子動力学シミュレーションを試みた。伸長構造からシミュレーションを開始して、長時間にわたるサンプリングを行ったものの、所々で局所構造にトラップされてしまい、十分に正確な構造分布は得られなかった。そのシミュレーションの中で、一度だけ天然構造に非常に近い構造が得られたため、その構造に至るまでの過程を解析したところ、まず全体が球状に丸まったのちに、ループ領域の G3·A5 がペアを作り、その後ステム領域が正しくペアを作っていく、という過程が見られた。Sorin らは、核酸ミニヘアピン分子の折れ畳み過程について、ループ領域側から構造が形成されていく **zipping** と、ステム領域側から構造が形成されていく **compaction** の2つの過程を挙げており、本研究で見られた過程はこの **zipping** 過程に近いものであると考えられる。

## 3. Locally Enhanced Sampling 法を用いた dGC(GNA)GC 分子の解析

拡張アンサンブル法を用いたシミュレーション結果では、伸長構造から天然構造に至ったもの以外に、ステム領域は天然構造と同じく正しいペアを作っているが、ループ領域は全く正しくない、といった構造もいくつか観察出来た。このような構造は、前述した **compaction** 過程の中間構造ではないかとも考えられる。このようなステム側から安定した構造を形成していく過程を追うために、ループ領域のサンプリングに非常に有効である **Locally Enhanced Sampling (LES)** 法を用いて、更なるサンプリングを行った。GNA ヘアピン分子の中で唯一構造既知である dGC(GAA)GC 分子については、NMR 構造に非常に近い構造 (全原子 RMSD 1.49 Å) が得られた。ヘアピン分子単体として実験的に構造が解かれていないその他3種の dGC(GNA)GC 分子についても、GAA ヘアピン分子の構造を元に作成したモデル構造を用いて、同様の LES 法を用いたシミュレーションを行ったところ、

GAA と同様の “side by side Ganti·Aanti pair” を持ったヘアピン構造が得られた。これらの分子の巻き戻り過程を詳細に解析した結果、正しく巻き戻った系のうち大多数で、A5、G3、N4 の順に正しい位置に配置するという、非常に類似した過程を経由して天然構造に至っている事が分かった。このように巻き戻りの経路が限られる理由に関して、単純なトポロジーによる制約も考えられる。また、N4 の塩基部分が wide-groove にあたる部分と相互作用し、そこに捕らわれてしまうといった過程が、収束に至らなかったものの

いくつかで見られたが、この A5 の主鎖二面角の一部に天然構造と同じ構造をとるような拘束を与えてシミュレーションを行ったところ、それまで見られた local minimum 構造へとは向かわず、天然に非常に近い構造が得られた。これらの事から、A5 がまず安定して G6 とスタックする事がこの過程にとって非常に重要であると考えられる。

#### 4. 同法による dGC(GAN)GC の解析

Yoshizawa らの結果によると、dGC(GAN)GC 分子は dGC(GNA)GC 分子ほどの高い安定性を示さない。よって、dGC(GAN)GC 分子に同様の LES 法を用いた分子動力学シミュレーションを適用すれば、dGC(GNA)GC 分子の場合とは異なる結果が得られる事が期待され、安定性の差とループ領域の構造・配列の差の関連性を明らかにすることが出来る。本研究では GAA 以外の dGC(GAN)GC 分子に対して、同様の LES 法を用いた分子動力学シミュレーションを行い、その最安定構造の探索を試みた。その結果、dGC(GNA)GC 分子の場合とは異なり明確な安定構造は得られなかった。GAC、GAT では短期間ではあるが収束した構造が得られたものの、それらはどれも不安定なものであった。GAC ループを持つ分子としては、dGCATC(GAC)GATGC (PDB:1POU) が構造既知であり、これは sheared-type Ganti·C<sub>syn</sub> ペアを取っているが、本研究ではその C の向きが反転した構造しか得られなかった。1POU と同様のループ構造を持つ dGC(GAN)GC 分子をモデリングし、explicit water 環境での分子動力学シミュレーションを行う事で、その構造の安定性を確かめてみたところ、GNA ヘアピン分子ほどでは無いが、GAT、GAG ヘアピン分子と比較すると非常に安定と

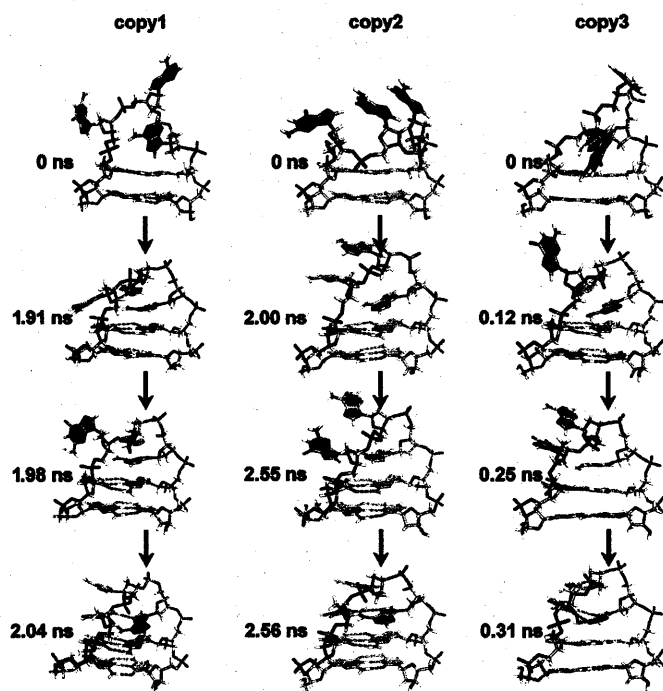


図. LES 法による dGC(GAA)GC 分子の refolding 過程

言える結果となった。GACヘアピン分子はYoshizawaらの結果においてもGAT、GAGヘアピン分子と比較すると熱安定性が高い事が示されており、それはループ領域がこのよう  
なある程度安定なループ構造をとっている事によるものであると考えられる。一方、GAT、  
GAGヘアピン分子のループ領域は一定の安定した構造をとらないため、ヘアピン分子全体  
の安定性に対して何らプラスの寄与をしないものと考えられる。

#### 5. 自由エネルギー解析

LES法を用いたシミュレーションの結果、4種のdGC(GNA)GCヘアピン分子については非常に安定な構造が得られ、3種のdGC(GAN)GCヘアピン分子についてはGNAほど安定な構造は得られなかった。これらの構造の溶液中での安定性、エネルギー差をより詳細に見積もるために、LES法によって得られた安定構造を元に、explicit water環境での分子  
動力学シミュレーション、およびMM-GB/SA法によるエネルギー計算を行った。dGC(GNA)GCヘアピン分子は4種ともほぼ同様の安定性を示し、ループ部分がunfolding  
した状態と比較して $\Delta H=23\sim 40$  kcal/molの安定化が見られた。一方、3種のdGC(GAN)GC  
ヘアピン分子では、ループ構造はやはり不安定であり、 $\Delta H=14\sim 22$  kcal/molと、GNAヘア  
ピン分子と比較してenthalpy面での安定化の程度は小さい事が示された。

#### 6. まとめ

本研究では、拡張アンサンブル法やLES法を用いた分子動力学シミュレーションを、核  
酸分子の中では単独で構造をとるものとしては最小と考えられるミニヘアピン分子に対し  
て適用し、その折れ畳み過程や溶液中での安定性に関して詳細な解析を行った。拡張アン  
サンブル法の結果からは、その折れ畳み過程のうちzippingに近い過程が観察出来た。また、  
LES法の結果からは、ステム領域、次いでループ領域の順で折れ畳みが起きるような、  
compactionに近い過程も確認出来、それらの多くは非常に似通った過程を経ている。4種  
のGNAヘアピン分子の間の安定性の差ははっきりとは見積もれなかったものの、それらよ  
り安定性が低いとされるGANヘアピンとの間にはenthalpy面での差がある事が確認出来  
た。

#### [発表論文]

Satoshi Yamasaki, Shugo Nakamura, Tohru Terada, and Kentaro Shimizu.

Mechanism of the difference in the binding affinity of *E. coli* tRNA<sup>Gln</sup> to glutaminyl-tRNA  
synthetase caused by noninterface nucleotides in variable loop.

*Biophys. J.* (in press)