

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山崎 智

核酸ヘアピン構造は、数塩基対の二本鎖ステム領域と、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、DNAにおいても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おり、核酸の構造・機能の両者に関わる重要な構造単位だと考えられている。このようなヘアピン構造の性質を調べる目的で、DNAミニヘアピン分子を用いて多くの研究がされており、その安定性に関して、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も依存することが知られているが、その機構については十分に明らかにはなっていない。また、近年折れ畳み過程に関しても多く研究がされているが、伸長構造から天然構造へと至る過程はまだ完全には明らかにはなっておらず、また折れ畳み過程の配列依存性も解析されていないのが現状である。申請者は、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、この分子の熱安定性、及び折れ畳み過程の配列依存性を明らかにし、6章にまとめた。

第一章では、核酸ヘアピン構造及び核酸ミニヘアピン分子に関して、その安定性の配列依存性、及び折れ畳み過程に関するこれまでの知見をまとめ、本研究の意義について記している。

第二章では、7ヌクレオチド長トリループDNAミニヘアピン分子の中で最も安定性が高いとされるdGC(GAA)GC分子を対象とし、拡張アンサンブル法に基づく分子動力学シミュレーションを行い、その正しい構造分布を得ることで、熱力学的特性、折れ畳み過程等様々な知見を得ることを試みている。その結果では、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ものの、一度だけ天然構造に非常に近い構造が得られている。その構造に至るまでの過程を、カノニカル分子動力学法による方法も併せて用いて更に解析したところ、ループ側から構造形成するzippering過程であることが示唆された。また、ステムの構造のみが天然と同じく形成されたような構造も得られており、これはcompaction過程の中間構造ではないかと示唆された。このような2つの過程は様々な先行研究とも合致しており、非常に尤もらしい結果である事が示された。

第三章では、前章でのシミュレーションの結果、ループ領域の構造探索が不十分であることが示唆されたため、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ている。その結果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) を得ている。また、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が、GAA 並みに安定性の高いその他 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い、GAA と同様の “side by side G<sub>anti</sub> · A<sub>anti</sub> pair” を持ったヘアピン構造を得ている。更に、これらの分子の巻き戻り過程を詳細に解析することで、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を明らかにしている。このように同様の過程を経る理由についていくつかの考察も行っており、これらのヘアピン分子の安定性の高さにも関わるのではないかと示唆している。

第四章では、dGC(GNA)GC 分子ほどの高い安定性を示さない、dGC(GAN)GC 分子について、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、その最安定構造を得て、熱安定性の差や折れ畳み過程とループ領域の配列の差の関連性を明らかにすることを試みている。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ていない。また、このシミュレーション中に見られた短期間ではあるが収束した構造や、既知構造の中に見られるループ構造を比較することでその安定性を確かめている。その結果によると、GAC ヘアピン分子は、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安定と言える結果を得ている。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、これはその結果と合致するものであると言える。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が得られておらず、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と述べている。このように、安定性が低いとされるヘアピン分子ほど安定構造が得られにくい、という結果は、既存の実験結果とよく合致しており、確かな結果であるといえる。

第五章では、第三、四章の結果得られた最安定構造に対し explicit water 環境でのシミュレーション、及び MM-GBSA 法による自由エネルギー解析を行い、それらの構造間の自由エネルギー差を調べ、実験との比較を行っている。その結果、定性的には実験とよく合致する結果が得られており、本研究の意義をよりよいものとしていると考えられる。

第六章では、これらの結果をまとめ、今後の展望について述べている。

以上、本論文は DNA ミニヘアピン分子の熱安定性、及び折れ畳み過程のループ配列依存性について、分子動力学シミュレーションを用いて原子解像度の解析を行ったものであり、特にその折れ畳み過程について新たな知見が得られた。これらの知見は、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値があるものと認めた。