

## 論文の内容の要旨

論文題目 Development of backbone force field parameters and  
molecular dynamics simulations for nucleic acids  
(核酸分子に対する主鎖二面角力場の開発と  
分子動力学法による動的挙動解析)

氏 名 三井 崇志

### 1. 序論

生命現象の基本となる生化学的な機能はタンパク質や核酸といった生体高分子の複雑な相互作用に基づいて実現されている。従って生体分子の振る舞いや分子間の相互作用を理解することは機能発現の機構解明や、機能制御による薬剤開発といった取り組みにつながるものと期待される。とりわけ核酸分子は、転写、複製、修復、修飾、翻訳といった、さまざまな場面でタンパク質と密接に相互作用しながら生命活動の根幹をなしている。

一方、生体高分子の動的振る舞いをコンピュータ上で解析する分子動力学シミュレーションの技術は、この30年余りの間に急速な発展と普及を遂げてきた。その要因として、一つには計算機の進歩とソフトウェア技術の発達による高速化が挙げられる。数十万原子から構成される系に対してマイクロ秒からミリ秒程度にわたって、その動的挙動を追跡することが可能になってきている。また他方では、計算モデルの精緻化が進み、化学的精度で実験と計算との対比が可能になってきた事もシミュレーションが欠かせない研究手法として認知されてきた理由の一つである。

このような背景のもと本研究は、タンパク質や低分子など他の構成要素との間に整合性があり精度の高い核酸の力場を開発し、核酸を含み多数の要素からなる複合体構造に対して計算モデルを構築して、分子動力学シミュレーションによりその機能や動的挙動を解析することを目的としている。第二章では核酸分子の構造に大きく影響する主鎖二面角ポテンシャルに対して、FUJI力場をベースにパラメータを開発した過程について述べる。第三章ではDNAの典型的な5つのタイプの構造に対して分子動力学シミュレーションを実施し、開発した力場の評価を行った。第四章ではDNAと核内受容体の複合体構造

に開発した力場を適用してシミュレーション・モデルを構築し、平衡構造やその揺らぎについて実験結果との対応を評価した。最後に第五章において本研究の結論をまとめている。

## 2. 核酸分子に対する主鎖二面角の力場パラメータ開発

X線やNMRを用いた構造解析から得られている核酸分子の多様なコンフォメーションのすべてを安定的に再現できる力場は現在のところまだ得られておらず、近年盛んに核酸の主鎖二面角に対して新たな力場パラメータの提案が続けられている。しかしながら、それらはパラメータ導出の元となる量子化学計算において、実験的に観測されている構造情報（二面角）をモデル分子に課す、あるいは連続体近似された溶媒効果を取り入れる、といった他のパラメータとは異なる条件を課すことにより導出されており生体分子全体としての整合性に課題が残る。

本研究では新たに力場を開発するにあたり、リン酸基の部分電荷と主鎖二面角ポテンシャルの改訂を行った。リン酸基は生理条件下で陰イオン状態にあることから電荷密度の広がり considering diffuse関数を基底関数に組み入れて量子化学計算を行いRESP電荷として決定した。次に二面角ポテンシャルのパラメータ導出では、まず主鎖二面角の組 $(\alpha, \gamma)$ ,  $(\delta, \epsilon, \zeta)$ それぞれに対してモデル分子を設定し、実験から得られる二面角構造情報を仮定することや連続体近似による溶媒効果を導入することなく、真空中での非経験的分子軌道法による量子化学計算のみからパラメータ導出する方法を採った。ここで主鎖二面角に対するエネルギー曲面を求める際には、モデル分子の回転可能な結合軸を $15^\circ$  刻みですべて回すことにより網羅的な配座空間探索を行った。得られたポテンシャル・エネルギー曲面の最低エネルギー経路から各二面角に対する一次元のエネルギー・プロファイルを得て、フーリエ展開によって力場パラメータの導出を行った結果、一次元エネルギー曲線に対する量子化学計算と力場計算のRMSEは0.37-0.81kcal/molの範囲に収まった。このようにして改訂された力場は、モデル分子の量子化学計算による二次元ポテンシャル・エネルギー面を全RMSE 1.5kcal/mol以内で極小点の位置も含め良く再現した。

## 3. DNAの多様な構造に対する従来力場との比較による評価

核酸分子は塩基配列や外部環境に応じて、さまざまな立体構造をとりうる事が知られている。ここではDNAの典型的な5つの構造を検証対象とし、改訂したFUJI力場の評価を行った。まず最も基本的なB-DNA構造について、X線構造やNMR構造と1マイクロ秒の分子動力学シミュレーションから得られた構造との比較、ならびに従来から広く用いられている他の力場 parm99, parmbse0, charmm36との比較を通じて、その妥当性を検証した。さらに引き続き、脱水状態で見られるA-DNAやテロメアやプロモータ領域において見られる特殊な高次構造である平行/逆平行グアニン四重鎖、高塩濃度下や超らせん構造に

において見られるZ-DNA、の4種の構造についても同様に比較検証を行った。

B-DNA構造においては、1マイクロ秒に渡りカノニカル構造を維持しており、主鎖二面角分布に実測構造から逸脱するピークは見られなかった。主鎖二面角の平均値は他の力場と同程度にX線結晶構造と一致しており、X線結晶構造からのRMSDはもっとも小さい値を示した。またparm99力場で歪んだ構造を初期構造としても、100ナノ秒以内にカノニカル構造を復元できることも確認された。次にA-DNA構造についても同様にシミュレーションを実施したところ、先行研究でも報告されている通りにB-DNA構造から始めた場合とよく類似した構造への転移が見られた。平行/逆平行グアニン四重鎖についても、中心軸に配位した陽イオンが平衡位置を維持した状態でRMSDが2Å程度の範囲で構造を維持した。平行グアニン四重鎖は非常に安定であり、parm99, parmbse0 と共に主鎖二面角の平均値もX線結晶構造をよく再現した。反平行グアニン四重鎖においてはループ部のチミン残基において $\alpha \sim -150^\circ$ ,  $\epsilon \sim 120^\circ$  の領域に結晶構造ではみられない小さな二面角分布が生じておりparmbse0よりRMSDがわずかに大きい原因となっていた。一方、Z-DNA構造では配列上シトシン残基と交互に現れるグアニン残基においてsyn型( $\chi \sim 65^\circ$ )からanti型( $\chi \sim 165^\circ$ )への構造変化を生じており、主鎖二面角の歪みの要因となっていた。糖と塩基を結ぶ二面角 $\chi$ に対する最適化が今後の改良点として挙げられる。

#### 4. 核酸-核内受容体ヘテロダイマー複合体の分子動力学シミュレーション

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ )はレチノイドX受容体 $\alpha$ とヘテロダイマーを形成して、PPAR応答配列(DR1)と呼ばれる特定のDNA配列に結合する。核酸とタンパク質の複合体への適用例として、これら核内受容体とDNAのX線結晶構造をもとに、改訂されたFUJI力場を用いてシミュレーション・モデルを構築した。先行研究として同じ共結晶構造を用いた50ナノ秒の分子動力学計算が報告されているが、平衡状態の議論には不十分と考えマイクロ秒のシミュレーションを実施し、その影響について検討した。

全系の三次元構造としては、核内受容体のヒンジ領域を除き安定したトラジェクトリが生成された。初期構造からのRMSDを比較すると、それぞれのDNA結合領域は2Å程度であり、リガンド結合領域の3~4Åと比べ小さな値を示した。各DNA結合領域は2つのジンクフィンガー構造を持っており、それらがDNAに結合することにより三次構造がさらに安定化されているものと考えられる。DNAのRMSDはタンパク質のDNA結合領域と同程度の平均値であったが、その揺らぎはタンパク質に比べて大きい幅を持っていた。またDNAは単独で水中に存在する場合に比べ、結合状態では構造揺らぎが大きく抑制されていることが分かった。次にPPAR $\gamma$ に対して残基ごとのRMSFの値を調べてみると揺らぎの大きな配列上の位置は、水素-重水素交換質量分析による重水素交換率や結晶構造解析の温度因子と矛盾のない結果を示していた。全系でのRMSF値を0.1マイクロ秒ごとの移動平均として見ると、0.8マイクロ秒辺りで収束する様子が見られたことから、数十ナノ秒程

度のシミュレーションでは平衡状態の動的挙動を吟味するには不十分であることが示唆された。

以上の結果から、核内受容体と核酸分子からなる複合体構造の動的挙動について実験との比較検討が可能となる安定なシミュレーション・モデルを、改訂した力場と長時間シミュレーションを利用することにより構築することが出来たものと考ええる。

## 5. 結論

核酸とタンパク質からなる複合体のシミュレーション・モデルを構築することを目的として、核酸の力場パラメータの開発とその評価、さらに核酸とタンパク質の複合体について分子動力学シミュレーションによる動的挙動の解析を行った。

力場の開発ではリン酸基の電荷決定に加え、二種の分子モデルを用いて実測の構造情報を仮定することなく、網羅的配座探索から非経験的量子化学計算をもとに核酸の主鎖二面角に対する力場パラメータを導出した。改訂した力場は真空中での量子化学計算のエネルギー曲面をよく再現した。次にこれらのパラメータを用いて、DNAの典型的な構造5種に対して水中での分子動力学シミュレーションを実行し、X線結晶構造解析あるいはNMR構造解析の二面角分布との比較を行った。Z-DNAを除き従来力場と同等以上の構造再現性を得た。最後に改訂した力場を用いて、DNAと核内受容体からなる複合体の分子動力学シミュレーションを行い、安定した平衡構造を得るとともに一次元配列上で構造揺らぎの大きな領域が、結晶構造における温度因子の大きな領域や水素重水素交換質量分析における交換率の高い領域と矛盾していないことを確認した。

本研究で得られた力場パラメータに基づくシミュレーション・モデルが実験から得られる構造揺らぎを良く再現していることから、リガンド結合に伴う生体分子の動的挙動や機能の解析に計算化学の側面から貢献するものと考ええる。

以上