

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17778

研究課題名(和文) 修飾核酸の分子動力学計算のための基盤構築

研究課題名(英文) Force fields for the molecular dynamics of modified nucleic acids

研究代表者

櫻庭 俊 (Sakuraba, Shun)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子生命科学領域・主任研究員(任常)

研究者番号：90647380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：修飾RNAの高精度の古典分子動力学用力場を作成するパイプラインを構築した。さらに、作成された力場を検証するための自由エネルギー計算パイプラインを作成した。高精度力場を用いる事でRNAの二次構造の安定性をシミュレーションから予測できるだけの精度があることを、RNAの実験的測定結果と計算結果との比較により示した。

さらに、検証用の自由エネルギー計算パイプラインを発展させ、タンパク質に一残基変異を入れた場合の安定性の変化を予測するパイプラインを作成し、実際にタンパク質の熱安定性の予測が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内には様々な修飾塩基が存在し近年その役割が注目されている。修飾塩基のシミュレーションはこれまで高い精度で実施することが困難であったが、本研究によりその原子単位の振る舞いを予測することが可能になった。さらに、高精度の力場により自由エネルギー変化が予測可能であることを示したことで、コストなどの面で実験が困難な修飾塩基に対し、計算を用いることでその様態を予測することを可能にした。また、本研究計画で作成した力場作成パイプラインはSARS-CoV-2での修飾mRNA研究を迅速に立ち上げるために活用された。

研究成果の概要(英文)：We constructed a pipeline to generate a classical molecular dynamics force field for modified RNAs. We further constructed the free-energy calculation pipeline to evaluate the generated force field. By using the force field from the same protocol we proved that RNA's stability can be predicted from simulations.

Additionally, based on the free-energy calculation pipeline we created in this project, we constructed a pipeline that can predict the stability change upon introducing a single mutation to the protein. We showed that the thermal stability change of the protein can be predicted with this pipeline.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子動力学法 力場 RNA RNA修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分子動力学法は分子をコンピュータ上にモデリングし、分子を構成する原子それぞれの運動を物理法則に従ってシミュレーションすることで、分子の持つ様々な性質を解析する手法である。主に古典力学によって分子運動を記述したモデルがその計算コストと精度のバランスの良さから広く使われている。分子動力学法ではまた、実際のサンプルを合成すること無くシミュレーションを行うことが可能であるため、低コストで実験結果を予測したり、分子構造の設計に使うことも可能であり、これらは分子動力学法の主要な応用先の一つとなっている。

分子動力学法の対象は生体分子も例外では無く、古くから DNA (デオキシリボ核酸) ならびに RNA (リボ核酸) について、シミュレーションによる構造やダイナミクスの解析が行われてきた。長年にわたる分子動力学法の技術のたゆまない改良と、核酸分子の相互作用を計算機内で記述する力場パラメータが進歩したことから、正確なシミュレーションが可能になった。DNA/RNA はリン酸基・糖・塩基から構成されるが、このうち主要な塩基であるアデニン(A)・グアニン(G)・チミン(T)・ウラシル(U)・シトシン(C)の 5 塩基(これらはカノニカルな塩基と総称される)については、シミュレーションと実験結果が非常に良い一致を見せる事が知られている。

一方で、生体内では非カノニカルな塩基である修飾塩基が存在し、様々な化学修飾された核酸(修飾核酸)を構成することが知られている。修飾核酸は DNA/RNA 研究において近年急速にその重要性を増しており、2016 年度時点から現在に至るまで特に RNA 研究の重要な位置を占めている。たとえば DNA のメチル化修飾が遺伝子の発現制御に大きく寄与していること、また細胞内での転写制御に関わる、non-coding RNA(タンパク質をコードしない RNA)に多くの修飾核酸が含まれ、転写翻訳の効率を左右する事などが明らかになってきた。しかしながら、こうした修飾核酸を含んだ系については適切な力場パラメータが存在せず、シミュレーションと実験が良く一致しない事が予備研究の結果から明らかになった。修飾核酸を扱うための正確な力場パラメータが必要とされていた。

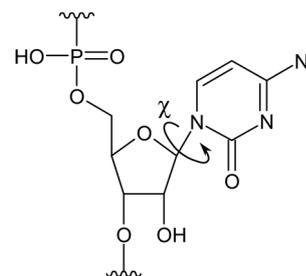


図 1: RNA のリボース(糖)と塩基を結ぶ角周りの二面角ポテンシャルは、RNA の様々な配座の安定性を決める重要パラメータとなる。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、こうした状況を改善し、修飾核酸を含む核酸のシミュレーション基盤を整備することを目的とする。特に生物学的重要性が高い修飾 RNA について、その力場パラメータを決定し、実験的に知られる定量的な指標との比較・検証を行う。更に、この力場パラメータの作成用のパイプラインを整備する。

### 3. 研究の方法

現在の高精度の RNA 力場パラメータは、ほぼ全て量子化学計算の数値を元にパラメータを調整している。本研究においてもこれまでのパラメータ決定の手続きを踏襲し、高精度の量子化学計算から参照値となるポテンシャルエネルギーを求め、古典力場での計算結果がこれと一致するようにパラメータを調整するようにした。具体的には、RNA のリボースと塩基を繋ぐ結合のまわりの回転(二面角; 図 1)を変化させた場合のポテンシャルエネルギーを CCSD(T)法と完全基底系(CBS)を組み合わせで求め、古典力場での計算結果と比較し力場パラメータを修正した。

作成したパラメータの検証のため、RNA の Watson-Crick 対の形成の際に生じる自由エネルギーを自由エネルギー摂動法により計算し、実験値との比較を行った。自由エネルギー摂動法では RNA を変異させた場合の相対自由エネルギー差を計算することが可能である。実験値との整合性を比較することで、作成した力場の精度を間接的に評価することが出来る。

### 4. 研究成果

(1) 本研究で目標としていた、修飾 RNA の力場パラメータを取り扱うためのパイプラインを作成した。パラメータをイノシン、N6-メチルアデニンについて作成した。本パイプラインによってイノシンを対象に得られた角を変化させた場合のポテンシャルエネルギーの変化を図 2 に示す。量子化学計算によって得られた計算値(MP2/CBS+ $\Delta$ CCSD(T))は

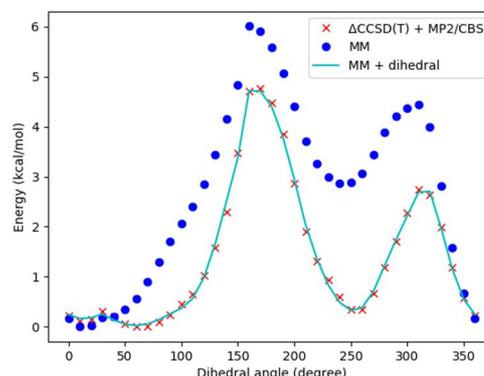


図 2: イノシンの二面角を変化させた場合のエネルギー変化。修正ポテンシャルにより量子化学計算結果(赤色 X 字)に極めて近いエネルギーを再現できる(水色実線)。

未補正の計算値(MM)との間に最大 2.7 kcal/mol もの大きな差が存在する。この差は本パイプラインによって自動的に計算される補正項を加えることで 0.22 kcal/mol 以下に減少させることができた (実線)。

(2) 非修飾 RNA について、同様のプロセスで作成された高精度 RNA 力場パラメータを利用した場合、RNA の最近接(NN)パラメータと呼ばれる RNA 二次構造予測に用いられるパラメータの導出に計算が活用できることを明らかにした。実験的に測定された配列数が少ない(~10 個)場合に、30 配列対への自由エネルギー計算を組み合わせると、NN パラメータをより正確に求めることが可能である。

(3) イノシン-シトシン間の Watson-Crick 対の形成の安定性とそこから導かれる NN パラメータを、実験値と比較し検証した (図 3)。検証の結果、本パラメータから導かれるステム構造形成自由エネルギーは実験値を定量的に再現(25 配列との比較による平均絶対誤差: 0.68 kcal/mol)することが示された。

(4) 本研究計画で作成した力場構築パイプラインの副産物として、パラメータ作成パイプラインを発展させ、研究最終年度に現れた SARS-CoV-2 について、ウイルス mRNA に存在する mRNA 修飾(N7-メチルグアニン, 2'-O メチルアデニン)についてのシミュレーション研究を迅速に立ち上げることができた。

(5) 本研究計画で作成した検証パイプラインを発展させ、RNA ではなくタンパク質に変異を入れた場合の自由エネルギー差を計算から予測する手法を開発し、パイプライン化した。手法の検証の結果、T4 lysozyme タンパク質について精度良く (1.06 kcal/mol; 図 4) 変異導入時の安定性変化を予測できることが明らかになった。

(6) 本研究計画で作成した検証パイプラインの一部として、高速な分子動力学計算用の電荷相互作用評価手法である零多極子和法の分子動力学パッケージへの実装を発表し実装を公開した。

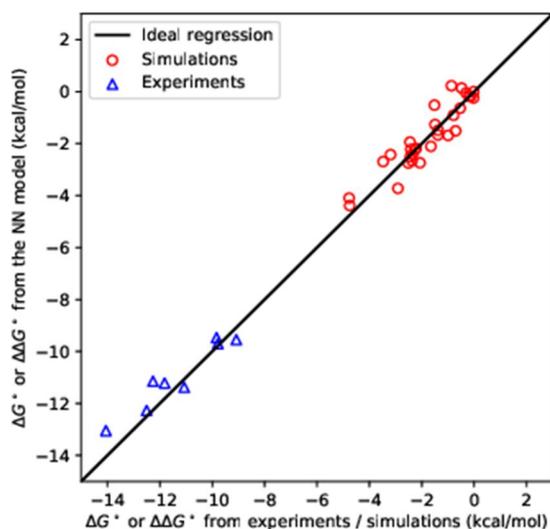


図 3: 計算と実験から構成されたイノシン-シトシンの NN パラメータ予測値(縦軸)は実験値・計算値と非常に良く一致する(横軸)。

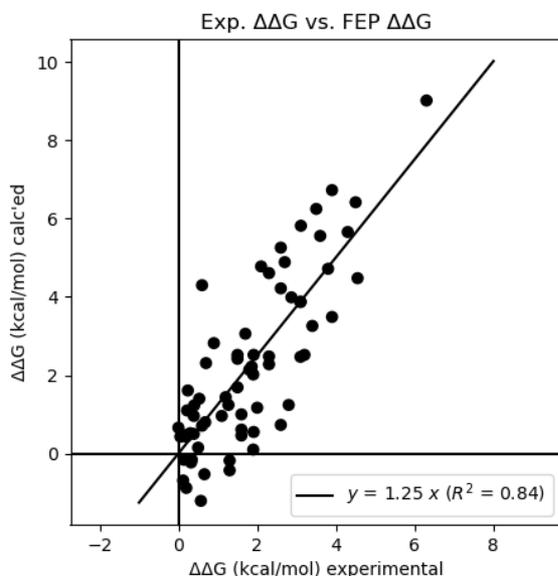


図 4: T4 lysozyme タンパク質に 1 残基変異を入れた場合の自由エネルギー変化の実験値(横軸)と計算値(縦軸)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Taichi Hagio, Shun Sakuraba, Junichi Iwakiri, Ryota Mori, Kiyoshi Asai   | 4. 巻<br>19                |
| 2. 論文標題<br>Capturing alternative secondary structures of RNA by decomposition of base-pairing probabilities  | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>BMC Bioinformatics   | 6. 最初と最後の頁<br>38          |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s12859-018-2018-4  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Kota Kasahara, Shun Sakuraba, Ikuo Fukuda  | 4. 巻<br>122               |
| 2. 論文標題<br>Enhanced Sampling of Molecular Dynamics Simulations of a Polyalanine Octapeptide: Effects of the Periodic Boundary Conditions on Peptide Conformation | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Physical Chemistry B  | 6. 最初と最後の頁<br>2495 ~ 2503 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.jpcc.7b10830   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Shun Sakuraba, Ikuo Fukuda   | 4. 巻<br>39                |
| 2. 論文標題<br>Performance Evaluation of the Zero-Multipole Summation Method in Modern Molecular Dynamics Software   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Computational Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>1551 ~ 1560 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/jcc.25228  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Shimpei Nishida, Shun Sakuraba, Kiyoshi Asai, Michiaki Hamada  | 4. 巻<br>16                |
| 2. 論文標題<br>Estimating energy parameters for RNA secondary structure predictions using both experimental and computational data                                   | 5. 発行年<br>2018年           |
| 3. 雑誌名<br>IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics  | 6. 最初と最後の頁<br>1645-1655   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1109/TCBB.2018.2813388  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shun Sakuraba, Junichi Iwakiri, Michiaki Hamada, Tomoshi Kameda, Genichiro Tsuji, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe, Kiyoshi Asai |
| 2. 発表標題<br>RNA nearest-neighbor parameters for inosine-cytosine pairs derived from a combined experiment-simulation approach           |
| 3. 学会等名<br>Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>桜庭 俊               |
| 2. 発表標題<br>修飾核酸の分子動力学シミュレーション |
| 3. 学会等名<br>第20回日本RNA学会年会      |
| 4. 発表年<br>2018年               |

|                               |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名<br>桜庭俊、浅井潔            |
| 2. 発表標題<br>修飾核酸の分子動力学シミュレーション |
| 3. 学会等名<br>日本RNA学会            |
| 4. 発表年<br>2017年               |

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>桜庭 俊, 浅井 潔, 亀田 倫史      |
| 2. 発表標題<br>RNA-RNA の相対結合自由エネルギー計算 |
| 3. 学会等名<br>理論化学討論会年会              |
| 4. 発表年<br>2016年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Shun Sakuraba   |
| 2. 発表標題<br>A Computational Study of Free-Energy Changes Upon Protein Mutations |
| 3. 学会等名<br>Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)                    |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|