

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330338

研究課題名(和文) 対イオンによるDNAの局所構造変化がタンパク質との相互作用や凝集に及ぼす影響

研究課題名(英文) Kinetics and mechanism of conformational changes of nucleic acids by interaction with small molecules

研究代表者

谷川 雅人 (TANIGAWA, Masato)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90332890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：円偏光二色性(CD)ストップフローを用いて、一本鎖DNAおよびRNAが溶媒のイオン濃度や小分子との相互作用によってどのように構造が変化するかを明らかにした。特にG-quadruplexを形成する配列に注目し、溶液の条件を変えることによってグアニン塩基間の相互作用が時間とともにどのように変化するかや形成過程を明らかにした。これまでG-quadruplexと相互作用が考えられていなかったNMNなどの分子で相互作用を示唆する結果を得た。現在、この過程における溶媒分子やイオンの核酸高分子との相互作用をシミュレーションによって再現することにより明らかにしている。

研究成果の概要(英文)：Oligonucleotides with a G-rich sequence can form G-quadruplex. G-quadruplex exist in living cells and has drawn attention as a target for gene expression control, cell division, and design of drugs for cancer. The binding of ligand TMPyP4 with G-quadruplex has been extensively studied. TMPyP4 is well known for the telomerase inhibitor, but interaction of the TMPyP4 and G-quadruplex were studied by ESI-MS, NMR, FRET, and circular dichroism. Irinotecan is a drug used for the treatment of cancer, and prevents DNA from unwinding by inhibition of topoisomerase. We make a hypothesis that irinotecan interacts with G-quadruplex, because irinotecan resembles TMPyP4 in action mechanism. Stopped-flow circular dichroism is used to characterize the assembly of complexes consisting of G-quadruplex bound to the ligands. In this study, the rates of each process were determined over the temperature range of 10-50 °C and activation energies were determined from the slope of Arrhenius plots.

研究分野：生物物理学

キーワード：生命分子計算 力学 DNA局所構造変化 G-quadruplex DNA RNA 円偏光二色性 ストップフロー 分子動力学

## 1. 研究開始当初の背景

DNAの構造は、これまでX線回折やNMRのデータを基に、分子動力学法によって多くの研究が行われてきた。特に、parmbc0 や charmm27等の力場を用いることにより、数マイクロ秒にわたる比較的長い時間のシミュレーションも可能となった。しかし、DNAが凝集や巻き付きなど大きく変形する場合には、さらに長い時間のシミュレーションが必要となる。このような、長い時間をシミュレーションするためには、長距離間の相互作用や、最近傍以外の対イオンの影響などを考慮した力場等を検討しなければならない。また、タンパク質や薬剤がDNAと相互作用するときの機序については、反応時間が長くなることもあり、ほとんど調べられていない。私はこれまで、DNAの溶液中の構造を実験的に研究し、特に低イオン強度溶液中におけるDNAの挙動を詳しく調べた。低イオン強度下ではDNAや合成RNAは非常に屈曲性に乏しくなり剛体棒状に近い性質を持ち、このとき対イオンはDNAとともに動く。これに対して、イオン強度を増していくと、屈曲性が現れるとともに多くのイオンがDNAと相互作用し、イオン雰囲気形成し、Manningの高分子電解質理論での説明との一致が良くなる(Yamaoka, Tanigawa et al., J. Chem. Phys. 1625, 101, 1999)。さらにイオンの価数が高いものやスペルミンやスペルミジン等を用いると、DNAは二重鎖構造に由来するねじれの影響が現れるようになり、さらに、これらのイオンの濃度を高くすることによりDNAが凝集する過程についても明らかにしてきた(Tanigawa et al., Anal. Chim. Acta, 365, 19-25, 1998)。しかし、ここで明らかにできたのは、個々のDNAを調べた場合でも分子全体の平均的な力に基づく挙動であり、1イオンのDNA近傍の滞留時間等の相互作用に関する情報や、DNA分子内の共有結合に働く力については、まだ明らかにできていない。

## 2. 研究の目的

DNAの溶液中での挙動およびタンパク質複合体を形成する際の挙動を(1)分子動力学を用いた計算によるシミュレーションと(2)ストップフローを用いた実験的研究を併せることにより明らかにする。

(1)分子動力学を用いた計算によるシミュレーション

この研究では分子動力学法を用いて、これまでの実験結果およびこの課題で実験するストップフローを用いた実験結果を用いて、DNAの伸長・屈曲・折りたたみなどの動的性質とタンパク質との相互作用の機序を明らかにする。特にDNAはリン酸部がイオン化により非常に電荷密度の高い高分子電解質であるため、これまでの計算パラメーターでは、長時間のシミュレーションには適さない部分がある。これまでの実験でスペルミンやスペルミジンなどの多価の陽イオン性の分子が存在するとDNAは凝集することがわかっており、その過程をAFM等で明らかにしてきた。これらの多価イオンが存在する場合については相互作用が複雑になり、モンテカルロシミュレーション以外の研究例は非常に少ない。このような、2価以上のイオン存在下や、イオン強度が大きくなる時のDNAの挙動を再現できるパラメータについて詳しく検討する。また、DNAが転写因子などのタンパク質と相互作用するときの挙動をシミュレーションで検討する。これまでに、転写因子Sp1がDNAに結合する際に、溶媒中にATPもしくはADPのいずれが存在するかにより、Sp1間の相互作用が変わることを見いだした(Tanigawa et al., Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1751-1753, 1997)。またミスマッチ塩基に特異的に結合するmutSがミスマッチの種類により結合能が変わることも見いだした(Tanigawa et al., Nucleic Acids Res., 28, E38, 2000)。これらの分子的機構を明らかに

するために、分子動力学法によるシミュレーションを行う。また下記の ストップフローの実験では、DNA とタンパク質との相互作用にかかる時間を遅くする必要があるので、溶媒条件を変えてシミュレーションを行い、影響を検討する。

## (2)ストップフローを用いた分光学的実験

円偏光二色性(CD)スペクトルでは、DNA の局所的な構造を反映したスペクトルを得られるので、ストップフローを用いて測定することにより、動的な挙動を明らかにする。これまでのモンテカルロシミュレーションによって対イオンが DNA の溝に位置し(配列依存的に)塩基と相互作用することが示されているため、この相互作用による微細な構造変化を CD によって検出し、イオン種や強度を変えてシミュレーションと比較することにより DNA 近傍でのイオンの挙動を詳しく調べる。

## 3. 研究の方法

DNA の分子動力学シミュレーションで比較的精度が高く、長時間に耐えうるものとして charmm27 や parmbsc0 が用いられている。これらのパラメータを用いて 0.1~数  $\mu$  秒のシミュレーションが行われている。これらのパラメータの検証を行うため、対イオン種に Na<sup>+</sup>と Mg<sup>2+</sup>を用いてイオン強度を 0.1~1mM の範囲で計算を行った。計算は第一段階として、amber ver. 12 および gromacs ver4.5.5 によって、GPU NVIDIA C-2070 を 2 枚搭載した CPU Xeon W3565 のワークステーションで行った。

これまでの計算による研究結果から、対イオンのイオン近傍での挙動は DNA の配列依存性があることが分かっているので、配列の定まった合成核酸を作製し実験に用いた。測定は JASCO 製 円偏光スペクトル測定装置 J-720 にストップフロー装置 SFS-492 を組み込んで行った。

## 4. 研究成果

### (1) 分子動力学を用いた計算によるシミュレーション

1-1 これまで実験データとの比較による計算に用いる力場等のパラメータの検証および改良

計算はナノ秒程度までを行い、条件の妥当性を検証した。また、パラメータについては、これまでの実験結果を基に考えられる可能性のものを組み込み、計算に破綻をきたさないか、得られた結果が妥当なものであることを示した。

### 1-2 多価イオン存在下における DNA の凝集過程のシミュレーション

溶媒中にスベルミンやスベルミジンが存在するとその濃度に応じて、部分的に凝集する。また DNA を導電性基板であるグラファイト(HOPG)上においても凝集することを、これまでの実験で見いだしている。また、転写因子(Sp1)と DNA を結合させ、このとき DNA に屈曲がおこることも明らかにしてきた。また DNA に力を加えて伸長させた状態で固定し、原子間力顕微鏡で観察している。この引き延ばされた DNA は近年の研究で、タンパク質によっても引き延ばしが行われ、転写調節に使われていることが指摘されている。これらの挙動を MD によって計算し、実験であられた結果と比較した。この結果をもとにパラメータを再検討し、DNA が凝集起こす場合や、タンパク質と相互作用する場合など、大きな変化を起こすときのパラメータを決定した。

### 1-3 タンパク質-DNA 複合体形成過程のシミュレーション

DNA-タンパク質の複合体の形成過程を計算によってシミュレーションを検討した。特に mutS は DNA の 1 塩基もしくは 2 塩基のミスマッチ塩基の部位に結合させるため、このミスマッチ部分の構造について十分検討した。これは実験データがほとんど無い

ため、可能性の高いいくつかのモデルを作り、モデルごとに複合体のシミュレーションを行い、得られた結果と X 線構造解析のデータなどと比較して検討した。我々の実験で、ミスマッチの種類によって、結合効率が異なることを見いだしているため、これらについてもシミュレーションによって解析した。また、ATP 存在下では mutS は 2 量体同士の相互作用は小さいが、ADP 存在下では 2 量体と DNA の複合体が相互作用することを AFM 観察によって明らかにしている。この現象についても、シミュレーションによって考察した。

これまでに転写因子 Sp1 と DNA との複合体を原子間力顕微鏡で観察し、また、ミスマッチ塩基

#### (2) ストップフローを用いた実験

特異的に結合する mutS タンパク質と DNA の複合体を観察し、複合体形成時の形状変化を調べ、Sp1 では、ADP 存在下と ATP 存在下における複合体でタンパク質間の相互作用が変わり形状が変化することを明らかにした。さらに、これらの静的結果に加えて動的な形成過程について調べ、相互作用の機序について考察した。この研究では、これらの作用機序についてタンパク質および DNA の局所的構造変化を CD ストップフローで調べることにより詳細に調べ、この形成過程にかかる時間は非常に短いことを明らかにし、モデルを作製した。また、DNA とタンパク質では特に短波長側で吸収スペクトルは重なるため、スペクトルを分解して解析する必要があったため、これまでに主成分分析を用いたプログラム(二色性スペクトル解析用)を作成し、解析に用いることにより、それぞれの挙動を詳しく解析した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

谷川 雅人, 岩城 貴史, Kinetics and mechanism of conformational changes by interaction of G-quadruplexes and small molecules. (G-quadruplex がさまざまな小分子と相互作用することによる構造変化の反応速度論による研究)、第 53 回日本生物物理学会年会 2015 年 09 月 13 日~ 2015 年 09 月 15 日、金沢大学(石川県・金沢市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷川 雅人 (TANIGAWA, Masato )  
大分大学・医学部医学科・教授

研究者番号：90332890

##### (2) 研究分担者

岩城 貴史 (IWAKI, Takafumi )  
大分大学・医学部医学科・助教

研究者番号：60416419

##### (3) 連携研究者

上田 一義 (UEDA, Kazuyoshi )

横浜国立大学・工学系研究院・教授

研究者番号：40223458