1L1500

Hammerhead Ribozymeの金属結合モチーフと二価金属イオンの相互作用解析

○田中 好幸¹、森田 勇人²、林 秀則²、笠井 康弘³、田中 俊之⁴、多比良 和誠^{1,5} (¹工技院・融合研、²愛媛大・院理、³筑波大・生科、⁴筑波大・応生、⁵東京大・院工)

Hammerhead Ribozymeは金属酵素であり、金属との相互作用の研究はメカニズムの解明に不可欠である。Hammerhead Ribozymeの結晶構造解析の結果より、二価金属イオンと結合できるモチーフが見つかってきている。しかし、この二価金属結合モチーフが溶液中でも実際に機能しうるかどうかは確認されていない。本研究では、溶液中でのこのモチーフの金属結合能等の溶液物性を明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。金属結合モチーフとして必要最小限の塩基配列を含むRNAオリゴマー(GA10: rGGACGAGUCC)を化学合成した。次に、種々のMgCl₂濃度でGA10のNMRスペクトル(natural abundance ¹H-¹³C HSQC、¹H-³¹P HMQC NOESY)を測定し、¹H、¹³C、³¹Pの化学シフト値の推移をモニターした。その結果、結晶構造から推定される二価金属結合モチーフ内のシグナルが選択的に摂動を受けたことから、1) 二価金属結合モチーフが溶液中でも実際に機能しうる、2) モチーフはリボザイムの他の保存配列がなくても独立して機能しうる、ことを明らかにした。

Y. Tanaka, E. H. Morita, H. Hayashi, Y. Kasai, T. Tanaka and K. Taira : Interaction between a metal-binding motif of Hammerhead Ribozyme and divalent cations

1L1530

高速多重極子展開法(FMM)とマルチ時間ステップ法(MTS)を用いた損傷DNAの分子動力学

○石田 恒(日本原子力研究所・計算科学技術推進センター)

核酸のような強い静電相互作用を持つ系の分子動力学シミュレーションには、高速かつ高精度なアルゴリズムが不可欠である。

今回、静電相互作用を能率的に取り扱いながら時間ステップを増大することを可能とするため、高速多重極子展開法(FMM)とマルチ時間ステップ法(MTS)を併用するアルゴリズムを構築した。

FMMは計算領域をツリー階層的なセルに分割し、粒子に働く静電相互作用を高速かつ高精度に計算するために近傍セルにある粒子からのものは厳密計算をし、遠方セルにある粒子からのものは有限次の多重極子展開で近似する。今回このFMMを、大規模シミュレーションに適した空間分割法による並列化を用いて開発した。

マルチ時間ステップ法(MTS)には、Liouville演算子の高次展開法にシンプレクティック法と鈴木の公式を利用した数値積分法を採用した。この方法は位相空間の体積を厳密に保存するので長時間シミュレーションに適当である。そしてFMMの近傍セルと遠方セルにある粒子のポテンシャル演算子をこの展開法により分割し、MTS法に適用した。

最終的に、このアルゴリズムを分子動力学ソフトPRESTOに組み込み、放射線照射により生成される7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA(dodecamer)の損傷DNA1個、Naイオン22個、水5538個のdroplet、熱浴の質量:10(kJ/mol)(ps²)の系に対して温度一定MDを300Kのもとで実行し、この手法の性能検証をした。なお、7,8-dihydro-8-oxoguanineのAMBER型ポテンシャルはGaussian94、HF6-31G*基底系を用いて作成した。

結果は、ツリー階層3、展開次数6(6次モーメントまで)のFMM、4次の数値積分法で近傍時間ステップ1.67fs、遠方時間ステップ6.67fsのMTSで計算能率が良いことがわかった。

H.Ishida : Molecular dynamics of a damaged DNA by FMM(Fast Multipole Method) and MTS(Multi Time Step) method

1L1515

蛍光標識DNAプローブと核酸とのハイブリダイゼーション速度の大きな多様性

○鶴岡 誠、村野 勢津子、岡田 真(広島市先端科学技術研究所)

蛍光偏光法を用いて、DNAハイブリダイゼーションの反応速度khと溶液の塩濃度、温度および塩基配列ミスマッチとの関係を研究し、khはこれらに大きく依存することを報告した[1, 2]。さらに本法において大きなkhを呈する条件として、反応溶液の塩化ナトリウム濃度を0.8 M程度の高塩濃度にすることを提案し、この条件で腸管出血性大腸菌(EHEC)の志賀毒素1、2型遺伝子(stx1, stx2)およびC型肝炎ウイルス(HCV)遺伝子の検出を試みた[1, 3, 4]。上記の各遺伝子は非対称PCR法またはNASBA法により予め1本鎖の測定対象核酸として増幅し、各増幅産物と蛍光標識オリゴDNAプローブとを混合しハイブリダイゼーションによる蛍光偏光度の時間変化を求めた。時間変化のグラフよりこの反応が90%飽和する時間t90を求め、これをハイブリダイゼーション速度の指標とした。stx1、stx2およびHCV遺伝子検出用の各プローブDNAに対するT_m、G+C比率、t90値および塩基鎖長を求め表記した。いずれのプローブのt90についてもT_m、G+C比率および塩基鎖長との強い関連は見出せず、ハイブリダイゼーションの反応速度の多様性はプローブと測定対象核酸とのハイブリッドにおける水素結合のエネルギーでは容易に説明できなかった。ゆえにハイブリダイゼーションの反応速度の多様性は測定対象1本鎖DNAまたはRNAの反応溶液の各条件にて形成される高次構造によって、オリゴプローブの結合が立体的に阻害されるためであると考察された。参考文献 [1] Tsuruoka, M. et al. (1996) J. Biotechnol. 48, 201-208. [2] Tsuruoka, M. et al. (1996) Anal. Lett. 29, 1741- 1749. [3] Tsuruoka, M. et al. (1997) Trends in Anal. Life Sciences 1, 131-135, elec. publish. at <http://neo.pharm.hiroshima-u.ac.jp/tals/>. [4] Tsuruoka, M. and Fujii, T. (1999) Nucleic Acids Symposium Series 42, 239-240.

M. Tsuruoka, S. Murano and M. Okada : The variability of the rate of hybridization between fluorescent-labeled DNA probes and nucleic acids

1L1600

制癌剤Mitoxantroneの酸塩基/モノマー-ダイマー平衡とDNAへの結合様式

○高橋 覚、外山 聡、竹内 英夫(東北大院・薬)

制癌剤Mitoxantrone(MTX)は、急性白血病や乳癌等の治療に用いられる合成抗腫瘍剤である。MTXはDNAに結合することでDNA合成を阻害し抗癌作用を示すといわれている。中性種MTX(nMTX)は、生理的pHに近いpK_a(約7.5)でプロトン化(pMTX)し、また、比較的低濃度でダイマーを形成することが報告されている。このことから生理的条件下では中性種(nMTX)₁とプロトン化したモノマー(pMTX)₁、およびそれらから成るダイマー[(nMTX)₂、(nMTX)(pMTX)、(pMTX)₂]の混在系になると考えられる。この平衡関係の詳細は未だ明らかではなく、また、どの状態のMTXが抗癌作用発現上重要であるのかも明らかではない。本研究では、生理的条件下におけるMTXのDNAへの結合様式を解明するために、MTXの平衡関係、および各々の状態のMTXがDNAとどのように相互作用するのかを分光学的に検討した。

まずMTXの平衡関係を調べるため、pHや濃度を変えて吸収スペクトルを測定した。pMTX、nMTXの会合定数は各々9.9 × 10³ M⁻¹、6.7 × 10⁵ M⁻¹であった。また、nMTXの場合は高濃度(> 10⁻⁴ M)でのスペクトルが等吸収点を通らなくなるため、より高次の会合体を形成することが示唆された。次に、仔牛胸腺DNA存在下、pMTXの吸収スペクトルを測定した。DNA結合時の吸収スペクトルは、(pMTX)₁の吸収スペクトルを約20 nm長波長シフトしたものに類似しており、pMTXはモノマー状態でDNAに結合すると考えられる。このことは、pMTXの濃度を変えても吸収スペクトルに変化が無いことから確認された。nMXTのDNAへの結合種の同定ならびにMTX結合によるDNAの構造変化について、吸収および紫外共鳴ラマン分光法を用いて現在検討中である。

S. Takahashi, A. Toyama, and H. Takeuchi : Acid-base/monomer-dimer equilibrium of antitumor drug mitoxantrone and its DNA binding modes