

# 細菌の複製起点開裂機構解明を目指した分子シミュレーション研究

清水 将裕

## 序論

転写や複製といった様々な過程で DNA 二重らせんはほどけ、一本鎖の状態となる。二重鎖開現象の中には、分子機構が未解明のものがある。本研究では、細菌の DNA 複製時に見られる複製起点の開裂現象を研究した。

細菌では、複製起点に複製開始複合体と呼ばれる DNA-タンパク質複合体を形成した後、DNA が開裂する。大腸菌 *Escherichia coli* では、熱ゆらぎにより一時的に生じた一本鎖 DNA を開始複合体がとらえ、保持することがその分子機構であると考えられている。複製開始複合体に結合するのは特定の DNA 領域であるが、その選択性を生み出す要因は未解明である。

本研究では粗視化分子動力学計算による分子モデリングを主に用い、この選択性が生じる原因を研究した。

## 第一章 細菌 DNA 複製開始複合体の近原子解像度の構造モデリングおよびその機能の洞察

大腸菌 *E. coli* の複製起点 *oriC* には複製開始タンパク質 DnaA の結合サイトと、Integration host factor (IHF)タンパク質の結合サイトがある。ここへ一組の IHF と 11 分子の DnaA が結合することで複製開始複合体が形成される。DnaA タンパク質は DNA 結合ドメインで *oriC* に結合する以外に、互いに結合しホモ多量体を形成している。この複合体の構造については、大きく 3 つの未解決の問題があった。一つめは開始複合体中での *E. coli* DnaA の構造が明らかにされていないこと、二つ目は DnaA タンパク質の結合の向きが不明瞭な DnaA ボックスがあること、三つ目は DnaA がホモ 6 量体を形成しているのか、ホモ 5 量体なのか不明な領域があることであった。私は分子シミュレーションにより複製開始複合体の構造モデリングに成功した。それにより、開始複合体中での DnaA の構造を明らかにした。さらに、結合の向きが不明瞭な DnaA ボックスでの DnaA 結合の向きを提案した。そして、DnaA はホモ 5 量体、単量体、ホモ 5 量体の 3 領域に分かれていることを示した。これらの結果は、共同研究者である九州大学の片山勉らのグループの生化学実験に支持された。構造モデルから、開始複合体とそれによって開裂が促進される DNA 領域の大まかな位置関係をつかんだ。

構造モデリングと共同研究者の生化学実験を組み合わせ、*oriC* 上のタンパク質結合サイトの間隔の役割も研究した。共同研究者らが IHF サイトと DnaA ボックスの間隔を変更すると、複製起点の開裂が起こらなくなった。これが複製開始複合体を形成できないことに起

因していることを、私のシミュレーションが示した。また、特定の二つの DnaA ボックスの間隔が、DNA ヘリカーゼの一本鎖 DNA 装着能に影響することを共同研究者が見つけた。ヘリカーゼは複製開始複合体に結合する分子である。私の計算結果と合わせ、二つの DnaA ホモ 5 量体の位置関係がヘリカーゼの一本鎖 DNA 装着に重要であることが示唆された。

## 第 2 章 粗視化 DNA-タンパク質モデルから原子解像度のモデルを構築する手法の開発

粗視化計算で現れた DNA-タンパク質複合体の詳細な解析のため、粗視化モデルから原子解像度のモデルを構築する手法を開発した。

はじめに DNA の粗視化モデルから原子モデルを構築する方法を考案した。既知の DNA 構造からフラグメントライブラリを作成し、その中の構造を粗視化モデルに当てはめる方法を行った。原子モデルの当てはめはデオキシリボヌクレオチド単位ごとに行った。結晶構造を粗視化モデルに変換し、開発した手法で原子モデルに戻すテストでは、様々な構造の DNA を再現できた。

粗視化計算後の DNA-タンパク質複合体から原子モデルを構築する手順は、A. 温度 1 K の条件で追加の粗視化計算を行い、粗視化モデルの構造緩和を行う。B. DNA の原子モデル構築を行う。C. タンパク質の原子モデル構築を行う。D. 全原子力場を用いたエネルギー最小化で構造を最適化する。の 4 ステップとした。タンパク質の原子モデル構築では既存の手法の利用に加え、DNA との相互作用面には既知の構造情報も取り入れた。

この一連の操作によって得られたモデルでは、DNA のワトソン-クリック塩基対の構造を高精度に再現した。既存のモデリングツールだけを用いた場合よりも DNA-タンパク質相互作用の再現性が大幅に高まった。既知構造を利用する領域を限定しているため、私の方法は既知構造から大きく変形した場合にも適用できる。

## 結論

本研究では、大腸菌 *E. coli* の複製開始複合体が特定の DNA 領域のみを開裂する機構の解明を目指した。私はまず複製開始複合体の構造をモデリングし、二重鎖開裂が起こる領域と開始複合体の位置関係をつかんだ。続いて粗視化 DNA-タンパク質複合体から原子モデルを構築する手法を開発した。開始複合体は巨大であるため、全原子分子動力学計算によって構造をサンプリングすることは困難である。粗視化計算は長時間のシミュレーションを可能にする一方で精度が低くなる。私が開発した手法を用いれば、両者を組み合わせ、双方の利点を生かすことが可能である。複製開始複合体の構造モデルを使い、様々な階層の計算実験を行うことで、二重鎖 DNA の開裂機構の研究は大きく進展すると期待される。

今後の課題として、二重らせん開裂現象を研究できる DNA 粗視化モデルの開発が挙げられる。既存の DNA モデルを改良した後で、シミュレーションにより DNA 二重らせん開裂機構に迫っていきたい。