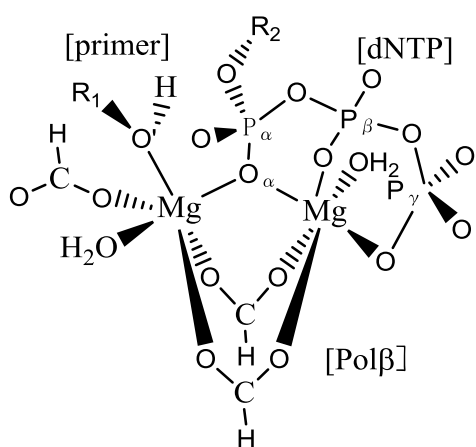


DNA 鎖伸長反応における遷移状態構造

(筑波大院化) ○廣田 恵以 , 守橋 健二

序論: DNA ポリメラーゼによる一本鎖DNAの伸長過程で重要となるいくつかの遷移状態構造は興味深い計算対象である。そのTS構造の理論的な決定には、ポリメラーゼの二つのMgイオンの関与とともに、DNA塩基間相互作用が重要となる。本発表では、ONIOM法、及びFull-QMでのDFT計算を行い、塩基間相互作用が遷移状態構造にどのような影響を与えるかを明らかにした。



研究方法: DNA鎖伸長反応にはPolymerase β が関与する。

その反応における遷移状態をDFT計算により求めた。X線結晶構造を基にして活性部位をモデル化したものを3種考えた。モデル1では、R1とR2をメチル基で、モデル2では糖五員環構造で、モデル3では糖五員環に核酸塩基(cytosine)を付加させたもので置換している(図1)。すべてのモデルにおいて、全電荷は-3である。

各モデルにて反応を追い、モデル1,2はB3LYPを用いて、モデル3は核酸塩基にUFF力場を用いたONIOM法で最適化を行った。またモデル3ではM062X^[1]/6-31G(d,p)を用いたFull-QM計算も行った(表4)。反応はprimerのHがP _{α} のOに移り、P _{γ} のOへと移動していく。中間体2はP _{α} を中心とした五配位中間体となっている。また遷移状態を経由して、終状態ではprimerのOとdNTPのP _{α} が結合し、dNTPから二リン酸が解離する。各モデルにおいて得られた中間体・遷移状態の相対エネルギーを表2に示した。

表1. モデル化の詳細

	原子数	R1,R2	計算方法
モデル1	43	メチル基	B3LYP/6-31G(d,p)
モデル2	66	糖五員環	B3LYP/6-31G(d,p)
モデル3	88	糖五員環+核酸塩基	ONIOM(B3LYP/6-31G(d,p):UFF)

表2. B3LYP/6-31G(d,p)計算による相対エネルギーの比較 (kcal/mol)

	始状態	中間体1	TS1	中間体2	TS2	中間体3	終状態
モデル1	0.0	2.48	32.78	29.53	39.13	8.14	5.82
モデル2	0.0	-2.14	31.19	24.54	33.47	3.69	-8.42
モデル3	0.0	-10.11	29.21	21.60	22.98	-5.47	-22.61

結果：1. DNA ポリメラーゼ β の反応機構

この反応の律速段階は、primer 末端の酸素原子による dNTP 酸素原子への α 位リン原子への求核攻撃であり、リン五配位中間体構造を含む遷移状態構造を経る段階である。この反応を促進しているのは二つの Mg^{2+} を含む活性部位の構造にある。この Mg^{2+} は六配位構造を取っており、基質同士が接近することによって反応系を安定化している。

また、核酸塩基対の存在による活性化エネルギーの変化として、表 2 にあるように律速段階における活性化エネルギーをさらに高くしてしまう結果となっている。だが、逆に二リン酸が脱離する反応においては、ONIOM 計算の場合に限り活性化エネルギーを低くしていることが分かる。このことから推測されるのは、最初の活性化エネルギーの上昇は核酸塩基対のスタッキングによる糖五員環の立体反発のほうに影響が大きく、解離時の反応においては、解離した primer の安定化に寄与しているため、活性化エネルギーが小さくなったと考えられる。

2. 核酸塩基が遷移状態構造に及ぼす影響について

糖五員環のみであるモデル 2 と核酸塩基対が結合しているモデル 3 で構造の比較を行ったところ、モデルの結合距離については特に取り上げられる変化は見られなかった。だが、電荷の比較をすると、活性部位で値の違いがみられた。活性部位の P_{α} の電荷が正のものを帯び、その Mg とリンに結合している酸素 O_{α} の電荷が大きく負に帯電していた。すなわち、核酸塩基が存在することによって活性部位のリンと酸素の間で分極が起こっていることが示された。

表 3. TS1 の各モデル反応系における Merz-Singh-Kollman^[2]電荷

	モデル 1	モデル 2	モデル 3
O_{α}	-0.681	-0.693	-1.001
P_{α}	1.214	1.512	1.918
Mg_1	1.487	1.580	1.578
Mg_2	1.904	1.751	1.930

3. Full-QM と ONIOM 計算の比較

次に、モデル 3 で最適化した ONIOM モデルを、M062X/6-31G(d,p)で最適化した M062X モデルと比較した。大きな差としては、TS2 の活性化エネルギーの値が大きくなった。

表 4. ONIOM 法と M062X による相対エネルギーの比較 (kcal/mol)

	始状態	中間体 1	TS1	中間体 2	TS2	中間体 3	終状態
M062X	0.0	12.49	46.02	22.59	46.48	18.45	-5.42
ONIOM	0.0	-10.11	29.21	21.60	22.98	-5.47	-22.61

参考文献

[1] Y. Zhao and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc*, 120, 215 (2008).

[2] U. C. Singh, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.*, 5, 129 (1984)