

## 密度汎関数法による DNA 類似核酸から成る二重鎖の電子状態解析

(豊橋技科大工\*, プエルトリコ大\*\*)

夏目 貴行\*, 石川 泰行\*\*, 出立 兼一\*, 塚本 貴志\*, 栗田 典之\*

### 【研究背景と目的】

遺伝子には膨大な量の生体の情報が書き込まれており、その情報を解読し意味付けをすることは、生体の機能を解明する上で最重要な研究課題である。人間の遺伝子情報(塩基配列)を調べ、医療に役立てる遺伝子診断は、21世紀における予防医学の基幹技術の1つになると期待されている。

遺伝子の DNA 塩基配列を正確かつ迅速に検出するため、DNA チップなどのバイオチップが開発されている。遺伝情報をより高速且つ高精度に解析するため、DNA 以外の様々な人工核酸を用いたチップの開発が世界中で進められており、例えば PNA (peptide nucleic acid) を用いたバイオチップに注目が集まっている[1,2]。PNA は、バックボーンにペプチド結合を持つ非荷電の核酸であり、DNA との結合能力が高く、PNA-DNA 二重鎖は DNA 二重鎖よりも安定な二重鎖を形成することができるため、DNA 塩基配列をより高精度に検出できる。また、二重鎖形成時に塩基間にミスマッチが発生した場合、PNA-DNA 二重鎖では安定性が大きく変化するため、PNA を用いたチップは、一塩基変異多型の検出にも優れている。しかし、PNA の電子状態は明らかになっていない。

我々はこれまでに、DNA-DNA、PNA-DNA、PNA-PNA の 3 種類の二重鎖構造を作成し、密度汎関数法 (DFT) に基づく第一原理分子軌道計算を用い、電子状態を解析した[3,4]。その結果、PNA-DNA が DNA-DNA より安定な二重鎖を形成する原因を明らかにし、PNA-DNA の新たなバイオチップとしての可能性を示した。

本研究では、DNA の塩基配列をより高精度に検出できる新規バイオチップの提案を目指し、DNA、RNA、PNA に加えて、LNA (ロックト核酸) の特性を解析した。LNA も、PNA と同様に DNA や RNA と水素結合を介して、より安定な二重鎖を形成する核酸であり、特に RNA との結合親和性に優れている[5]。これらの核酸から成る様々な二重鎖構造に対して、DFT 計算を行い、電子状態の相違を明らかにした。特に、二重鎖間の結合エネルギーの相違に注目して、どの核酸の組合せが、最も安定な二重鎖構造を形成するかを明らかにした。

### 【研究内容と結果】

初めに、分子設計支援ソフトウェア HyperChem を用い、3 塩基対からなる B 型の DNA 及び RNA 二重鎖構造を作成した。3'及び 5'末端には水素、バックボーンの PO<sub>4</sub> 部分にはカウンターイオン (Na<sup>+</sup>) を付加し、分子力場 AMBER を用いて構造最適化した。次に、PNA と LNA を作成するため、DNA あるいは RNA 二重鎖のバックボーンを PNA あるいは LNA に変更し、AMBER 力場で最適化して、LNA や PNA を含む二重鎖の構造を作成した。これらの構造 (Fig. 1) は、実験構造と比較し得る。

二重鎖構造の結合エネルギーを解析するため、非経験的分子軌道計算プログラム Gaussian03 の Perdew-Wang91 (PW91) 汎関数を用い、6-31G\*\*の基底関数で電子状態を計算した。その際、基

底関数重なり誤差 (BSSE) を考慮し、counterpoise 法による補正を行い、結合エネルギーを解析した。各二重鎖構造の、一重鎖間の結合エネルギーを Table 1 に示す。PNA と RNA 間の結合エネルギーが最大 (74.7 kcal/mol) であり、RNA と RNA 間の結合エネルギーが最小であり、59.7 kcal/mol であった。ここで注目すべきことは、LNA や PNA を含む二重鎖は、従来の DNA-DNA や RNA-RNA よりも結合エネルギーが大きくなることである。これは、PNA や LNA が DNA とより安定な二重鎖を形成するという実験結果と定性的に一致する。

この結果を理論的に説明するため、各二重鎖構造の水素結合部位の電荷分布を解析した。その結果、PNA や LNA を含む二重鎖では、水素結合に関与する水素原子の電荷が、DNA-DNA や RNA-RNA 構造の電荷と比較して大きいことが明らかになった。そのため、PNA や LNA を含む二重鎖では水素結合がより強くなり、結合エネルギーが大きくなったと結論できる。特に、実験で一重鎖間の親和性が特に高いとされている LNA-RNA と PNA-DNA では、水素結合の大きさが顕著に現れている。これらの結果より、PNA や LNA が、DNA チップに代わる新たなバイオチップとして利用できることを示した。

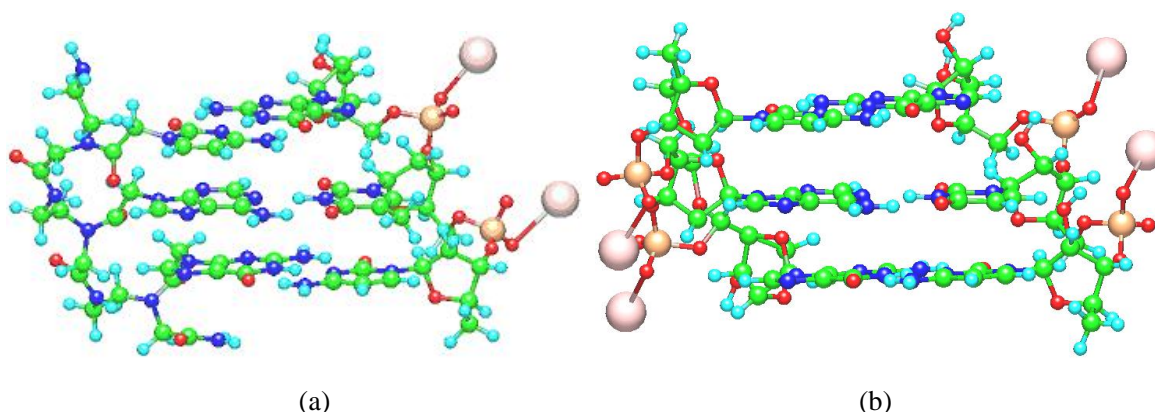


Figure 1. Optimized structures of (a) PNA-DNA and (b) LNA-RNA with the base sequence : 5'- CAG -3' obtained by molecular mechanics calculations based on AMBER force field.

Table 1. Binding energies (kcal/mol) between single strands for double strands.

	DNA	RNA	LNA	PNA
DNA	-65.7			
RNA	-73.5	-59.7		
LNA	-72.2	-70.9	-73.6	
PNA	-71.5	-74.7	-69.7	-69.1

### 【謝辞】

本研究は、日本学術振興会の科学研究費補助金 (特別研究員奨励費、18・282) の援助を受けて行われた。

### 【参考文献】

- [1] B. S. Gaylord, A. J. Heeger, G. C. Bazan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **2002**, 99, 10954.
- [2] O. Lioubashevski, F. Patolsky, I. Willner, Langmuir, **2001**, 17, 5134.
- [3] T. Natsume, Y. Ishikawa, K. Dedachi, N. Kurita, Chem. Phys. Lett., **2006**, 418, 239.
- [4] T. Natsume, Y. Ishikawa, K. Dedachi, T. Tsukamoto, N. Kurita, Int. J. of Quan. Chem., **2006**, in press.
- [5] M. Petersen, J. Wengel, Trends Biotechnol., **2003**, 21, 74.