

2019 年度 博士論文

3D-RISM 理論、分子動力学、そして  
QM/MM メタダイナミクスから導く  
*EcoRV* の DNA 切断反応における  
水分子と  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの役割  
要約

九州工業大学大学院 情報工学府  
情報工学専攻  
生命情報工学分野

大西到

学生番号 17794041

指導教員 入佐 正幸

# この文章の位置づけ

新規研究結果の学術雑誌への公開まで、学位論文の全内容の九州工業大学学術機関レポジトリへの登録を猶予されている。そのため、公開可能な部分の中から抜粋し「要約」として暫定的に公開する。

まず、全体の「概要」を示す。次に、第 I 部から、「序」の「概要」および「本研究の独自性と目的」、「方法」の「研究対象 (制限酵素 *EcoRV*)」、そして、「結論」の「加水分解反応前の scissile リン酸基付近の DNA の変形による反応前駆体形成」を示す。更に、第 II 部から、「序」、「STCSB の概要」、「特徴」、そして、「結論」を示す。最後に、「共同研究者一覧」を示す。それ以外の項目は、項目名のみを示す。

## 概要

本研究では II 型の制限酵素 *EcoRV* による DNA 切断における水分子と  $Mg^{2+}$  イオンの役割を、統計力学理論および計算科学手法から導いた。3D-RISM 理論により新たに得られた  $Mg^{2+}$  イオンの結合部位に  $Mg^{2+}$  イオンを置いた分子動力学計算を行い、DNA が構造変化を起こした反応前駆体の構造を得た。さらに DNA 切断を QM/MM メタダイナミクスにより追った。また、計算科学支援ツールを関数型言語 Scala を用いて開発した。

生命体中には DNA の切断に関わる「制限酵素」と呼ばれる蛋白質群が存在し、DNA の「修復」や「編集」においてその機能を発揮している。II 型の制限酵素である *EcoRV* は加水分解反応によって DNA の特定の配列を切断するが、 $Mg^{2+}$  イオンを必要とすることにその特徴がある。本研究は理論化学物理における 3つの方法 (3D RISM/RISM, 分子動力学、量子力学) を駆使して、*EcoRV* による DNA 切断反応における水分子と  $Mg^{2+}$  イオンが果たす役割を明らかにする。

*EcoRV* による DNA 切断反応は加水分解反応であるため、反応のひとつの基質として水分子の存在が必須であり、基質とは別の水分子の求核攻撃により加水分解が起こるとされている。これらの水分子の位置やそれ以外の水分子の役割については未だ明らかになっていない。さらに、この加水分解反応では  $Mg^{2+}$  イオンを必須とするが、その活性部位における位置や役割についても未だ共通の理解は得られていない。したがって、*EcoRV* の活性部位における水分子と  $Mg^{2+}$  イオンの位置と役割を明らかにすることはその反応機構を解明する上での鍵となる。

Viadiu らは II 型の制限酵素 *BamHI*-DNA 複合体の X 線結晶解析において、最初  $Ca^{2+}$  イオンを使って結晶化し立体構造を得た後、 $Mn^{2+}$  イオンを染み込ませることで結晶内で反応を進行させ DNA が切断された立体構造を得ることに世界で初めて成功している。得られた DNA 切断前後の活性部位の立体構造を比較すると、活性部位において scissile リン酸基を挟むように位置する 2 個の金属イオンの位置はほとんど同じであり、さらに触媒残基の位置もほとんど変わらなかった。しかし、*EcoRV*-DNA 複合体では、*BamHI*-DNA 複合体と同じ位置に金属イオンが見られる結晶構造はこれまで得られていないため、*EcoRV* と

*Bam*HI は反応機構が異なるとされてきた。また、X線結晶構造では精度の問題から水分子と区別が付きにくい金属イオンの位置に任意性が残ることも知られている。

分子動力学 (MD) においても水分子および金属イオンの取り扱いが簡単ではない。なぜなら X 線結晶構造では精度の問題から水分子の位置が全て解っているわけではない。また金属イオンはその水溶液中の濃度から MD 計算での周期境界条件における計算単位となるセルの中に数個しか存在しない見積もりになるため、金属イオンに関する計算結果を統計量として扱うことが難しい。

以上述べてきた従来の実験的、理論的方法論の弱点を克服するため、本研究では酵素活性部位における水分子やイオンの位置あるいは配向を 3D RISM/RISM 理論により計算する。3D RISM/RISM 理論は液体の統計力学に基づき位相空間における配置積分を求める手法である。MD シミュレーションも同様に配置積分を求める手法のひとつであるが、MD がニュートン方程式を数値的に積分することによって配置積分を行うのに対して、3D RISM/RISM 理論ではそれを解析的に行うことに特徴があり、熱力学極限およびエルゴード極限を解析的に行っている。

本研究では、まず、*Eco*RV の活性部位に結合した  $Mg^{2+}$  イオンおよび水分子の空間的分布を 3D RISM/RISM 理論により決定した。その結果、2 個の  $Mg^{2+}$  イオンの分布は Kostrewa らや Horton らによって得られた X 線結晶解析の結果とよく一致したが、それ以外にもうひとつ別の位置 (site IV† と呼ぶ) に顕著な分布を見出した。そこで、一個の  $Mg^{2+}$  イオンを site IV† に置いて蛋白質水溶液全体の MD シミュレーションを実行したところ、DNA が構造変化を起こし、DNA の切断に関わる scissile リン酸基が振じれることが分かった。さらに site IV† に  $Mg^{2+}$  イオンを置いたことによって誘起された活性部位の立体構造は類似蛋白質である *Bam*HI の活性部位のそれと 2 個の金属イオンの位置も含め極めて似ていた。このことは *Eco*RV と *Bam*HI の構造の違いは実験の「条件」や「精度」の違いというよりむしろ反応の進行に伴う  $Mg^{2+}$  イオンや水分子を含む蛋白質-DNA 複合体の構造変化に起因しているということを示唆しているのである。本研究ではさらに得られた構造をもとに加水分解反応に関する量子力学計算を行った。その結果、3D RISM/RISM 理論で推測した  $Mg^{2+}$  イオンの新しい結合位置および求核剤や基質候補として働く水分子が反応機構において本質的役割を演じていることが明らかとなった。

本研究での計算における対象は蛋白質-DNA 複合体であり、X 線の精度もあまり良くなかったため、X 線で見えなかったペプチド鎖の原子位置をモデル化により補完している。補完された溶質の立体構造を元に 3D RISM 理論計算の入力構造を作成する。これらのことを行うために今回、Scala 言語を用いた生体分子のための計算科学用ツールを作成した。さらに、分子グラフィックスを用いた分子構造の可視化 (VR デバイス利用を含む) により、計算を行なう際の人為的なミスをも最小限にするための工夫を行った。このツールを作成するにあたり、情報処理分野において広く用いられている MVC モデルを採用し、Scala 言語が関数型言語の特徴も持つ言語である利点を生かすツールにした。このツールはクロスプラットフォームで動作し、Java バージャルマシン上で動作させる。

以上のように、本研究では、情報処理手法を用いたツールを開発しながら、対象である蛋

白質分子と核酸分子の複合体における加水分解の機構を探った。結果として類似蛋白質と共通の反応機構を持つことを示唆する結果を得た。このことは、ATP の加水分解を含む、蛋白質によるリン酸基の加水分解の反応機構に対し、統計力学理論および計算科学手法を用いて迫る第一歩になったと位置づけられる。

## 第 I 部

# 3D-RISM 理論、分子動力学、そして QM/MM メタダイナミクスから導く *EcoRV* の DNA 切断反応における水分子と $\text{Mg}^{2+}$ イ オンの役割

## 1 序

### 1.1 概論

制限酵素は特定の DNA 配列のみを特異的に認識し、DNA 二重鎖を選択的に加水分解で切断する [1]。そのため、遺伝子工学のツールとして使われている。制限酵素のうち II 型制限酵素は DNA 加水分解に ATP を必要としないが、カチオンの種類と濃度といった溶液条件が反応性に大きく影響する [1]。例えば、II 型制限酵素の一種である *EcoRV* は反応活性に溶媒中の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが必要である。従って、反応活性に  $\text{Mg}^{2+}$  イオンがどんな役割を持っているかを調べることは非常に重要である。*EcoRV* による DNA 加水分解反応の研究では、二つの重要な特徴を明らかにしなければならない。一つは、活性部位中の水分子、特に DNA 加水分解反応において求核剤および基質として働く水分子、の位置と配向である。もう一つは、反応に活性化剤（または「補因子」）として直接関わるカチオンの位置である。DNA 加水分解反応の機構を解明するためには、反応に直接関わるカチオンと求核剤や基質として働く水分子の相対的な配置が重要となる。

Kostrewa と Winkler は X 線結晶解析を用いて、DNA 加水分解反応前に相当する *EcoRV*-DNA 複合体 (PDB ID: 1rvb) の触媒部位中での水分子と  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの位置、配向を調べた [2]。 $\text{Mg}^{2+}$  イオンリッチな状態での結晶化によって、ホモダイマーである *EcoRV*-DNA 複合体の試料が用意された。彼らの実験から導かれたモデルによれば、*EcoRV*-DNA 複合体はそれぞれのサブユニット中の活性部位に 2 個の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが存在する。それぞれのサブユニットに 2 個の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが存在するとした仮定は、制限酵素による DNA 加水分解反応の研究には極めて重要である。しかし、更にこれらの研究を発展させるためには、二つの問いへの答えが必要となる。第一に、 $\text{Mg}^{2+}$  イオンはホモダイマーの内の 1 つのサブユニット中でしか見つからなかった。この発見は、物理化学的な直感に反する。ホモダイマーの両サブユニット中の活性部位への  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの結合アフィニティは、同じであるべきだからである。この問題は試料の結晶化中に生じた可能性があり [3]、ホモダイマーの対称性が破れたか、電子密度マップの解析中に生じたアーティファクトである可能性も考えられる。第二に、Kostrewa らによって報告された水分子の位置と配向である。我々は彼らの結果を決定的ではないと判断するが、別の観点から注意深い検討が必要である。

蛋白質中での水分子と小さなカチオン、例えば  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの位置あるいは分布を決定する方法は、十分に立証された方法であるが複数の理由から簡単な仕事ではない。X 線のデータから、蛋白質中の水分子や小さなイオンの位置（あるいは分布）を求める従来の方法は、試行錯誤を必要とする。水分子とイオンを幾つかの試験的位置に配置し、実験で観測された系全体の電子密度と最も一致する場所を探す。場合によっては、分子動力学がこの試行錯誤を支援するために用いられる。しかしながら、この方法では初期配置として水分子やイオンの試行による配置と配向の選択を必要とするため、分子動力学シミュレーションによる方法では限界がある。水分子とイオンを含む溶媒の試行すべき配置と配向に対応する配位の数膨大であり、全ての配位をシミュレーションで評価することは不可能である。これには、活性部位中の水分子やイオンの数、そしてそれら溶媒分子の多種多様な配位の方法、つまり配置と配向も含まれる。溶媒の配置と配向は熱力学的平衡状態で決定されるべきであり、これは活性部位内外での各種溶媒の化学ポテンシャルが等価であることを意味する。しかしながら、化学ポテンシャルを決定するためには、サンプリング (アンブレラサンプリングや熱力学的摂動) を実行するために水分子やイオンを試行により適当な位置に配置する必要がある。つまり、この流儀で決定した水分子やイオンの位置と配向は決定的なものではなく、仮定を含むため他の手法によって検証する必要がある。

この研究では、*EcoRV*-DNA 複合体での水分子と  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの分布を、統計力学手法の積分方程式理論の three-dimensional reference interaction site model (3D-RISM) 理論と reference interaction site model (RISM) 理論 [4-6] によって調べた。3D-RISM/RISM 理論は蛋白質や DNA といった生体分子に結合する小分子を発見する能力を持っていることが、これまでにイオン/水のチャネルや酵素などへの応用を通じて実証 [7-9] されてきた。この手法は水分子やイオンといった溶媒分子の配置と配向を初期条件として必要としないことから、特に上記のような問題を解決するために適した手法として位置づけられる。

また、近年、化学反応の反応機構解明のために量子力学計算が精力的に行われている。特にリン原子や金属原子など、これまで電子状態の計算が難しかった原子を含む分子を対象とする計算が行われており、密度汎関数法の登場による計算負荷の低減、および、より精度の高い結果を求めた基底関数の改良が行われている。各種ヌクレオチドの加水分解反応は特に注目され、非酵素存在下と酵素存在下での反応が盛んに研究されている。例えば ATP 加水分解の場合、非酵素存在下での反応 [10, 11] が挙げられる。量子力学計算結果によって過去教科書に載っていた定説が覆る可能性も出ており、酵素存在下での ATP 加水分解反応 [12, 13] についても計算が行われている。他にも、DNA ポリメラーゼ I [14]、RNase HI [15]、ハンマーヘッドリボザイム [16]、endonuclease IV [17] など、様々な酵素による触媒反応が量子化学計算によって研究されている。本研究では、3D-RISM 理論と分子動力学法によって得られた DNA 加水分解に適した活性部位の構造を持つ熱平衡状態の立体構造から、*EcoRV* による DNA 加水分解がどのように起こるかを、量子化学計算を用いて解析した。

## 1.2 *EcoRV* 活性部位の立体構造

## 1.3 求核剤攻撃により引き起こされる *EcoRV* の DNA 加水分解

## 1.4 これまでの活性部位の立体構造に関する研究における問題点

## 1.5 加水分解に必要な触媒残基

## 1.6 活性部位の電子状態

## 1.7 類似蛋白質の活性部位との比較

## 1.8 本研究の独自性と目的

### II 型制限酵素の DNA 加水分解反応中の金属イオン位置の研究

II 型制限酵素である *Bam*HI では、Viadiu らによって DNA 加水分解前後の X 線結晶構造が同一結晶に対して得られている [18]。金属イオンの位置は、反応前の X 線結晶構造 (PDB ID: 2bam) と反応後の X 線結晶構造 (PDB ID: 3bam) とともに site A, B と名付けられた位置で同じだった。このことから、一般的な II 型制限酵素の DNA 切断反応中の金属イオンの位置は、site A, B と思われている。一方、*EcoRV* での X 線結晶解析では site B に相当する位置に金属イオンが存在する構造が得られていないため、*Bam*HI に代表される一般的な II 型制限酵素とは異なる反応機構を持っているとされていた。

### 1.8.1 *EcoRV* のこれまでの研究の中での本研究の位置づけ

*EcoRV* は II 型制限酵素 [19] の 1 つであり、DNA の特定の配列を認識し特異的に切断する DNA 分解酵素の 1 つである。この機能から遺伝子工学において重要なツールとして用いられている。この酵素の反応機構を理解することは遺伝子工学におけるツールの改良に繋がるだけでなく、制限酵素本来の役割である外来の DNA すなわちウイルスの感染および増殖を防ぐための方策を探ることにも役立つと思われる。制限酵素は核酸分解酵素であるためリン酸ジエステル加水分解酵素でもある。リン酸分解酵素群のリン酸モノエステル加水分解酵素に ATP 加水分解酵素が含まれることを考えると、リン酸ジエステル加水分解酵素の反応機構の研究は、生物学において非常に重要な位置にあることがわかる。

しかし、現状では酵素を用いない  $Mg^{2+}$  イオンによる ATP の加水分解といった比較的小さな系であっても反応機構に関する論争が続いており、解明すべき課題が山積している [10, 11, 20, 21]。特に計算科学すなわちコンピュータを用いた計算機実験においても、リン酸モノエステルやリン酸ジエステルの加水分解は精力的に研究が行われており、特に酵素を用いた場合に用いなかった場合と比べ反応機構が変わるのかについて議論が続いている [14, 16]。リン酸モノエステルとリン酸ジエステルの加水分解においては、補因子である金属イオンに配位した求核剤が切断部位のリン酸基のリンを求核攻撃することにより加水分

解反応が起こると思われる。今回研究の対象とした *EcoRV* が属する II 型制限酵素は反応に  $Mg^{2+}$  イオンが必須であり、反応そのものには他の制限酵素とは異なり ATP を必要としない。

II 型制限酵素の中で最も精力的に実験や計算科学での研究が行われているのが *EcoRV* である。*EcoRV* と DNA 断片との複合体の立体構造が X 線結晶解析により複数得られている。反応前後の 3 つの状態 ( $Mg^{2+}$  イオンを含まない DNA 切断前、 $Mg^{2+}$  イオンが活性部位に配置した DNA 切断前、 $Mg^{2+}$  イオンが活性部位に配置した DNA 切断後) ついても、Kostrewa と Winkler によって立体構造が得られている。[2]

Imhof らが行った量子化学計算を用いた先行研究 [22] においては、酵素を用いない  $Mg^{2+}$  イオンだけによるリン酸ジエステルの加水分解においては associative reaction pathway であったが、*EcoRV* 内では dissociative reaction pathway であると結論づけている。associative reaction pathway とは  $S_N2$  反応に似た反応であり、求核剤 (ここでは水分子または水酸化物イオン) がリン酸基のリンを求核攻撃したうえで trigonal bipyramidal 構造をもつ中間体を形成し、次に scissile ボンドが切断される。dissociative reaction pathway においては先に scissile ボンドを切断し次に求核剤がリン酸基と結合する。2 つの mechanism ではともに求核剤が  $Mg^{2+}$  イオンの配位子として反応に寄与する。Imhof らの計算は複数の反応経路を検討し、反応経路での量子化学計算による活性化エネルギーの違いから dissociative reaction pathway と結論づけた。しかし、Imhof らのこの研究では、DNA の構造、特に scissile ボンドのリン酸基の位置と向き、そして  $Mg^{2+}$  イオンおよび水分子の位置、が意図的に選んだ複数の X 線結晶構造をもとに推定した構造になっており、 $Mg^{2+}$  イオンおよび水分子の初期配置には疑問が残る。特に Imhof らが MD 計算に使用した *EcoRV* の立体構造は元々アミノ酸置換した際の構造を人工的に元のアミノ酸に戻しており、 $Mg^{2+}$  イオンの初期配置は好ましくないものとなっている可能性が高い。

Horton らは活性部位周辺に位置するアミノ酸残基 Thr93 を Ala に置換した X 線結晶構造を観察した結果、wild type ですでに得られている *EcoRV*-DNA 複合体の立体構造について疑問を呈した [3, 23]。wild type の立体構造での  $Mg^{2+}$  イオンの位置は反応の前後の状態を表していないとし、求核剤の求核攻撃を助ける位置に実際の反応では  $Mg^{2+}$  イオンが配置していると主張した。この研究段階においても、DNA 切断反応において 2 個の  $Mg^{2+}$  イオンが必要だということは蛍光ストップ・フローや結晶へのイオン浸潤による別のグループの実験 [24, 25] から解っていたが、その 2 個の  $Mg^{2+}$  イオンが活性部位のどこに位置しているかについては論争が続いており、現在でも最終的な結論は得られていない。Horton らが新たな  $Mg^{2+}$  イオンの配置位置を提案した背景には、同じ制限酵素の類似蛋白質の *BamHI*-DNA 複合体の立体構造 [18] と比較した結果から、対応する同じ位置に  $Mg^{2+}$  イオンがあるのではないかと考えたことが一因である。また、X 線結晶構造解析では見られていないが、Horton らが行った *EcoRV*-DNA 複合体のエネルギー極小化計算 [23] におい



て scissile ボンドのリン酸基が DNA の局所的な変形により向きを変えている。このリン酸基の回転により求核剤がリンを攻撃しやすくなっている。回転後の向きは類似蛋白質とよく似た向きになっている。これらのことから、Horton らは制限酵素における DNA 分解反応において統一的な反応機構があると推測しており、*EcoRV* においては何らかの理由で天然状態での *EcoRV*-DNA 複合体の X 線結晶構造は本来の反応直前または直後の立体構造を反映していないと主張している。これらのことから、まず最初に *EcoRV* の加水分解反応の反応経路を考察する際に古典力学に従った分子動力学および統計力学計算を行い *EcoRV* の DNA 複合体での立体構造、特に scissile ボンドのリン酸基の位置及び向きそして  $Mg^{2+}$  イオンや水分子の位置を考察することが必要と考える。

$Mg^{2+}$  イオンや水分子は本来溶媒であるため、X 線結晶解析において位置情報の正確さは十分であるとは言えない。また、分子動力学を用いる場合、 $Mg^{2+}$  イオンは数が水分子に比べ非常に少ないため、一般的には人間が推測する任意の位置に初期位置として配置し計算を行う場合が多い。すなわち、 $Mg^{2+}$  イオンが活性部位のどこに最も高い確率で分布するかは、現状のコンピュータの性能を以ってしても分子動力学では正確には推測出来ない。一方、統計力学を用いた溶液化学の計算科学手法である平田らが開発した 3D-RISM 理論 [6] を用いた手法においては、水分子や  $Mg^{2+}$  イオンの分布を熱平衡状態での分布として計算することが可能である。つまり、 $Mg^{2+}$  イオンの位置を分子動力学法よりも正確に推測することが可能である。

今回の研究においては、まず古典力学の範囲内で 3D-RISM 理論を用いてすでに得られている X 線結晶構造での  $Mg^{2+}$  イオンおよび水分子の位置を推測し、そこに配置させた上で分子動力学を行い溶液内状態としての *EcoRV*-DNA 複合体の立体構造を計算により得る。そして、その得られた立体構造から出発し、DNA 切断反応について QM/MM 計算を行なう。このような手順を用いることにより、MD 及び QM/MM Metadynamics の出発構造の客観性を保ったまま *EcoRV* の反応機構を研究することができると考えた。これまでの先行研究と比べると、複数得られている *EcoRV*-DNA 複合体の X 線結晶構造に関する論争に引きずられることなく、物理学に基づく 3D-RISM の計算から得られた溶媒分布を用いることにより、生化学の対象である DNA 切断反応を、コンピュータを用いた計算によって研究する所に利点がある。

## 2 方法

### 2.1 研究対象 (制限酵素 *EcoRV*)

制限酵素は DNA のヌクレオチド鎖の途中の特定の配列（回文配列等）を認識して切断するエンドヌクレアーゼである。遺伝子工学において広く利用されているツールでもある。

今回研究対象とした II 型の制限酵素である *EcoRV* は DNA 二重らせんの特定の配列（図 1）を認識し 5'-TA-3' の部位を加水分解によって切断する。*EcoRV* は DNA に非特異的に弱く結合し、特定の配列が見付かるまで分子に沿って移動すると考えられている [26]。また、X 線結晶解析により *EcoRV* が結合することによって DNA にコンホメーション変化が起こり、DNA が湾曲し、認識する DNA 配列（同族 DNA 配列, cognate DNA sequence）部分は屈曲した A 型の立体構造になり、切断部位の副溝が広がり主溝が狭まることが判っている [3]。そして、DNA のリン酸ジエステル結合が蛋白質の活性部位で切断される。なお、この II 型の制限酵素の反応には ATP を必要としない。また、この反応には  $Mg^{2+}$  イオンが必須であると言われている [27]。

本研究では *EcoRV*-DNA の複合体の X 線結晶構造として PDBID:1bss, 1rva, 1rvb, 1rv, 1sx5 の 5 つを使用した。



図 1: *EcoRV* が認識する DNA 配列

## 2.2 *EcoRV*-DNA 複合体の X 線結晶構造

## 2.3 複合体の系のモデル化

## 2.4 分子性液体の溶媒和に対する統計力学

## 2.5 分子の運動方程式に対する計算科学

## 2.6 直接相互作用エネルギー計算に用いたパラメーター

## 2.7 今回使用した計算資源

# 3 結果と考察

## 3.1 DNA 加水分解反応前の活性部位中の溶媒分布 (3D-RISM)

## 3.2 DNA 加水分解反応の前駆体の形成 (分子動力学)

## 3.3 structure M からの DNA 切断反応追跡 (量子化学計算)

# 4 結論

## 4.1 加水分解反応前の scissile リン酸基付近の DNA の変形による反応前駆体形成

今回、3D-RISM と MD によって、II 型制限酵素 *EcoRV* による DNA 加水分解反応における、 $Mg^{2+}$  イオンと水分子の役割が一つ明らかになった。3D-RISM 計算によって得た *EcoRV*-DNA 複合体の X 線結晶構造中の  $Mg^{2+}$  イオンの分布を解析することで、我々は複合体の活性部位中に  $Mg^{2+}$  イオンの新たな結合部位 site IV<sup>†</sup> を発見した。発見した結合部位 site IV<sup>†</sup> は DNA 断片の変形において重要な役割を果たす。X 線結晶構造解析から定義された site I\* と今回理論で発見した site IV<sup>†</sup> に  $Mg^{2+}$  イオンを配置した初期構造を用いて MD を行った結果、熱平衡状態の立体構造 (structure M) が得られた。structure M では、scissile ボンドが求核剤の水分子の方に向く、つまり求核剤が scissile ボンドと一直線上に来るように scissile リン酸基がツイストしていた。また、structure M の活性部位の立体構造は、*EcoRV* の類似蛋白質である II 型制限酵素 *BamHI* と DNA 断片の複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 2bam) の活性部位によく似ていた (図??)。この類似性から、*EcoRV* と *BamHI* が DNA 加水分解反応において同じメカニズムをとる可能性が示唆された。今回の研究の鍵となった新たな結合部位 site IV<sup>†</sup> の発見には、統計力学手法である 3D-RISM が重要だった。

これまで *EcoRV* の X 線結晶解析において site IV<sup>†</sup> になが 2 価の金属イオンが発見されなかった理由は、site IV<sup>†</sup> に 2 価の金属イオンが配置すると反応中間体を取り、加水分解反応が進行してしまうからだと推測される。X 線結晶解析で反応中間体の立体構造を得るため

に、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンが広く使われている。類似蛋白質である II 型制限酵素 *PvuII* と DNA の複合体の X 線結晶構造 (PDB ID: 1f0o) は、site  $\text{IV}^\dagger$  に近い位置に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが配置している。*PvuII*-DNA 複合体の場合、*EcoRV* では Asp90 に相当する位置に Glu68 が配置している。この *PvuII*-DNA 複合体の立体構造は、まるで DNA 切断前の *EcoRV*-DNA 複合体のアミノ酸を一部のみ置換したような立体構造だった (図??)。 *EcoRV*-DNA 複合体においては site  $\text{III}^*$  が最も  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが配置しやすい結合部位である。一方、*PvuII*-DNA 複合体では site  $\text{III}^*$  相当の部分が Glu68 によって空間的に占有されている。このことから、 $\text{Mg}^{2+}$  イオンが配置しやすい位置である site  $\text{III}^*$  の存在が活性部位中の他の結合部位、まさに site  $\text{IV}^\dagger$ 、の発見をこれまで阻害してきたと考えられる。我々は統計力学手法の一種である 3D-RISM 理論を用いることで、理論的に site  $\text{IV}^\dagger$  を発見することができた。これは、3D-RISM 理論が各座標における溶媒分子の成分、水分子や金属イオン、の確率分布を求めることが可能な手法だからである。

今回 *EcoRV* に配置した  $\text{Mg}^{2+}$  イオンが、scissile リン酸基のツイストを引き起こした。site  $\text{I}^*$  に配置した  $\text{Mg}^{2+}$  イオンは scissile リン酸基のツイスト中、同じ位置を維持する。site  $\text{I}^*$  は図 2 にあるように、*BamHI*-DNA 複合体中の site A と同一とみなせる。一方、site  $\text{IV}^\dagger$  に配置した  $\text{Mg}^{2+}$  イオンは scissile リン酸基に対して相対的に同じ位置を維持し、ツイストに伴って一緒に移動した。移動後の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの位置は *BamHI*-DNA 複合体中の site B と呼ばれる金属イオンの位置であった。この結果は、*EcoRV*-DNA 複合体中の“2 つ目”の金属イオンの役割が、scissile リン酸基のツイストにより求核攻撃の準備を行うことだという可能性を示唆している。*BamHI* の場合、“2 つ目”の金属イオン、つまり site B、はおそらく求核攻撃の際に scissile ボンドの向きを安定化することだと推測される。今回、分子動力学シミュレーションから得た *EcoRV*-DNA の熱平衡状態の立体構造 structure M と、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンを 2 個/活性部位含む *BamHI*-DNA 複合体の X 線結晶構造 2bam は、同じ求核攻撃のメカニズムをとることが推測される。*BamHI* による DNA 加水分解反応のメカニズムはまだ解明されていないが、今現在提唱されているのは one metal メカニズムと、associative, dissociative, concerted の 3 通りの DNA 切断経路を含む two metal メカニズムである。我々の結果は、この 2 つの酵素による DNA 加水分解反応について新しい識見を提供し、*EcoRV* の議論において *EcoRV* と *BamHI* が DNA 加水分解反応において共通の求核攻撃の仕組みをとる議論を可能にする。*EcoRV* と *BamHI* の残る相違点である scissile リン酸基のツイスト前の  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの位置および他の  $\text{Mg}^{2+}$  イオン結合部位は、DNA 配列の認識および配列特異的に DNA を切断する仕組みに影響すると考えられる。

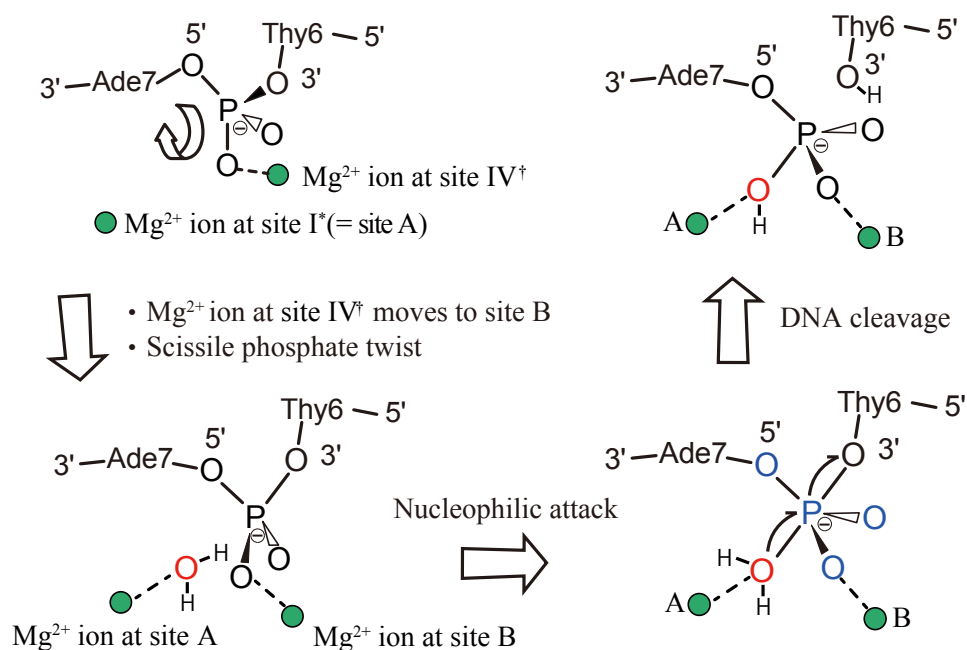


図 2: *EcoRV* の “Two-metal ion mechanism with a scissile-phosphate twist induced by displacement of the second-metal ion” の概念図。求核剤（赤の O）は水分子あるいは水酸化物イオン。scissile リン酸基ツイスト前の活性部位の立体構造は、*PvuII*-DNA 複合体の X 線結晶構造中の活性部位に、scissile リン酸基ツイスト後の活性部位の立体構造は、*BamHI*-DNA 複合体の X 線結晶構造中の活性部位に似ていた。参考文献 [28] の図 15 を引用。

また、scissile リン酸基のツイストが起き structure M を得た 1ns MD のトラジェクトリーでは、二つの  $Mg^{2+}$  イオン共に、配位子の交換は起きず、配位子となっている水分子も移動しなかった。最新の Amber 力場を用いた 10ns MD でも同様に structure M が得られ、配位子の交換は起きず、配位子となった水分子も移動しなかった。このことは、DNA のエネルギーパラメーターの小さな変更よりも、水分子の幾何学・エネルギーパラメーターに TIP5P を採用したことが大きかったことを示唆している。つまり、水分子の水素結合の距離及び向きは水分子の孤立電子対の向きを具体的に再現する TIP5P の採用により精度を増したと考えられる。TIP5P は 5 サイトモデルであるため計算量は多くなるが、水素結合ネットワークの再現性が高いシミュレーションを行うことができる。水分子に TIP3P を用いても scissile リン酸基のツイストは起きるが、水素結合ネットワークの再現性には疑問が残る。

## 4.2 反応前駆体形成後の DNA 切断反応経路の候補

## 第 II 部

# Scala 言語で作成した生体分子の計算科学のためのツール, STCSB

## ——*EcoRV* の DNA 切断反応における水分子と $\text{Mg}^{2+}$ イオンの役割の計算科学による解析を目的として開発

以下の内容については既に論文としてまとめ、Biophysics and Physicobiology で公開している [29]。

## 5 序

現在、生体高分子を対象とする研究を行う際、Amber [30], CHARMM [31], GROMACS [32] などの複数の分子シミュレーションパッケージを研究者は利用できる。多くの場合、分子シミュレーションの前処理後処理のためには、これらのパッケージとは別のツールを組み合わせる必要がある。Amber の場合、AmberTools [30] が最もよく使われるユーティリティツールである。分子グラフィックスシステムである UCSF Chimera [33] や VMD [34] は分子の可視化だけでなく、分子モデリングや上記パッケージを用いた分子シミュレーション結果の解析に使用される。MDAnalysis [35] や MD-TASK [36] は分子動力学シミュレーションのトラジェクトリを解析するツールである。

ほとんどの場合、研究者は分子科学アプリケーションパッケージと、それを補助する複数のツールを使用する。それぞれのツールには、ツール開発時の目的に応じた科学的あるいは技術的観点に由来する利点を持っている。複数のツールを管理するために、研究者は複数のコマンドを並べたシェルスクリプトを用意する必要があり、シェルスクリプトの内容は目的や必要な計算に応じて様々である。例えば CHARMM-GUI [37] であれば、この複数のツールを組み合わせるための工程を単純化するため、CHARMM パッケージ用のツールを Web アプリケーションの形でまとめている。しかし、CHARMM-GUI のメニューは固定されており、事実上ユーザにそれらをカスタマイズすることは許されていない。

アプリケーションフレームワーク [38] とは、アプリケーションソフトウェアの基本構造を実装するライブラリの集合からなるソフトウェアフレームワークである。アプリケーションフレームワークの一種として、特などに広く知られている例は Web サービスに適用されている Ruby on Rails があげられる。Ruby on Rail は GitHub, Airbnb, Kickstarter, そして Square などの開発に使用されている。

Model-View-Controller (MVC) architectural pattern を使用してアプリケーションフレームワークを実装することは、研究者が複数の計算分子科学ツールを扱う際に有効な手段となる。MVC architectural pattern の Model コンポーネントを他の要素から切り離すことで、他の研究者や研究グループが開発した新たな分子科学ツールを組み合わせる

ことが容易になる。この状況は Web アプリケーション開発に似ているため、MVC の各要素の対応関係を比較して理解することができる。Web アプリケーション開発分野におけるアプリケーションフレームワークは、リレーショナルデータベースに接続しデータを扱う部品 (Model コンポーネント)、Web ページの美しいレイアウト (View コンポーネント)、そして Web ページ上でのマウス操作へのインタラクティブな応答 (Controller コンポーネント)、を含む新しい Web アプリケーションを開発者が作ることを助ける。このうち、リレーショナルデータベースへの各種要求の接続部分が、計算科学ツールそれぞれとのインターフェイスを作成することに対応している。

以上のように、生体分子を研究対象とする研究者は、MD、量子化学、統計力学、分子グラフィックスなどの為に作られた分子科学パッケージを可能な限り深いレベルの連携で研究に活用できるような、使いやすく、カスタマイズ性の高いツールを必要としている。この部では、我々が Scala を用いて開発した Scala tool for the computational science of biomolecules (STCSB) について述べる。STCSB は MD, three-dimensional reference interaction site model (3D-RISM) [6] 計算実行のための準備を可能とする。STCSB の開発の動機は 3D-RISM 計算の前処理と後処理を容易に行うことであり、それが当初の目的だった。ソースコード開発にフレームワークの哲学 (philosophy) を採用していることが、STCSB のその後の多くの機能拡張につながった。

## 6 STCSB の概要

STCSB はアプリケーションフレームワークの哲学を元に、MD や 3D-RISM 計算の準備及び解析を行うために作成された。STCSB では、MD や 3D-RISM 計算の入力ファイル用意に分子モデリングソフトウェアパッケージである Tinker [39] を使用する。この観点から見れば、STCSB は Tinker のグラフィカルユーザーインターフェース (GUI) と位置付けられる。

3D-RISM 計算入力ファイル作成において必要とされる Tinker のプログラムについては、一部ソースコード (Fortran で記述) を Scala で再実装している。同時に、我々は Tinker でモデル化した標的分子の構造を視覚的に確認する分子グラフィックスのアプリケーションプログラミングインターフェース (API) を STCSB 内で提供した。

STCSB の強みの一つは、MD と 3D-RISM 理論 (統計力学手法) を組み合わせて使用する点である。例えば、MD シミュレーションの出発構造中での蛋白質周囲の溶媒分子 (水分子やイオン) の座標は 3D-RISM 計算から求めることができる。この例の場合、3D-RISM 理論で予測された位置とは異なる位置に金属イオンがあるなどの、X 線結晶構造中での溶媒分子の座標の曖昧さは効率的に複数の MD シミュレーションを行うことで取り除かれた [28]。

## 7 特徴

主な特徴

STCSB の特徴は以下を含む。

1. Java バージュアルマシン (JVM) 上で動く jar ファイル (Java バイトコード) で配布され、プラットフォーム非依存のアプリケーションである
2. 階層構造をもった XML ベースのデータフォーマットである Protein data bank markup language (PDBML) を処理できる
3. CUI や GUI の選択肢があるアプリケーションプログラミングインターフェース (API) を用意している
4. 分子グラフィックス用の API を用意している
5. MVC architectural pattern を用いた、拡張性の高いソースコード
  - (a) 外部プログラム（言語は問わない）を呼び出すシェルスクリプトに似た書き方 (Model コンポーネント)
  - (b) 単一のプログラミング言語（この場合 Scala）を用いた CUI/GUI 分子グラフィックス (Controller/View コンポーネント)

Android 上で移植版も動作する。Android は JVM を持たないが、Java API を有しているからである。移植版は Android スマートフォン/タブレットで Android アプリケーションとして動作した。

## 7.1 必要とするライブラリ

STCSB は以下のライブラリを含む (図 3)。

- Standard Widget Toolkit (SWT)
- Lightweight Java Game Library (LWJGL)
- scala-xml
- scala-parser-combinators

これらのライブラリは STCSB では一つの jar ファイルとしてまとめられ、配布される。MD と 3D-RISM 計算の前処理を行うためには、別途 Tinker が必要となる。



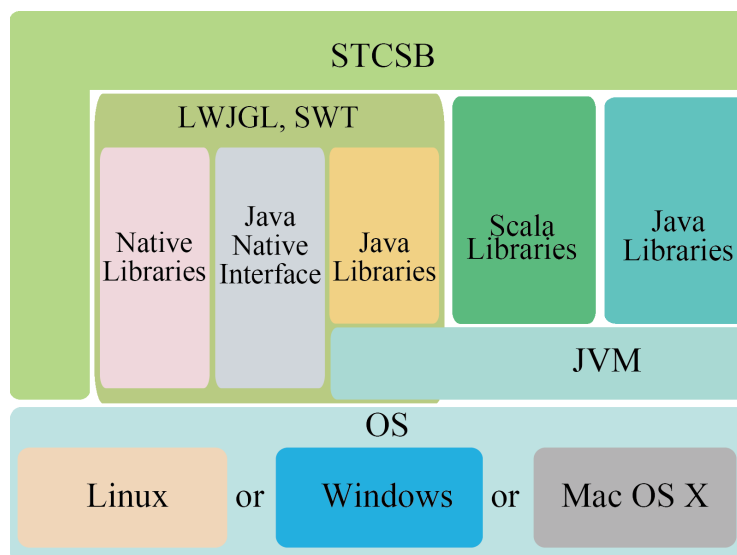


図 3: STCSB の概念図。参考文献 [29] の図 1 を引用。

## 7.2 用意した API

我々は、3D-RISM や MD で生体分子を学習する際の Model コンポーネントとして、いくつかの API を用意した。プログラミングに精通していないユーザーでも、簡単に Model コンポーネントを追加できる。また、プログラミングに精通したユーザーであれば Model コンポーネントを言語の指定なく実装できる。ただし、共通するラッパー部分は Scala が必要となる。これらにより、更に複雑なタスクも実行できる。

### 7.2.1 3D-RISM 計算及び Amber での MD シミュレーション実行の前/後処理を支援するキャラクターユーザーインターフェース (CUI)

この CUI は、下で紹介するものを含むプログラムのほぼ全ての機能呼び出すことができる。MVC architectural pattern に従い、CUI は Model, View, Controller の三つのコンポーネントに分けられる (図 4)。Controller コンポーネントを編集することで、ユーザーは CUI のコマンドとサブプログラムの対応付けの追加/変更を行うことができ、Model コンポーネントを一切変更することなく目的の機能を実行できる。

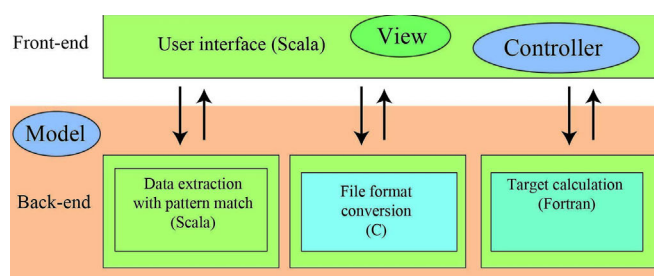


図 4: MVC architectural pattern に従って実装した STCSB の概念図。参考文献 [29] の図 2 を引用。

### 7.2.2 3D-RISM 前処理のための GUI

SWT と LWJGL を使い、3D-RISM 計算の前処理を支援する GUI を Scala 言語で作成した (図 5)。この GUI はシェルスクリプトのように、他のプログラミング言語 (Fortran, C, Python, Java など) で実装された各機能を実行することができる。

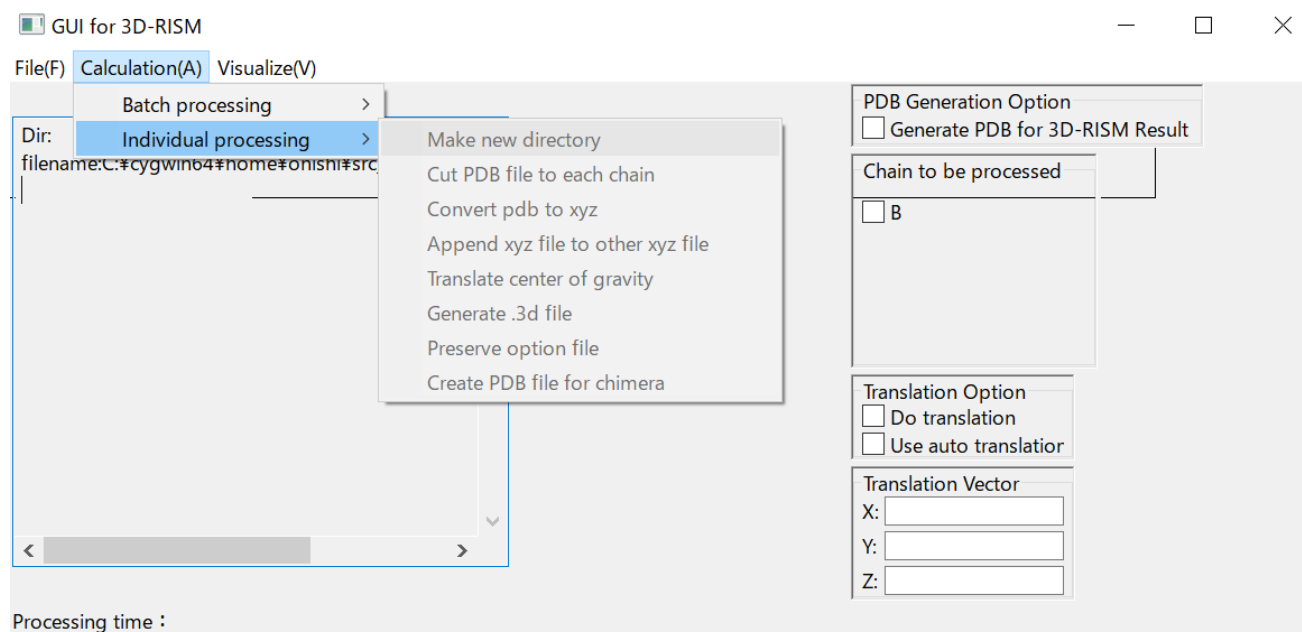


図 5: 3D-RISM 計算の前処理のための組み込みメニューを持つ STCSB GUI。参考文献 [29] の図 3 を引用。

### 7.2.3 PDBML ファイルの読み書きを行うプログラム

PDBML の読み込み/編集/書き出しを行うプログラムを Scala で実装した。このプログラムは、ユーザーが PDBML を利用して計算の初期構造を作成することを可能とする。原子の情報は Scala の case class である AtomInfo のオブジェクトとして格納される。他のプログラムから、このプログラムを PDBML 操作のために呼び出せる。

### 7.2.4 PDB/PDBML ファイル内の原子と残基の配列のバリデーションを行うプログラム

DNA 鎖とペプチド鎖の配列のバリデーションを行うプログラム PDBValidator を Scala で実装した。このプログラムは PDB/PDBML ファイルといった入力ファイル中の原子と残基のバリデーションを行う。X 線結晶解析では、蛋白質の熱揺らぎが原因で幾つかの原子や残基の座標が割り当てられていない場合がある。PDB/PDBML ファイルは REMARK 情報に原子と残基の座標の欠けの記述がある筈だが、計算の出発構造準備において、原子と残基のバリデーションは重要である。

PDBValidator は CUI から呼び出すことができる。このプログラムは検証結果を標準出力に表示する。座標が割り当てられていない残基は “Missing residues:” の後に、座標が割り当てられていない原子は “Missing atoms:” の後に表示される (ソースコード 1)。

### ソースコード 1: PDBValidator の出力例

```
-----  
Validating DNA in Chain C  
-----  
-----  
Validating DNA in Chain D  
-----  
-----  
Validating AminoAcids in Chain A  
-----  
Missing atoms: CG,OD1,ND2 in 9-ASN  
.  
.  
.  
Missing atoms: CG,CD,OE1,OE2 in 57-GLU  
Missing residues: res67--67  
Missing atoms: CG,CD,OE1,NE2 in 68-GLN  
.  
.  
.  
-----  
Validating AminoAcids in Chain B  
-----  
Missing residues: res13--18  
Missing atoms: CG,CD1,CD2,CE1,CE2,CZ,OH in 12-TYR  
.  
.  
.  
Missing atoms: CG,CD,OE1,NE2 in 224-GLN  
Missing atoms: CG,OD1,ND2 in 227-ASN  
Missing atoms: CG,OD1,OD2 in 228-ASP  
Missing atoms: CD,CE,NZ in 245-LYS  
===[Result]=====  
This is invalid PDB!!
```

#### 7.2.5 Placevent アルゴリズム

我々は Placevent アルゴリズム [40] を Scala で実装した。既に Python で実装された Amber 用の Placevent プログラムは利用可能だが、我々のバージョンは STCSB で 3D-RISM 計算を行うためのものである。Placevent アルゴリズムは、3D-RISM 計算で得た生体分子の周囲の溶媒分子の分布から露わに溶媒分子の座標を予測する単純なアルゴリズムである。詳細は元論文 [40] を参照。

### 7.2.6 MD トラジェクトリ解析のためのプログラム

我々は Amber の MD トラジェクトリ解析プログラム (MD trajectory analyzer) を実装した。MD trajectory analyzer は二原子間の距離、三原子間の角度、四原子間の二面角などを計算する。また、参照構造を原子座標で重ね合わせ、トラジェクトリ中の特定の原子との RMSD を計算することもできる。

この解析プログラムは MD トラジェクトリ中の任意の情報だけを読み込み、メモリ不足やパフォーマンス低下を避ける。このプログラムはソースコード 2 のような入力ファイルが必要である。

解析後、このプログラムは別のファイル (ソースコード 3) を出力する。出力ファイル名は、ファイル拡張子以外は入力ファイル中の prefix キーワードで指定した名前となり、ファイル拡張子は距離解析結果であれば “distance”、角度解析結果であれば “angle”、二面角解析結果であれば “torsion”、RMSD 解析結果であれば “rmsd” となる。

ソースコード 2: MDTrajectoryAnalyzer の入力ファイル例

```
prmtop 1rvb_withNaCl_siteIandIVdagger_HIS2HIP.prmtop
mdcrd 1rvb_NVT_MD_withNaCl_siteIandIVdagger.mdcrd

# distance
distance 355@OD1-525@O

# angle
angle 6@O3'-7@P-538@O

# torsion
torsion 6@C5'-6@C4'-6@C3'-6@O3'
```

ソースコード 3: MDTrajectoryAnalyzer の出力ファイル例 (角度の場合)

#step	#6@O3'-7@P-538@O	#17@O3'-18@P-525@O
1	153.76208	153.37374
2	156.94835	154.26489
3	158.89551	154.84515
.		
.		
.		
10998	151.61876	140.91769
10999	152.09419	140.28708
11000	149.96356	139.69684

### 7.3 分子グラフィックス

STCSB 内の簡素な分子グラフィックス API は LWJGL を通して OpenGL を使用する。分子は空間充填モデルで表示される (図 6)。この API は、OpenGL の QuadBuffered Stereo を通して立体視を可能としている。立体視には、QuadBuffered Stereo 対応の立体視眼鏡とディスプレイ、グラフィックボード (NVIDIA Quadro シリーズ) が必要である。この API は Tinker [39] を用いて用意した分子構造の確認に使用できる。

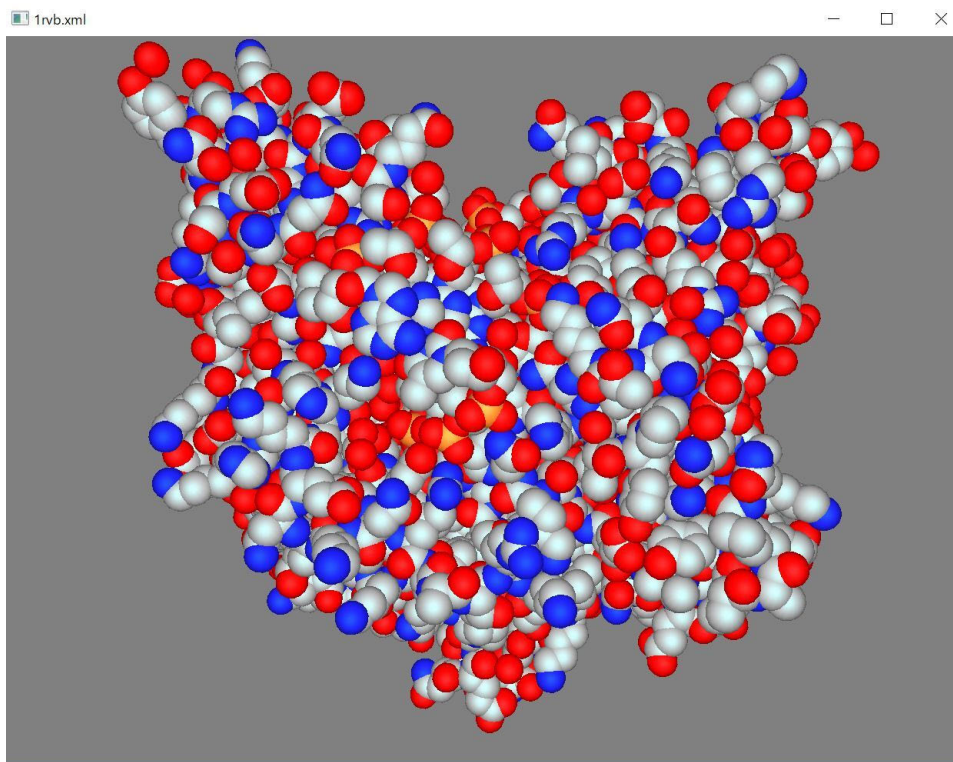


図 6: STCSB の分子グラフィックス API で表示した *EcoRV*-DNA 複合体 (PDB ID: 1rvb)。参考文献 [29] の図 7 を引用。

### 7.4 DNA 加水分解によって新たにできた 3'/5' 末端への対応

STCSB は、DNA 加水分解で新たに生じた 3'/5' 末端といった、生体分子の構造の多様性への対応を可能とする。例えば、DNA 加水分解反応後の *EcoRV*-DNA 複合体の X 線結晶構造 PDB ID: 1rvb [2] では、A タイプの DNA 加水分解によって DNA 断片に新たに 5' 末端が生じている。この新たに生じた DNA 断片の 5' 末端は、*EcoRV* による DNA 加水分解反応を調べるためには、目的の計算の前処理で適切に処理されねばならない。しかし、AmberTools の LEaP や Tinker はこの 5' 末端を適切に処理できない。LEaP はトポロジー情報が欠けていること、Tinker は新しく生じた 5' 末端は構造中に現れない前提のソースコードになっていることが原因である。LEaP の場合、理解および変更が難しいパラメーターファイル中の DNA トポロジー情報を修正する必要がある。Tinker の場合、

ソースコードを変更する必要がある。一方、STCSB は新たに生じた 5' 末端を既に開発した Model コンポーネントで適切に処理できる。

## 8 結論

この部では、我々は計算生物物理のために Scala で作成されたツール STCSB について説明した。STCSB は、生体分子の研究において MD の解析や 3D-RISM 計算の支援を行う。

STCSB は MVC architectural pattern をプログラミングのアーキテクチャとして採用している。STCSB に存在する Controller コンポーネントは、Fortran, C, Java などの他のプログラミング言語で記述された外部アプリケーションソフトウェアを呼び出す機能の逐次的な追加を可能にする。

プログラミングに精通しているユーザーであればロジックを実装した Model コンポーネントを、そうでないユーザーには Controller コンポーネントの改変を許すことで、STCSB は高い拡張性を持ち、プログラミングに精通しているユーザーと精通していないユーザーの双方にとって使いやすくなるように作成されている。また、STCSB は、ユーザーに次世代の標準 PDB ファイルフォーマットである PDBML を簡単に読み込み、編集し、書き出すことができる。さらに、Model コンポーネントを最適化することにより、DNA 加水分解で新たに生じた 3'/5' 末端といった、生体分子の構造の多様性への対応も可能にしている。STCSB が持つ特徴は、プログラミングに精通しているユーザーと精通していないユーザー間の研究協力に大きく寄与すると期待される。

- 9 付録 1 手法
- 10 付録 2 既存の分子シミュレーションパッケージ、目的計算  
実行プログラムの改変
- 11 付録 3 新たに作成した外部プログラム (STCSB と未連携)

## 参考文献

- [1] Alfred Pingoud and Albert Jeltsch. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, No. 0, pp. 3705–3727, 2001.
- [2] Dirk Kostrewa and Fritz K. Winkler.  $\text{Mg}^{2+}$  Binding to the Active Site of *EcoRV* Endonuclease: A Crystallographic Study of Complexes with Substrate and Product DNA at 2 Å Resolution. *Biochemistry*, Vol. 34, No. 0, pp. 683–696, 1995.
- [3] Nancy C. Horton and John J. Perona. DNA Cleavage by *EcoRV* Endonuclease: Two Metal Ions in Three Metal Ion Binding Sites. *Biochemistry*, Vol. 43, No. 22, pp. 6841–6857, 2004.
- [4] Dmitrii Beglov and Benoît Roux. An Integral Equation To Describe the Solvation of Polar Molecules in Liquid Water. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 101, No. 39, pp. 7821–7826, 1997.
- [5] Jean Pierre Hansen and Ian R. McDonald. *Theory of Simple Liquids*. Academic Press, 1990.
- [6] Fumio Hirata, editor. *Molecular Theory of Solvation*. Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [7] Norio Yoshida, Takashi Imai, Saree Phongphanphanee, Andriy Kovalenko, and Fumio Hirata. Molecular Recognition in Biomolecules Studied by Statistical-Mechanical Integral-Equation. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 113, No. 4, pp. 873–886, 2009.
- [8] Saree Phongphanphanee, Norio Yoshida, and Fumio Hirata. Molecular Recognition Explored by a Statistical-Mechanics Theory of Liquids. *Current Pharmaceutical Design*, Vol. 17, No. 17, pp. 1740–1757, 2011.
- [9] Ekaterina L. Ratkova, David S. Palmer, and Maxim V. Fedorov. Solvation Thermodynamics of Organic Molecules by the Molecular Integral Equation Theory: Approaching Chemical Accuracy. *Chemical Reviews*, Vol. 115, No. 13, pp. 6312–6356, 2015.
- [10] Shina C. L. Kamerlin and Arie Warshel. On the Energetics of ATP Hydrolysis in Solution. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 113, pp. 15692–15698, 2009.
- [11] B. Ram Prasad, Nikolay V. Plotnikov, and Arie Warshel. Resolving Uncertainties About Phosphate Hydrolysis Pathways by Careful Free Energy Mapping. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 117, pp. 153–163, 2013.
- [12] Noriaki Okimoto, Kazunori Yamanaka, Junko Ueno, Masayuki Hata, Tyuji Hoshino, and Minoru Tsuda. Theoretical Studies of the ATP Hydrolysis Mechanism of Myosin. *Biophysical Journal*, Vol. 81, No. 5, pp. 2786 – 2794, 2001.
- [13] Wei-Lin Hsu, Tadaomi Furuta, and Minoru Sakurai. ATP Hydrolysis Mechanism in



- a Maltose Transporter Explored by QM/MM Metadynamics Simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 120, No. 43, pp. 11102–11112, 2016.
- [14] Michael Fothergill, Myron F. Goodman, John Petruska, Arie Warshel. Structure-Energy Analysis of the Role of Metal Ions in Phosphodiester Bond Hydrolysis by DNA Polymerase I. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 117, , 1995.
  - [15] Ming-Hsun Ho, Marco De Vivo, Matteo Dal Peraro, and Michael L. Klein. Understanding the Effect of Magnesium Ion Concentration on the Catalytic Activity of Ribonuclease H through Computation: Does a Third Metal Binding Site Modulate Endonuclease Catalysis? *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 132, No. 39, pp. 13702–13712, 2010.
  - [16] Fabrice Leclerc and Martin Karplus. Two-Metal-Ion Mechanism for Hammerhead-Ribozyme Catalysis. *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 110, No. 7, pp. 3395–3409, 2006.
  - [17] Ivaylo Ivanov, John A. Tainer, and J. Andrew McCammon. Unraveling the three-metal-ion catalytic mechanism of the DNA repair enzyme endonuclease IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 104, No. 5, pp. 1465–1470, 2007.
  - [18] Hector Viadiu and Aneel K. Aggarwal. The role of metals in catalysis by the restriction endonuclease *Bam*HI. *Nature Structural Biology*, Vol. 5, No. 0, pp. 910–916, 1998.
  - [19] Alfred Pingoud, Geoffrey G Wilson, and Wolfgang Wende. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, Vol. 42, No. 12, pp. 7489–7527, 2014.
  - [20] Cui Wang, Wenting Huang, and Jie-Lou Liao. QM/MM Investigation of ATP Hydrolysis in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 119, pp. 3720–3726, 2015.
  - [21] Jonathan K. Lassila, Jesse G. Zalatan, and Daniel Herschlag. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 80, pp. 669–702, 2011.
  - [22] Petra Imhof, Stefan Fischer, and Jeremy C. Smith. Catalytic Mechanism of DNA Backbone Cleavage by the Restriction Enzyme EcoRV: A Quantum Mechanical/-Molecular Mechanical Analysis. *Biochemistry*, Vol. 48, No. 0, pp. 9061–9075, 2009.
  - [23] Nancy C. Horton, Kate Juliet Newberry, and John J. Perona. Metal ion-mediated substrate-assisted catalysis in type II restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 95, No. 23, pp. 13489–13494, 1998.
  - [24] I. Barry Vipond, Geoffrey S. Baldwin, and Stephen E. Halford. Divalent Metal Ions at the Active Sites of the EcoRV and EcoRI Restriction Endonucleases. *Biochemistry*, Vol. 34, No. 2, pp. 697–704, 1995.
  - [25] John J. Perona and Amy M. Martin. Conformational Transitions and Struc-

- tural Deformability of EcoRV Endonuclease Revealed by Crystallographic Analysis. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 273, No. 1, pp. 207–225, 1997.
- [26] A. Pingoud, M. Fuxreiter, V. Pingoud, and W. Wende. Type II restriction endonucleases: Structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 62, No. 6, pp. 685–707, 2005.
- [27] David S. Sigman(Ed.). *The Enzymes, Vol. 20: Mechanisms of Catalysis, 3rd Edition*. Academic Press, 1992.
- [28] Itaru Onishi, Shunya Sunaba, Norio Yoshida, Fumio Hirata, and Masayuki Irida. Role of  $Mg^{2+}$  Ions in DNA Hydrolysis by *EcoRV*, Studied by the 3D-Reference Interaction Site Model and Molecular Dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 122, pp. 9061–9075, 2018.
- [29] Itaru Onishi, Hiroto Tsuji, and Masayuki Irida. A tool written in Scala for preparation and analysis in MD simulation and 3D-RISM calculation of biomolecules. *Biophysics and Physicobiology*, Vol. 16, No. , pp. 485–489, 2019.
- [30] D. A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao, and P.A. Kollman. *AMBER 16*. University of California, San Francisco, 2016.
- [31] Bernard R. Brooks, Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, David J. States, S. Swaminathan, and Martin Karplus. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 4, pp. 187–217, 1983.
- [32] Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz, SzilárdPáll, Jeremy C. Smith, Berk Hess, Erik Lindahl. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, Vol. 1-2, No. unknown, pp. 19 – 25, 2015.
- [33] Eric F. Pettersen, Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 25, pp. 1605–1612, 2004.
- [34] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, Vol. 14, pp. 33–38, 1996.
- [35] Naveen Michaud-Agrawal, Elizabeth J. Denning, Thomas B. Woolf, and Oliver Beckstein. MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 32, No. 10, pp. 2319–2327,

- 2011.
- [36] David K Brown, David L Penkler, Olivier Sheik Amamuddy, Caroline Ross, Ali Rana Atilgan, Canan Atilgan, ÖzlemTastan Bishop. MD-TASK: a software suite for analyzing molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics*, Vol. 33, No. 17, pp. 2768–2771, 2017.
  - [37] Sunhwan Jo, Xi Cheng, Jumin Lee, Seonghoon Kim, Sang-Jun Park, Dhilon S. Patel, Andrew H. Beaven, Kyu Il Lee, Huan Rui, Soohyung Park, Hui Sun Lee, BenoîtRoux, Alexander D. MacKerell Jr, Jeffrey B. Klauda, Yifei Qi, Wonpil Im. CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 38, No. 15, pp. 1114–1124, 2017.
  - [38] Mohamed Fayad and Douglas Schmidt. Object-Oriented Application Frameworks. *Communications of the ACM*, Vol. 40, No. 10, pp. 32–38, 1997.
  - [39] Joshua A. Rackers, Zhi Wang, Chao Lu, Marie L. Laury, LouisLagardère, Michael J. Schnieders, Jean-Philip Piquemal, Pengyu Ren, Jay W. Ponder. Tinker 8: Software Tools for Molecular Design. *Journal of Chemical Theory and Computation*, Vol. 14, pp. 5273–5289, 2018.
  - [40] Daniel J. Sindhikara, Norio Yoshida, and Fumio Hirata. Placevent: An Algorithm for Prediction of Explicit Solvent Atom Distribution–Application to HIV-1 Protease and F-ATP Synthase. *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 33, pp. 1536–1543, 2012.

## 質疑応答

## 謝辞

# 共同研究者一覧

本研究は以下の方々との共同研究です。

## 第Ⅰ部

九州工業大学生命情報工学科

入佐 正幸 准教授 (指導教員)

豊田理化学研究所, 分子科学研究所 (名誉教授)

平田 文男 教授

九州大学大学院 理学府 化学専攻

吉田 紀生 准教授

理化学研究所 AICS

丸山 豊 博士

九州工業大学生命情報工学科

皿井 明倫 教授

九州工業大学情報工学府情報科学専攻

安庭 潤治氏 (2011 年度博士後期中間報告)

九州工業大学情報工学府情報科学専攻

本松 良太氏 (2012 年度修士論文)

九州工業大学情報工学府情報科学専攻

砂場 俊哉氏 (2013 年度修士論文)

## 第Ⅱ部

九州工業大学生命情報工学科

入佐 正幸 准教授 (指導教員)

九州工業大学情報工学府情報科学専攻

辻 裕人氏 (修士在籍時にベースプログラム作成)

九州工業大学生命情報工学科

本松 良太氏 (2010 年度卒業論文)

九州工業大学生命情報工学科

松村 和典氏 (2011 年度卒業論文)