

[共同研究成果]

DNA 鎖切断の反応動力学シミュレーションと AVS/Express を用いた三次元可視化

菱沼 直樹¹, 及川 啓太¹, 岡田 朝彦², 菅野 学¹, 山崎 馨^{1,3},Wilfredo Credo Chung^{1,4}, 齋藤 敦子⁵, 河野 裕彦¹¹東北大学大学院 理学研究科 化学専攻, ²東北大学 理学部 化学科,³北海道大学大学院 理学院 化学部門, ⁴Department of Chemistry, De La Salle University,⁵東北大学 情報部 情報基盤課

近年、電子状態計算プログラムの高速化や計算機の高性能化が進み、多くの原子を含む複雑な分子の化学反応動力学シミュレーションが行えるようになってきた[1]。ナノサイエンスにおける材料の合成や機能評価,あるいは、生体系の構造や反応機構の解明などに実際に適用されている。また、その対象は平衡状態のみならず、非平衡な問題にも広がっている。実際、生体内の反応は非平衡開放系の問題として捉えるべきで、反応サイトにおける原子組換えに要するエネルギー(たとえば、反応の遷移状態のエネルギー)の計算だけではなく、エネルギーや電荷がどのような時間・空間スケールで開放系の中を移動していくかにも答えることが要求されてくるであろう。そのような問題の一つとして、我々は DNA の鎖切断などの損傷過程を取り上げ、反応動力学シミュレーションを適用して、DNA 鎖切断機構の分子論的理解を進めようとしている。本稿では、DNA 鎖切断シミュレーションの結果を概説し、その動力学過程の可視化や解析に用いた東北大学サイバーサイエンスセンターの三次元可視化システムの利用法について紹介する。

1. はじめに

DNA が放射線に曝されると、核酸塩基の脱離や二量体化、鎖切断が起こることが知られている。これらは塩基配列の転写において問題となり、人体に発がんなどの悪影響を及ぼす。DNA の損傷は、放射線のエネルギーが標的 DNA に直接吸収されて影響を及ぼす直接作用と、エネルギーを吸収した他の分子が DNA と反応して影響を及ぼす間接作用に分けられる。直接作用の一例としては、DNA 分子が励起あるいはイオン化し、その際発生する振動エネルギーによって DNA の共有結合が切れる過程がある。また、代表的な間接作用の一例は、放射線のエネルギーがまず水分子に吸収されて、ヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) などが生じ、それら活性酸素種が水溶液中を移動して DNA に作用する過程である。DNA 損傷は放射線だけでなく、様々な粒子源や光源によっても引き起こされる。たとえば、DNA が紫外線を吸収すると、隣り合ったピリミジン塩基 (チミンとシトシン) が二量体化し、塩基対の変異を引き起こすことが知られている。また、Mathur らのグループは、DNA を含んだ水溶液に近赤外のパルス照射すると、様々な鎖切断が起こることを見出している[2]。彼らは、発生した OH ラジカルの衝突によって DNA の鎖切断が起こり、DNA の 2 本の鎖が同じ塩基対のところで切れる 2 本鎖切断は複数の OH ラジカルの衝突が引き金になると結論づけている。また、発生した高熱によっても鎖切断は起こるが、それは DNA の 2 本の鎖のうち 1 本が切断する 1 本鎖切断に限られることを報告している。次節では、放射線により発生する熱を想定して、真空条件下の DNA 及びカウンターカチオンや水分子に囲まれた DNA の化学結合がどのように切れていくかを調べた化学反応動力学シミュレーションの結果[3,4]を紹介する。

このようなシミュレーションでは、各原子の位置 (xyz 座標) とその速度などの情報を時間ステップごとに出力する。次に、原子の位置を描画ソフトで表し、系がどのように変化していくかを視覚的に追跡する。しかしながら、本研究のように、対象とした DNA 分子とその周囲の分子

やイオンの総原子数が数百から千を超えるような場合、視覚的に結合切断部位を探すのはほぼ不可能である。そのため、座標情報から結合長や結合の組み換えを判定するプログラムを自作して、どこで結合の切断・形成が起こったかを判断している。一方、結合の切断を含む化学反応の理解には、結合していた2つの原子のみを考える“ミクロ”な情報だけでは不十分で、どのような原子が周囲に存在し、どのような影響を結合に及ぼしているかという“マクロ”な情報も必要である。そのような目的には、系全体から結合の切断・形成が起こる領域まで瞬時にズームでき、しかも、各原子の遠近を正確に捉えることができる可視化システムが力を発揮する。我々は、DNAのような複雑な構造の時間変化を様々な視点から効率よく観察するために、東北大学サイバーサイエンスセンターの三次元可視化システムに即したプログラムを開発した。このプログラムの作成には、光の影や透明感など様々な要素を取り込んで立体形状を画像化するレンダリングソフトウェア POV-Ray (Persistence of Vision Raytracer) [5]の知識を応用した。第3節では POV-Ray の入力ファイルの作り方を簡単に説明し、第4節で三次元可視化システムを使って、動力学シミュレーションの結果をどのように表示するかを具体的に説明する。

2. DNA の化学反応動力学シミュレーション

最初に、真空条件での DNA 鎖切断シミュレーションの結果を報告する。用いたモデル DNA の構造を図1に示す。この短鎖 DNA は4つのアデニン-チミン塩基対のみからなる2本鎖 DNA である。ただし、短鎖 DNA を安定化するために、ヘキサエチレングリコールをリンカーとして用いて、鎖同士を架橋している。これは、実際に Lewis らによって合成された分子である[6]。反応動力学シミュレーションでは、各原子が受けている力を各時間ステップで求めるが、それに必要な電子状態計算には、密度汎関数法に近い精度で高速計算が可能な密度汎関数強束縛(DFTB)法[7]を用いた。今回は、その中でも Kohn-Sham エネルギーを電荷揺らぎに関して3次まで展開した DFTB3[8]法とパラメータセット 3ob-3-1 を組み合わせて用いた[9,10]。実際の計算には、量子化学計算パッケージ DFTB+[11]を利用した。X線による鎖切断では、鎖1本の切断に約100 eVのエネルギーが使われているという報告[12]を参考に、構造最適化した短鎖 DNA に対し、リンカー以外の部分へ1原子当たり0.3 から0.4 eVの熱エネルギーを与えて動力学計算を行った。得られた鎖切断の過程を Mulliken 電荷と振動エネルギー移動の観点、すなわち、有機電子論と動力学の観点から解析した。なお、エネルギー移動の解析には、分子の全ポテンシャルエネルギーと運動エネルギーを各構成原子に分配する手法(原子分割エネルギー法[13,14])を用いた。これによって、各原子が持つエネルギーを定量化でき、原子や原子団のエネルギー変化を追跡することが可能となる。つまり、反応ダイナミクスにどのような原子や原子団が関わっているかを明らかにすることができる。

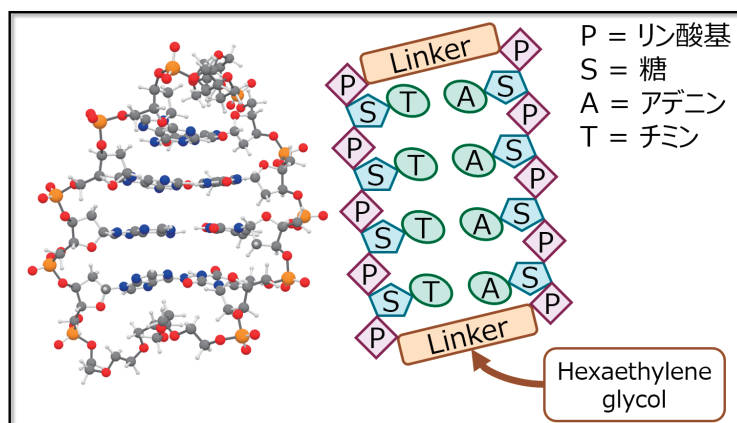


図1 アデニン-チミンの4塩基対で構成されるモデル DNA の構造(左)と模式図(右)。

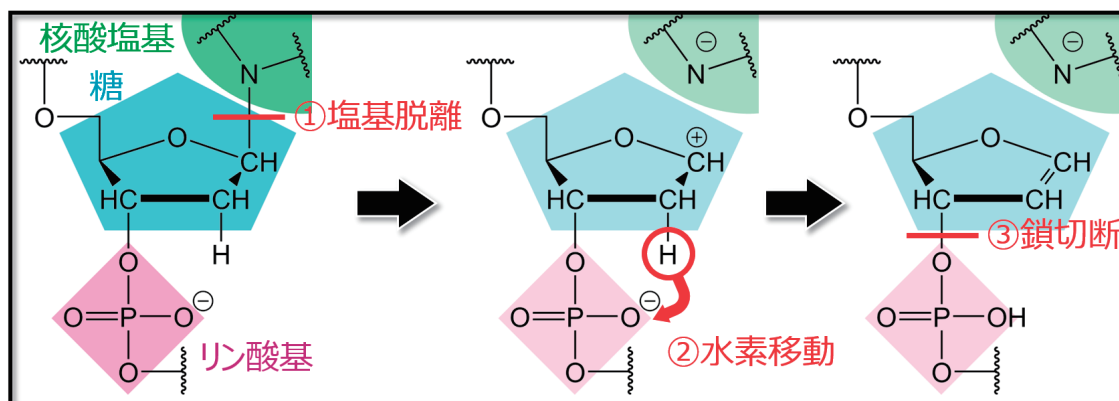


図 2 真空条件でのモデル DNA の主な切断過程。

この動力学計算の結果は、アデニン側の鎖はほとんど切れず、鎖切断はチミン側の鎖で起こりやすいことを示していた。多くの場合、①チミンが塩基脱離し、②糖からリン酸基への水素移動が起こり、後に③糖とリン酸基との間で鎖が切断する（図 2）。この一連の過程は初期時刻から 10 ピコ秒程度のオーダーで進行した。1 本鎖 DNA にも同様のシミュレーションを行い、塩基脱離後に、糖とリン酸基との間で鎖が切断するという結果を得た。この機構は、1 本鎖 DNA に対して行われたマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization; MALDI）による詳細な質量分析の結果[15]とも一致しており、DFTB3 法を使った動力学シミュレーションが熱効果による鎖切断を適切に再現できることがわかった。

①の塩基脱離過程のエネルギーと電荷変化の一例を図 3 に示す。結合切断に直接関わる糖とチミン塩基の外部からエネルギーが流入し、糖から塩基への電子移動により塩基脱離を引き起こしていることがわかった。次に、その後の②水素移動と③鎖切断（糖-リン酸基間の C-O 結合切断）過程におけるエネルギーと電荷の変化の一例を図 4 に示す。C-O 結合の切断部分を含む糖とリン酸基の電荷やエネルギーも鎖切断の前後で変化しており、解析の結果、他の複数のヌクレオチドからの広域的な電子やエネルギーの流入により、鎖切断が引き起こされていることが明らかになった。①の機構では糖の電子が塩基に移動して塩基脱離が引き起こされるので、その結果アデニンよりも電子を引きつけやすいチミン側の鎖が切断されたと考えられる。また、熱による鎖切断のシミュレーションでは、1 本鎖切断しか見られない。これは Mathur らの主張[2]を裏付ける結果になっている。

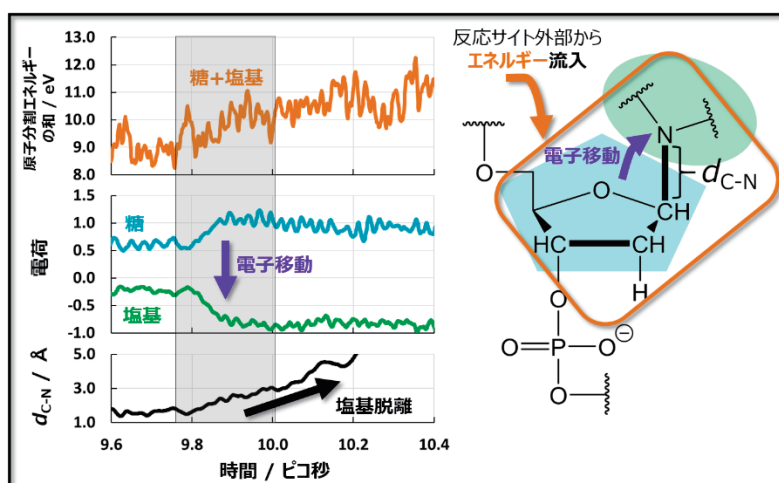


図 3 ①の塩基脱離時における原子分割エネルギーの変化（左上段）、電荷の変化（左中段）及び C-N 結合長の変化（左下段）。右は解析結果から得られた反応の描像。

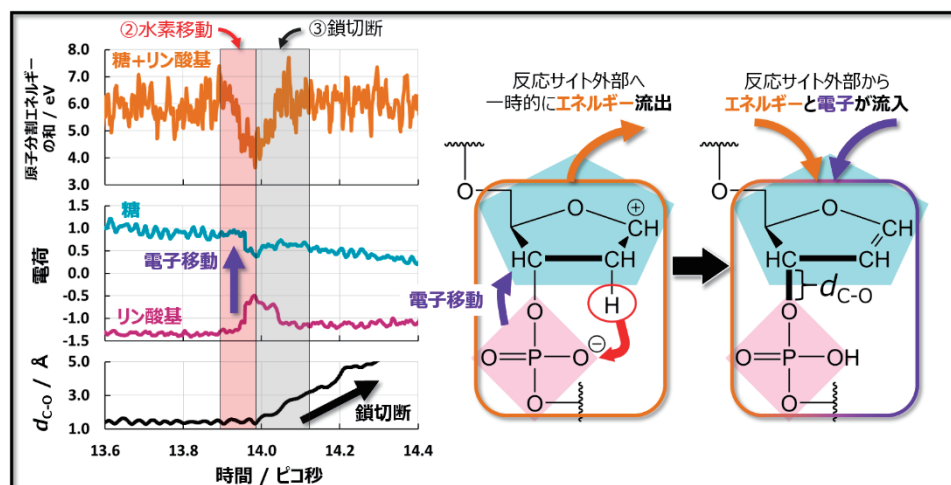


図 4 ②水素移動と③鎖切断時における原子分割エネルギーの変化（左上段）、電荷の変化（左中段）及び C-O 結合長の変化（左下段）。右は解析結果から得られた反応の描像。

我々は、 Na^+ や Mg^{2+} などのカウンターカチオンと水分子が周囲に存在する条件で、DNA の動力学シミュレーションも行っている。X 線結晶構造が既知である12 塩基対からなる DNA（図 5；蛋白質データバンク PDB ID：355D[16]）を対象として、カチオンや水分子以外の部分に真空条件と同程度の熱エネルギーを与えて計算を行った。結果として、図 1 のような真空条件の場合とは異なり、 Na^+ がリン酸基と中間体（ $\text{Na}^+\text{-O}^-\text{-P-O}$ の四角形構造）を形成し、リン酸基内の P-O 切断が誘発されることがわかった（図 6）。カウンターカチオンの存在によって電荷の広域的な移動が妨げられ、エネルギー移動も局所的になっており、真空条件とは全く異なった鎖切断機構が存在すると思われる。これらの詳細な結果は、OH ラジカルとの反応や励起状態を経由した鎖切断を含めて、別の機会に紹介したい。

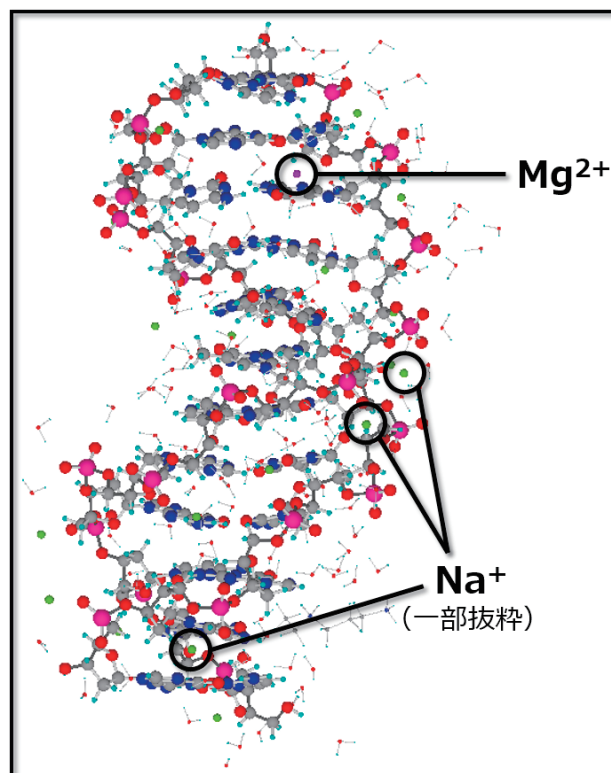


図 5 355D の構造。DNA 以外の原子を表す球は小さく表示している。

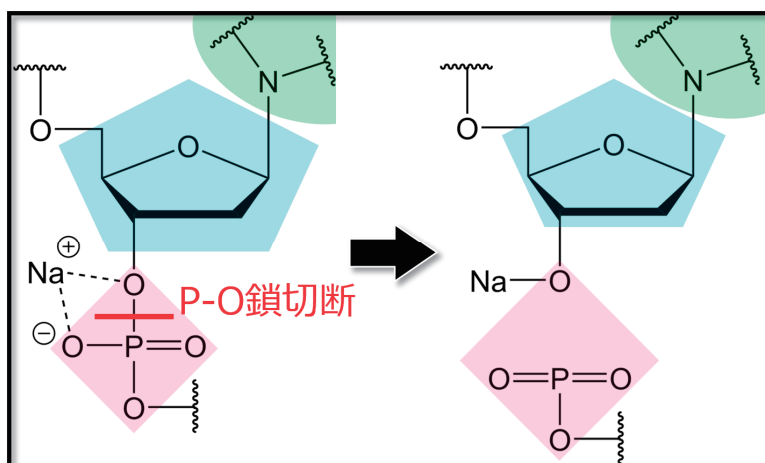


図 6 Na^+ が関与する DNA の主な鎖切断過程。

3. POV-Ray を用いた分子の画像・動画作成法

本節では、原子の座標情報から POV-Ray を介して立体画像や動画を作成する方法について紹介する。最近では、Gaussian[17]や GAMESS[18]など、様々な量子化学計算ソフトが用いられている。例えば、我々が使用している DFTB+の動力学シミュレーションは、その結果が XYZ フォーマットで出力され、図 7 のように時間ステップ毎に各原子の元素記号とその xyz 座標の情報が得られる。パッケージソフトによってはこの出力形式に違いがあるが、元素や座標情報が通常出力される。GaussView[17]や Jmol, MOLDEN, Avogadro など[19]の量子化学計算の前後処理のためのアプリケーションを用いれば、ひとまずシミュレーション結果を見ることができ、プレゼンテーション用としてより高い品質の画像・動画を作成するには、POV-Ray などのレンダリングソフトが不可欠である。

[原子数] [コメント行] [元素記号] [座標xyz] : [元素記号] [座標xyz] [原子数] [コメント行] [元素記号] [座標xyz] : [元素記号] [座標xyz] :	<pre> 3 Step 0 H2O molecule O 0.000 0.000 0.000 H 0.787 0.000 -0.545 H -0.787 0.000 -0.545 3 Step 1 H2O molecule O 0.031 0.000 0.000 H 0.539 0.000 -0.373 H -1.035 0.000 -0.717 : </pre>
---	--

図 7 XYZ フォーマットの形式 (左), 水分子の振動の出力例 (右)。座標 xyz の単位は Å (オングストローム) であり, Step n の時刻は時間刻み Δt の n 倍になっている。

しかしながら、レンダリングソフト自身は、元素から球の色や大きさを決めたり、座標から自動的に結合を判定したりすることができない。つまり、分子の画像を作成するためには、シミュレーションの出力である「点」の情報から、各原子を「球」で表し、それらの結合を「円柱」で表す必要がある。具体的な手順は以下のとおりである。

1. ある原子について、元素に対応した球の大きさと色を定義し、その xyz 座標に球を置く
2. 全ての原子間の距離を調べ、その中で設定したしきい値を下回った距離の原子同士の間には結合を表す円柱を配置する

この手順に従って、図 7 の Step 0 の水分子の原子の座標から自作プログラムを通して変換した POV-Ray の入力ファイルを図 8 左に示す。なお POV-Ray の場合は、球や円柱の位置だけではなく、カメラ位置や光源を設定する必要がある。この入力ファイルに従って POV-Ray でレンダリングすると、図 8 の右に示したような分子が描かれる。また、各時間ステップでレンダリングした画像を連続して集めると動画にすることが可能である。AviUtl[19]というフリーソフトで動画編集を行っているが、どのような動画編集ソフトでも大抵可能な処理である。

POV-Ray による分子描画のメリットは、高画質な画像・動画が得られるだけではなく、原子の色や結合の色を自由に決められることにある。例えば、原子の Mulliken 電荷に合わせて色の変化を定義すると、各原子の電荷の変化を動画で確認することが可能である。図 9 に作成した画像の一例を示しておく。

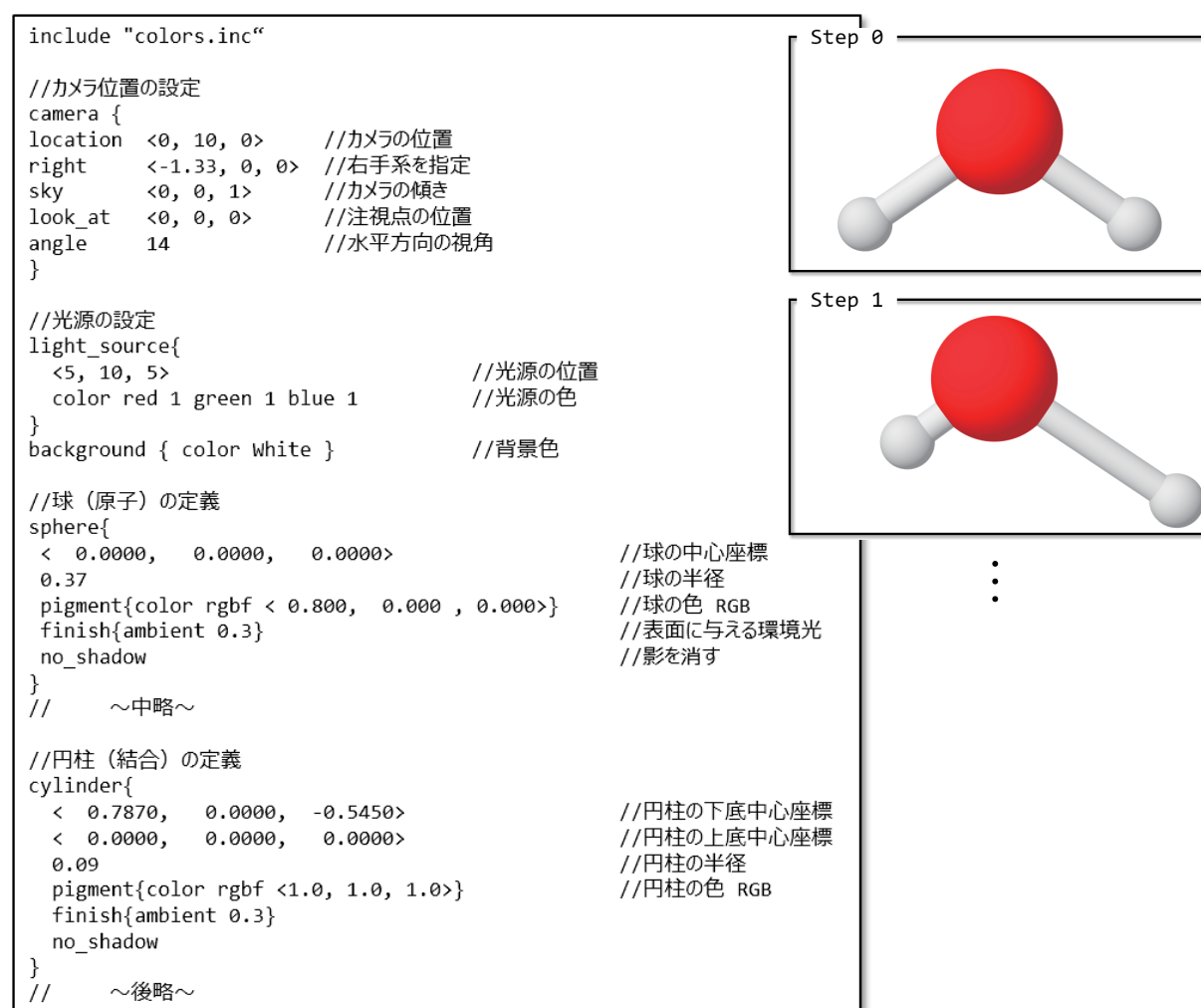


図 8 POV-Ray の入力フォーマット POV の入力例（左）と実際の描画後の画像（右）。重要な結合については、結合の色を変えることも可能であるし、また、重要ではない原子団については小さく出力することも可能である（図 9 参照）。

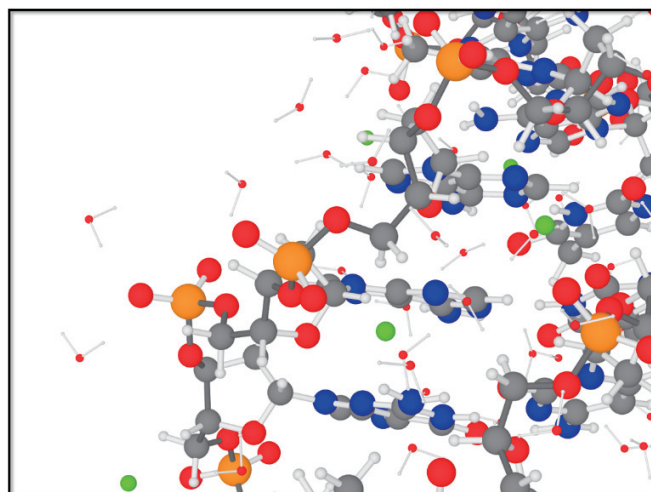


図 9 POV-Ray で DNA の一部を描画した画像例。DNA の鎖に相当する結合はグレーで目立たせ、周りの水分子などは逆に目立たないように球や円柱を小さく設定した。白は水素、灰色は炭素、青は窒素、赤は酸素、オレンジはリンの各原子を表している。

4. AVS/Express を用いたシミュレーション結果の三次元可視化

東北大学サイバーサイエンスセンターの三次元可視化システム[20,21]では、CYBERNET 社の可視化ソフトウェア AVS/Express が利用できる。AVS/Express の MGF フォーマットを利用すると、容易に分子構造の三次元可視化ができる。MGF フォーマットは、多角形、線分、球、円、円柱などの三次元形状をアスキー形式で簡単に記述できる AVS オリジナルの書式である。POV-Ray の書式に似ているため、図 8 のような POV-Ray 用のファイルを少し修正するだけで、AVS/Express 用の MGF フォーマット入力データを作成することができる。入力データの書式を図 10 に、入力例を図 11 に示す。原子の形状は球 (sphere)、結合部分の形状は円柱 (column) を用いて記述した。

```
# Micro AVS Geom:2.00
# 原子の形状 (球)
sphere
[要素名 (コメント行)]
color
[球の個数n]
[1個目の球の中心座標xyz] [半径] [RGB]
:
[n個目の球の中心座標xyz] [半径] [RGB]

# 結合部分の形状 (円柱)
column
[要素名 (コメント行)]
dvertex_and_color
[円柱の分割数 i]          # 円柱は、i角柱で近似表示
[円柱の個数 j]
[1個目の円柱の下底中心座標xyz] [上底中心座標xyz] [半径] [RGB]
:
[j個目の円柱の下底中心座標xyz] [上底中心座標xyz] [半径] [RGB]
```

図 10 MGF フォーマットの入力データの書式。

```

# Micro AVS Geom:2.00
sphere
ball
color
3
  0.000  0.000  0.000  0.37  0.80  0.00  0.00
  0.787  0.000 -0.545  0.16  0.95  0.95  0.95
 -0.787  0.000 -0.545  0.16  0.95  0.95  0.95

column
stick
dvertex_and_color
6
2
  0.787  0.000 -0.545  0.000  0.000  0.000  0.09  1.0  1.0  1.0
 -0.787  0.000 -0.545  0.000  0.000  0.000  0.09  1.0  1.0  1.0

```

図 11 入力データの例（図 7 の Step 0 における水分子の場合）。

次に、作成した入力データファイルを AVS/Express で読み込み、可視化する方法を説明する。MGF フォーマットで作成した入力データファイルの読込には Read MGF モジュールを使用する。MGF フォーマットの場合は入力データファイルに形状や色の情報を全て記述するため、Read MGF モジュールをビューワモジュール（Uviewer）に接続するだけで簡単に可視化することができる。Read MGF モジュールを使った可視化ネットワークを図 12 に、可視化結果の例を図 13 に示す。なお、TextString モジュールを使用することで、三次元画面上に 1.00 ps（ピコ秒）のようなシミュレーションの経過時間などの情報を表示させることも可能である。

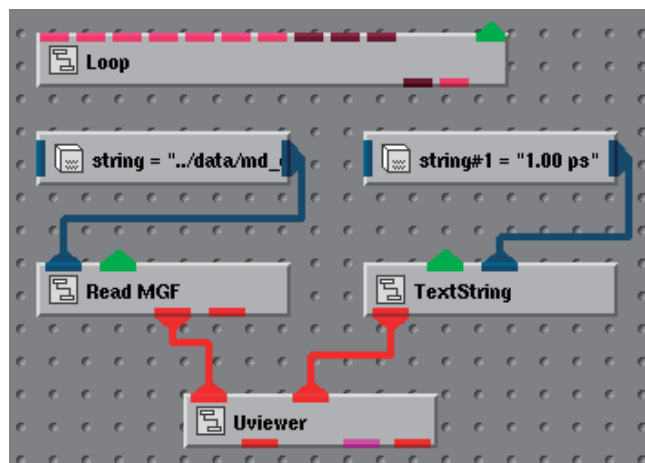


図 12 Read MGF モジュールを使った可視化ネットワーク。

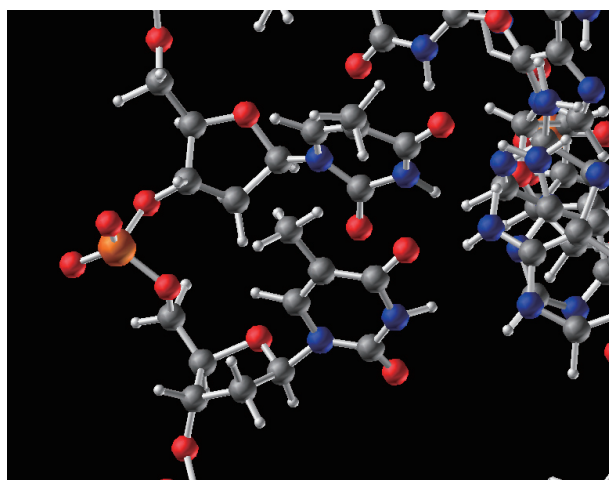


図 13 DNA の可視化結果。液晶シャッターメガネを通すと、三次元可視化システムの巨大なスクリーン（横 4.4 m×縦 1.8 m）に映し出された画像が立体的に見える。

5. おわりに

本稿では、DNA の鎖切断の反応動力学シミュレーションとその結果の三次元可視化について解説した。三次元可視化によって、教科書に載っている二次元の絵ではわかりにくい二重螺旋構造および主溝・副溝といった DNA の特徴を容易につかみ取ることができる。あたかも自分が DNA の場の中に入り、個々の原子が現実の空間で動いているように感じられる。研究がより捗るためのツールとして三次元可視化システムは有効である。

我々は、今回紹介した DNA の鎖切断や X 線自由電子レーザーによる C_{60} のクーロン爆発[22,23]のシミュレーションの結果を東北大学のオープンキャンパスなどですでに一般公開している[21]。三次元可視化システムは分子構造の立体的な把握を容易にするため、今後は教育での利用価値が高まると期待している。二次元の絵から空間をイメージして理解することに慣れていない一般の方々に対しても、三次元可視化システムは理解を促す強力なツールである。

謝辞

本研究の計算の一部は、東北大学サイバーサイエンスセンターの並列コンピューターで実行した。また、本センターの山下毅氏には、計算結果の三次元可視化についてご協力いただいた。DNA の鎖切断の機構に関しては、化学専攻木野康志先生、十川和博先生、多元物質科学研究所秋山公男先生から重要な情報をいただいた。なお、本研究は科研費（河野：No.24245001, 15K13614, 16H04091）の助成のもとに行われた。

参考文献

- [1] 日本化学会編, CSJ カレントレビュー08 巨大分子系の計算化学, 化学同人, 2012。
- [2] A. K. Dharmadhikari, H. Bharambe, J. A. Dharmadhikari, J. S. D'Souza and D. Mathur, “DNA Damage by OH Radicals Produced Using Intense, Ultrashort, Long Wavelength Laser Pulses”, *Phys. Rev. Lett.* **112**, 138105 (2014).
- [3] 菱沼直樹, 菅野学, 木野康志, 秋山公男, 河野裕彦, モデル二本鎖 DNA における鎖切断過程の電荷・エネルギー移動解析, 第 9 回分子科学討論会, 口頭発表 **2E10**, 2015。

- [4] 及川啓太, 菱沼直樹, 菅野学, 木野康志, 秋山公男, 河野裕彦, カウンターカチオンが引き起こす DNA 鎖切断: 化学反応動力学シミュレーション解析, 第 10 回分子科学討論会, 口頭発表 **3G09**, 2016.
- [5] オープンソースのソフトである。詳細は, <http://www.povray.org/> 参照。
- [6] M. McCullagh, L. Zhang, A. H. Karaba, H. Zhu, G. C. Schatz and F. D. Lewis, “Effect of Loop Distortion on the Stability and Structural Dynamics of DNA Hairpin and Dumbbell Conjugates”, *J. Phys. Chem. B* **112**, 11415 (2008).
- [7] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai and G. Seifert, “Self-consistent-charge density-functional tight-binding method for simulations of complex materials properties”, *Phys. Rev. B* **58**, 7260 (1998).
- [8] M. Gaus, Q. Cui and M. Elstner, “DFTB3: Extension of the Self-Consistent-Charge Density-Functional Tight-Binding Method (SCC-DFTB)”, *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 931 (2011).
- [9] M. Gaus, A. Goez and M. Elstner, “Parametrization and Benchmark of DFTB3 for Organic Molecules”, *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 338 (2013).
- [10] M. Gaus, X. Lu, M. Elstner and Q. Cui, “Parameterization of DFTB3/3OB for Sulfur and Phosphorus for Chemical and Biological Applications”, *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 1518 (2014).
- [11] B. Aradi, B. Hourahine and Th. Frauenheim, “DFTB+, a sparse matrix-based implementation of the DFTB method”, *J. Phys. Chem. A* **111**, 5678 (2007). 詳細は, <http://www.dftb-plus.info/> 参照。
- [12] J. E. Cleaver, G. H. Thomas and H. J. Burki, “Biological Damage from Intranuclear Tritium: DNA Strand Breaks and Their Repair”, *Science* **177**, 996 (1972).
- [13] H. Nakai, “Energy density analysis with Kohn-Sham orbitals”, *Chem. Phys. Lett.* **36**, 73 (2002).
- [14] R. F. W. Bader, “A quantum theory of molecular structure and its applications”, *Chem. Rev.* **91**, 893 (1991).
- [15] L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerald, C. M. Nelson and L. M. Smith, “Oligodeoxynucleotide Fragmentation in MALDI/TOF Mass Spectrometry Using 355-nm Radiation”, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6048 (1995).
- [16] X. Shui, L. McFail-Isom, G. G. Hu and L. D. Williams, “The B-DNA Dodecamer at High Resolution Reveals a Spine of Water on Sodium”, *Biochemistry* **37**, 8341 (1998).
- [17] 詳細は, <http://www.gaussian.com/> 参照。なお, 本学ではサイバーサイエンスセンターにて Gaussian09 と GaussView を提供している。(<http://www.ss.cc.tohoku.ac.jp/application/index.html>)
- [18] 詳細は, <http://www.msg.ameslab.gov/GAMESS/> 参照。
- [19] 詳細は, 各ソフトのホームページを参照。
- [20] 東北大学サイバーサイエンスセンター 三次元可視化システム
<http://www.ss.cc.tohoku.ac.jp/service/vsr.html>
- [21] 共同研究支援係, 共同利用支援係, 三次元可視化システムと可視化事例の紹介, *SENAC*, Vol. **49**, No. 3, 9 (2015).
- [22] 山崎馨, 上田潔, 河野裕彦, X 線自由電子レーザーパルスによるフラーレン超多価カチオン C_{60}^{q+} の爆発解離の動力学シミュレーション, *SENAC*, Vol. **48**, No. 3, 1 (2015).
- [23] K. Yamazaki, T. Nakamura, N. Niitsu, M. Kanno, K. Ueda, and H. Kono, “Communication: Two-step explosion processes of highly charged fullerene cations C_{60}^{q+} ($q = 20-60$)”, *J. Chem. Phys.* **141**, 121105 (2014).