

分子動力学法によるピレン修飾核酸の 塩基配列認識プローブ設計のための基礎的研究

佐々 和洋^{a*}, 宇野 健^b, 林 治尚^c, 中野 英彦^a

^a 兵庫県立大学大学院工学研究科, 〒 671-2201 兵庫県姫路市書写 2167

^b 広島県立大学経営学部経営情報学科, 〒 727-0023 広島県庄原市七塚町 562

^c 兵庫県立大学学術総合情報センター, 〒 671-2201 兵庫県姫路市書写 2167

*e-mail: en02g004@steng.u-hyogo.ac.jp

(Received: March 8, 2007; Accepted for publication: May 7, 2007; Published on Web: June 30, 2007)

塩基配列を迅速に判別するためのシステム開発は、医療のみならず様々な分野において重要な研究課題である。核酸へ蛍光物質を修飾した遺伝子プローブは魅力的なプローブとして期待されている。その中で、蛍光物質としてピレンを利用したピレン修飾 DNA および RNA において、ピレン修飾 RNA のみが相補鎖の RNA と二重螺旋を形成した際、蛍光が著しく増大することが示されている。しかし、ピレンとピレン周辺の詳細な構造やピレン自身の挙動などは明らかにされていない。そこで本研究では、ピレン修飾 DNA およびピレン修飾 RNA の分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、ピレン修飾部の挙動や構造を比較検討し、ピレンがピレン修飾 DNA では二重螺旋内部に、ピレン修飾 RNA では二重螺旋外部に配座すること、その際の詳細な構造や挙動を明らかにした。さらにはピレン修飾 RNA においてミスマッチによるピレンの挙動の変化についても検討した。

キーワード: 塩基配列認識プローブ, ピレン, DNA, RNA, 分子動力学法

1 緒言

ヒトゲノムの解読が完了し、我が国においてもこれまで、疾患遺伝子の探索が行われるとともに、遺伝子領域における一塩基変移 (SNPs) の基盤データベースが完成するなどの成果が創出されている。これらの成果に伴い、個人個人に対し最も適した医療、「テーラーメイド医療」の実現が目指されている。そこで、ターゲットとする配列を迅速に判別するためのシステムに関する研究が盛んに行われている。その中で、蛍光物質を用いて核酸のハイブリダイゼーションを検出する蛍光プローブの研究が注目されている。特に、均一溶液系で DNA や RNA が分析可能な蛍光修飾核酸は、ハイブリダイゼーションが確実に行うことができるため、魅力的な蛍光プローブであると期待されている [1–4]

中村らは核酸の糖部 2' 位にピレニルメチル基を導

入したピレン修飾核酸に関する研究を行い、ピレン修飾 DNA は完全に相補鎖の DNA と二重螺旋形成時 (以降フルマッチとする) ピレンのモノマー蛍光に 1 本鎖のときと大きな変化は無いが、ピレン修飾 RNA では相補鎖 RNA とフルマッチの二重螺旋形成時に、モノマー蛍光が著しく増強されることを発見した [5–8]。これは、ピレン修飾 DNA ではピレンが二重螺旋内部に存在し周辺の塩基等とインターカレーションしており、また、ピレン修飾 RNA ではピレンが二重螺旋の外部に存在することにより蛍光の増大が起こるためであると示唆している [8]。

また、ピレン修飾 RNA においては、相補的でない塩基対 (以降ミスマッチとする) を一部含む場合、ミスマッチがピレン修飾部の近傍 (2 塩基以内) に存在するときは蛍光の増大は観測されず、3 塩基以上離れると再び蛍光の増大することが山名らにより観測されている [9]。

| | Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
|-----|----------|----|---|---|---|-------|---|---|---|---|----|----|
| DNA | A strand | 3' | G | G | A | G | T | A | C | U | C | 5' |
| | B strand | 5' | C | C | U | (Pyr) | C | A | T | G | A | G |
| RNA | A strand | 3' | G | G | A | G | U | A | C | U | C | 5' |
| | B strand | 5' | C | C | U | (Pyr) | C | A | U | G | A | G |

Figure 1. The sequence of full-match pyrene-modified DNA and RNA

しかし、ピレン修飾 DNA および RNA における、ピレンの挙動やピレンと周辺塩基の構造などは明らかにされておらず、より高性能なプローブを開発するためにも、それら様々な情報は必要不可欠である。そこで、これら実験的手法で研究されてきたピレン修飾核酸のさらに詳細な情報を得ることを目的として、分子動力学 (MD) シミュレーションを実行し、ピレン修飾を施したフルマッチ DNA および RNA やミスマッチを含むピレン修飾 RNA を再現し、ピレンの周辺塩基や二重螺旋に対する配座やその周辺塩基の構造について解析を行った。

2 シミュレーション条件

本研究では、中村らの実験と同じフルマッチ 10 量体ピレン修飾 DNA および RNA を用いて MD シミュレーションを行った [8]。各シーケンスは Figure 1 に示す。また、ミスマッチを含むピレン修飾 RNA についても実験と同様、Figure 2 に示すシーケンスの 15 量体を用いた。各シーケンスにおける塩基対をそれぞれ Position 1~10 および Position 1~15 とした。

ピレン修飾残基については、ウリジン (Uridine) の糖部 2' 位にメチレンリンカーを介してピレンを修飾した 2'-O-(1-Pyrenylmethyl)uridine を用いた。

シミュレーションソフトには、生体高分子のシミュレーションに適した AMBER ver.6.0 [10] を用いた。2'-O-(1-Pyrenylmethyl)uridine の構造や電荷などは AMBER のデータベースに登録されていないため、それらを登録するための入力ファイルを作成する必要がある。そこで入力ファイルの作成には、我々の開発した Modast-P [11-14] の AMBER に対する新規残基追加支援システムを用いて作成した。このシステムにおいては、形式電荷を MOPAC により算出した。修飾残基の各原子に対する原子タイプは AMBER の parm94 より作成した。

| | Position | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
|-----|----------|-----|----|---|---|---|-------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| RNA | A strand | 5' | A | C | A | U | (Pyr) | C | C | A | G | U | A | G | U | U | 3' |
| | B strand | I | 3' | U | G | U | A | A | G | U | C | A | C | A | A | C | U |
| | | II | 3' | U | G | U | A | A | G | G | C | C | A | C | A | A | C |
| | | III | 3' | U | G | U | A | A | G | G | U | U | A | C | A | A | C |

Figure 2. The sequence of mismatch pyrene-modified RNA

全てのシミュレーションは、AMBER6 の sander モジュールより行い、force field には AMBER の ff94 force field を適用した。まず AMBER の LEaP モジュールでモデリングを行った。二重螺旋構造の核酸を配置し、その中にピレン修飾残基を導入した。全てのピレン修飾体において、ピレンは塩基対とほぼ平行に二重螺旋内部に配置した。

シミュレーションは、エネルギー極小化計算を実行し構造の安定化を図った後、MD シミュレーションを行った。シミュレーションの環境は、水溶媒分子とカウンターイオンを核酸の周囲に発生させ、水中を模倣した系とした。水分子の配置は、AMBER の “solvate-box” コマンドを用い、DNA および RNA 分子より、x、y、z 軸の正負両方向へ 10Å ずつの Solvate Box を作成し、AMBER の WATBOX216 に基づいて TIP3P 水分子を配置した。カウンターイオンは、DNA および RNA のリン酸における電荷の中和を目的として、ナトリウムイオンを 18 個挿入した。また、温度は全て 300 K とし、MD シミュレーション時間はフルマッチピレン修飾 DNA および RNA に対し、長時間のシミュレーションを行ったが大きな構造変化が見られなかったため、全て 1ns (Time step 1fs) で議論した。

3 結果と考察

3.1 フルマッチピレン修飾 DNA と RNA におけるピレン残基の挙動

ピレン修飾 DNA はフルマッチの二重螺旋形成時において、ピレンのモノマー蛍光は 1 本鎖のときと大きな変化が無いが、ピレン修飾 RNA ではフルマッチの二重螺旋形成時にモノマー蛍光が著しく増強することが合成実験において確認されている。そして、CD スペクトルや NMR などから、ピレン修飾 DNA ではピレンが二重螺旋内部に存在し周辺の塩基等とインター

カレーションしていることと、ピレン修飾 RNA ではピレンが二重螺旋の外部に存在していることが示唆されている [8]。

そこで、中村らと同様のフルマッチピレン修飾 DNA および RNA について MD シミュレーションを実行し、ピレンとピレン周辺の構造を比較した。

3.1.1 メチレンリンカーの挙動

ピレンを二重螺旋内部に配置したピレン修飾 DNA および RNA 双方のモデリング構造からエネルギー極小化計算後の極小化構造への構造変化をグラフィック表示により調べたところ、ピレン修飾 DNA ではピレンは二重螺旋内部に留まり、ピレン修飾 RNA ではピレンは二重螺旋外部に配座する結果となった。

そこで、ピレンとウリジンの糖をつなぐメチレンリンカーにおける二面角 α , β , γ の時間推移を Figure 3 に

示す。各二面角は DNA・RNA とも全て揺らいでいる程度であることが確認される。このことはピレン修飾 DNA および RNA ともにピレンは安定した状態を保っていることを示している。

次に、DNA と RNA の相違について、まず、糖とピレンの配座に大きく影響する二面角 α と β それぞれについて考察する。DNA と RNA で明らかな相違が見て取れるのは α であり、 β は双方ほぼ同様の値を取っている。これは、ピレンがリンカーの根元の部分から配座の異なるを示していることを示しており、二面角 α , β の値からピレンが DNA では内部、RNA では外部 (副溝) 方向に配座することを示している。

また、二面角 γ において、ピレンが二重螺旋内部に収まっている DNA だけでなく、ピレンが二重螺旋外部に存在する RNA においても γ は回転等の大きな挙動を示さなかった。

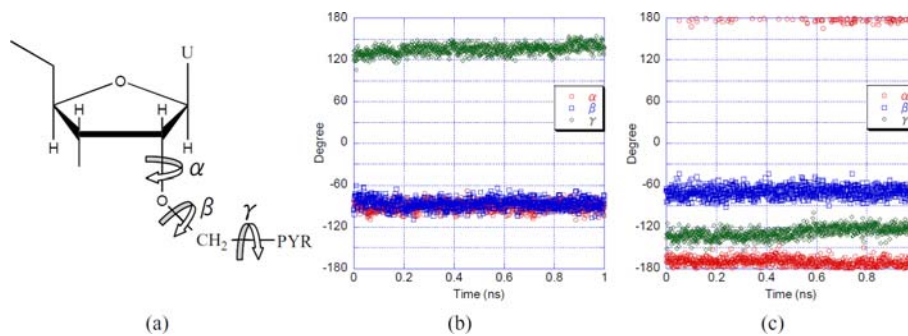


Figure 3. The structure of 2'-O-(1-pyrenylmethyl)uridine (a). The dihedral angle (α , β , γ) of linker in DNA (b) and RNA (c).

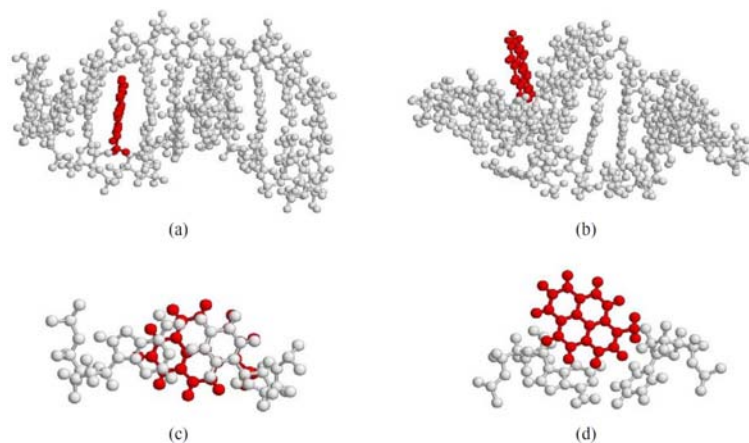


Figure 4. The side view of Ball & Stick Model display of full-match pyrene-modified DNA at 1ns (a) and full-match pyrene-modified RNA at 1ns (b). The top view of the pyrene aromatic plane together with A-U nucleoside pair of full-match pyrene-modified DNA at 1ns (c) and full-match pyrene-modified RNA at 1ns (d).

3.1.2 1ns 後におけるピレン修飾核酸の構造

1ns 後における、ピレン修飾 DNA および RNA のスナップショットを Figure 4 に示す。ピレン修飾 DNA (Figure 4(a)) ではピレンが隣接の塩基対とほぼ平行に並んでおり、それに対して、ピレン修飾 RNA (Figure 4(b)) ではピレンが二重螺旋の外に出てくるのが確認できる。

螺旋軸方向からピレンとピレン周辺核酸残基を見た Figure 4 の (c) と (d) では、ピレン修飾 DNA の場合のみピレンと塩基が重なり合っている様子が見える。

3.1.3 ピレンを挟む塩基間の距離

ピレンを挟む 2 つの塩基間の距離として各残基の C1' における水素間距離を調べたところ、DNA の A 鎖では約 6.0Å、B 鎖では約 6.5Å であった。これは、B 型 DNA 二重螺旋構造の基本構造では 5.0Å、そしてピレンを修飾していない同シーケンス DNA についての MD シミュレーションより得られた平均値が約 5.0Å であることから、A 鎖で約 1Å、B 鎖で約 1.5Å 増加している。それに対し、RNA では A 鎖が約 5.7Å、B 鎖が 6.5Å であった。これは、A 型 RNA 二重螺旋の基本構

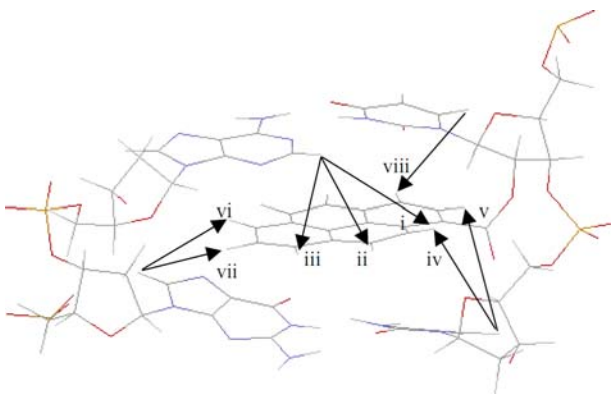


Figure 5. The proton pairs between the bases and pyrene for which NOE signals are observed.

造では 5.6Å、そしてピレンを修飾していない同シーケンス RNA についての MD シミュレーションより得られた平均値が約 5.5Å であることから、A 鎖はほとんど変わらず、B 鎖のみ約 1Å の増加が見られただけであった。これは、DNA ではピレンが二重螺旋内部に存在するため、A 鎖および B 鎖において塩基対間距離の増加が引き起こされたのに対し、RNA ではピレンが二重螺旋の外側へ出ているためメチレンリンカー部分のみが影響し、B 鎖のみ塩基間距離が増加したもののと思われる。

3.1.4 ピレンと周辺塩基

中村らはピレン修飾 DNA のピレンのインターカレーションを証明するため、NMR から NOESY スペクトルを測定し、ピレンと周辺塩基との水素間におけるオーバーハウザー効果を観測している [8]。これは水素間距離が約 5Å 以下で観測されるものであるため、中村らによってオーバーハウザー効果が観測された水素間距離を i~viii (Figure 5) とし、MD シミュレーションにおけるピレン修飾 DNA および RNA の各水素間距離の平均を Table 1 に示す。

Table 1 から、ピレン修飾 DNA では、シミュレーション結果においても全ての水素間距離でオーバーハウザー効果が観測され得る距離が示された。また、各水素間距離とオーバーハウザー効果の強度において、水素間距離が短いところはオーバーハウザー効果の強度も高く、長いところは強度も低いという高い相関性を示した。このことから、ピレン修飾 DNA において、本シミュレーションはピレンの塩基対間内部にインターカレートしている状態をよく再現していると思われる。

また、ピレン修飾 RNA では、A 鎖側の塩基とピレンの水素間距離 vi, vii が特に大きな値をとっている。よって、ピレン修飾 RNA においては、ピレンが塩基対間の外へ出ていることがこの結果からも確認される。

Table 1. The average distances between the bases and pyrene protons in full-match pyrene-modified DNA and full-match Pyrene-modified RNA, and strength of NOE signals in full-match pyrene-modified DNA.

| | i | ii | iii | iv | v | vi | vii | viii |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Full-match DNA (Å) | 4.6 | 3.4 | 3.4 | 4.6 | 5.4 | 3.8 | 5.4 | 3.2 |
| NOE signal [8] | ++ | +++ | +++ | + | + | ++ | ++ | +++ |
| Full-match RNA (Å) | 5.8 | 7.0 | 8.0 | 5.4 | 3.6 | 8.0 | 10.4 | 5.1 |

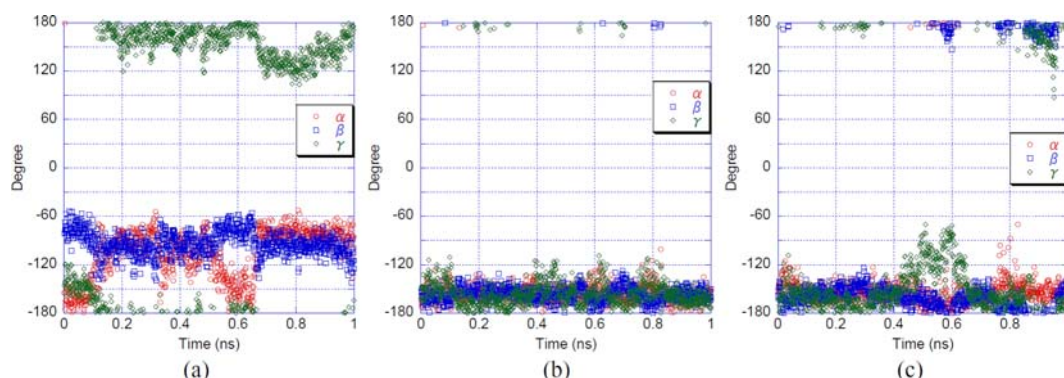


Figure 6. The dihedral angle of linker in Sequence I (a), Sequence II (b) and Sequence III (c).

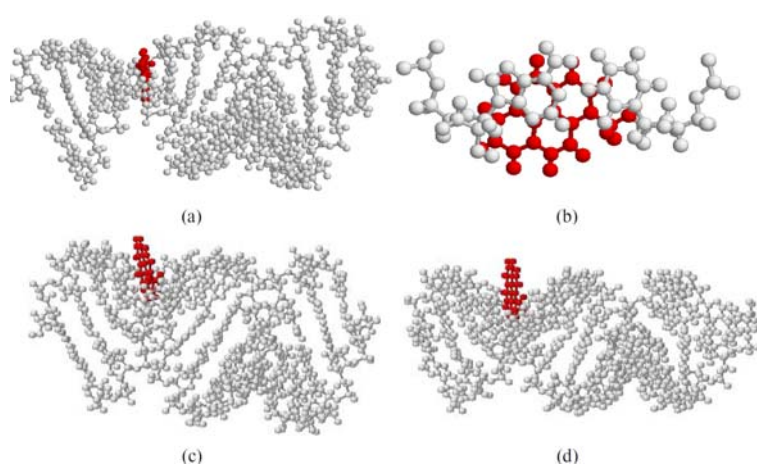


Figure 7. The side view of Ball & Stick Model display of Sequence I at 1ns (a). The top view of the pyrene aromatic plane together with A-U nucleoside pair of Sequence I at 1ns (b). The side view of Ball & Stick Model display of Sequence II at 1ns (c) and Sequence III at 1ns (d).

3.2 ピレン修飾 RNA におけるミスマッチの影響

ピレン修飾核酸を塩基配列認識プローブとして利用するためには、フルマッチだけでなくミスマッチによる蛍光強度やピレンと周辺塩基の構造への影響を検討する必要がある。

そこで、一本鎖のときとフルマッチ二本鎖のときで、明らかな違いを示したピレン修飾 RNA について塩基対ミスマッチの位置によるピレンの挙動に対する影響を調べた。今回使用したミスマッチ RNA (15 量体) は、A 鎖の 5' 末端からの位置 Position 6~8 にミスマッチが存在する (以降、ピレン修飾部からミスマッチが近い順にシーケンス I~III とする) (Figure 2)。これらシーケンス I~III は、I では二本鎖を形成した際、フ

ルマッチのピレン修飾 RNA とは異なり蛍光の増大は観測されず、II, III ではフルマッチのピレン修飾 RNA と同様に蛍光の増大が観測されている [9]。

さらに、ミスマッチにおいては様々な組み合わせが考えられるため、他の組み合わせについてもシミュレーションを行い、ミスマッチの組み合わせによるピレン周辺部位への影響を調査した。

3.2.1 メチレンリンカーの挙動

フルマッチのときと同様にミスマッチ修飾 RNA について極小化構造を解析したところ、シーケンス I ではピレンが二重螺旋内部に留まり、シーケンス II, III では二重螺旋外部に配座する結果となった。

Table 2. The average distances between base pairs in Sequences I-III.

| | A strand | B strand |
|----------------|----------|----------|
| Sequence I (Å) | 6.9 | 6.4 |
| II (Å) | 6.7 | 6.1 |
| III (Å) | 6.5 | 6.2 |

ミスマッチを含むシーケンス I~III におけるメチレンリンカーの各二面角の時間推移を Figure 6 に示す。Figure 6 から、シーケンス I のメチレンリンカーは 1ns 中に構造変移を起こしているが、シーケンス II, III はほぼ一定の状態を保っていることが確認される。

そこでまず、3.1.1 と同様に糖とピレンの配座に大きく影響する二面角 α と β について考察する。シーケンス I では、ピレンが二重螺旋内部にいる状態 ($\alpha \cong -90^\circ$ であり極小化構造でもほぼ同値) をほぼ維持しており、僅かの間だけ二重螺旋外部 ($\alpha \cong -180^\circ$) に出ているが、すぐに内部に戻っている様子が確認される。それに対し、シーケンス II と III では終始ピレンは二重螺旋外部に留まっていることが確認される。

また、二面角 γ において、シーケンス I ではメチレンリンカーの構造転移に伴い、ピレンの向きも変化している様子が確認される。シーケンス II・III ではフルマッチのピレン修飾 RNA と同様、二重螺旋の外部にピレンが配座しているにもかかわらず、回転等の大きな挙動は示されなかった。

3.2.2 1ns 後におけるピレン修飾核酸の構造

1ns 後における、シーケンス I~III のスナップショットを Figure 7 に示す。3.2.1 のリンカーの挙動でも示された通り、シーケンス I ではピレンは二重螺旋内部に留まり、シーケンス II, III ではピレンが二重螺旋の外部に出ていることが確認できる。

3.2.3 ピレンを挟む塩基間の距離

次に、3.1.3 と同様に C1' におけるの水素間距離を調べた (Table 2)。シーケンス I において、ピレンが修飾されている A 鎖の平均水素間距離は約 6.9Å、B 鎖は約 6.4Å であった。同様に、シーケンス II では A 鎖約 6.7Å、B 鎖約 6.1Å、シーケンス III では A 鎖 6.5Å、B 鎖 6.2Å であった。A 型 RNA 二重螺旋の基本構造での水素間距離は 5.57Å であり、同シーケンスかつ未修飾

Table 3. The average distances between the bases and pyrene protons in Sequences I-III.

| | i | ii | iii | iv | v | vi | vii | viii |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|
| Sequence I (Å) | 4.8 | 4.3 | 4.7 | 4.1 | 4.5 | 5.9 | 4.6 | 4.3 |
| II (Å) | 5.1 | 6.3 | 7.5 | 5.4 | 3.6 | 9.3 | 7.0 | 4.8 |
| III (Å) | 5.6 | 6.0 | 6.6 | 5.5 | 4.0 | 10.9 | 8.5 | 4.8 |

のフルマッチ RNA の MD より得られた平均距離が A 鎖約 5.6Å、B 鎖約 5.5Å であること、さらにフルマッチのピレン修飾 RNA では A 鎖約 6.6Å、B 鎖 5.8Å であることから、フルマッチピレン修飾 DNA のときほど明確ではないが、ミスマッチにより周辺の構造に乱れが生じて塩基間が広がっており、シーケンス I ではさらにピレンが二重螺旋内部に存在することによって塩基対間の広がりが最も大きくなったと考えられる。

3.2.4 ピレンと周辺塩基

Table 3 にフルマッチのピレン修飾 DNA および RNA で測定した水素間と同様の各距離 i~viii を示す。I では、水素間距離 vi が他の水素間距離に比べ僅かに大きな値を示すが、他の水素間距離の結果からピレンはフルマッチのピレン修飾 DNA と同様に塩基対の間に存在していることが推察される。それに対し、II, III ではフルマッチのピレン修飾 RNA の場合に近い水素間距離が得られたことから、フルマッチのピレン修飾 RNA と同様にピレンは塩基対の外側に存在していることが示された。

3.2.5 ミスマッチにおける他の組み合わせ

シーケンス I~III より、ミスマッチの位置によるピレンとピレン周辺への影響を考察したが、次に、ミスマッチの組み合わせを Figure 2 の組み合わせと変更した場合について検討した。

フルマッチピレン修飾 DNA および RNA とシーケンス I~III の極小化構造の結果から、ピレンが二重螺旋内部に留まり得るピレン修飾核酸は、極小化構造の時点でピレンが二重螺旋内部に留まっており、ピレンが二重螺旋外部に配座するものは極小化構造の時点ですでにピレンが二重螺旋外部に配座していた。そこで、極小化構造をピレンが二重螺旋内部に留まるか外部に配座するかの指標とした。

Table 4. Calculated positions and combinations of mismatched base pairs.

| A strand \ B strand | | A | U | G | C |
|---------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| Position 6 | C6 | o | o | (×) | o |
| | A6 | - | (×) | - | o |
| | U6 | (×) | o | o | o |
| | G6 | - | o | - | (×) |
| Position 7 | A7 | - | (-) | - | × |
| | U7 | (-) | × | × | × |
| | G7 | - | × | - | (-) |
| | C7 | × | × | (-) | × |
| Position 8 | G8 | - | × | - | (-) |
| | A8 | - | (-) | - | × |
| | U8 | (-) | × | × | × |
| | C8 | × | × | (-) | × |

o Inside the double helix
 × Outside the double helix
 - not simulated
 () Full-match sequence

そこで、ミスマッチの位置はシーケンス I~III と同様であるがミスマッチの種類のみを変更したピレン修飾 RNA に対して、それぞれ極小化計算を実行し、ピレンが内部に留まるか外部に配座するかを調べた。ただし、塩基対がプリン (アデニンおよびグアニン) 同士のミスマッチは、A 型 RNA 二重螺旋の基本構造において塩基が重なり合ってしまうため、シミュレーションは実行しなかった。また、フルマッチにおいては、シーケンス I の場合のみ行った。結果は、ピレンが二重螺旋内部に留まる場合を “o”、外部に配座する場合を “×”、シミュレーションを行わなかった場合 “-” として Table 4 に示す (括弧付きの (×)、(-) はフルマッチの組み合わせであることを示す) Table 4 から、シーケンス I と同様にピレンから 2 残基離れた位置にミスマッチがあるピレン修飾 RNA ではミスマッチの種類に関わらずピレンは二重螺旋内に留まり、シーケンス II, III と同様の位置にミスマッチがあるピレン修飾 RNA では、ピレンが二重螺旋外部に出るといった結果が示された。

4 結言

本稿では、ピレン修飾核酸における MD シミュレーションの妥当性と塩基配列認識プローブの開発への可

能性を検討した。フルマッチのピレン修飾 DNA ではピレンは二重螺旋内部に留まり、隣接する塩基と非常によく重なり合っている様子がピレンと周辺塩基との水素間距離などにより確認された。また、ピレンが二重螺旋内部に留まることにより、ピレンを挟む 2 つの塩基の間が A 鎖、B 鎖とも広がることも確認された。それに対しフルマッチのピレン修飾 RNA では DNA の様なピレンが二重螺旋内部に留まることはなく、二重螺旋の外側へ出ており、塩基との重なり合いも起こしておらず、ピレンを挟む塩基間の距離もメチレンリンカーの影響によるものと思われる B 鎖のみ増加がみられ A 鎖では増加は確認されなかった。また、ピレンの挙動に対しては、ピレン修飾 DNA および RNA の双方とも揺らいでいる程度で回転等大きな挙動は見受けられなかった。ミスマッチを含むピレン修飾 RNA では、ミスマッチがピレン修飾部から 2 塩基離れた場合では二重螺旋内に留まり、3 塩基以上離れた場合では二重螺旋外に出ることが確認された。

以上の結果から、ピレン修飾核酸の MD シミュレーションは中村らの実験結果によく則した結果となり、ミスマッチによるピレンの挙動への影響を予測することが可能であることを示した。このことから、MD シミュレーションが実際のターゲットに対するプローブ設計への指針と成り得ることを示す。

参考文献

- [1] A. Murakami, M. Nakamura, Y. Nakatsuji, S. Nagahara, Q. Tran-Cong, and K. Makino, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4097 (1991).
- [2] Y. Jenkins and J. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8736 (1992).
- [3] T. Ishiguro, J. Saitoh, H. Yawata, M. Ohtsuka, T. Inoue, and Y. Sugiura, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4992 (1996).
- [4] K. Yamana, Y. Ohashi, K. Nunota and H. Nakano, *Tetrahedron*, **53**, 4265 (1997).
- [5] K. Yamana, R. Iwase, S. Furutani, H. Tsuchida, H. Zako, T. Yamaoka and A. Murakami, *Nucleic Acids Research.*, **27**, 11 (1999).

- [6] K. Yamana, H. Zako, K. Asazuma, R. Iwase, H. Nakano and A. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 6 (2001).
- [7] A. Mahara, R. Iwase, T. Sakamoto, K. Yamana, T. Yamaoka and A. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 19 (2002).
- [8] M. Nakamura, Y. Fukunaga, K. Sasa, Y. Ohtoshi, K. Kanaori, H. Hayashi, H. Nakano and K. Yamana, *Nucleic Acids Research*, **33**, 18 (2005).
- [9] K. Yamana, Personal communication
- [10] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen and D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, **7**, 230 (1986).
<http://www.amber.ucsf.edu/amber/amber.html>
- [11] T. Uno, H. Hayashi, K. Yamana and H. Nakano, *J. Chem. Software*, **4**, 1 (1998).
- [12] T. Uno, H. Hayashi, K. Yamana and H. Nakano, *J. Chem. Software*, **5**, 39 (1999).
- [13] K. Sasa, T. Uno, H. Hayashi, K. Yamana and H. Nakano, *J. Comput. Chem. Jpn.*, **2**, 4 (2003).
- [14] K. Sasa, T. Uno, H. Hayashi, K. Yamana and H. Nakano, *J. Comput. Chem. Jpn.*, **4**, 3 (2004).

Molecular Dynamics Study for the Base Sequence Recognition Probe of Nucleic Acids Modified with the Pyrenyl Group

Kazuhiro SASA^{a*}, Takeshi UNO^b, Haruhisa HAYASHI^c and Hidehiko NAKANO^a

^aDepartment of Materials Science and Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Hyogo
2167 Shosha, Himeji, Hyogo, 671-2201, JAPAN

^bDepartment of Management and Information Sciences, Hiroshima Prefectural University
562 Nanatuka, Shobara, Hiroshima, 727-0023, JAPAN

^cLibrary and Academic Information Center, University of Hyogo
2167 Shosha, Himeji, Hyogo, 671-2201, JAPAN

*e-mail: en02g004@steng.u-hyogo.ac.jp

It is known that RNA modified with the pyrenyl group (pyren-RNA) which uses the pyrene moiety as a fluorescent chromophore shows a remarkable increase in fluorescence when the double helix is formed with the complementary strand RNA, compared to the single strand pyrene-RNA, and that this phenomenon is not seen with DNA. For the purpose of designing a sequence recognition probe based on these phenomena, detailed data of the pyrenyl moiety in the pyrene-RNA and pyrene-DNA of double stranded structures are observed with MD simulation. In addition, the influence of mismatched combination of base in the complementary strand was examined. As a result, it was revealed that in the full-match double stranded pyrene-DNA the pyrene moiety stays inside the helix but in the full-match double stranded pyrene-RNA pyrene was thrust out of the helix. Mismatch sequence in the pyrene-RNA double strand influenced the behavior of the pyrenyl moiety when the mismatch position was located close to the pyrene modified position.

Keywords: Base sequence recognition probe, Pyrene, DNA, RNA, Molecular dynamics