

博士論文審査報告書

氏名	西上 博士
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博理第119号
学位授与報告番号	甲第357号
学位授与月日	平成31年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	Molecular dynamics study of selective binding of supercoiled-DNA recognition peptide with spatially crossover DNA 「スーパーコイル DNA 結合ペプチドによる空間交差 DNA2重鎖認識メカニズムの動力的理論解析」
論文審査委員	(主査) 教授 樋口 芳樹 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 舘野 賢 (副査) 主任研究員 山崎 和彦 (国立研究開発法人産業技術総合研究所) (副査) 教授 Bert de Groot (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Principal Investigator)

* Groot 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。

1. 論文内容の要旨

DNA のスーパーコイル構造(スーパーコイル DNA)は、DNA の 2 重らせん構造がさらにねじれることによって形成される高次のらせん構造である。ゲノム DNA における転写、複製、修復、相同組み換え、またクロマチン構造の形成・リモデリングなど、ゲノム DNA の折り畳みにも深く関連し、様々な生命機能と関わっていることが、近年急速に明らかになってきた。転写の活性な領域に形成されるスーパーコイル DNA については、それに結合する因子のひとつとして Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF) が知られており、他の転写因子をリクルートする機能を有することが明らかにされている。HIV-1 ウイルスにおいても、LEDGF が HIV-1 のプレインテグレーション複合体を宿主細胞のクロマチンに結合させる役割を有し、LEDGF は HIV-1 ゲノムのインテグレーションにおいて不可欠な補因子である。

LEDGF による DNA 認識は、スーパーコイル DNA において局所的に形成される、2 重鎖 DNA の交差構造 (Spatial Crossover Configuration) に結合することによる。そのアミノ酸配列内においては、Lys および Glu 残基のそれぞれのクラスターが交互に現れる領域で、スーパーコイル DNA を認識する (Supercoiled DNA Recognition Domain; 以下 SDR ドメイン)。驚くべきことに、SDR ドメインのアミノ酸配列を模して合成されたペプチド (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉ (以下 SDR ペプチド) もまた、Mg²⁺ イオン依存的なスーパーコイル DNA への選択的結合能を有することが明らかになった。そこで西上氏は、SDR ペプチドによる DNA 交差構造への選択的結合のメカニズムを明らかにするために、i) SDR ペプチド単体、ii) DNA 交差構造、iii) それらの複合体の立体構造のそれぞれを、分子動力学 (MD) 計算を駆使して理論的に解析した。

SDR ペプチド自体はランダムコイル状態にあることが、従来の生化学実験により示唆されていた (Intrinsic Disordered Protein; IDP)。西上氏は、一般化アンサンブル法を用いた高度な MD 計算を実行し、生成された立体構造アンサンブルを理論的に解析した結果、前述の実験結果とは異なり、Lys と Glu 残基の境界にヘリッ

クス構造が高い確率で形成されることを見出した。そこで SDR ペプチド全体のヘリックス構造の割合を、円偏光二色性(CD)スペクトルによる実験と比較したところ、両者はよく一致した。そのため、Glu-Lys 境界領域に形成されるこうしたヘリックス構造の安定化の要因を理論的に解析した。その結果、Glu と Lys 残基の間で塩橋と疎水性コンタクトが同時に形成され(ハイブリッド・コンタクトと名づけた)、立体構造を安定化することが分かった。さらに立体構造データベースを探索した結果、従来のタンパク質構造においても一般に、(Lys)_n や(Glu)_m クラスタがハイブリッド・コンタクトを形成し、ヘリックス構造を安定化する傾向を有することが分かった。

次に DNA 交差構造における Mg²⁺ イオンの役割を明らかにするために、様々な Mg²⁺ 濃度において MD 計算を実行し、立体構造の安定性とそれを決定する相互作用を解析した。その結果 Mg²⁺ イオンは、i) DNA 交差構造に特異的に結合することにより、最も安定な配向を誘導する(Mg²⁺ 濃度には依存しないことを合わせて示した)と共に、ii) 静電相互作用による統計物理学的な効果(Ionic Atmosphere)によって結合配向の安定性を制御する(Mg²⁺ の濃度に依存する)、以上のふたつの異なる役割を有することが分かった。さらに、DNA 交差構造を解離するのに必要な自由エネルギーを、様々な Mg²⁺ 濃度で計算した結果、~40 mM の濃度を臨界値として、DNA 交差構造を形成する確率(頻度)が急激に高くなることを見出した。これは、従来の複数の実験結果と良く合致しており、それらの実験データの有する意味が、統計熱力学および細胞生物学的な観点から、初めて理解されるに至った。

さらにドッキング計算によって複合体の立体構造を解析した結果、DNA 交差構造の対称性により、4 つの SDR ペプチドが DNA 交差構造に対称に結合し得ることが分かった。これは、CD スペクトルのデータと良く一致する。さらにこの複合体の立体構造から、SDR ペプチドの解離に要する自由エネルギーを計算した結果、(1本の2重鎖 DNA への結合解離よりも)DNA 交差構造からの解離は約 3 kcal/mol 小さい(複合体がより安定)ことが分かった。この結果は、SDR ペプチドがスーパーコイル DNA に対して約 10 倍の選択性を有する従来の生化学データと合致する。このようにして DNA 交差構造に 1 分子の SDR ペプチドが結合すると、DNA 交差構造がより安定になるために、他の 3 つの結合サイトへのペプチド結合が誘導されることにより、結合の協同性(CD 分光法によるデータ)のメカニズムを理解することが可能となった。

以上のようにして、SDR ペプチド、DNA 交差構造、それらの複合体のそれぞれについて、立体構造とその安定性および複合体形成におけるメカニズムが、統計熱力学における基本原理に基づいて原子レベルで初めて詳細に解明された。

2. 論文審査結果

本研究の解析対象であるスーパーコイル DNA は、ゲノム DNA が関連する様々な生命機能に関わり、近年、その高次構造の形成自体が機能の調節に関連することが明らかになってきた。転写制御メカニズム等の研究は、その中でも近年、特に精力的に推進されている領域である。他方で、スーパーコイル DNA と転写制御タンパク質との相互作用や、それらの複合体の立体構造形成のメカニズムは、いまだほとんど未知である。こうした中で本研究は、スーパーコイル DNA 内に形成される DNA 交差構造と、それを認識する SDR ペプチドの、それぞれの立体構造と安定性、および複合体形成のメカニズムを、自由エネルギーに基づいて理論的かつ定量的に明らかにした初めての研究である。特に、それぞれの因子の解析と、さらにそれらが複合体を形成するメカニズムの課題全体に渡って、立体構造およびその安定性の要因を原子レベルで理論的に解析し、以って選択的結合の本質的なメカニズムを明らかにした点は、国際的にも極めて先鋭的な成果と考えられる。

このように本研究の成果は、ゲノム DNA における様々な高次構造形成のメカニズムやダイナミクスを、原子レベルにおける物理的な相互作用と基本原理に基づいて本質的に理解するために、基礎的な知見を与えるものであり、今後、実験・理論の両面において重要な意義を有する成果であると評価できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 31 年 1 月 17 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title : Molecular dynamics study of selective binding of supercoiled-DNA recognition peptide with spatially crossover DNA

Applicant : Hiroshi Nishigami

1. Abstract of the thesis

Supercoiled DNA is a higher order helical structure of double-stranded (ds) DNA, which is induced by incorporation of additional twists in the double helical DNA structure. Supercoiled DNA is closely relevant to various biological functions, such as transcription, replication, repair, recombination, and chromatin remodeling. In particular, supercoiled DNA is preferentially formed in active transcriptional regions in nuclei. A nucleus factor, lens epithelium-derived growth factor (LEDGF), recognizes and selectively binds to the supercoiled DNA, and thereby recruits other proteins to the active transcriptional regions. Moreover, LEDGF is a cellular cofactor of HIV-1 integrase that promotes the viral integration by tethering the preintegration complex to the chromatin.

LEDGF selectively binds to the spatial crossover configuration form by DNA duplexes, which is a local structure found in the supercoiled DNA. The DNA-binding domain of LEDGF, referred to here as the supercoiled DNA recognition (SDR) domain, is composed of the conservative Lys and Glu residue clusters, i.e., (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉. Surprisingly, some isolated polypeptides, which were extracted from the SDR domain, such as (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉, preserve the comparable selectivity for the supercoiled DNA. In particular, a characteristic sequence, (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉, is referred to here as SDR peptide, since it also exhibited the selectivity to the supercoiled DNA. Mr. Nishigami employed advanced methods of molecular (MD) dynamics simulation in terms of (i) the isolated SDR peptide, (ii) the isolated DNA crossover, and (iii) their complex, in order to understand mechanisms of the selective binding between the SDR peptide and the DNA crossover in the supercoiled DNA that is dependent on the Mg²⁺ concentration.

Concerning the isolated form of SDR peptide, previous biochemical experiments suggested that it takes the random coil state. However, MD simulations coupled with a generalized ensemble method (replica exchange MD) indicated that a substantial amount of helical structures was found in the boundary regions between Lys and Glu residue segments. In the present study, the helical content of the (entire) SDR peptide was compared with that obtained by the circular dichroism (CD) spectroscopy, and thereby both were elucidated to be comparable. So, he analyzed the conformational ensemble of the helical structures obtained by the advanced MD simulations, and revealed that the hybrid electrostatic/hydrophobic contacts that were formed in Lys-Glu residue pairs were responsible for formation and stabilization of the helical structures. Moreover, the bioinformatics analysis of the Protein Databank (PDB) indicated that the hybrid contacts were also identified to contribute to the stabilization of the helical structures found in various conventional protein structures.

As for the DNA crossover, standard and free energy MD simulations were performed at various Mg²⁺ concentrations to evaluate the stability of the crossover configurations of the DNA duplexes. As a result of the analysis, roles of Mg²⁺ on the DNA crossover were summarized as follows; i.e., i) the specific coordination of Mg²⁺ contributes to formation of the most stable crossover configurations of the DNA duplexes (this effect is independent of Mg²⁺ concentrations), and ii) the non-specific electrostatic atmosphere effects of Mg²⁺ regulate the dissociation free energy of the crossover configurations of two DNA duplexes of the DNA duplexes (ΔG_d ; i.e., affinity) (this is dependent on Mg²⁺ concentrations). The obtained free energy profiles indicated that the ratio of the populations between the dissociated and associated DNA duplexes significantly increased at ~40 mM of Mg²⁺

concentration (the critical concentration). This is consistent with previous experimental data, which thus provided the thermodynamic and atomistic understandings concerning these experimental data.

Furthermore, docking MD simulations to build the complex of the SDR peptide and the DNA crossover were performed, and thereby showed that four SDR peptides could bind to the DNA crossover in a symmetrical manner. This was consistent with the present CD spectroscopy measurement. Moreover, the binding free energy of the SDR peptide with the DNA crossover was, by ~ 3 kcal/mol, less than that with a single DNA duplex. This result was consistent with the experimental observation; in fact, the selectivity of the SDR peptide toward the supercoiled DNA is 10-fold. These structural features imply the following picture: Binding of SDR peptide to the DNA crossover may stabilize its crossover configuration of the DNA duplexes, which can thus promote binding of further three peptides. This also provides an explanation of the cooperative binding of the SDR peptides and DNA crossover, observed in the CD measurements.

In this manner, Mr. Nishigami theoretically revealed the characteristic features observed in the conformational ensemble of the SDR peptide (in the free state), the DNA crossover, and the structure of their complex. Based on these data, he elucidated the mechanism of the selective binding of SDR peptide and crossover DNA at the atomic structural level.

2. Evaluation of the thesis and the final examination

Recent studies have indicated that formation of supercoiled DNA is relevant to various biological functions, and thus the structural features of supercoiled DNA are involved in the regulation of those biological functions. In particular, it has been elucidated that supercoiled DNA is closely relevant to the transcriptional regulations, and thus this issue has recently been studied intensively. However, interactions of supercoiled DNA with transcription factors and mechanisms of the formation of their complexes have not been elucidated up to date enough to understand the structural basis of their functional mechanisms.

In this thesis, for each of DNA crossover and SDR peptide, the structural stability was theoretically and quantitatively analyzed by computationally evaluating the free energy values. For their complex formation and selective bindings, thermodynamical and structural mechanisms were analyzed. Thus, this study elucidated the mechanisms of recognition between DNA crossover and SDR peptide based on fundamental principles, and thereby includes cutting-edge achievements in the frontier of combined biophysics and molecular biology fields. So, this study could be a solid basis of future works to understand the mechanisms of topology and structural dynamics of genome DNA on the basis of physical atomic-level interactions and fundamental principles, thereby contributing to the encompassing understandings of the cellular functions and mechanisms.

Thus, the reading committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by Mr. Nishigami in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on January 17 in 2019.

The chief examiner : Yoshiki Higuchi _____

The second readers : Hideo Nishitani _____

: Masaru Tateno _____

: Kazuhiko Yamasaki _____

(Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced
Industrial Science and Technology, Senior Research Scientist)

: Bert de Groot
(Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Principal Investigator)

博士論文審査報告書

論文題目: Molecular dynamics study of selective binding of supercoiled-DNA recognition peptide with spatially crossover DNA
「スーパーコイル DNA 結合ペプチドによる空間交差 DNA 2重鎖認識メカニズムの動力学的理論解析」

申請者: 西上 博士

1. 論文内容の要旨

DNA のスーパーコイル構造(スーパーコイル DNA)は、DNA の 2 重らせん構造がさらにねじれることによって形成される高次のらせん構造である。ゲノム DNA における転写、複製、修復、相同組み換え、またクロマチン構造の形成・リモデリングなど、ゲノム DNA の折り畳みにも深く関連し、様々な生命機能と関わっていることが、近年急速に明らかになってきた。転写の活性な領域に形成されるスーパーコイル DNA については、それに結合する因子のひとつとして Lens Epithelium-Derived Growth Factor(LEDGF)が知られており、他の転写因子をリクルートする機能を有することが知られている。HIV-1 ウイルスにおいても、LEDGF が HIV-1 のプレインテグレーション複合体を宿主細胞のクロマチンに結合させる役割を有し、HIV-1 ゲノムのインテグレーションにおいて LEDGF は不可欠な補因子である。

LEDGF による DNA 認識は、スーパーコイル DNA において局所的に形成される、2 重鎖 DNA の交差構造(Spatial Crossover Configuration)に結合することによる。そのアミノ酸配列内においては、Lys および Glu 残基のそれぞれのクラスターが交互に現れる領域で、スーパーコイル DNA を認識する(Supercoiled DNA Recognition Domain; 以下 SDR ドメイン)。驚くべきことに、SDR ドメインのアミノ酸配列を模して合成されたペプチド (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉ (以下 SDR ペプチド)もまた、Mg²⁺ イオン依存的なスーパーコイル DNA への選択的結合能を有することが明らかになった。そこで西上氏は、SDR ペプチドによる DNA 交差構造への選択的結合のメカニズムを明らかにするために、i) SDR ペプチド単体、ii) DNA 交差構造、iii) それらの複合体の立体構造のそれぞれを、分子動力学(MD)計算を駆使して理論的に解析した。

SDR ペプチド自体はランダムコイル状態にあることが、従来の生化学実験により示唆されていた(Intrinsic Disordered Protein; IDP)。西上氏は、一般化アンサンブル法を用いた高度な MD 計算を実行し、生成された立体構造アンサンブルを理論的に解析した結果、前述の実験結果とは異なり、Lys と Glu 残基の境界にヘリックス構造が高い確率で形成されることを見出した。そこで SDR ペプチド全体のヘリックス構造の割合を、円偏光二色性(CD)スペクトルによる実験と比較したところ、両者はよく一致した。そのため、Glu-Lys 境界領域に形成されるヘリックス構造の安定化の要因を理論的に解析したところ、Glu と Lys 残基の間で塩橋と疎水性コンタクトが同時に形成され(ハイブリッド・コンタクトと名づけた)、それが構造安定化の重要な要因であることを明らかにした。さらに立体構造データベースを探索した結果、従来のタンパク質構造においても一般に、ハイブリッド・コンタクトがヘリックス構造を形成する傾向を有することが分かった。

次に DNA 交差構造における Mg²⁺ イオンの役割を明らかにするために、様々な Mg²⁺ 濃度において MD 計算を実行し、立体構造の安定性とそれを決定する相互作用を解析した。その結果 Mg²⁺ イオンは、i) DNA 交差構造に特異的に結合することにより、最も安定な配向を誘導する(Mg²⁺ 濃度には依存しないことを合わせて示した)と共に、ii) 静電相互作用による統計物理学的な効果(Ionic Atmosphere)によって結合配向の安定性を制御する(Mg²⁺ の濃度に依存する)、以上のふたつの異なる役割を有することが分かった。さらに、DNA 交差構造を解離するのに必要な自由エネルギーを、様々な Mg²⁺ 濃度で計算した結果、~40 mM の濃度を臨

界値として、DNA 交差構造を形成する確率(頻度)が急激に高くなることを見出した。これは、従来の複数の実験結果と良く合致しており、それらの実験データの有する意味が、統計熱力学および細胞生物学的な観点から、初めて理解されるに至った。

さらにドッキング計算によって複合体の立体構造を解析した結果、DNA 交差構造の対称性により、4 つの SDR ペプチドが DNA 交差構造に対称に結合し得ることが分かった。これは、CD スペクトルのデータと良く一致する。さらにこの複合体の立体構造から、SDR ペプチドの解離に要する自由エネルギーを計算した結果、(1本の2重鎖 DNA への結合解離よりも)DNA 交差構造からの解離は約 3 kcal/mol 小さい(複合体がより安定)ことが分かった。この結果は、SDR ペプチドがスーパーコイル DNA に対して約 10 倍の選択性を有する従来の生化学データと合致する。このようにして DNA 交差構造に 1 分子の SDR ペプチドが結合すると、DNA 交差構造がより安定になるために、他の 3 つの結合サイトへのペプチド結合が誘導されることにより、結合の協同性(CD 分光法によるデータ)のメカニズムを理解することが可能となった。

以上のようにして、SDR ペプチド、DNA 交差構造、それらの複合体のそれぞれについて、立体構造とその安定性および複合体形成におけるメカニズムが、統計熱力学における基本原理に基づいて原子レベルで初めて詳細に解明された。

2. 論文審査結果

本研究の解析対象であるスーパーコイル DNA は、ゲノム DNA が関連する様々な生命機能に関わり、近年、その高次構造の形成自体が機能の調節に関連することが明らかになってきた。転写制御メカニズム等の研究は、その中でも近年、特に精力的に推進されている領域である。他方で、スーパーコイル DNA と転写制御タンパク質との相互作用や、それらの複合体の立体構造形成のメカニズムは、いまだほとんど未知である。こうした中で本研究は、スーパーコイル DNA 内に形成される DNA 交差構造と、それを認識する SDR ペプチドの、それぞれの立体構造と安定性、および複合体形成のメカニズムを、自由エネルギーに基づいて理論的かつ定量的に明らかにした初めての研究である。特に、それぞれの因子の解析と、さらにそれらが複合体を形成するメカニズムの課題全体に渡って、立体構造およびその安定性の要因を原子レベルで理論的に解析し、以って選択的結合の本質的なメカニズムを明らかにした点は、国際的にも極めて先鋭的な成果と考えられる。

このように本研究の成果は、ゲノム DNA における様々な高次構造形成のメカニズムやダイナミクスを、原子レベルにおける物理的な相互作用と基本原理に基づいて本質的に理解するために、基礎的な知見を与えるものであり、今後、実験・理論の両面において重要な意義を有する成果であると評価できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成 31 年 1 月 17 日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判定した。

主査：樋口 芳樹

副査：西谷 秀男

： 舘野 賢

： 山崎 和彦

(国立研究開発法人産業技術総合研究所、主任研究員)

： Bert de Groot 署名* _____

(Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Principal Investigator)

* Groot 委員の審査結果については別紙(英文)として添付する。



Evaluation Report for Doctoral Thesis

Title : Molecular dynamics study of selective binding of supercoiled-DNA recognition peptide with spatially crossover DNA

Applicant : Hiroshi Nishigami

1. Abstract of the thesis

Supercoiled DNA is a higher order helical structure of double-stranded (ds) DNA, which is induced by incorporation of additional twists in the double helical DNA structure. Supercoiled DNA is closely relevant to various biological functions, such as transcription, replication, repair, recombination, and chromatin remodeling. In particular, supercoiled DNA is preferentially formed in active transcriptional regions in nuclei. A nucleus factor, lens epithelium-derived growth factor (LEDGF), recognizes and selectively binds to the supercoiled DNA, and thereby recruits other proteins to the active transcriptional regions. Moreover, LEDGF is a cellular cofactor of HIV-1 integrase that promotes the viral integration by tethering the preintegration complex to the chromatin.

LEDGF selectively binds to the spatial crossover configuration form by DNA duplexes, which is a local structure found in the supercoiled DNA. The DNA-binding domain of LEDGF, referred to here as the supercoiled DNA recognition (SDR) domain, is composed of the conservative Lys and Glu residue clusters, i.e., (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉. Surprisingly, some isolated polypeptides, which were extracted from the SDR domain, such as (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉, preserve the comparable selectivity for the supercoiled DNA. In particular, a characteristic sequence, (Lys)₉(Glu)₉(Lys)₉, is referred to here as SDR peptide, since it also exhibited the selectivity to the supercoiled DNA. Mr. Nishigami employed advanced methods of molecular (MD) dynamics simulation in terms of (i) the isolated SDR peptide, (ii) the isolated DNA crossover, and (iii) their complex, in order to understand mechanisms of the selective binding between the SDR peptide and the DNA crossover in the supercoiled DNA that is dependent on the Mg²⁺ concentration.

Concerning the isolated form of SDR peptide, previous biochemical experiments suggested that it takes the random coil state. However, MD simulations coupled with a generalized ensemble method (replica exchange MD) indicated that a substantial amount of helical structures was found in the boundary regions between Lys and Glu residue segments. In the present study, the helical content of the (entire) SDR peptide was compared with that obtained by the circular dichroism (CD) spectroscopy, and thereby both were elucidated to be comparable. So, he analyzed the conformational ensemble of the helical structures obtained by the advanced MD simulations, and revealed that the hybrid electrostatic/hydrophobic contacts that were formed in Lys-Glu residue pairs were responsible for formation and stabilization of the helical structures. Moreover, the bioinformatics analysis of the Protein Databank (PDB) indicated that the hybrid contacts were also identified to contribute to the stabilization of the helical structures found in various conventional protein structures.

As for the DNA crossover, standard and free energy MD simulations were performed at various Mg²⁺ concentrations to evaluate the stability of the crossover configurations of the DNA duplexes. As a result of the analysis, roles of Mg²⁺ on the DNA crossover were summarized as follows; i.e., i) the specific coordination of Mg²⁺ contributes to formation of the most stable crossover configurations of the DNA duplexes (this effect is independent of Mg²⁺ concentrations), and ii) the non-specific electrostatic atmosphere effects of Mg²⁺ regulate the dissociation free energy of the crossover configurations of two DNA duplexes of the DNA duplexes (ΔG_d ; i.e., affinity) (this is dependent on

Mg²⁺ concentrations). The obtained free energy profiles indicated that the ratio of the populations between the dissociated and associated DNA duplexes significantly increased at ~40 mM of Mg²⁺ concentration (the critical concentration). This is consistent with previous experimental data, which thus provided the thermodynamic and atomistic understandings concerning these experimental data.

Furthermore, docking MD simulations to build the complex of the SDR peptide and the DNA crossover were performed, and thereby showed that four SDR peptides could bind to the DNA crossover in a symmetrical manner. This was consistent with the present CD spectroscopy measurement. Moreover, the binding free energy of the SDR peptide with the DNA crossover was, by ~3 kcal/mol, less than that with a single DNA duplex. This result was consistent with the experimental observation; in fact, the selectivity of the SDR peptide toward the supercoiled DNA is 10-fold. These structural features imply the following picture: Binding of SDR peptide to the DNA crossover may stabilize its crossover configuration of the DNA duplexes, which can thus promote binding of further three peptides. This also provides an explanation of the cooperative binding of the SDR peptides and DNA crossover, observed in the CD measurements.

In this manner, Mr. Nishigami theoretically revealed the characteristic features observed in the conformational ensemble of the SDR peptide (in the free state), the DNA crossover, and the structure of their complex. Based on these data, he elucidated the mechanism of the selective binding of SDR peptide and crossover DNA at the atomic structural level.

2. Evaluation of the thesis and the final examination

Recent studies have indicated that formation of supercoiled DNA is relevant to various biological functions, and thus the structural features of supercoiled DNA are involved in the regulation of those biological functions. In particular, it has been elucidated that supercoiled DNA is closely relevant to the transcriptional regulations, and thus this issue has recently been studied intensively. However, interactions of supercoiled DNA with transcription factors and mechanisms of the formation of their complexes have not been elucidated up to date enough to understand the structural basis of their functional mechanisms.

In this thesis, for each of DNA crossover and SDR peptide, the structural stability was theoretically and quantitatively analyzed by computationally evaluating the free energy values. For their complex formation and selective bindings, thermodynamical and structural mechanisms were analyzed. Thus, this study elucidated the mechanisms of recognition between DNA crossover and SDR peptide based on fundamental principles, and thereby includes cutting-edge achievements in the frontier of combined biophysics and molecular biology fields. So, this study could be a solid basis of future works to understand the mechanisms of topology and structural dynamics of genome DNA on the basis of physical atomic-level interactions and fundamental principles, thereby contributing to the encompassing understandings of the cellular functions and mechanisms.

Thus, the reading committee members listed below hereby state our full approval of the thesis completed by Mr. Nishigami in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science in the Graduate School of Life Science.

The committee also certifies that the applicant passed the final oral examination on his thesis and related issues held on January 17 in 2019.

The chief examiner : Yoshiki Higuchi

The second readers : Hideo Nishitani

: Masaru Tateno _____

: Kazuhiko Yamasaki _____

(Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced
Industrial Science and Technology, Senior Research Scientist)

: Bert de Groot _____

(Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Principal Investigator)



B.L. de Groot · MPI bpc · Am Faßberg 11 · D-37077 Göttingen Germany

Am Faßberg 11
37077 Göttingen

Tel.: +49/551/201 - 2308

Fax: +49/551/201 - 2302

email: bgroot@gwdg.de

Göttingen, 1. 2. 2019

Review of PhD thesis of Hiroshi Nishigami

The PhD thesis of Hiroshi Nishigami presents a computational study of supercoiled DNA as well as the structure and binding of a model peptide binding to supercoiled DNA.

After a brief introductory chapter, the second chapter deals with a model of the isolated supercoiled DNA. It is found that out of several tested conformations, only the right-handed crossover state is stable in MD. Moreover, the stability of the complex was found to strongly depend on Mg^{2+} concentration. Using umbrella sampling MD simulations, an association free energy approaching -8 kcal/mol was only achieved at Mg^{2+} concentrations of 40 mM, with the Mg^{2+} stabilization effect being twofold. First, a specific, direct coordination of Mg^{2+} with the DNA adds to the crossover stabilization. Second, a water-mediated non-specific binding further aids stabilization of the complex.

The third chapter describes the conformational preferences of a peptide composed of lysine and glutamate residues that is used as a model system for a supercoiled DNA recognition motif. Replica exchange molecular dynamics simulation results are presented for the K9E9K9 peptide test the hypothesis if such highly charged peptides are unfolded in solution or of residual secondary structure is formed. It is found that under the chosen simulation conditions and force field, a surprisingly large helical content is formed, in particular at the interface regions between Lys and Glu stretched, presumably stabilized by electrostatic interactions. The helical content is corroborated by accompanying CD spectroscopic experiments.

Subsequently, in chapter 4 the two systems are brought together and the binding mechanism of the peptide to supercoiled DNA is studied. Umbrella sampling free energy calculations are presented to assess the affinity of the complex, arriving at surprisingly high binding free energies of 35-50 kcal/mol. It was found that the peptide binds with a higher affinity to supercoiled than to linear DNA, reportedly resulting from interactions of the Glu residues in the DNA crossover. Also in the peptide binding to DNA, Mg^{2+} was found to have a stabilizing effect, with the peptide showing a stronger binding to supercoiled DNA in the presence than in the absence of Mg^{2+} .

The thesis ends with a concise discussion of the results. Overall, the thesis presents a signifi-

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE
Computational biomolecular dynamics group



cant contribution to the understanding of supercoiled DNA, its stabilization by supercoiled DNA recognition peptides, and the conformational dynamics of these highly charged peptides. The thesis is accompanied with a vast body of supporting analyses and controls, indicating that Hiroshi Nishigami is capable of independently and successfully conducting scientific research. I therefore recommend acceptance of the PhD thesis.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'B. de Groot'.

Prof. Dr. Bert L. de Groot