

## 2P063 フラグメント MO 法による DNA とエストロゲン受容体の相互作用解析

(産総研<sup>1</sup>・科技振<sup>2</sup>・富士総研<sup>3</sup>・神戸大<sup>4</sup>・国立衛研<sup>5</sup>・カロリンスカ研究所<sup>6</sup>) ○渡邊寿雄<sup>1,2</sup>, 稲富雄一<sup>1,2</sup>, 福澤 薫<sup>3</sup>, 田中成典<sup>4</sup>, 中野達也<sup>5</sup>, Nilsson Lennart<sup>6</sup>, 長嶋雲兵<sup>1</sup>

**【緒言】** エストロゲン受容体 (ER) は核内受容体スーパーファミリーの1つで、エストロゲンとの結合によって活性化され、二量体としてDNAのエストロゲン応答配列(DNA-ERE)と配列特異的に結合し、標的遺伝子の転写制御因子として働く。ERのDNAへの結合は、Zn Fingerモチーフを基礎としたERのDNA結合部位(ER-DBD)が二量体としてDNA-EREへ結合することが、結晶構造解析により分かっている。その配列認識能に関しては結晶構造の解析や、古典MDを用いた研究[1]がなされているが、ERのDNA結合機構に関してはDNAの電子状態の変化が重要であるため、その詳細は明らかにされていない。そこで、大規模生体分子の電子状態をあらわに扱うが可能なフラグメント分子軌道(FMO)法[2-6]を用いて、DNA-EREとER-DBD間の詳細な相互作用解析を行い、結合機構の解析を行った。

**【方法】** ER-DBDとDNA-EREの複合体の結晶構造(1HCQ)を元に、MD計算を行って得られたスナップショット構造[1] (Figure 1)を用いてFMO-HF/STO-3G及びFMO-HF/6-31G計算を行った。MD計算で得られたスナップショットは球状の水分子と対イオンを含んでいたが、見易さのためFigure1には水分子を除いたものを示した。FMO計算においてはまず水分子及び対イオンを除いた計算を行った。またER-DBD及びDNA-EREへの最近接距離を基準として、一部の水分子及び対イオンを選択した計算も行った。ER-DBD及びDNA-EREのフラグメント分割は、それぞれ1残基/1フラグメント及び1ヌクレオチド/2フラグメント(リン酸/糖、塩基)で計算を行った。得られた結果はフラグメント間相互作用エネルギーを用いて詳細な解析を行った。

**【結果】** Figure 2にはフラグメント間相互作用エネルギーを用いて求めた、DNA-EREの各塩基対(x軸)と2つのER-DBDのリン酸/糖及び塩基の間の相互作用エネルギーを示した。実線で示したものがMD計算で得られた構造を用いた結果であり、点線はDNA-EREと(ER-DBD)<sub>2</sub>との距離を1Åずつ5Åまで離した際の結果である。コンセンサス配列は斜体太字で示した。まず、配列特異的認識の源であるコンセンサス配列の塩基とER-DBDの相互作用に注目するとコンセンサス配列の領域で50-100kcal/mol程度の相互作用があるのが分かる。この相互作用は水素結合などの短距離相互作用であるため、DNA-EREと(ER-DBD)<sub>2</sub>との距離を離すと大きく減衰する。一方で、負電荷を持つリン酸基とER-DBDとの相互作用に注目すると、まず全体的に200kcal/mol程度の相互作用があるのが分かる。これはリン酸基の-1の負電荷と

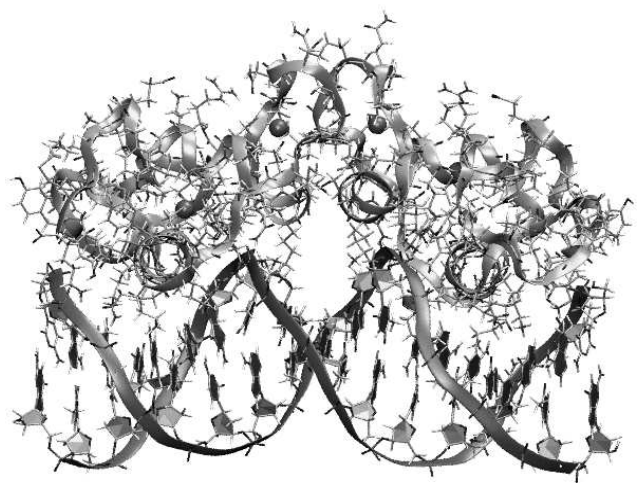


Figure 1: エストロゲン受容体 DNA 結合部位と DNA エストロゲン応答配列の複合体

ER-DBD の+5 の正電荷の相互作用であり、ER-DBD が DNA へと接近する際に重要な役割を果たす。また AT 及び TA の所で特異的に大きな相互作用のピークがある。このピークは DNA-ERE と (ER-DBD)<sub>2</sub> との距離を離すと大きく減衰し、5 Å ではほぼ隣の塩基対と同様な値となる。これは Arg の正電荷と Zn 周りの負電荷による双極子としての振る舞いと、Zn 周りの大きな分極相互作用によるものである。二量体ではこの2つの大きな相互作用によって(ER-DBD)<sub>2</sub> が DNA の上に固定されることによって、先に述べた配列特異的な相互作用を引き出されると思われる。

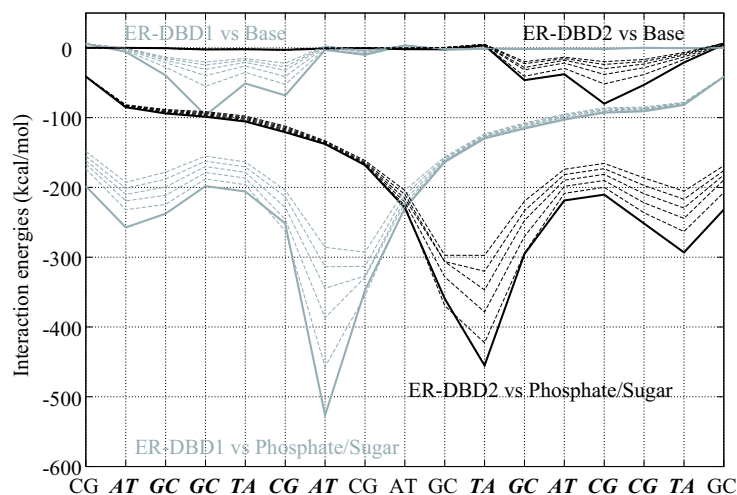


Figure 2. Each DNA basepairs (*Consensus sequences are shown in Bold Italic style*)

Table 1. に示したのは DNA - ER 間、及び ER - ER 間の相互作用エネルギーの溶媒による変化を示したものである。水分子は DNA 及び ER からの最近接距離がそれぞれ 2,3,4 Å 以内のものを選択し、Type1 では水分子は複合体とは独立したフラグメント分割を行い、Type2 ではすべての水分子は複合体の各フラグメントへ含める形でフラグメント分割を行った。ちなみに Type2 で扱った 2 Å 以内の水分子というのは強く水素結合している水分子に相当する。まず Type1 では水分子なし(no-water)の場合に比べて DNA - ER の場合には相互作用が弱められる一方で、ER 同士は相互作用が強まっているのがわかる。これは静電遮蔽効果によるものである。次に Type2 での相互作用エネルギーは水なしの場合に比べてどちらも大きく安定化していることがわかる。この変化分には水がない場合の相互作用エネルギーに加えて、溶質 - 水分子、及び水分子同士の相互作用が加わっている。つまり、Type1 の解析で得られた DNA - ER 間の相互作用の不安定化以上に、溶媒分子の水素結合ネットワークによる安定化が大きな役割を果たしているということである。FMO/6-31G における詳細な解析も現在行っている。

Table 1. 溶媒による分子間相互作用エネルギーの変化 (FMO-HF/STO-3G)

|                  | DNA - ER1       | DNA - ER2       | DNA - (ER) <sub>2</sub> | ER1 - ER2     |
|------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|---------------|
| no-water         | -3543.21        | -3636.69        | -7179.90                | 16.37         |
| +Water 2Å Type 1 | -3516.70        | -3617.59        | -7134.29                | 16.41         |
| +Water 3Å Type 1 | -3473.10        | -3590.70        | -7063.80                | 3.92          |
| +Water 4Å Type 1 | -3418.05        | -3550.54        | -6968.59                | -4.69         |
| +Water 2Å Type 2 | <b>-3680.38</b> | <b>-3723.95</b> | <b>-7404.33</b>         | <b>-58.38</b> |

参考文献 [1] M. A. L. Eriksson, L. Nilsson, *Eur. Biophys. J.*, **28**, 102-111 (1999). [2] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.* **312**, 319 (1999). [3] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701 (1999). [4] T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.* **318**, 614 (2000). [5] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.* **336**, 163 (2001). [6] T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.* **351**, 475 (2002).