

TSUBAME 共同利用 平成 26 年度 学術利用 成果報告書

利用課題名 転写サイクルを制御する蛋白質複合体ダイナミクスの解析
英文: Analysis of protein complex dynamics controlling transcription cycle

利用課題責任者
Haruki Nakamura

所属

Research Institute for Protein, Osaka University
URL: <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfpi/>

邦文抄録(300 字程度):古細菌 RNA ポリメラーゼ (RNAP) 11 量体およびその一部である D/L サブユニット二量体について分子動力学(MD)計算を行い、11 量体の形成メカニズムの解析を行った。L サブユニットにおいて D/L 二量体状態のみでループの顕著なコンフォメーション変化が観測された。また転写因子 Ets1 についてディスオーダー領域を含むモデルを構築し、2 残基のリン酸化、1 残基のリン酸化、リン酸化なしの各状態について MD 計算を行い、リン酸化による DNA 結合阻害メカニズムを解析した。その結果リン酸化セリンの負電荷が認識ヘリックスの正電荷に引きつけられ、競合的に DNA 結合を阻害するメカニズムが示唆された。

英文抄録(100 words 程度):We have simulated dynamic behavior of multimeric RNA polymerase (RNAP) in order to elucidate the molecular mechanism of multimerization of RNAP. The result suggests a unique conformational change at the loop region in L subunit, observed only in the dimer form of D/L subunits. In addition, we also simulated the conformational changes of the phosphorylated disorder region of the transcription factor, Ets1. As a result, negative charges at phosphoserine residues are strongly attracted by the basic residues on the recognition helix. This implies the phosphorylation of the disorder region competitively inhibits DNA binding.

Keywords: 5つ程度: 転写サイクル、ディスオーダー領域、超分子複合体、翻訳後修飾、分子動力学

背景と目的

転写サイクルは多数の蛋白質および蛋白質複合体の間の動的な相互作用によって複雑に制御されている。この詳細は、蛋白質の静的な立体構造情報のみでは不明なことも多く、長時間の分子シミュレーションによる解析が求められている。

とりわけ主要な課題として、転写現象の主体である (i) RNA ポリメラーゼ(RNAP)の動的特性の解明、および転写調節を行う (ii) 転写因子の機能制御に関する動的特性の解明が急務である。(i) について、RNAP は複数のサブユニットが複雑に会合してはじめて機能を発揮する超分子複合体であり、その複雑性から動的特性の解明は容易ではない。近年愛媛大の平田らにより古細菌の RNAP11 量体の立体構造が発表され、真核生物の Pol II との構造の違いが明らかになってきた[1]。とりわけサブユニット間の会合による活性型の RNAP 形成の過程については不明な点が多く、シミュレーションによる動的特性の解明が求められている。(ii) 一方転写を制御する蛋白質で

ある転写因子は、様々な複雑な機能調節を受ける事で遺伝子発現を制御する。がんの標的としても知られる重要な転写因子である Ets1 はディスオーダー領域のリン酸化によって DNA 結合を阻害されるが、特定の構造を取らないディスオーダー領域の実験的解析は難しく、いまだそのメカニズムは不明である。

本プロジェクトでは独自開発の分子動力学計算プログラム myPresto/psygene-G[2]を利用することで、(i)大規模系のシミュレーションや(ii)ディスオーダー領域のダイナミクスを検討した。myPresto/psygene-G では独自の静電相互作用ポテンシャル計算手法 Zero-multipole summation 法[3-5]を実装することで高速かつ高精度な計算を可能としている。

概要

DNA 上に記された遺伝情報を読み取る転写の過程は、開始・RNA 鎖の伸長・終結という転写サイクルと呼ばれる段階からなっており、多数の転写因子

とそれらの間の相互作用によって精緻に制御されている。近年、種々の転写因子や RNAP の立体構造が X 線結晶解析によって明らかにされたが、それらの因子間の動的な相互作用については未知のことが多い。特に、リン酸化によるアロステリックな制御が与える構造と相互作用への影響や、古細菌の RNA ポリメラーゼの動的なドメイン間相互作用について、分子動力学シミュレーションを行って解析する。

具体的には、(i)古細菌 RNAP 11 量体、D/L サブユニット 2 量体について、それぞれ 100 ns、400 ns の時間発展シミュレーションを実施した。また(ii) 転写因子 Ets1 について ETS ドメイン上流のリン酸

的には、ディスオーダー領域について 2 種類のコンフォメーションを生成し、それぞれについてリン酸化なし、Ser282 リン酸化、S282+Ser285 リン酸化の 3 種類の状態について、各 200 ns ずつ検討した。

結果および考察

まず(i)RNAP11 量体、2 量体の計算結果について述べる。11 量体のアッセンブル過程において、D/L 二量体は最初に形成され、その後のアッセンブルの足場として働くと言われている。この足場としての機能に関するメカニズムを解明するため、D/L を含む 11 量体と 2 量体のみの状態でのダイナミクスの比較を行った。結晶構造

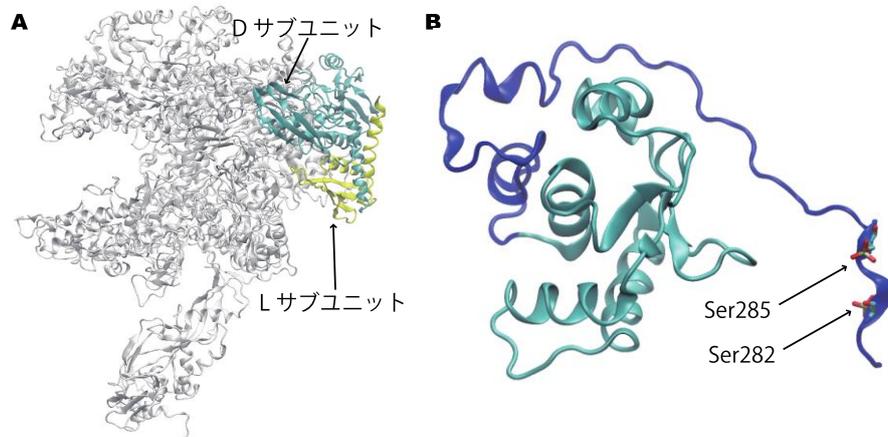


図 1. シミュレーションモデル (A) 古細菌 RNAP11 量体。 (B) リン酸化 Ets1。

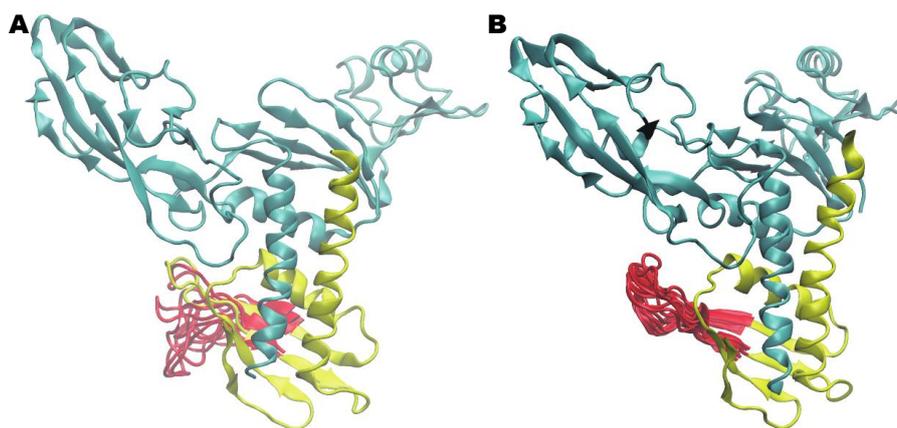


図 2. RNAP のシミュレーション結果。水色が D サブユニット、黄色が L サブユニット、赤は L サブユニットのうち Tyr43-Lys58 の領域を示している。この領域のみ、シミュレーション中に観測された複数の構造を重ねて表示している。 (A) D/L 二量体での計算結果。 (B) 11 量体での計算結果のうち、D/L のみを表示している。

化ディスオーダー領域に関して様々なモデルを構築し合計 1,200 ns のシミュレーションを行った。具体

としては両者の間に大きな違いは見られなかったが、シミュレーションから観測されたダイナミクスには大きな違

いが見られた。とりわけ、最も違いが顕著であった Tyr43-Lys58 ループ領域について、図 2 に示す。図中赤で示された部分が該当のループである。D/L 二量体での計算ではループが大きく揺らぎ、図中下側へ大きくフリップするような動きが見られた。しかしながら 11 量体では結晶構造のごく近辺で揺らぐのみで、大きなコンフォメーション変化は観測されなかった。これは隣接する B サブユニットの立体的な障害によって運動が抑制されているためである。逆に捉えれば D/L 二量体に対して B サブユニットが会合するためには、このループ領域を正しい位置に再配置する必要があり、何らかの調節の一端を担っている可能性が示唆される。

次に (ii) Ets1 ディスオーダー領域の計算結果を述べる。3 種類のリン酸化状態と 2 種類の初期構造について 200 ns のシミュレーションを行ったが、すべての計算においておおよそ 100 ns 以内に一定のコンフォメーションに収束し、残りの 100 ns 程度は安定に構造を保った。このことから、ディスオーダー領域は少なくともサブマイクロ秒スケールで持続する複数の準安定コンフォメーションを持つことが分

ETS ドメインの認識ヘリックス (H3 ヘリックス) と相互作用する構造が見られた。H3 ヘリックスは DNA 主溝にはまり込むことによって配列を特異的に認識する重要な領域である。DNA の負電荷と相互作用するため正電荷のアミノ酸残基を複数有しているが、リン酸化セリンの負電荷がこれらと塩架橋を形成していた (図 3A)。一方でリン酸化を受けていないモデルでは、ETS ドメインの側でディスオーダー領域が丸まって準安定なコンフォメーションをとるなど、H3 ヘリックスに干渉しない構造を取った。このことから、ディスオーダー領域のリン酸化によって DNA 結合が阻害されるメカニズムは、リン酸化セリンの負電荷が H3 ヘリックスの正電荷に引きつけられることによる競合的結合阻害であることが示唆された。

まとめ、今後の課題

本課題において我々独自の計算プログラムを用いて、RNAP11 量体やディスオーダー領域を含む転写因子など、転写サイクルに関わる大規模、複雑な蛋白質の動的挙動を計算することができた。シミュレーション結果から種々の興味深い事象が観測されたも

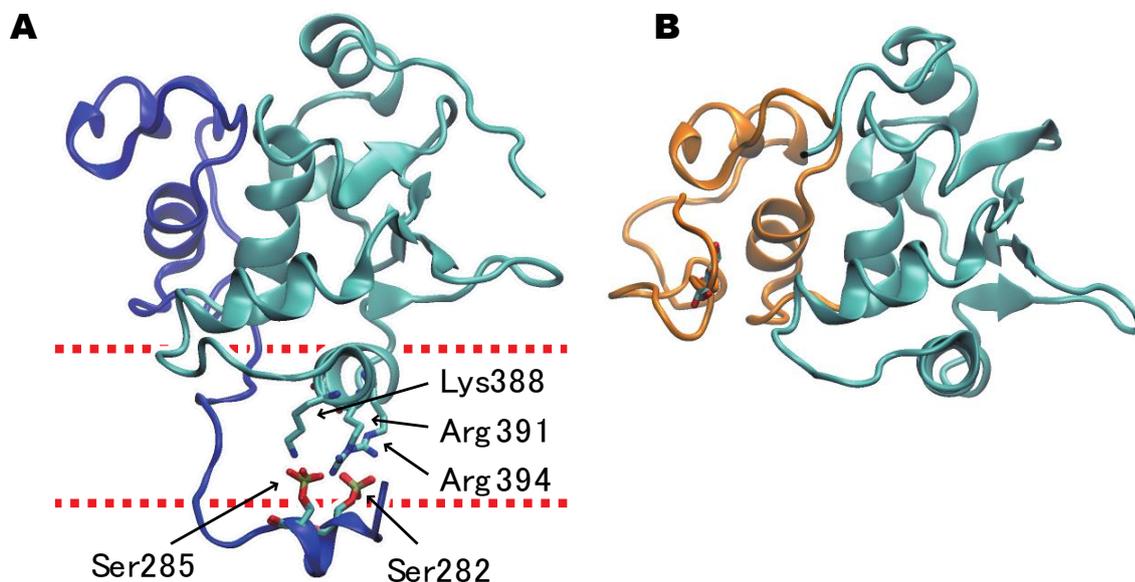


図 3. 転写因子 Ets1 の計算結果。ディスオーダー領域から HI1 ヘリックスまでを青またはオレンジで示している。

(A) Ser282 および Ser285 の両者がリン酸化されたモデルでの最終構造。赤い破線は、DNA が結合するべき位置をおまかに示している。(B) リン酸化されていないモデルでの最終構造

かる。とりわけ、Ser282 と Ser285 の両者がリン酸化されたモデルのみにおいて、リン酸化セリンが

の、より確かな知見を得るためにはシミュレーションで得られた数値データに対する情報解析を行う

ことがこれからの課題となる。具体的には我々が近年発表した独自の解析手法 multi-modal Dynamic Cross Correlation (mDCC) 法[6]を適用し、巨大複合体の中での複雑な相互作用ネットワークを明らかにしていく。またディスオーダー領域の検討についても拡張アンサンブル法による検討を引き続き行っているところである。

参考文献

1. Jun S-H, Hirata A, Kanai T, Santangelo TJ, Imanaka T, et al. (2014) The X-ray crystal structure of the euryarchaeal RNA polymerase in an open-clamp configuration. 5: 5132-. doi:10.1038/ncomms6132.
2. Mashimo T, Fukunishi Y, Narutoshi K, Takano Y, Fukuda I, et al. (2013) Molecular Dynamics Simulations Accelerated by GPU for Biological Macromolecules with a Non-Ewald Scheme for Electrostatic Interactions. J Chem Theory Comput 9: 5599–5609. doi:10.1021/ct400342e.
3. Fukuda I, Yonezawa Y, Harukii N (2011) Molecular dynamics scheme for precise estimation of electrostatic interaction via zero-dipole summation principle. J Chem Phys 134: 164107. doi:10.1063/1.3582791.
4. Fukuda I, Harukii N (2012) Non-Ewald methods: theory and applications to molecular systems. Biophysical Reviews 4: 161–170. doi:10.1007/s12551-012-0089-4.
5. Fukuda I (2013) Zero-multipole summation method for efficiently estimating electrostatic interactions in molecular system. J Chem Phys 139: 174107. doi:10.1063/1.4827055.
6. Kasahara K, Fukuda I, Harukii N (2014) A Novel Approach of Dynamic Cross Correlation Analysis on Molecular Dynamics Simulations and Its Application to Ets1 Dimer-DNA Complex. PLoS ONE 9: e112419. doi:10.1371/journal.pone.0112419.