

# p53 search and recognition dynamics on DNA studied by multi-scale simulations

0560-23-7203 Tsuyoshi Terakawa (寺川 剛)

## 1. Introduction

癌抑制性転写因子 p53 は DNA 上の特異的結合サイトに結合することで、アポトーシス、細胞周期停止、DNA 修復に関わる様々なタンパク質の転写を活性化する。この機能により p53 はゲノムの完全性を保ち、癌化を抑制する。癌化した細胞の半数以上で p53 遺伝子に変異があることから、変異して失活した p53 を再び活性化することができれば、癌治療につながるのではないかと、様々な研究が行われてきた。

p53 は生理的条件下で 4 量体を形成する。それぞれの単量体は 4 つのドメイン (N 末端ドメイン、コアドメイン、4 量体形成ドメイン、C 末端ドメイン) で構成される。N 末端ドメイン、C 末端ドメイン、およびコアドメインと 4 量体形成ドメインをつなぐリンカー領域は天然変性領域であり、静的な構造情報を用いた機能解析を困難にしている。p53 が DNA 配列から特異的結合サイトを探索・認識するメカニズムについても、分子レベルでの理解が不十分であった。本研究の目的は、全原子の構造アンサンブルから構築したマルチスケールモデルを用いたマルチスケール分子動力学シミュレーションを行い、その動的な構造情報から p53 の機能に重要な特異的 DNA 配列の探索・認識の分子メカニズムを明らかにすることである。

## 2. Specific DNA sequence search mechanism of p53 on non-specific DNA

p53 が転写を活性化するためには、まず、p53 がその特異的結合サイトを探索する必要がある。しかし、p53 が非特異的 DNA 上で特異的結合サイトを探索する分子メカニズムは明らかになっていない。また、p53 は 2 つの DNA 結合ドメインを持つ。1 つは特異的結合サイトを認識するコアドメインであり、もう 1 つは DNA と非特異的に結合する C 末端ドメインである。p53 が特異的結合サイトを探索する際に、これら 2 つの DNA 結合ドメインがどのように協調するかは明らかになっていない。これらを明らかにするために、本研究では、非特異的 DNA 上の p53 のマルチスケール分子動力学シミュレーションを行った。その結果、p53 が特異的結合サイトを探索する時に、C 末端ドメインは DNA 上を溝に沿わずにスライディングして、コアドメインは DNA に対し結合・解離を繰り返すという分子メカニズムが示唆された。

## 3. Multi-scale ensemble modeling of p53 linker region

第 2 章において、p53 が特異的結合サイトを探索する際に、C 末端ドメインは DNA 上を溝に沿わずにスライディングして、コアドメインは DNA に対し結合・解離を繰り返すという分子メカニズムを明らかにした。この分子メカニズムにおいて、C 末端ドメインとコアドメインをつなぐリンカーが、特異的結合サイトの探索や認識に重要な役割を果たすと考えられる。本章の研究の目的は、従来のモデルより精度の高いリンカーの新規マルチスケールモデルを構築することである。そのためにまず、40 残基長のリンカーの全原子分子動力学シミュレーションを行った。次に、全原子分子動力学シミュレーションによって得られたコンタクトマップをマルチスケール分子動力学シミュレーションで再現できるように、マルチスケールモデルの長距離相互作用のパラメータを調節した。次に、その新規マルチスケールモデルを用いて、p53 から N 末端ドメインと C 末端ドメインを欠失したコンストラクト (CTetD) のマルチスケール分子動力学シミュレーションを行った。その結果得られた構造アンサンブルから X 線小角散乱のプロファイルを理論的に計算した。そのプロファイルは以前の実験で得られた CTetD の 4 量体の X 線小角散乱のプロファイル

を再現した。この結果は、新規マルチスケールモデルが従来のモデルより精度よく p53 の構造アンサンブルを再現することができることを示唆している。

#### 4. Specific DNA sequence recognition mechanism of p53

第3章において、私は、従来のモデルより精度よく p53 の構造アンサンブルを再現することができる新規マルチスケールモデルを構築した。本章の研究の目的は、この新規マルチスケールモデルを用いたマルチスケール分子動力学シミュレーションにより、p53 が DNA 上の特異的結合サイトを認識する分子メカニズムを明らかにすることである。そのために本研究では、特異的結合サイトを含む DNA 上の p53 のマルチスケール分子動力学シミュレーションを行った。その結果、p53 が DNA に結合していない構造から、特異的結合サイトに結合した構造までのトラジェクトリを得ることができた。特異的結合サイトに結合した構造は、過去に電子顕微鏡観察によって得られたモデル構造と整合性があった。また、p53 は C 末端がアセチル化されていない状態では DNA 上をスライディングすることによって特異的結合サイトを探索するが、C 末端ドメインがアセチル化されていると DNA への結合・解離を繰り返すことによって特異的結合サイトを探索することが示唆された。また、過去に C 末端ドメインが特異的結合サイトに非特異的に結合することによりコアドメインの特異的結合サイトへの結合を阻害するというモデルが提唱されたが、本研究の結果から、そのような影響は非常に小さいことが示唆された。さらに、これまでの X-線結晶構造解析で得ることができなかった、スパーサーを含む特異的結合サイトに結合した p53 のモデル構造を提唱することができた。

#### 5. Specific DNA sequence search mechanism of p53 on nucleosomal DNA

In vivo の環境下では、DNA は 1 群のヒストンタンパク質の周りに巻きつき、ヌクレオソームを形成している。そのような環境下における p53 の特異的結合サイト探索メカニズムを探求するために、p53 とヌクレオソームを含む系のマルチスケール分子動力学シミュレーションを行った。その結果、p53 はヒストンタンパク質の周辺をあまり探索せず、リンカーDNA を主に探索することが示唆された。

#### 6. Conclusion

本研究において、私は、マルチスケール分子動力学シミュレーションによって得られる動的な構造情報から、p53 の機能に重要な探索・認識の分子メカニズムを明らかにした。まず、p53 が特異的結合サイトを探索する際に、C 末端ドメインは DNA 上を溝に沿わずにスライディングして、コアドメインは DNA に対し結合・解離を繰り返すという分子メカニズムを明らかにした。また、C 末端ドメインをアセチル化すると、p53 は DNA 上をスライディングせずに、DNA に対し結合・解離を繰り返しながら特異的結合サイトを探索することを明らかにした。さらに、ヌクレオソーム上で、p53 はヒストンタンパク質の周辺をあまり探索せず、リンカーDNA を主に探索することを明らかにした。今後、より In vivo の環境に近いポリヌクレオソーム中の p53 の特異的結合サイト探索メカニズムの解明が期待される。

また本研究において、全原子分子動力学シミュレーションの結果を用いて、マルチスケール分子動力学シミュレーションのパラメータを調節する新規手法を提唱した。このような天然変性領域のマルチスケールモデリング手法は、これまでの静的な構造情報を用いた機能解析が困難であった天然変性領域を多く含むタンパク質の分子メカニズムの解明に広く用いられていくことが期待される。