

第一原理分子シミュレーションによる  
芳香族炭化水素受容体とリガンド間の  
特異的相互作用の解析

2014 年 1 月

博士（工学）

宮城慧

豊橋技術科学大学

2014 年 1 月 16 日

機能材料工学専攻		学籍番号	073733	指導 教員	栗田 典之
申請者 氏名	宮城 慧				関野 秀男

## 論文要旨 (博士)

論文題目	第一原理分子シミュレーションによる 芳香族炭化水素受容体とリガンド間の特異的相互作用の解析
------	--

(要旨 1,200 字程度)

芳香族炭化水素受容体 (AhR : Aryl hydrocarbon Receptor) は、様々な異物が生体内に取り込まれた際に、これらを特異的に結合・認識し、その情報を核に伝え、代謝酵素の発現を誘導する転写活性因子である。この異物受容体が細胞分化機構を制御するハブとして重要な機能を果たし、様々な疾患の発病に関係することが、最近の研究により明らかになっている。しかし、現在、AhR の立体構造は未解明であり、AhR と様々なリガンド間の特異的相互作用の機構は、原子レベルでは明らかになっていない。更に、免疫機構に関与する細胞分化の方向性が、AhR に結合するリガンドにより変化することは明らかになっているが、その原因は解明されていない。

本研究では、高精度な構造予測手法を用い、AhR のリガンド結合ドメインの構造を予測し、*Ab initio* 分子軌道(MO)法を用いた電子状態計算により、AhR とリガンド間の特異的相互作用を電子レベルで初めて明らかにした。更に、AhR の転写活性機構に重要と考えられている AhR と co-factor タンパク質 ARNT(AhR Nuclear Translocator)のヘテロ二量体の構造を予測し、二量体形成機構解明の手がかりとなる重要な知見を得た。

まず、本研究では、タンパク質立体構造予測プログラムを用い、Protein Data Bank に登録された立体構造既知のタンパク質を鋳型とし、ラット AhR (rAhR) のリガンド結合ドメインの立体構造を作成した。次に、タンパク質-リガンドドッキングプログラムを用い、細胞分化の方向性を変化させるリガンドを rAhR に結合させ、複合体の構造を古典分子力場計算により、水中で最適化した。さらに、フラグメント分子軌道(FMO)法を用い、rAhR 中の各アミノ酸とリガンド間の特異的相互作用を電子レベルで初めて明らかにし、従来の実験結果を原子・電子レベルで説明できる結果を得た。

次に、リガンド結合ドメインの立体構造を予測した手法と同様の計算手法を用い、ヒト AhR (hAhR) と ARNT の二量体の立体構造を作成した。更に、その構造にリガンドを付加した複合体構造を作成し、古典分子力場法を用い、水中で構造を最適化し、室温における構造変化を古典分子動力学計算により解析した。最後に、hAhR と ARNT 間の特異的相互作用を FMO 計算により解析した。その結果を基に、hAhR の二量体形成ドメインに存在する荷電アミノ酸が、ARNT の荷電アミノ酸と強く相互作用し、二量体の形成・分離に大きく影響することを、初めて明らかにした。

year month day  
2014 1 16

Department	Functional Materials Engineering	ID	073733
Name	Satoshi Miyagi		

Advisor	Noriyuki Kurita Hideo Sekino
---------	---------------------------------

# A b s t r a c t

Title	Specific interactions between Aryl hydrocarbon receptor and various ligands: molecular simulations combined with classical MD and <i>ab initio</i> FMO methods
-------	--

(800 words)

Aryl hydrocarbon receptor (AhR), a ligand-dependent transcription factor, mediates toxic and biological effects of a diverse spectrum of chemicals including environmental contaminants such as dioxin family. AhR binds extraneous substances as a ligand, and the information of the binding is transferred to the nucleus, resulting in the induction of metabolic enzymes. In the cell differentiation of various organism species, AhR plays a prominent role in the development of immune systems depending on the intracellular environment. Recent biochemical studies elucidated that some ligands bind specifically to AhR to have a significant effect on the development of immune systems. However, it has not been elucidated how the ligands binding to AhR affects the development of immune systems. Moreover, the three-dimensional structures of AhR itself and its complex with ligand have not been determined by experimental structural biology.

In our study, we first searched stable structures of the complexes with rat AhR (rAhR) and the ligands (TCDD,  $\beta$ -NF, FICZ, ITE) by protein-ligand docking and classical molecular mechanics (MM) methods, and the binding affinity and the specific interactions between rAhR and the ligands were investigated at an electronic level by the *ab initio* fragment molecular orbital (FMO) calculations. The results simulated were compared with the experimental results obtained by our collaborators.

In addition, we constructed the candidate structures of the complex of human AhR (hAhR) with co-factor protein ARNT, in order to elucidate the dimerization mechanism of hAhR and ARNT controlled by ligand binding. By use of the FMO calculations, the specific interactions between hAhR and ARNT were elucidated at an electronic level for the first time.

The binding energies between rAhR and the ligand evaluated by FMO are 30.8 (TCDD), 38.0 ( $\beta$ -NF), 51.0 (FICZ) and 55.8 kcal/mol (ITE), respectively. In addition, the FMO results elucidate that the endogenous ligands (FICZ and ITE) bind strongly to some specific amino acid residues (Gln381, Tyr320, Phe293) of rAhR, while the exogenous ligands (TCDD and  $\beta$ -NF) bind weakly to many residues of rAhR. In particular, the side chain of Gln381 is flexible and its amino group forms a strong hydrogen bond with the oxygen atom located at the center of the ligand in all the rAhR+ligand complexes. Therefore, it is expected that the amino group of Gln381 plays an important role as an anchor in binding these ligands and that ligands forming a hydrogen bond with the amino group of Gln381 can be a potent agonist to rAhR.

To check the validity of the calculated results, we compared the results with the mutagenic experiments by Motto *et al.* They focused their attention specifically on the 26 residues contained within the 5 Å distance from the ligand-binding pocket of the mouse AhR (mAHR). These residues were mutated by the other amino acids, and the change in induction factor by the mutations was investigated by experiment. The results elucidated the 17 residues (Thr287, His289, Phe293, Pro295, Leu306, Leu313, Tyr320, Phe322, Ile323, Cys331, Met338, Phe349, Leu351, Ser363, Ala365, Ala379 and Gln381) are important for the binding between mAHR and TCDD. Our FMO calculations for rAhR+TCDD elucidate that the seven residues among the ten residues having the largest attractive interaction to TCDD are included in the above mentioned 17 residues. Consequently, it is elucidated that our computed results on the specific interactions between rAhR and TCDD are comparable to the results for mAHR and TCDD obtained by the experiment, although some residues are different between rAhR and mAHR.

In addition, we constructed several model structures for the hAhR+ARNT complex including a ligand by the homology modeling and the protein-ligand docking programs. Solvating water molecules were added around the complex, and their positions were fully optimized by a classical MM method. Furthermore, in order to search for various conformations of the solvated complex, classical molecular dynamics (MD) simulations were performed by use of the MM/MD program GROMACS. For the most stable conformation determined by the *ab initio* FMO calculations, the specific interactions between hAhR and ligand and between hAhR and ARNT were investigated to reveal the effect of ligand-binding on the specific interactions between hAhR and ARNT. Consequently, we elucidated that the dimerization and the separation of the dimer are significantly affected by the electrostatic interactions between the charged residues of both hAhR and ARNT. In particular, Glu279, Ile280 and Arg281 of hAhR and Ser451, Asp452 and Glu453 of ARNT contribute to the dimerization between hAhR and ARNT. On the other hand, the Arg288, Lys290, Lys292 and Lys372 of hAhR, and Arg362, Arg366, Hip378 and Arg379 of ARNT were found to be important for the separation.

## 目次

1. 序論.....	6
1.1. 芳香族炭化水素受容体 AhR による転写活性機構.....	6
1.2. AhR が関与する細胞分化機構.....	6
1.3. AhR の構造と特徴.....	6
1.4. AhR による転写活性機構に関与するリガンド.....	7
1.5. 従来の実験研究.....	7
1.6. 従来の理論的研究.....	8
1.7. 本研究の目的と意義.....	8
2. 計算対象.....	10
2.1. AhR の構造予測に使用する鋳型構造.....	10
2.2. 予測した様々な AhR の立体構造.....	10
2.3. AhR に結合するリガンドの種類.....	10
3. 計算手順.....	11
3.1. AhR-LBD+リガンド複合体に対する解析.....	11
3.1.1. 複合体の初期構造の作成.....	11
3.1.2. 複合体の水和構造の作成と最適化.....	12
3.1.3. AhR とリガンド間の特異的相互作用の解析.....	13
3.1.4. 生化学実験を用いた AhR とリガンド間の結合特性の解析.....	14
3.2. AhR+ARNT+リガンド複合体に対する解析.....	14
3.2.1. 複合体の初期構造の作成.....	14
3.2.2. 複合体の水和構造の作成と最適化.....	14
3.2.3. 複合体に対する水中での MD 計算.....	15
3.2.4. AhR+ARNT 二量体とリガンド間の特異的相互作用の解析.....	16
4. 計算結果と考察.....	16
4.1. AhR-LBD+リガンド複合体に対する結果.....	16
4.1.1. 分子モデリングにより得た AhR の立体構造.....	16
4.1.2. MM 法により得た複合体の水和構造.....	17
4.1.3. AhR とリガンド間の特異的相互作用.....	18
4.1.4. AhR-LBD へのリガンド結合に関する考察.....	20
4.2. AhR+ARNT+リガンド複合体に対する結果.....	20
4.2.1. 分子モデリングにより得た AhR+ARNT 二量体の立体構造.....	20
4.2.2. MM 法により得た複合体の水和構造.....	21
4.2.3. MD 計算による複合体構造の経時変化.....	21
4.2.4. AhR とリガンド間の特異的相互作用.....	22
4.2.5. AhR と ARNT 間の特異的相互作用.....	22
4.2.6. AhR+ARNT へのリガンド結合による構造変化の考察.....	23
5. 結論.....	24

## 1. 序論

### 1.1. 芳香族炭化水素受容体 AhR による転写活性機構

芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor : AhR)は、様々な外来異物が生体内に取り込まれた際に、それらを外来性リガンドとして特異的に結合し、高い親和性で認識し、その情報を核に伝え、代謝酵素の発現を誘導する転写活性因子として機能している[1-4]。Figure 1 に示すように、AhR にリガンドが結合していない状態では、AhR は、タンパク質の状態を保持する分子シャペロン(Figure 1 で青色の四角形で表したタンパク質)と呼ばれるタンパク質と複合体を形成し、細胞質中に存在する[5-6]。この分子シャペロンは、温度上昇によって発現する熱ショックタンパク質である。この分子シャペロンが AhR の構造をリガンドが結合出来る状態に保っている。AhR にリガンドが特異的に結合するために、分子シャペロンから AhR が解離し、AhR とリガンドの複合体は、核内に侵入する。更に、AhR は、核内で AhR Nuclear Translocator (ARNT)とヘテロ二量体を形成[7]し、DNA に結合できる形状に変化する。AhR と ARNT の複合体は、DNA 上の異物応答配列 Xenobiotic responsive element (XRE) に特異的に結合し、転写が活性化され[8]、Cytochrome P450 (CYP)などの代謝酵素を発現することが知られている。Figure 1 は、異物とされる外来性リガンドが AhR に結合したことにより発生する代謝機構を表したものであり、外来性のリガンドが細胞内に侵入し、分子シャペロンが結合している AhR に結合すると、その複合体が核内に侵入する。更に、核内で複合体から分子シャペロンが離れ、ARNT と 2 量体を形成し、DNA 上の DRE (Dioxin response element)配列に結合し、転写を活性化する。それに伴い mRNA が発現し、代謝酵素が生成され、外来性リガンドが代謝される。

### 1.2. AhR が関与する細胞分化機構

近年、AhR が外来性リガンドだけではなく、生体内に存在するリガンドを受容する知見[9]、更に結合するリガンドの種類に応じて、細胞分化の方向性を変化させる結果が報告された[10]。例えば、機能を持たないナイーブ T 細胞の分化の方向性は、外来性リガンド 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)、内在性のリガンド 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ)の結合で変化する。TCDD がナイーブ T 細胞中の AhR に結合すると、T 細胞は制御性 T 細胞へ分化する。一方、FICZ が AhR に結合すると、T 細胞は Th17 細胞へ分化する。この分化の方向性の違いが、自己免疫性疾患やアレルギー性疾患といった細胞内外の環境によって調節される免疫系に影響している。しかし、この細胞分化の方向性が、AhR とリガンドにより制御される機構の詳細は、解明されていない。

### 1.3. AhR の構造と特徴

AhR は、Basic helix-loop-helix (bHLH) モチーフを持つ Per-Arnt-Sim (PAS) family に属し、機能発現に重要な複数のドメイン構造を有している (Figure 2)。AhR の N 末端側の bHLH モチーフは、AhR と DNA 間の結合に関係する塩基性の basic 領域、及び AhR の二量体形成に関与する HLH 領域を持つドメインから

構成される[11]。また、AhR は二つの PAS domain を持ち、それらは、PAS-A と PAS-B に分けられる。PAS-A domain は、ARNT などの PAS domain を持つタンパク質との相互作用に関与し、AhR+ARNT の二量体形成の際に重要な役割を果たす[12]。また、PAS-B domain はリガンド結合ドメイン(Ligand Binding Domain: LBD)であり、リガンドが結合するリガンドポケットを形成している。一方、AhR のC末端側には、転写活性に重要なドメインである Glutamine-rich domain (Q-rich) が存在する[13]。具体的なドメインの大きさは、DNA を結合するドメイン (27-39 residues)、リガンドを結合するドメイン (230-397 residues)、転写活性に関係するドメイン (490-805 residues) となっている。

bHLH-PAS family には、低酸素状態で活性化し、ARNT とヘテロ二量体を形成し、低酸素誘導遺伝子を誘導する HIF- $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor- $\alpha$ ) や、体内時計サーカディアンリズムに関与する SIM (Single-minded homolog)等が属し、これらは全て、ホモ二量体を形成することは出来ない。そのため、これらのタンパク質が DNA に結合するためには、AhR と同様に ARNT とヘテロ二量体を形成する必要があることが知られている。

#### 1.4. AhR による転写活性機構に関与するリガンド

AhR の転写活性機構には、様々なリガンドが関与する。体外に存在する外来性リガンドには、内分泌かく乱化学物質、環境ホルモン物質と呼ばれているダイオキシン類、抗癌剤として開発された  $\beta$ -Naphthoflavone ( $\beta$ -NF)、その他芳香族化学物である様々なリガンドが存在する。特に、ダイオキシン類の TCDD は発がん性物質として有名であり、ダイオキシン類のポリ塩化ジベンゾパラジオキシン (PCDD) に属し、2つのベンゼン環と、そのベンゼン環の水素原子を塩素原子に置換した構造が特徴である。この塩素原子の位置によって、毒性が変化し、TCDD のように発ガン性を持つものや、まったく毒性を持たないものなど様々存在する。また、生体内で生成される内在性リガンドには、体内の脂肪酸の代謝酵素を誘導する FICZ、尿中に存在する indirubin、自然界に存在する 2-(1'-H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester (ITE)等が存在する。現在までに明らかになっている内在性リガンドは、全てベンゼン環とピロール環から成るインドールを持つインドール化合物である。

#### 1.5. 従来の実験研究

これまでの実験では、AhR の立体構造は明らかになっていない。これは、AhR の結晶化が困難なためである。そのため、AhR の転写活性機構を分子シミュレーションで明らかにすることは、非常に困難であった。一方、AhR の様々な機能を明らかにするため、AhR を構成するアミノ酸残基を網羅的に置換し、AhR とリガンド及び DNA 間の結合特性の変化を解析する実験[14]が行われている。

今回比較対象とした Motto ら[14]の実験では、Table 1 に示す結果が得られている。彼らは mouse AhR に対してアミノ酸置換を行い、AhR と TCDD 及び DNA 間の結合親和性を、細胞実験によって解析した。TCDD との比較には、結合アッセイを用い AhR と TCDD との結合特性を計測し、DNA との比較には、放射線画像解析を用い AhR と DNA との結合特性を計測した。そして置換を行って

いない wild-type の AhR の結合特性と置換後の AhR の結合特性の変化を解析し、AhR が TCDD と特異的に結合するために重要なアミノ酸、及び AhR が DNA に結合するために重要なアミノ酸を特定した。

また、2013 年 9 月、AhR の bHLH/PAS-A 部分の構造が、実験により明らかになった[15]。これまでの AhR 研究では、立体構造を明らかにすることが出来なため、構造モデリングを用いてきたが、この二量体形成ドメインを含めた bHLH/PAS-A domain 立体構造の解明によって、二量体形成機構を詳細に解析することが可能になっている。しかし、未だに我々が研究の対象としている、リガンド結合ドメインの立体構造は明らかになっていない。

2014 年にも、Denison らが AhR と ARNT のヘテロ二量体構造が DNA に対する影響を実験によって解明している[16]。このように、現在でも AhR は様々な研究が行われており、部分構造が解析されたことにより、今後更に研究が加速していくことが予想される。

## 1.6. 従来の理論的研究

AhR に類似したタンパク質であり、PAS super family に属する Bacterial photoactive yellow protein (PYP) や PAS domain of human potassium channel (HERG) 等の立体構造は、既に実験により解析されている[17-19]。これらの AhR に類似したタンパク質の構造を鋳型構造として、ホモロジーモデリングにより AhR の Ligand Binding Domain (LBD) の構造モデルが作成された[20]。この結果では、1 次配列と鋳型との相同性は低かったが、homology modeling によって過去の実験データをすべて説明出来る構造を作成出来たことが証明されている。その構造作成手法を参考に、Denison らの研究グループ[21]では、homology modeling を用い、AhR の LBD の構造作成を行った。そして更に鋳型構造の重要性[14]、置換実験と理論研究の比較[21]を行っている。しかし、これまでの理論的研究は、古典分子力場を用いた構造探索及び構造解析のみであり、第一原理計算を用いて AhR の電子状態を計算した研究は存在せず、AhR とリガンド間の特異的相互作用は電子レベルでは明らかになっていなかった。また、AhR と ARNT のヘテロ二量体に関する理論的研究は、これまでに存在せず、AhR と ARNT の結合に重要なアミノ酸、重要な相互作用等は、明らかにされていない。

## 1.7. 本研究の目的と意義

本研究では、立体構造が未解明である AhR の構造を高精度に作成する計算手法を確立し、更に、AhR の水中での安定構造を求めた。また、AhR のリガンド結合ポケット内でのリガンドの安定位置を、ドッキングプログラムを用いて作成し、複合体の水中での安定構造を探索した。また、リガンドの種類によって、どのように構造が変化するかを解析し、リガンドの種類に応じた複合体の最安定な構造を決定した。さらに、FMO 計算を用い、最安定構造の電子状態を水中で解析し、AhR の各アミノ酸と各リガンド間の特異的相互作用を電子レベルで初めて明らかにした。

しかし、AhR とリガンドの結合特性のみを解析するだけでは、転写活性機構の全てを明らかにすることは出来ない。また、実験で明らかにされる特性は、



基本的には発現量を基にした値であるため、AhR とリガンド間の結合の強さのみでは、実験結果の全てを説明することは困難であると考え、AhR と DNA 間の結合により近い構造である AhR+ARNT のヘテロ二量体に注目し、このヘテロ二量体の立体構造を作成し、水中での安定構造、及びリガンドが結合した場合の複合体の安定構造の変化を求めた。その結果を基に、二量体形成に重要なアミノ酸を FMO 法により解析した。

更に、AhR 単体とリガンドの複合体に対する計算結果を、共同研究先である東芝研究開発センターが実施した生化学実験と比較し、現在 AhR 研究で注目されている免疫系の細胞分化との関連性を考察した。また、AhR+ARNT の二量体に対する計算結果は、現在明らかにされていない二量体形成のプロセスに対する知見、及び細胞分化機構に影響があるリガンドが結合した際の AhR の結合ドメインの変化に関する知見を得るために重要である。これらの解析により、AhR が外来異物を認識し、DNA に結合するまでの機構に関与する様々な相互作用を明らかにし、AhR の異物認識機構に対する新たな知見を得ることが、本研究の目的である。

## 2. 計算対象

### 2.1. AhR の構造予測に使用する鋳型構造

AhR の立体構造は明らかになっていない。そのため、AhR の立体構造を予測するために鋳型構造を用いる必要がある。我々は Motto ら[14]の研究を参考に、Protein Data Bank (PDB) に登録されている HIF-2 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ ) の PAS-B 構造と ARNT の C 末端構造が二量体を形成している PDB ID: 3H82 の実験構造[22]を採用し、AhR の構造を予測するための鋳型構造とした(Figure 3)。3H82 は X 線結晶解析により得られた構造であり、構造分解能は 1.50 Å である。HIF-2 $\alpha$  は低酸素誘導因子と呼ばれ、生体が酸素供給不足状態に陥った際に誘導されるタンパク質であり、転写因子として機能する。この HIF-2 $\alpha$  は、AhR と同じ bHLH-PAS family に属し、アミノ酸の相同性も 51 % であり、AhR に対する鋳型構造として適している。また、この鋳型構造の中には人工のリガンドが含まれており、HIF-2 $\alpha$  のリガンドポケット構造を維持した構造を基に、AhR のリガンド結合ドメインの構造を予測することが可能である。我々は、この HIF-2 $\alpha$  構造を使用し、AhR のリガンド結合ドメインの構造、及び AhR と ARNT のヘテロ二量体の構造を予測した。

### 2.2. 予測した様々な AhR の立体構造

我々が予測した AhR の立体構造を Figure 4 に、AhR と ARNT のヘテロ二量体の立体構造を Figure 5 に示す。この AhR 構造は 107 個の残基から成り、PAS-B ドメインであるリガンド結合ドメインを含んでいる。また、AhR と ARNT のヘテロ二量体は 223 個の残基から成り、AhR は 112 個、ARNT は 111 個の残基を含んでいる。この AhR の構造には、リガンド結合ドメインと二量体形成ドメインの一部が含まれている。今回、我々が予測した立体構造は、AhR の全体構造ではなく、現状で予測が可能なリガンド結合ドメインが大部分である。そのため、本研究では、AhR とリガンド間、及び AhR と ARNT 間の特異的相互作用の解析は可能であるが、AhR と DNA 間の結合特性は、AhR 中に DNA 結合ドメインが含まれないため、解析不可能である。

### 2.3. AhR に結合するリガンドの種類

本研究では、AhR の代表的なリガンドである TCDD、 $\beta$ -NF、FICZ、ITE の 4 種類をリガンドとして用いた。これらのリガンドの構造を Figure 6 に示す。全てのリガンドが環構造を持ち、この環構造が AhR を構成するアミノ酸の中で側鎖に環構造を持つ残基と  $\pi$  電子を介した  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用を取りやすいと考えられる。また、TCDD については、4 個の塩素原子を持ち、AhR とハロゲン結合を形成する可能性がある。 $\beta$ -NF は Figure 6b に示すように、CO 基で AhR のアミノ酸残基と水素結合する可能性を持ち、また、回転自由度を持つベンゼン環を有する。FICZ (Figure 6c)、ITE (Figure 6d) は、インドール化合物であり、NH 基を持つ。更に ITE は、多くの回転自由度を持ち、様々な配座でリガンド結合ポケットに結合する可能性がある。

### 3. 計算手順

#### 3.1. AhR-LBD+リガンド複合体に対する解析

##### 3.1.1. 複合体の初期構造の作成

従来の理論研究[21]では、相同性モデリングを用いてマウス AhR (mAhR) のリガンド結合に重要な部位の立体構造を予測する際に、PDB に登録された Hipoxia inducible factors (HIF-2 $\alpha$ )及び ARNT の立体構造を鋳型構造として用い、mAhR の 230 番から 421 番の 191 個のアミノ酸から成るドメインの立体構造を予測した。しかし、近年の研究[14]において、リガンドポケットの重要性について議論され、鋳型構造として human HIF-2 $\alpha$ : ARNT PAS B heterodimer cocrystallized with artificial ligands (3H82)を用いることにより、より信頼性の高い立体構造が得られることが明らかになった。そこで、本研究では、Motto ら[14]の方法を参考に、Homology modeling program MODELLER [23]を用い、rAhR の LBD の立体構造モデルを作成し、その構造にリガンドを結合させ、水中での安定構造を探索した。その際、LBD のモデルとして Pandini[21]らが作成した 191 個のアミノ酸から成るモデルを考え、MODELLER により候補構造を作成しようとする、PAS-B Domain 以外の鋳型構造が存在せず、候補構造の作成には多数のギャップが発生し、信頼性のない構造になる可能性が存在する。そこで、本研究では、PAS-B Domain を含む 278 番から 384 番までの 107 個のアミノ酸で構成された rAhR の LBD に対し、立体構造モデルを作成し、LBD の構造をより高精度にモデル化した。rAhR の LBD をこの長さに設定することにより、鋳型構造中の相同性の高い領域を多く含んだ高精度なモデル構造を予測することが可能になる。

MODELLER は、立体構造既知のタンパク質の構造を鋳型として指定することにより、対象とするタンパク質の立体構造を予測するプログラムである。ホモロジーモデリングには、主にフラグメントに基づく fragment-based-modeling と制約条件に基づく restraint-based modeling の 2 種類が存在するが、今回用いた MODELLER は後者を使用している。実際の計算手法として、初めにターゲットの配列とホモロジーのある構造既知の配列を指定し、それらの配列のアラインメントを取得する。この時に、配列の類似していない部分のギャップに対して二次構造や構造上の環境（埋没した原子、伸長した主鎖）を考慮した処理を行っている。その後、テンプレート（鋳型）の構造郡から距離や二面角の制約条件を抽出し、目的関数で表し最適化を行う。この最適化が MODELLER の大きな特徴であり、各原子間の距離の分布を連続関数（ガウス関数等）で近似して条件確率を求め、構造の取りやすさをこの確率で評価している。

MODELLER を用いた立体構造作成においては、鋳型構造の選択が結果に大きな影響を与える。本研究では、最新の研究により決定された 3H82 の構造を採用した。

この PDB 構造を鋳型構造と指定し、MODELLER により 100 個の候補構造を作成し、この 100 個の候補構造の妥当性を、MODELLER の評価スコア Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) score[23]を基に評価した。DOPE score の値が小さい候補構造ほど、主鎖構造が既存のタンパク質の構造に近く、より安定とな

っている。そこで、今回の計算では、100 個の候補構造の中で、DOPE score が安定な構造 5 個を rAhR の候補構造とした。MODELLER で求められた安定構造は、複合体構造での最適化構造エネルギーで比較したものでも最安定な構造になることがこれまでに我々が行った研究から明らかであるため、より安定なグループの構造 5 個を取得した。さらに、この構造の妥当性を検証するため、PROSA-Web[24]、RAMPAGE[25]を用い、候補構造の妥当性を確認した。PROSA-Web は、モデル構造と PDB に登録されている実験構造の特徴を比較し、モデル構造が現実存在し得る構造であることを統計的に評価するプログラムである。また、RAMPAGE はラムチャンドランプロットによる、主鎖二面角の妥当性を確認する。

また、X 線解析、NMR 解析では、各アミノ酸の水素原子の位置を完全に決定することは困難であり、本研究で用いた PDB 構造には水素原子の位置情報は含まれていない。そのため、タンパク質の分子シミュレーションにおいては、PDB 構造を基に水素原子の位置を決める必要がある。特に、His 残基に関しては、水素原子の付加位置に応じて、3 種類のプロトネーション構造 (Figure 7) が存在し、どの構造を取るかにより、タンパク質の立体構造が変化する可能性がある。プロトネーションは強酸性下では Asp、Glu が、塩基下では Cys などでも変化するが、リガンドポケット内に存在し、直接相互作用を形成する可能性がある His のみを対象にした。

本研究では、rAhR の構造をより高精度に求めるため、PROPKA Web Interface2.0 [26]を用い、rAhR 中の各 His 残基周辺の pKa 値を見積もり、その値に応じて His の水素原子の位置を決定した。PROPKA は各アミノ酸のイオン化可能なグループとカルボニルグループを定義し、それらの水素結合、溶媒和相互作用、静電相互作用を経験的なパラメータから高速で計算する。His には、イミダゾール環の  $\delta$  位に水素原子が結合した Hid、 $\epsilon$  位に水素原子が結合した Hie、及び  $\delta$  位と  $\epsilon$  位の両方に水素原子が結合した荷電の Hip がある。pKa 値が 6 以上の His は Hip 構造を取り、6 未満の His は Hid、あるいは Hie 構造を取る可能性を持つ。このプロトネーション構造の考慮が、リガンドの結合位置を決めるために重要であることが過去の研究で明らかになっている[27]。その後、rAhR 中の各アミノ酸側鎖の安定位置を決定するため、主鎖構造を固定し、構造最適化を行った。構造最適化には、古典分子力学計算プログラム AMBER12[28]を用い、水中で最適化した。具体的には、rAhR の構造に水素原子を付加し、さらに rAhR の表面から 9 Å 以内の領域に水和水を付加し、水和した rAhR のアミノ酸の側鎖部分のみを構造最適化した。AMBER12 を用いた最適化には、PARM99SB [29]と TIP3P [30]の力場を用い、共益勾配法による構造最適化を行った。

### 3.1.2. 複合体の水和構造の作成と最適化

rAhR とリガンドの複合体の構造を作成するため、タンパク質-リガンドドッキングプログラム AutoDock4.2 [31] を用い、rAhR のリガンド結合ポケットに TCDD、 $\beta$ -NF、FICZ、ITE を結合させた。その際、遺伝的アルゴリズムを用い、リガンドを配置する Grid Box は、リガンドポケットの中心部に位置する Phe349 を中心とした  $45.0 \times 34.0 \times 34.0$  Å の直方体とし、Grid Spacing は AutoDock4.2 の

デフォルト値である  $0.375 \text{ \AA}$  を採用した。Pandini らの分子モデリング[21]では、rAhR と TCDD の複合体の候補構造を 100 個作成したが、本研究では、rAhR のリガンド結合ポケット内でのリガンドの安定配置をより広範囲に探索するため、Grid Box のサイズを大きくし、AutoDock4.2 で作成できる最大の個数である 256 個の候補構造を作成した。作成した複数の候補構造を、構造の類似性を基にクラスタに分類する際の Root Mean Square Deviation (RMSD) 値は  $0.1 \text{ \AA}$  に設定し、256 個の候補構造をより細かく分類した。次に、AutoDock4.2 で作成した AhR とリガンドの複合体構造を、AMBER12[28]を用い、水中で最適化した。具体的には、複合体に水素原子を付加し、水和した複合体の構造全体を最適化した。AMBER12 の最適化には、PARM99SB [29]と TIP3P [30]の力場を用い、最急降下法、共益勾配法を組み合わせ局所構造に収束するのを防いだ。また、各リガンドに関する AMBER12 における GAFF 力場[32]の電荷パラメータは、汎用の高精度分子軌道プログラム Gaussian09 [33]の HF/6-31G(d)法を用いた RESP[34]計算により求めた。HF/6-31G(d)は、PARM99SB 力場でのパラメータ作成で過分極による溶媒効果を取り入れるために使用されている。そのため、最も適した手法となる。

### 3.1.3. AhR とリガンド間の特異的相互作用の解析

rAhR 中の各アミノ酸とリガンド間の特異的相互作用を明らかにするため、FMO 法[35]を用い、rAhR と各リガンドの複合体の電子状態を計算した。FMO 計算には ABINIT-MP Ver 6.0 [36]を用いた。FMO 法は、非経験的分子軌道計算が困難な生体高分子の電子状態計算を可能にする手法として開発された[37]。対象となる分子をフラグメントと呼ばれる単位に区切り、フラグメント単体（モノマー）及びフラグメントのペア（ダイマー）に対する電子状態を基に、分子全体の電子状態を求める分子軌道法である。その際、ダイマーに対して電子状態計算をするため、フラグメント間の相互作用エネルギーを、周囲に存在する他のフラグメントの影響を考慮して求めることができる。また、FMO 法では、各フラグメントの電子状態を独立に計算するため、並列化効率が高く、計算時間や使用するメモリが少ないという利点がある。

本研究の FMO 法を用いた電子状態計算は、rAhR+リガンド複合体全体を対象とした。さらに、複合体に直接相互作用する可能性のある複合体周囲  $3 \text{ \AA}$  以内に存在する水分子を、あらわに考慮した。分子軌道計算には MP2 法、基底関数には 6-31G を用いた。AhR は  $\pi$ - $\pi$  スタッキングや CH- $\pi$  スタッキングなどの芳香環の  $\pi$  電子を介した相互作用が重要であるため、電子相関を考慮出来る MP2 法が必要である。FMO 計算において、計算対象をフラグメントに分割する際、1 つのフラグメントに 1 つのアミノ酸を割り当てることにより、rAhR 中の各アミノ酸とリガンド間の相互作用エネルギーを詳細に解析した。その結果を基に、rAhR 中のどのアミノ酸がリガンドとの結合に重要であることを明らかにした。また、水分子をあらわに考慮することにより、rAhR とリガンド間をブリッジする水分子が存在する可能性を明らかにした。さらに、rAhR 単体及びリガンド単体の全エネルギーを計算し、rAhR とリガンド間の結合エネルギーを求め、rAhR とリガンド間の結合の強さを評価した。

### 3.1.4. 生化学実験を用いた AhR とリガンド間の結合特性の解析

AhR とリガンド結合特性を予測するために、共同研究先の東芝研究開発センターで実施された生化学実験の結果と本研究で計算した結果を比較する。生化学実験では Tyrosine hydroxylase (TH) assay[38]と呼ばれる手法を用い、代謝酵素の発現量を測定する。TH assay は脳の神経遺伝子である Th 遺伝子と、ホタルの遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を結合し、AhR に結合したリガンドの強さを発現したルシフェラーゼの発光量を検出し、リガンド結合の強度として測定する手法である。実際に用いたリガンドは TCDD、 $\beta$ -NF、FICZ、ITE であり、リガンド量を変化させた時の発現率の変化を測定し、Figure 8 に示す結果を得た。発現量は TCDD、FICZ、ITE、 $\beta$ -NF の順番で多くなった。本研究では、この順番と実際に我々が計算した結合エネルギーの大きさを比較する。結合エネルギーが大きいということは、リガンドが強く rAhR に結合し、rAhR が関与する発現量に大きな影響を与えることを示唆する。

## 3.2. AhR+ARNT+リガンド複合体に対する解析

### 3.2.1. 複合体の初期構造の作成

AhR-LBD と同様な手法を用いて構造作成を行う。鋳型は 3H82 を用い、3H82 の HIF-2 $\alpha$  構造を鋳型とし、AhR のホモロジーモデリングを行う。また、3H82 の ARNT に対しては構造を保持し、AhR+ARNT のヘテロ二量体の構造を予測する。また、鋳型のリガンドポケットの大きさを維持するために、3H82 に保存されている人工リガンドを含んだままで AhR の構造を予測する。ここで AhR 単量体に対する構造作成の場合と大きく異なる点は、二量体の作成に用いた AhR は rat の構造ではなく、human の構造であることである。鋳型構造が human のタンパク質であるため、より統一性を保つために human の一次配列を使用した。この方法を用い、3H82 のリガンドポケットの構造を維持し、更に ARNT とのヘテロ二量体構造が予測出来る。また、AhR の大きさは、二量体形成ドメインを含めるために、AhR 単量体の際に用いた 107 残基ではなく、279 番から 390 番の 112 残基の長さを採用した。候補構造の作成数は、計算コストを考慮し、10 構造のみ作成した。この候補構造に対し、DOPE score を用い、最適な構造を選定する。予測構造の数は少ないが、AhR-LBD 構造と比較した結果、TCDD と周囲のアミノ酸間の相互作用に関しては、AhR 単量体の結果と一致しており、AhR+ARNT に対しても、妥当な構造を取得出来たと考える。

### 3.2.2. 複合体の水和構造の作成と最適化

ヘテロ二量体とリガンドの複合体の構造を作成するため、単量体の時と同様に AutoDock4.2 を用い、hAhR のリガンド結合ポケットにリガンドを結合させた。リガンドに関しては、外来性の代表である TCDD と内在性リガンドの FICZ のみを使用した。ドッキングに関するパラメータについては、単量体との時と同様なパラメータを採用した。また、二量体の様々な部位の結合しやすさを解析するため、AhR のリガンド結合ポケットのみではなく、二量体の構造全体をドッ

キング部位とした。

生体内のタンパク質の構造変化を正しく解析するためには、熱ゆらぎを考慮した分子動力学(MD)計算が必要である。 $\alpha$ -helix や  $\beta$ -Sheet などのドメイン内の構造変化は、短時間の MD 計算により解析できるが、タンパク質内の複数のドメイン間の相互作用による構造変化の解析には、 $\mu$ s から ms オーダーの MD 計算が必要とされている。従って、ms オーダーの MD 計算の実現を目標に、AhR+ARNT のヘテロ二量体の MD 計算を行う。

溶媒水は、Gromacs Ver. 4.5.3[39-42]パッケージ内の editconf でセルサイズを決定し、genbox でセルを水分子で満たした。セルサイズは、対象の X、Y、Z 軸方向のサイズの 2 倍になるように設定した。これは、周期境界条件を用いるため、隣接するセルに含まれる複合体自身との本来は存在しない相互作用を小さくするためである。実際のセルサイズは、 $47.25 \times 47.25 \times 47.25 \text{ \AA}^3$  とした。力場パラメータとして、アミノ酸残基には Amber99SB 力場、水分子に TIP3P 力場を用いた。また、リガンドの力場は GAFF 力場を用いた。GAFF 力場作成に必要なリガンドの各原子の電荷は、単量体と同様の電荷を用いた。このリガンドの電荷と構造を ACPYPE (AnteChamber PYthon Parser interface) [43]を用い、Gromacs で扱える力場に変換した。

また、周期境界条件を用いるため、ユニットセル内の電荷をゼロにする必要がある。そのため、タンパク質の周囲にカウンターイオンを考慮した。カウンターイオンは、構造最適化の過程で、タンパク質から離れ、カウンターイオンの役割を果たさなくなる可能性がある。そのような状況を防ぐため、カウンターイオンとして用いた  $\text{Cl}^-$  イオンに対し、拘束している原子から 0~6  $\text{\AA}$  に存在する場合は、拘束ポテンシャルを与えず、6  $\text{\AA}$  以上離れた場合は、Figure 9 の式に示す拘束ポテンシャルを与えた。図中の  $r_0$ 、 $r_1$ 、 $r_2$  は、それぞれ 0.0、0.6、0.8  $\text{\AA}$  に設定した。

更に、MD 計算中に、複合体が平行移動し、ユニットセルから外に飛び出してしまう可能性があるため、それを防ぐため、複合体の一点を座標拘束した。実際は、リガンド結合に影響がなく、また二量体形成ドメインからも離れている ARNT の重心に最も近い位置にある Asn576 の主鎖の炭素原子を、X、Y、Z 座標に対し、Figure 10 式の定数  $kxpr$  を  $1000 \text{ kJ mol}^{-1}$  に設定して固定した。

以上の計算条件で、構造最適化には Gromacs Ver. 4.5.3 の最急降下法を用い、収束判定条件を  $1.0 \times 10^{-4} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$  として、周期境界条件下で計算した。

### 3.2.3. 複合体に対する水中での MD 計算

リガンドが AhR に結合した時、あるいはリガンドがない時の AhR の構造変化を解明するためには、生体内の環境下で複合体の構造を動的に追跡する必要がある。そこで、Gromacs Ver. 4.5.3 の MD 計算を用いて、温度上昇過程、緩和過程、アンサンブル過程の順で、複合体の構造変化を追跡した。

古典分子力学法によって最適化した構造は、絶対 0 K での安定構造である。従って、温度を上昇させ構造変化を解析する必要がある。しかし、急激に温度を上昇させると、タンパク質の構造が壊れ、生体内の構造とは別の構造に変化してしまう可能性がある。そのため、温度上昇過程は焼きなまし法により徐々

に温度を上げることにした。MD 計算条件として、積分は leap-frog 法[44]、静電相互作用は PME( Particle Mesh Ewald )法[45]を用い、NVT アンサンブルを用い、周期境界条件下で MD 計算を実行した。時間刻み幅は、水分子の水素原子を SETTLE [46]、その他の水素原子を LINCS [47]で拘束しているため、2 fs とした。温度は Velocity rescale 法[48-49]で制御し、焼きなまし法により、100 ps までは 0 K を維持させ、100 ps から 400 ps まで 1 K/ps の割合で温度を上昇させ、400 ps から 500 ps まで 300 K を維持させた。

構造緩和過程では、温度上昇過程と同条件で、温度制御、圧力制御を変更し、NPT アンサンブルを実行した。温度制御は Nose-Hoover 法[50]で 300 K を維持、圧力制御は Parrinello-Rahman 法[51-52]で 1 bar とし、1 ns 実行した。アンサンブル過程は、緩和過程と同じ条件で 10 ns 実行した。

### 3.2.4. AhR+ARNT 二量体とリガンド間の特異的相互作用の解析

AhR+ARNT 二量体中の各アミノ酸とリガンド間の特異的相互作用を明らかにするため、FMO 法を用い、AhR、ARNT と各リガンドの複合体の電子状態を計算した。FMO 計算には、AhR 単量体に対する計算と同様に ABINIT-MP Ver 6.0 を用いた。二量体+リガンド複合体全体を計算対象とし、さらに、複合体に直接相互作用する可能性のある複合体周囲 3 Å 以内に存在する水分子を、あらわに考慮した。分子軌道計算には MP2 法、基底関数には 6-31G を用いた。フラグメント分割は、1 つのフラグメントに 1 つのアミノ酸を割り当てることにより、AhR 及び ARNT 中の各アミノ酸とリガンド間の相互作用エネルギーを詳細に解析した。その結果を基に、AhR+ARNT 二量体中のどのアミノ酸がリガンドとの結合に重要であるか、また二量体形成にどのアミノ酸が重要であるかを、電子レベルで初めて明らかにした。

## 4. 計算結果と考察

### 4.1. AhR-LBD+リガンド複合体に対する結果

#### 4.1.1. 分子モデリングにより得た AhR の立体構造

本研究では、PDB に登録された 3H82 の構造を鋳型構造として用い、Homology modeling program MODELLER により、rAhR の LBD の候補構造を作成した。作成した 100 個の候補構造に対し、MODELLER で計算される DOPE score が低い上位 15 個の構造の DOPE score を Table 2 に示す。その中で DOPE score がより安定なグループに含まれる 5 個の構造を、rAhR の候補構造とした。Figure 4 に示すように、rAhR のリガンド結合ポケットは、3 つの  $\alpha$ -helix と 6 個の  $\beta$ -sheet で囲まれ、リガンドが入る十分なスペースが存在する。

この候補構造の妥当性を検証するため、ラマチャンドラプロット解析プログラム RAMPAGE を用い、最安定の候補構造を既存のタンパク質の構造と比較した。その結果、rAhR の LBD に含まれるアミノ酸の 94.3 から 97.1%が、ラマチャンドラプロット上の most favored areas に存在し、候補構造が既存のタンパク質と類似した構造を有することがわかった。更に、タンパク質構造解析プ



ログラム PROSA-Web を用いて、候補構造の妥当性を確認した結果、Z-score は -3.20 から -3.48 の範囲内にあり、同じ残基数を持つタンパク質の構造に対して得られる Z-score の範囲内に存在する。従って、本研究で、MODELLER により作成した rAhR の候補構造は、既存のタンパク質の構造に類似した現実的な構造であることが確認できた。

次に、候補構造に対し PROPKA Web Interface を用い、各残基の周辺の pKa を計算し、ヒスチジン残基のプロトネーションを決定した。rAhR のリガンド結合ドメインは、5 個の His を含み、その内 324、330、355 番目の His は構造の表面に存在し、更に pKa 値が 6 以上であるため Hip とした。335 番の pKa 値は 6 に近いが、構造の内部に埋没しており、立体障害を考慮し Hid に設定した。一方、289 番は pKa 値が 6 未満であるため Hid、Hie の 2 通り考えられるが、リガンドポケットの中心に位置し、Motto らの実験においてリガンド結合に重要とされていたため、Hid、Hie の 2 構造を作成することにした。これにより、MODELLER で生成された候補構造 5 構造がそれぞれ Hid、Hie の構造を持つことになり、計 10 構造の候補構造を以降の計算で採用する。

次に、Autodock4.2 を用い、rAhR 構造のリガンド結合ポケットに各リガンドを結合させ、複合体の候補構造を Autodock で作成できる最大個数の 256 個作成した。その結果、各リガンドに対して 2560 個の候補構造が作成され、それらの候補構造を構造の類似性を基に分類すると、Table 3 のようにクラスタリングされた。分類されたクラスタの数は、TCDD で 13 個、 $\beta$ -NF で 54 個、FICZ で 52 個、ITE で 1638 個になる。複合体の最安定構造を求めるために、10 個以上クラスタリングされた構造に対しては 10 個まで代表構造を取得した。そのため、 $\beta$ -NF の model 3 と ITE 以外の複合体構造に対しては、全てのクラスタの代表構造を取得し、古典 MM 計算によって最安定構造を議論する。しかし、それらに関してはクラスタ数が膨大であるため、Autodock で算出されたドッキングエネルギーの上位 10 構造を採用する。配座構造を確認するために、これらの代表構造のリガンド配置を Figure 11 に示す。各リガンドはそれぞれ形状が異なるが、どのリガンドも結合する位置が似ていることが明らかである。また、rAhR のリガンド結合ポケットの中心部より、rAhR 上部の  $\alpha$ -helix 周辺に、リガンドが結合し易いことが明らかになった。

#### 4.1.2. MM 法により得た複合体の水和構造

複合体の各代表構造を、AMBER12 を用いて水中で最適化した。最適化後の複合体のエネルギーを Table 4 に示す。赤字で示した構造が、AMBER 力場で計算した場合により安定な構造である。各複合体に対し、安定なグループに属する構造を複合体の候補構造として取得すると、TCDD は 2 構造、 $\beta$ -NF は 3 構造、FICZ は 2 構造、ITE は 4 構造となる。それらの候補構造に対し、FMO 計算により全エネルギーを計算し、最安定構造を決定した。Table 5 に示すように、TCDD の複合体の 2 個の構造間には、殆どエネルギーの差がなく、どちらの構造も存在し得るが、より安定な structure 1 の構造を安定構造とした。rAhR+ $\beta$ -NF の複合体では、Structure 3 の構造が他の構造よりも 15 kcal/mol 以上安定であり、Structure 3 を最安定構造とした。FICZ、ITE についても同様な基準で最安定構造

を決め、FICZ は Structure 2 を、ITE は Structure 3 を最安定構造とした。Figure 12 に各複合体の最安定構造を示す。4 種類のどのリガンドも、自身の構造を保ったまま、rAhR のリガンド結合ポケットのほぼ同じ位置で、安定化していることがわかる。また、リガンドの結合により、rAhR の各ドメインの位置が 1 Å 以上変化することがわかった。従って、4 種類のリガンドは、自身の構造を大きく変えずに、rAhR のリガンド結合ポケットの構造を変化させながら rAhR に結合する、つまり、結合ポケットに Induced fit することが、本研究で明らかになった。

また、従来の実験[14]により、マウス AhR と TCDD 間の特異的相互作用が調べられ、TCDD 結合に重要なアミノ酸が特定された。その実験では、マウス AhR の Thr287、His289、Phe293、Pro295、Leu306、Leu313、Tyr320、Phe322、Ile323、Cys331、Met338、Phe349、Leu351、Ser363、Ala365、Ala379、Gln381 が TCDD の結合に重要とされていた。本研究でも、rAhR+TCDD の安定構造が得られたので、この実験結果と比較するため、TCDD 周辺の構造を詳しく調べた。Figure 13 に TCDD の周囲に存在するアミノ酸の一部を示す。実験[14]で指摘された上記の 17 個のアミノ酸の内、15 個が TCDD 周辺に存在する。従って、rAhR と TCDD の複合体に関しては、本研究で決定した構造は、従来の実験結果 [14] と比較でき、構造の妥当性が検証できた。

しかし、Met338、Ala379 は TCDD の周辺には存在せず、Figure 14 に示すように His289 と Phe293 を挟んだ場所に位置する。アミノ酸置換実験では、重要とされているため、これらのアミノ酸は TCDD の結合に何らかの影響を与えると考えられる。この点を明らかにするため、FMO 計算により、これらのアミノ酸と TCDD 間の特異的相互作用を解析する。

#### 4.1.3. AhR とリガンド間の特異的相互作用

これらのリガンドと rAhR 間の結合の強さを評価するため、FMO 法により rAhR+リガンド複合体、rAhR 及びリガンド単体の Total energy を水中で計算し、それらの値から rAhR とリガンド間の結合エネルギーを計算した。Table 6 に FMO 計算の結果と結合エネルギーの計算式を示す。各リガンドの結合エネルギーの値は、それぞれ、45.3 (TCDD)、48.4 ( $\beta$ -NF)、53.1 (FICZ)、59.2 kcal/mol (ITE) となった。この結果、内在性リガンド (FICZ、ITE) は、外来性リガンド (TCDD、 $\beta$ -NF) よりも結合エネルギーが大きいことが明らかになった。内在性リガンドの結合エネルギーが大きいことは、それらが rAhR により強く結合し、rAhR の構造や機能により大きな影響を与える可能性があることを示唆している。

共同研究先（東芝研究開発センター）での生化学実験により解析された各リガンドを投与した際の発現量の変化では、発現量の増加が、TCDD を投与した時に最大であり、FICZ、ITE、 $\beta$ -NF の順番に増加が小さくなっていた (Figure 8)。この変化を、計算で求めた結合エネルギーと比較すると、相関が取れないことがわかる。この結果は、AhR とリガンドの結合の強さのみを解析するだけでは、AhR の異物認識機構の最後のプロセスである代謝酵素の発現量を予測する事は出来ないことを示唆する。従って、リガンド結合後に起る AhR と ARNT の二量体形成、及び二量体と DNA 間の特異的結合に関するシミュレーションを実行することが、今後の研究課題として明確になった。

次に、内在性リガンドが、外来性リガンドよりも rAhR に強く結合する原因を明らかにするため、FMO 計算を用い、rAhR の各アミノ酸とリガンド間の相互作用エネルギーを解析した。まず、我々の計算結果の妥当性を検討するため、計算結果と Motto ら[14]の置換実験の結果を比較した。Table 7 に TCDD と引力相互作用する rAhR のアミノ酸を引力相互作用が強い順番で示す。Table 7 中の星印が付いたアミノ酸残基は、実験で TCDD の結合に重要とされた 17 個の残基である。この 17 個の残基のうち 15 個が、TCDD との間に引力相互作用があり、FMO 計算の結果においても、実験で重要とされているアミノ酸残基をほぼ再現できたと結論できる。しかし、Met338 と Ala379 の 2 つのアミノ酸に関しては、TCDD との間に殆ど相互作用が無く、TCDD の結合には関係無いように考えられる。この理由は Figure 14 に示したように、Met338 及び Ala379 と TCDD の間には、His289 と Phe293 が存在し、Met338 及び Ala379 が TCDD に直接相互作用することは、不可能であるためである。その結果、相互作用エネルギーが殆ど無かったと考えられる。しかし、この 2 つのアミノ酸は、rAhR のリガンド結合ポケットの外側に位置しているため、ポケット周囲のアミノ酸の位置を保つために重要な役割を果たす可能性がある。そのため、Motto らの置換実験では、Met338 及び Ala379 の置換の影響が大きく現れたと予測できる。この点を確認するため、これらの残基を実際に置換し、rAhR と TCDD 間の結合エネルギーの変化を計算した。Ala379 を Leu、あるいは Met338 を Ala に置換した 2 種類の置換型 rAhR と TCDD の複合体構造を作成し、AMBER12 を用いて構造を最適化し、更に FMO 計算を用いて結合エネルギーを評価した。その結果、置換前の構造では、45.3 kcal/mol であった結合エネルギーが、Ala379Leu 置換の rAhR では 44.9 kcal/mol に減少し、また、Met338Ala 置換の rAhR では 40 kcal/mol となり、置換により結合エネルギーが 5.3 kcal/mol 減少した。今回の構造決定は、古典 MM 計算を用いた最適化のみであるため、結合エネルギーの減少はそれ程大きくななかったが、古典 MD 計算により熱揺らぎを考慮して安定構造を探索すると、更なる構造変化が起こり、結合エネルギーがさらに減少すると考えられる。これらの結果から、rAhR のリガンド結合ドメインに含まれる Met338 と Ala379 は、TCDD に直接は相互作用しないが、リガンド結合ポケットの構造を支えているアミノ酸であり、rAhR と TCDD の結合に重要なアミノ酸であることが明らかになった。

本研究で明らかにした各リガンドと rAhR の各アミノ酸残基間の相互作用エネルギーを Figure 15 に示す。更に、エネルギーの縦軸を統一したグラフを Figure 16 に示す。これらのグラフから、外来性リガンドである TCDD と  $\beta$ -NF は、多くのアミノ酸と弱く相互作用しているが、内在性リガンドは幾つかなの特異なアミノ酸と強い引力相互作用をしていることが、初めて明らかになった。Figure 17a に示すように、rAhR+TCDD 複合体では、TCDD は Gln381 と静電相互作用し、更に Phe293 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用している。また、Figure 17b に示すように、rAhR+ $\beta$ -NF 複合体では、 $\beta$ -NF の中心部の CO 基と Ser363 の OH 基の間に、水素結合が形成されている。一方、内在性リガンドを含む rAhR+FICZ 複合体では、FICZ は、His289 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用、Ser363、Gln381 及び Thr294 と水素結合相互作用をしている (Figure 17c)。また ITE は、Figure 17d に示すように、His289、Gln381 と強い静電相互作用を形成している。

このように、第一原理 FMO 計算を用いることで、rAhR と内在性リガンドは少数のアミノ酸と強く相互作用することで結合しており、外来性リガンドは多数のアミノ酸と弱い相互作用を形成することで結合しているという特徴が明らかになった。この結合特性の違いから、内在性リガンドが rAhR に結合した際は、外来性リガンドが結合した場合よりも、リガンド結合ポケット周囲の構造変化が大きくなると考えられる。この構造変化は、AhR と ARNT の二量体形成にも影響を与え、更に二量体と DNA の結合も、内在性リガンドにより大きく影響すると考えられる。

#### 4.1.4. AhR-LBD へのリガンド結合に関する考察

本研究の FMO 計算の結果 (Figure 15 and 16) より、rAhR の Gln381 が外来性リガンド、内在性リガンド限らず、全てのリガンドに対して、強い引力相互作用を形成することがわかった。Gln381 は非荷電のアミノ酸であるため、長距離相互作用は生じない。しかし、側鎖が柔軟であるため、近傍にある酸素原子と水素結合を結合しやすい。また、AhR に結合するリガンドの多くは酸素原子を持ち、本研究で採用した 4 種類のリガンドも全て酸素原子を持っている。そのため、酸素原子を持つリガンドは、この Gln381 と特異的に相互作用を形成しやすいと考えられる。また、His289 については、内在性リガンドとのみ強い引力相互作用をする。従って、Gln381 及び His289 に強く結合可能なリガンドを提案できれば、AhR の構造と機能をより効果的に制御できる新規アゴニストを提案できると考える。

## 4.2. AhR+ARNT+リガンド複合体に対する結果

### 4.2.1. 分子モデリングにより得た AhR+ARNT 二量体の立体構造

AhR 単量体の場合と同じように PDB の 3H82 を鋳型構造として用い、Homology modeling program MODELLER により、hAhR+ARNT 二量体の候補構造を作成した。AhR に関しては、二量体形成ドメインを考慮し、279 番から 390 番までのアミノ酸残基を採用し、ARNT については 3H82 の構造をそのまま使用した。また、copy ligand オプションを使用することで、3H82 に含まれる人工リガンドを引き継いだ状態で AhR の構造を作成した。作成した 10 個の候補構造の MODELLER の DOPEscore が最小になった構造を、hAhR+ARNT 二量体の候補構造とした。次に、候補構造に対し PROPKA Web Interface を用い、pKa を計算し、ヒスチジン残基のプロトネーションを決定した。hAhR に含まれる 3 個の His 残基のうち、pKa 値が 6 以上の 2 個は Hip に決定した。一方、pKa 値が 6 未満である 1 個の His は立体障害を考慮し、十分なスペースがある位置にプロトンを設置した。rAhR-LBD の構造作成の場合と計算条件が違う理由としては、Hie の位置に周囲のアミノ酸が存在し、この方向に水素原子を付加出来なかったためである。また、ARNT に含まれる 3 個の His 残基に対しても同様に、2 個を Hip に、残りの 1 個を Hid に指定した。そして、Autodock4.2 を用い、hAhR のリガンド結合ポケットに各リガンドを結合させ、hAhR+ARNT+リガンドの候補構造を、Autodock で作成できる最大個数の 256 個作成した。それらの候補構造を構造の

類似性を基に分類すると、Table 8 のようにクラスタリングされ、TCDD は 8 個、FICZ は 17 個のクラスタになる。これらのリガンド配置を Figure 18 に示す。リガンドポケット内では、どちらのリガンドも同様の位置に結合するが、リガンドポケット外では、TCDD は AhR と ARNT 間の特異的な位置に結合し、FICZ は様々な位置に結合することがわかる。また、両者のリガンド共に、ARNT 内部には結合しないことも明らかになった。以下の計算では、リガンドがリガンドポケット内に結合した候補構造のみを選択した。

#### 4.2.2. MM 法により得た複合体の水和構造

上記の複合体の構造を、Gromacs を用いて、水中で最適化した。さらに、最適化構造の電子状態を、FMO 法を用いて計算し、Table 9 に示す全エネルギーを得て、それを基に最安定構造を決めた。Figure 19 に示す最安定構造においては、rAhR 単量体にリガンドを結合した場合と同様に、どのリガンドもリガンド結合ポケットのほぼ同じ位置に結合している。また、hAhR+ARNT 二量体に結合したリガンド周辺のアミノ酸を調べると、単量体の場合(Figure13)と同様なアミノ酸に結合していることが、明らかになった。

#### 4.2.3. MD 計算による複合体構造の経時変化

リガンド結合が hAhR 及び ARNT の構造に与える影響を調べるため、MM 法により最適化した hAhR+ARNT+リガンドの構造を初期構造として、10 ns の MD 計算を実行した。MD 計算中の hAhR+ARNT の主鎖 C $\alpha$  原子の RMSD を解析した結果を Figure 20 に示す。hAhR+ARNT 二量体にリガンドが結合していない構造では、Figure 20a に示すように、約 5 ns 付近で 10 Å 以上の RMSD が確認される。この原因を明らかにするために、各アミノ酸残基の C $\alpha$  原子の位置のずれを解析した。Figure 21 に示すように、Glu312、Leu354、Ile372、Phe375、Arg409、Val422 のアミノ酸残基、及び hAhR と ARNT の末端構造が大きくずれている。Glu312、Leu354、Ile372、Phe375、Arg409 は、hAhR と ARNT の二量体形成に直接相互作用する部位には存在せず、ヘアピン、ターン部位に存在し、熱揺らぎによる構造変化が起きたと考えられる。一方、Val422 は二量体間に存在するアミノ酸であり、その周囲の構造を解析すると、Figure 22 に示すように、Phe444、Leu370 のように疎水基を持つアミノ酸が集まっており、これらの疎水基間の相互作用が、約 5 ns 付近での大きな構造変化に繋がったと考えられる。

次に、hAhR+ARNT 二量体に TCDD が結合した構造については、Figure 20b に示すように、約 0.5 ns 付近で平衡状態にあった構造から、段階的に RMSD が増加し、10 ns では、約 15 Å の RMSD が確認された。実際に 10 ns での構造を調べると、Figure 23 のように、hAhR と ARNT が離れてしまうことが明らかになった。この原因としては、hAhR と ARNT の間に存在する荷電アミノ酸の有無が考えられる。hAhR と ARNT 間の相互作用の変化については、FMO 法を用いて、4.2.5 節において更に詳細な情報から解析する。また、二量体構造に FICZ が結合した構造では、リガンドなしの構造と同様に約 5 ns までは平衡状態を保ち、そこから徐々に RMSD が上昇していく。約 9 ns の地点では、RMSD が 5 Å 上昇している。この構造変化を解析し、リガンドなしの構造と同様に二量体形成ドメ

インとは相互作用していない揺らぎやすいアミノ酸の構造変化が大きかった。しかし、二量体間の重心距離は 25 Å から 33 Å と約 8 Å の変動幅があり、TCDD の結合により、AhR と ARNT が離れていることが明らかである。こちらも TCDD と同様に 4.2.5 節において FMO を用いた解析結果を説明する。

これらの構造から構造変化が起こる前の平衡状態の構造を取得し、構造最適化を行った。Figure 24 にそれらの構造を示す。リガンド結合によって  $\alpha$ -helix の構造が大きく変化し、更に AhR と ARNT の相対位置がリガンドなし、TCDD が結合した構造、FICZ が結合した構造で異なっているのが分かる。

#### 4.2.4. AhR とリガンド間の特異的相互作用

AhR-ARNT ヘテロ二量体の AhR リガンド結合ドメインに TCDD、FICZ が結合した時の特異的相互作用を解析するために FMO 法により相互作用エネルギーを求めた。Table 10 に示すように、TCDD では Tyr322、Phe295、Gln383 が他のアミノ酸よりも TCDD と強く相互作用している。これらのアミノ酸は単量体での解析の時に比較した実験[14]で重要とされているアミノ酸に含まれているものである。他のリガンドよりも相互作用エネルギーが強い理由として、単量体の場合と異なり、MD 計算で熱揺らぎを取り入れたことにより、Tyr や Phe が持つ側鎖が熱ゆらぎを含めた時間的変化によって、リガンドとの相互作用を強めたと考えられる。単量体の解析で得た TCDD との相互作用の順番は異なるが、実験で重要とされているアミノ酸を二量体の計算手法でも再現することが出来た。一方、FICZ は、Hid291、Hip337、Phe351 と強く結合することが明らかになった。実際にこれらの結合構造を Figure 25 に示す。TCDD は Phe295 とスタッキング相互作用を形成し、Tyr322 とは弱い CH- $\pi$  相互作用と弱い静電相互作用、そして Gln383 とは水素結合を形成している。また、FICZ は Hip337、Hid219 と水素結合を形成し、Phe351 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用により相互作用している。

#### 4.2.5. AhR と ARNT 間の特異的相互作用

Figure 23 において、hAhR+ARNT+TCDD の構造が大きく分離することを示した。このように TCDD の影響で、hAhR と ARNT が分離する原因を調べるため、分離直前の構造に対し、hAhR と ARNT の中で最も強く相互作用しているアミノ酸の組み合わせを解析し、hAhR+ARNT 二量体の形成に重要なアミノ酸を特定した。hAhR と ARNT のアミノ酸残基の中で、お互いに反発し合う残基、及びその相互作用エネルギーを、Table 11 に示す。それらの残基の位置を Figure 26 に示す。hAhR と ARNT 中には、それぞれ荷電アミノ酸が集まっている領域が存在し、これらの領域が反発し合うことにより、hAhR と ARNT が分離すると考えられる。一方、hAhR と ARNT 中で、お互いに引力相互作用し合うアミノ酸残基を Table 12 に、それらの位置を Figure 27 に示す。これらのアミノ酸残基は、hAhR の末端に存在する二量体形成ドメイン、及び ARNT 側のヘアピン構造の部位に存在する。これらのアミノ酸は全て荷電アミノ酸であり、hAhR 及び ARNT 中に存在する荷電アミノ酸が、hAhR+ARNT 二量体の形成に関与していることが、示唆される。

本研究では、10 ns の短時間の MD 計算により、hAhR+ARNT 二量体が分離す

る現象をシミュレーションすることができた。これは、本解析では、hAhR の一部の構造のみを考慮しているためであり、hAhR の全体構造を考慮すると構造変化が短時間では起き難くなると思われる。また、本研究の MD 計算は、hAhR と ARNT が二量体を形成した構造から開始したため、実際の転写活性のメカニズムとは逆のプロセスをシミュレートしたことになるが、結果を逆方向に解析することにより、実際のメカニズムを予測できると考えられる。しかし、生体内で AhR と ARNT が関与する転写活性機構を明らかにするためには、AhR の DNA 結合ドメインまで含めた全体構造に対し、ARNT、DNA 及び様々なリガンドが結合した構造を考え、高精度な MD 計算を長時間実行することが必要となる。そのためには、AhR の全体構造の決定が必須である。

#### 4.2.6. AhR+ARNT へのリガンド結合による構造変化の考察

hAhR と ARNT の二量体に対し、外来性リガンドである TCDD、あるいは内在性リガンドである FICZ を結合し、10 ns の MD 計算により構造変化を解析した結果、Figure 20 に示すように、リガンドが結合していない構造、及び FICZ が結合した構造は、10 ns の MD 計算では大きな構造変化は見られなかった。しかし、TCDD が結合した複合体は、約 3.6 ns で、hAhR と ARNT が分離を始める。この原因は TCDD の結合が二量体構造に大きな影響を与えたためであると考えられる。この影響を解明するため、二量体構造が分離した TCDD の複合体と構造が分離しない FICZ の複合体の違いを、MD 計算を始めた初期構造の相互作用に依存すると考え、古典 MM での最安定構造に対する FMO 計算による相互作用エネルギーの変化から解析した。Figure 28 に、hAhR+ARNT+TCDD と hAhR+ARNT+FICZ の複合体の相互作用エネルギーとその差分を示す。差分が大きく表れている His291、His337 は、hAhR のリガンド結合ポケットの中心に存在し、hAhR と ARNT 間の直接的な相互作用には影響しない。このように、リガンドが直接相互作用しているアミノ酸は大きく二量体分離に影響は与えないと考えられる。そこで、FICZ と ARNT 側の相互作用しているアミノ酸を解析すると、FICZ が ARNT の Asp374 と 1.3 kcal/mol の引力静電相互作用を形成していることが明らかになった。TCDD では構造上、このような静電相互作用は形成されない。hAhR+ARNT+リガンド構造で存在する相互作用の中では非常に弱い相互作用であるが、TCDD と FICZ が結合した構造の相互作用の違いの中で、特徴的な引力相互作用である。そのため、これが二量体分離と非分離の原因の一つと考えられる。このような長距離相互作用は、最適化した構造を確認しただけでは確認は難しいものである。この結果は、FMO 計算を AhR 研究に使い、フラグメント間の相互作用を確認したことによって初めて明らかになった研究結果である。

## 5. 結論

本研究では、立体構造が明らかになっていない AhR に対し、ホモロジーモデリングを用い、AhR のリガンド結合ドメインの構造、及び AhR と ARNT のヘテロ二量体の構造を予測し、さらに、それらの構造にリガンドが結合した複合体構造を得た。それらの構造を、古典分子力学 (MM) 法、及び古典分子動力学 (MD) 法を用い、水中で最適化し、リガンド結合による AhR の構造変化を解析した。更に、第一原理フラグメント分子軌道 (FMO) 法を用い、AhR 単量体とリガンド間の結合に重要なアミノ酸を特定し、AhR+ARNT 二量体とリガンドが結合する際に重要なアミノ酸、及び二量体形成に重要なアミノ酸を明らかにした。以下に本研究により初めて明らかになった点を述べる。

### [I] AhR-LBD+リガンド複合体に関する重要な点

- (1) 外来性リガンドは rAhR の多くのアミノ酸と弱く相互作用を形成。
- (2) 内在性リガンドは rAhR の幾つか(His289、Gln381)のアミノ酸と強い相互作用を形成。
- (3) 外来性リガンドと内在性リガンドが AhR に与える相互作用は特徴的であり、その相互作用による AhR の構造変化が代謝酵素を発現するまでのプロセスに影響を与えることが予測出来る
- (4) AhR が発現に与える影響は、結合ドメインを解析するだけでは明らかに出来ないため、二量体形成、DNA との結合を解析する必要がある

### [II] AhR+ARNT+リガンド複合体に関する重要な点

- (1) 二量体形成には AhR の Glu279、Ile280、Arg281、ARNT の Ser451、Asp452、Glu453 が重要である。
- (2) 二量体分離には AhR の Arg288、Lys290、Lys292、Lys372、ARNT の Arg362、Arg366、His378、Arg379 が重要である。
- (3) FICZ と荷電アミノ酸の引力静電相互作用が二量体形成に重要
- (4) FMO 計算を取り入れることで、長距離相互作用の重要性を解明

本研究では、AhR 単量体、AhR+ARNT 二量体に対し、様々な解析を行い、AhR の異物認識機構に重要な相互作用、アミノ酸を解明した。しかし、DNA 結合ドメインの構造が明らかになっていないため、AhR と DNA 間の特異的相互作用を解析することはできなかった。今後、AhR の DNA 結合ドメインの構造が実験で明らかになり次第、AhR と DNA 間の特異的相互作用を解析する予定である。

また、本研究で開発した計算手法は、タンパク質構造予測、ドッキングによる複合体作成、MM 法による構造最適化、MD 法による構造変化の解析、及び第一原理フラグメント分子軌道計算を組み合わせた統合シミュレーション手法であり、他のタンパク質+リガンドの複合体にも適用可能である。



## 謝辞

本研究は、豊橋技術科学大学、情報・知能工学系の栗田典之准教授の御指導の下、行われました。栗田典之准教授には、研究に関する御指導、御助言の他、海外派遣や日本学術振興会特別研究員に関しての御助言を戴きました。また、研究以外の面でも今後の進路の御助言等、お世話になりました。栗田典之准教授には心から感謝申し上げます。

また、本研究は、東芝研究開発センターとの共同研究であり、研究開発センターから生化学実験データを提供して頂きました。ご助言、研究データの提供をして頂きました東芝研究開発センター 機能材料ラボラトリー 主任研究員である石原・菅野美津子氏、伊藤聡氏（現在、理化学研究所計算科学研究機構に所属）に深く感謝致します。

更に、本研究に関し、研究発表会等の機会に御指導して下さい、またこの博士論文の審査をして戴きました関野秀男教授、後藤仁志准教授に深く感謝致します。

最後に、本研究を遂行するにあたり、様々な御助言や研究環境を提供して下さい下さった出立氏、大山氏、岡本氏、及び栗田研究室のメンバーの方々にも、深く感謝致します。

本研究は、日本学術振興会（Japan Society for the Promotion of Science）の研究助成（博士課程特別研究員：課題番号 242465）の助成を受けたものである。

## 参考文献

- [1] J. V. Schmidt, C. A. Bradfield, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 55 (1996).
- [2] B. N. Fukunaga, M. R. Probst, S. Reisz-Porszasz, O. Hankinson, *J. Biol. Chem.*, **49**, 29270 (1995).
- [3] Q. Ma, *Curr. Drug Metab.*, **2**, 149 (2001).
- [4] R. J. Kewley, M. L. Whitelaw, A. Chapman-Smith, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **36**, 189 (2004).
- [5] M. Denis, S. Cuthill, A. C. Wilkstrom, L. Poellinger, J. A. Gustafsson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 801 (1988).
- [6] G. H. Perdew, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13802 (1988).
- [7] H. Reyes, S. Reisz-Porszasz, O. Hankinson, *Science*, **256**, 1193 (1992).
- [8] M. S. Denison, J. M. Fisher, J. P. J. Whitlock, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17221 (1988).
- [9] F. J. Quintana, A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, H. L. Weiner, *Nature*, **453**, 65 (2008).
- [10] M. Veldhoen, K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld, B. Stockinger, *Nature*, **453**, 106 (2008).
- [11] M. Ema, K. Sogawa, N. Watanabe, Y. Chujoh, N. Matsushita, O. Gtoh, Y. Funae, Y. Fujii-Kuriyama, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **184**, 246 (1992).
- [12] P. Coumailleau, L. Poellinger, J. A. Gustafsson, M. L. Whitelaw, *J. Biol. Chem.*, **270**, 25291 (1995).
- [13] M. B. Kumar, P. Ramadoss, R. K. Reen, J. P. Vanden. Heuvel, G. H. Perdew, *J. Biol. Chem.*, **276**, 42302 (2001).
- [14] I. Motto, A. Bordogna, A. A. Soshilov, M. S. Denison and L. Bonati, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2868 (2011).
- [15] W. Dalei, P. Nalini, K. Youngchang, R. Fraydoon, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 4346 (2013).
- [16] D. E. Degroot, M. S. Denison, *Toxicol. Sci.*, **137**, 102 (2014).
- [17] G. E. Borgstahl, D. R. Williams, E. D. Getzoff, *Biochemistry*, **34**, 6278 (1995).
- [18] P. Dux, G. Rubinstenn, G. W. Vuister, R. Boelens, F. A. Mulder, K. Hard, W. D. Hoff, A. R. Kroon, W. Crielaard, K. J. Hellingwerf, R. Kaptein, *Biochemistry*, **37**, 12689 (1998).

- [19] J. H. M. Cabral, A. Lee, S. L. Cohen, B. T. Chait, M. Li, R. Macinnon, *Cell*, **95**, 649 (1998).
- [20] M. Procopio, A. Lahm, A. Tramontano, L. Bonati, D. Pitea, *J. Biochem.*, **269**, 13 (2002).
- [21] A. Pandini, A. A. Soshilov, Y. Song, J. Zhao, L. Bonati, M. S. Denison, *Biochemistry*, **48**, 5972 (2009).
- [22] J. Key, T. H. Scheuermann, P. C. Anderson, V. Daggett, K. H. Gardner, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17647 (2009).
- [23] A. Sali, T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.*, **234**, 779 (1993).
- [24] M. Wiederstein, M. J. Sippl, *Nucleic. Acids. Res.*, **35**, 407 (2007).
- [25] S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall III, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, J. S. Prisant, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **50**, 437 (2003).
- [26] L. Hui, A. D. Robertson, J. H. Jensen, *Proteins*, **61**, 704 (2005).
- [27] S. Miyagi, S. Sawamura, E. Yoshikawa, K. Dedachi, S. Itho, M. Ishihara-Sugano, N. Kurita, *Int. J. Quant. Chem.*, **112**, 289 (2012).
- [28] D. A. Case, T. E. Cheatham III, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Jr. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods, *J. Comput. Chem.*, **26**, 1668 (2005).
- [29] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Stockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, *Proteins*, **65**, 712 (2006).
- [30] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. Madura, R. W. Impey, M. L. Klein, *J. Chem. Phys.*, **79**, 926 (1983).
- [31] G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.*, **16**, 2785 (2009).
- [32] J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, D. A. Case, *J. Comp. Chem.*, **25**, 1157 (2004).
- [33] M. J. Frisch *et al.*, “Gaussian 03 Revision D.01”, Gaussian, Inc, Pittsburgh, PA (2003).
- [34] B. H. Besler, K. M. Merz Jr, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.*, **11**, 431 (1990).
- [35] K. Kitaura, S. Sugiki, T. Nakano, Y. Komeiji, M. Uebayasi, *Chem. Phys. Lett.*, **336**, 163 (2001).

- [36] T. Nakano, T. Kaminuma, T. Sato, Y. Akiyama, M. Uebayasi, K. Kitaura, *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 614 (2000).
- [37] Y. Mochizuki, K. Fukuzawa, A. Kato, S. Tanaka, K. Kitaura, T. Nakano, *Chem. Phys. Lett.*, **410**, 247 (2005).
- [38] E. Akahoshi, S. Yoshimura, S. Uruno, S. Itoh, M. Ishihara-Sugano, *Toxi. Mecha. Meth.*, **22**, 458 (2012).
- [39] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, *Comp. Phys. Comm.*, **91**, 43 (1995).
- [40] E. Lindahl, B. Hess, D. van der Spoel., *J. Mol. Model.*, **7**, 306 (2001).
- [41] D. vand der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, H. J. C. Berendsen, *J. Comp. Chem.*, **26**, 1701 (2005).
- [42] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, E. Hindahl, *J. Chem. Theo. Comp.*, **4**, 435 (2008).
- [43] A. W. S. da Silva, W. F. Vranken, *BMC Res. Notes*, **5**, 367 (2012).
- [44] R. W. Hockney, S. P. Goel, J. W. Eastwood, *J. Comp. Phys.*, **14**, 148 (1974).
- [45] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089 (1993).
- [46] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L. G. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, **103**, 8577 (1995).
- [47] S. Miyamoto, P. A. Kollman, *J. Comp. Chem.*, **13**, 952 (1992).
- [48] B. Hess, H. Bekker, H. J. C. Berendsen, J. G. E. M. Fraaije, *J. Comp. Chem.*, **18**, 1463 (1997).
- [49] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, *J. Chem. Phys.*, **126**, 014101 (2007).
- [50] S. Nosé, *Mol. Phys.*, **52**, 255 (1984).
- [51] W. G. Hoover, *Phys. Rev. A.*, **31**, 1695 (1985).
- [52] M. Parrinello, A. Rahman, *J. Appl. Phys.*, **52**, 7182 (1981).
- [53] S. Nosé, M. L. Klein, *Mol. Phys.*, **50**, 1055 (1983).

## Tables

Table 1

Effects of mAhR Mutagenesis on TCDD Binding obtained by experiment[14].

residue	reduced to less than 50%	reduced to less than 50% - 60%	little or no effect
F285			F285W
T287	T287E, T287M		
H289	H289F, H289A		
F293	F293A, F293L, F293Y		
P295	P295F		
C298			
L306	L306A		
Y308			
L313	L313A		
G319			
Y320	Y320A, Y320F		
F322	F322A, F322W, F322I		F322Y
I323	I323A, I323Y		
C331		C331A	
S334			
H335			
M338	M338E	M338A	
M346			
F349	F349A, F349L		
L351	L351A		
L352			
S363		S363A	
A365	A365L, A365V		
I377			
A379	A379L, A379V		
Q381	Q381A		Q381L

Table 2

DOPE (discrete optimized protein energy) scores obtained by MODELLER for 100 model structures of rat AhR

Structure	Score	$\Delta$ Score
76	-10210.1	0.0
51	-10189.1	21.0
4	-10183.1	27.0
24	-10167.5	42.7
9	-10162.4	47.7
61	-10149.0	61.1
71	-10146.9	63.2
94	-10146.7	63.4
37	-10140.9	69.2
39	-10140.0	70.1
79	-10130.9	79.2
15	-10123.5	86.6
47	-10122.5	87.7
33	-10114.8	95.3
3	-10109.4	100.7

Table 3

Clustering of the rAhR+ligand structures created by Autodock ver.4.2

Ligand	Cluster	model 1		model 2		model 3		model 4		model 5	
		Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie
TCDD	1	256	256	256	256	179	235	246	256	256	256
	2					77	21	10			
$\beta$ -NF	1	254	199	177	253	163	132	156	256	82	202
	2	2	51	60	3	8	18	1		77	4
	3		4	3		47	7	1		85	24
	4		2	16		19	2	97		9	4
	5					5	4	1		2	5
	6					1	1			1	9
	7					1	27				2
	8					6	34				1
	9					4	18				1
	10					2	4				4
	11						2				
	12						6				
	13						1				
FICZ	1	256	100	214	250	186	205	101	15	41	119
	2		155	12	6	51	23	3	10	127	87
	3		1	1		19	17	132	84	1	9
	4			1			7	20	37	1	20
	5			22			1		19	86	1
	6			5			2		2		1
	7			1			1		38		1
	8								36		7
	9								15		10
	10										1
ITE	1	2	8	27	3	5	1	1	4	1	12
	2	1	4	11	1	5	3	1	1	1	3
	3	5	3	5	4	2	10	1	1	3	11
	4	2	2	10	5	6	23	2	2	2	6
	5	1	3	11	1	1	1	1	1	1	13
	6	2	1	6	1	6	1	1	1	4	2
	7	1	1	11	15	1	9	1	1	3	3
	8	2	1	3	1	19	1	1	1	1	1
	9	1	2	3	1	1	2	1	1	1	1
	10	1	3	13	3	2	1	1	1	1	1

Table 4

Total energies (T.E.) (kcal/mol) of rAhR+ligand complexes evaluated by classical MM calculations.

Ligand	Structure	model 1		model 2		model 3		model 4		model 5	
		Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie	Hid	Hie
TCDD	1	-20181	-20214	-20141	-20165	-20133	-20062	-20297	-20250	-20188	-20250
	2					-20133	-20062	-20297			
$\beta$ -NF	1	-20351	-20317	-20317	-20278	-20312	-20212	-20309	-20212	-20295	-20352
	2	-20336	-20317	-20323	-20278	-20312	-20206	-20324		-20295	-20359
	3		-20317	-20318		-20292	-20212	-20310		-20295	-20359
	4		-20317	-20323		-20312	-20212	-20362		-20295	-20359
	5					-20312	-20206	-20348		-20359	-20352
	6					-20312	-20243			-20359	-20352
	7					-20312	-20243				-20352
	8					-20322	-20226				-20374
	9					-20322	-20226				-20383
	10					-20324	-20218				-20361
FICZ	1	-20192	-20182	-20158	-20161	-20170	-20110	-20207	-20209	-20227	-20281
	2		-20189	-20158	-20156	-20170	-20110	-20207	-20213	-20227	-20313
	3		-20187	-20163		-20154	-20104	-20215	-20191	-20227	-20313
	4			-20158			-20110	-20207	-20189	-20254	-20271
	5			-20204			-20110		-20198	-20220	-20271
	6			-20107			-20104		-20227	-20220	-20271
	7			-20116			-20078		-20197		-20268
	8								-20196		-20268
	9								-20213		-20250
	10										-20253
ITE	1	-20056	-20016	-20011	-20010	-19953	-19928	-20040	-20003	-20056	-20049
	2	-20056	-20016	-19947	-20010	-19957	-19931	-20041	-20003	-20057	-20057
	3	-20019	-20016	-19947	-20028	-19953	-19945	-20059	-20003	-20057	-20049
	4	-20021	-20016	-19947	-20028	-20014	-19947	-20040	-20003	-20057	-20049
	5	-20056	-20016	-20005	-20010	-19953	-19943	-20048	-20003	-20057	-20049
	6	-20056	-20016	-19947	-20033	-19971	-19931	-20041	-20003	-20073	-20057
	7	-20056	-20016	-19947	-19992	-19999	-19945	-20048	-20003	-20073	-20049
	8	-20021	-20016	-20011	-20009	-20004	-19928	-20048	-20003	-20073	-20057
	9	-20056	-20021	-19947	-19992	-19964	-19949	-20048	-20003	-20075	-20057
	10	-20056	-20021	-19962	-20028	-19953	-19928	-20048	-20003	-20057	-20057



Table 5

Total energies (T.E.) (kcal/mol) of rAhR+ligand complexes evaluated by *ab initio* FMO calculations.

Ligand	Structure	T.E.	$\Delta$ T.E.
TCDD	1	-64915206.9	0.0
	2	-64915205.9	1.0
$\beta$ -NF	1	-64989991.3	14.2
	2	-64989988.1	17.3
	3	-64990005.4	0.0
FICZ	1	-65011495.4	0.6
	2	-65011496.0	0.0
ITE	1	-65235088.7	1.0
	2	-65235089.4	0.3
	3	-65235089.7	0.0
	4	-65235045.7	43.9

Table 6

Binding energy of rAhR+ligand complexes evaluated by *ab initio* FMO calculations.

Binding energy = Total energy (Complex – (AhR+Water) – (Ligand+Water) + Water)

Ligand	Complex	Total energy (Hartree)			Binding energy	
		AhR+Water	Ligand+Water	Water	(Hartree)	(kcal/mol)
TCDD	-103449.0	-102690.7	-59377.3	-58619.0	0.0722	45.3
β-NF	-103568.2	-102690.4	-59496.7	-58618.9	0.0771	48.4
FICZ	-103602.5	-102690.5	-59530.7	-58618.8	0.0846	53.1
ITE	-103958.8	-102690.3	-59887.3	-58618.9	0.0944	59.2

Table 7

Interaction energies (I.E.) (kcal/mol) between the TCDD and amino acid residues of rAhR; residues are listed in decreasing order of the magnitude of attractive interaction.

\* is Important residues on TCDD Binding obtained by experiment[14].

Residue	I.E.
* Phe293	-7.1
* Gln381	-6.2
* Cys331	-4.6
* Phe349	-3.8
* Ser363	-3.5
Ser334	-3.4
* Leu351	-3.3
Met346	-3.0
Phe285	-2.5
* Ile323	-2.2
Pro383	-1.9
* Leu313	-1.9
* Ala365	-1.8
* His289	-1.8
* Phe322	-1.7
* Leu306	-1.0
Lys354	-1.0
Asp292	-0.9
* Tyr320	-0.9
Arg366	-0.7
His355	-0.7
* Pro295	-0.6
Gly319	-0.6
Asp327	-0.6
* Thr287	-0.6
⋮	
* Ala379	0.0
⋮	
* Met338	0.2

Table 8

Clustering of the AhR+ARNT+ligand structures created by Autodock ver.4.2; positions of each ligand, numbers of structures in each cluster and their rates to total number are listed.

Ligand	Structure	Position	Number	Rate (%)
TCDD	1	in cavity	194	75.8
	2	in cavity	7	2
	3	in cavity	1	0.3
	4	in cavity	1	0.3
	5	outside	39	15
	6	outside	4	1.5
	7	outside	3	1.1
	8	outside	7	2.7
FICZ	1	outside	69	27
	2	in cavity	69	27
	3	in cavity	5	1.9
	4	in cavity	15	5.8
	5	in cavity	5	1.9
	6	outside	20	7.8
	7	outside	32	12.5
	8	outside	4	1.5
	9	outside	8	3.1
	10	outside	7	2.7
	11	outside	3	1.1
	12	outside	2	0.7
	13	outside	3	1.1
	14	outside	2	0.7
	15	outside	7	2.7
	16	outside	2	0.7
	17	outside	3	1.1

Table 9

Total energies (T.E.) (kcal/mol) of AhR+ARNT+ligand complexes evaluated by *ab initio* FMO calculations.

Ligand	Structure	T.E.	$\Delta$ T.E.
TCDD	1	-139316899.2	5.3
	2	-139316904.5	0.0
	3	-139316759.4	145.1
	4	-139316772.1	132.5
FICZ	1	-138306142.1	48011.0
	2	-138354139.5	13.7
	3	-138354153.1	0.0
	4	-138354035.1	118.1

Table 10

Interaction energy (IFIE)(kcal/mol) between residues of AhR and the ligands

TCDD		FICZ	
Residues	IFIE	Residues	IFIE
Tyr322	-7.0	Hid291	-15.7
Phe295	-7.0	Wat	-11.0
Gln383	-6.0	Hip337	-9.9
Hid291	-2.8	Phe351	-8.0
Ile325	-2.7	Ile325	-5.7
Val381	-2.0	Cys333	-5.2
Cys333	-1.9	Phe295	-4.7
Ser365	-1.9	Met348	-4.1
Ala367	-1.6	Gln383	-3.8
Gly347	-1.5	Phe324	-3.4
Phe324	-1.2	Wat	-3.3
Arg339	-1.2	Val381	-2.7
Thr289	-1.1	Ser336	-2.5
Hip337	-1.0	Ala367	-2.0
Ser336	-1.0	Arg352	-1.5
Met348	-0.9	Glu312	-1.2
Leu353	-0.9	Ser346	-1.2

Table 11

Repulsive interaction energy (kcal/mol) between AhR and ARNT

		AhR			
	Residues	Arg288	Lys290	Lys292	Lys372
ARNT	Arg362	22.3	31.0	17.9	22.3
	Arg366	30.5	18.9	10.8	11.4
	Hip378	20.0	22.4	11.5	13.2
	Arg379	28.1	49.9	17.0	20.1

Table 12

Attractive interaction energy (kcal/mol) between AhR and ARNT

		AhR		
Residues		Glu279	Ile280	Arg281
ARNT	Ser451	0.2	0.5	-16.8
	Asp452	-1.7	-2.7	-33.8
	Glu453	-69.7	-28.1	-37.8



## Figures

### Figure 1

Signal pathway of AhR; (a) the AhR binds ligand, (b) the AhR into the nucleus, (c) the AhR binds ARNT, (d) the AhR/ARNT complex binds DRE, (e) gene expression

### Figure 2

Functional domains of AhR structure has DNA binding domain(27-39 residues), ligand binding domain(230-397 residues), Transcriptional activation binding domain(490-805 residues)

### Figure 3

Template structure of ligand-binding domain of AhR obtained by Protein Data Bank

### Figure 4

Model structure of ligand-binding domain of rAhR obtained by MODELLER.

### Figure 5

Model structure of AhR+ARNT complex obtained by MODELLER.

### Figure 6

Chemical structures of the ligands employed in the present study: (a) TCDD (2,3,7,8-tetrachrodibenzo-p-dioxin), (b)  $\beta$ -NF ( $\beta$ -Naphthoflavone), (c) FICZ (6-formylindolo [3,2-b]carbazole) and (d) ITE (2-(1'H-indole-3'-carbonyl)-thiazole-4-carboxylic acid methyl ester)

### Figure 7

Three types of protonated structures of histidine residue depending on pH value

### Figure 8

Dependence of expression level of rAhR on the concentration of the ligand obtained by experiment

Figure 9

The potential penalty for distance restraint

Figure 10

The potential penalty for position restraint

Figure 11

Binding positions of the ligand to rAhR generated by use of Autodock 4.2:

(a) TCDD, (b)  $\beta$ -NF, (c) FICZ and (d) ITE

Figure 12

Most stable structures of the rAhR+ligand complexes optimized in water by classical molecular mechanics method: (a) rAhR+TCDD, (b) rAhR+ $\beta$ -NF, (c) rAhR+FICZ and (d) rAhR+ITE.

Figure 13

Amino acid residues located around TCDD in the rAhR-TCDD complex optimized by classical MM method in water

Figure 14

Met338 and Ala379 of rAhR don't interact with TCDD

Figure 15

Interaction energies between the ligand and the amino acid residues of rAhR; (a) TCDD, (b)  $\beta$ -NF, (c) FICZ, (d) ITE

Figure 16

Interaction energies between the ligand and the amino acid residues of rAhR

Figure 17

Interacting structures and the distances (Å) between the ligand and the amino acid residues of rAhR, which have large attractive interactions with the ligand; (a) TCDD, (b)  $\beta$ -NF, (c) FICZ and (d) ITE. The chlorine, hydrogen, carbon, oxygen, and nitrogen atoms are shown in green, white, gray, red, and blue colors, respectively.

Figure 18

Binding positions of the ligand to rAhR generated by use of Autodock 4.2:

(a) TCDD binds inside a ligand binding pocket, (b) TCDD binds to the hollow of AhR+ARNT, (c) FICZ binds inside a ligand binding pocket and (d) FICZ binds to surface of AhR-ARNT.

Figure 19

Most stable structures of the AhR+ARNT+ligand complexes optimized in water by classical molecular mechanics method: (a) AhR+ARNT, (b) AhR+TCDD and (c) AhR+FICZ

Figure 20

RMSD of all C $\alpha$  atoms of AhR between MM-optimized structure and the structures obtained by the MD simulation

Figure 21

Displacement of C $\alpha$  atom of each AhR residue between equilibrate

Figure 22

Main reason for the change of structure of AhR+ARNT

Figure 23

The separated structure of AhR+ARNT+TCDD obtained by MD 10ns simulations.

#### Figure 24

Most stable structures of the AhR+ARNT+ligand complexes obtained by classical molecular dynamics: (a) AhR+ARNT, (b) AhR+TCDD and (c) AhR+FICZ

#### Figure 25

Interacting structures and the distances (Å) between the ligand and the amino acid residues of hAhR, which have large attractive interactions with the ligand; (a) TCDD, and (b) FICZ. The chlorine, hydrogen, carbon, oxygen, and nitrogen atoms are shown in green, white, gray, red, and blue colors, respectively.

#### Figure 26

Positively charged amino acid residues exist in the space between AhR and ARNT.

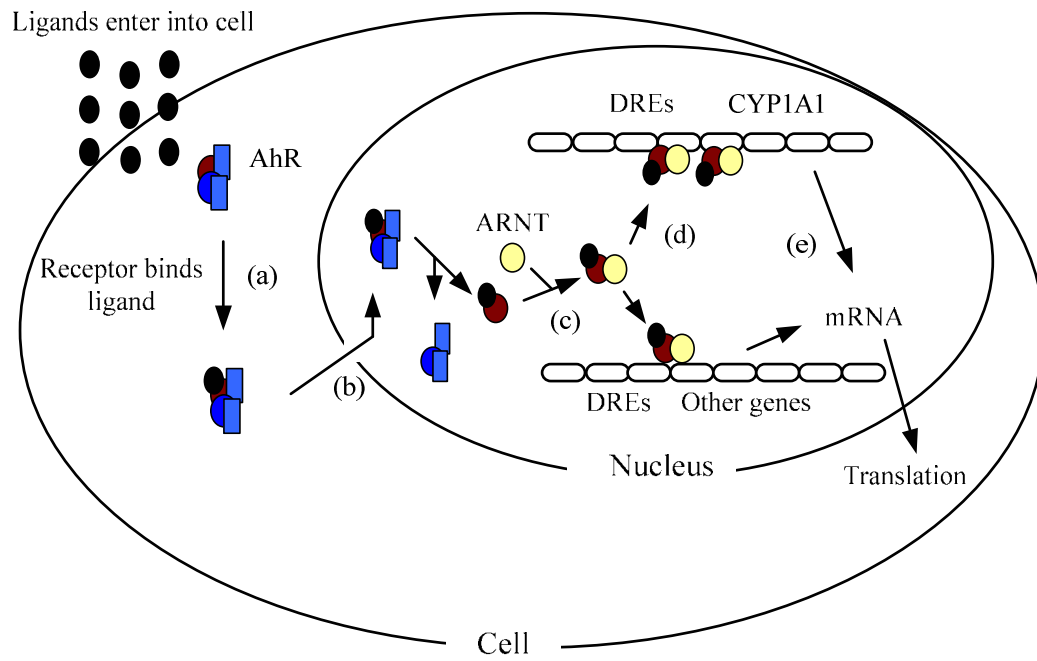
#### Figure 27

The important charged amino acid residues exist in the dimerization domain of AhR.

#### Figure 28

Difference in interaction energies between AhR+ARNT+TCDD and AhR+ARNT+FICZ

**Fig. 1**



**Fig. 2**

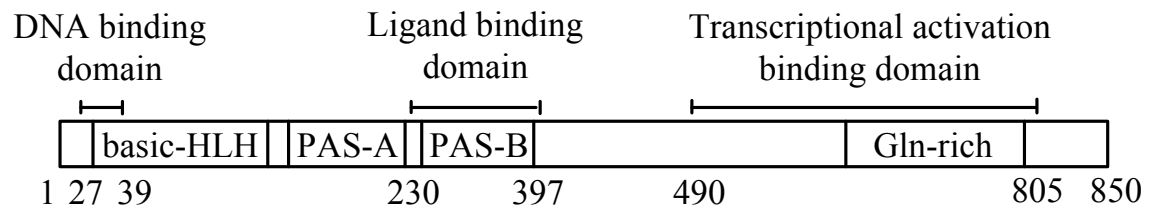
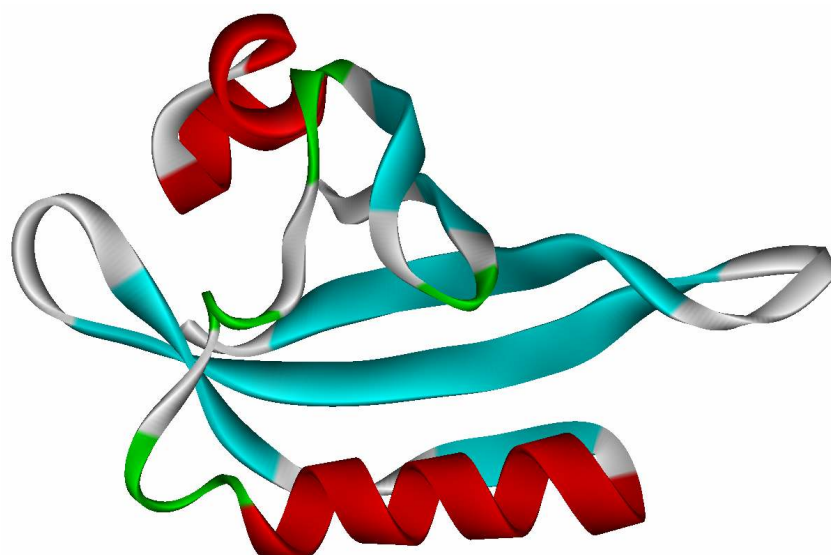


Fig. 3

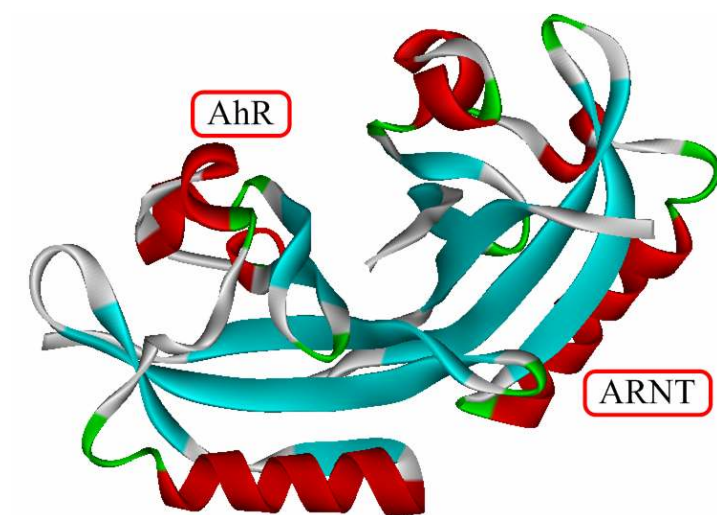


**Fig. 4**

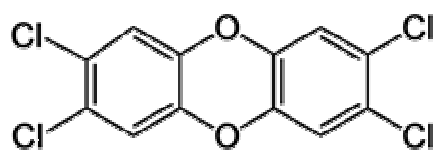




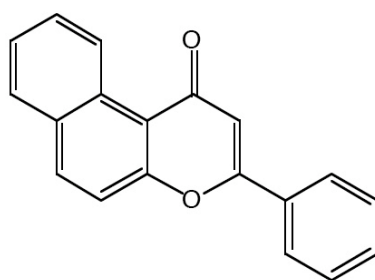
**Fig. 5**



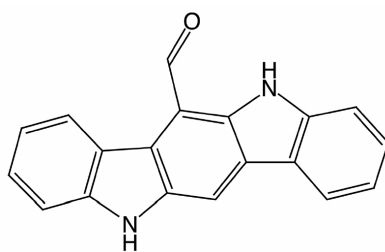
**Fig. 6**



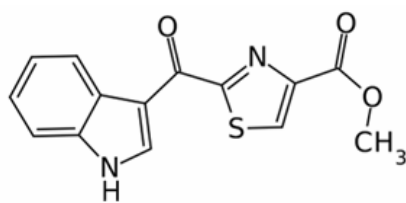
**(a)**



**(b)**



**(c)**



**(d)**

Fig. 7

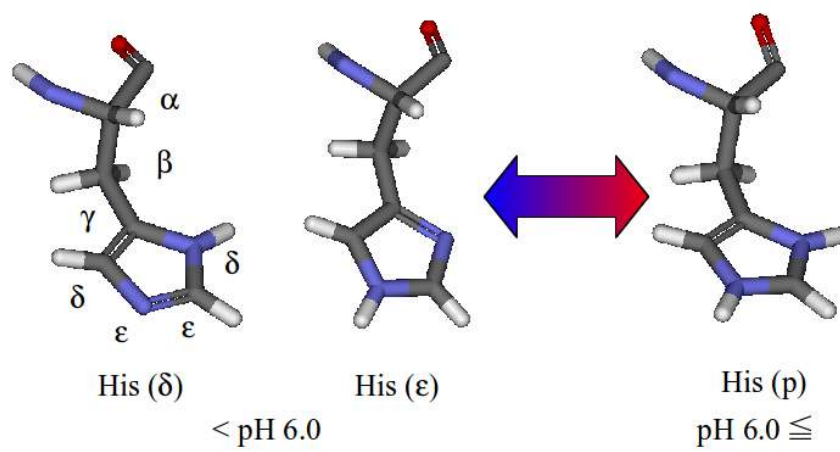
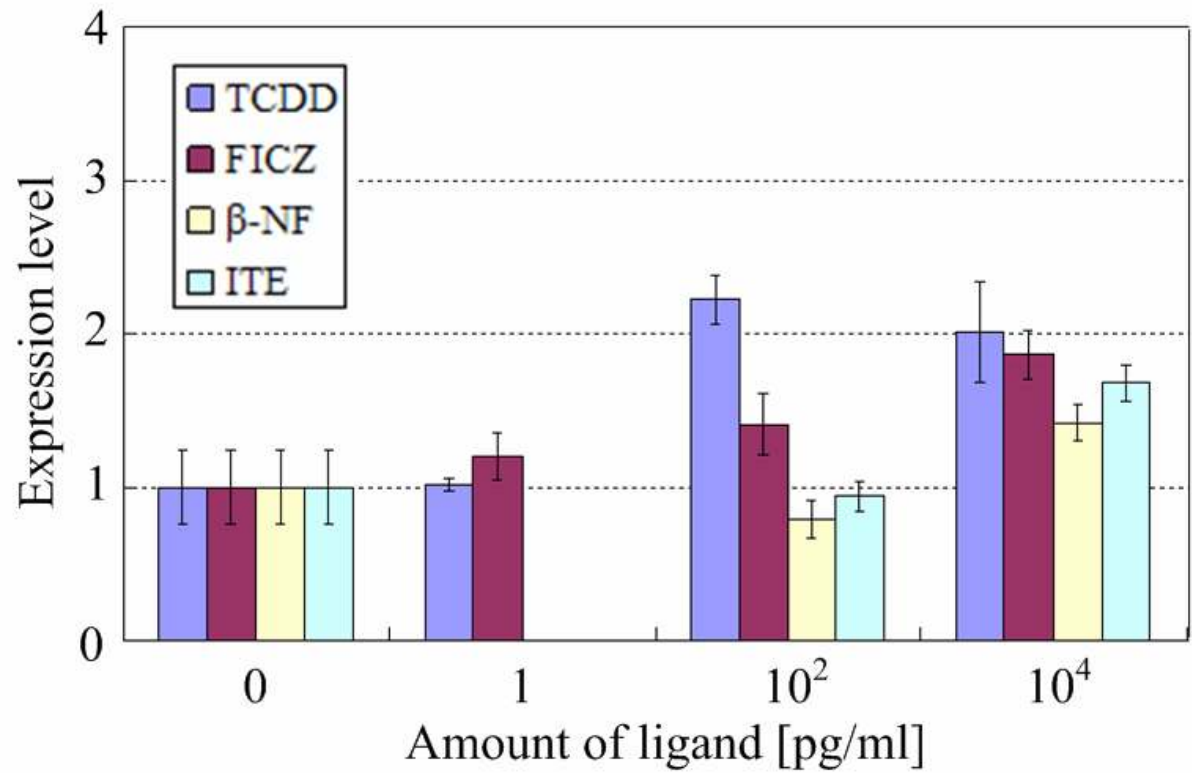


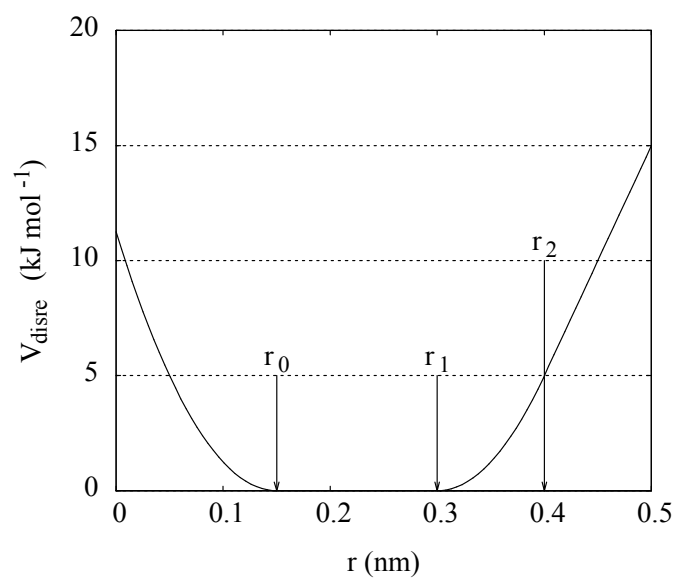
Fig. 8



**Fig. 9**

$$V_{dr}(r_{ij}) = \begin{cases} \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_0)^2 & \text{for } r_{ij} < r_0 \\ 0 & \text{for } r_0 \leq r_{ij} < r_1 \\ \frac{1}{2}k_{dr}(r_{ij} - r_1)^2 & \text{for } r_1 \leq r_{ij} < r_2 \\ \frac{1}{2}k_{dr}(r_2 - r_1)(2r_{ij} - r_2 - r_1) & \text{for } r_2 \leq r_{ij} \end{cases}$$

**(a)**

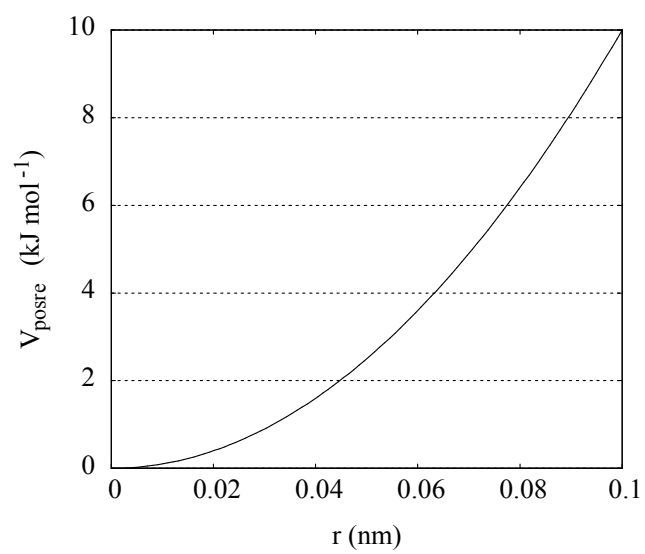


**(b)**

**Fig. 10**

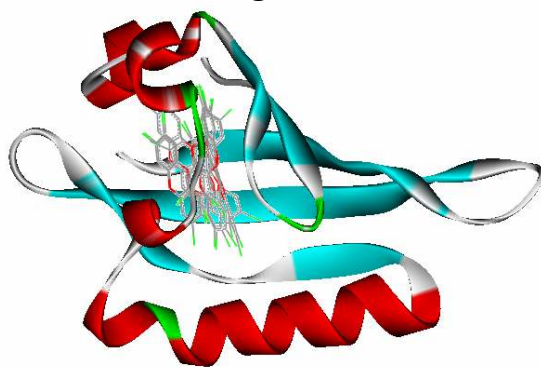
$$V_{pr}(r_i) = \frac{1}{2} [k_{pr}^x (x_i - X_i)^2 \hat{\mathbf{x}} + k_{pr}^y (y_i - Y_i)^2 \hat{\mathbf{y}} + k_{pr}^z (z_i - Z_i)^2 \hat{\mathbf{z}}]$$

**(a)**

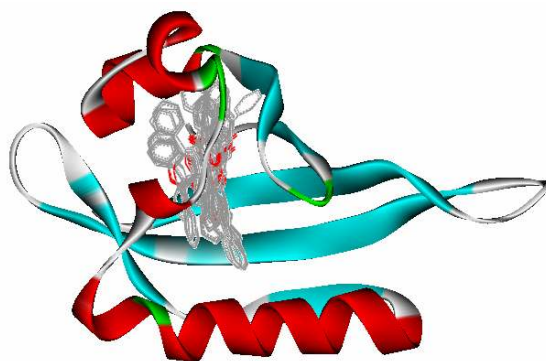


**(b)**

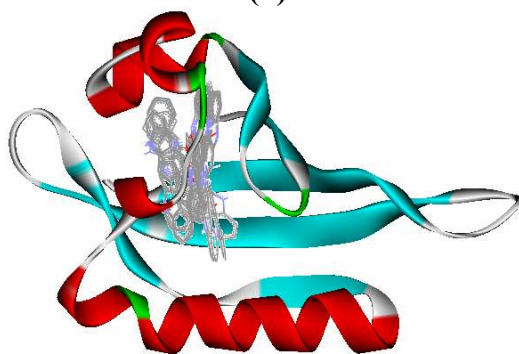
**Fig. 11**



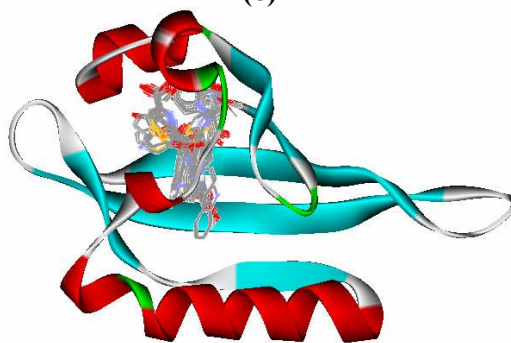
**(a)**



**(b)**

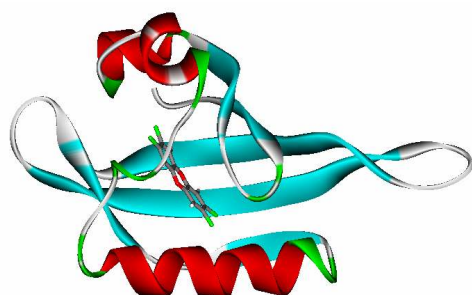


**(c)**

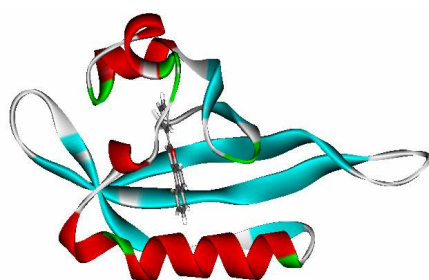


**(d)**

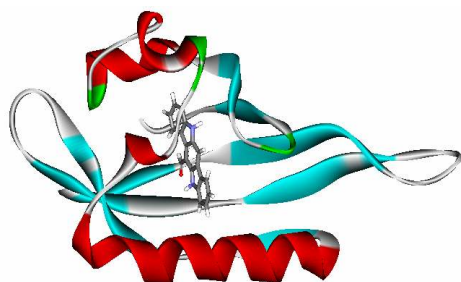
**Fig. 12**



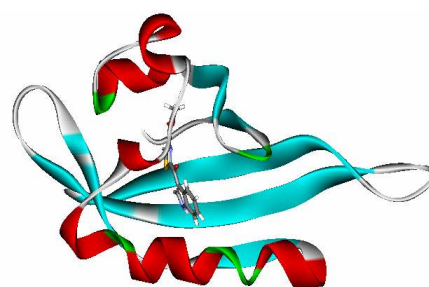
**(a)**



**(b)**



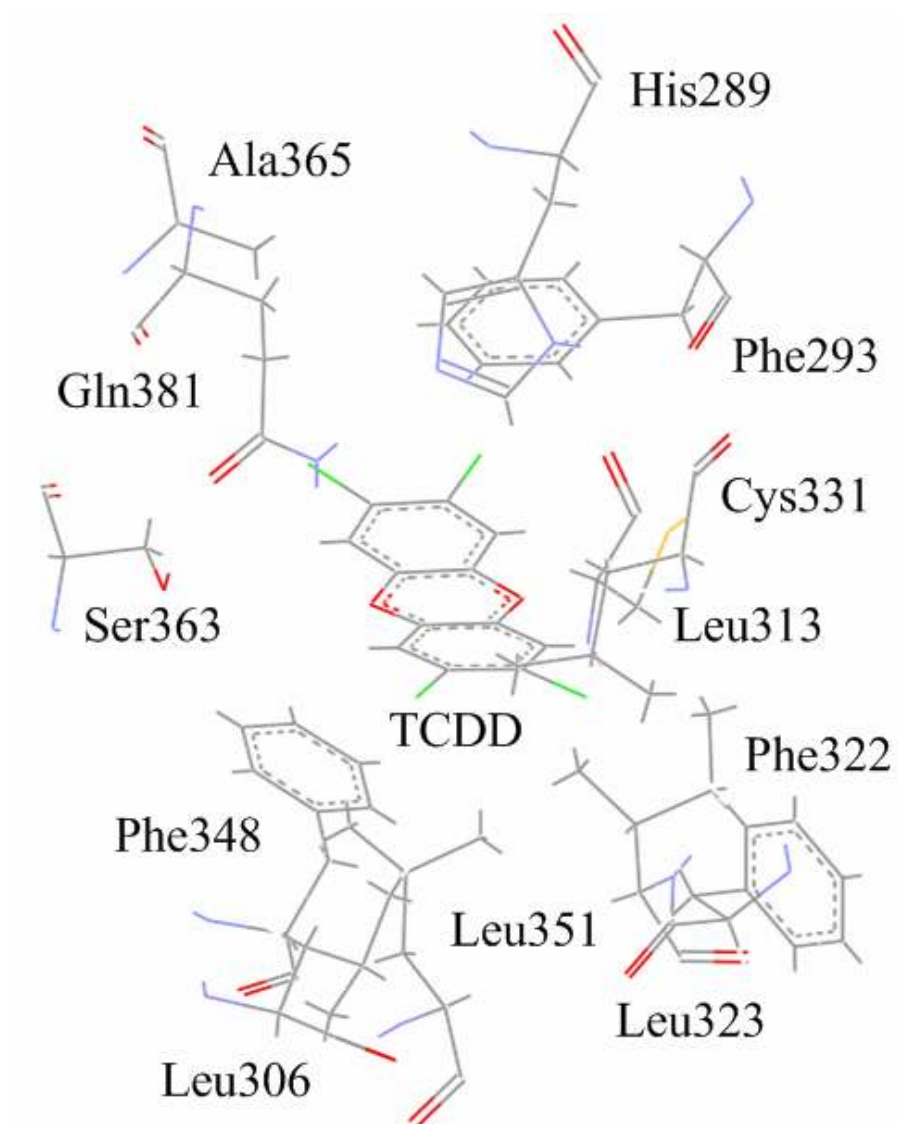
**(c)**



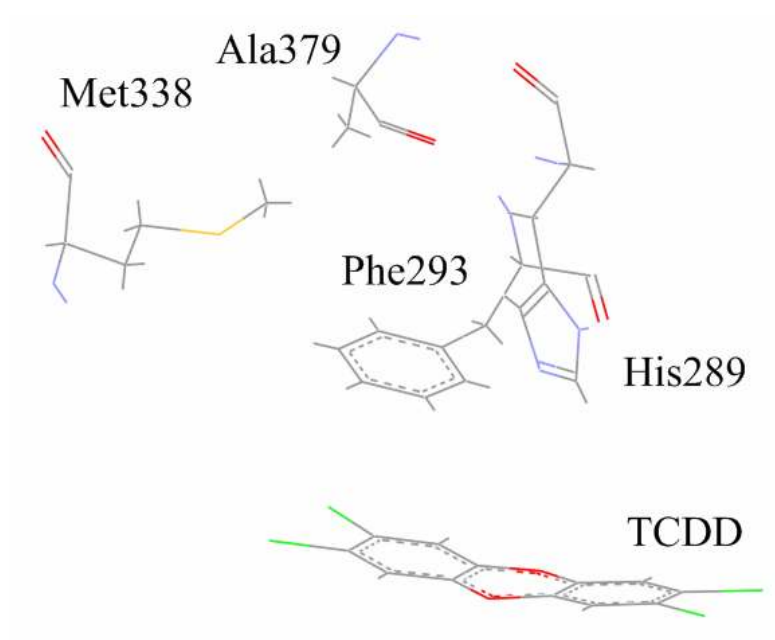
**(d)**



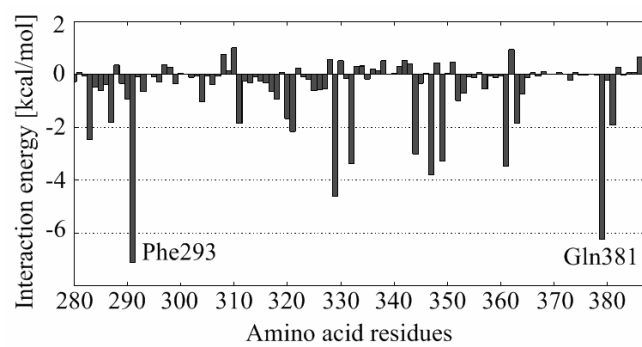
Fig. 13



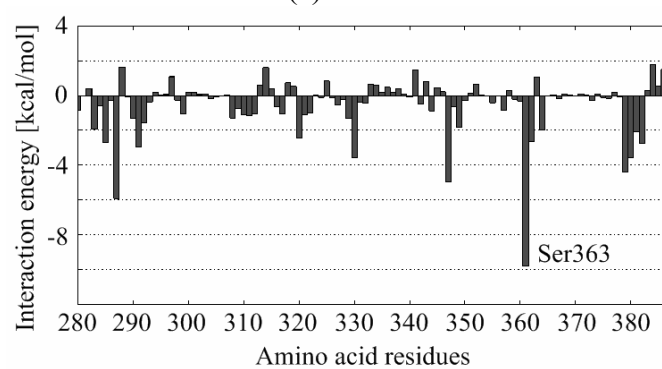
**Fig. 14**



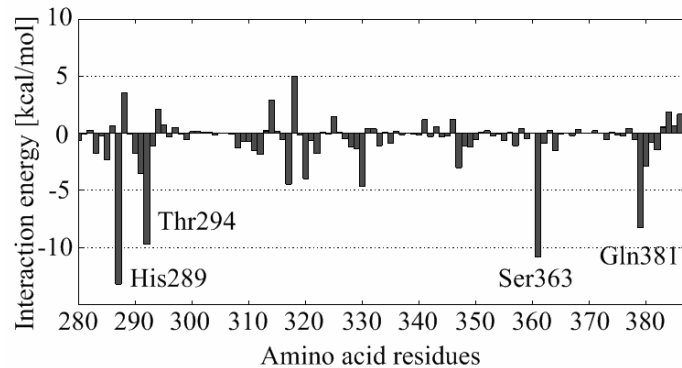
**Fig. 15**



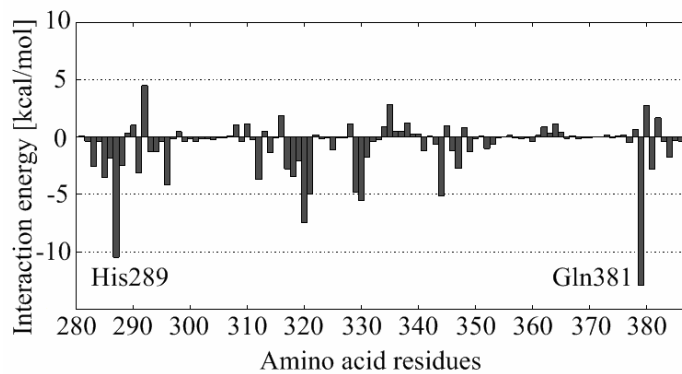
**(a) TCDD**



**(b)  $\beta$ -NF**



**(c) FICZ**



**(d) ITE**

Fig. 16

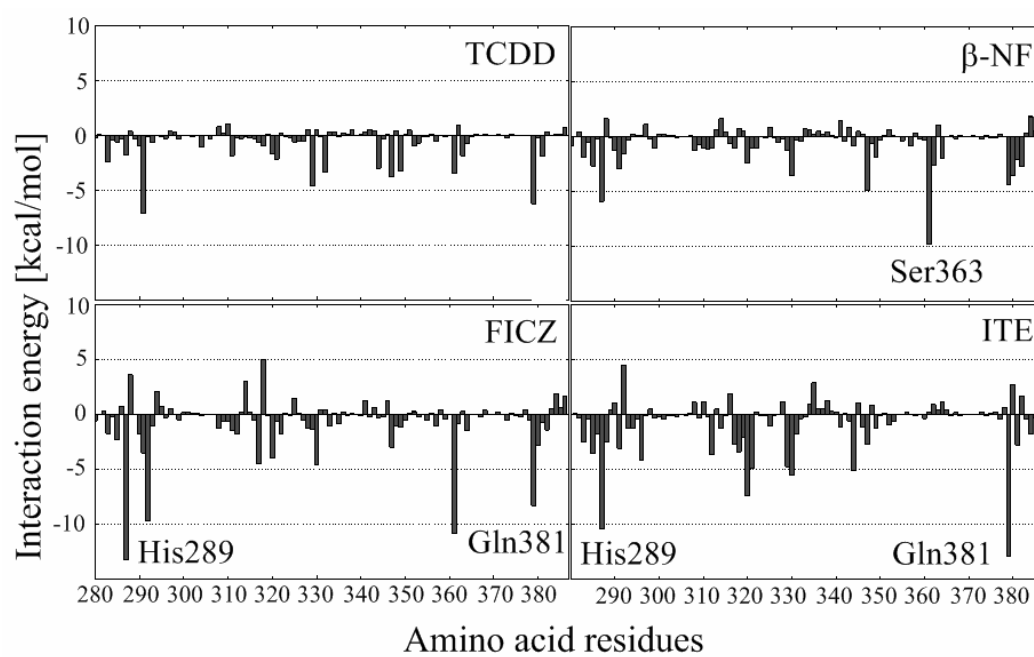
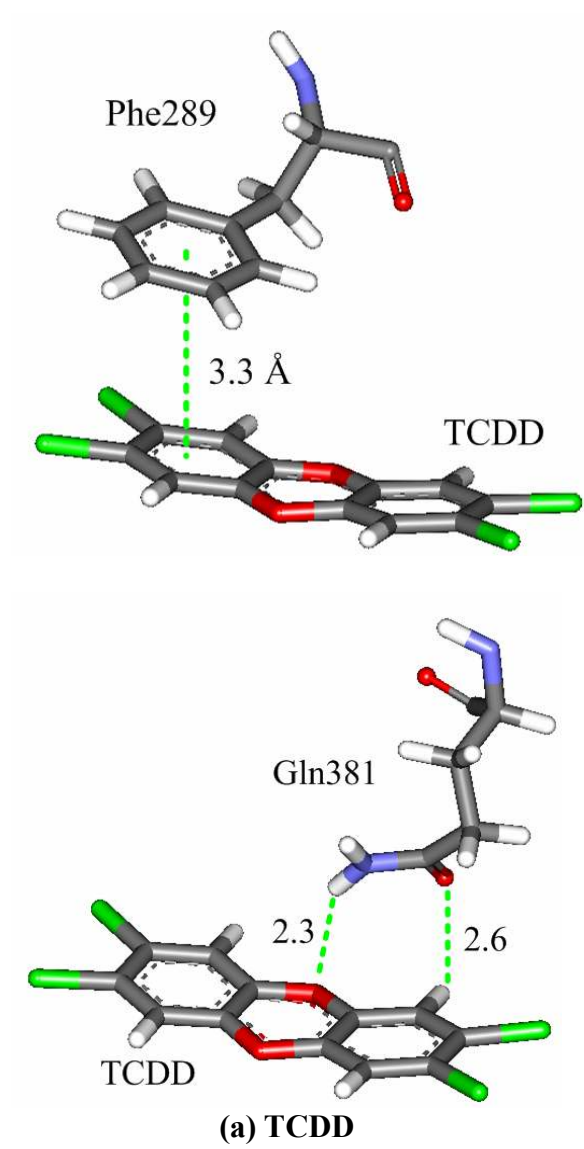
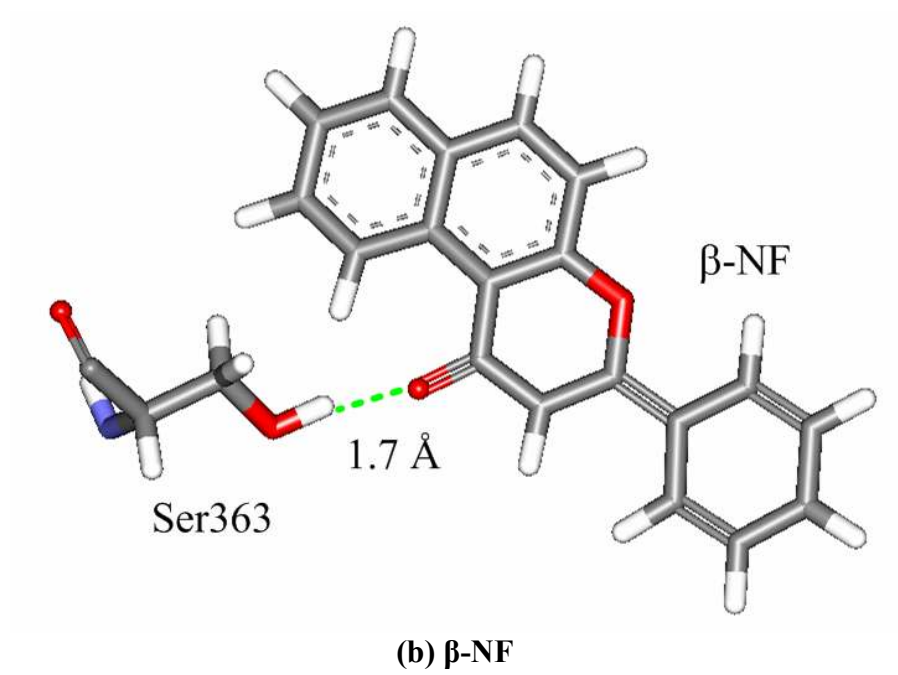
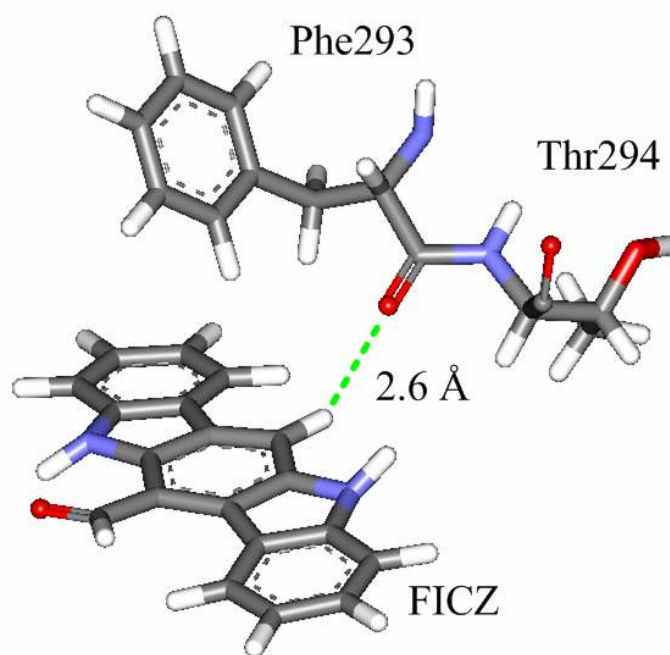
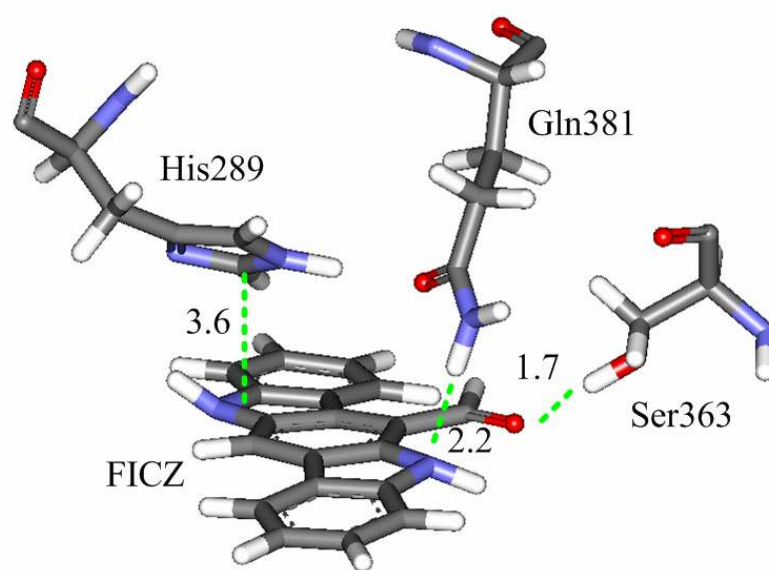


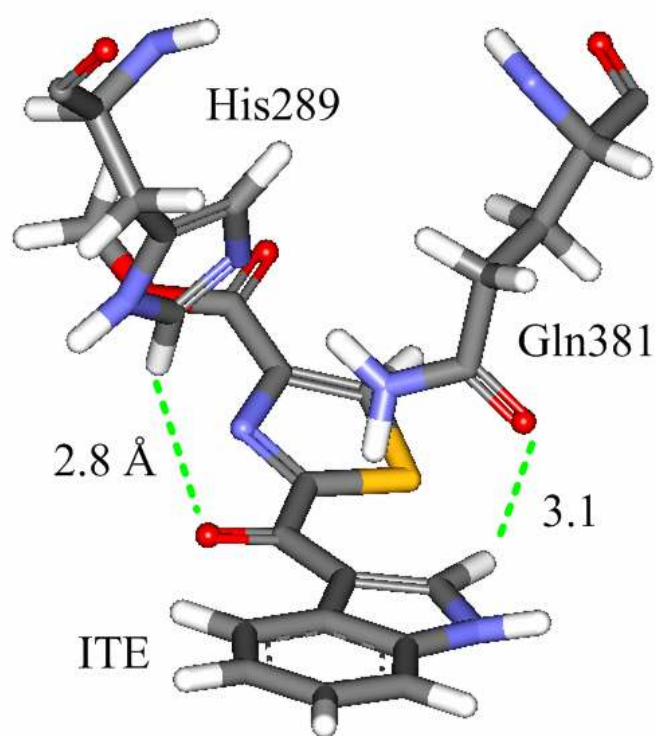
Fig. 17







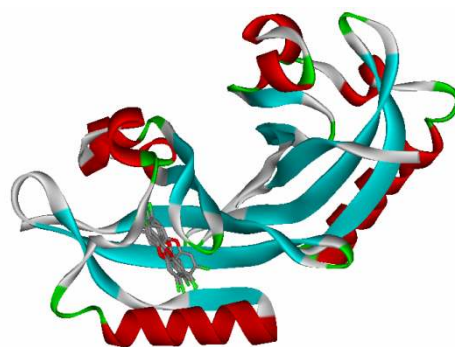
**(c) FICZ**



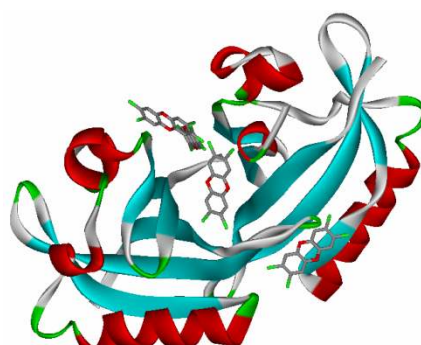
**(d) ITE**



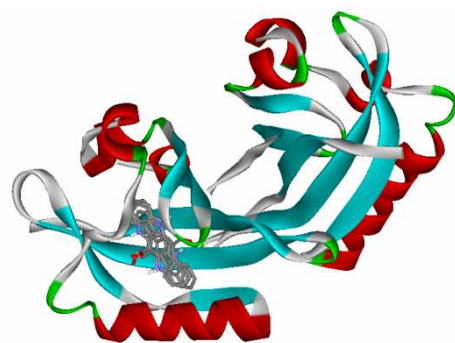
**Fig. 18**



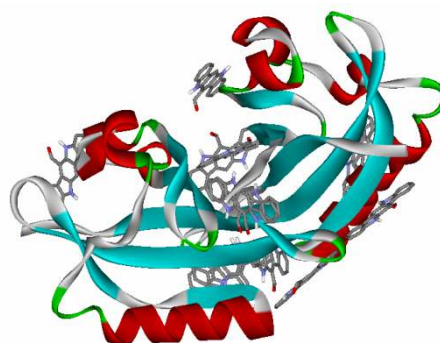
**(a) TCDD-inside**



**(b) TCDD-outside**

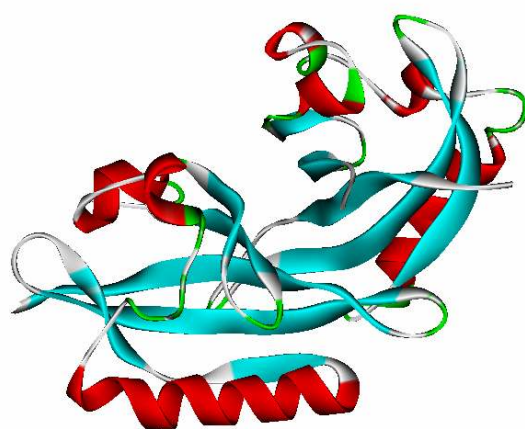


**(c) FICZ-inside**

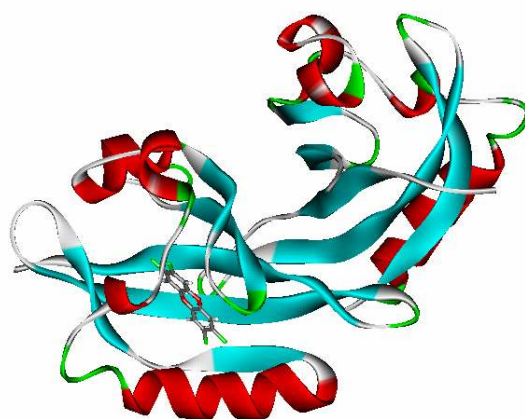


**(d) FICZ-outside**

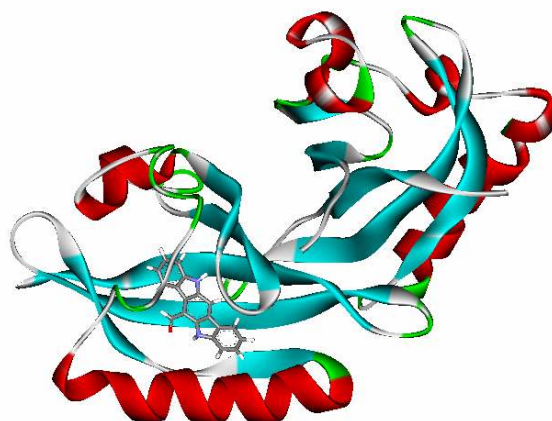
**Fig. 19**



**(a) Non-ligand**

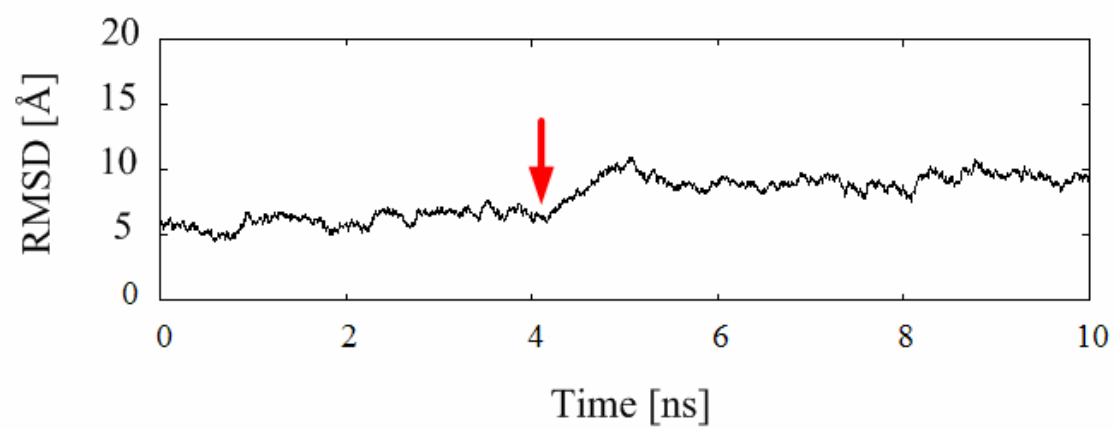


**(b) TCDD**

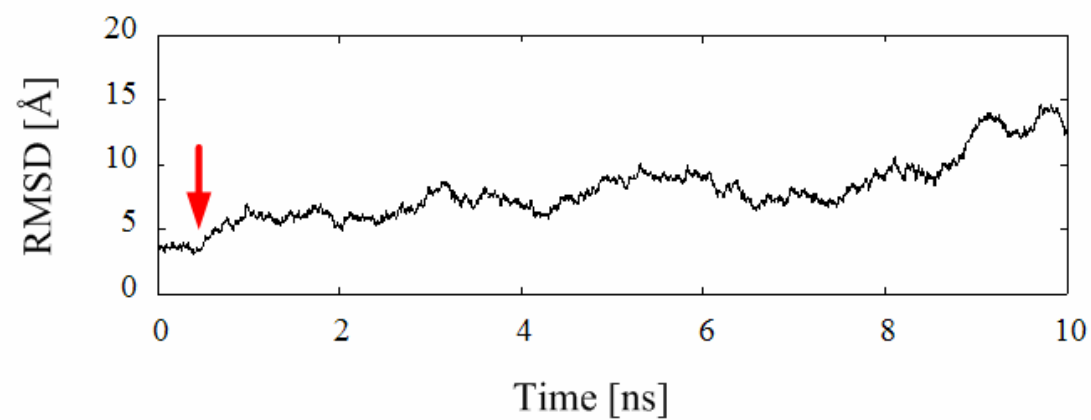


**(c) FICZ**

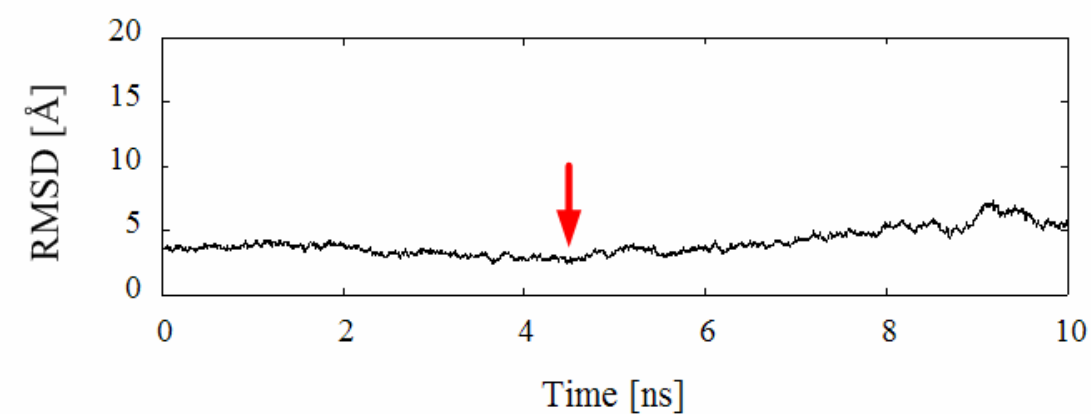
**Fig. 20**



**(a) Non-ligand**



**(b) TCDD**



**(c) FICZ**

**Fig. 21**

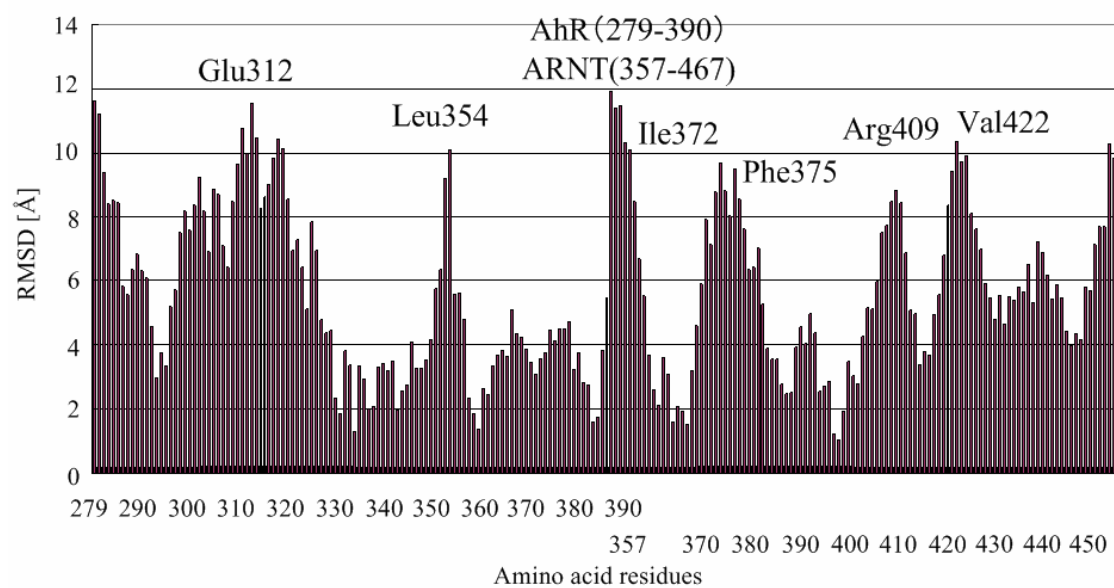
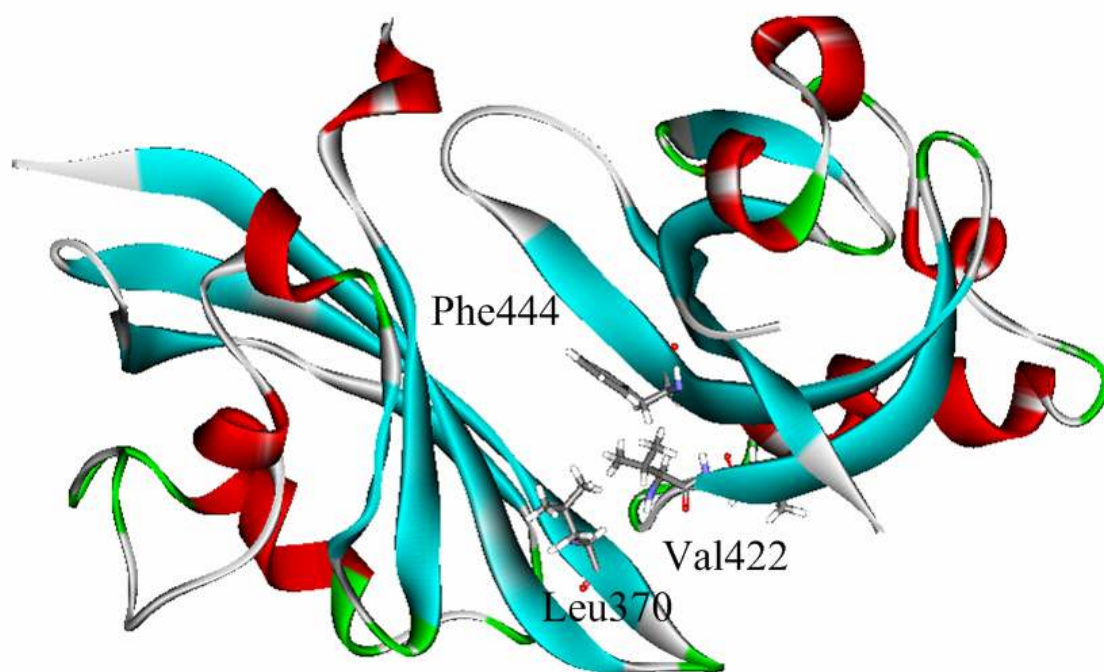
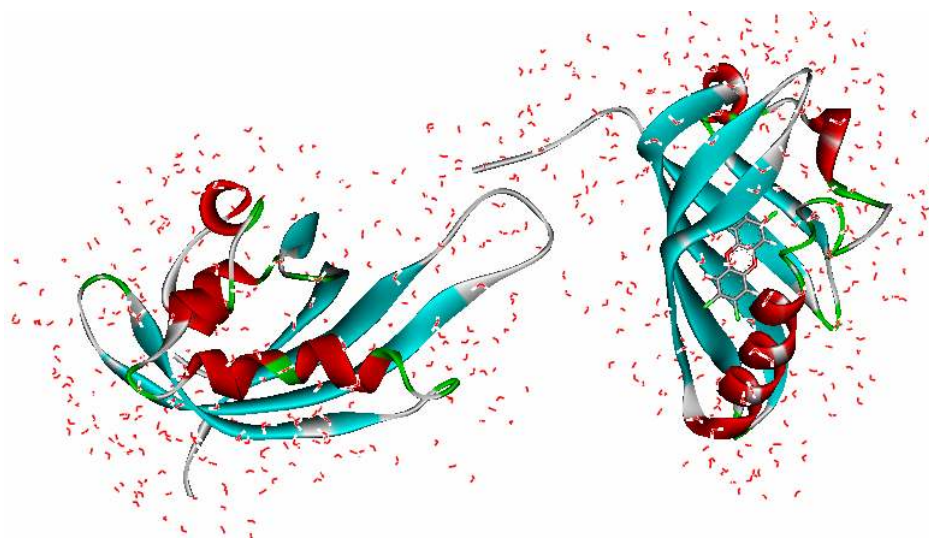


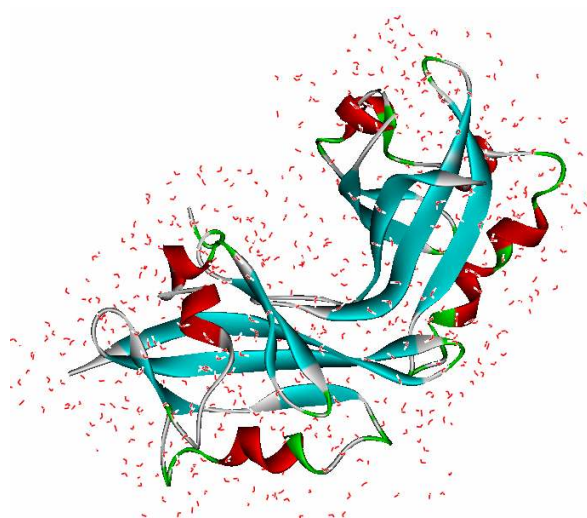
Fig. 22



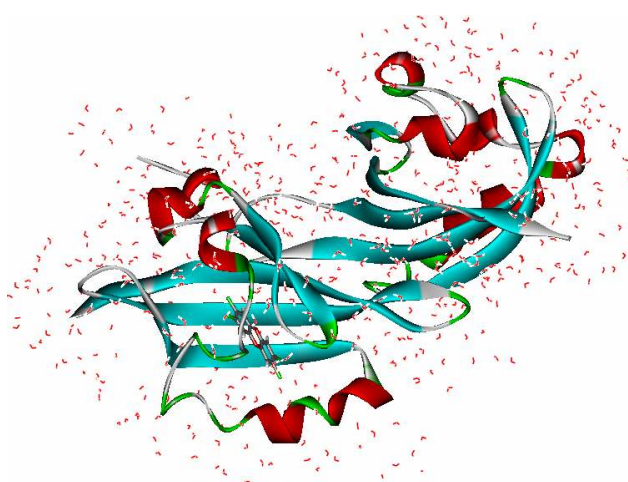
**Fig. 23**



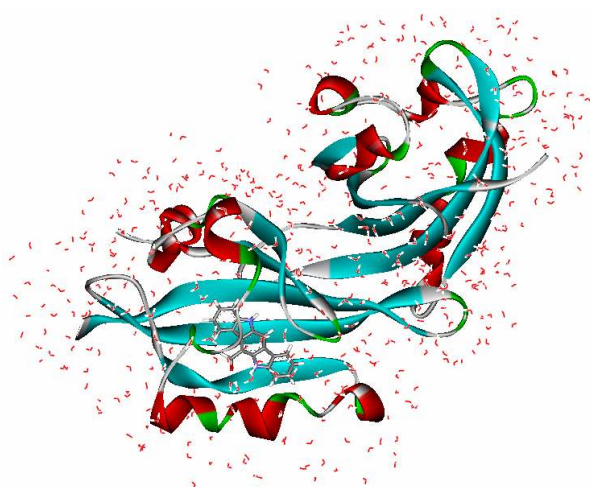
**Fig. 24**



**(a) Non-ligand**



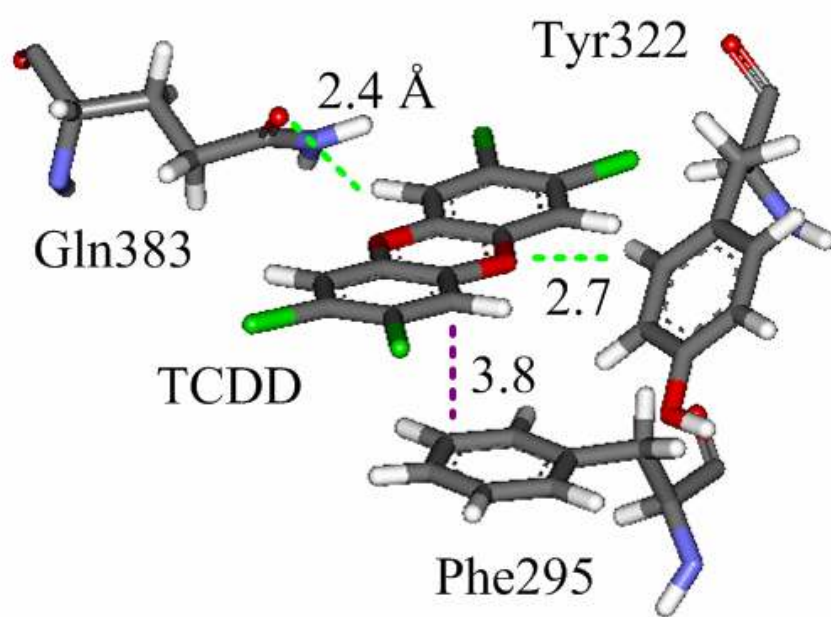
**(b) TCDD**



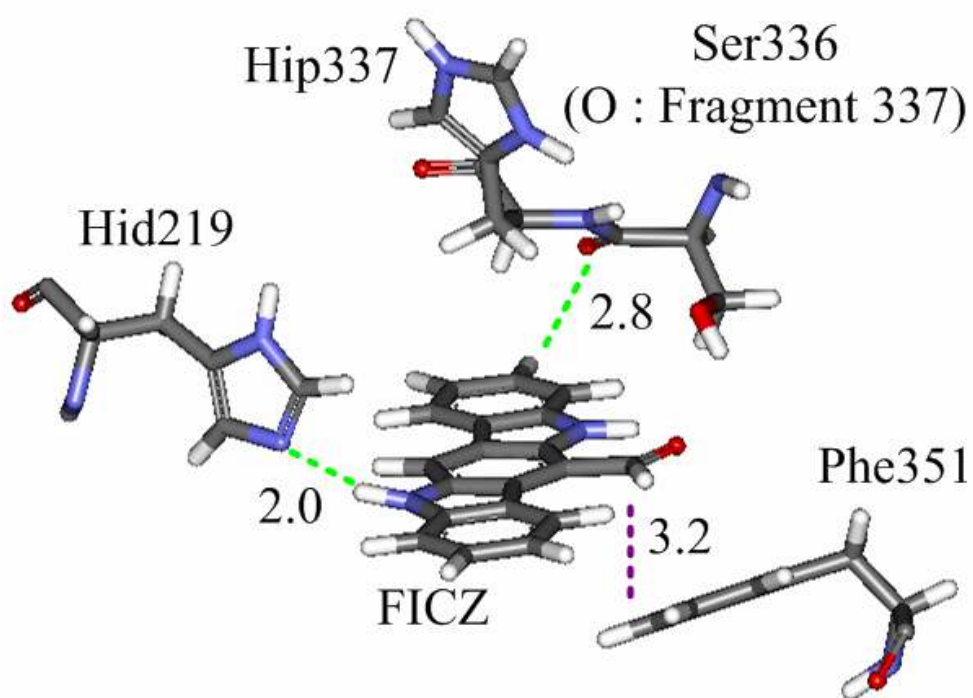
**(c) FICZ**



Fig. 25



(a) TCDD



(b) FICZ



**Fig. 26**

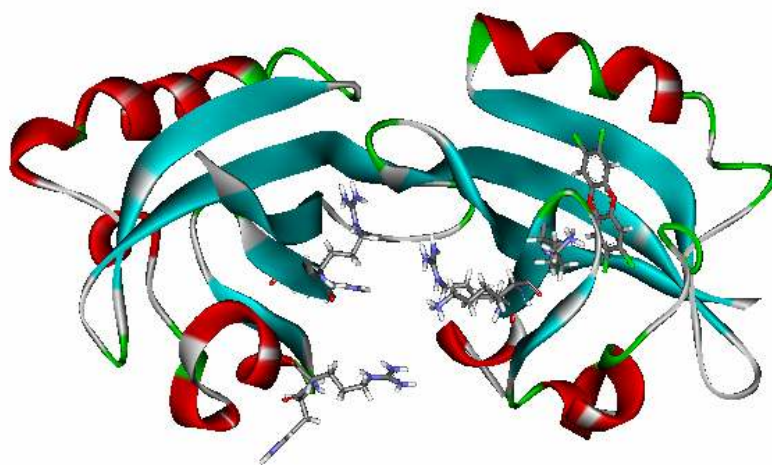


Fig. 27

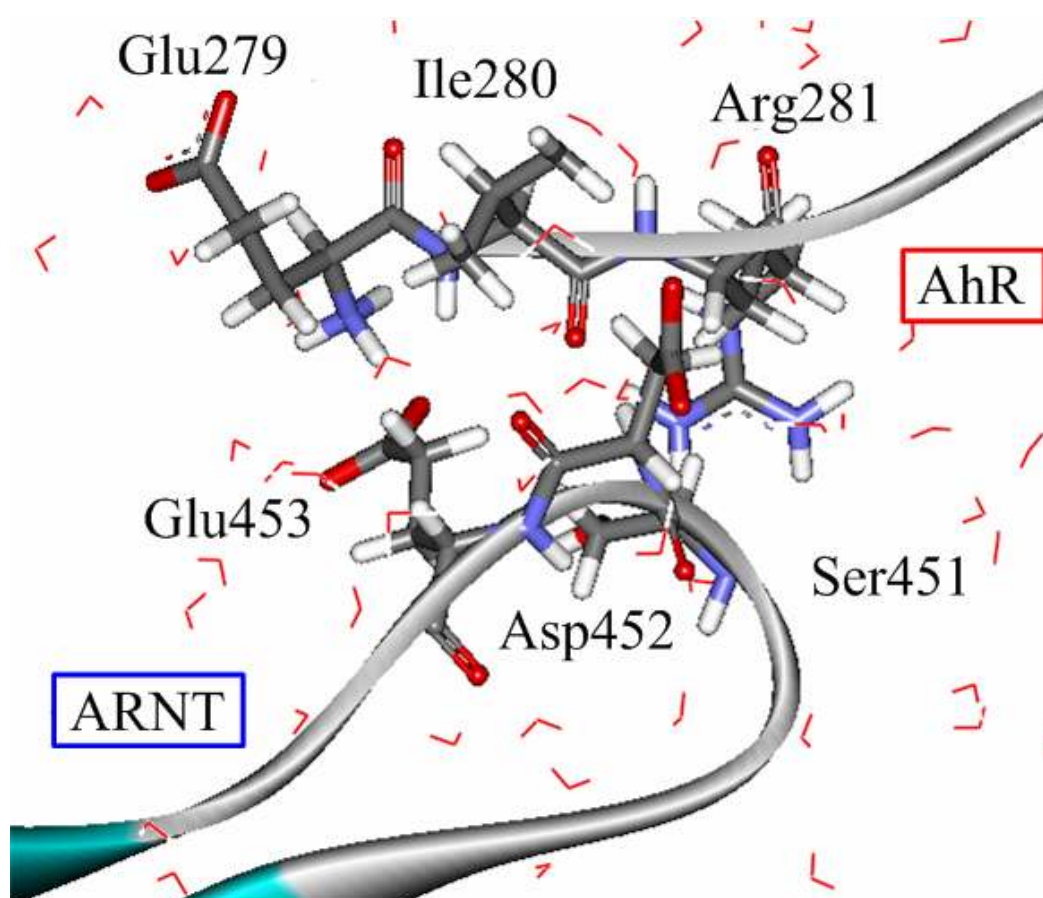


Fig. 28

