

3P100

フラグメント分子軌道法を用いた転写制御タンパク質ラクトースリプレッサーとリガンド及び DNA との特異的相互作用の解析

(豊橋技術科学大学) ○大山達也、西川真、栗田典之

【序】

ラクトースリプレッサー(LacR)は、DNA に特異的に結合して転写を制御するタンパク質であり、ラクトースなどのリガンドが結合することにより、DNA への結合特性が変化することが、これまでの実験で明らかにされている[1]。しかし、リガンドの結合によって制御される転写機構の詳細は、電子レベルでは未解明である。LacR に結合するリガンドは、結合による LacR と DNA 間の結合特性の変化より 3 種類に分類される。インデューサーは、LacR に結合することにより、LacR と DNA を分離させ、DNA の転写を活性化させるリガンドである。逆に、アンチインデューサーと呼ばれるリガンドは、LacR に結合することにより、LacR と DNA の結合を強め、DNA の転写を抑制する。また、LacR に結合するが、LacR と DNA の結合特性に影響を与えないノンインデューサーと呼ばれるリガンドも存在する。

本研究では、インデューサーとして、Fig.1(a)に示す IPTG と T-ONPG、アンチインデューサーとして Fig.1(b)の ONPF と T-ONPF を採用し、これらのリガンドを結合した LacR-DNA の複合体、及びリガンドを結合していない LacR-DNA 複合体を研究対象とした。そして、LacR に結合するリガンドの種類に応じて、LacR と DNA 間の結合特性が変化する原因を明らかにする目的で、LacR とリガンド間、及び LacR と DNA の特異的相互作用を、フラグメント分子軌道(FMO)計算により解析した。

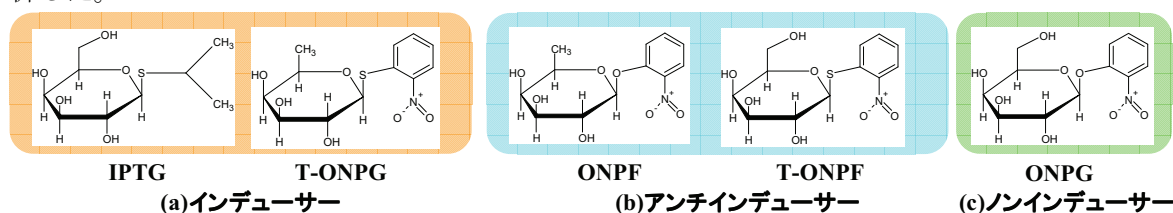


Fig. 1 LacR に結合するリガンド

【計算手順】

1. リガンドが結合した LacR-DNA 複合体の水和構造の作成

本研究では、リガンドが結合した LacR と DNA 間の結合特性の変化を明らかにするため、リガンド結合ドメインのと DNA 結合ドメインの両方を含み、かつ DNA が結合した LacR の構造が必要である。Protein Data Bank でこの条件を満たす構造として、1EFA と 1JWL の 2 種類が存在する。先行研究[2]では、LacR とリガンド間の水分子が重要であるという結果が報告されているため、結晶水を含む 1EFA を採用した。ONPF 以外のリガンドと結合した複合体については、ONPF 複合体中の ONPF を IPTG、ONPG、T-ONPG、T-ONPF に置換したものを初期構造とし、それぞれのリガンドは、Na⁺イオンと同様に HyperChem によって最適化した。また、ONPF 複合体の初期構造から ONPF を除去したものを、リガンドと結合していない LacR-DNA 複合体の初期構造とした。

2. LacR とリガンド間、及び LacR と DNA 間の特異的相互作用の解析

LacR とリガンド間、及び LacR と DNA 間の特異的相互作用を明らかにするため、水和した LacR-DNA-リガンド複合体の電子状態を FMO 計算プログラム ABINIT-MP のマルチレイヤー法を

用いて解析した。LacR とリガンド間の特異的相互作用の解析では、電子相関を考慮し、リガンドとその周囲 5 Å にあるアミノ酸と水分子を MP2/6-31G 法、その他のアミノ酸、DNA 骨格、DNA 塩基、水分子、カウンターイオンを HF/6-31G 法で計算した。一方、LacR と DNA 間の特異的相互作用の解析では、LacR の DNA 結合ドメインであるアミノ酸(2~61 残基)と DNA 骨格、DNA 塩基、LacR と DNA の間に存在する水分子、カウンターイオン周辺 3 Å に存在する水分子を MP2/6-31G 法、その他のアミノ酸、リガンド、カウンターイオンを HF/6-31G 法で計算した。なお、DNA は DNA 骨格と DNA 塩基を 1 フラグメントとして計算した。

【結果と考察】

PDB の 1EFA(LacR-ONPF-DNA) の実験構造と ONPF 複合体の最適化構造間の Root Mean Square

Distance(RMSD) は 0.94 Å となり、今回求めた構造は、実験構造と比較できることがわかった。

LacR とリガンド間の結合エネルギーを Table1 に示す。IPTG の結合エネルギーは他のリガンドに比べ、少なくとも 15 kcal/mol 小さい。この原因はリガンドの構造にあると考えられる。ONPF は、Fig. 2 (b) に示すように、糖部位の他、糖部位に結合している置換基でも LacR に結合しており、計 5 つの水素結合が形成されている。一方、IPTG は Fig. 2 (a) に示すように LacR と結合する際、糖の部位のみで結合しており、4 つの水素結合が形成されており、ONPF より水素結合による結合が弱くなっている。さらに、IPTG には糖部位に結合する置換基としてイソプロピル基があるため、LacR の親水性のアミノ酸との相互作用が小さくなる。これら 2 つの理由により、IPTG が他のリガンドより結合エネルギーが小さくなったと考えられる。また、Table1 に示す結合エネルギーの大小では、各リガンドのインデューサー、あるいはアンチインデューサーとしての機能の相違を説明することはできなかった。

LacR と DNA 間の特異的相互作用がリガンド結合により、どのように変化するかに関しては、当日のポスターにて発表する。

	IPTG	T-ONPG	ONPF	T-ONPF
	Inducer	Inducer	Anti-inducer	Anti-inducer
Binding energy	-66.84	-81.07	-89.44	-91.97
Number of hydrogen bonds	4	4	5	6

Table1 LacR とリガンド間の結合エネルギー(kcal/mol)と水素結合の数

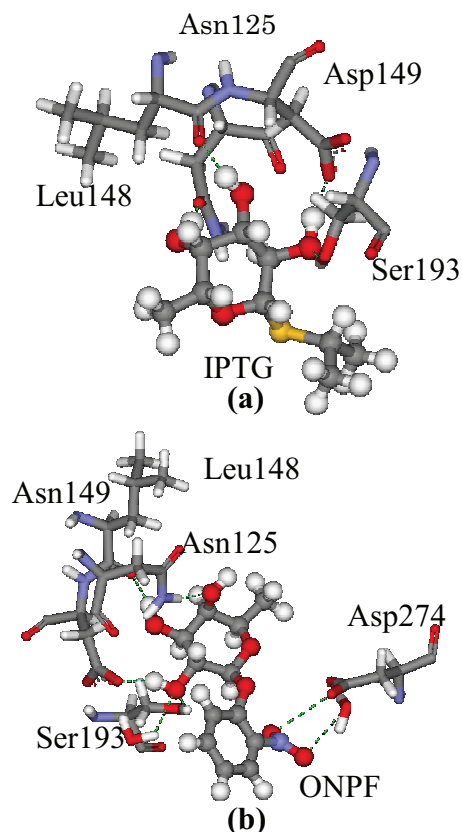


Fig. 2 LacR のアミノ酸と(a)IPTG、(b)ONPF 間の水素結合

【参考文献】

- [1] R. Daber, S. Staybrook, A. Rosenberg, M. Lewis, J. Mol. Biol., 2007, 340, 609-619.
- [2] S. Nishikawa *et al.*, J. Comp. Aided. Chem., 2008, 9, 17-29.