

## 分子シミュレーションによるアロステリックタンパク質と DNA 間の特異的相互作用の解析

(豊橋技術科学大学) ○大山達也、野村和哉、栗田典之

### 【序】

DNA から mRNA への遺伝情報の転写機構は、ラクトースリプレッサー(LacR)のようなアロステリック効果を示すタンパク質により巧みに制御されている。LacR に Fig. 1 のようなリガンドが結合することにより、LacR の構造が大きく変化することが、これまでの実験 [1] で報告されている。LacR のリガンドは、結合による LacR と DNA の結合特性の変化より分類される。インデューサは、LacR に結合することにより LacR と DNA 間の結合を弱め、その結果、LacR と DNA が分離し DNA の転写を活性化させる。一方、アンチインデューサは、LacR に結合することにより、LacR と DNA 間の結合を強め、DNA の転写をより抑制する。先行研究 [2] では、LacR に結合するリガンドの違いによる LacR の構造、及び電子状態の変化を解析し、LacR とリガンド間の結合に重要な LacR のアミノ酸残基、及び LacR

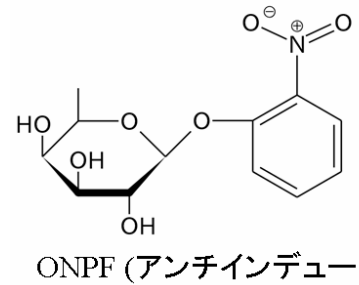
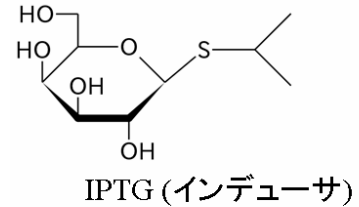


Fig. 1 LacR に結合するリガンド

と DNA 間の結合に重要な LacR のアミノ酸残基と DNA 塩基を明らかにした。しかし、解析する構造を古典分子力学(MM)法のみで決定しており、熱のゆらぎやリガンド結合に伴う LacR の構造の変化(アロステリック効果)を十分に考慮しているとは言い難いものであった。

本研究では、リガンド結合が LacR に与える影響、及びリガンド結合による LacR と DNA 間の結合特性の変化をアロステリック効果を考慮して原子・電子レベルで明らかにする。そのため、インデューサ、あるいはアンチインデューサが結合した LacR-DNA 複合体、及びリガンドが結合していない LacR-DNA 複合体の構造を作成し、分子動力学(MD)計算とフラグメント分子軌道(FMO)法を用い、リガンド結合が LacR と DNA 間の特異的相互作用に与える影響を解析した。

### 【計算手順】

#### 1. LacR-DNA 複合体の水和構造の作成

本研究の目的を達成するためには、リガンド結合ドメインと DNA 結合ドメインを含み、DNA と結合している LacR の構造が必要である。また、LacR とリガンドの結合にはタンパク質内に存在する水分子(結晶水)が重要な働きをする場合があり、結晶水を含んだ構造の方がより現実的である。これらの条件を満たす構造として、Protein Data Bank に登録された 1EFA の構造を初期構造として採用した。この構造は、LacR-DNA 複合体に ONPF が結合した構造であり、この構造の DNA のリン酸基にカウンターイオンとして  $\text{Na}^+$  を付加することで LacR-DNA-ONPF の初期構造とした。さらに、LacR-DNA-ONPF の ONPF を削除した構造を LacR-DNA とし、LacR-DNA-ONPF の ONPF を IPTG に置換した構造を LacR-DNA-IPTG の初期構造とした。これらの 3 つの複合体構造の周囲  $9 \text{ \AA}$  に水分子を付加し、古典 MD 計算プログラム Amber9 を用い、 $300 \text{ K}$  で、 $10 \text{ ns}$  の MD 計算を行い、各複合体の構造変化を比較検討した。また、MD 計算で求めた複数個のスナップショットを MM 計算で最適化し、複合体の水中での最安定構造を決定した。

## 2. LacR とリガンド及び 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、水和した複合体構造の電子状態を FMO 計算プログラム ABINIT-MP ver 4.3 のマルチレイヤー法を用いて解析した。LacR とリガンド間の電子状態計算では、リガンドとその周囲 5 Å に存在するアミノ酸残基と水分子を電子相関を考慮した MP2/6-31G 法、その他のアミノ酸残基、カウンターイオンを HF/6-31G 法で計算した。一方、LacR と DNA 間の電子状態計算では、LacR の DNA 結合ドメインのアミノ酸残基 (2~61 残基)、DNA、LacR と DNA 間に存在する水分子、及びカウンターイオン周囲 3 Å の水分子を MP2/6-31G 法で扱い、その他のアミノ酸残基を HF/6-31G 法で扱って計算した。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】

MM で最適化した構造と MD 計算した時の LacR の C $\alpha$ 原子の RMSD を Fig. 2 に示す。この結果より、リガンドと結合していない LacR、及び IPTG と結合している LacR は ONPF と結合している LacR より柔軟であることが明らかになった。これは、ONPF と結合した LacR は DNA と結合した状態で構造を固定化し、DNA と分離しにくい状態になっているものだと考えられる。一方、IPTG と結合した LacR は ONPF と結合した LacR より柔軟であるため、DNA から分離しやすい構造になっていると考えられる。

また、IPTG と結合している LacR の MD 前の構造と MD 後の構造を比較した所、LacR の DNA 結合ドメインの構造が大きく変化していることが明らかとなった(Fig. 3)。MD 前の構造では、Ser31 と Thr34 が DNA のリン酸基と水素結合を形成しているが、MD 後にこれら水素結合は消失している。そのため、Ser31 と Thr34 が LacR と DNA の結合に重要であると考えられる。

これら結果に対する考察、及び電子状態の解析結果は当日のポスターにて発表する。

### 【参考文献】

- [1] R. Daber, S. Stayrook, A. Rosenberg, M. Lewis, J. Mol. Biol., 2007, 340, 609-619.
- [2] T. Ohyama, M. Hayakawa, S. Nishikawa, N. Kurita, J. Comput. Chem. 2011, 32, 1661-1670.

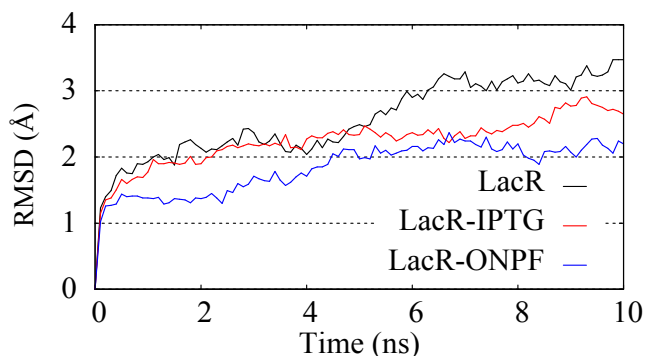


Fig. 2 Change in RMSD between initial structure and MD structure

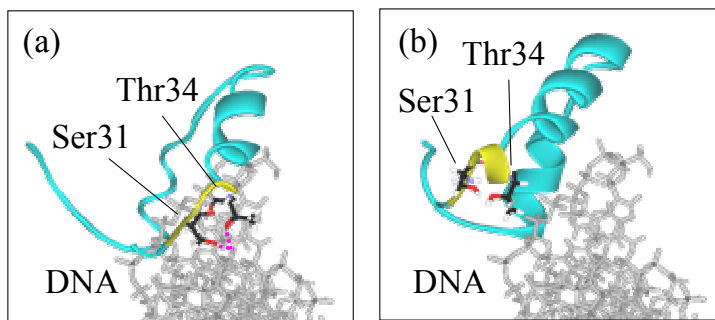


Fig. 3 Structure of DNA and DNA binding domain of LacR in (a) before and (b) after MD.