

2P091

分子動力学法を用いた cAMP 結合による
catabolite activator protein (CAP) の構造変化と機能発現に関する研究
(京都府大・院生命環境¹, 産総研²) ○小嶋 麻由佳¹, 福西 快文², リントゥルオト 正美¹

Molecular dynamics study on cAMP-mediated conformational change and functional
expression of the catabolite activator protein (CAP)

(¹ Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., ² AIST)

○Mayuka Ojima¹, Yoshifumi Fukunishi², Masami Lintuluoto¹

【序】 Catabolite activator protein (CAP) はアロステリック構造変化を示す代表的なタンパク質で、遺伝子転写調節因子として生命にとって重要な役割を果たすことから数多くの研究がなされているが、アロステリック構造変化と機能発現の詳細はよくわかっていない。CAP はホモ二量体で、cAMP 結合サイトである CBD (cAMP Binding Domain) と DNA 結合サイトである DBD (DNA Binding Domain) から構成される (Fig. 1)。cAMP が結合すると CBD とは離れた DBD の構造がアロステリックに大きく変化する。これにより、特異的な DNA 配列との結合が誘導され CAP-cAMP-DNA 複合体を形成する (Fig. 2)。

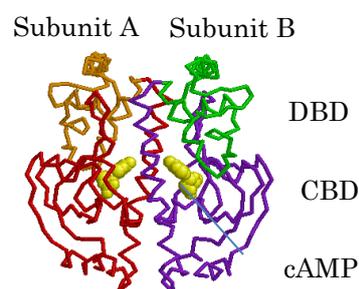


Fig. 1 CAP の構造
(PDB ID: 1o3t)

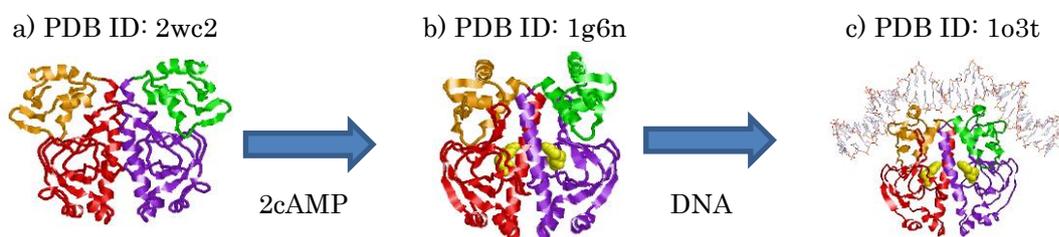


Fig. 2 CAP への cAMP 及び DNA の結合過程

実験的結果から 1 分子目の cAMP の結合が 2 分子目の結合に影響を与えること報告されている。また、我々の先に行った計算結果から CAP は 2 量化によって安定化することが分かった。そこで 2 量体界面が cAMP 結合情報伝達に重要であると考え、特に cAMP 結合によって 2 次構造が変化する 2 量体界面に存在するロイシンジッパー (LZ) に着目し、cAMP 結合によるアロステリック構造変化について、Molecular Dynamics (MD) 法を用いた研究を行った。

【実験】 NMR 構造である 2wc2 (cAMP なし)、X 線結晶構造である 1g6n (2 分子 cAMP 結合状態) と 1o3t (2 分子 cAMP-CAP-DNA 複合体) を基にモデル化を行った。MD 計算は myPresto ver.4.0 を用いて 6 ns 行った。NVT アンサンブル、温度: 300 K、タイムステップ: 2 fs、力場: Amber 99、溶媒: tip3p モデル、Cut off: 12 Å、長距離クーロン力: FMM 法の条件で行った。

【結果と考察】初期構造を参照構造とした主鎖の根平均二乗距離 (RMSD) の結果より、cAMP が結合していない 2wc2 は 6ns 後の値が 4.3Å で cAMP が結合している 1o3t、1g6n に対してそれぞれ 2.0 倍、1.5 倍であった。そこで、主鎖の根平均二乗ゆらぎ (RMSF) を調べると Fig. 3 に示すように 2wc2 の片方のサブユニットの揺らぎが特に大きいことが分かった。サブユニット B の CBD を比べると、2wc2 は 1o3t、1g6n よりも特に揺らぎが大きいことが分かる。RMSF が 4 Å 以上の残基を調べると、全て β -シート構造に挟まれたループ構造に位置していた。

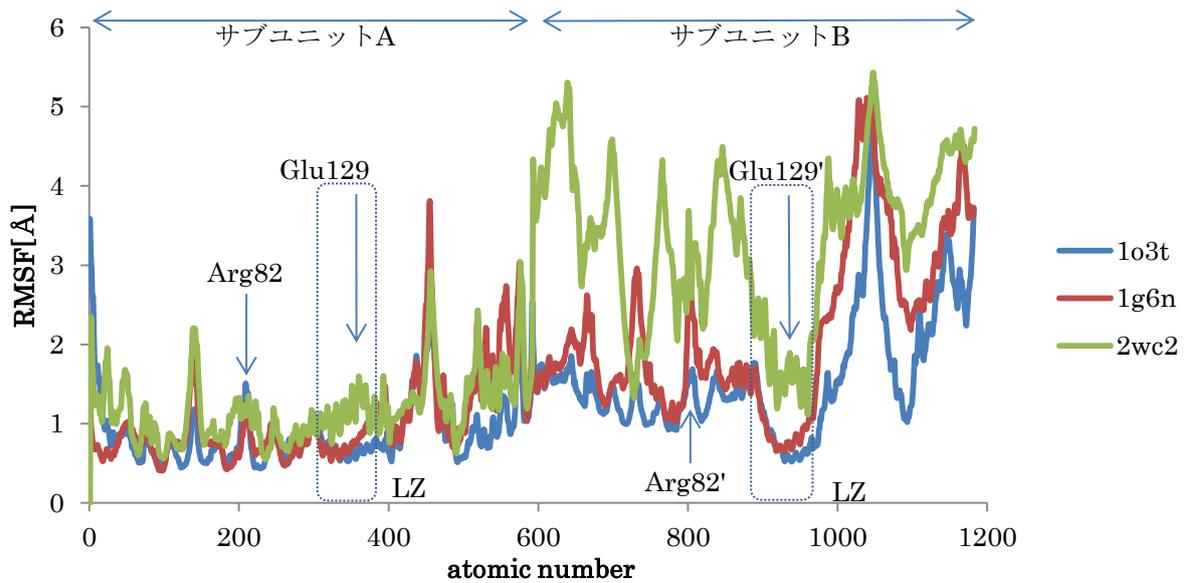


Fig. 3 主鎖に対する RMSF

次に、サブユニット B の LZ 内の Glu129' に揺らぎが見られる。また、cAMP 結合サイトである Arg82' でも変化が見られる。実験結果から、一方のサブユニットの Arg82 は他方の Glu129' と塩橋を形成することが確認されている。しかし、我々の研究からは、Glu129-Arg82' の塩橋は確認できたが、Glu129'-Arg82 の塩橋は確認できず、非対称性が示された。

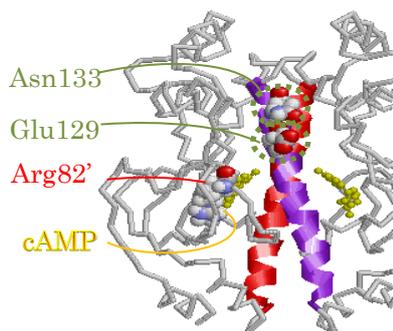


Fig. 4 LZ の伸長について

1g6n の CBD では、cAMP が Arg82' へと結合するとともに Arg82'-Glu129 の塩橋は切断される。Glu129 と Asn133、Asn133 と Leu137 での相互作用が両方のサブユニットで確認され、LZ に位置する C-ヘリックスがヒンジ部方向に 2 ループ伸長していることも示された (Fig. 4)。

DBD では、D-ヘリックスの Arg142 が Asp138 と相互作用し、ヒンジ部方向に 1 ループ伸長していた。Arg142 は Leu137 と相互作用することもわかっている。以上より、cAMP が結合すると C-ヘリックスと D-ヘリックスはヒンジ部に向かって伸長し、末端で相互作用することにより DBD の構造変化が固定されると思われる。さらに詳細な原子レベルでの解析及び、エネルギー的解析を行っているところである。