

4Pa042 フラグメント分子軌道法を用いた cAMP 受容タンパク質と DNA との相互作用の理論的研究

(富士総研・産総研・豊橋技科大・東芝・国立衛研)

○福澤薫・古明地勇人・仙石康雄・田中成典・中野達也

【序】

細菌内に存在する cAMP 受容タンパク質 (cAMP Receptor Protein ; CRP) は、cAMP との結合によって DNA 結合が誘発され、糖代謝系遺伝子の転写を促進する転写制御因子である。例えば、大腸菌のラクトースオペロンの転写に対しては、転写を抑制するラクトースリプレッサーとともに二重調節の機能を果たしている (図 1)。これらの転写制御機構を明らかにするためには、まず DNA と転写因子との間の特異的相互作用について理解する必要がある、これまでに多くの実験的研究がなされてきた。特に CRP はコンセンサス配列 5'-(TGTGA)-3' との特異的な認識機構を持つことが実験的に明らかにされている。本研究ではそれらの実験結果に理論的解釈を与えるために、非経験的フラグメント分子軌道法 (FMO 法) を用いて DNA-CRP-cAMP 巨大複合体の電子状態計算を行い、アミノ酸残基、DNA ヌクレオチド単位での相互作用を解析している。

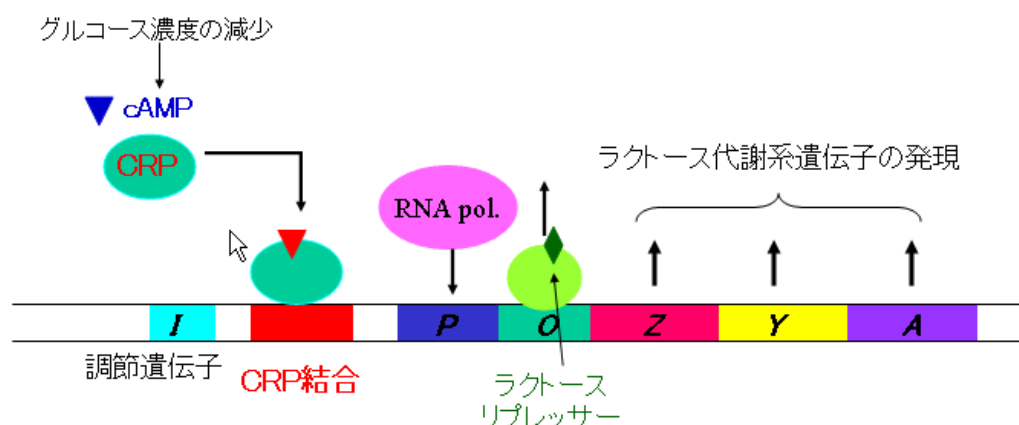


図1 大腸菌 CRP によるラクトースオペロンの転写制御機構

【方法】

生体内では、CRP と cAMP との複合体は二量体となって DNA に結合することが知られているが、ここではまず単量体に対する計算を行った。大腸菌の CRP-cAMP-DNA の複合体構造は Protein Data Bank (PDB) で公開されている結晶構造 1DB7 を使い、結晶水を全て削除した。水素原子を付加し、力場計算により水素原子の構造最適化を行った。次に、水とカウンターイオン (Na^+) をシェール状に発生させ、分子動力学法プログラム PEACH を用いて、最急降下法および徐冷法によるエネルギー極小化計算を行った。力場には CHARMM および AMBER94 を用いた。電子状態計算では、真空中の条件で FMO-HF/STO-3G レベルでの 1 点計算を行った。残基、ヌクレオチド単位のフラグメント間相互作用解析を行うために、フラグメント分割は DNA では 1 ヌクレオチド単位、タンパク質では 1 アミノ酸残基単位とした。CRP は 200 残基、DNA 鎖は 11 塩基対からなり、cAMP を含めた全原子数は 3932 である。計算プログラムは ABINIT-MP¹ を、計算機は Dual Xeon 2.2GHz、

8 ノード(16CPUs) の PC クラスタを用い、複合体の計算に約 14 時間を要した。

【結果】

大腸菌 CRP と cAMP、DNA との複合体の FMO 計算結果を図 2 に示す。左図は cAMP-CRP 複合体に対する各 DNA 塩基の相互作用の強さを表す。各塩基はどれもほぼ安定化しているが、特に濃色を示し強く安定化しているのは、コンセンサス配列とその周辺、5'-(aaaaTG)-3' の部分である（コンセンサス配列を大文字、その他の配列を小文字で表した）。すなわち、リガンドである cAMP を伴った CRP が DNA と結合すると、コンセンサス配列周辺と強く相互作用し安定化している様子がわかる。一方、右図は DNA 鎖に対する各アミノ酸残基および cAMP の相互作用の強さを示している。安定化・不安定化している残基がともに存在し、DNA 鎖から見た場合にどのアミノ酸残基が安定化・不安定化に寄与しているのかがわかる。これらにより、どのアミノ酸や塩基に変異を加えると DNA-タンパク質間の結合性が効果的に変化するか、などの知見を得ることができる。ここではタンパク質や DNA 全体とその他のフラグメントとの相互作用を示したが、もちろん個々のアミノ酸残基、DNA 塩基ごとの相互作用を詳細に解析することもできる。さらに、水分子、カウンターイオンを含めた系での FMO 計算を行い、溶媒効果とカウンターイオンの影響について評価する予定である。

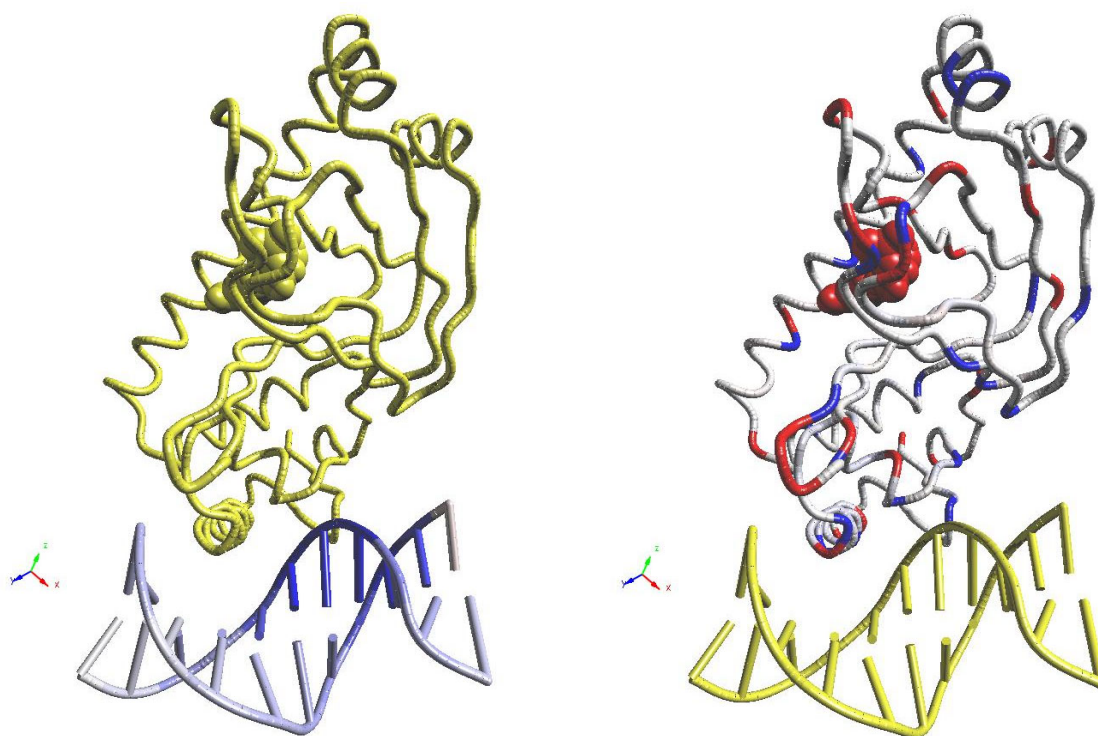


図2 大腸菌 CRP と DNA との複合体のフラグメント間相互作用解析結果。CPK 表示、チューブ表示、ラダー表示はそれぞれ cAMP、CRP、DNA 鎖を示す。画面上ではカラー表示され、黄色で示される範囲に対して、青が安定化、赤が不安定化しているフラグメントを表す。濃い色ほど強く安定化/不安定化している。分子表示には BioStation Viewer¹ を用いた。

[1] ABINIT-MP プログラムおよび視覚化ソフト BioStation Viewer は以下の web サイトから入手できる。<http://www.fsis.iis.u-tokyo.ac.jp/result/software/>