

転写調節因子とDNAの相互作用の理論的解析

●小田井 圭¹⁾ ◆杉本 徹²⁾

1) 湘北短期大学情報メディア学科 2) 関東学院大学工学部

〈研究の目的と進め方〉

本研究では、転写調節因子の一つであるCREB (CRE binding protein) がDNAのCRE (cAMP-responsive element) 配列 (5'-TGACGTCA-3' という8塩基) を特異的に認識して結合する過程に注目し、その認識機構、さらには、CRE配列に結合した後のCREBの構造変化を理論的に明らかにすることを目的とする。

代表者小田井が分子動力学シミュレーションを実施し、得られた結果に基づいて分担者杉本が量子化学計算を遂行する。

〈研究開始時の研究計画〉

1) CREBはDNAのどの様な配列にでも結合するのか？

CREBのDNA結合ドメイン (bZIP=Basic region leucine zipper構造) には塩基性アミノ酸残基が多く存在する領域があり、DNAのリン酸部分のマイナス電荷と強く相互作用して、CREBはDNAのどのような配列にも結合するとされている。CRE配列にCREBが結合した結晶構造 (PDB登録名：1DH3) に基づいてDNAのランダム配列モデルを幾例か作成し、それらとCREBの親和性を計算して、CRE配列-CREBの親和性と比較する。

2) どの様なDNA配列にも結合するなら、CREBはDNA上をスライドできるのか？

本研究者等の半経験的分子軌道法での準備計算によると、CRE配列とその他のDNA配列との間には静電ポテンシャルに違いはなく、CREBはDNAのどのような配列にも結合することが示唆されている。一般的に、CREBはDNA上をスライディングしてCRE配列で止まると考えられている。1)で得られたいくつかのランダム配列結合モデルを初期状態として、分子動力学によるスライディングモデルの検証計算を行う。

3) CREBのCRE配列結合後の動的構造変化

CREBがDNAのCRE配列に結合した状態を初期状態として、分子動力学法を用いて時間経過によるCREBの動的構造変化を明らかにする。

4) CREB・CRE配列構造変化後

3)で得られた構造変化後の構造および初期構造について分子軌道計算を実行し、量子化学的に、分子の形状、電荷分布、分子間の相互作用、Mg²⁺の水和状態、および自由エネルギー等の熱力学的諸量について変化を詳しく調べる。

〈研究期間の成果〉

本研究では、CREBがDNAのCRE配列に結合した状態の結晶構造 (PDB登録名：1DH3) を初期状態とした、分子軌道法および分子動力学法を用いてCRE配列とCREBの電子状態および時間経過による動的構造変化を明らかにした。

A) 電子状態・ポテンシャル

DNA (CRE配列を含む) には一様にマイナス電荷がリン酸部分に局在し、マイナスの静電ポテンシャルのみであった。従って、これをCREBが認識してDNAに結合し、

DNA上をCRE配列まで移動し (又は、直接CRE配列に結合し)、CRE配列上でCREB自体が構造変化等の反応を起こすと考えられる。CRE配列上でCREBを強く結合する理由については、今後の継続課題としたい。また、CREBとDNAのHOMO-LUMO間エネルギーギャップの大きさから、CREBとDNAとの間で電荷移動は起こりえないことが分かった。

B) CREBはDNAのどの様な配列にでも結合するのか？

分子軌道法によりエネルギーおよびその構造から検討した結果、CREBはDNAのCRE配列以外の場所にも結合し得ることが分かった。ただし、CREBはCRE配列に結合する場合が安定な結合のうちの1つであった。

C) CREBはDNA上をスライドできるのか？

CREBをCRE配列以外の場所に結合させて経時変化を分子動力学計算した結果、数10ns程度の時間では有意な動きは観察できなかった。タンパク質が移動するにはサブミリ秒以上の時間経過を必要とすると思われる。現在も計算を継続中である。

D) CREBのCRE配列結合後の動的構造変化

分子動力学による計算結果、数10ns程度の時間経過ではCREBとDNAには有意な動きは観測できなかった。現在、観測時間を100ns以上にするため計算を継続中である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

タンパク質とDNAの認識過程の理論的研究の第一歩として、そのモデル作成・計算・解析の一例を提示することが出来た。今後、計算機の発展に伴い、タンパク質全体と多数の塩基対を考慮に入れた計算も可能であり、この分野において、実験結果を理論研究がサポート可能であることを示すことが出来たと考える。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

今回本研究課題で取り上げたDNA+CREB+水+6水和Mg²⁺だけでは、CREBのCRE配列の結合の特異性などを明らかにすることはできなかった。今回考慮しなかった何か他の要因でCREBがCRE配列上に留まることや、計算に考慮している観測時間がまだ数10nsのオーダーであることに起因していると考えられる。

〈今後の課題〉

現在、転写が活性化された領域では、ヒストンH3の4番目のリジン残基がメチル化されていることが明らかになっている。このことから、分子動力学のシミュレーションには、更に何か別の分子などを登場させる必要性も考えられる。

DNAとタンパク質の相互作用についての研究は今後ますます活発になると考えられる。今回の研究の結果は、分子動力学計算に考慮すべき塩基対数や登場させる分子および観測時間といった条件を吟味することが大切であることを示唆している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

・なし