

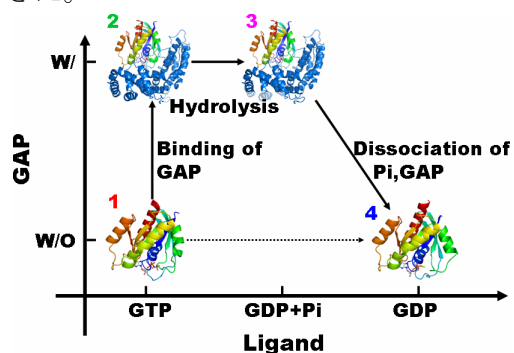
## シグナル伝達タンパク質 Ras の揺らぎと構造変化

(分子研、理論・計算分子科学) ○小林千草、齊藤真司

## [序]

低分子量 G タンパク質スーパーファミリーは GDP, GTP を特異的に結合し、グアニンヌクレオチドの結合状態により 2 つの立体構造をとり、分子スイッチとして機能する。その中でも Ras は特にシグナル伝達タンパク質として働く。GTP と結合することにより活性型となった Ras は、他のタンパク質と結合し、シグナルをより下流へと伝え、最終的には核へ到達し細胞増殖が起こる。GTP が加水分解反応により GDP とリン酸(Pi)に変換することにより、Ras は不活性となりシグナル伝達を起こさなくなる。そのため、Ras の加水分解速度がシグナル伝達量を決定しているといえる。このように Ras は細胞増殖の制御にかかわる重要なタンパク質であり、その制御に直接かかわる GTP の加水分解反応の解析はこれまでの多くの実験、理論研究がなされてきた。Ras のスイッチ領域と呼ばれている部分は、結晶構造解析から、活性型、不活性型においてその領域の構造が異なっていること、ヌクレオチド結合ドメインの一部を含むことから反応にかかわることが考えられてきた。

Ras の加水分解反応は生体条件化では非常に遅く、GTPase-activating protein (GAP) とよばれるタンパク質が結合することにより加速される。そのため、生体内における反応を調べるには GAP の結合による効果を取り込むことは必須である。GAP 結合を経て起こる一連の反応は右図のように (1) 反応体である活性型、(2) GAP 結合型、(3) 中間体型、(4) 生成物である不活性型で表すことができる。従来の研究の多くは活性型と不活性型、つまり (1) と (4) の間の違いについて議論されてきたが、実際の反応では (2), (3) の状態を経ている。本研究では GAP の結合を考慮にいたした反応機構の解析を目指した。4 つの反応状態に対してそれぞれ分子動力学計算を行い、それぞれのトラジェクトリに対して解析を行った。



## [計算手法]

構造解析より得られた構造 (活性型、不活性型、GAP 結合型) を初期構造とし、分子動力学計算を行い、各構造におけるタンパク質の構造や揺らぎの違いについて解析を行った。加水分解にかかわるとされる水分子とそれに配位する残基の水素結合ネットワークについても解析を進めた。さらに、加水分解直後の中間体のモデリングの解析を進めた。分子動力学計算には、AMBER の PMEMD を用い、全原子モデル (parm03) による計算を行った。また、加水分解反応に直接関わる過程や水素結合構造ネットワーク構造の安定性に関する解析に関しては、電子状態計算 (QM/MM 法) を用いた解析も行った。

## [結果]

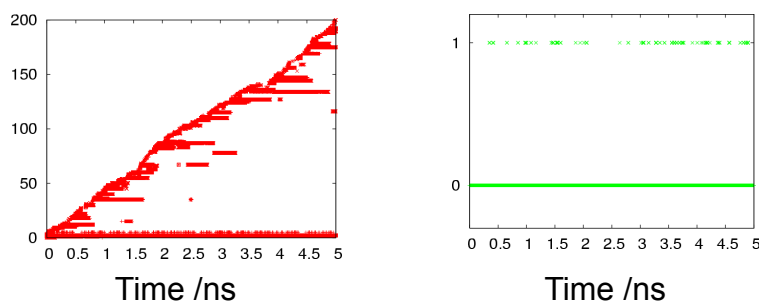
Ras の加水分解反応は、GAP の結合（1 - 2）、加水分解（2 - 3）、GAP と Pi の解離（3 - 4）という 3 段階の反応に分割できる。

GAP の結合（1 - 2）では、GAP の塩基性残基が Ras のスイッチ領域の酸性残基といくつかの塩橋を作成する。また、Ras の Q61 と GAP の R789 間に主鎖と側鎖間の水素結合が作成される。このような Ras-GAP 間の強い結合により GTP の周辺環境は変化する。特にリン酸基は活性型ではバルクと接して水和しているが、GAP の結合とそれともなう Ras のスイッチ領域の構造変化によりタンパク質から囲まれる。本研究でのシミュレーション時間の範囲内（ $\sim 5$  ns）ではこの領域への新たな水分子の出入りは見られなかった。これにより、水分子の交換を防ぎリン酸に配位する水分子を固定させ、加水分解反応を起こしやすくしていると考えられる。また、主鎖原子 ( $C\alpha$ ) に対する RMSF 計算を行い、特に結合領域において GAP の結合によって主鎖の揺らぎが抑えられていることも明らかとした。ただし、これらの状態間では二次構造の大きな差異はみられなかった。

次の段階（2 - 3）では、加水分解反応により GTP は GDP と Pi に分解される。最近の実験研究により、分解後の Pi は GDP と水素結合を作り、中間体として存在する事が明らかになってきた。今回の研究において実験で示唆された GDP と Pi が水素結合を持つような安定した中間体を作成することに成功した。この構造により反応により  $\gamma$  位のリン酸基が Pi となっても、GDP/Pi と Ras、GAP との配位はほとんど保持されおり、原子間距離があまり変化しないことが明らかとなった。また、この状態でも GAP や Ras に囲まれているため水分子の出入りはみられなかった。主鎖原子の揺らぎや二次構造はこの段階でも違いがみられなかった。

最後の段階（3 - 4）では、GAP と Pi が Ras から解離する。Ras は再び単体になり、GDP を結合した不活性型となる。つまり、Ras と Pi、GAP 間の結合（塩橋、水素結合）は完全に解消され、スイッチ領域近傍の配位も大きく変化する。GAP が解離するため、GDP は再びバルクに接するようになり、 $\gamma$  リン酸基や GAP との結合の多くが水分子との配位へと置き換わる。これらの結合交替が大きな構造変化を引き起す。主鎖原子の揺らぎは GAP の解離のため、再び大きくなった。また、スイッチ領域では大きな二次構造の違いが見られた。

本研究では残基間、GAP と Ras の相互作用エネルギー、各状態の安定性についても解析を行った。QM/MM 法を用いた各状態（2, 3）の安定構造の結果も含め、詳細は当日発表する。



GTP の  $\gamma$  リン酸に配位する水分子の交換の様子（左：活性型、右：GAP 結合型）

縦軸は配位した水分子の番号、横軸は時間