

4.00E+11

GTP 結合型 Ras の構造変化と揺らぎ

(分子研、理論・計算分子科学) ○小林千草、齊藤真司

[序]

Ras は、低分子量 G タンパク質スーパーファミリーの代表的なタンパク質であり、シグナル伝達の機能を持つ。これらのタンパク質は GDP、または GTP を結合すると、それぞれ異なる 2 つの立体構造をとり、分子スイッチとして機能する。GTP と結合することにより活性型となった Ras は、エフェクターと呼ばれる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 となると、Ras は不活性となりシグナル伝達は停止する。GTP 結合型、GDP 結合型での結晶構造解析から、ヌクレオチド結合ドメインの一部を含む特定の領域において加水分解反応による構造変化がおきることが明らかとなった。これらの領域はスイッチ I (残基 30-38) とスイッチ II (残基 60-76) と呼ばれている。このファミリーのタンパク質の多くで、同様の構造変化が報告されている。

スイッチ領域のいくつかの残基はファミリー内で保存され、エフェクターとの結合、または加水分解反応に重要な役割を担うことも知られている。スイッチ I に存在するスレオニンは Ras ファミリー内の多くに保存されている。GTP 結合型の結晶構造では、スレオニンの側鎖の水酸基が Mg^{2+} と配位している。この配位は Ras がエフェクターと結合しているときにも保持されていることが知られている。エフェクターとは直接結合しないに関わらず、このスレオニンの変異体は、エフェクターとの結合能が低下する事が知られている。しかし、その一方で、Ras において Mg^{2+} との配位が外れている構造がある程度の割合で存在していることが P-NMR 実験から明らかとなった。他のいくつかの実験研究の結果と併せて、GTP 結合型の Ras では異なる構造を持った安定状態が複数存在し、それらの状態間を遷移するモデルが考えられている。その中の一つが、エフェクターと結合する活性状態であり、結晶構造解析で得られた構造はこの状態であると考えられている。この状態は state 2 と呼ばれている。また、スレオニン- Mg^{2+} の配位がない状態は state 1 と呼ばれる状態であると考えられている。H-Ras では state 2 が優位であるが、Ras ファミリーのタンパク質である M-Ras や H-Ras の変異体のいくつかは state 1 が優位であることが知られている。

本研究の目的は Ras の構造変化がエフェクターの結合などの反応にどのような影響を与えるかを解析することである。2 つの GTP 結合型(state 1,2)と GDP 結合型の 3 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、揺らぎやその結合状態などを調べた。

[計算手法]

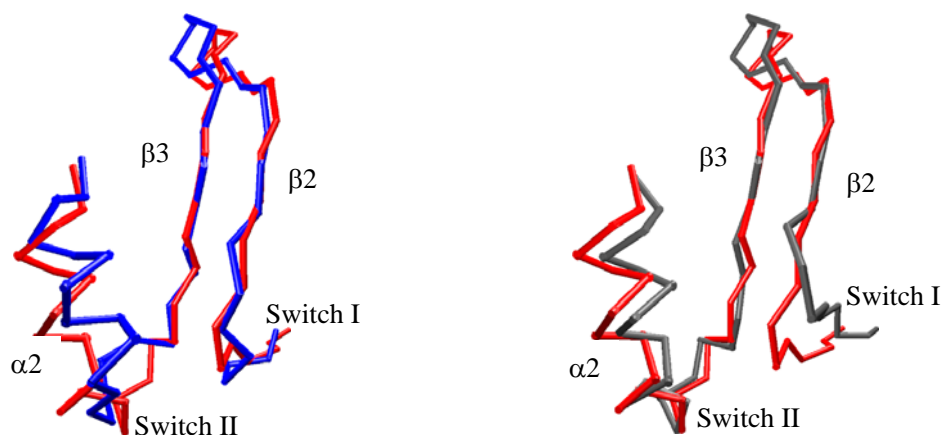
結晶構造解析より得られた構造 (GTP 結合型、GDP 結合型) を初期構造とし、分子動力学計算を行い、各構造におけるタンパク質の構造や揺らぎの違いについて解析を行った。また、GTP 結合型の state 1 の初期構造に関しては、M-Ras のスイッチ I 領域を GTP 結合型構造 (state 2) へ挿入するモデリングを行うことにより作成した。分子動力学計算には、AMBER の PMEMD を用い、

全原子モデル(parm03)による計算を行った。

[結果]

まず、GTP 結合型と GDP 結合型との違いについて述べる。GTP 結合型では γ リン酸がスイッチ II の Gly60 と配位する。また、 γ リン酸は Mg^{2+} とも配位しており、 Mg^{2+} を通じてスイッチ I のスレオニン (Thr35) とも相互作用する。その結果、ヌクレオチド(GTP/GDP)は Ras のループ部位にゆるく囲まれた構造を取る。一方、GDP 結合型では、加水分解により γ リン酸が解離しているため、 γ リン酸とスイッチ I,II 領域の配位はなく、スイッチ I,II 領域は GDP とは離れる。これらの配位の変化により、 γ リン酸の配位にかかわる残基においてスイッチ領域の二次構造は大きく変化する。(下図左) また、これらの残基(Thr35,Gly60)は、スイッチ領域のループ部位と隣接した部位との境界に存在している。境界の二次構造が変化することにより、ループに隣接した部位 (特にスイッチ I の $\beta 2$ strand, スwitch II の $\alpha 2$ helix) の構造も変化しており、結果的にスイッチ領域の全体の構造を変化させていることが考えられる。

次に、2つの GTP 結合型 (state 1,2) の構造の比較を行った。(下図右) どちらの状態でも、 γ リン酸とスイッチ II の Gly60 との配位は保持されており、スイッチ II の構造は同様の構造を取ることが分かった。しかし、先に述べたように state 1 では Mg^{2+} は Thr35 に配位しておらず、 γ リン酸と Mg^{2+} を通じた Thr35 との相互作用は存在しない。そのため、スイッチ I は GTP より離れている。また、 γ リン酸とスイッチ I の Pro34 との間に立体障害があるため、 Mg^{2+} と Thr35 の配位がない GDP 結合型に比べ、スイッチ I は更に開いた構造を取っていることも明らかにした。State 1 でもスイッチ I 領域のループ部位と隣接した部位との境界の残基での二次構造の変化が見られ、スイッチ I の $\beta 2$ strand は開いた構造を取っている。いくつかのエフェクターは $\beta 2$ strand と β シートを作ることにより結合している。つまり、 $\beta 2$ strand が開いた構造を取ることにより、この β シート構造を取りにくくしていることが、state 1 のエフェクターとの結合能の低下の原因であると考えられる。



MD から得られたスイッチ領域の平均構造

左 : GTP 結合型,state 2 (赤)と GDP 結合型(青)、
右 : 2つの GTP 結合型 : state 1(灰)と state 2 (赤)