

Ras の構造変化に関する理論的研究

(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。特に、スイッチ I 領域のスレオニン(Thr35)とスイッチ II 領域のグリシン(Gly60)は保存された残基であり、GTP 結合時にはそれぞれマグネシウムイオンと γ リン酸と配位している。現在までの研究で、我々は加水分解反応によるこれらの配位の変化が

スイッチ領域の構造変化を引き起こしていることを示した。Ras のスイッチ領域での変異は、配位の変化やスイッチ領域全体の構造変化を引き起こし、加水分解反応能を低下させることが知られている。本研究では、スイッチ領域の変化がどのように構造や反応に影響を与えるかを調べた。特に変異体 G60A, A59G において分子動力学法(MD)計算を行い、野生体との構造や揺らぎの違いについて議論を行った。

Ras の加水分解反応では、Ras 自身の加水分解反応能は低いため、GTPase-activating protein (GAP)とよばれるタンパク質の結合が必要であることが知られている。GAP の結合と加水分解後の解離は Ras の加水分解過程において非常に重要な過程である。Targeted MD や Steered MD を用いた GAP の結合、解離過程の解析も併せて行った。

[計算手法]

結晶構造解析より得られた構造 (野生体、G60A、A59G、GAP 結合体) 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、GAP 結合体は加水分解の反応前 (GAP-GTP 型) と反応後(GAP-GDP+Pi 型)の物を用意した。GAP-GDP+Pi 型の MD 計算の初期構造は GAP-GTP 型の構造よりモデリングを行い求めた。野生

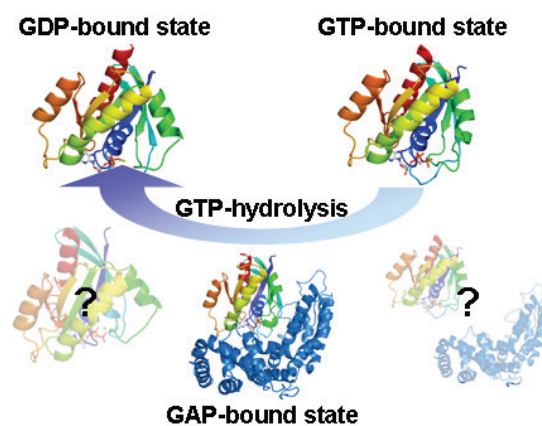


図 1 : Ras の反応と各状態

体での GTP 結合型と GDP 結合型でのトラジェクトリに対して、スイッチ領域とその周辺領域の 53 残基の C α 原子座標と側鎖の水素原子を除く平均座標の主成分解析 (PCA) をそれぞれ行い、主鎖、側鎖の構造変化を調べた。分子動力学計算には AMBER を使い、全原子モデル (parm03)による計算を行った。

【結果】

GTP 結合型と GDP 結合型との違いを解析するため、二つの状態でのトラジェクトリを用い、スイッチ領域とその周辺領域の C α 原子の座標での PCA を行った。第 1 主成分(PC1)の寄与率は 75.5%である。図 2 (a) より、スイッチ I 領域の loop2 とスイッチ領域の loop4 と $\alpha 2$ helix において大きな変異が見られた。GDP 結合型では Thr35 側鎖と Mg $^{2+}$ との配位が存在しないため、loop2 と $\beta 2$ strand との境界領域(Thr35 周辺)の構造が変化する。またスイッチ II に関しては、 γ リン酸と Gly60 との水素結合の有無により loop4 の構造が変化し、その結果、ループ領域に隣接する $\alpha 2$ helix の構造も変化する。また、側鎖の構造変化についても側鎖の座標での PCA を行った。図 2 (b) で見られるように、側鎖の構造も主鎖と同様に loop2、loop4 と $\alpha 2$ helix において大きく変化する。ここから、スイッチ領域の配位の変化が主鎖のみでなく側鎖の構造も大きく変化させていることを明らかにした。

次に変異体 G60A,A59T の構造変化について解析を行った。これらの変異体では、先ほど述べた重要な配位である Thr35 側鎖と Mg $^{2+}$ との配位と γ リン酸と Gly60 との水素結合において変化が見られた。A59G では γ リン酸と Gly60 との水素結合が非常に弱い。また、G60A では γ リン酸と Gly60 との水素結合、Thr35 側鎖と Mg $^{2+}$ の配位の両方とも存在しない。次に変異体でのトラジェクトリを PC1 で張られる空間へ射影した。(図 2 (c)) 二つの変異体 A59G、G60A は GTP 結合型と GDP 結合型の中間的な構造を取ることが明らかとなった。これらの変異体の中間的な構造は段階的に配位が変化することに対応している。また、GAP 結合下の二つの構造 (GAP-GTP 結合型、GAP-GDP+Pi 結合型) では構造に大きな違いが見られなかった。つまり、GTP 結合型から GDP 結合型への構造変化は GAP や Pi の解離に伴う変化であることを示している。GAP の結合、解離過程の解析などの詳細は当日発表する。

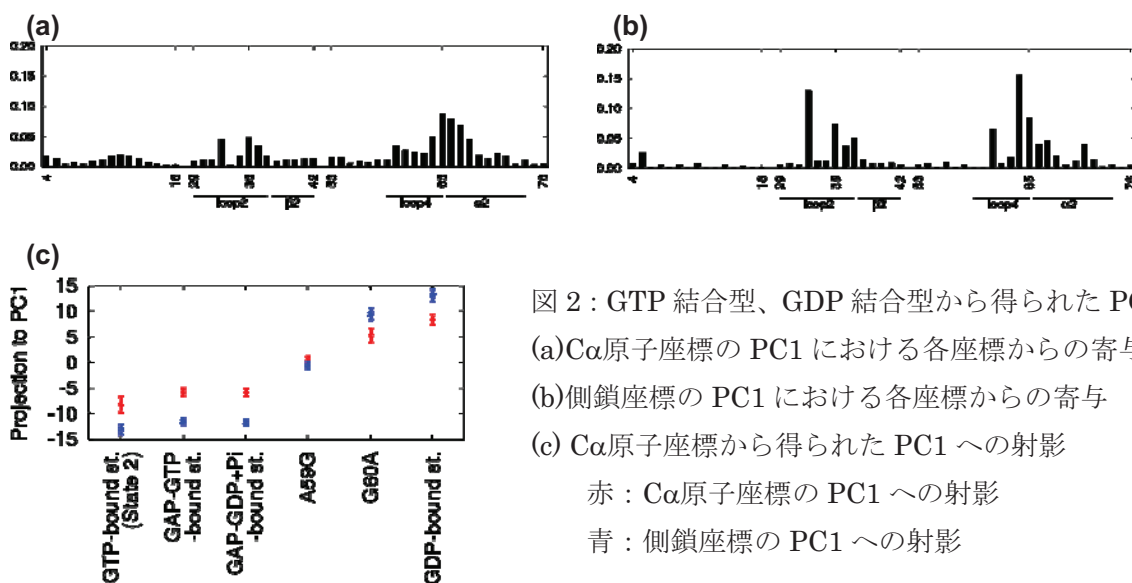


図 2 : GTP 結合型、GDP 結合型から得られた PCA
 (a) C α 原子座標の PC1 における各座標からの寄与
 (b) 側鎖座標の PC1 における各座標からの寄与
 (c) C α 原子座標から得られた PC1 への射影
 赤 : C α 原子座標の PC1 への射影
 青 : 側鎖座標の PC1 への射影