

令和元年6月11日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04780

研究課題名(和文)細胞膜との相互作用によって制御される細胞内シグナル伝達の分子メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of signal transduction regulated by the interactions to cell membrane

研究代表者

木寺 詔紀 (Kidera, Akinori)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00186280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が細胞外からの信号を受容する過程でなにが起きているのかを実時間の原子レベルで明らかにすることを目的として、シミュレーションによる研究を行った。信号受容の代表例として、MAPKパスウェイの初期段階、SOS(グアニンヌクレオチド交換因子)がGDP型Ras(低分子GTP結合タンパク質)を結合することで、GDPを解離する過程を研究対象とした。シミュレーションの結果から、もうひとつのRasのアロステリックサイトへの結合によってSOSのRemドメインがCdc25ドメインに対して動くことで、Cdc25の一部がRasのGDP結合部位を押し開き、GDPが解離することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

計算機の中に作り出した細胞環境を模擬した系の中で、刺激に対する応答として起こる一連の出来事のシミュレーションは、その結果の観察から実験ではとらえることができない実像としての生体分子が実時間で動く有様をとらえることができる。ここで得られた結果は、細胞における信号伝達の理解を物質のことばで解釈することを可能とし、さらには分子の振る舞いに対する細胞環境の役割を明らかにすることで、分子から細胞へと展開していくシミュレーションを用いた研究の方向を示すものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanism of the signal transduction at the atomic level during the real time course is the problem to be solved in this study. We used the techniques of the molecular simulation. As the target system of the study is the guanine nucleotide exchange reaction occurring in Ras bound to SOS. Long molecular dynamics simulations of the SOS-Ras complex clarified that the key trigger to the domain motions in SOS is the binding of another Ras to the allosteric site located between the Rem domain and the Cdc25 domain in SOS. The resultant domain motions cause the significant motion of the helical hairpin near catalytic Ras, which in turn open up the switch 1 of Ras to release the bound GDP molecule. The relay of the motions is the molecular mechanism of the reaction, i.e., binding of allosteric Ras domain motion of SOS motion of helical hairpin motion of switch 1 of Ras the release of GDP.

研究分野：計算生物学

キーワード：タンパク質 シグナル伝達 分子シミュレーション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達の初期過程は細胞膜直下で起こる。MAPK シグナリングパスウェイでは、細胞質側へのシグナルの受容がグアニンヌクレオチド交換因子 SOS に伝えられることで、SOS が細胞膜上にリクルートされる。細胞膜上での脂質分子との結合は、SOS を自己阻害 (Rem/Cdc25 ドメイン間にあるアロステリックサイトへの Ras の結合阻害型) の 3 ドメイン (HF、DH、PH) の配置から、Ras 結合が可能な配置に変化させる効果を持つ。そしてアロステリックサイトへの GTP 型 Ras の結合は、Cdc25 ドメインにある catalytic site への GDP 型の Ras 結合をアロステリックに促進することで、ヌクレオチド交換反応 (GDP→GTP) を触媒し、GTP 型となった Ras がさらに下流へシグナルを伝達する。

この背景の中で課題として出てくることは、第一に SOS が受容体の信号受容に伴って、adapter タンパク質を介して受容体に結合することによって活性化される機構があげられる。活性化は、大規模なドメイン再配置によって DH ドメインが Rem ドメインから解離し、それによって Rem ドメインと Cdc25 ドメインの間にもうひとつの Ras が結合できる allosteric site が形成されることによって起こる。第二の課題は、この構造変化が Cdc25 ドメインにある catalytic site を形成している helical hairpin の構造変化を誘起し、その結果そこに結合した Ras の switch 1 を押し開ける動作につながり、GDP を解離する過程にある。これらふたつの課題を合理的に説明しなければならない。

2. 研究の目的

細胞膜直下で生起する細胞内シグナル伝達の初期過程に起こるタンパク質間相互作用を分子シミュレーションによって研究する。対象は、細胞膜直下で起こる Ras 二分子と SOS との相互作用である。本研究では、第一に、SOS の Rem/Cdc25 ドメイン間に結合する Ras が SOS をアロステリック制御するばかりでなく、SOS の N 末端 3 ドメイン (HF、DH、PH) の広範囲でダイナミックな構造ゆらぎが SOS をアロステリックに制御していることを検証することで、SOS の活性化の機構を探ることである。第二に、allosteric Ras の結合が、どのように catalytic Ras の GDP を解離させるかという機構を明らかにすることである。同時に、Ras の GDP と GTP の結合のあり方の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

基本的に分子動力学計算を用いてシミュレーションを行うことで、以下の 3 つの問題について研究を行った。

- (1) 水中の Ras 非結合型の非活性型 SOS (HF、DH、PH、Rem、Cdc25 ; PDB : 3ksy) の運動のシミュレーション。ここでは、野生型と Noonan syndrome を引き起こす R552G (活性型への変位が容易になって過剰な応答をもたらす置換) の比較を行った。
- (2) 水中での Ras 結合型 (catalytic site と allosteric site) の活性型 SOS (Rem、Cdc25 ; PDB : 1nvv) において、allosteric Ras の GTP 結合型と GDP 結合型 (GTP 結合型が GDP 結合型に比べて大きな交換活性を持つ) の比較をシミュレーションによって行った。
- (3) 水中の Ras の weighted ensemble simulation と replica exchange umbrella sampling を行い、GDP 結合型と GTP 結合型の switch 1 開閉について比較を行った。

4. 研究成果

- (1) 非活性型 SOS (HF、DH、PH、Rem、Cdc25) に及ぼす R552G の影響

SOS の活性化は、図 1 の非活性型構造において DH と Rem と間が離れ、Ras が結合できる allosteric site を形成することによって起こる。その鍵となる部分が、helical linker であり、HF、DH、PH、を接続する役割を持っている。その中でも重要な相互作用を持っているものが R552 であり、helical linker と HF を接続する位置にある。この残基の glycine への変異は、Noonan syndrome (常染色体優性遺伝性疾患) を引き起こす原因の一つとして知られている。R552G は SOS の活性化を促進するといわれている。そこで、野生型と R552G の分子動力学計算を行い、活性化の機構を調べる試みをした。

野生型と R552G の水中での分子動力学計算の結果を図 2 に Motion Tree として表示する。Motion Tree は剛体的に動く部分を類似した部分として認識する構造

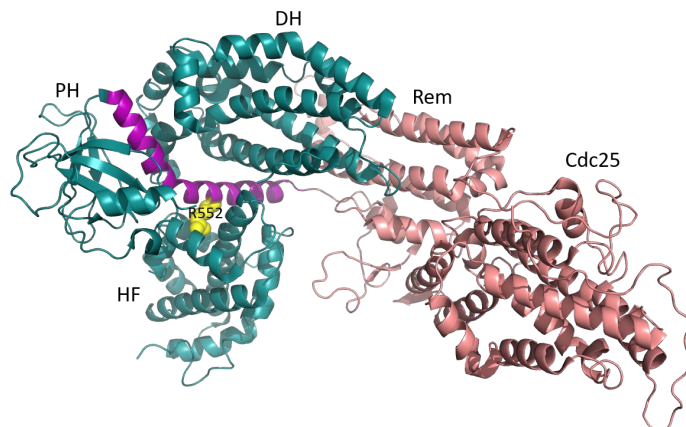


図 1 非活性型 SOS (HF、DH、PH、Rem、Cdc25 ; PDB : 3ksy)。R552(yellow sphere)は helical linker (violet) にあり、HF、DH、PH を接続する位置にある。

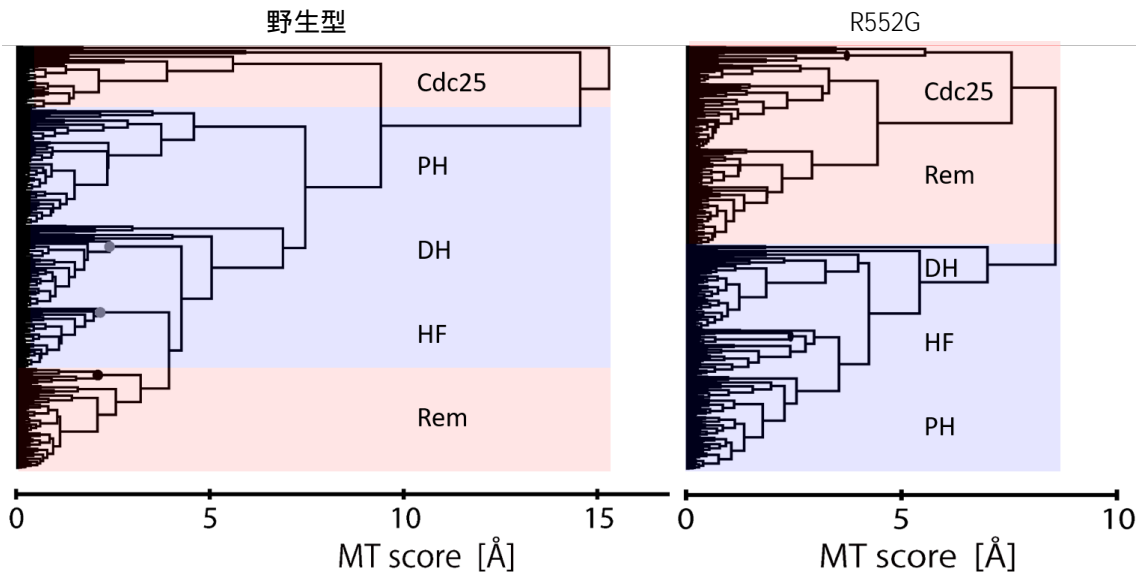


図2 二つのシミュレーション結果を Motion Tree として表示した。

ダイナミクスの表示方法であり、どの部分がどこと協調して運動しているかを示すものである。これらの結果から、helical linker で安定化されている野生型では、HF、DH、PH、Rem ドメインがひとつのかたまりとして運動し、Cdc25 のみが独立して運動していることが分かる。これは、非活性型の特徴である DH ドメインと Rem ドメインが強い相互作用で結合されており、非活性構造が安定化されていることによって起こるものと思われる。それに対して、helical linker の相互作用を弱めた R552G では、HF、DH、PH がひとつの剛体として振る舞い、DH と Rem の間の相互作用が弱まり、Rem は Cdc25 とともに動いていることが示された。これは、helical linker の相互作用が弱まることで活性型 (DH と Rem の間の開裂) が引き起こされることを示している。野生型で helical linker の動きを弱めるような SOS-膜間相互作用が存在することが示唆される。

(2) Ras-SOS(Rem, Cdc25)間相互作用のダイナミクスへの影響

活性型 SOS (図3) では、図2に示したように Rem、Cdc25 がひとつのかたまりとして振る舞うため、HF、DH、PH ドメインはここではあらわには扱わない。ここでは、Cdc25 に guanine exchange を行う catalytic Ras が、Rem には制御因子としての allosteric Ras (GTP 結合型) が結合している。ここで helical hairpin と呼ばれる Cdc25 の一部である helix- β turn-helix が、catalytic Ras の switch 1 (guanine 結合部位である loop と core の間) に挟み込まれていることが見て取れるだろう。その立体構造において allosteric Ras の制御によって Rem の運動が誘起されそれが helical hairpin を動かすことで、さらに switch 1 を開くものと考えられている。そこでまず、この活性型の構造の分子動力学計算を行った。その結果を図4に示す。

これから分かることは Cdc25 の一部である helical hairpin は、Rem と協調して動き、allosteric Ras の制御下にあることを見て取ることができる。

さらに、実験結果から allosteric Ras は GTP 結合型で最も catalytic Ras の交換活性が大きく GDP 結合型では活性は抑制的であることが示されている。このことを理解するために、Ras の guanine 結合状態の異なった4つの系のシミュレーションを行った。すなわち、noRas/noRas (apo 状態)、RasGDP/NoRas、RasGTP/noRas、RasGTP/RasFree (allosteric/catalytic) である。その結果を図5に示した。まず、allosteric Ras が結合することによって、helical hairpin の動きが Ras の switch 1 の開閉方向に限定されて動くようになる (Fig.5(a))。次に、allosteric Ras が GDP 型から GTP 型に変わることによって、より Ras の switch 1 を広げる方向に helical hairpin が動くことが分かった (Fig.5(b))。これは、allosteric RasGTP が高い活性を持つという実験結果と整合するものである。

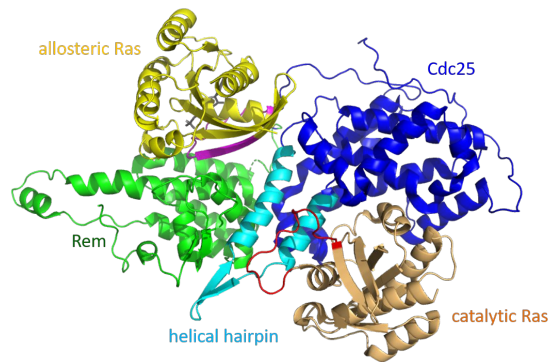


図3 活性型 SOS (Rem, Cdc25 ; PDB : 1nvv)。helical hairpin は配列上は Cdc25 の一部としてある。Allosteric Ras は GTP 結合型であり、switch 1 (magenta) は閉じているが、Catalytic Ras は apo 状態で switch 1 (red) は開いている。

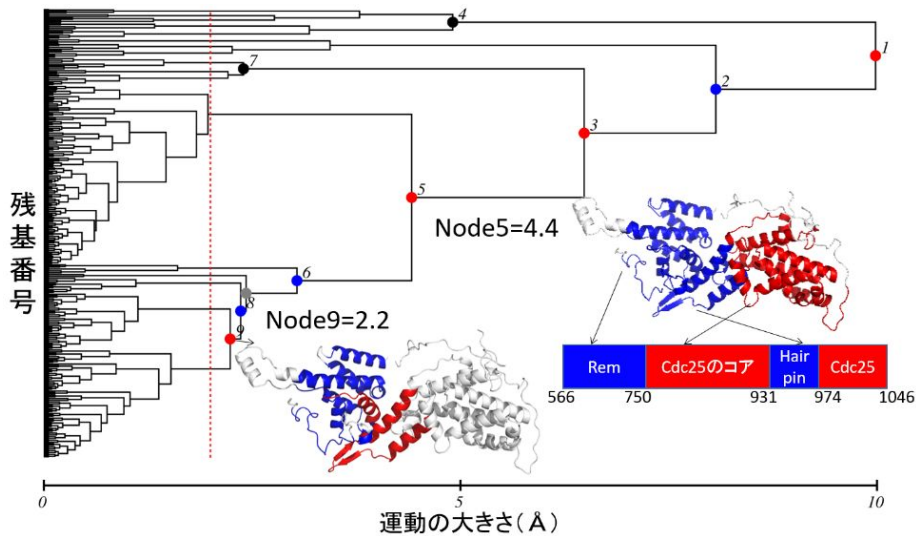


図 4 活性型 SOS + 2Ras の分子動力学計算の結果を Motion Tree で表現した。

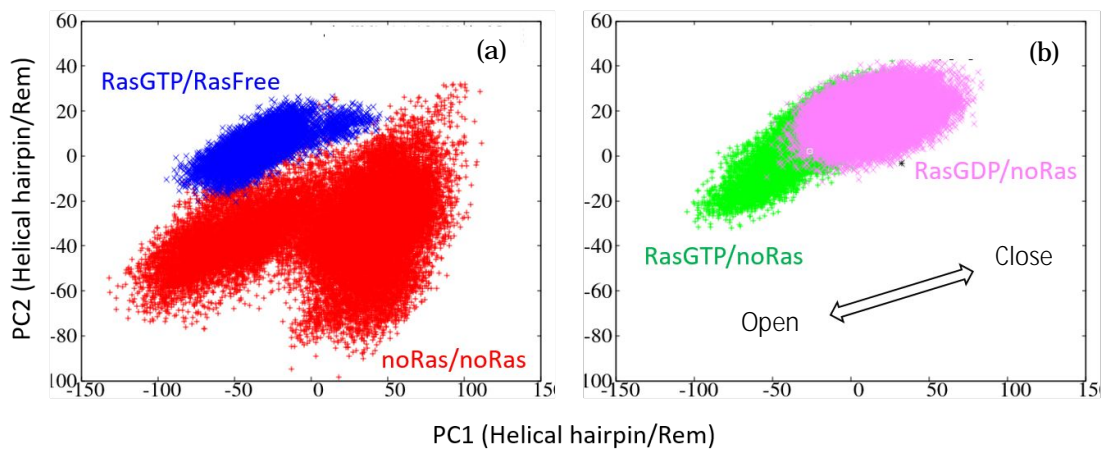


図 5 活性型 SOS の Ras の状態が異なる分子動力学計算によって得られた helical hairpin の構造分布をその主成分 PC1-PC2 上で示した。(a) allosteric site への RasGTP の結合によって起こる変化。(b) allosteric site の Ras に結合する guanine の種類の違いによって起こる変化。open↔close の印は、helical hairpin が Ras の switch 1 をより開く、閉じる方向を示している。

これらの結果は、allosteric RasGTP の結合 → SOS のドメイン運動 → helical hairpin の運動 → Ras switch 1 の運動 → GDP の解離、という過程でグアニンヌクレオチド交換反応が起こることを示している。

(3) Ras switch 1 の開閉運動の GTP 型と GDP 型との違い

上に示したシナリオは、Ras switch 1 が GDP 型では開きやすく、GDP の解離後に高濃度にある GTP が結合し、switch 1 が閉じるとともに RasGTP が解離するという仮定にたつものであった。従って、GDP 型で開状態が GTP 型よりも安定であることが必要である。そのことを確認するために、二つのグアニン結合状態で、switch 1 の開閉運動の動力学と熱力学による解析を行った。前者は、weighted ensemble 法を用い、後者は replica exchange umbrella sampling 法を用いた。結果を表 1 と図 6 に示す。これらの結果から、明瞭に GDP 型で開状態が GTP 型よりも安定であり、そこへ至る障壁も低い（より速やかに開状態に至る）ことが示された。以上のことから、(2)で想定されたシナリオは十分に確からしいものであることが分かった。

表 1 weighted ensemble 計算から求めた閉状態 開状態の速度定数

| | k at 300 K [μs^{-1}] | MFPT [μs] | A [kcal/mol] |
|---------|-------------------------------------|------------------------|----------------|
| Ras-GDP | 4.2×10^{-2} | 22.6 | 9.1 |
| Ras-GTP | 4.0×10^{-3} | 249 | 13.1 |

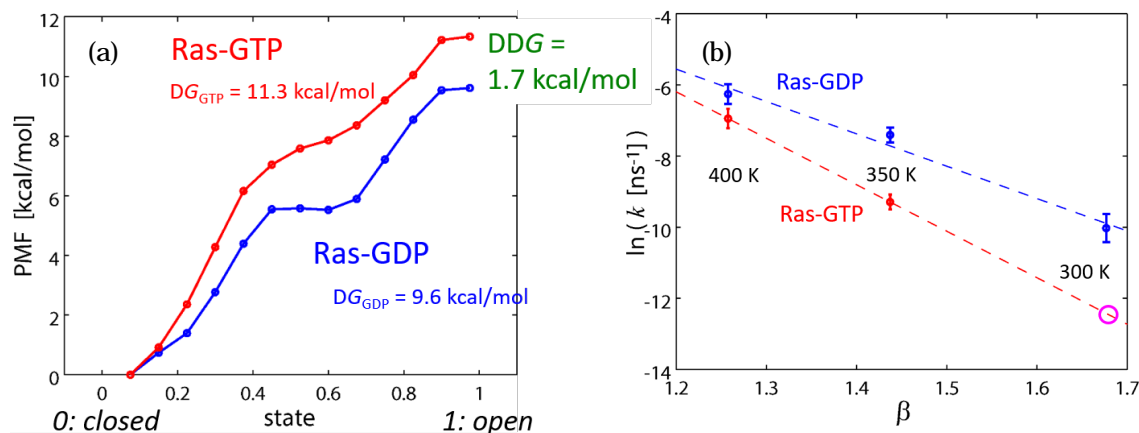


図6 weighted ensemble 計算の結果。Ras switch 1 の閉状態 → 開状態の速度の温度依存性。GTP at 300K の値は、開く速度が遅すぎ計算を行うことができなかったので外挿で推定した。それらの速度定数は表 1 にまとめた。(b) replica exchange umbrella sampling による熱力学定数の計算。閉状態から効状態に至る自由エネルギーを見積もった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera. Multiscale enhanced sampling for protein systems: An extension via adiabatic separation. *Chem. Phys. Lett.* 661, 279-283 (2016).
- K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera. Free energy landscape of protein-ligand interactions coupled with protein structural changes. *J. Phys. Chem. B* 121, 731-740 (2017).
- Y. Matsunaga, T. Yamane, T. Terada, K. Moritsugu, H. Fujisaki, S. Murakami, M. Ikeguchi, and A. Kidera. Energetics and conformational pathways of functional rotation in the multidrug transporter AcrB. *ELife* 7, e31715 1-19 (2018).
- K. Moritsugu, T. Terada, H. Kokubo, S. Endo, T. Tanaka, and A. Kidera. Multiscale enhanced sampling of glucokinase: Regulation of the enzymatic reaction via a large scale domain motion. *J. Chem. Phys.* 149, 072314 1-12 (2018).
- K. Moritsugu, H. Nishi, K. Inariyama, M. Kobayashi, and A. Kidera. Dynamic recognition and linkage specificity in K63 di-ubiquitin and TAB2 NZF domain complex. *Scientific Reports*, 8, 16478 1-13 (2018).

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森次圭

ローマ字氏名：Moritsugu, Kei

研究協力者氏名：黄博

ローマ字氏名：Huang, Bo