

X線小角散乱による三つのドメインからなるシグナル伝達蛋白質 Grb2 の溶液構造

湯沢 聡

科学技術振興事業団 戦略的基礎研究推進事業
北海道大学大学院 薬学研究科 構造生物学分野

Solution structure of signaling protein Grb2 composed of three domains by Small Angle X-ray Scattering

Satoru YUZAWA

CREST, Japan Science and Technology Corporation

Department of Structural Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

1. はじめに

X線小角散乱(Small Angle X-ray Scattering: SAXS)は溶液中における分子の挙動を調べる手段として広く用いられている測定方法である。SAXSからはX線結晶構造解析やNMRによる構造解析のように原子レベルの構造情報を得ることはできないが、分子量、慣性半径(R_g)や距離分布といった構造情報が得られるという特徴をもつ[1-2]。蛋白質の場合得られた散乱データをフーリエ変換することで得られる距離分布 $P(r)$ は、近似的に炭素、窒素と酸素等の原子間の距離分布に対応する。この距離分布 $P(r)$ は分子の幾何学的な形状に依存しているため、分子の形状やコンフォメーションの変化に鋭敏である。本稿では溶液中における Grb2 のドメインの配置に関して SAXS により観察した結果について報告する[3]。

細胞内シグナル伝達を担う蛋白質には、機能構成単位であるドメインが複数タンデムにつながったマルチドメイン構造をもつものが多くみられる。Grb2 もそのような複数のドメイン構造を持つマルチドメイン蛋白質であり、N末端側から SH3、SH2、SH3 という三つのドメインからなる。SH2 や SH3 は細胞のシグナル伝達を担う蛋白質に広く見られ、機能的、構造的構成単位である[4]。

細胞質内で Grb2 は SH3 を介して Ras のグアニンヌクレオチド交換因子である Sos の C 末端側およそ 200 残基に存在するプロリンに富む領域と恒常的に結合している。増殖因子受容体が活性化され、

受容体内あるいは基質蛋白質に含まれるチロシン残基がリン酸化されると、このリン酸化チロシン残基に Grb2 は SH2 を介して結合する。その結果、Sos は細胞質から細胞膜直下へ移動することになり、細胞膜に結合している Ras との相互作用が可能になる。この結果、不活性な GDP 型の Ras は活性型の GTP 型へ変換する。活性化した Ras が一連の蛋白質リン酸化酵素によるリン酸化カスケードを活性化することで、細胞外からの情報を下流へと伝える。この点で、Grb2 は増殖因子から Ras へのシグナル伝達を仲介するアダプター蛋白質と考えられている[5]。

2. 大きさと形状

高エネルギー加速器研究機構放射光施設の BL-10C に設置されている酵素回折計を用いて SAXS の測定を行った[6-7]。全長蛋白質である Grb2(1-217)、切り出してきたドメイン単独 n SH3(1-57)、SH2(58-159)、c SH3(159-217)について散乱データを収集した (Fig. 1)。

最初に得られた散乱データのギニエ解析を行い、分子量と慣性半径(R_g)を見積もった。Fig. 2 に一例として Grb2 のギニエプロットを示した。散乱強度 $I(0)$ より分子量を見積もったところ、これらの蛋白質はアミノ酸配列から計算して求めた分子量と一致した。蛋白質の濃度依存性はなく非特異的な会合のない単量体として溶液中で存在していた。

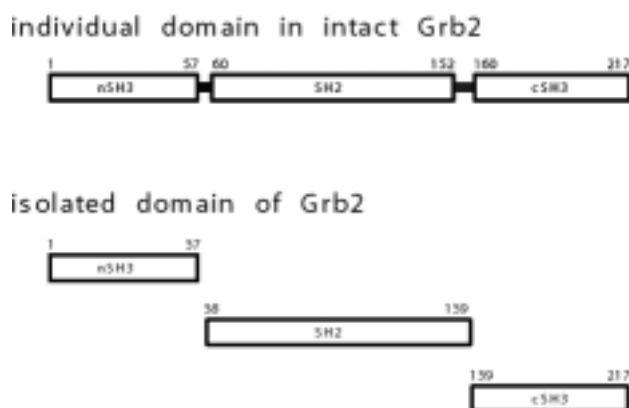


Figure 1.
Definition of the individual domain in intact Grb2, the nSH3 (1-57), SH2 (60-152) and cSH3 (160-217) domain (upper panel). The definition of the isolated domains, the nSH3 (1-57), SH2 (58-159) and cSH3 (159-217) domain (lower panel).

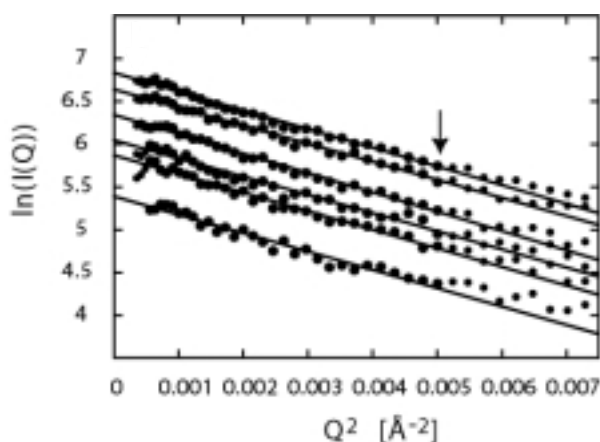


Figure 2.
Guinier region of the X-ray scattering curves for intact Grb2. The data with larger filled circles were used to determine the $I(0)$ and R_g values. SAXS data for Grb2 solution at 15.6, 13.0, 9.5, 7.0, 5.8 and 3.6 mg/ml are shown from top to bottom. The arrow shows the position of the $R_gQ = 1.8$.

次に、散乱データをフーリエ変換することで得られる距離分布 $P(r)$ を求めた。リゾチームやミオグロビンのような典型的な球状蛋白質では単一ピークからなる距離分布をとることが知られている。三つのドメイン nSH3、SH2 と cSH3 は、単一ピークからなりそれぞれ 15、20 と 15 付近にピークトップを持つ距離分布を示したことから、典型的な球状蛋白質であると考えることができる。これに対し Grb2 の距離分布は 20 付近と 40 付近に二つのピークがあり、裾は 80 までの広がりをもっていた [Fig. 3]。さらに、既に報告されている Grb2 の X 線結晶構造、nSH3、SH2 と cSH3 の NMR 構造 [8-11]

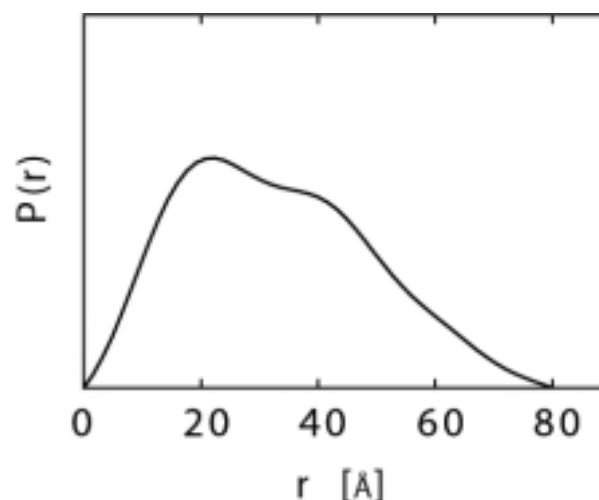


Figure 3.
The distance distribution, $P(r)$, of Grb2 calculated from X-ray scattering using indirect Fourier transform method. The X-ray scattering data were extrapolated to infinity dilution for Grb2.

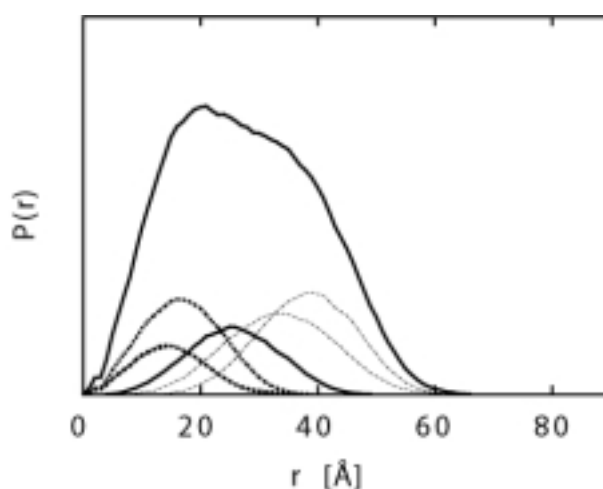


Figure 4.
Distance distribution function, $P(r)$, calculated from the crystal structure of Grb2. In each distribution function, the contribution from intra and inter domains were calculated. Intra-domain; nSH3 (dash line), SH2 (dash line) and cSH3 (dash line), inter domain; nSH3-SH2 (thin dash line), nSH3-cSH3 (thin dash line) and SH2-cSH3 (continuous line).

に基づいて距離分布を計算した。これらの距離分布は、近似的に炭素、窒素と酸素等の原子間距離の分布として求めた。それぞれの蛋白質について散乱データより求めた距離分布と座標より計算した距離分布を比較した。三つのドメイン単独(nSH3、SH2 と cSH3)での距離分布の形状は典型的な球状蛋白質の距離分布を示し、高分解能の構造から計算された距離分布と同様な結果が得られた。一方、Grb2

については二つの形状の間には大きな違いが見いだされた (Fig. 3-4)。結晶構造より計算した重原子間の距離分布は 25 を中心にブロードなピークが一つあり、裾の広がりはせいぜい 60 程度である。SAXS により得られた Grb2 の距離分布は、結晶構造より計算した距離分布とは明らかに異なっていた。また、NMR による解析により溶液中でも結晶構造と同様に Grb2 は三つのドメインの構造が保持されていることが明らかとなっている[3]。このことから Grb2 は溶液中では結晶構造とは異なるドメインの配置をもつと考えられる。

3 . Grb2 の三つのドメインの配置

この結果を解釈するために、結晶構造の座標[8]にもとづいて簡単なシミュレーション計算を行った。この計算では、nSH3、SH2 および cSH3 はドメイン構造を保っている事、ドメインを結ぶリンカーは柔軟に動けるといふ二つの仮定を設けた。NMR の実験からドメイン構造が保たれていることとリンカー領域が運動性に富む構造をもつことが示されており、以上の仮定は妥当であると考えられる[3]。

このような条件のもとで、合計 750 個の Grb2 の構造を simulated annealing 計算により生成し、溶液構造のモデルとした。このうちランダムに選んだ 20 個の構造と結晶構造を Fig. 5 に示した。溶液中で Grb2 は SH2 に対して二つの SH3 が互いに異なる相対配置をとるアンサンプルとして存在しているというモデルである。溶液構造のモデルである 750 個の構造の分布を、ドメインの配置を特徴付ける角度 と分子の広がりを表す慣性半径 R_g で表現した (Fig. 6)。ここで、ドメイン間の重心を結ぶベクトルのうち、SH2-nSH3 と SH2-cSH3 との為す角度を と定義する。角度 は 30° から 160° 、慣性半径 R_g は 20 から 30 の範囲に分布した。結晶構造は Fig. 6 で左下に矢印で示している。

シミュレーション計算によって得られた個々の構造から距離分布を計算し、それらの平均距離分布 (Fig. 7) をもとめた。これと実験より得た距離分布 (Fig. 3) がよく一致することから、今回得た溶液構造のモデルの妥当性が支持される。

結晶構造より得られた距離分布と溶液構造のモデルから計算した平均距離分布の差異を検討するために、結晶構造と溶液構造のモデルに基づいてドメイン内およびドメイン間の距離分布を比較した (Fig 4,7)。nSH3、SH2、cSH3 各ドメイン内の距離

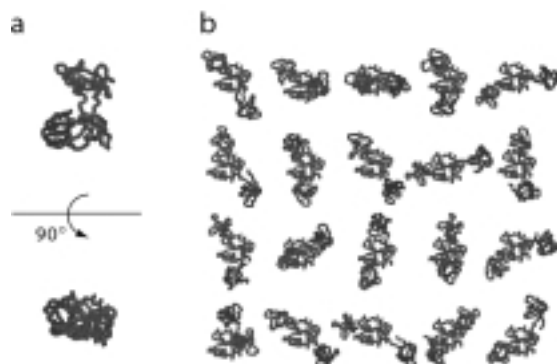


Figure 5 Structures of Grb2 in crystal and in solution. The left Panel shows the side and top views of the crystal structure (a). The right panel shows 20 top view structures of Grb2 randomly selected from the solution model (b). The orientation of the SH2 domain is the same for all the structures so that the relative position and orientation of the nSH3 and cSH3 domains can be identified.

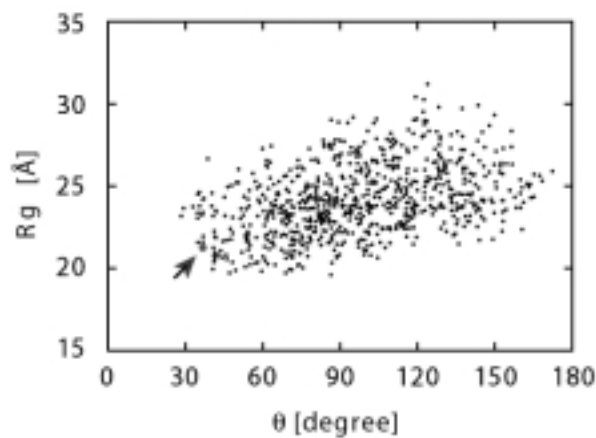


Figure 6. The distribution of 750 solution structures model in (θ , R_g) conformational space obtained from the simulated annealing calculations, where θ is an angle formed by the vectors connecting the center of gravity from SH2 to SH3 domains and R_g indicate the radius of gyration of each solution structure. The arrow shows the location of the crystal structure.

分布と、リンカーでつながれた nSH3 と SH2 ドメイン間の距離分布は、結晶構造の場合も溶液構造モデルの場合も大きな違いはなかった。これに対して、SH2 と cSH3 および cSH3 と nSH3 の間の距離分布は、結晶構造と溶液構造モデルとの間に顕著な違いが見られた。特に cSH3-nSH3 間の距離分布は、結晶構造の距離分布に比べ広がると共に、ピークトップは 25 から 46 へと移動した。nSH3 と cSH3 ドメインの間の距離分布は、溶液構造のモデルでは

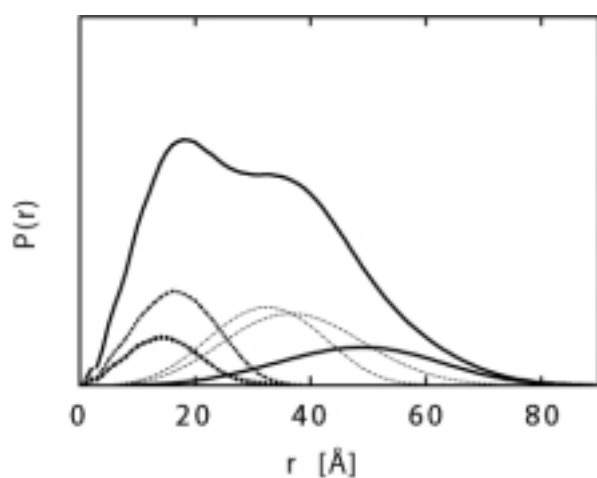


Figure 7.
Distance Distribution function, $P(r)$, calculated from the average of the 750 solution structures. In each distribution function, the contribution from intra and inter domains were calculated. Intra-domain; nSH3 (dash line), SH2 (dash line) and cSH3 (dash line), inter domain; nSH3-SH2 (thin dash line), nSH3-cSH3 (thin dash line) and SH2-cSH3(continuous line).

75 まで広がっているのに対し、結晶構造では 45 程度しかない。実験より得られた距離分布 (Fig.3) と溶液構造のモデルから求めた距離分布 (Fig. 7) の比較から、nSH3 と cSH3 ドメイン相互が様々な配置を取ることで Grb2 全長の場合には 80 まで広がった距離分布をもつと解釈できた。

4 . 溶液構造と機能

SAXS の解析より溶液中で Grb2 は二つの SH3 が互いに異なる相対配置を取る柔軟な構造をもつことが示唆された (Fig. 5)。

Grb2 は様々な標的蛋白質に含まれるプロリンに富む配列に二つの SH3 を介して二価で結合することが知られている[1-2]。Grb2 は、二つの SH3 の相対配置を変えることにより、標的配列に二価で効率的に結合することが可能となるのであろう。実際、Grb2 の二つの SH3 に二価で結合できるペプチドをデザインしその親和性を調べたところ二価で結合することができ[13]、さらに様々な長さのリンカーに対して高い親和性で結合できることが示された[3]。このことから、Grb2 は溶液中で柔軟な構造をもつこと、SH3 ドメインの相対的な配置を変化させることで効果的に標的に二価で結合することができることが示唆された。

一般にシグナル伝達蛋白質はドメインとそれらを結ぶリンカーから構成されている。溶液中でドメイン構造を保ったままリンカー部分は柔軟な構造

を取り、その結果ドメイン間の相対配置を変えることができる。このことはシグナル伝達蛋白質の機能と密接な関係があると考えられる。

5 . おわりに

マルチドメイン蛋白質ではドメイン間の相互作用様式と相対的な配置を変化させることでシグナル伝達の制御を行うと考えられている。このような現象はドメインリアレンジメントと呼ばれ、シグナル伝達蛋白質の制御機構の一般的な機構である可能性が高い。たとえば、活性化状態と不活性化状態の間でドメイン間の相対的な配置が変化し、シグナル伝達蛋白質の酵素活性が活性化すること、特定のドメインの結合活性が向上するということが示唆されている。いくつかの蛋白質では不活性化状態での X 線結晶構造解析の例が報告されているが、不活性型から活性型へ変化するとき起こる構造的な基盤は、現在までのところ十分に理解されていない。SAXS はドメインの配置が大きく変化した場合その変化を鋭敏に検出できる方法である。SAXS はこのような蛋白質における活性状態・不活性化状態の違いとドメインの相対的な位置関係を明らかにする有効な方法である。

謝辞

ここで紹介した研究については、北海道大学大学院 稲垣冬彦教授の指導の元に行われたものであり、奈良先端科学技術大学院大学 片岡幹雄教授、東京都臨床医学総合研究所 (現・理化学研究所 ゲノム科学総合研究センター) 畠中秀樹博士及び科学技術振興事業団 横地政志氏との共同研究である。X 線小角散乱の測定は高エネルギー加速器研究機構 放射光研究施設の共同利用実験課題番号 97G-129 により行われた。

引用文献

- [1] Small Angle Scattering of X-rays. Guinier, A., and Fournet, G., John Wiley and Sons Inc., London (1955).
- [2] Small Angle X-ray Scattering. Glatter, O. and Kratky, O., Academic Press Inc., London (1982).
- [3] Yuzawa, S., Yokochi, M., Hatanaka, H., Ogura, K., Kataoka, M., Miura, K., Mandiyan, V., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (2001). Solution structure of Grb2 reveals extensive flexibility of the adaptor protein necessary for recognition

- and function. *J. Mol. Biol.* **306**, 527-537.
- [4] Protein Modules in Signal Transduction edited by Anthony J. Pawson. Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1998).
- [5] Hunter, T. (2000). Signaling-2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- [6] Kataoka, M., Head, J.F, Seaton, B.A., and Engelman, D.M. (1989). Melittin binding causes a large calcium-dependent conformational change in calmodulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6944-6948.
- [7] Ueki, T., Hiragi, Y., Kataoka, M., Inoko, Y., Amemiya, Y., Izumi, Y., Tagawa, H., and Muroga, Y. (1985). Aggregation of bovine serum albumin upon cleavage of its disulfide bonds, studied by time-resolved small-angle X-ray scattering technique. *Biophys. Chem.* **23**, 115-124.
- [8] Maignan, S., Guilloteau, J-P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J., and Ducruix, A. (1995). Crystal structure of the Mammalian Grb2 Adapter. *Science* **268**, 291-293.
- [9] Terasawa, H., Kohda, D., Hatanaka, H., Tsuchiya, S., Ogura, K., Nagata, K., Ishii, S., Mandiyan, V., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (1994). Structure of the N-terminal SH3 domain of GRB2 complexed with a peptide from the guanine nucleotide releasing factor Sos. *Nature Struct. Biol.* **1**, 891-897.
- [10] Ogura, K., Tsuchiya, S., Terasawa, H., Yuzawa, S., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (1999). Solution structure of the SH2 domain of Grb2 complexed with the Shc-derived phosphotyrosine-containing peptide. *J. Mol. Biol.* **289**, 439-445.
- [11] Kohda, D., Terasawa, H., Ichikawa, S., Ogura, K., Hatanaka, H., Mandiyan, V., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Inagaki, F. (1994). Solution structure and ligand-binding site of the carboxy-terminal SH3 domain of Grb2. *Structure* **2**, 1029-1040.
- [12] Buday, L. (1999). Membrane-trageting of signalling molecules by SH2/SH3 domain - containing dataptor proteins. *Biochemi, Biophys, Acta.* **1422**, 187-204.
- [13] Cussac, D., Vidal, M., Leprince, C., Liu, W.,

Cornille, F., Tiraboschi, G., Roques, B.P., and Garbay, C. (1999). A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB. J.* **13**, 31-39.

著者紹介

湯沢聡 Satoru YUZAWA

科学技術振興事業団 戦略の基礎研究推進事業
研究員

北海道大学大学院薬学研究科 構造生物学分野

〒060-0812 北海道札幌市北区北 12 条西 6 丁目

TEL : 011-706-3976

FAX : 011-706-4979

e-mail : yuzawa@pharm.hokudai.ac.jp

略歴 : 2000 年学習院大学大学院自然科学研究科化学専攻博士後期課程単位取得退学。理学博士