

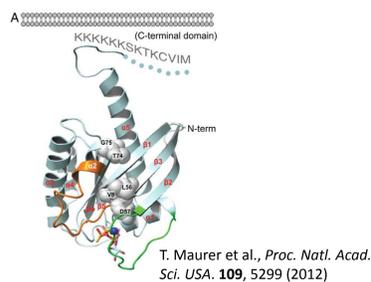
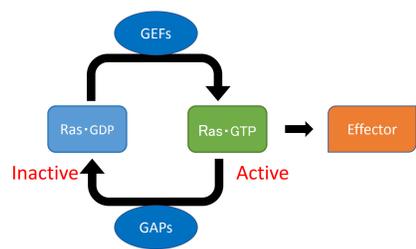
Rasタンパク質多量体形成機構の X線小角散乱による解析



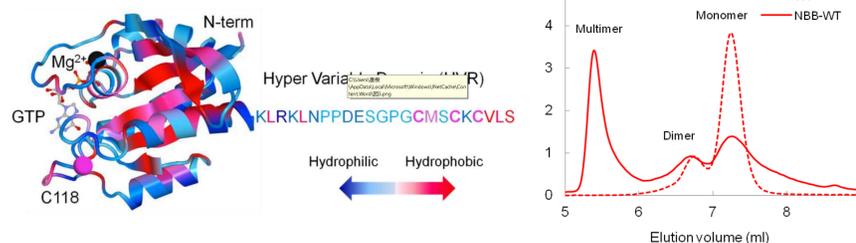
橋本貴志¹、高橋由芽²、岩田聖悟^{1,3}、上田剛慈⁴、丸田晋策⁵、○杉本泰伸⁶

¹ 創価大学工学研究科、² 名古屋大学工学部、³ 理化学研究所脳科学総合研究センター、
⁴ 株式会社エナジーフロント、⁵ 創価大学理工学部、⁶ 名古屋大学シンクロトン光研究センター

背景・経緯



タンパク質の多くは多量体を形成することによって生理機能の制御を可能にしている。低分子量Gタンパク質H-Rasは、Hypervariable region (HVR) にある3つのCysが脂質修飾を受け、細胞膜に結合する膜タンパク質である。細胞膜に結合し、クラスターを形成したRasは二量体を形成すると考えられている。我々は、チオール反応性官能基を持つケージド化合物である2-Nitrobenzyl bromide (NBB)をH-Ras WTのCysに修飾することで、多量体形成が起きることを高速サイズ排除クロマトグラフィー(SEC-HPLC)で確認した。さらにこの多量体NBB-Rasに対して紫外線照射(366 nm)または紫光照射(400 nm)することによってNBBを解離させ、多量体NBB-Rasが単量体Rasに分離することを確認した。



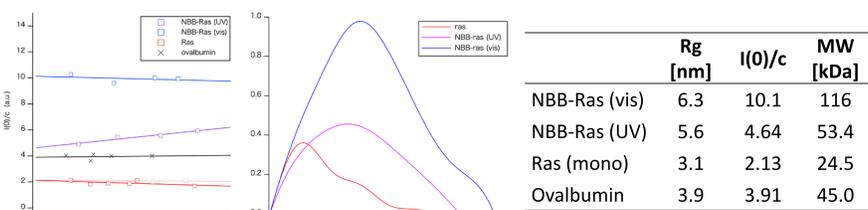
低分子量Gタンパク質RasはGTP結合タンパク質であり、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどを制御する広範な情報伝達系経路の分岐点に位置し、時間的・空間的に情報伝達の経路選択を担う膜タンパク質である。GTPaseであるRasは、非常に高いグアニンヌクレオチドへの親和性を持つが、一方でGTPase活性が非常に低いという特徴を持つ。RasのGTP加水分解サイクルは、調節因子であるグアニンヌクレオチド交換因子(GDP/GTP exchange factors: GEFs)の働きによってGDPとGTPが交換されることでエフェクターと相互作用できる活性状態(Ras-GTP state2)になり、生理活性を発揮するようになる。また、GTPase活性化タンパク質(GTPase activating proteins: GAPs)の働きによってGTPの加水分解が促進されることで不活性状態になる。

実験・結果

Rasタンパク質の多量体形成のメカニズムを解明するためにX線小角散乱測定を行い、多量体NBB-RasおよびDACM-Rasの分子量と構造の解析の測定を行った。多量体形成とその光応答性ナノデバイスを用いた光刺激による制御の構造学的知見を得ることを目的とする。

1 NBB-Rasの小角散乱

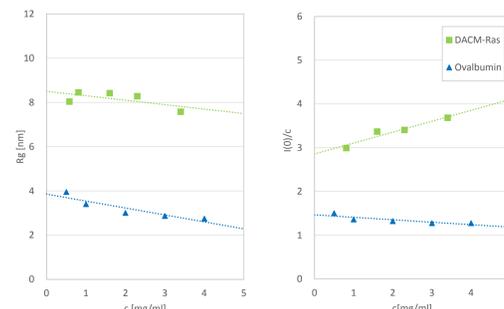
SEC-HPLCにより多量体形成が予想されたNBB-Rasの構造の詳細を調べるためにX線小角散乱測定を行った。さらに、光反応性物質の光応答によりタンパク質多量体の構造変化を調べるために、可視光(vis)および紫外光(UV)を照射したタンパク質溶液でのX線小角散乱測定を行った。



X線小角散乱実験はあいちSRのビームラインBL8S3を利用し、カメラ長2.2m、波長1.5Åの条件で行った。NBB修飾したRas、および単体のH-Rasと標準試料のovalbuminで散乱強度を測定し、ギニエプロットから慣性半径、分子量を求め、p(r)関数を計算した。結果からNBB-Rasが5量体を形成していることが示唆された。また紫外光の照射により多量体が分離することが示された。多量体からの分離は完全な単量体になるものではなく、見かけの分子量は単量体のおよそ2倍程度であった。

2 DACM-Rasの小角散乱

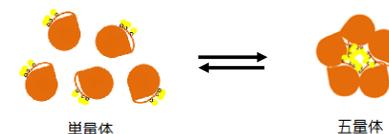
蛍光プローブDACMをH-RasのHVRのCysに修飾すると、NBBと同様に多量体を形成することが分かった。RasのHVR領域が多量体化の相互作用領域であることが示唆されているので、蛍光プローブDACMにより多量体化した構造でも、NBBの多量体と同じ構造を示している可能性が考えられる。このことを示すために、DACMにより化学修飾したH-RasのX線小角散乱測定を行った。



小角散乱により求められた慣性半径、分子量を右表に示した。DACM-Rasは、NBB-Rasと同様に5量体に相当する分子量を示す予想とは異なり、単体の3-4倍の分子量であった。これは溶液中で単量体と多量体分子が平衡で存在するためであると推察される。また分子架橋実験からも、DACM-RasとNBB-Rasでは多量体構造が異なる可能性が示唆された。

X線小角散乱実験はあいちSRのビームラインBL8S3で行った。DACM-Rasと標準試料であるovalbuminに対して、カメラ長2.2m、波長1.5Å、測定温度25°C、露光時間30秒×6-10回という条件で測定した散乱強度のギニエプロットから、慣性半径と原点散乱強度を求めた。

	Rg [nm]	I(0)/c	MW [kDa]
DACM-Ras	8.5	2.86	85.8
Ovalbumin	3.9	1.47	45.0



期待される効果・社会的インパクト

低分子量Gタンパク質Rasは、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどを制御する情報伝達の経路選択を担うタンパク質である。細胞内でのRasの情報伝達反応に重要であるとされている構造変化と多量体形成について、Rasのフォトリソミック分子やケージド化合物といった光反応性ナノデバイスによる化学修飾と光刺激に関する研究の結果、多量体形成の人工的な光制御の可能性が示された。Rasの5量体の構造およびNBB-RasとDACM-Rasの差異については、さらに研究を進める必要がある。

この研究により細胞内の情報伝達に関する知見と、さらにこうした生体機能を外部刺激により人工的に制御できる有用性が期待される。

