



## 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

杉本泰伸<sup>1</sup>、橋本貴志<sup>2</sup>、高橋由芽<sup>3</sup>、岩田聖悟<sup>2,4</sup>、上田剛慈<sup>5</sup>、丸田晋策<sup>6</sup>

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

### 1. 測定実施日

2016年12月20日 10時 – 18時30分 (2シフト) , BL8S3  
2016年12月21日 10時 – 18時30分 (2シフト) , BL8S3

### 2. 概要

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 の化学修飾をフォトクロ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、あるいは蛍光プローブによって行った。これらの化学修飾した Ras タンパク質への光刺激の影響に関する研究を行い、その多量体の存在が X線小角散乱により示された。

### 3. 背景と研究目的

細胞内において情報伝達の経路選択を担うタンパク質である Ras は、分子量 ~20 kDa の比較的小さなタンパク質であり、その情報伝達過程において GTP 加水分解反応と多量体構造の変化が重要であることが分かっている。Ras タンパク質のひとつである H-Ras は C 端に hypervariable region (HVR) と呼ばれる領域を持っており、HVR の脂質修飾は細胞内信号伝達に関与している。我々は、Ras タンパク質 HVR にあるシステイン残基を化学修飾することにより多量体が形成されるという現象を発見した。光応答性ナノデバイスによる Ras の化学修飾と光刺激に関する研究を行い、多量体形成の人工的な光制御の可能性を示した。本研究課題では、蛍光プローブおよび光応答性ナノデバイスを用いた光刺激による Ras の多量体形成の制御を行い、その構造的学知見を X線小角散乱法で得ることを目的とする。

#### 4. 実験内容

HVRにあるシステイン残基を化学修飾した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った。先行研究で一部X線小角散乱による構造解析を行っている多量体NBB-Rasは、ケージド化合物をHVRに導入したものであり、また、DACM-Rasは蛍光プローブを同領域に導入したものである。X線小角散乱によりこれらの分子量、慣性半径と構造の解析の測定を行い、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に関する構造学的知見を得た。測定はあいちシンクロトロン光センターのBL8S3を利用し、カメラ長2.2 m、波長1.5 Åの条件で行った。NBB修飾したRas、および単体のH-RasとDACM修飾したRas、また標準試料のovalbuminに対して散乱強度を測定し、ギニエプロットから慣性半径、分子量を求めた。測定温度は25 °Cとし、Pilatus 100K 検出器と溶液セルを用いたstaticな条件で露光時間30秒の測定を6-10回繰り返して加算した。

#### 5. 結果および考察

NBB-Rasの小角散乱ギニエプロットから原点散乱強度を求め、ovalbuminを標準とした相対値から分子量を求めた。その結果求めた分子量は、単体のRasに対しておよそ5倍となり、SEC-HPLCで予測された値と一致した。さらにNBB-Rasに対して紫外線照射を行ってNBBの光反応を刺激すると、この多量体の見かけの分子量はおよそ50%に減少した。すなわち、UV照射により5量体であったNBB-Rasのうち70%程度が単量体へとかい離していることが推定される。

蛍光プローブDACMにより多量体化したRasでは、SEC-HPLCの結果からはNBB-Rasの多量体と同じ構造を示していると推測される。測定した散乱強度に対して小角領域のギニエプロットを行い、各濃度において試料の慣性半径および原点散乱強度を求めた。得られた原点散乱強度 $I(0)$ の濃度依存性を調べ、オブアルブミンを標準とした相対値から分子量を求めた。小角散乱により求められた慣性半径、分子量からは、DACM-Rasが、NBB-Rasと同様に5量体に相当する分子量を示す推測とは異なり、単体の3-4倍の分子量をもつものであった。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。

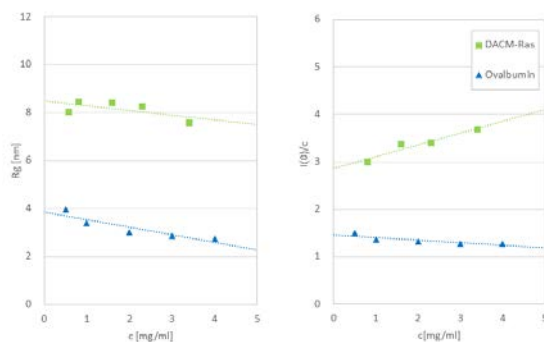


Fig.1 X線小角散乱により求めたDACM-Rasの慣性半径と原点散乱強度の濃度依存性を示した。

## 6. 今後の課題

NBB-Ras および DACM-Ras はともに Ras タンパク質の Hypervariable region を修飾する物質であり、SEC-HPLC により多量体を形成していることを示唆した。しかしながら X 線小角散乱では両者は異なる構造を持つ多量体である可能性が示された。今後はこれらの構造の差異を詳細に明らかにするため、広い Q レンジの X 線散乱の測定を行い、散乱強度からの三次元構造モデリングなどを通してその差異を検討する。Ras 単体の原子構造を利用した構造モデルにより、多量体形成における結合サイトの検討を行う。これらを通じて、NBB による光反応と Ras タンパク質の多量体形成のメカニズムや、さらにその制御機構を明らかにすることを目指していく。

## 7. 参考文献

Iwata, S. et al., *J. Biochem.* 159, 41-48, 2016.