



Ras タンパク質多量体化の構造解析と生理的機能との関係

杉本泰伸¹、山下真広²、橋本貴志²、丸田晋策²

¹ 名古屋大学、² 創価大学

キーワード : X線小角散乱, 細胞内情報伝達, Ras

1. 背景と研究目的

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。先行研究により Ras の C 末端領域をケージド化合物で化学修飾することで、タンパク質が多量体化することが見いだされた。さらにケージド化合物を紫外光刺激により遊離させると、多量体を形成した Ras が単量体へと解離することが SEC-HPLC により示唆された。本研究では、Ras 多量体の構造および光刺激による変化を X 線小角散乱法で解析することを目的とする。

2. 実験内容

H-Ras を大腸菌発現系により発現精製した。C 末端 HyperVariable Region にあるシステイン残基をケージド化合物 2-Nitrobenzyl Bromide (NBB) により修飾した。測定試料には、NBB 修飾しない単量体の Ras(monomer)、NBB 修飾した NBB-Ras(-UV) および紫外線を照射した NBB-Ras(+UV) の 3 種類を用いた。タンパク質濃度は 1-5 mg/mL とし、BL8S3 において溶液試料セルを用いた小角散乱実験を行った。カメラ長は~2200 mm、X 線波長 0.15 nm、検出器に Pilatus 100K を用いて露光時間 180 秒で測定した。散乱強度は溶媒散乱との差をとり、ギニエプロットを行って慣性半径、原点散乱強度を各濃度で求めた。

3. 結果および考察

初めに、His-tag 精製した H-Ras 試料の小角散乱測定を行った。この時、試料分子は凝集したものとなりギニエプロットを行っても正しい慣性半径、原点散乱強度を見積もることができなかつた。そこで試料調製プロトコルを見直し、精製の最後の段階にゲルろ過クロマトグラフィを行うようにした。この結果、分子会合の見られない散乱強度のギニエプロットを得ることができ、これを使って慣性半径および原点散乱強度の濃度依存性を調べた。I(0)/c から求められた分子量は、NBB-Ras(-UV) に対して NBB-Ras(+UV) は約 0.16 となった。散乱強度の考察から、紫外光の照射によって多量体の 80-90% 程度が解離していると予想された。散乱強度から p(r) 関数を求めたところ、NBB-Ras(+UV) の曲線には 2 つの極大が見られ、これらは Ras(monomer) に見られる 2.5 nm の極大および NBB-Ras(-UV) に見られる 8 nm の極大とおおよそ一致するものであった。紫外光照射による解離においては中間状態が多く存在するのではなく、SEC-HPLC より予想された 5 量体構造と単量体の平衡であることが予想された。このように、原点散乱強度および p(r) 関数の形状から紫外光照射による分子の解離の詳細が示された。

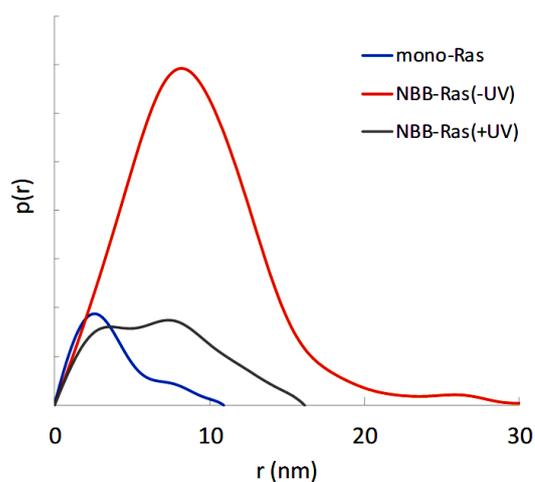


Fig.1 散乱強度から求めた p(r)関数の比較