



Ras タンパク質の X 線小角散乱

杉本泰伸¹, 森田大貴², 谷本悠³

1 名古屋大学シンクロトン光研究センター, 2 名古屋大学工学研究科, 2 名古屋大学工学部

キーワード：X 線小角散乱、

1. 背景と研究目的

Ras タンパク質は生体内においてシグナル伝達を担う分子スイッチである。スイッチを担う球状ドメインと、細胞膜への結合を担うアンカードメインで構成される。球状ドメインは、結合する 2 種類のヌクレオチド、GDP と GTP によって、構造変化しスイッチの ON/OFF を表す。シグナルを下流側へと伝達するために Ras は二量体化すると考えられており、この Ras の二量体化は、アンカードメインを用いて、膜上に局在化することで起こる。本研究ではアンカードメインを含む全長 Ras を、人工脂質二重膜 (リポソーム) 上に再構成させ、X 線小角散乱測定を用いて、溶液中のリポソーム膜上で Ras 二量体化の観察を目指した。

2. 実験内容

大腸菌発現系を用いて全長 Human H-Ras に His タグを追加して発現させる。His タグカラム、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。表面に Ni を提示するリポソームは、フォスファチジルコリンに 10% DGS-NTA(Ni)を加えて調製した。リポソームと Ras を混合することで表面に Ras を提示したリポソームを得た。

X 線小角散乱は BL8S3 を用い、カメラ長 2.2 m、波長 0.15 nm の条件で行った。溶液セルを用い、露光時間は 120 秒とした。二次元検出器 Pilatus100K を用いて得られた散乱パターンは一次元化してバックグラウンド散乱の引き算、ギニエプロット、 $p(r)$ 関数の計算などを行った。

3. 結果および考察

DGS-NTA(Ni)脂質を混合したリポソームと Ras タンパク質の散乱強度を測定した。また、DGS-NTA(Ni)脂質を含まないリポソーム、Ras 単体の溶液についても散乱強度の測定を行った。

リポソーム(-DGSNTA(Ni)) と Ras の混合溶液から得られた散乱強度から動径距離分布関数 $p(r)$ を求めた結果、分子最大長はおよそ 4 nm となり、これは単体の Ras と同様の $p(r)$ であった。リポソーム (+DGSNTA(Ni))と Ras の混合溶液からの散乱強度はより大きな慣性半径を持つ分子の存在を示し、 $p(r)$ 関数は分子最大長約 6 nm で二つのピークを持つプロファイルを示した。これは DGS-NTA(Ni)脂質によりリポソーム上に局在化した Ras が二量体を形成していることを示唆した。一方、DGS-NTA(Ni)脂質上にある Ras のヌクレオチドを GDP から GTP アナログに交換して小角散乱プロファイルを測定したが、今回の実験ではヌクレオチドの違いによる構造の差は測定できなかった。Figure1 に測定した散乱強度から求められた $p(r)$ 関数を示した。

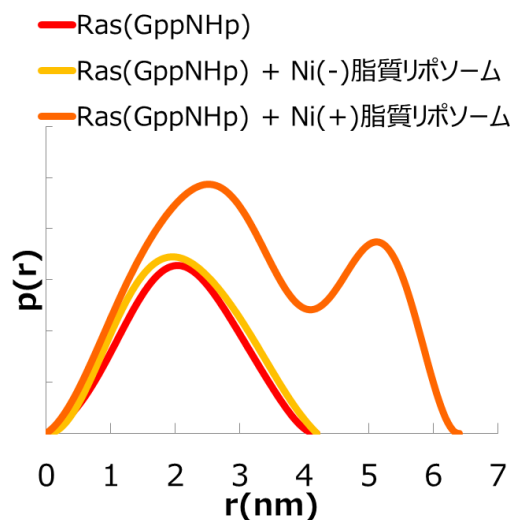


Figure 1. 溶液中及びリポソーム上に局在化させた Ras の $p(r)$ 関数。