



## Ras タンパク質の X 線小角散乱

杉本泰伸<sup>1,2</sup>, 森田大貴<sup>2</sup>, 谷本悠<sup>3</sup>

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, 3 名古屋大学工学部

キーワード : X 線小角散乱、G タンパク質

### 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 は二量体化あるいは多量体化すると考えられており、この Ras のクラスタ化は、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 のクラスタ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 を使い、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、ギニエプロットなどを行った。

### 3. 結果および考察

前回の実験 (実験番号 201904093) において、His タグと DGSNTA(Ni)を用いることで H-Ras をリポソーム上に局在化させて X 線小角散乱による測定が可能であることが示された。一方、ヌクレオチド交換による構造の差異は明確ではなかった。今回は溶液中での Ras の構造を正しく見積もるためにリポソームの含まれない系での測定を行った。Ras に GDP もしくは GTP アナログである GppNHp を結合させた溶液での散乱を測定した。Figure 1 に散乱強度を Kratky プロットしたものを示した。両者の差はほとんど見られなかったが、これは結晶構造解析からの知見では構造変化が活性部位に限られること、クラスタリングは膜上で生じること、と言った知見と矛盾しない。リポソーム上での構造を再度確認し、クラスタリングの詳細を検討する実験を継続する。

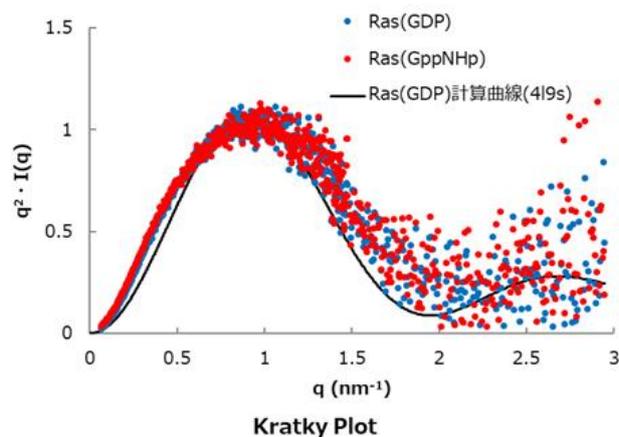


Figure 1 溶液中での H-Ras の散乱強度の Kratky プロット。