



Ras タンパク質の X 線小角散乱

杉本泰伸^{1,2}, 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, 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

リポソーム上に提示した Ras の散乱強度を測定し、Kratky プロットを行ったものを Figure 1 に示した。ヌクレオチド交換を行い、GTP 型の Ras の構造は GTP アナログである GppNHp と結合した Ras の散乱強度として得た。測定の結果、GDP-Ras、GTP-Ras とともに Kratky プロットにおけるピークが大きく二つ現れた。q ~ 1.0 nm⁻¹ 付近には共通したピークが観測でき、これはリポソーム上にアンカーされたものではない、溶液中の Ras の散乱強度におけるピーク位置と近い q 座標であった。一方、GDP-Ras、GTP-Ras とともに、より小角側に Kratky プロットにピークが見られたが、その位置は異なっていた。GTP-Ras におけるピーク位置は GDP-Ras に比べて大きく小角側に変化して観測された。これらのピークは脂質膜上での Ras のクラスタリングを観測していると考えられ、細胞内シグナル伝達において活性型となる GTP-Ras では膜上でより大きなクラスタリング、もしくは配向の違いが観測されたことが示唆される。

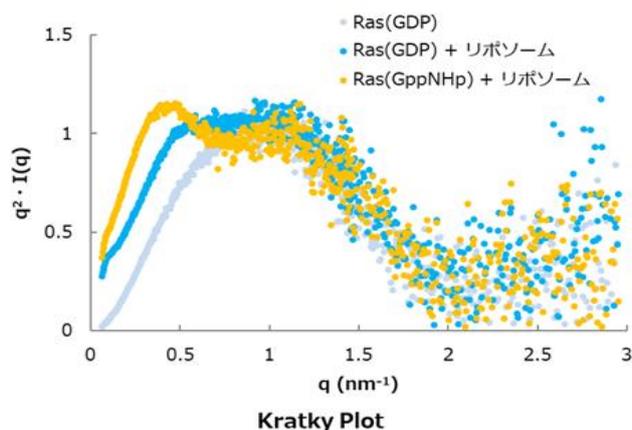


Figure 1 溶液中での H-Ras の散乱強度の Kratky プロット。