



ケージド化合物によるタンパク質多量体形成の制御

杉本泰伸¹、岩田聖悟²、丸田晋作²

1 名古屋大学シンクロトン光研究センター、2 創価大学大学院工学研究科

1. 背景と研究目的

Ras タンパク質は細胞の様々な現象に関わる、分子量~20 kDa の比較的小さなタンパク質である。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連する。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 [1]。ケージド化合物である 2-Nitrobenzyl bromide (NBB) を H-Ras の HVR システイン残基に導入すると、Ras は多量体を形成する。この NBB 化学修飾した Ras に対して 400 nm の光照射をすることにより NBB が解離し、それに伴い Ras の単量体への変化が生じる。これらのことがサイズ排除クロマトグラフィにより観測された。このような Ras タンパク質の多量体形成とその構造の詳細を調べるために、光反応性のケージド化合物を用いた Ras タンパク質溶液の X 線小角散乱実験を行った。

2. 実験内容

NBB 修飾された H-Ras を明条件においたもの (NBB-Ras(vis)) と 400 nm の紫外線照射をしたもの (NBB-Ras(UV)) を用意し、X 線小角散乱法 (SAXS) で測定を行った。SAXS 実験は小角散乱ビームライン BL8S3 において行い、カメラ長 2.2 m、X 線波長 1.5 Å、Pilatus100K 検出器と溶液セルを用いた条件で static な測定を行った。試料温度は 25 °C とし、2-8 mg/mL の濃度シリーズを溶媒とともに連続的に測定した。得られた散乱強度は入射強度で規格化し、ギニエプロットにより解析を行った。また、同時に標準試料として、H-Ras 単量体およびオブアルブミン溶液の SAXS 測定も同様の条件で行った。

3. 結果および考察

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。その結果求められた分子量は、単量体の Ras が 24.5 kDa であったのに対して、NBB-Ras(vis) は 117 kDa、NBB-Ras(UV) が 53.4 kDa であった。すなわち、NBB 修飾により Ras は 5 量体を形成することが示唆された。この結果はサイズ排除クロマトグラフィで予想された量と一致した。また、UV 照射により、5 量体であった NBB-Ras のうち 70% 程度が単量体へと解離していると予想された。慣性半径は NBB-Ras(vis)、NBB-Ras(UV) でそれぞれ 6.3 nm、5.6 nm であった。5 量体構造の詳細な解析は今後さらに進める必要がある。今回の結果から、NBB-Ras に相互作用による多量体化が外部からの光照射により制御できる可能性が示された。

4. 参考文献

1. S. Iwata et al., *Biophys. J.* 110, sup.1, 168a (2016)

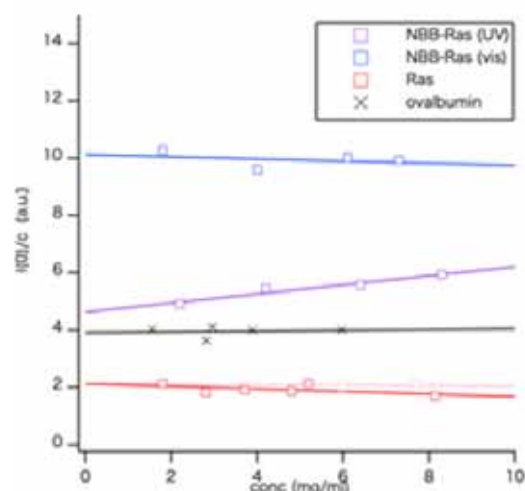


Figure 1 $I(0)/c$ の濃度依存性