



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, 森田大貴², 渡邊智基², 山下真広²

1 名古屋大学シンクロトン光研究センター, 2 名古屋大学工学部

キーワード : G タンパク質、Ras、X 線溶液散乱

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。NBB 修飾した Ras は紫外光照射により単量体へ解離することが示唆されている。測定試料を氷上で紫外光照射し続け、20 分ごとに試料セルへと注入して 140 分間の X 線小角散乱実験を行った。測定は BL8S3 においてカメラ長 2170 mm で行い、X 線波長 0.15 nm、露光時間 180 秒、検出器には Pilatus100K を用いた。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、原点散乱強度を各時間で求めた。

3. 結果および考察

X 線小角散乱の結果を時間経過で調べた結果、慣性半径の変化が Fig.1 で示されるようになり、多量体が解離する様子が観測できた。同様の変化は原点散乱強度でも示されたが、140 分後の I_0 は測定前と比較しておよそ 40% 程度の強度となり、5 量体と予測されている NBB-Ras は本実験の条件下ではすべて解離することはなかった。測定中の各散乱強度曲線から $p(r)$ 関数を計算することも行い、また、多量体及び単量体の条件での $p(r)$ 関数との比較も行った。紫外光照射による解離途中の $p(r)$ 関数を多量体および単量体の $p(r)$ 関数の和で表現できると仮定すると、比較的良好に説明できることが示された。この時の 2 つの $p(r)$ 関数の量比から、解離途中の分子の割合を見積もることができた。また、これらの解析ができたことで、NBB-Ras の紫外光による解離は、5 量体の分子が 1 個ずつ離れていくのではなく、一度に全部が解離して単量体になる変化であることが示唆された。

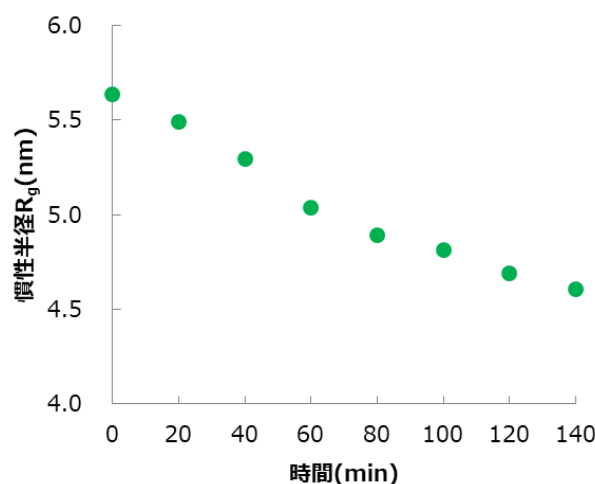


Fig. 1 NBB-Ras に紫外光を照射しながら慣性半径の変化を求めた。