

Title	1分子蛍光共鳴エネルギー移動法によるRasの動的構造ゆらぎ計測
Author(s)	新井, 由之
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46756
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	あら い よし ゆき 新 井 由 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 20447 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科システム人間系専攻
学位論文名	1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法による Ras の動的構造ゆらぎ計測
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 若林 克三 教授 山本 亘彦

論 文 内 容 の 要 旨

低分子量 G タンパク質 Ras は、細胞の増殖や分化・アポトーシスなどに重要な役割を果たしているシグナル伝達タンパク質である。細胞内においては、Ras は細胞膜上に存在しており、細胞外刺激に応じて GDP と結合した不活性型から GTP と結合した活性型へと交換される。活性型となった Ras は、Raf や RalGDS、PI3K など多様な標的タンパク質と相互作用することで、様々なシグナル伝達経路の選択に関与しているが、どのようにしてこれら多様な標的タンパク質を選択しているかは未解明である。近年の研究により、活性化状態の Ras はミリ秒から秒のオーダーの酵素反応の時間スケールでの構造遷移が報告されており、機能との密接な関連性が示唆されている。しかしながら、多分子の系による実験では、タンパク質のミリ秒から秒のオーダーでのゆっくりとした構造変化の計測は、多数の分子の平均値の中に埋もれてしまうために難しい。本研究では 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) による Ras タンパク質 1 分子の実時間での構造変化の計測を目的とした。

これまでの研究により、活性化状態の Ras において Switch I、Switch II 部位が大きく構造変化していることが報告されている。そこで、Ras の Switch II 部位にドナーとして Cy3 を、アクセプターとして Cy5-GTP を結合させた試料を作成し、プリズム型全反射蛍光顕微鏡により観察した。

その結果、Ras の構造変化を 1 分子レベルで、実時間で観察することに成功した。活性化状態の Ras は、秒というオーダーで、少なくとも二状態以上の構造遷移が観察された。また、標的タンパク質である Raf や RalGDS を加えたところ、一つの状態のみ観察された。これらの結果から、活性化状態の Ras には、標的タンパク質と結合できるオン状態と、オフ状態があることが示唆された。さらに、構造変化の時間変化を調べるために自己相関関数を求めたところ、オン状態の Ras の構造には 30 ミリ秒程度の緩和が観察された。一方、標的タンパク質と結合した状態での緩和時間は時間分解能以下となった。よって、標的タンパク質と結合した時の構造は、一つの状態に固定されることが示唆された。

以上の結果から、Ras は従来考えられていたような単純なオン・オフのスイッチではなく、複数の準安定状態をミリ秒から秒のオーダーで、熱ゆらぎにより遷移している柔軟なタンパク質であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

低分子量 G タンパク質の一つ Ras は、細胞の増殖や分化の促進に重要な役割を果たしている、代表的なシグナル伝達タンパク質である。Raf や RalGDS 等の多様な標的タンパク質と相互作用することで、様々なシグナル伝達経路を制御していることが知られている。しかし、Ras がどのようにしてこれら標的タンパク質を認識しているかは明らかにされていない。過去の研究から、Ras の構造がミリ秒から秒オーダーで揺らぐことが、標的タンパク質認識に重要であるとの示唆が得られているが直接観察には至っていない。そこで、本論文では Ras の構造変化を 1 分子蛍光共鳴エネルギー移動法 (FRET) を用いて実時間で計測に成功し、構造変化と機能の相関について明らかにした。

本論文では、Ras の構造で大きく揺らぐとされている Switch II 部位に特異的に標識するための変異体 Ras を作成し、ドナーとして Cy3 で標識した (Cy3-Ras)。また、アクセプターとして、Cy5-GTP (GDP) を新規に合成し、Cy3-Ras に結合させた。1 分子レベルで構造変化を検出するために全反射照明顕微鏡を開発した。Cy3-Ras・Cy5-GTP 複合体を FRET により実時間計測し、構造変化の指標である FRET 効率を計測したところ、標的タンパク質が結合していない場合、秒のオーダーで FRET 効率が高い状態と低い状態を遷移していることがわかった。一方、標的タンパク質である Raf や RalGDS を結合させた条件では、FRET 効率は高い状態、しかも平均して異なる FRET 効率で局在していることがわかった。さらに、FRET 効率の時間変動を調べるために自己相関関数を求めたところ、標的タンパク質が結合していない状態では相関時間は 30 ms 程度であったのに対し、標的タンパク質が結合した場合、その相関時間は時間分解能以下となった。これらの結果から、Ras は標的タンパク質と結合できる活性化状態と休止状態があり、その間を秒オーダーで遷移していることがわかった。さらに、活性化状態には複数の準安定状態があり、それぞれ標的タンパク質に対応するポテンシャルを持っていることがわかった。また、標的タンパク質が結合することでその構造が一意に決定されることがわかった。今回得られた Ras の構造と機能に関する知見はこれまで考えられてきたような GTP/GDP の結合状態による単なる on-off のスイッチではなく、複数の準安定状態を熟揺らぎ程度で自発的に遷移していることを本論文で初めて示した。

以上のように、Ras の既存のモデルを修正し、新しいモデルを提案できた本研究の成果が、Ras の分子メカニズム解明に大きく貢献していることは明らかである。したがって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。