

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25871145

研究課題名(和文) 構造的多型性を利用した、Rasの新規分子認識メカニズム

研究課題名(英文) The novel molecular recognition mechanism of Ras by its structural polymorphism

研究代表者

梅木 伸久(Nobuhisa, Umeki)

国立研究開発法人理化学研究所・佐甲細胞情報研究室・研究員

研究者番号：70647502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Ras-RaIGDS-Ral間のシグナル伝達メカニズムを明らかにするために、全長RaIGDSまたはその機能ドメイン(RBD・REMCDC)を細胞内に発現させ、これらの細胞膜移行ダイナミクス計測を行った。その結果、RBDがEGF刺激依存的なRaIGDS分子の膜移行頻度を上昇させるのに寄与している一方、REMCDCはRaIGDSの細胞膜上における滞在時間の決定に寄与している事が明らかとなった。このことは、Ras-RaIGDS間相互作用がRasとRaIGDSそれぞれの複数の領域によって調節されている事を示していた。またRasの構造多型性もRaIGDSとの相互作用に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of Ras-RaIGDS-Ral signaling, translocation dynamics of RaIGDS and its functional domains (RBD and REMCDC) to the plasma membranes of living cells were measured. Although the RBD played an important role in increasing the association rate constant between RaIGDS and the plasma membrane, the REMCDC domain affected the dissociation rate constant from the membrane, which decreased after Ras activation. Thus, multiple regions and domains of both Ras and RaIGDS work concertedly to regulate the Ras-RaIGDS-Ral signaling. It is also suggested that the structural polymorphism of Ras is involved in interaction of Ras and RaIGDS.

研究分野：生物物理学、生化学、細胞生物学

キーワード：Ras RaIGDS 1分子計測 細胞内情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

細胞運命決定（細胞増殖・分化・アポトーシス）には極めて重要ないくつかの細胞内情報処理伝達経路が存在し、細胞外からの刺激が正しく細胞内で伝達される事で個々の細胞が正しく機能する。低分子量 G タンパク質 Ras は、細胞増殖や分化を制御する経路である ERK 経路や Akt 経路の上流に位置し、細胞外からの刺激により活性化される。活性化した Ras は、その標的タンパク質である Raf キナーゼや RaIGDS などいくつかの標的タンパク質を時空間的に「適切に選択」し、下流へと情報を伝達する。つまり Ras はいわば交差点の信号機のような役割をしており、情報伝達の ON/OFF だけでなくその経路選択の役割も担っている。では Ras による経路選択はいったいどのようにして成し遂げられているのだろうか。多数あるタンパク質の中から正しい反応相手をどうやって見分けて相互作用できるのか、その分子認識メカニズムの全体像は未解明のままである。

これまでの先行研究により、Ras はいくつかの構造状態をとる事が明らかとなっている。ヌクレオチドである GDP が結合した Ras (GDP-Ras) は不活性型であり標的タンパク質と相互作用できないが、GTP が結合した Ras (GTP-Ras) は活性型であり、様々な標的タンパク質と相互作用して下流へと情報を伝達する事ができる。GDP-Ras と GTP-Ras の構造が異なる事は以前から知られていたが、横山らのグループは NMR 解析により、GTP-Ras にもさらにいくつかの構造状態（構造的多型性）がある事を示した (Yokoyama et al., 1997)。また新井らは、蛍光エネルギー移動法の原理を利用して、GTP-Ras の構造的多型性が標的タンパク質の結合により消失し、特定の構造に限定される事を示した (Arai et al., 2006)。これらの結果から、Ras の分子認識には構造的多型性が利用されているのではないかと考えられた。すなわち「活性型の Ras はいくつかの準安定的な構造を遷移しており、異なった構造の Ras は異なった標的タンパク質と結合し、それにより情報伝達経路の方向性が決定づけられているのではないか」というものである (図 1)。実際、異なる標的タンパク質が結合した GTP-Ras の構造は標的タンパク質の種類によって異なることが、X 線結晶構造解析や生化学的解析から明らかとなっている (Margarit et al., 2003) (Sondermann et al., 2004)。

## 2. 研究の目的

Ras とその標的タンパク質との相互作用解析を通じて、Ras の構造多型性の有無の再検証を行うとともに、Ras のシグナル伝達反応（分子認識反応）と構造多型性との関連性について調べる。

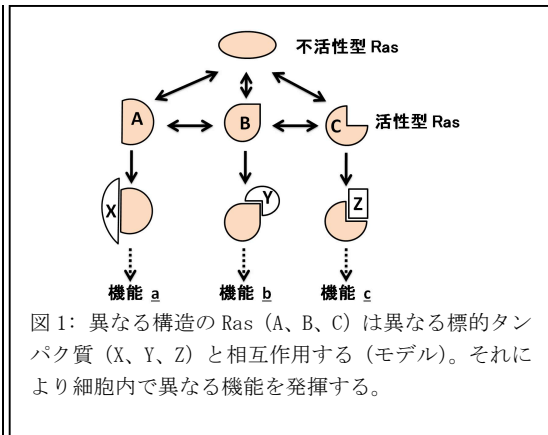


図 1: 異なる構造の Ras (A, B, C) は異なる標的タンパク質 (X, Y, Z) と相互作用する (モデル)。それにより細胞内で異なる機能を発揮する。

## 3. 研究の方法

溶液中あるいは細胞内の Ras は、構造的多型性により様々な構造状態をとっていると考えられる。したがって、これまでの多分子計測による平均的な動的解析からでは構造的多型性と分子認識との関連性を明らかにする事は難しい。そこで本研究では 1 分子計測技術を利用して、個々の Ras と標的タンパク質との相互作用を区別して観察する事とした。具体的には以下の 2 つの方法により、Ras とその代表的な標的タンパク質である RaIGDS 及び Raf キナーゼとの相互作用の解析を行った。

### 1) *in vitro* 再構成系を用いた Ras-RaIGDS 間相互作用の解析

大腸菌発現系によって調製した Ras を、His タグ抗体または PA タグ抗体を用いてガラス基板上に再構成した。一方、RaIGDS の Ras 結合ドメイン (RBD) あるいは Raf の Ras 結合ドメインを Halo-tag との融合タンパク質として調製し、それぞれ Alexa488 または tetramethylrhodamine (TMR) で蛍光標識した。蛍光標識したこれらの結合タンパク質をガラス基板の上の Ras に作用させ、Ras との相互作用を 1 分子蛍光観察が可能な全反射照明蛍光顕微鏡により観察した。

### 2) *in cell* における Ras-RaIGDS 間相互作用の解析

細胞内の Ras 結合タンパク質を可視化するために Halo-tag を付加した全長の RaIGDS またはその機能ドメイン (REMCDC、RBD) を細胞内に発現させた。それらを TMR で蛍光標識した後、全反射照明蛍光顕微鏡を用いて、EGF 刺激にともなう RaIGDS の細胞質から細胞膜への translocation dynamics と kinetics を計測した。この時 Ras と RaIGDS との相互作用を増幅するために、Ras の過剰発現 HeLa 細胞を用いた。

## 4. 研究成果

### 1) *in vitro* 再構成系を用いた Ras-RaIGDS 間相互作用の解析

GMPPNP (加水分解されない GTP のアナログ) が活性部位に取り込まれた活性型の Ras

を調製し、その Ras と RalGDS の RBD との相互作用を *in vitro* 再構成系を用いて 1 分子蛍光観察することに成功した。結合時間のヒストグラムを作成したところ、そのヒストグラムは 2 つの指数関数の和でフィッティングされることがわかった。この事は、Ras に対する RalGDS の解離反応には少なくとも二つの異なる様式がある事を示しており、Ras の構造多型性の存在が示唆された。また同様な現象は Ras-Raf キナーゼ (RBD) 間相互作用においても観察された。

当初の研究計画ではこのあと、Ras との相互作用における RalGDS の反応履歴を解析する予定であった。これは「異なる幾つかの Ras 結合タンパク質が同時に溶液中に存在していた時、Ras は一旦結合したタンパク質との相互作用を一定期間記憶することで、解離後も再び同種の結合タンパク質が結合しやすくなる」という仮説であったが、期待される様な現象は検出されなかった。そこで細胞内における Ras-RalGDS 間相互作用の解析を行い、Ras-Ral シグナル伝達反応における RalGDS の役割および Ras の構造多型性の寄与について検証を行う事とした。

## 2) *in cell* における Ras-RalGDS 間相互作用の解析

細胞膜上における RalGDS 分子を蛍光観察する事に成功し (図 2)、RalGDS はサブ秒~秒オーダーで細胞膜上の Ras との結合・解離を繰り返している事がわかった。また EGF 刺激後に RalGDS の膜上分子密度が増加する事もわかった (図 2)。RalGDS 分子の膜滞在時間のヒストグラムを作成したところ、二つの指数関数の和でフィッティングされた (図 3、青線)。この事から、細胞内における Ras-RalGDS 間相互作用にも二つの反応様式がある事が示唆された。続いて、RalGDS の Ras に対する結合速度時定数及び解離速度時定数を見積もった。その結果、EGF 刺激後に RalGDS の Ras に対する結合速度時定数の増加および解離速度時定数の減少がみられた。しかし Y64A 変異 Ras が過剰発現した細胞における RalGDS の解離速度時定数は、EGF 刺激前後と比較して変化しない事がわかった。一方 Ras の Y64A 変異は、RalGDS の EGF 刺激に伴う結合速度時定数の増加には影響を与えない事がわかった。

RalGDS の機能ドメインである REMCDC および RBD ドメインについても、それぞれの結合速度時定数および解離速度時定数を見積もった。また Ral 過剰発現細胞についても同様にそれらを見積もった結果、次のような事が明らかとなった。Ras の結合ドメインである RBD は RalGDS 分子の EGF 刺激依存的な膜移行頻度を上昇させる事 (結合速度時定数の増加) に寄与していた。一方、Ral の GEF ドメインである REMCDC は、RalGDS 分子の膜上における滞在時間の決定 (解離速度時定数の減少) に寄与していた。Ral の過剰発現によ

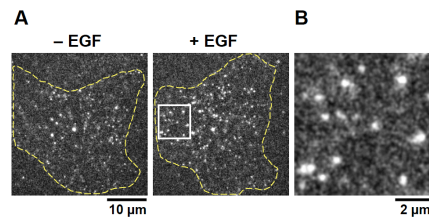


図 2: 蛍光標識した細胞膜上の RalGDS 分子。それぞれの輝点が RalGDS 分子を示す。A: EGF 刺激前後における細胞膜上の RalGDS の蛍光像。EGF 刺激後に細胞膜上における RalGDS の輝点数の増加が観察された。B: 図 A の白枠部分の拡大写真。

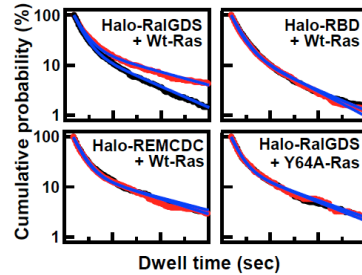


図 3: RalGDS 分子の細胞膜滞在時間 (Dwell time) のヒストグラム。EGF 刺激前および後の分布をそれぞれ黒色と赤色で示す。青線はそれら分布をフィットした曲線を示しており、この際のフィッティング式より RalGDS の解離速度時定数が算出できる。RalGDS は EGF 刺激後に滞在時間が伸びる (解離速度時定数の減少が起こる) 事がわかった (左上)。RBD (右上) と REMCDC (左下) の滞在時間分布は刺激により変化しないが、RBD は全長 RalGDS の刺激前の分布に等しく、また REMCDC は全長 RalGDS の刺激後の分布に等しかった。この事から、REMCDC が RalGDS 分子の膜上における滞在時間の決定に寄与している事が考えられた。また Y64A 変異 Ras 過剰発現細胞では、EGF 刺激に伴う滞在時間の増加はみられなかった。

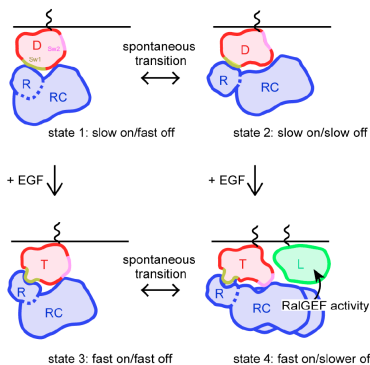


図 4: Ras-RalGDS-Ral のシグナル伝達反応モデル。細胞内の Ras は構造的な多型性により少なくとも二つの異なる構造をとっておりその間を遷移している。異なる構造の Ras に対する RalGDS の結合状態はそれぞれ異なる。EGF 刺激により Ras が活性化すると、Ras のスイッチ領域に構造変化が生じ、RalGDS の Ras に対する結合頻度の増加 (RBD と Sw1 が主に寄与) と解離時間の減少 (REMCDC と Sw2 および Ral が主に寄与) が起こる。D: GDP-Ras, R: RBD, RC: REMCDC, T: GTP-Ras, L: Ral, Sw1: Ras の Switch 1 領域, Sw2: Ras の Switch 2 領域。

り RalGDS の解離速度時定数がさらに減少するので、REMCDC と Ral との相互作用が RalGDS 分子の膜上滞在時間を増加させる（すなわち解離速度時定数を減少させる）主な原因である事が示唆された。

以上の結果から、Ras-RalGDS-Ral 間シグナル伝達反応における次のような反応モデルが考えられた（図 4）。EGF 刺激前の細胞では、RalGDS は細胞膜上の GDP-Ras と RBD および REMCDC の二つのドメインを介して二つの異なる結合様式で相互作用している。EGF 刺激によって細胞膜上の Ras が活性型の GTP-Ras へと変換されると、Ras のスイッチ 1 およびスイッチ 2 領域に構造変化が生じ、その結果 RBD ドメイン依存的な Ras との結合頻度の増加がもたらされる。これにより Ral と REMCDC ドメインとの相互作用が促進され、結果として RalGDS 分子の膜上滞在時間の増加が起こるものと考えられた。このとき、Ras の Tyr-64 が Ral の活性化に重要な RalGDS 分子の膜上滞在時間の増加に寄与している事がわかった。このように Ras-RalGDS 間相互作用が Ras と RalGDS それぞれの複数の領域によって調節されていることが明らかとなり、また Ras-RalGDS-Ral 間シグナル伝達反応に Ras の構造多型性が関与している可能性が本研究により示された。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1) Yoshizawa R, Umeki N (1<sup>st</sup> equal contribution and corresponding author), Yanagawa M, Murata M, Sako  
“Single-molecule fluorescence imaging of RalGDS on cell surfaces during signal transduction from Ras to Ral”  
Biophysics and Physicobiology (2017) in press 査読有

2) Ngo KX, Umeki N (1<sup>st</sup> equal contribution), Kijima ST, Koderu N, Ueno H, Umezumi NF, Nakajima J, Noguchi TQ, Nagasaki A, Tokuraku K, Uyeda TQ.  
“Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin”  
Scientific Reports (2016) article number #35449 査読有 DOI:10.1038/srep35449

3) Umeki N (corresponding author), Hirose K, Uyeda TQ  
“Cofilin-induced cooperative conformational changes of actin subunits revealed using cofilin-actin fusion

protein”  
Scientific Reports (2016) article number #20406 査読有 DOI:10.1038/srep20406

4) Iwata S, Masuhara K, Umeki N, Sako Y, Maruta S.

“Interactin of novel fluorescent GTP analogue with the small G-protein K-Ras”  
J. Biochem. 159, 41-48(2016) 査読有 DOI: 10.1093/jb/mvv071

5) Zhou U, Mao H, Joddar B, Umeki N, Sako Y, Wada K, Nishioka C, Takahashi E, Wang Y, Ito Y.

“The significance of membrane fluidity of feeder cell-derived substrates for maintenance of iPS cell stemness”  
Scientific Reports 5, article number #11386 (2015) 査読有 DOI:10.1038/srep11386

〔学会発表〕（計 8 件）

1) Yoshizawa R, Umeki N, Yanagawa M, Murata M, Sako Y

“Elucidation of the EGF dependent localization mechanism of RalGDS molecule to plasma membrane using TIRF microscopy”  
2016 年 11 月 26 日 第 54 回日本生物物理学会  
つくば国際会議場（つくば市・茨城県）

2) Iwata S, Hashimoto T, Umeki N, Sugimoto Y, Kondo K, Maruta S

“Photocontrol of small G-protein H-Ras multimer formation using caged compounds”  
2016 年 2 月 28 日 American bio-physics 59th annual meeting. Los Angeles, USA

3) 梅木伸久, 吉澤亮, 中村由樹, 稲葉岳彦, 前田亮, 柳川正隆, 佐甲靖志

“Ras-RalGDS 相互作用の 1 分子蛍光イメージング”  
2015 年 12 月 3 日 第 88 回日本生化学会年会 神戸ポートアイランド（神戸市・兵庫県）

4) 岩田聖悟, 橋本貴志, 梅木伸久, 近藤和典, 丸田晋策

“ケイジド化合物導入による低分子量 G タンパク質 H-Ras の多量体形成の光制御”  
2015 年 9 月 14 日 第 53 回日本生物物理学会年会 金沢大学（金沢市・石川県）

5) Masuhara K, Iwata S, Umeki N, Maruta S

“Photo-regulation of the interaction between ras and ralgds using GTP analogues composed of photochromic molecules”  
2015 年 2 月 11 日 American bio-physics

59th annual meeting. Baltimore, USA

6) Iwata S, Masuhara K, Umeki N, Kondo K, Maruta S

“Photo-regulation of small G protein normal and oncogenic K-ras using Photochromic molecules”

2015年2月11日 American bio-physics 59th annual meeting. Baltimore, USA

7) Iwata S, Masuhara K, Umeki N, Kondo K, Maruta S

“低分子量Gタンパク質K-rasのフォトクロミック分子を用いた光制御”

2014年9月26日 日本生物物理学会第52回年会 札幌コンベンションセンター（札幌市・北海道）

8) Yamada MD, Umeki N, Ikebe M Uyeda TQ

“アクチンフィラメントの違いによるミオシンIXbの運動制”

2014年9月26日 日本生物物理学会第52回年会  
札幌コンベンションセンター（札幌市・北海道）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ：

<http://www.riken.go.jp/cell-info/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅木 伸久 (Nobuhisa Umeki)

国立研究開発法人理化学研究所・

佐甲細胞情報研究室・研究員

研究者番号：70647502

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし