低分子量 G タンパク質 Ras の光スイッチ分子デバイスを利用した光制御

2024 年 3 月

氏　名　西部 伸幸

1 序論
1.1 はじめに
1.1.1 本研究の目的と意義
1.1.2 本論文の構成
1.2 生体分子機械
1.2.1 モータータンパク質
1.2.1.1 ミオシン
1.2.1.2 キネシン
1.2.2 G タンパク質
1.2.2.1 三量体 G タンパク質
1.2.2.2 低分子量 G タンパク質
1.2.2.3 Ras
1.3Ras 外部調節因子
1.3.1 グアニンヌクレオチド交換因子
1.3.2 GTP アーゼ活性化タンパク質
1.4 光応答性分子
1.4.1 フォトクロミック化合物
1.4.2 光応答性タンパク質
1.5 第一章総括
付表・付図

2 フォトクロミック分子修飾 Sos を用いた HRas GTPase 活性の光制御
2.1 本章の要旨
2.2 緒言
2.3 実験材料と試薬
2.3.1 試薬
2.3.2 Human H-Ras の調製
2.3.3 Human Sos1(564-1049)の調製
2.3.4 Cys-lite Human NF1(1195-1528)の調製
2.3.5 Human Sos 変異体の調製
2.3.6 GTPase サイクル活性測定
2.3.7 アゾベンゼン誘導体の光異性化測定
2.3.8 アゾベンゼン誘導体の修飾条件検討

2.3.8.1 Sos 変異体への PAM 修飾
2.3.8.2 Sos 変異体への CASAB 修飾
2.3.8.3 Sos 変異体への AABM 修飾
2.3.8.4 Sos 変異体への SABM 修飾
2.3.9 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた GTPase サイクル活性測定
2.3.10 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた GTPase サイクル活性測定
2.4 結果
2.4.1 Human HRas の発現・精製
2.4.2 Human NF1 の発現・精製
2.4.3 Human Sos の発現・精製
2.4.4 GTPase サイクル活性測定
2.4.5 Human Sos 変異体の発現・精製
2.4.6 アゾベンゼン誘導体の光異性化と Sos 変異体への修飾条件
2.4.7 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた HRas GTPase サイクル活性の光制御
2.4.7.1 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S732C 変異体
2.4.7.2 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S881C 変異体
2.4.7.3 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos K679C 変異体
2.5 考察
付表・付図

3 光応答性タンパク質融合 HRas による GTPase 活性の光可逆的制御
3.1 本章の要旨
3.2 緒言
3.3 実験材料と方法
3.3.1 試薬と機器
3.3.2 大腸菌発現系ベクターの構築
3.3.3 組換えタンパク質の精製
3.3.4 分光学的特性
3.3.5 SEC 測定
3.3.6 GEF、GAP 存在下での GTPase 活性測定
3.3.7 Basal GTPsae 活性測定
3.4 結果
3.4.1 光応答性蛋白質融合 Ras の設計
3.4.2 光応答性蛋白質の調製と分光学的特性

3.4.3 光異性化に伴う Ras-PZs の単量体-二量体形成
3.4.4 Ras GTPase 活性の光制御
3.5 考察
付表・付図

4 総括と展望
4.1 総括
4.2 展望

参考文献

略語

GAPs	GTPase activating proteins
GEFs	Guanine exchange factors
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDF	GDI displacement factor
GPCR	G protein-coupled receptor
HVR	Hypervariable region
SOS	Son of sevenless
HC	Heavy chain
RLC	Regulatery light chain
ELC	Essential light chain
S-1	Myosin subfragment 1
ATP	adenosine-5-triphosphate
ADP	adenosine-5'-diphosphate
GTP	guanosine-5'-triphosph
GDP	guanosine-5'-diphosphate
PAM	4-phenylazophenylmaleimide
ABDM	4,4'-azobenzene-dimaleimide
DIAAB	6-bromoacetyl-2-dimethyl-aminonaphthalene
cDNA	complementary DNA

WT	wild-type
DTT	dithiothreitol
DMF	N,N-dimethylformamide
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
MOPS	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)9-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
EDTA	Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
SDS-PAGE	sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEC-HPLC	Size-exclusion-High-performance liquid chromatography

第一章

序論

1.1　　はじめに

1.1.1　本研究の目的と意義

　低分子量 G タンパク質 Ras は、細胞内シグナル伝達において重要な役割を担う GTP アーゼである。Ras は細胞増殖、細胞分化、アポトーシスなどを制御しており、GTP 結合で活性化され下流の標的タンパク質と相互作用することでシグナルが伝達され、GDP 結合で不活性化され、シグナルは伝達しなくなる分子スイッチの様な振る舞いをする。この分子スイッチ機構は外部調節因子であるグアニンヌクレオチド交換因子: GEFs と GTP アーゼ活性化タンパク質: GAPs によって制御されており、これらのタンパク質と Ras の相互作用は、GTP 加水分解に 伴うヌクレオチド結合ドメインの構造変化によって機械的に制御されている。 代表的な Ras-GEF の一つである Son of sevenless: Sos は Ras シグナル伝達経路において欠かせない外部調節因子であり、Ras-Sos 相互作用は広く研究されており、その機構は分子レベルで明らかになっている。

Sos は二つの Ras 結合部位を有しており、結合した Ras の GDP を GTP へと置き換えるカタリティックドメインと GTP 結合 Ras が結合することでヌクレオチド交換反応が亢進されるアロステリックドメインがある。これらの結合部位を人工的に制御することができれば、Ras シグナル伝達経路を制御することが可能であると考えられる。

人工的な外部刺激によって低分子量 G タンパク質 Ras の情報伝達を制御することができれ ば、細胞機能の人工的制御や人工細胞への応用、癌やヌーナン症候群などの遺伝病のメカニズムの解明などが可能になると考えられる。人工的な外部刺激の 1 つである光刺激によって制御する方法には、フォトクロミック分子を用いる方法、ケージド化合物を用いる方法、オプトジェネティックスを用いる方法がある。

これまでの当研究室の研究で外部刺激によって ATP 駆動型生体分子モーターの機能を人工的に制御することに成功している。また光応答性化合物であるフォトクロミック分子を HRas の活性部位または機能部位に直接化学修飾することで、活性の光制御に成功している。しかし、蛋白質への直接的な化学修飾は、本来の生理活性を損なう恐れがあり、また細胞内での実験への応用が難しい。

本研究では、外部因子である Sos にフォトクロミック分子を導入することで、本来の生理的活性を損なうことなく、活性の光制御に試みる。また新たな試みとして、光応答性タンパク質の Dronpa と Aureo1 をもとに開発された Photozipper を HRas の機能ドメインと融合した光応答性 Ras を調製し、Ras の GTPase 活性の光可逆的制御を試みた。

1.1.2　本論文の構成

本論文は、四つの章で構成されている。本章では生体分子機械である生体分子モーター(ミオシン、キネシン)と生体分子スイッチ(三量体 G タンパク質、低分子量 G タンパク質)について紹介する。そして生体分子機械の光制御に利用されている光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック化合物と光応答性タンパク質について実際の応用例を挙げて述べた。

第二章では、フォトクロミック分子の一つであるアゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた HRas の GTPase サイクル活性の光制御を試みた。Sos の Ras 結合部位の近傍にシングルシステインを導入し、任意の位置にチオール基反応性アゾベンゼン誘導体を修飾し、Ras-Sos 相互作用を光可逆的な制御が可能なことについて述べた。

第三章では、新たにデザインした光応答性タンパク質融合 HRas を用いて、GTPase サイクル活性の光制御を試みた。光応答性タンパク質である Dronpa と Aureo1 をもとに開発された¥Photozipper(PZ)をそれぞれ HRas と融合することで光応答性の HRas を作製し、その光照射に伴う多量体形成を用いて Ras の GTPase サイクル活性が光制御可能なことをについて述べた。

最後に第四章では、本論文の結論をまとめ、光照射による Ras 機能の人工的な制御の有用性を示し、今後の展望を述べた。

1.2　生体分子機械

1.2.1　モータータンパク質

1.2.1.1　ミオシン

ミオシンは、筋肉の収縮を担う細胞骨格付随タンパク質の 1 つで、繊維状構造体である細胞骨格のアクチンフィラメントをレールとして、ATP を加水分解し運動エネルギーに変換する生体分子モーターである(Fig.1-1)。ミオシンの研究は、1930 年代に筋肉組織から抽出され、ATP 加水分解酵素であることが明らかになったことから盛んになり、その機能・作用別に多くの種類が存在しており、約 20 のスーパーファミリーを構成している。ミオシンの構造は各 2 本の重鎖(Heavy chain: HC, 229 kDa)、制御軽鎖(Regulatory light chain: RLC, 20 kDa)、必須軽鎖(Essential light chain:ELC, 17 kDa)からなり、2 つの頭部と 1 本の長い尾部を持つ分子の形態をとっている(Fig.1-2)。骨滑筋ミオシンであるミオシン II は、多分子でフィラメントを形成し協調しながら働くミオシンで、ミオシン V は二量体を形成して、アクチンフィラメントとどちらか片方のモーター部位を常に結合させながら、36 nm のステップサイズで、まるで人が歩くようにアクチンの+端方向に動き、細胞内小器官などを輸送する生体分子モーターである。骨格筋の収縮がトロポニン・トロポミオシン複合体によってアクチン側で調節されているのに対して(Fig.1-3)、平滑筋の収縮は、ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)とミオシン軽鎖脱リン酸化酵素(MLCP)によるミオシン頭部にある RLC のリン酸化・脱リン酸化によって行われる。まず、G タンパク質共役型受容体にアゴニストが結合するとホスホリパーゼ C が活性化され、ホスホファチジルイノシトールがイノシトール 3 リン酸(IP3)とジアシルグリセロール(DAG)が分解される。IP3 が小胞体にある IP3 受容体に結合すると Ca2+が放出され、Ca2+とカルモジュリン(CaM)が複合体を形成し、MLCK を活性化する。活性化された MLCK が RLC をリン酸化することによって RLC の構造変化が起こり、平滑筋ミオシンの頭部がアクチンと相互作用できるようになる。ミオシン V はミオシン II のように多分子ではなく一分子で働くことから全反射顕微鏡による一分子 motility 測定や光ピンセットによる一分子力測定など、一分子での研究が活発に行われている。

1.2.1.2　キネシン

キネシンは、細胞骨格付随タンパク質の 1 つで、繊維状構造体である細胞骨格の微小管をレールとして、ATP を加水分解し運動エネルギーに変換して物質を輸送する生体分子モーターである。1985 年に vale らによってイカの神経軸索で初めて発見され、そのキネシンは従来型キネシン(conventional kinesin)と呼ばれている。その基本構造は、モータードメイン(MD)、ネック部位、コイルドコイル領域、テールドメインで構成されており、 主に、重

鎖(Kinesin Heavy Chain, KHC)2 本と軽鎖 2 本からなる 4 量体である。MD は 350 残基程度であり、相同性が高く他のキネシンと構造が良く保存されている。従来型キネシンは N 末側に MD を持ち、C 末側に cargo との相互作用に重要な部位であるストーク/テールドメインを持っている。MD の位置は、キネシンの N 末側、中央、C 末側に存在するものがあり MD 以外の構造は、キネシンの機能ごとに異なる。また、MD はコイルドコイル領域でダイマー化しており、その間には、ネックリンカーと呼ばれる 15 アミノ酸残基 程度の部位が存在する。この部位が ATP 加水分解に伴って構造変化することが知られている(Fig.1-4)。従来型キネシンは 2 つの MD が微小管と交互に結合しながらテールドメインに結合した荷物を輸送していると考えられている。従来型キネシンは、ADP と結合すると安定状態になり、微小管と結合すると、キネシンのヌクレオチド結合部位から ADP が解離する。一方の MD のヌクレオチド結合部分に ATP が結合すると、もう片方の MD が前に振り出される。結合した ATP は加水分解され、リン酸の放出が起こり、MD は微小管から解離する。従来型キネシンは以上のような運動を繰り返して微小管上を歩くように動いていると考えられていることからこの運動は hand-over-hand model と呼ばれている(Fig.1-5)。一般に従来型キネシンに代表される N 末型のキネシンは微小管の+端方向に進み、kinesin-13 に属する Ncd などの C 末型のキネシンは－端方向に進むことが知られている。動物細胞における生理的な役割は多様であり、小胞や細胞小器官の 輸送、神経軸索においてシナプス末端への情報伝達物質の輸送、細胞分裂時の中心体の分離と紡錘体の形成など生体内において極めて重要なタンパク質である。キネシンは、その多様な働きに合わせて多様な形をしており、多くの種類が存在し、14 のファミリーに分類されている。従来型キネシン以降に発見されたキネシンには、キネシン様タンパク質(kinesin-like proteins : KLP)、キネシン類タンパク質(kinesin-related proteins : KRP)と呼ばれるものがある。従来型キネシンは N 末 MD で微小管の+端方向に動き、kinesin-14 ファミリーのキネシンは C 末 MD で、微小管の - 端方向へ動くことが知られている。

1.2.2 G タンパク質

1.2.2.1 三量体 G タンパク質

G タンパク質は、GTP 加水分解酵素の略称である。100kDa 前後の膜受容体関連ヘテロ三量体 G タンパク質と、Ras のような低分子量 G タンパク質が存在し、いずれも情報伝達カスケードにおいて重要な役割を担っている。三量体 G タンパク質は、細胞外の神経伝達やホルモンを受容した G タンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor :GCPR)により活性化され、さまざまな細胞応答に関与している。また α サブユニット(39-52kDa)、β サブユニット(35kDa)、γ サブユニット(10kDa)からなるヘテロ三量体である(Fig.1-6)。α サブユニットは、GTP または GDP と特異的に結合する GTP アーゼユニットと α ヘリック

スユニットから構成されている。この GTP アーゼユニットは、GTP 結合タンパク質に共通して存在する G モチーフがあり、グアニンヌクレオチドと結合・解離する。またこの G モチーフは ATP 結合タンパク質に共通して存在するヌクレオチド結合ドメイン(Switch I, Switch II, P-loop)を含んでいる。通常βサブユニットとγサブユニットは互いに強く結合しており、G$\beta\gamma$複合体と呼ばれる。GCPR が活性化していない場合、$\alpha\beta\gamma$サブユニットは結合している。GCPR とアゴニストが結合し活性化した場合、αサブユニットに結合している GDP と GTP の交換反応がおこり、GTP 結合型αサブユニットと$\beta\gamma$サブユニットに解離する。解離した$\beta\gamma$サブユニットは、標的タンパク質や酵素を活性化し、下流へとシグナルを伝達する。その後、αサブユニットに結合した GTP はαサブユニットの GTP アーゼ活性によって加水分解され GDP となり、再び$\beta\gamma$サブユニットと結合し、不活性型三量体を形成する。

1.2.2.2　低分子量 G タンパク質

低分子量 G タンパク質は、分子量 20kDa から 30kDa のグアニンヌクレオチド結合タンパク質である。低分子量 G タンパク質は、Ras、Rho、Rab、Ran、Arf の 5 つのサブファミリーに分類され、酵母からヒトまでの真核生物に広く保存されている膜タンパク質である(Fig.1-7A)。Ras ファミリーには、H-Ras、K-Ras、N-Ras など様々の種類が存在し、細胞の増殖や分化の制御をしている。Rho ファミリーには、Rho、Rac、Cdc42 など様々な種類が存在し、細胞運動や細胞骨格の制御をしている。Rab は 30 種類以上存在し、小胞輸送に関与している。Ran は核内への物質輸送に関与する分子である。Arf は 6 種類あり、Rab と同様小胞輸送に関わっている。三量体 G タンパク質のようにサブユニット構造を持たないが、三量体 G タンパク質と同様に GTP 結合活性型と GDP 結合不活性型の間で GTP アーゼサイクルをおこなう。低分子量 G タンパク質は、グアニンヌクレオチド交換因子(GEFs)により活性化され、それぞれ標的エフェクターに結合し、下流へとシグナル伝達をおこなう。また、GTP アーゼ活性化タンパク質(GAPs)によって、低分子量 G タンパク質に本来備わっている GTP アーゼが亢進され､結合している GTP が GDP へと分解され不活性型となる。低分子量 G タンパク質は、GEFs と GAPs によりその活性が制御され、細胞外からのほとんどのシグナルは GEF か GAP を活性化することで GTP アーゼサイクルを調節している(Fig.1-7B)。低分子量 G タンパク質は、C 末端から 4 番目のアミノ酸がシステイン残基であり、ファルネシルトランスフェラーゼやゲラニルゲラニルトランスフェラーゼによってファルネシル化されており、この脂質修飾により細胞膜に直接結合している(Fig.1-8)。Ras を除く低分子量 G タンパク質は、GDP 結合型の場合、GDP 解離阻害因子(GDI)と複合体を形成して細胞質内に存在する。GDI により、GDP の解離の阻害、また細胞膜への結合を阻害している。GDI 置換因子(GDF)により、低分子量 G タンパク質から GDI が遊離する

ことで、GEF による活性化が可能になる。

1.2.2.3 Ras

Ras タンパク質ファミリーは、低分子量 G タンパク質のひとつであり、細胞分化、細胞周期を含む様々なシグナル伝達経路において重要な役割を担う(Fig.1-9)。Ras は、大きく 3 つの異性体(H-Ras、N-Ras、K-Ras)をもち、さらに K-Ras は K-Ras4A と K-Ras4B に分化する。すべての異性体は、GTP 結合で活性型となり、GDP 結合で不活性型となる。Ras が GTP か GDP に結合することで、主に Switch I 、Switch II 、P loop に構造の変化が生じ、細胞内分子スイッチとして作用する(Fig.1-10)。この分子スイッチ機構はとても緻密に制御されているが、このシグナル経路が癌に侵されると、制御が効かなくなる。癌細胞における Ras の過剰な活性化は、一般的に Ras 内の点変異に関連する。典型的に 12、13 もしくは 61 番目のコドンにおいて点変異が生じ、GTP 結合状態が優位になり Ras の持続的な活性化状態から下流のエフェクターと GTP 結合 Ras の親和性が上昇する。これにより、細胞分化、アポトーシス回避、細胞浸潤および転移等の連続的刺激をもたらし、それにより癌化を促進する。変異した Ras は、ヒトのすべての癌のおよそ 30%において発見されている。大腸癌の 50%、膵臓癌の 90%が変異した Ras による、劇的な活性化が原因であると考えられている。近年、Ras 特異的阻害剤などの開発が積極的に行われてきている。

1.3 Ras 外部調節因子

1.3.1 グアニンヌクレオチド交換因子

低分子量 G タンパク質の GDP/GTP への親和性はとても高く nanomolar から picomolar と言われている。この高い親和性から低分子量 G タンパク質と GDP/GTP の解離速度が遅くなり、半減期 1 時間以上になる。G タンパク質の活性化に必要な GDP から GTP への交換には、グアニンヌクレオチド交換因子: GEF の活性が必要となる。GEF は G タンパク質のヌクレオチド結合部位に結合しているヌクレオチドの親和性を下げることでヌクレオチドの解離を触媒する。一般的に GTP と GDP に対する G タンパク質の親和性は同じであり、また GEF は GDP から GTP へのリバウンドを行なっているわけではない。細胞質内における GTP が GDP の約 10 倍以上高い濃度のため、結果的に GTP 結合状態が GDP 結合状態より多くなる。また GEF による G タンパク質とヌクレオチドの親和性を減少させるメカニズムは既に明らかになっている(Fig.1-11)。G タンパク質結合ヌクレオチドは Switch1、Switch2 と呼ばれる二つのループによって挟まれており、このスイッチ領域と一緒に P ループがヌクレオチドのリン酸基と相互作用し、そこにマグネシウムがコーディネートされている。このリン酸基とマグネシウムのコーディネートはヌクレオチドと G タンパク質間の高い親和性を保つのに必須である。GEF の結合はスイッチ領域と P ループの構造変化を引き起こし、マグネシウム結合部位の立体的な閉鎖、または Switch2 に存在する DTAG モチーフのアラニンの位置が変化する。その結果、G タンパク質に結合しているヌクレオチドが解離される。

1.3.2 GTP アーゼ活性化タンパク質

低分子量 G タンパク質は GTP アーゼとも呼ばれるが、実際の GTP 加水分解反応は非常に遅く、効率的な加水分解には GTP アーゼ活性化タンパク質:GAP との相互作用が必要であり、これにより切断ステップが数桁加速される。構造的また生物物理的研究から反応機構は解明されている(Fig.1-12)。Ras-GAP 複合体は Ras の Gln61 の位置を安定化する。加えてアルギニンフィンガーと呼ばれるアルギニンがリン酸結合部位に配置され、γ リン酸の負電荷を中和させることで遷移状態を安定化する。このアルギニンフィンガーは、三量体 G タンパク質の α サブユニットのへリックス挿入に見られるアルギニンと非常によく似た機能を果たしている。Ras-GAP と Rho-GAP は構造的な相同性は低いが、Rho-GAP による加水分解においても同様の機構が見つかっている。

Ras と Rho に保存されるカタリティックなグルタミンは Rab にも見られ、またアルギニンフィンガーもまた Rab-GAP に見られるが、その加水分解の機構は多少異なる。Rab のヌクレオチド結合部位の近傍にはグルタミンが存在せず、安定化させるグルタミンは GAP によって供給される。Ras-GAP はアスパラギンを供給することで、Ran のグルタミンの配向を

安定化する。対照的に、Ras に非常に高い相同性を持つ Rap は、Ras Gln61 に対応するグルタミンを持たない。実際、Rap-GAP は構造的に Ras-GAP とは無関係であり、触媒作用の主要な要素としてアルギニン残基ではなくアスパラギン残基が重要な役割を担っていると考えられています。Sar/Arf にも触媒作用を持つグルタミンを持たないことが明らかになっており、グルタミンの代わりに Sar/Arf-GAP のヒスチジンが触媒作用を持つ。触媒作用に対する様々な GAP の寄与は、G タンパク質の触媒機構の構造の安定化である。

1.4　光応答性分子

1.4.1　フォトクロミック化合物

フォトクロミック分子は、光刺激に応じて可逆的に構造や性質を変化させる化合物で、アゾベンゼン誘導体、ジアリールエテン誘導体、スピロピラン誘導体、フルギミド誘導体などが存在する(Fig.1-13)。その光異性化の速度は拡散や熱伝導などに比べて非常に早く 非接触で制御が可能であるという利点を持っている。光照射によって変化した後、元に戻るときに別の波長の光照射でしか戻らないジアリールエテン誘導体やフルギミド誘導体を P 型化合物と呼び、光照射以外に熱でも戻るアゾベンゼン誘導体やスピロピラン誘導体を T 型化合物と呼んでいる。それぞれの特性を生かした光機能性材料として記憶媒体材料や 色彩材料、調光材料として利用されている。例えば、アゾベンゼン誘導体は DVD などの記憶媒体材料に、スピロピラン誘導体は紫外線チェッカーやサングラスに使用 されている(57)。また最近では、主にアゾベンゼン誘導体を生体分子に応用する研究が行 われている。アゾベンゼン誘導体は染料として使用されていたが 1937 年に光異性化する ことが Hartley 等によって発見され、紫外線照射でトランス体からシス体に異性化し、可視光照射でシス体からトランス体に異性化することが明らかになった。光制御スイッチとして様々な研究に用いられ、蛋白質分解酵素であるパパインやグルコースオ キシダーゼに導入することで光照射による光異性化によってその酵素活性を制御できることが報告されている。イオンチャネルに応用した研究では、イオンチャネルの入り口に導入することによってイオンチャネルの物質通過能を光制御することに成功している。また、二価架橋性アゾベンゼン誘導体である DIAAB を合成ペプチドに導入することで光異性化によってペプチドの二次構が変化することが報告されている。また DNA の二重らせんの間に導入することで RNA ポリメラーゼの活性や RNaseH の分解活性を光制御できることも報告されている。また、当研究室では過去にキネシンの機能部位に導入することで ATPase 活性と阻害剤による ATPase 活性への阻害効果を光制御することに成功している。このようにアゾベンゼン誘導体は光照射によってその構造と性質を大きく変化させ、導入した機能性蛋白質の活性などを光制御することができる化合物である。

1.4.2　光応答性タンパク質

光応答性タンパク質は、光刺激に応じて可逆的に構造や性質、また多量体形成など様々な変化を示すタンパク質で、細胞内シグナル伝達の光遺伝学的制御において広く利用されてきた。いくつかの研究グループによる先駆的な研究により、LOV ドメイン、フィトクロム B (PhyB)、クリプトクロム 2 (CRY2)、UV 耐性遺伝子座 8(UVR8) 、Dronpa など、いくつかの光活性化タンパク質が発見された(Fig.1-14)。スプリット GFP などの一部の光活性化可能なタンパク質は、生細胞のシグナル伝達の制御にはまだ使用されていないが、光制御されたタンパク質間相互作用を使用して、生細胞の細胞内シグナル伝達経路を調節することに最近成功している。これらの光活性化可能なシステムの機構は既に明らかになっている。 励起光の光子からエネルギーを吸収することにより、光活性化可能なタンパク質は立体構造の変化を受け、タンパク質間またはタンパク質内の結合を再編成し、タンパク質間またはタンパク質内の相互作用を調節する。一般的に、光遺伝学的シグナル伝達の制御は、二つの制御機構があると考えられている。一つは光誘導タンパク質転座と二つは光誘導タンパク質アンケージングである。光誘導タンパク質転座では、光応答性タンパク質間相互作用がシグナル伝達タンパク質の細胞内位置またはオリゴマー化状態を変化させ、下流の細胞応答を制御している。光誘導タンパク質アンケージングでは、光応答性タンパク質内相互作用による立体障害でシグナル伝達を制御している。光応答性タンパク質である Dronopa、また Aureochrome1 を Ras の触媒ドメインと融合することで光応答性機能を持つ Ras を作製し、Dronpa 融合 Ras では Dronpa の光刺激によるオリゴマー形成を利用した光制御を用いることで、GTPase 活性の光制御が期待できる(Fig.1-15)。Aureochrome1 融合 Ras では、Aureochrome1 の光刺激によるタンパク質内相互作用による立体構造の変化を用いることで、GTPase 活性の光制御が期待できる(Fig.1-16)。

1.5 第一章総括

第一章では、始めに生体分子機械である生体分子モーター(ミオシン、キネシン)と生体分子スイッチ(三量体 G タンパク質、低分子量 G タンパク質)が広く研究されており、次に低分子量 G タンパク質のスイッチ機構が外部調節因子である GEF、GAP によって保存されており、その機械的な仕組みが広く保存されていることを述べた。そして光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック化合物と光応答性タンパク質が光という非接触の外部刺激によって制御が可能な分子であり、それらを標的タンパク質または外部因子に導入するとで機能性タンパク質の機能を光制御することが可能になることを述べた。低分子量 G タンパク質 Ras の外部制御因子である GEF の一つ Sos にフォトクロミック化合物を導入することで、Ras GTPase 活性を光制御することが可能であると考えられる。また光応答性タンパク質を Ras の触媒ドメインと融合することで光応答性機能を持つ Ras を作製し、GTPase 活性の光制御を試みた。

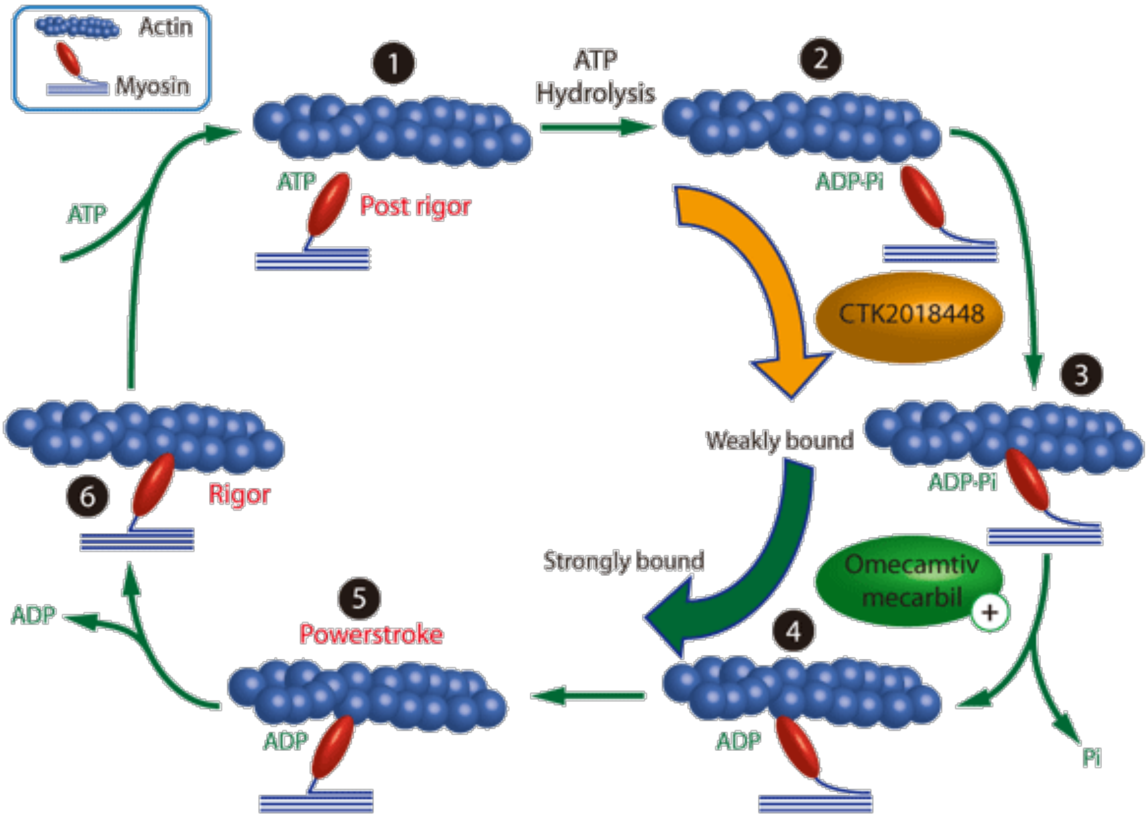


Fig. 1-1. ミオシンとアクチンの結合ステップ

(http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cytoskele ton_news_201211-12.asp?entry_id=10319 より)

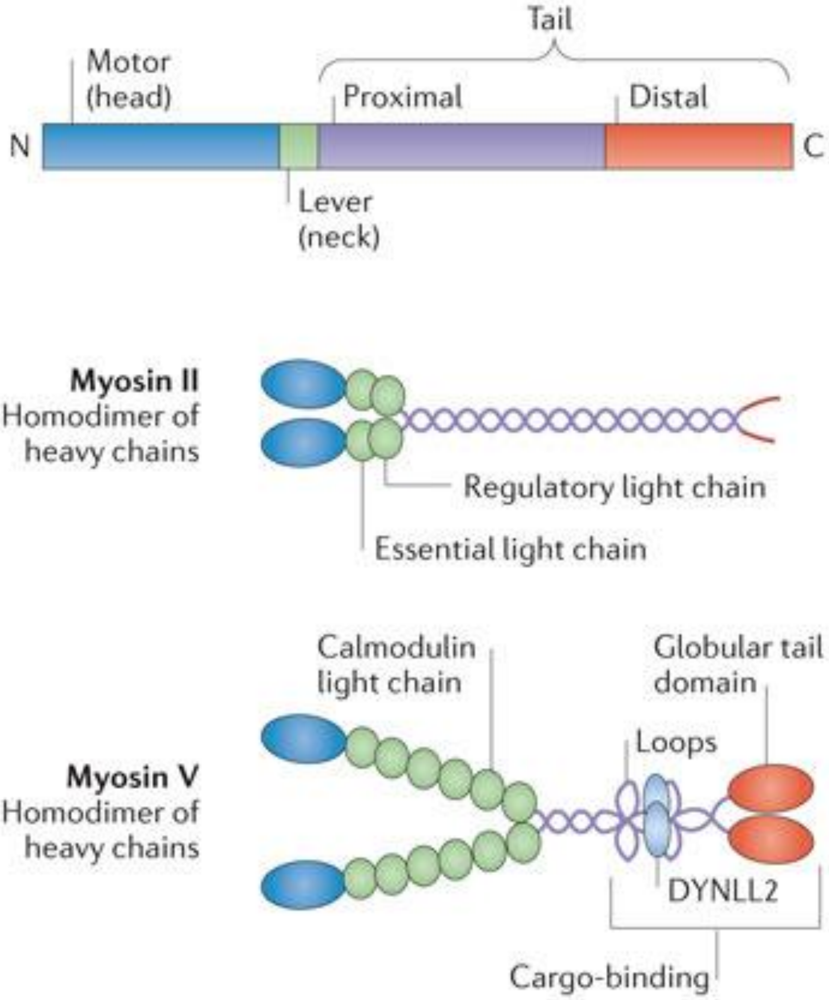


Fig. 1-2. Myosin II と Myosin V の構造モデル（11）

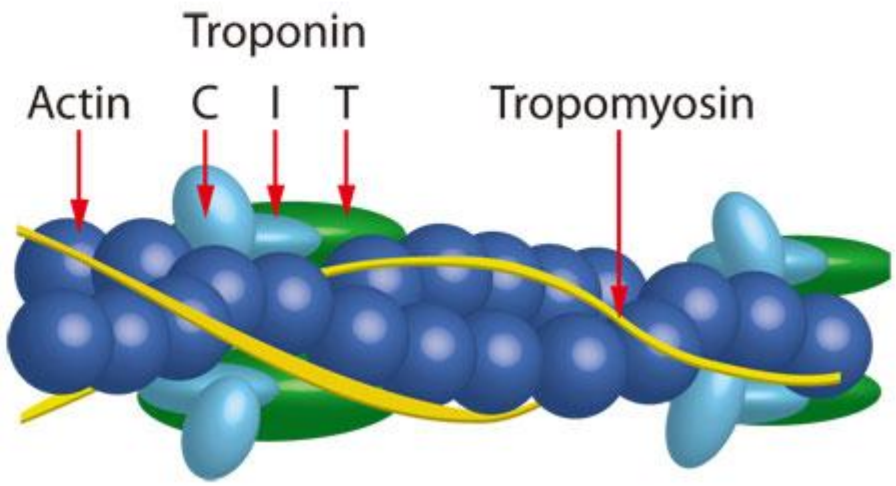


Fig. 1-3. 筋肉のアクチンフィラメントの構造
（http://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cytoske leton_news_201211-12.asp?entry_id=10319 より）

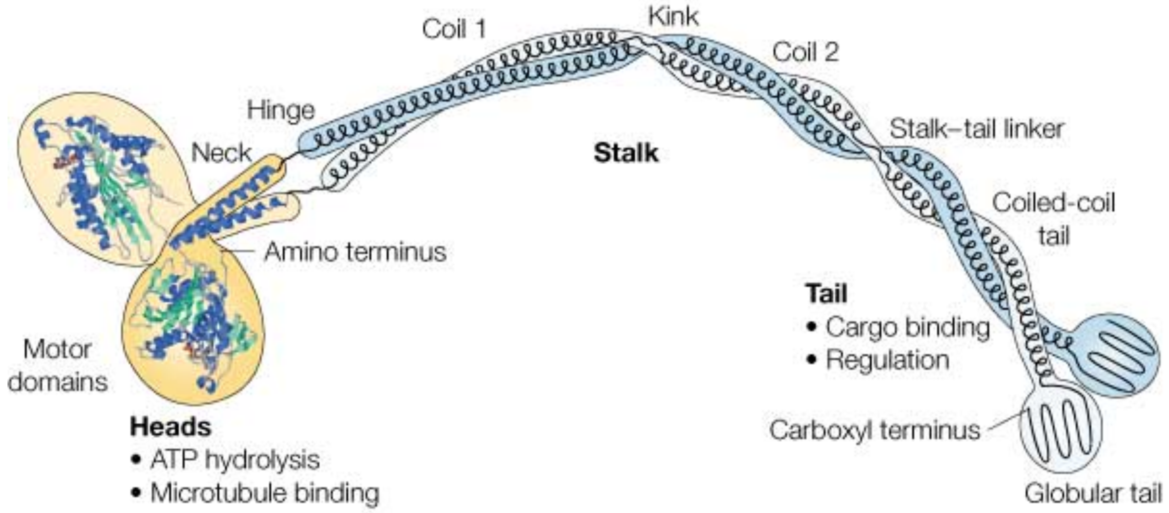


Fig. 1-4. キネシンの構造モデル（8）

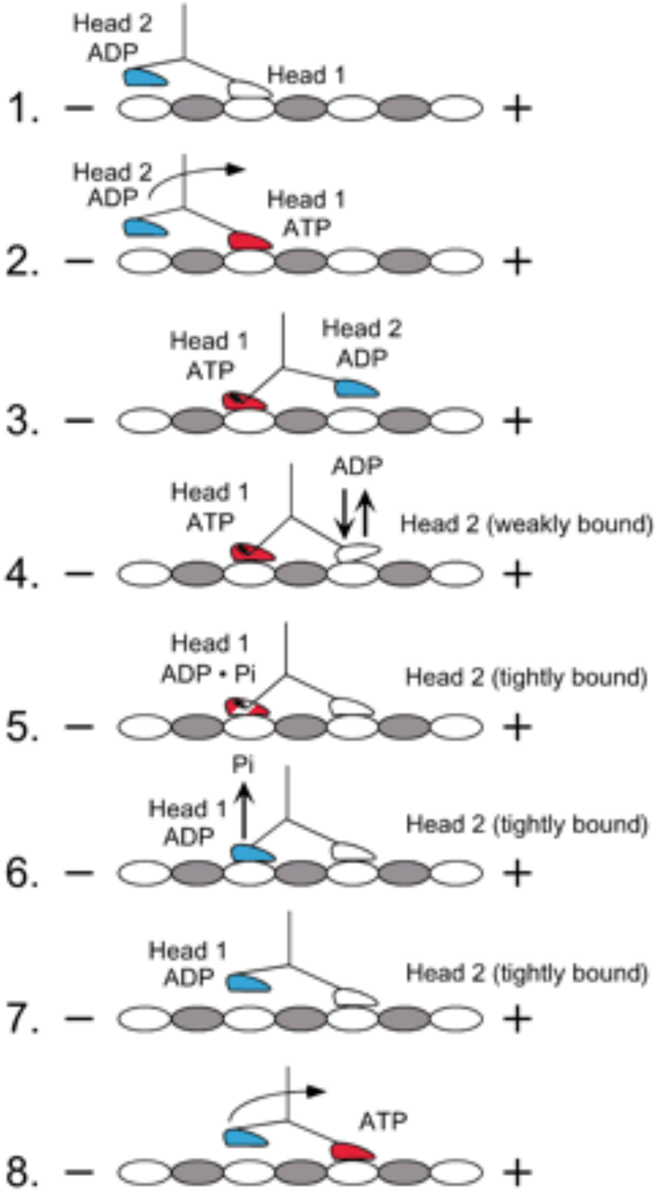


Fig. 1-5. キネシンの微小管の結合ステップ（29）

D:ADP 結合状態、O:ヌクレオチド非結合状態、T:ATP 結合状態

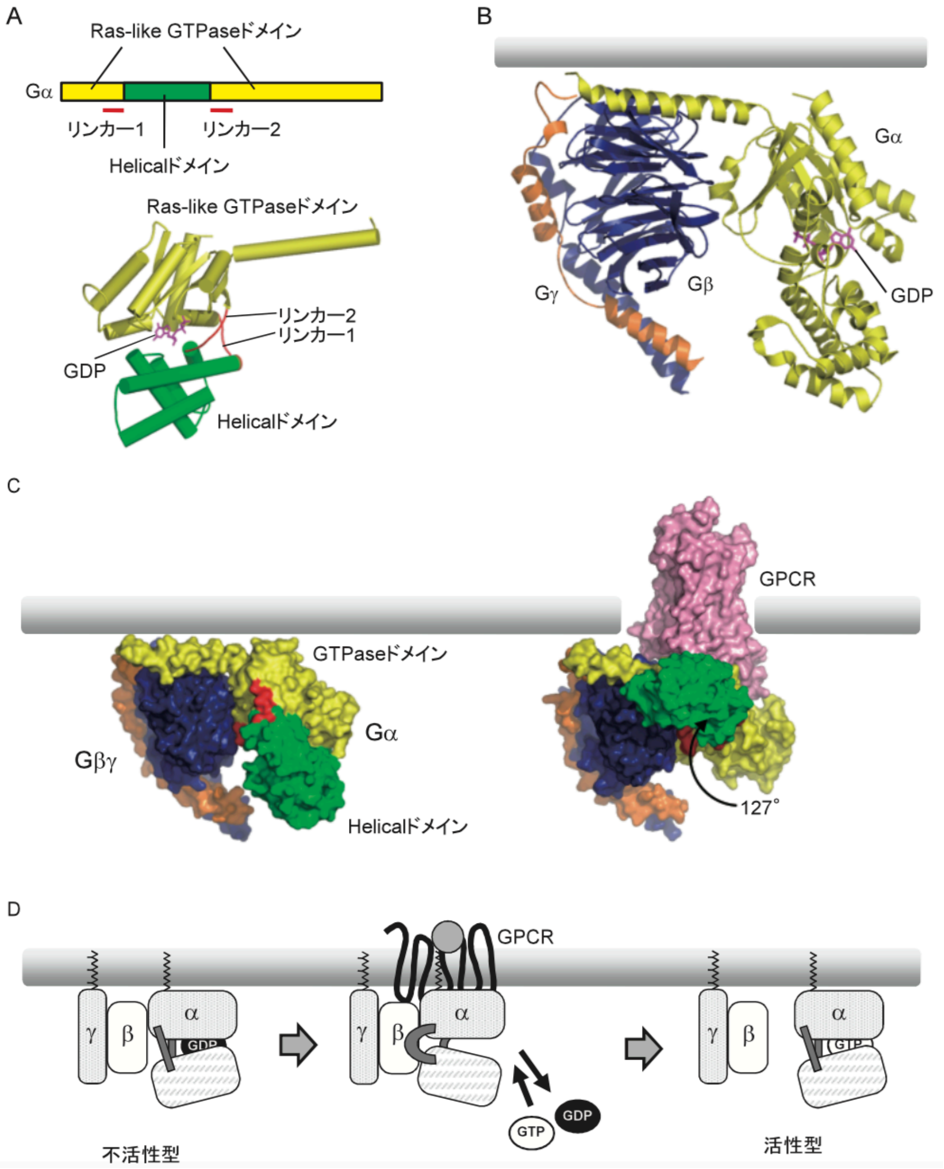
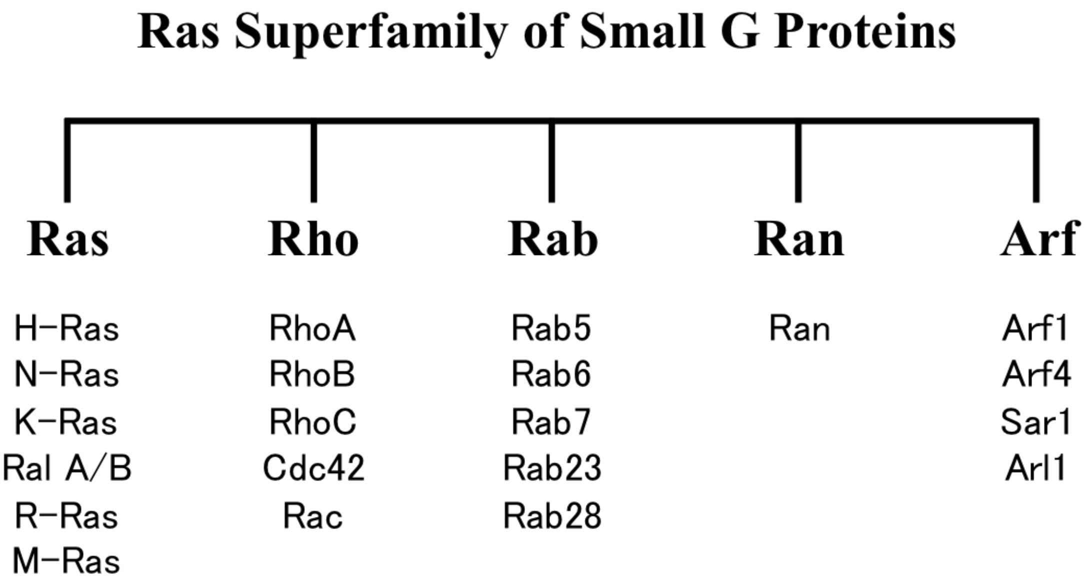


Fig. 1-6. 三量体 G タンパク質の構造と活性化 (30)

(A)Gα の一次構造と立体構造.Gα は Ras-like GTPase ドメインと Helical ドメイン,さらに両ドメインをつなぐ 2 本のリンカー領域から構成されている。GTPase ドメインに結合している GDP もしくは GTP は通常 Helical ドメインによりマスクされている。(B) 三量体 Gi$\alpha\beta\gamma$ の立体構造(PDB 番号:1GP2)。(C)三量体 Gi$\alpha\beta\gamma$(PDB 番号:1GP2)と β アドレナリン受容体ー三量体 Gs$\alpha\beta\gamma$ 複合体(PDB 番号:3SN6)の構造比較。β アドレナリン受容体との複合体では Gα からヌクレオチドが解離しており、リンカー部分を支点に Helical ドメインが 127° シフトしている。 この構造変化により Gα のグアニンヌクレオチド結合部位が外部に露出していることがわかる。(D)活性化時における G タンパク質の構造変化のモデル図。

A



B

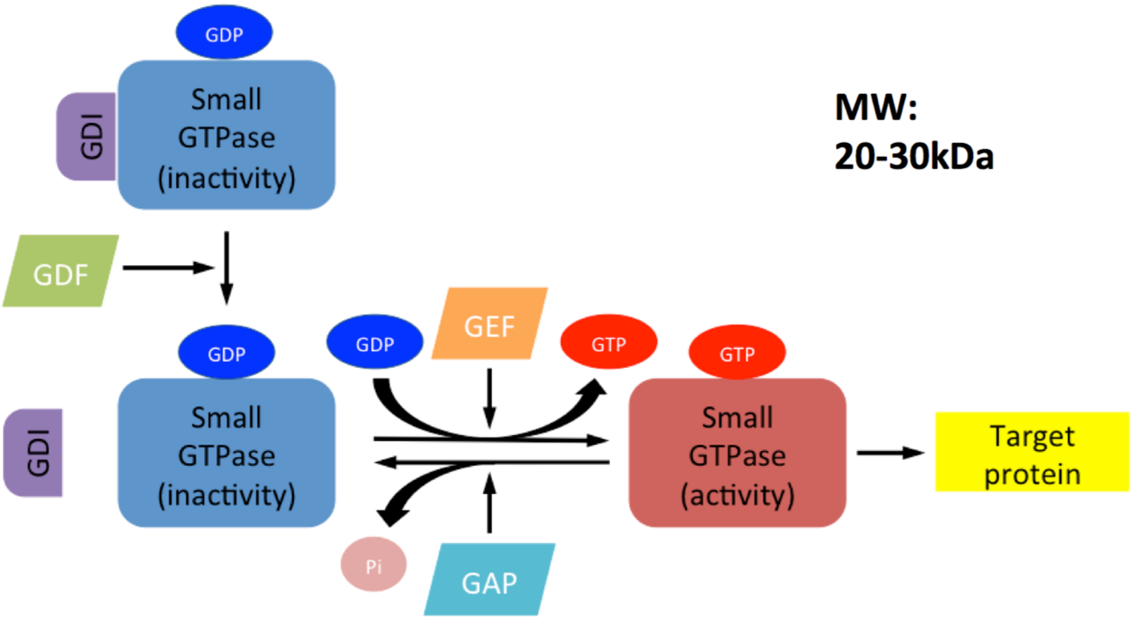


Fig. 1-7. 低分子量 G タンパク質 Ras スーパーファミリーとそのスイッチ機構
(A)Ras スーパーファミリーに所属する低分子量 G タンパク質の分類.
(B)低分子量 G タンパク質のスイッチ機構

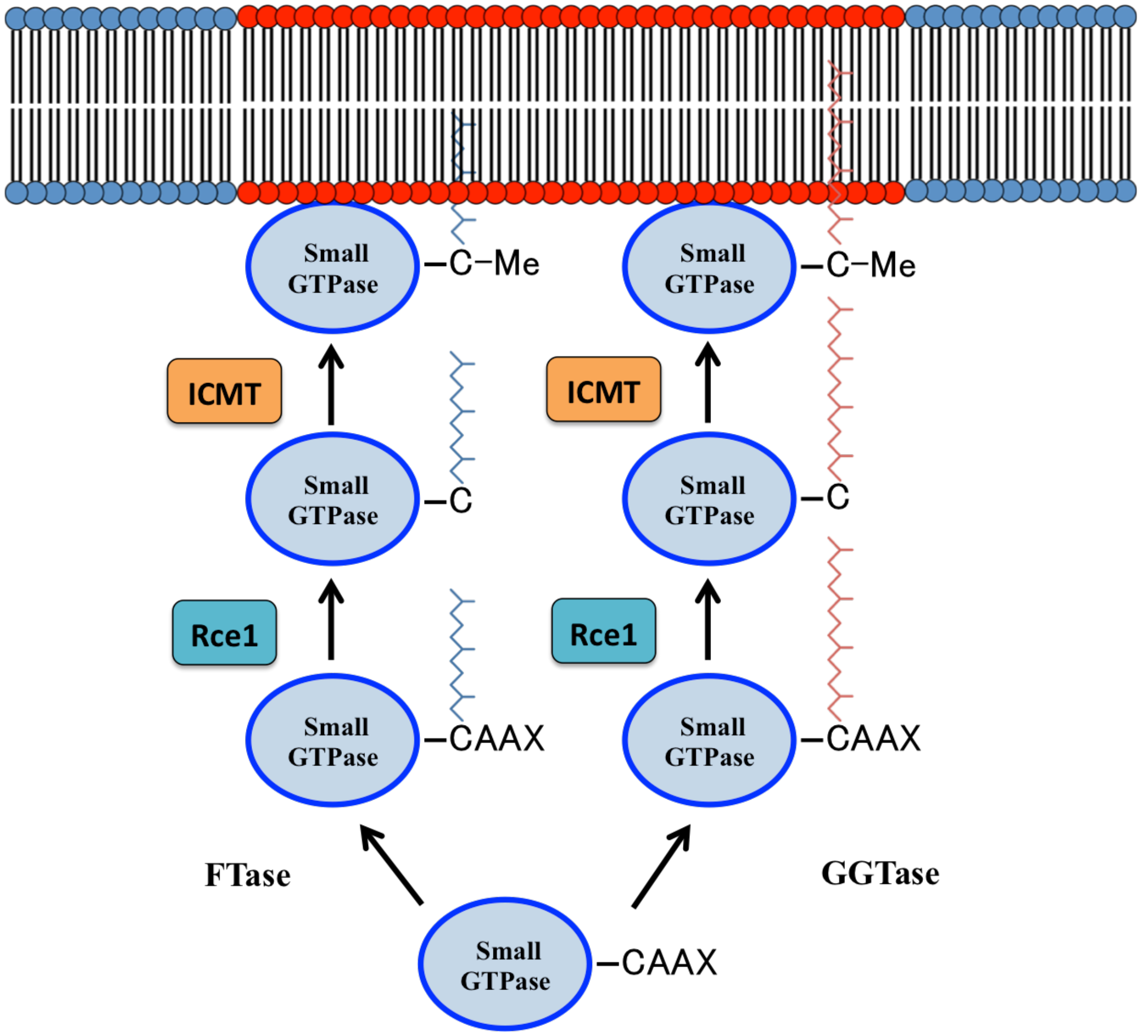


Fig. 1-8. 低分子量 G タンパク質の脂質修飾による膜結結合

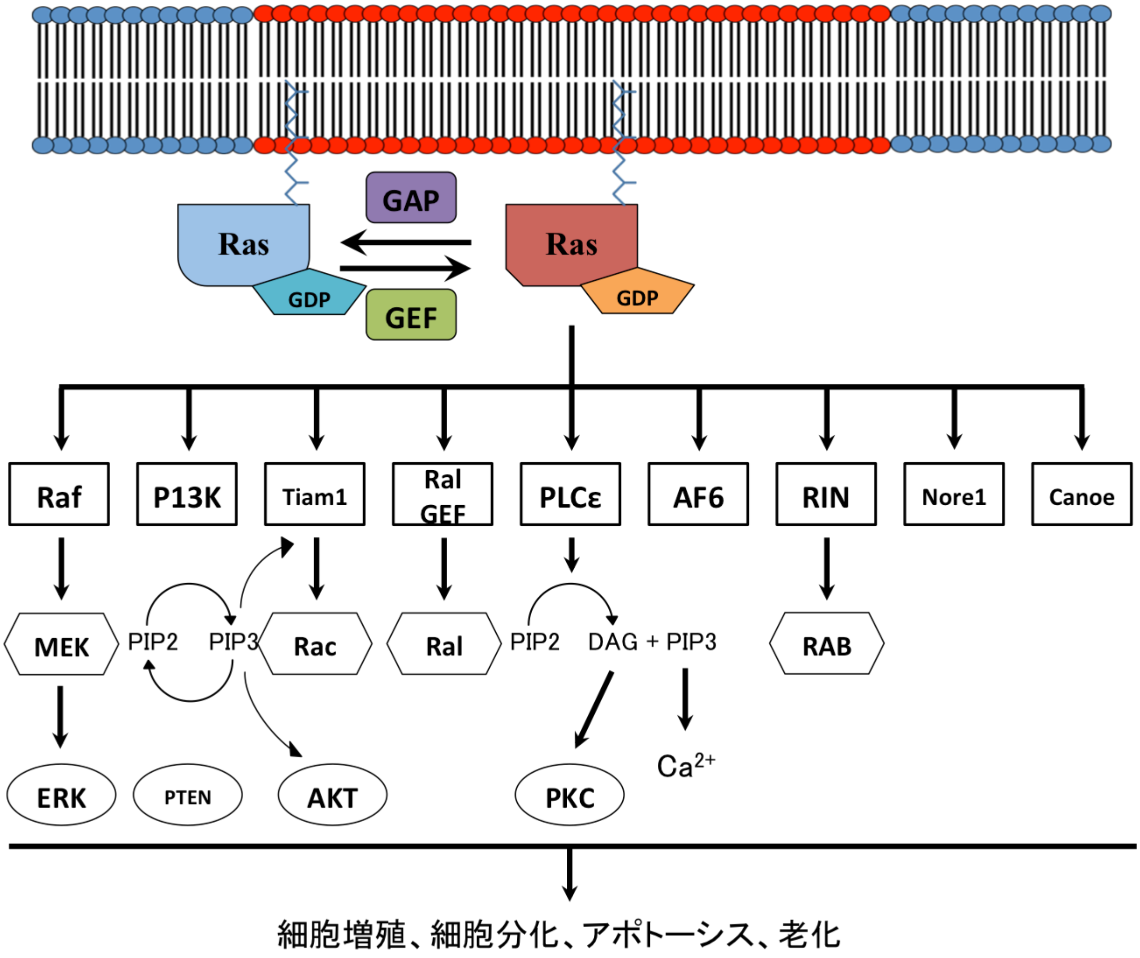
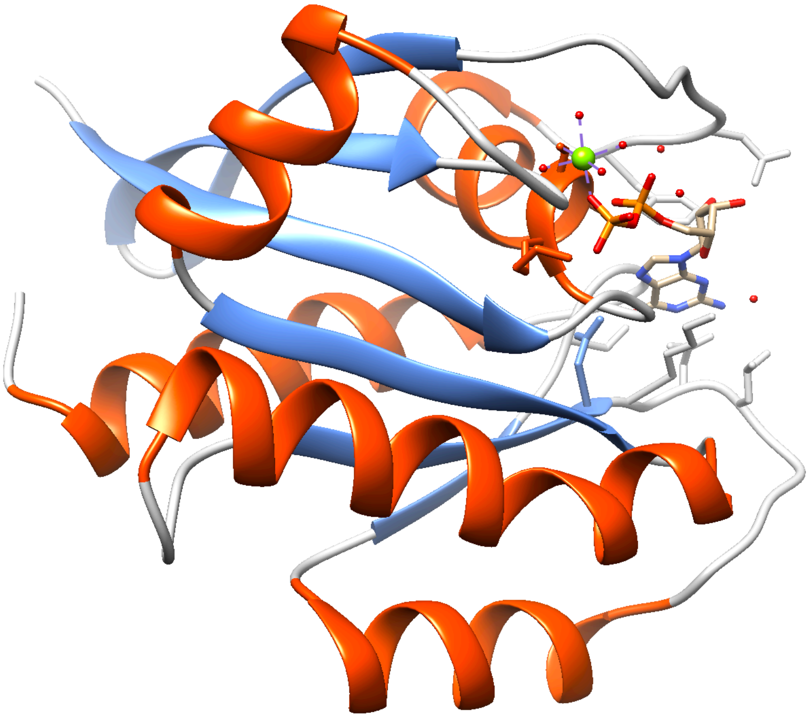


Fig. 1-9. Ras シグナル伝達経路



Protein	Sequence	Switch Ⅰ	HVR domain
H-Ras		DEYDPTIEDSYR	KLRKLNPPDESGPGCMSCKC
N-Ras		DEYDPTIEDSYR	RMKKLNSSDDGTQGCMGLPC
K-Ras4A		DEYDPTIEDSYR	RLKKISKEEKTPGCVKIKKC
K-Ras4B		DEYDPTIEDSYR	KEKMSKDGKKKKKSKTKC

Fig. 1-10. Ras 結晶構造と Ras 異性体の相同性

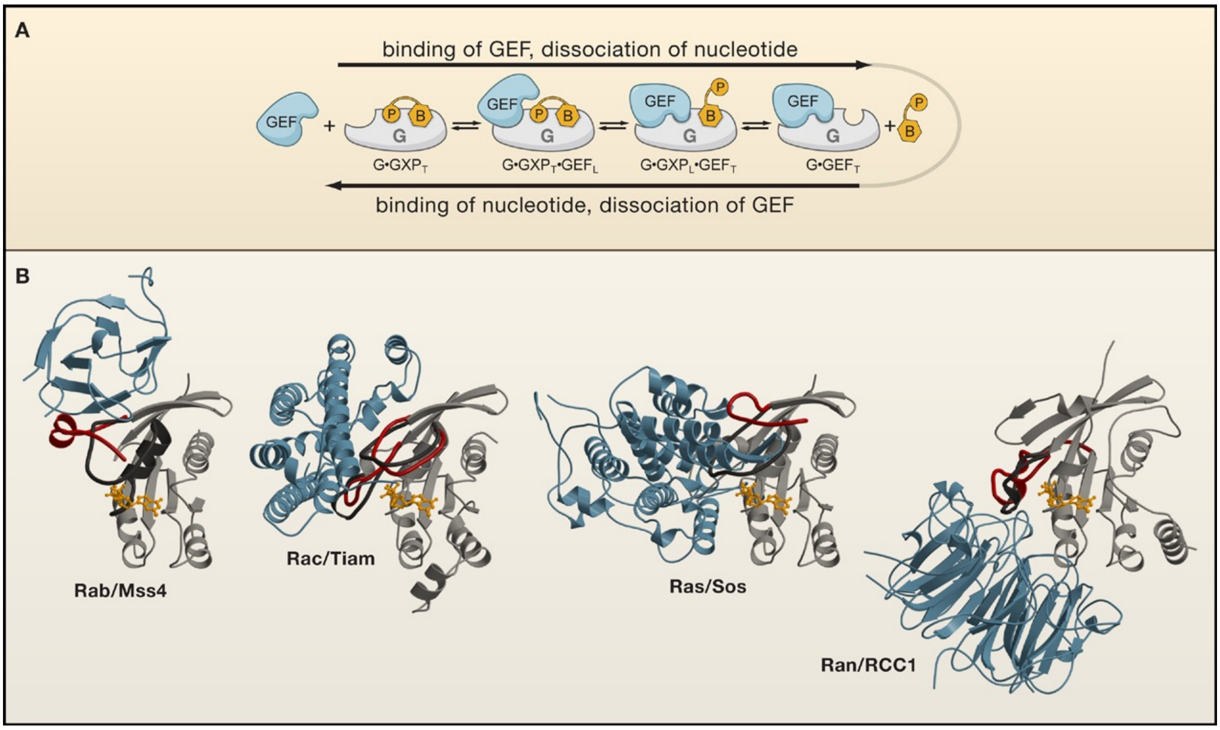


Fig. 1-11. グアニンヌクレオチド交換因子によるヌクレオチド交換の機構（53）

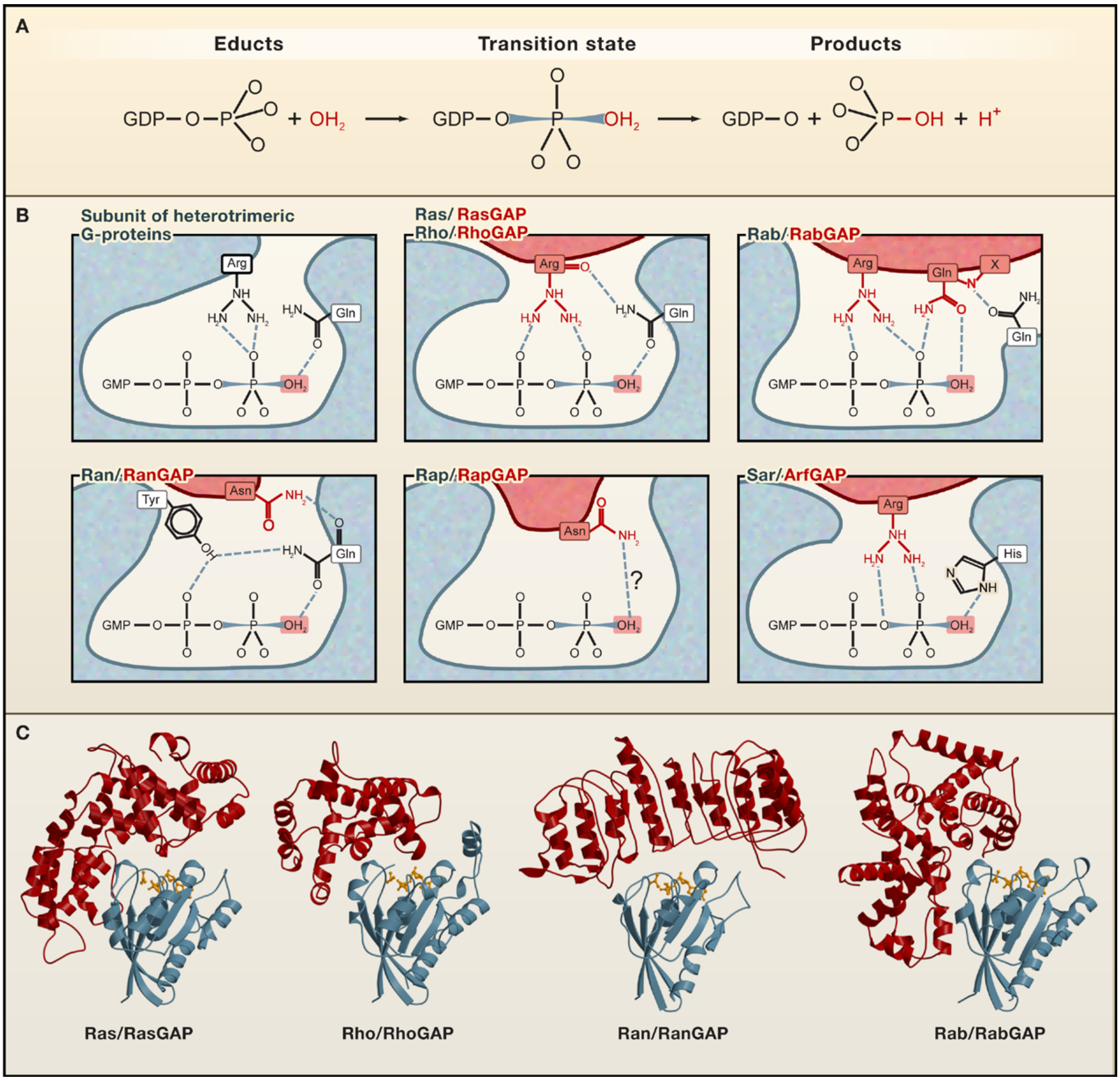


Fig. 1-12. GTP アーゼ活性化タンパク質による GTP 加水分解促進の機構（53）

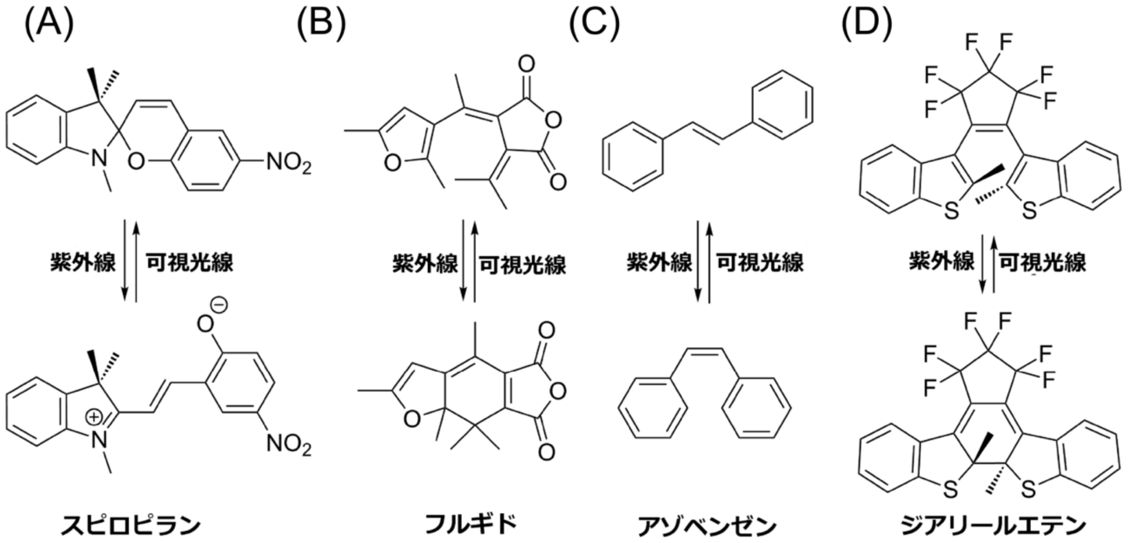


Fig. 1-13. フォトクロミック分子

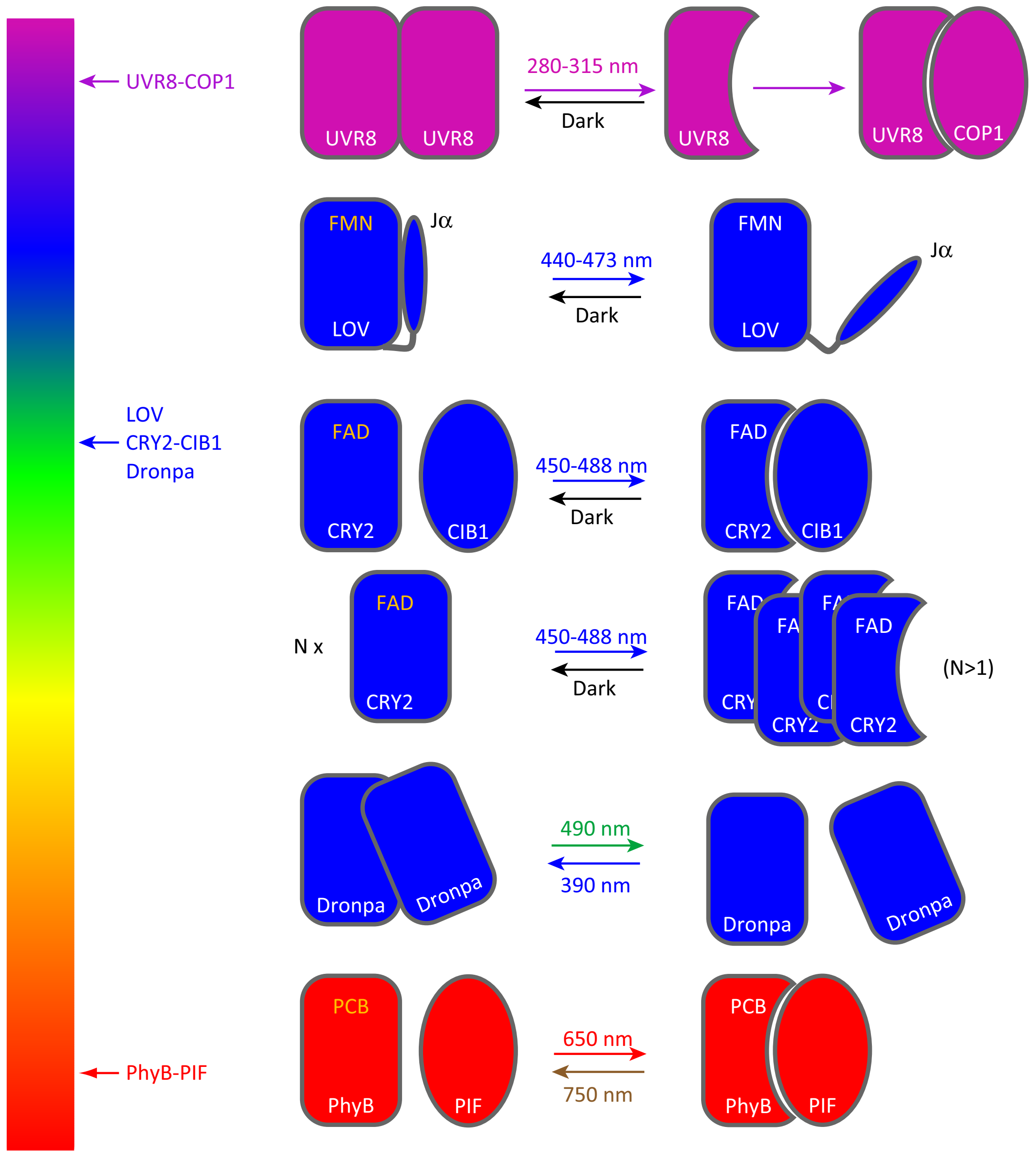


Fig. 1-14. 光応答性タンパク質の光照射による構造変化の概念図（60）

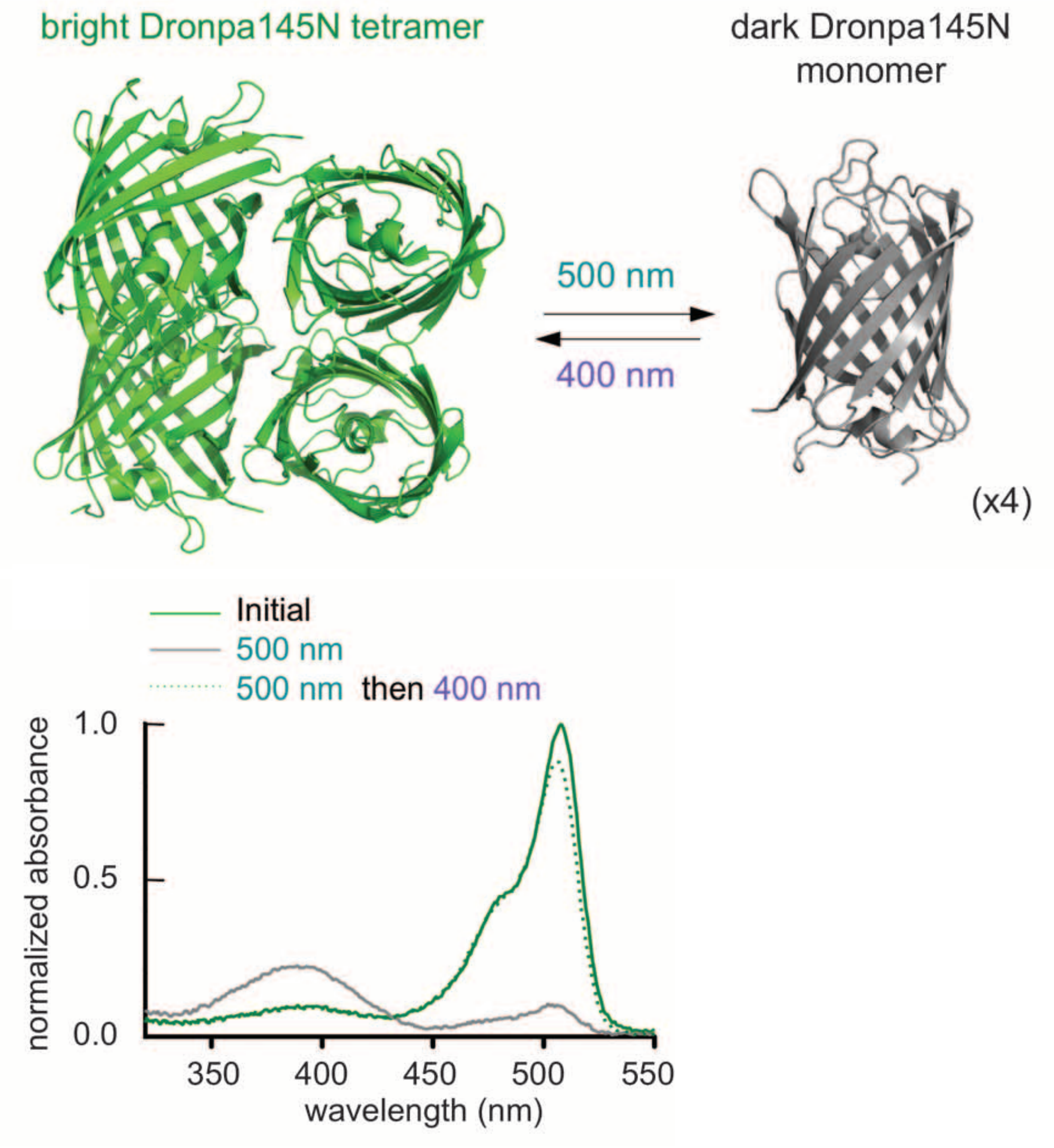


Fig. 1-15. Dronpa の光異性化に伴う会合の概念図（61）

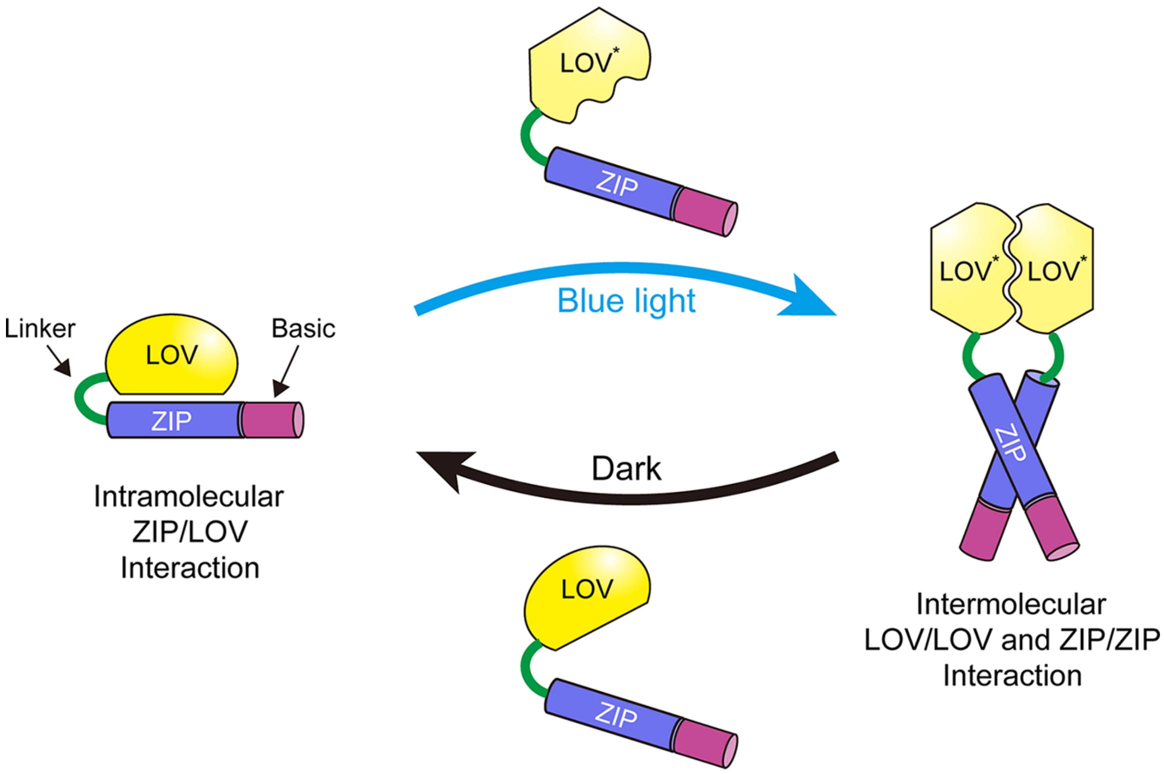


Fig. 1-16. Aureochrome1 の光異性化に伴う構造変化の概念図（62）

第二章

フォトクロミック分子修飾 Sos を用いた HRas GTPase 活性の光制御

2.1 本章の要旨

本章では、光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック分子と Ras GTPase 調節因子である GEF を用いた低分子量 G タンパク質 H-Ras の GTPase サイクル活性の光制御について述べた。本章では、まず GTPase H-Ras、調節因子である Sos GEF ドメイン、NF1 GAP ドメインを調製した。次にチオール基反応性のフォトクロミック分子を修飾するための Sos 変異体を設計・調製した。Sos GEF ドメインは 5 つのシステイン残基を持ち、うち 3 つは表面に露出しているため、表面に露出しているシステインはセリンへと置換し、更に Ras 結合部位近郊のアミノ酸残基から光制御の効果が期待される残基をシステインへと変異させシングルシステインを持つ Sos 変異体を調製した。また本研究ではそれぞれ違う特性を持つ 4 つのアゾベンゼン誘導体(PAM、CASAB、AABM、SABM)を用いた。各フォトクロミック分子修飾条件の Sos 変異体への修飾条件を決定し、紫外線照射と可視光照射によって Sos 変異体に修飾したフォトクロミック分子が光異性化することを確認した。次にフォトクロミック分子修飾 Sos 変異体を用いて GTPase サイクル活性測定を行い、光制御の有用性を確認した。CASAB 修飾 Sos S732C 変異体に対して紫外線照射と可視光照射を交互に行うことで GTPase サイクル活性が光制御できることを明らかにした。

2.2 緒言

低分子量 G タンパク質 Ras は細胞内情報伝達において重要な役割を担っているグアニンヌクレオチド結合タンパク質である。Ras は分子スイッチのような働きをもち、GTP 結合で活性型となり下流へとシグナルを伝達し、GDP 結合で不活性型となり下流へのシグナルが止まる。この分子スイッチは外部因子であるグアニンヌクレオチド交換因子 GEFs と GTPase 活性化タンパク質 GAPs によって制御を受けている。グアニンヌクレオチド交換因子は､Ras に結合している GDP を放出させて GTP を結合させることで Ras を活性化し、GTPase 活性化タンパク質は Ras が本来持つ GTPase を活性化させることで GTP から GDP への加水分解を促進し Ras を不活性化する。この分子スイッチ機構は既に分子レベルで明らかになっている。当研究室では、これまでに H-Ras の分子機械的な仕組みを光で制御することを試みてきた。光応答性化合物であるフォトクロミック分子を H-Ras の活性部位または機能部位に直接化学修飾することで、活性の光制御に成功している。しかし、蛋白質への直接的な化学修飾は、本来の生理活性を損なう恐れがある。
そこで本研究では、外部因子である Ras GEF の一つである Son of sevenless (Sos)にフォトクロミック分子を導入することで、H-Ras 本来の生理的活性を損なうことなく、Ras による情報伝達の光制御を試みる(Fig.2-1)。

2.3 実験材料と試薬

2.3.1 試薬

オリゴヌクレオチドの合成はユーロフィンジェノミクスを利用した。制限酵素およびその他の酵素は TOYOBO または TAKARA のものを使用した。大腸菌 DH5αは TAKARA、Rosetta2(DE3)pLysS と pET15b は Novagen のものを使用した。4-chloroacetoamido-4'-sulfo-azobenzene (CASAB)は当研究室で既に確立された方法によって合成したものを用いた。その他の試薬は断りのない限り Wako の試薬を使用した。

また、超高速遠心機(超遠心)は Optima XE-90 Ultracentrifuge (BECKMAN COULTER, US)を使用し、小型超高速遠心機は himac CS 120GX (HITACHI, JPN)を使用し、高速遠心機は himac CR 22G (HITACHI, JPN)を使用した。小型高速遠心機は MX-150 (TOMY, JPN)を使用した。タンパク質定量などには、分光光度計の UVmini-1240 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER (SHIMADZU, JPN)を使用した。吸光スペクトラムの測定には U-3000 Spectrophotometer (HITACHI, JPN)を使用した。蛍光分光光度計は、F2500 Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI, JPN)を使用した。CD スペクトラムの測定は、Chirascan(Applied Photophysics, UK)を使用した。マイクロプレートリーダーは iMark microplate reader (biorad)を使用した。PCR は PC707 (Astec)を使用した。オートクレーブには AUTOCLAVE SS-325(TOMY)を使用した。少量培養の場合は超音波破砕に Bioruptor (COSMO BIO)を使用し、大量培養の場合は、超音波破砕に VP-30S CULTRAS. HOMOGENIZER (TAITEC)を使用した。

2.3.2 Human H-Ras の調製

H-Ras WT(1-189)(pET42c)の cDNA は、佐甲靖志博士（国立研究開発法人理化学研究所主任研究員）より分けていただいた。タンパク発現用大腸菌 E.coli Rosetta2(DE3)pLys2 を形質転換し、LB-Kna 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 4 mM NaOH, 50 μg/ml kanamycin で一晩倒置培養を 37°C で行った。シングルコロニーを LB-Kna 培地 5 mL: 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 50 μg/ml kanamycin に植菌し、37 °C で一晩振盪培養した。一晩前培養させた培養液を新たな LB-Kna 培地 4.8 ml に 200 μl 植菌し、37°C で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、18℃で 24 時間振盪培養させた。菌液を高速遠心(1,500 x g, 15 min, 4°C)し、沈殿に PBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Sodium phosphate, 1.47 mM Potassium phosphate 300 μl を加え再懸濁し、15 分間(ON:30 sec, OFF:30 sec)超音波破砕した。高速遠心(16 Krpm, 20 分, 4°C)し、上清と沈殿に分け、沈殿に PBS 400 μl を加え再懸濁し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。

Rasタンパクは以下の方法で大量培養と精製を行った。少量培養でタンパク質の発現を確認できたコロニーの培養液150μLを、300 ml三角フラスコに入れたLB-Kna培地150 mLに植菌し、一晩浸透培養させた。2 L三角フラスコに対してLB培地1Lを入れて、計6 LのLB培地をオートクレーブした。冷えてからKanamycinを最終濃度50 μg/mLになるように加え、LB-Kna培地1Lに対し一晩前培養させた培養液20 mlを加えて37ºCで振盪培養させた。OD600=0.4-0.6になったらIPTGを最終濃度0.5 mMになるように加え、24時間18ºCで振盪培養させた。　その後、高速遠心により集菌し、沈殿を1 Lあたり10 ml HEM buffer: 10 mM HEPES , pH7.2 , 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 25 mM NaClで懸濁し、50 mLコーニングチューブ 3 本に分け高速遠心により菌体を沈殿させ、上清を捨て菌体のみを-80ºCで保存した。

大腸菌封入体からRasをCo2+キレートカラム(1.6×3 cm)を用いて2.5 ml/minの流速で精製した。保存した菌体を解凍し1L培地あたりの菌体に対し10 mLのSonication buffer: 500 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH7.0, 1 mM MgCl2, 0.2 mM β-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 0.8 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Pepstatin を加え懸濁した。懸濁液を氷上で超音波破砕（ON:30 sec, OFF:90 sec×5回）した。超遠心管に移し、45 Ti ローター（Beckman)で超遠心(200,000 × g, 1時間, 4ºC)した。Coキレートカラムにカラム体積5倍量のEquilibrium buffer: 20 mM MOPS, pH7.0, 500 mM NaCl,1 mM MgCl2, 0.2 mM β-mercaptoethanol を流して安定化させてから、超遠心した上精サンプルをカラムにアプライし、Rasをカラムへと吸着させた。Wash buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 5 mM Imidazole, 0.2 mM β-mercaptoethanol で十分に洗い、Elution buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 200 mM Imidazole, 0.2 mM β-mercaptoethanolにより、Rasを溶出させフラクションコレクターを用いて分取した。溶出液をSDS-PAGEにより、タンパク質の精製の確認を行なった。精製したRasを透析膜に移しスクロースにより一晩濃縮した。その後、Dialysis buffer:30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTTの溶液1Lで1時間の透析を2回行った後、2Lで4℃において一晩透析した。VIVASPIN 20ml 10,000 MWCO PES (VIVA SCIENCE)を用いて遠心(4,500-5,500 × g, 4ºC)により濃縮し、超遠心(HITACHI)を行った。マイクロビュレットを用いて濃度決定をした後、液体窒素にエッペンドルフチューブを入れて冷やしながら50 μlずつ分注して急速凍結し、-80ºCで保存した。

2.3.3 Human Sos1(564-1049)の調製

Human Sos(564-1049)のcDNAはpET15bのマルチクローニングサイトへ導入するための設計をした。5’末端にNde1の認識配列、3’末端にBamH1の認識配列を組み込み、His-tagはpET15b由来のものを使用した。設計したDNA配列はIntegrated DNA Technologies

(IDT, JPN)に合成依頼をした。合成 DNA 1000ng を 100 μL TE buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA に溶解し、合成 DNA の一部と pET15b を Nde1 及び BamH1 を用いて 37℃で 20 時間制限酵素処理をした。制限酵素処理をした溶液を 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて DNA をゲルから精製した。精製した pET15b と合成 DNA をモル比 1:3 となるように混合し、15℃で 30 分ライゲーションを行った。ライゲーション溶液を大腸菌 DH5αに形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5 %NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin に塗布し、37℃で一晩倒置培養した。100 μg/ml ampicillin を含む 3 mL 2×YT: 1.6% bacto-triptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl にシングルコロニーから植菌し、37℃で一晩浸透培養した。培養液を 1.5 ml エッペンに移し、遠心(15 Krpm, 5 分, 4 ºC)し、上清を捨て沈殿に 100 μL Solution 1: Solution I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA を加えピペッティングし、200 μL Solution II: 0.2 N NaOH, 1% SDS を加え 8 回倒立攪拌し、5 分間氷上でインキュベートした。150 μL Solution III: 5 M AcNa を加え 8 回倒立攪拌し、3 分間氷上でインキュベートした。遠心(15 Krpm, 5 分, 4ºC)し、400 uL フェノール・クロロホルムを分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(15 Krpm, 5 min, 4 ºC)し、800 uL 100% EtOH を分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、上清を捨て沈殿に 1mL 70% EtOH を添加し、遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、沈殿をロータリーエバポレーターで 15 分間乾燥した。乾燥後、20 uL TE+RNase Buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 30 μg/ml RNase A を加え、15 分間 37 ºC でインキュベートし、プラスミドを回収した。得られたプラスミドでタンパク発現用大腸菌 E.coli Rosetta2(DE3)pLys2 を形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin で一晩倒置培養を 37ºC で行った。シングルコロニーを LB-Amp 培地 5 mL: 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 100 μg/ml ampicillin に植菌し、37 ºC で一晩振盪培養した。一晩前培養させた培養液を新たな LB-Amp 培地 4.8 ml に 200 μl 植菌し、37ºC で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、37℃で 4 時間振盪培養させた。菌液を高速遠心(1,500 x g, 15 min, 4ºC)し、沈殿に PBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Sodium phosphate, 1.47 mM Potassium phosphate 300 μl を加え再懸濁し、15 分間(ON:30 sec, OFF:30 sec)超音波破砕した。高速遠心(16 Krpm, 20 分, 4ºC)し、上清と沈殿に分け、沈殿に PBS 300 μl を加え再懸濁し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。

Sos は以下の方法で大量培養と精製を行った。少量培養でタンパク質の発現を確認できたコロニーの培養液 150μL を、500 ml 三角フラスコに入れた LB-Amp 培地 150 mL に植菌し、一晩浸透培養させた。2 L 三角フラスコに対して LB 培地 1L を入れて、計 6 L の LB 培地をオートクレーブした。冷えてから ampicillin を最終濃度 100 μg/mL になるように加え、LB-Amp 培地 1L に対し一晩前培養させた培養液 20 ml を加えて 37ºC で振盪培養させ

た。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、37ºC で 4 時間振盪培養させた。　その後、高速遠心により集菌し、沈殿を 1 L あたり 10 ml HEM buffer: 10 mM HEPES , pH7.2 , 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 25 mM NaCl で懸濁し、50 mL コーニングチューブ 3 本に分け高速遠心により菌体を沈殿させ、上清を捨て菌体のみを-80ºC で保存した。

　大腸菌封入体から Sos を Co2+キレートカラム(1.6×3 cm)を用いて 2.5 ml/min の流速で精製した。保存した菌体を解凍し 1L 培地あたりの菌体に対し 10 mL の Sonication buffer: 500 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH7.0, 1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.8 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Pepstatin を加え懸濁した。懸濁液を氷上で超音波破砕（ON:30 sec, OFF:90 sec×5 回）した。超遠心管に移し、 45 Ti ローター（Beckman）で超遠心(200,000 × g, 1 時間, 4ºC)した。Co キレートカラムにカラム体積 5 倍量の Equilibrium buffer: 20 mM MOPS, pH7.0,　500 mM NaCl,1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT を流して安定化させてから、超遠心した上精サンプルをカラムにアプライし、Sos をカラムへと吸着させた。Wash buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 5 mM Imidazole, 0.2 mM DTT で十分に洗い、Elution buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 200 mM Imidazole, 0.2 mM DTT により、Sos を溶出させフラクションコレクターを用いて分取した。溶出液を SDS-PAGE により、タンパク質の精製の確認を行なった。精製した Sos を VIVASPIN20 5000 MWCO PES (SARTORIUS)を用いて濃縮し、Dialysis buffer:30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTT, 0.1% CHAPS で透析した。超遠心(HITACHI)を行ったあとマイクロビュレットを用いて濃度決定をし、液体窒素にエッペンドルフチューブを入れて冷やしながら 25 μl ずつ分注して急速凍結し、-80ºC で保存した。

2.3.4 Cys-lite Human NF1(1195-1528)の調製

 NF1(1195-1528) Cys-lite pET21a の調製は Rufiat Nahar らが確立した方法にしたがって行った。NF1 cDNA でタンパク発現用大腸菌 E.coli Rosetta2(DE3)pLys2 を形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin で一晩倒置培養を 37ºC で行った。シングルコロニーを LB-Amp 培地 5 mL: 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 100 μg/ml ampicillin に植菌し、37 ºC で一晩振盪培養した。一晩前培養させた培養液を新たな LB-Amp 培地 4.8 ml に 200 μl 植菌し、37ºC で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、37℃で 4 時間振盪培養させた。菌液を高速遠心(1,500 x g, 15 min, 4ºC)し、沈殿に PBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Sodium phosphate, 1.47 mM Potassium phosphate 300 μl を加え再懸濁し、15 分間(ON:30 sec,

OFF:30 sec)超音波破砕した。高速遠心(16 Krpm, 20 分, 4ºC)し、上清と沈殿に分け、沈殿に PBS 300 μl を加え再懸濁し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。

NF1 は以下の方法で大量培養と精製を行った。少量培養でタンパク質の発現を確認できたコロニーの培養液 150μL を、500 ml 三角フラスコに入れた LB-Amp 培地 150 mL に植菌し、一晩浸透培養させた。2 L 三角フラスコに対して LB 培地 1L を入れて、計 6 L の LB 培地をオートクレーブした。冷えてから ampicillin を最終濃度 100 μg/mL になるように加え、LB-Amp 培地 1L に対し一晩前培養させた培養液 20 ml を加えて 37ºC で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、37ºC で 4 時間振盪培養させた。　その後、高速遠心により集菌し、沈殿を 1 L あたり 10 ml HEM buffer: 10 mM HEPES , pH7.2 , 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 25 mM NaCl で懸濁し、50 mL コーニングチューブ 3 本に分け高速遠心により菌体を沈殿させ、上清を捨て菌体のみを-80ºC で保存した。

大腸菌封入体から NF1 を Co2+キレートカラム(1.6×3 cm)を用いて 2.5 ml/min の流速で精製した。保存した菌体を解凍し 1L 培地あたりの菌体に対し 10 mL の Sonication buffer: 500 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH7.0, 1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.8 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Pepstatin を加え懸濁した。懸濁液を氷上で超音波破砕 (ON:30 sec, OFF:90 sec×5 回) した。超遠心管に移し、45 Ti ローター (Beckman) で超遠心(200,000 × g, 1 時間, 4ºC)した。Co キレートカラムにカラム体積 5 倍量の Equilibrium buffer: 20 mM MOPS, pH7.0, 500 mM NaCl,1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT を流して安定化させてから、超遠心した上精サンプルをカラムにアプライし、NF1 をカラムへと吸着させた。Wash buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 5 mM Imidazole, 0.2 mM DTT で十分に洗い、Elution buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 200 mM Imidazole, 0.2 mM DTT により、NF1 を溶出させフラクションコレクターを用いて分取した。溶出液を SDS-PAGE により、タンパク質の精製の確認を行なった。精製した NF1 を VIVASPIN20 5000 MWCO PES (SARTORIUS)を用いて濃縮し、Dialysis buffer:30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTT で透析した。超遠心(HITACHI)を行ったあとマイクロビュレットを用いて濃度決定をし、液体窒素にエッペンドルフチューブを入れて冷やしながら 25 μl ずつ分注して急速凍結し、-80ºC で保存した。

2.3.5 GTPase サイクル活性測定

HRas によって加水分解された GTP 濃度(GTPase 活性)を測定した。GTPase 活性は以前に確立された方法で行った。4 μM HRas、2 μM Sos、2 μM NF1 を GTPase 活性測定バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 60 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で 10 分間インキュベート

し、GTP を最終濃度 1 mM になるように加え GTPase サイクルを開始させた。25℃で 30 分インキュベート後、反応液の 2 倍量の 10% TCA を加えて GTPase サイクル反応を止めた。高速遠心(15Krpm, 4℃, 5 分)し、上清 50 μL を BioMol Green Reagent 100 μL と混合し、25℃で 30 分インキュベート後、吸光度 630 nm をマイクロプレートリーダーで測定した。

2.3.6 Sos 変異体の調製

チオール基反応性官能基を持つフォトクロミック分子を修飾するための Sos 変異体を設計した。Human Sos(564-1049)は 5 残基のシステインを持ち、内 3 残基のシステイン: C635, C838, C980 は表面に位置している。これらのシステインをセリンへと置換し、さらにアロステリックドメインの近傍に位置する Ser 732 をシステインへと置換したアミノ酸配列を大腸菌のコドン使用頻度に留意し DNA 配列へと変換した。この DNA 配列を pET15b のマルチクローニングサイトへ導入するための設計をした。5'末端に Nde1 の認識配列、3'末端に BamH1 の認識配列を組み込み、His-tag は pET15b 由来のものを使用した。設計した DNA 配列は Integrated DNA Technologies (IDT, JPN)に合成依頼をした。合成 DNA 1000ng を 100μL TE buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA に溶解し、合成 DNA の一部と pET15b を Nde1 及び BamH1 を用いて 37℃で 20 時間制限酵素処理をした。制限酵素処理をした溶液を 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて DNA をゲルから精製した。精製した pET15b と合成 DNA をモル比 1:3 となるように混合し、15℃で 30 分ライゲーションを行った。ライゲーション溶液を大腸菌 DH5α に形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5 %NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin に塗布し、37℃で一晩倒置培養した。100 μg/ml ampicillin を含む 3 mL 2×YT: 1.6% bacto-triptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl にシングルコロニーから植菌し、37℃で一晩浸透培養した。培養液を 1.5 ml エッペンに移し、遠心(15 Krpm, 5 分, 4 ºC)し、上清を捨て沈殿に 100 μL Solution 1: Solution I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA を加えピペッティングし、200 μL Solution II: 0.2 N NaOH, 1% SDS を加え 8 回倒立攪拌し、5 分間氷上でインキュベートした。150 μL Solution III: 5 M AcNa を加え 8 回倒立攪拌し、3 分間氷上でインキュベートした。遠心(15 Krpm, 5 分, 4ºC)し、400 uL フェノール・クロロホルムを分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(15 Krpm, 5 min, 4 ºC)し、800 uL 100% EtOH を分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、上清を捨て沈殿に 1mL 70% EtOH を添加し、遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、沈殿をロータリーエバポレーターで 15 分間乾燥した。乾燥後、20 uL TE+RNase Buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 30 μg/ml RNase A を加え、15 分間 37 ºC でインキュベ

ートし、プラスミドを回収した。

得られたプラスミド: S732C を鋳型にシスライト変異体を作成した。フォワードプライマー（5'-AGCATCACCAAGATCATCCAGCGCAAGAAAATC -3'）、リバースプライマー(5'-CTCCAC CCACTTCTTCATGGCTTTGCCGCGAAC)を合成し、これらのプライマーを用いて PCR をし、Sos Cys-lite DNA を増幅させた。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて DNA をゲルから精製した。精製した pET15b と合成 DNA をモル比 1:3 となるように混合し、15℃で 30 分ライゲーションを行った。ライゲーション溶液を大腸菌 DH5αに形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5 %NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin に塗布し、37℃で一晩倒置培養した。100 μg/ml ampicillin を含む 3 mL 2×YT: 1.6% bacto-triptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl にシングルコロニーから植菌し、37℃で一晩浸透培養した。培養液を 1.5 ml エッペンに移し、遠心(15 Krpm, 5 分, 4 ºC)し、上清を捨て沈殿に 100 μL Solution 1: Solution I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA を加えピペッティングし、200 μL Solution II: 0.2 N NaOH, 1% SDS を加え 8 回倒立攪拌し、5 分間氷上でインキュベートした。150 μL Solution III: 5 M AcNa を加え 8 回倒立攪拌し、3 分間氷上でインキュベートした。遠心(15 Krpm, 5 分, 4ºC)し、400 uL フェノール・クロロホルムを分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(15 Krpm, 5 min, 4 ºC)し、800 uL 100% EtOH を分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、上清を捨て沈殿に 1mL 70% EtOH を添加し、遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、沈殿をロータリーエバポレーターで 15 分間乾燥した。乾燥後、20 uL TE+RNase Buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 30 μg/ml RNase A を加え、15 分間 37 ºC でインキュベートし、プラスミドを回収した。

得られたプラスミド: シスライト変異体を鋳型にシングルシステイン変異体を作成した。K679C 作製用であるフォワードプライマー (5'-TGCGAGTACATCCAACCGGTGCAGCTGC GTGTG -3')、リバースプライマー (5'-GCGGAAGCGCTTGAGCTCCGCACTC -3')、S881C 作製用であるフォワードプライマー (5'- GCTGTTCATCGCGCTCACCACTTCC -3')、リバースプライマー (5'-GCTGTTCATCGCGCTCACCACTTCC -3')、H905C 作製用であるフォワードプライマー (5'- TGCGAACTGAGTGAAGACCACTACAAGAAATATC -3')、リバースプライマー (5'-GGCCTCCTCCAGAATCTTTTTCTGGCGACTCG -3')、H911C 作製用であるフォワードプライマー（5'- TGCTACAAGAAATATCTGGCGAAGCTGCGCAGC -3'）、リバースプライマー（5'- GTCTTCACTCAGTTCATGGGCCTCCTC -3'）、L1014C 作製用であるフォワードプライマー（5'- TGCGAAATCGAGCCACGCAATCCAAAACCACTG -3'）、リバースプライマー（5'- ACT CTTGTTGAACAGATAGTCCGTGAACTC -3'）、R1019C 作製用であるフォワードプライマー (5'-

TGCAATCCAAAACCACTGCCACGCTTCCCGAAGAAGTAC -3')、リバースプライマー(5'- TGGCTCGATTTCCAGACTCTTGTTGAACAG -3')をそれぞれ合成し、これらのプライマーを用いて PCR を行い、Sos 変異体 DNA を増幅させた。PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて DNA をゲルから精製した。上記の S732C 作製と同様の手法を用いてそれぞれのプラスミドを回収した。

得られたそれぞれのプラスミド: シスライト、K679C、S732C、S881C、H905C、H911C、L1014C、R1019C でタンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS を形質転換し、先述した手法と同様に少量培養をしタンパク質発現を確認した。

Sos 変異体は以下の方法で大量培養と精製を行った。少量培養でタンパク質の発現を確認できたコロニーの培養液 150 μL を、500 ml 三角フラスコに入れた LB-Amp 培地 150 mL に植菌し、一晩浸透培養させた。2 L 三角フラスコに対して LB 培地 1L を入れて、計 6 L の LB 培地をオートクレーブした。冷えてから ampicillin を最終濃度 100 μg/mL になるように加え、LB-Amp 培地 1L に対し一晩前培養させた培養液 20 ml を加えて 37°C で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、18℃で 24 時間振盪培養させた。 その後、高速遠心により集菌し、沈殿を 1 L あたり 10 ml HEM buffer: 10 mM HEPES , pH7.2 , 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 25 mM NaCl で懸濁し、50 mL コーニングチューブ 3 本に分け高速遠心により菌体を沈殿させ、上清を捨て菌体のみを-80°C で保存した。

大腸菌封入体から Sos 変異体を Co2+キレートカラム(1.6×3 cm)を用いて 2.5 ml/min の流速で精製した。保存した菌体を解凍し 1L 培地あたりの菌体に対し 10 mL の Sonication buffer: 500 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH7.0, 1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.8 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Pepstatin を加え懸濁した。懸濁液を氷上で超音波破砕（ON:30 sec, OFF:90 sec×5 回）した。超遠心管に移し、 45 Ti ローター (Beckman)で超遠心(200,000 × g, 1 時間, 4°C)した。Co キレートカラムにカラム体積 5 倍量の Equilibrium buffer: 20 mM MOPS, pH7.0, 500 mM NaCl,1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT を流して安定化させてから、超遠心した上精サンプルをカラムにアプライし、Sos 変異体をカラムへと吸着させた。Wash buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 5 mM Imidazole, 0.2 mM DTT で十分に洗い、Elution buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 200 mM Imidazole, 0.2 mM DTT により、Sos 変異体を溶出させフラクションコレクターを用いて分取した。溶出液を SDS-PAGE により、タンパク質の精製の確認を行なった。精製した Sos 変異体を VIVASPIN20 5000 MWCO PES (SARTORIUS)を用いて濃縮し、S732C 変異体は Dialysis buffer: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTT で透析し、その他の変異体は Dialysis buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTT で透析した。超遠心(HITACHI)を行ったあとマイクロビュレットを用いて濃度決定をし、液体窒素にエッペン

ドルフチューブを入れて冷やしながら分注して急速凍結し、-80ºC で保存した。

2.3.7 アゾベンゼン誘導体の光異性化測定

室温で 5 cm 離れたところから PAM、CASAB、AABM、SABM に対し光照射を行い光異性化した。100% DMF 中 の 20μM のアゾベンゼン誘導体の trans から cis への異性化は Black-Ray lamp(16W)(UVP Inc.,San Gabrial, USA)を使用し紫外線照射(366nm)を行い、cis から trans への異性化は、 紫外線照射(366nm)を 20 分間行ったアゾベンゼン誘導体に対して ＬＤＬ－42W H(6.5W)(オーム電機, Japan)を使用し可視光照射を行った。吸収スペクトルは U-3000 spectrophotometer (HITACHI 社)を 用いて測定した。

2.3.8 アゾベンゼン誘導体の修飾条件検討

2.3.8.1 Sos 変異体への PAM 修飾

アゾベンゼン誘導体を Sos 変異体に修飾する最適修飾条件を決定するために反応時間依存性と濃度依存性を IAE-DANS によるバックタイトレーションを用いて測定した。まず修飾バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で十分に湿潤させた Sephadex G25 fine をセントリカット超ミニ W-MO に充填し、高速遠心(3Krpm, 4℃, 3 分)を行った。Sos 変異体を溶液体積が 50 μL を超えないよう調製し、カラム表面にサンプルをアプライし、高速遠心(3 Krpm, 4℃, 3 分)をして DTT を除去した。溶出したタンパク質の濃度はブラッドフォード法で定量した。次に反応時間依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対して 10 μM PAM を加えて反応を開始し、25℃で 0-30 分反応させた。濃度依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対し 0-25 μM の PAM を加えて反応を開始し、25℃で 30 分反応させた。IAE-DANS を最終濃度 100 μM になるよう加え、25℃で 10 分反応し、DTT を最終濃度 2 mM になるように加えて反応を止めた。30 μL 反応液と 30 μL 2×SDS sample buffer: を混合し、熱処理した後 10%均一ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。泳動後、SAYACA imager で UV lamp を照射しながら撮影を行った。撮影したデータを imageJ でゲルの画像解析を行い、IAE-DANS の輝度から PAM の最適な修飾条件を決定した。最適な条件で PAM 修飾を行った Sos 変異体は 10DG カラムを用いて精製し、光制御実験を行った。

2.3.8.2 Sos 変異体への CASAB 修飾

アゾベンゼン誘導体を Sos 変異体に修飾する最適修飾条件を決定するために反応時間依存性と濃度依存性を IAE-DANS によるバックタイトレーションを用いて測定した。まず修飾バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で十分に湿潤させた Sephadex G25 fine をセントリカット超ミニ W-MO に充填し、高速遠心(3Krpm, 4℃, 3 分)を行った。Sos 変異体を溶液体積が 50 μL を超えないよう調製し、カラム表面にサンプルをアプライし、高速遠心(3 Krpm, 4℃, 3 分)をして DTT を除去した。溶出したタンパク質の濃度はブラッドフォード法で定量した。次に反応時間依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対して 100 μM CASAB を加えて反応を開始し、25℃で 0-25 時間反応させた。濃度依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対し 0-200 μM CASAB を加えて反応を開始し、25℃で 30 分反応させせた。IAE-DANS を最終濃度 100 μM になるよう加え、25℃で 10 分反応し、DTT を最終濃度 2 mM になるように加えて反応を止めた。30 μL 反応液と 30 μL 2×SDS sample buffer: を混合し、熱処理した後 10%均一ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。泳動後、SAYACA imager で UV lamp を照射しながら撮影を行った。撮影したデータを imageJ でゲルの画像解析を行い、IAE-DANS の輝度から CASAB の最適な修飾条件を決定した。

2.3.8.3 Sos 変異体への AABM 修飾

アゾベンゼン誘導体を Sos 変異体に修飾する最適修飾条件を決定するために反応時間依存性と濃度依存性を IAE-DANS によるバックタイトレーションを用いて測定した。まず修飾バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で十分に湿潤させた Sephadex G25 fine をセントリカット超ミニ W-MO に充填し、高速遠心(3Krpm, 4℃, 3 分)を行った。Sos 変異体を溶液体積が 50 μL を超えないよう調製し、カラム表面にサンプルをアプライし、高速遠心(3 Krpm, 4℃, 3 分)をして DTT を除去した。溶出したタンパク質の濃度はブラッドフォード法で定量した。次に反応時間依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対して 10 μM AABM を加えて反応を開始し、25℃で 0-30 分反応させた。濃度依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対し 0-25 μM AABM を加えて反応を開始し、25℃で 30 分反応させた。IAE-DANS を最終濃度 100 μM になるよう加え、25℃で 10 分反応し、DTT を最終濃度 2 mM になるように加えて反応を止めた。30 μL 反応液と 30 μL 2×SDS sample buffer: を混合し、熱処理した後 10%均一ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。泳動後、SAYACA imager で UV lamp を照射しながら撮影を行った。撮影したデータを imageJ でゲルの画像解析を行い、IAE-DANS の輝度から AABM の最適な修飾条件を決定した。

2.3.8.4 Sos 変異体への SABM 修飾

アゾベンゼン誘導体を Sos 変異体に修飾する最適修飾条件を決定するために反応時間依存性と濃度依存性を IAE-DANS によるバックタイトレーションを用いて測定した。まず修飾バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で十分に湿潤させた Sephadex G25 fine をセントリカット超ミニ W-MO に充填し、高速遠心(3Krpm, 4℃, 3 分)を行った。Sos 変異体を溶液体積が 50 μL を超えないよう調製し、カラム表面にサンプルをアプライし、高速遠心(3 Krpm, 4℃, 3 分)をして DTT を除去した。溶出したタンパク質の濃度はブラッドフォード法で定量した。次に反応時間依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対して 50 μM SABM を加えて反応を開始し、25℃で 0-30 分反応させた。濃度依存性測定の場合は、5 μM Sos 変異体に対し 0-50 μM SABM を加えて反応を開始し、25℃で 30 分反応させた。IAE-DANS を最終濃度 100 μM になるよう加え、25℃で 10 分反応し、DTT を最終濃度 2 mM になるように加えて反応を止めた。30 μL 反応液と 30 μL 2×SDS sample buffer: を混合し、熱処理した後 10%均一ゲルを用いて SDS-PAGE を行った。泳動後、SAYACA imager で UV lamp を照射しながら撮影を行った。撮影したデータを imageJ でゲルの画像解析を行い、IAE-DANS の輝度から SABM の最適な修飾条件を決定した。

2.3.9　アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた GTPase サイクル活性測定

室温で 5 cm 離れたところから Sos 変異体に修飾したアゾベンゼン誘導体に対し光照射を行い光異性化した。測定 は 20 μM アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体 を用いて 30 mM Tris-HCl, pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 中で行った。trans から cis への異性化は Black-Ray lamp(16W)(UVP Inc.,San Gabrial, USA)を使用し紫外線照射(366nm)を行い、cis から trans への異 性化は、紫外線照射(366nm)を 10 分間行った PAM に対して L D L－42W H(6.5W)(オーム電機, Japan)を使用し可視光照射を行った。吸収スペクトルは U-3000 spectrophotometer (HITACHI 社)を 用いて測定した。

2.3.10 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた GTPase サイクル活性測定

アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いて GTPase サイクル活性を測定した。反応開始前に、アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体に 366nm の紫外線ランプを 5 cm の距離から 5 分間、または可視光線を 5 cm の距離から 5 分間交互に照射し光異性化を行い、2 μM アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体、4 μM H-Ras、2 μM NF1 を GTPase 活性測定バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 60 mM NaCl, 2 mM MgCl2 で 10 分間インキュベートし、GTP を最終濃度 1 mM になるように加え GTPase サイクルを開始させた。25℃で 30 分インキュ

ベート後、反応液の 2 倍量の 10% TCA を加えて GTPase サイクル反応を止めた。またここまでの作業は暗室で行なった。高速遠心(15Krpm, 4℃, 5 分)し、上清 50 μL を BioMol Green Reagent 100 μL と混合し、25℃で 30 分インキュベート後、吸光度 630 nm をマイクロプレートリーダーで測定した。

2.4 結果

2.4.1 Human HRas の発現・精製

佐甲靖志博士より分けていただいた Human HRas pET42c は C 末端にベクター由来の His タグを持ち、全長 207 アミノ酸残基、分子量 23,224 となる。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Ras を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Ras を精製した(Fig.2-2)。

2.4.2 Human NF1 の発現・精製

IDT で合成したシスライト変異型 Human NF(1195-1528)を pET21a に Nde1 と Hind3 の制限酵素を用いて組み込んだ。NF1 pET21a は C 末端に His タグを持ち、全長 348 アミノ酸残基、分子量 39,588 となる。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で NF1 を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて NF1 を精製した(Fig.2-3)。

Human Sos の発現・精製

IDT で合成した Human Sos(564-1049)を pET15b に Nde1 と Xho1 の制限酵素を用いて組み込んだ(Fig.2-4)。Human Sos pET15b は N 末端にベクター由来の His タグをもち、全長 507 アミノ酸残基、分子量 59,260 となる。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した。透析の際に、可溶性の向上のため界面活性剤 CHAPS を最終濃度 0.1%になるように加えた(Fig.2-5)。

2.4.3 GTPase サイクル活性測定

Ras が本来持つ GTPase 活性は低く、NF1 を加えることで GTP の加水分解が促進され、Sos
を加えることで加水分解によって産生された GDP の GTP への交換が促進される。またイオン強度依存的に加水分解される GTP の量が変化することが確認された(Fig.2-7)。

2.4.4 Human Sos 変異体の発現・精製

2.4.5.1 Sos S732C 変異体の発現・精製

アロステリック結合部位近傍にシングルシステインを導入した Sos S732C 変異体を作製した(Fig.2-7)。IDT で合成した Human Sos　S732C を pET15b に Nde1 と Xho1 の制限酵素を用いて組み込んだ(Fig.2-8)。Human Sos S732C pET15b は N 末端にベクター由来の His タグをもち、全長 507 アミノ酸残基、分子量 59,228 となる。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos S732C を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した(Fig.2-9)。

2.4.5.2 Sos Cys-lite 変異体の発現・精製

Sos S732C pET15b を鋳型に Sos シスライト変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos Cys-lite を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した。1L 培養液から 28.3 mg の精製タンパク質を得ることができた(Fig.2-10)。

2.4.5.3 Sos S881C 変異体の発現・精製

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos S881C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos S881C を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した(Fig.2-11)。

2.4.5.4 Sos K679C 変異体の発現・精製

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos K679C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos K679C を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した(Fig.2-12)。

2.4.5.5 Sos H905C 変異体の発現・精製

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos H905C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発

現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos H905C を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した。

2.4.5.6 Sos H911C 変異体の発現・精製

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos H911C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos H911C を発現させたところ上清に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos を精製した。

2.4.5.7 Sos L1014C 変異体の発現

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos L1014C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos L1014C を発現させたところ沈殿に発現誘導が確認できたが、可溶画分には見られなかった。目的タンパク質を可溶化させるため IPTG で発現誘導後、18°Cで 24 時間浸透培養したが、可溶画分にはバンドは見られず改善はされなかった。

2.4.5.8 Sos R1019C 変異体の発現・精製

Sos Cys-lite pET15b を鋳型に Sos R1019C 変異体のプラスミドを調製した。タンパク質発現用大腸菌 Rosetta2(DE3)pLysS で Sos R1019C を発現させたところ沈殿に発現誘導が確認できたので、Co キレートカラムを用いて Sos の精製を試みた。しかし精製後タンパク質を含む溶液が白濁してしまったため、目的タンパク質を得ることはできなかった。

2.4.5 アゾベンゼン誘導体の光異性化と Sos 変異体への修飾条件

アゾベンゼン誘導体 PAM、CASAB、AABM、SABM(Fig.2-13)の吸光スペクトルは cis 状態と trans 状態でそれぞれ特有の吸光スペクトルを示す。trans-PAM は 330nm 付近に吸光極大をもち、紫外線照射によって cis-PAM へと光異性化し、それに伴い極大が減少する。PAM の吸収極大は紫外線照射 (366 nm)を 10 分間照射することで飽和に達し、可視光を 15 分間照射することによって吸光極大の増加が飽和に達した(Fig.2-14AB)。trans-CASAB と trans-SABM は 360nm 付近に吸光極大をもち、紫外線照射によって cis 型へと光異性化

し、それに伴い極大が減少する。CASAB の吸収極大は紫外線照射（366 nm)を 7 分間照射することで飽和に達し、可視光を 12 分間照射することによって吸光極大の増加が飽和に達した(Fig.2-14CD)。SABM の吸収極大は紫外線照射（366 nm)を 7 分間照射することで飽和に達し、可視光を 10 分間照射することによって吸光極大の増加が飽和に達した(Fig.2-14GH)。trans-AABM は 400nm 付近に吸光極大をもち、紫外線照射によって cis-AABM へと光異性化し、それに伴い極大は増加する。AABM の吸収極大は紫外線照射（366 nm)を 10 分間照射することで飽和に達し、可視光を 10 分間照射することによって吸光極大の減少が飽和に達した(Fig.2-14EF)。吸光スペクトラム測定によって各種アゾベンゼン誘導体が光可逆的に光異性化することが確認できた。

次にアゾベンゼン誘導体を Sos 変異体への修飾をおこなった。まず最適な修飾条件を決定するため、チオール基反応性蛍光試薬 IAE-DANS によるバックタイトレーションを用いて濃度依存性、時間依存性を解析した。Sos 変異体への PAM 修飾条件は、Sos 5μM に対し PAM 10μM、反応時間は 1 分で飽和した(Fig.2-15)。Sos 変異体への CASAB 修飾条件は、Sos 5μM に対し CASAB 100μM

、反応時間 15 時間で飽和に達した。Sos 変異体への AABM 修飾条件は、Sos 5μM に対し AABM10μM

、反応時間 1 分で飽和に達した。Sos 変異体への SABM 修飾条件は、Sos 5μM に対し SABM100μM

、反応時間 1 分で飽和に達した。これらの結果をもとに、最適な条件でアゾベンゼン誘導体を修飾した Sos 変異体を精製し、光照射に伴う吸光スペクトルの変化を測定した(Fig.2-18)。未修飾のアゾベンゼン誘導体と同様に光照射に伴って吸光スペクトルが変化していることから修飾してもアゾベンゼン誘導体の機能は損なわれていないことが示唆される。

2.4.6 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体を用いた HRas GTPase サイクル活性の光制御

2.4.6.1 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S732C 変異体

Sos S732C 変異体にチオール基反応性アゾベンゼン誘導体 PAM、CASAB、AABM、SABM を修飾し、H-Ras の GTPase サイクル活性の光制御を試みた。S732C はアロステリック結合部位の近傍に位置し、Sos による Ras のヌクレオチド交換反応のアロステリックな亢進を制御することを試みた。PAM 修飾 S732C 変異体(S732C-PAM)は、cis 型、trans 型ともに GTPase サイクル活性が未修飾 S732C 変異体に比べ 50%に減少した。また PAM の光異性体間で活性に優位な差は見られなかった(Fig.2-19A)。CASAB 修飾 S732C 変異体は、trans 型で GTPase サイクル活性は未修飾 S732C に比べ 60%にまで減少したが、cis 型は 95%の活性を有することが確認された(Fig.2-19B)。また光可逆的に活性の制御が可能なことも示された(Fig.2-20)。AABM 修飾 S732C 変異体は、cis 型は GTPase サイクル活性が未修飾

S732C に比べ 82%の活性を持ち、trans 型では 70%の活性を持つことが確認された。光異性体間で活性の差は見られたが優位な差は見られなかった(Fig.2-19C)。SABM 修飾 S732C 変異体は、cis 型、trans 型ともに GTPase サイクル活性が未修飾 S732C に比べ 50%以下に減少した。また光異性体間で活性に優位なさは見られなかった(Fig.2-19D)。これらの結果から、S732C へのアゾベンゼン誘導体修飾はある一定の光制御に有効であることが示唆された。PAM、AABM、SABM 修飾では光異性体間での活性の差が見られなかったが、CASAB 修飾では光異性体間で活性の差が見られた。Trans 状態に比べ Cis 状態の活性が高いことから、一つはアゾベンゼンの光異性化による立体障害が影響を及ぼしていると考えられる。また PAM では差が見られなかったことから、アゾベンゼンの para 位に付加されているスルホン酸も何らかの影響を与えていると考えられる。CASAB と同様にスルホン酸を持つ SABM 修飾で活性に差が見られなかったのは、チオール基からアゾベンゼンまでの距離の違いから、SABM の方がより Ras-Sos 間相互作用面に干渉してしまい、アゾベンゼンの光異性体での構造変化の差が表れにくくなったためと考えられる。

2.4.6.2 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S881C 変異体を用いた HRas GTPase サイクル活性の光制御

Sos S881C 変異体にチオール基反応性アゾベンゼン誘導体 PAM、CASAB、AABM、SABM を修飾し、HRas GTPas サイクル活性の光制御を試みた。S881C はカタリティック結合部位の近傍に位置し、Sos による Ras のヌクレオチド交換反応を直接的に制御することを試みた。S881C 変異体にアゾベンゼン誘導体修飾を行うと、未修飾の S881C 変異体と比べどれも活性が 50%近く減少することが明らかになった(Fig.2-21)。これは S881C がカタリティック結合部位の近傍にあるため、アゾベンゼン誘導体修飾により GDP 結合 Ras の結合がが立体障害的に阻害されてしまうためだと考えられる。

2.4.6.3 アゾベンゼン誘導体修飾 Sos K679C 変異体を用いた HRas GTPase サイクル活性の光制御

Sos K679C 変異体にチオール基反応性アゾベンゼン誘導体 PAM、CASAB、AABM、SABM を修飾し、HRas GTPas サイクル活性の光制御を試みた。K679C は S732C 同様にアロステリック結合部位の近傍に位置し、Sos による Ras のヌクレオチド交換反応のアロステリックな亢進を制御することを試みた。また S732C と比べ Ras-Sos 間相互作用面から少し離れた位置に存在する。 アゾベンゼン誘導体修飾 679C 変異体はどれも光異性体間で大きな活性の差は見られなかった(Fig.2-22)。また S881C 変異体に見られたアゾベンゼン誘導体修飾による劇的な活性の減少も見られなかった。これは K679C が Ras-Sos 間相互作用面から少

し離れた位置に存在するためであると考えられる。また面白いことに PAM 修飾と AABM 修飾では未修飾 K679C 変異体に比べ、活性が PAM 修飾で 20%、AABM 修飾で 10%程度上昇している(Fig.2-22AC)。これは Lys から Cys へと変異をすることで減少した活性がアゾベンゼン誘導体を修飾することで一部回復したと考えられる。このことからある程度の側鎖の長さが必要であり、また負電荷を持たない性質が Ras-Sos 間相互作用に関与していると予測される。

2.5 考察

新たに調製した野生型 Sos(564-1049)、また Sos 変異体(K679C、S732C、S881C)が生理活性を示した。Sos 変異体に 4 種のアゾベンゼン誘導体 PAM、CASAB、AABM、SABM 修飾を行い、それぞれの活性また光異性体間で活性の差を GTPase サイクル活性測定で確認した。Sos S732C 変異体に修飾したフォトクロミック分子アゾベンゼン誘導体 CASAB を光異性化させることによって GTPase サイクル活性が可逆的に光制御された。また Sos K679C 変異体にフォトクロミック分子アゾベンゼン誘導体 AABM を修飾したところ、未修飾 K679C 変異体に比べ高い GTPase サイクル活性を示した。

以上のことより光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック分子を用いることで、Sos と Ras の相互作用を光制御し GTPase サイクルを光制御できる可能性が示された。GTPase サイクル調節タンパクと同様にエフェクター(c-Raf, RalGDS など)との相互作用を光制御することで Ras の情報伝達を光制御が可能であることも期待される。

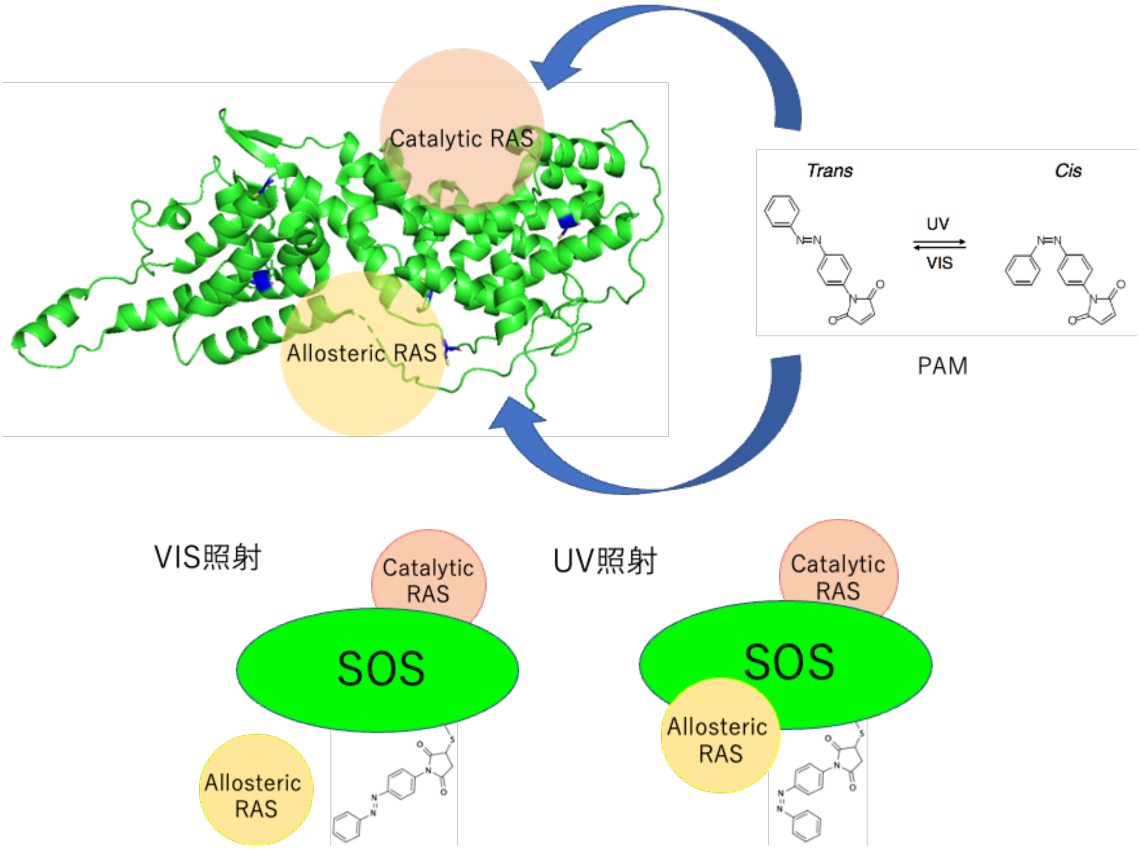


Fig. 2-1. 光応答性 Sos 変異体を用いた Ras 活性の光制御の模式図

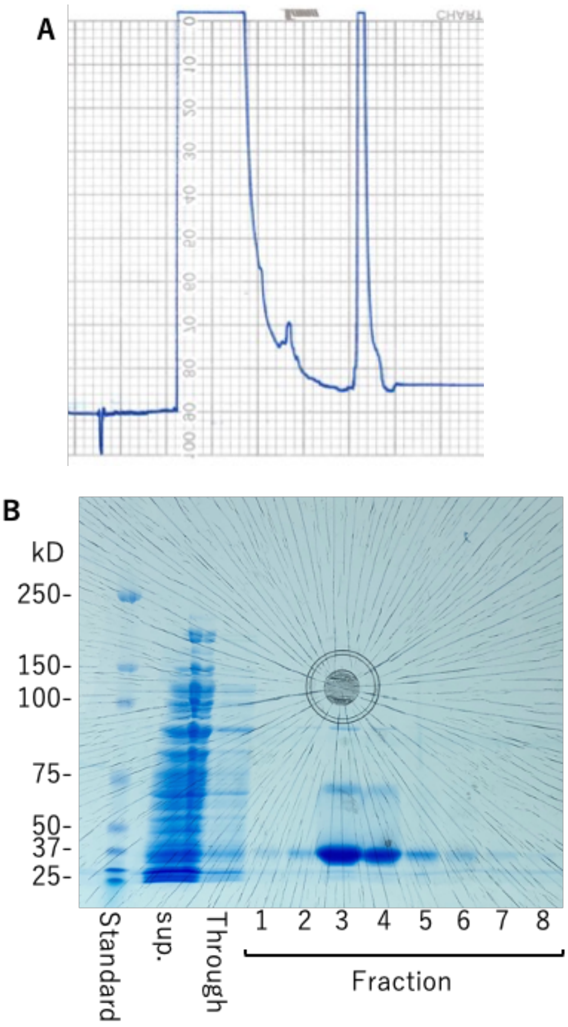


Fig. 2-2. HRAS WT の Co キレートカラム精製（A)HRAS WT 溶出曲線(Abs 280　nm)（B)5-20%グラジエント SDS-PAGE による溶出確認

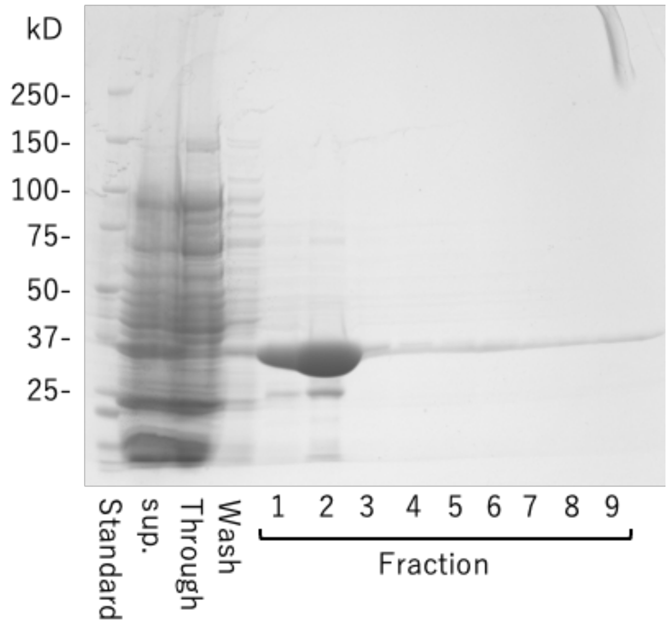


Fig. 2-3. NF1 の Co キレートカラム精製 10%均一 SDS-PAGE による溶出確認

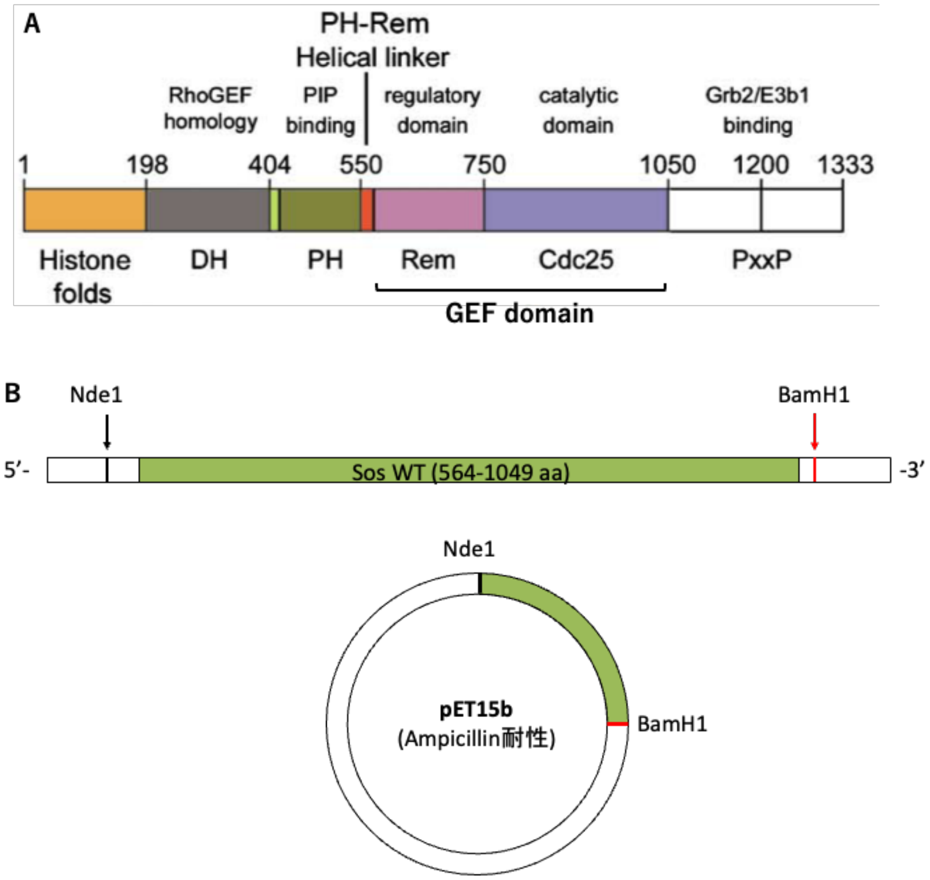


Fig. 2-4. Sos WT の DNA クローニング（A)Ras-GEF 機能を持つ GEF ドメイン（B)Sos WT DNA デザイン

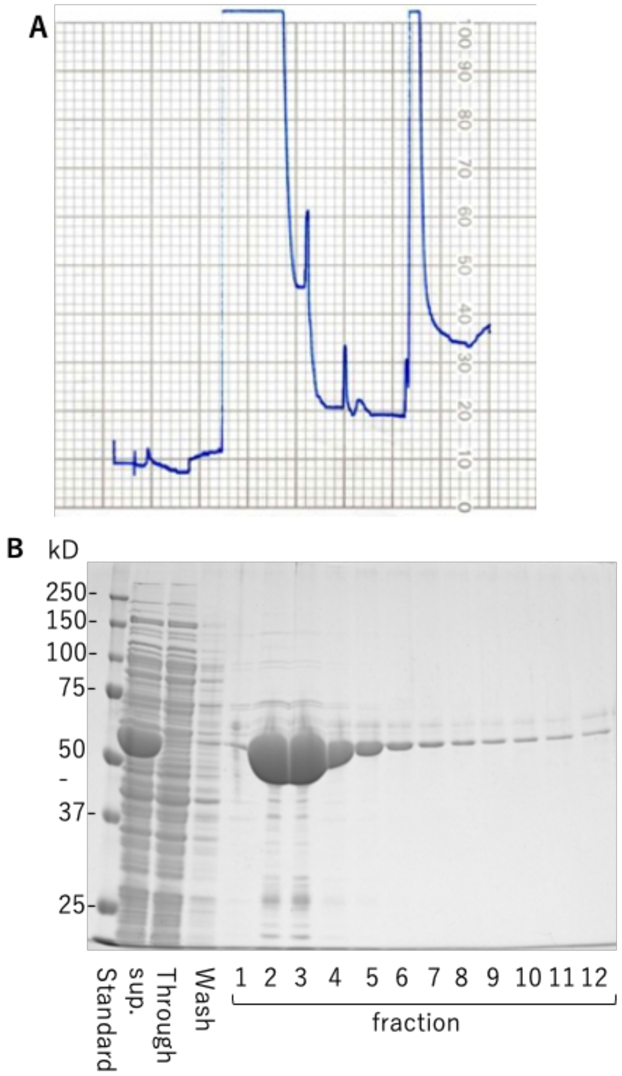


Fig. 2-5. Sos WT の Co キレートカラム精製 (A)Sos WT の溶出曲線(Abs 280 nm) (B)10% 均一 SDS-PAGE による溶出確認

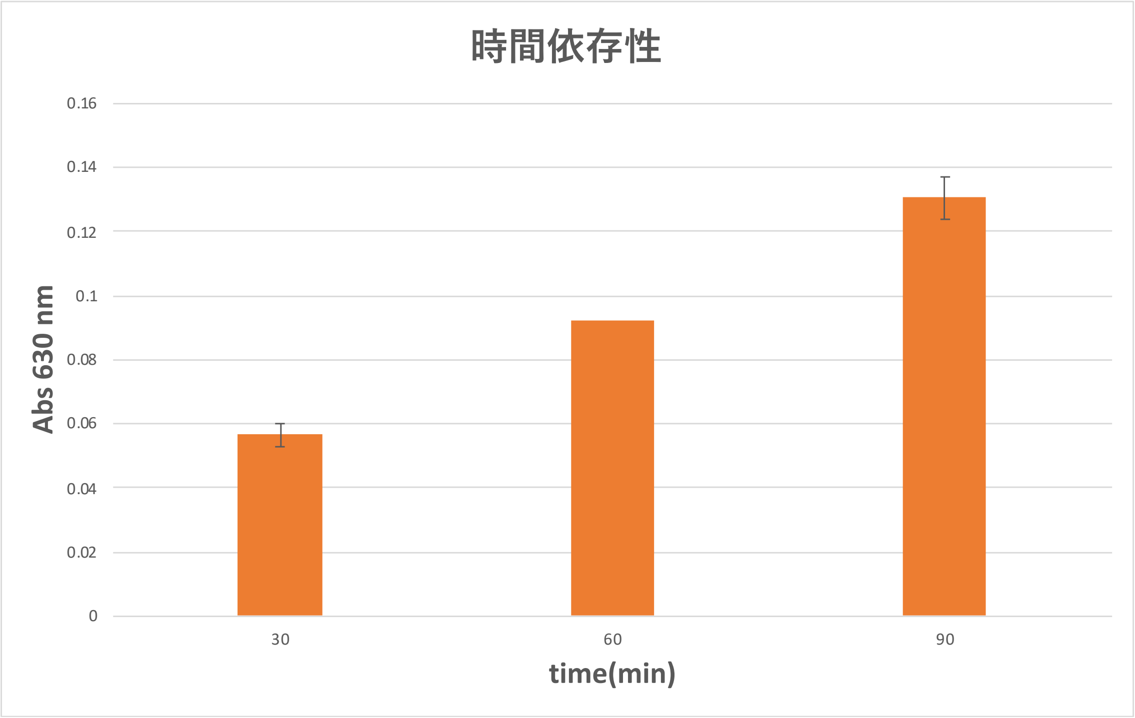


Fig. 2-6. HRas GTPase サイクル活性測定　(A)外部調節因子　(B)時間依存性（C)イオン強度依存性（D) GEF 濃度依存性（E)GAP 濃度依存性（F)HRas 濃度依存性

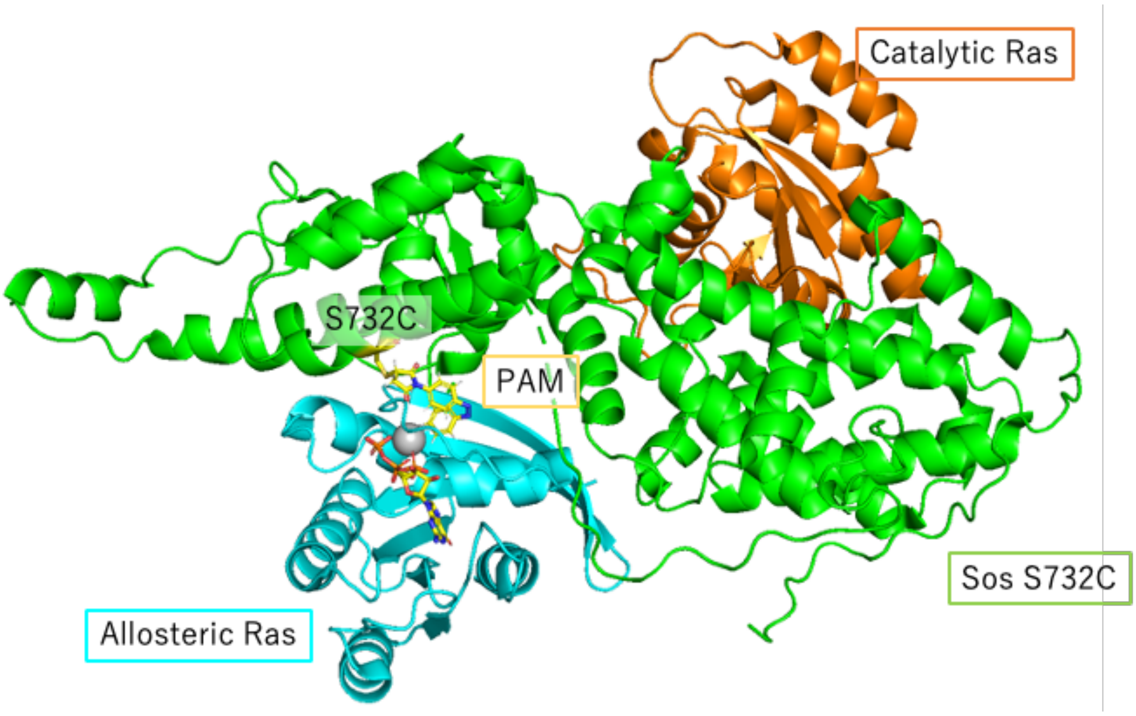


Fig. 2-7. PAM 修飾 Sos S732C のモデル構造

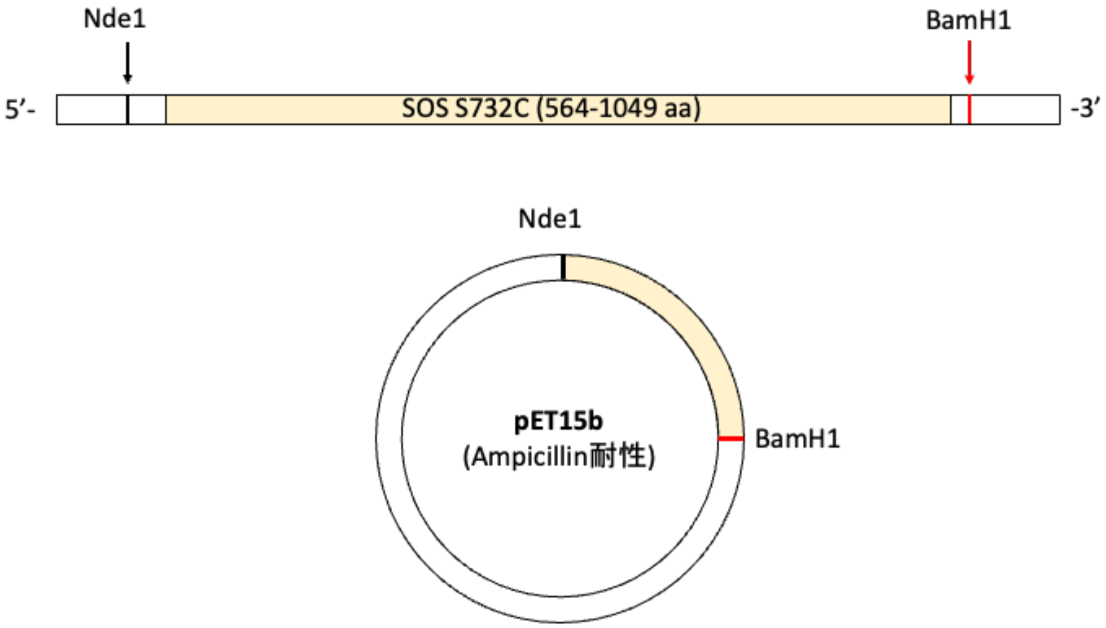


Fig. 2-8. Sos S732C インサート DNA のデザイン

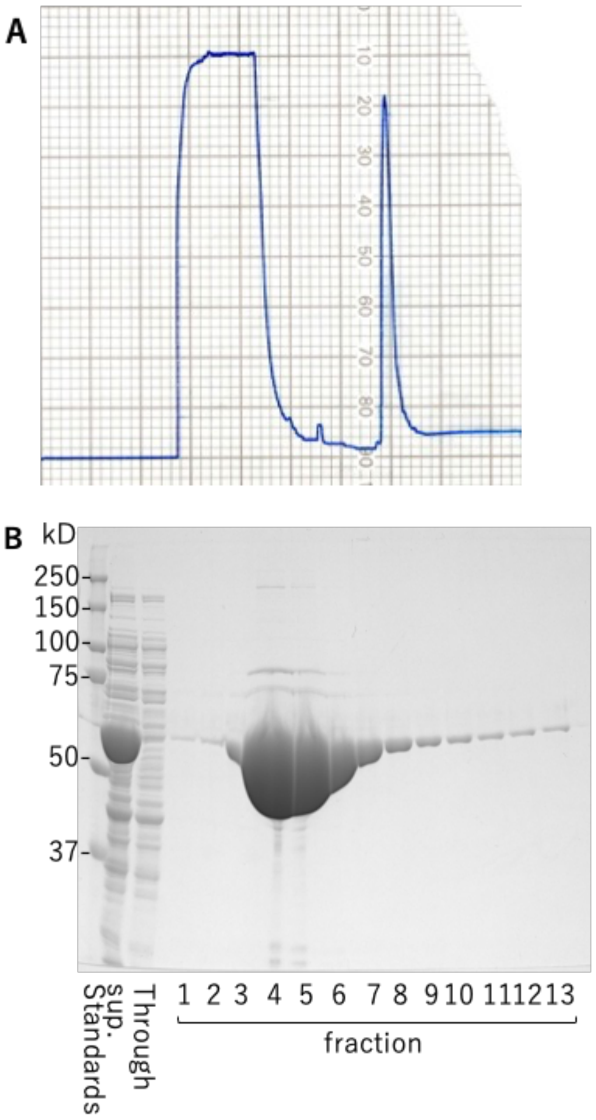


Fig. 2-9. Sos S732C 変異体の Co キレートカラム精製（A)Sos S732C の溶出曲線(Abs 280 nm）（B)10%均一 SDS-PAGE による溶出確認

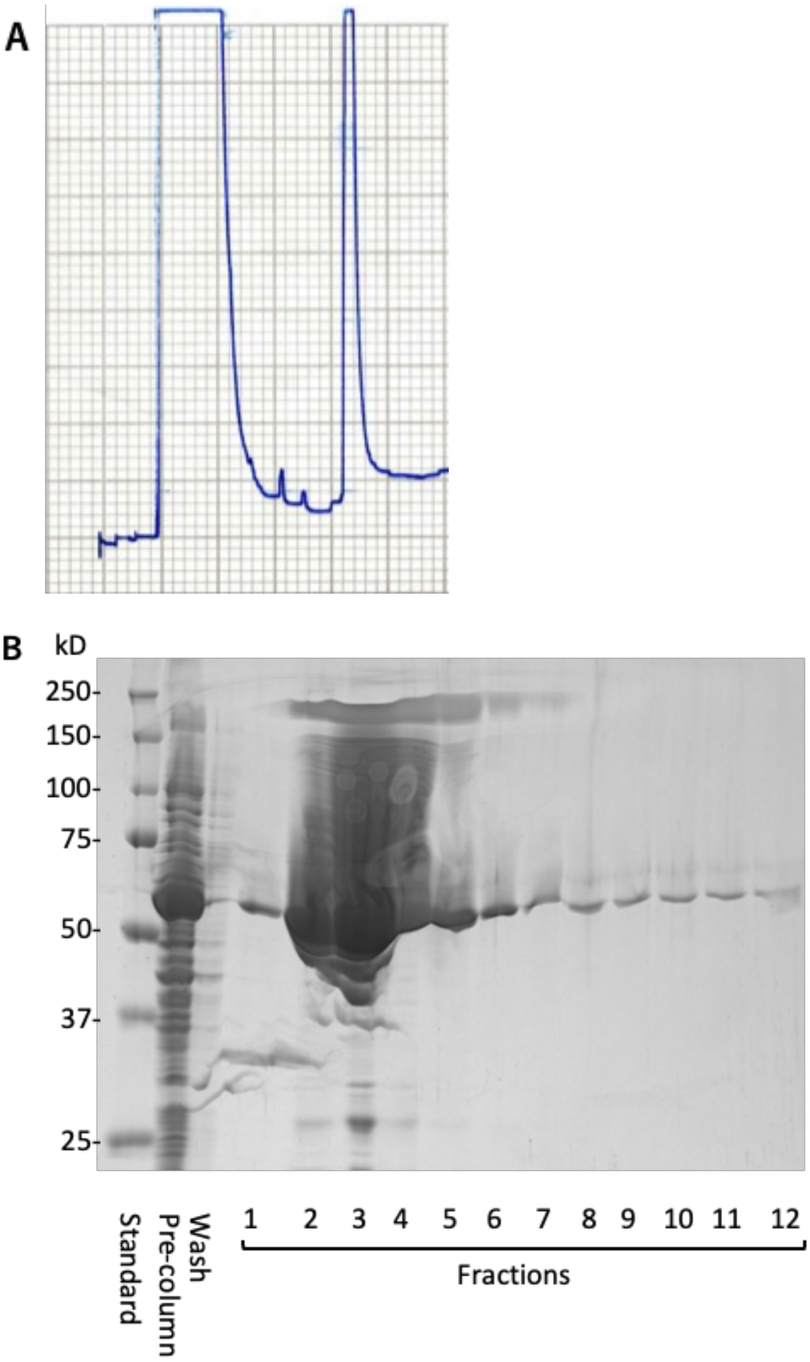


Fig. 2-10. Sos Cys-lite の Co キレートカラム精製（A)Sos Cys-lite の溶出曲線(Abs 280 nm)
(B)10%均一 SDS-PAGE による溶出確認

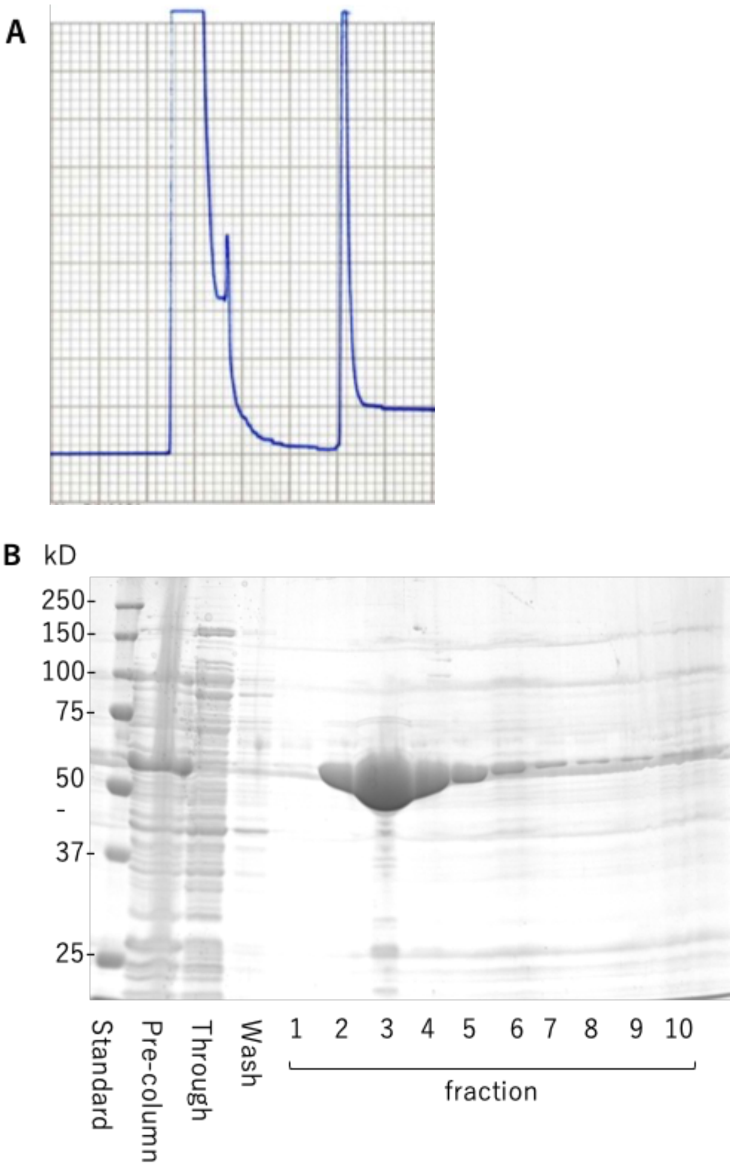


Fig. 2-11. Sos S881C の Co キレートカラム精製 (A)Sos S881C の溶出曲線(Abs 280 nm)
(B)10%均一 SDS-PAGE による溶出確認

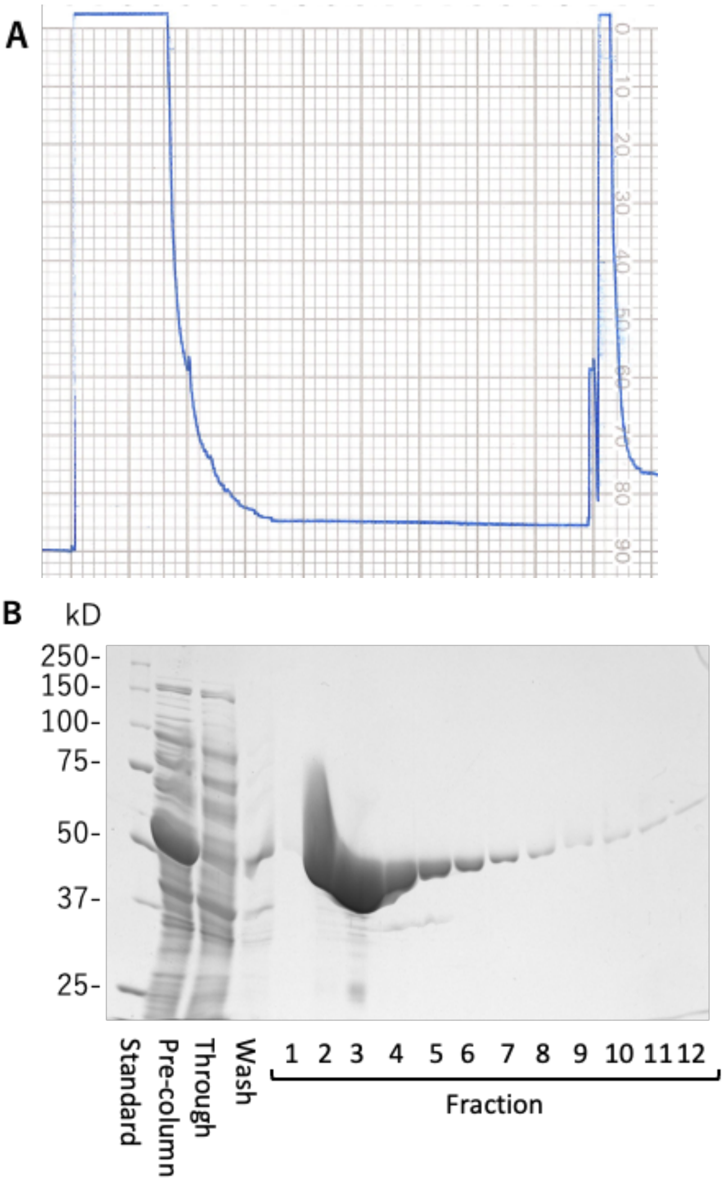


Fig. 2-12. Sos K679C の Co キレートカラ精製 (A)Sos K679C の溶出曲線(Abs 280 nm)
(B)10%均一 SDS-PAGE を用いた溶出確認

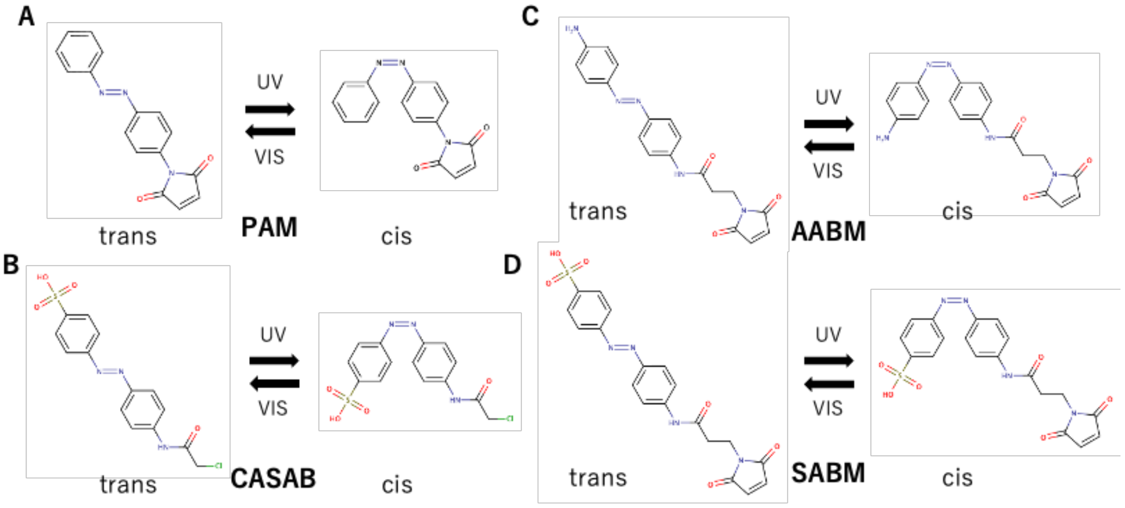


Fig. 2-13. チオール基反応性アゾベンゼン誘導体 (A)PAM (B)CASAB (C)AABM (D)SABM

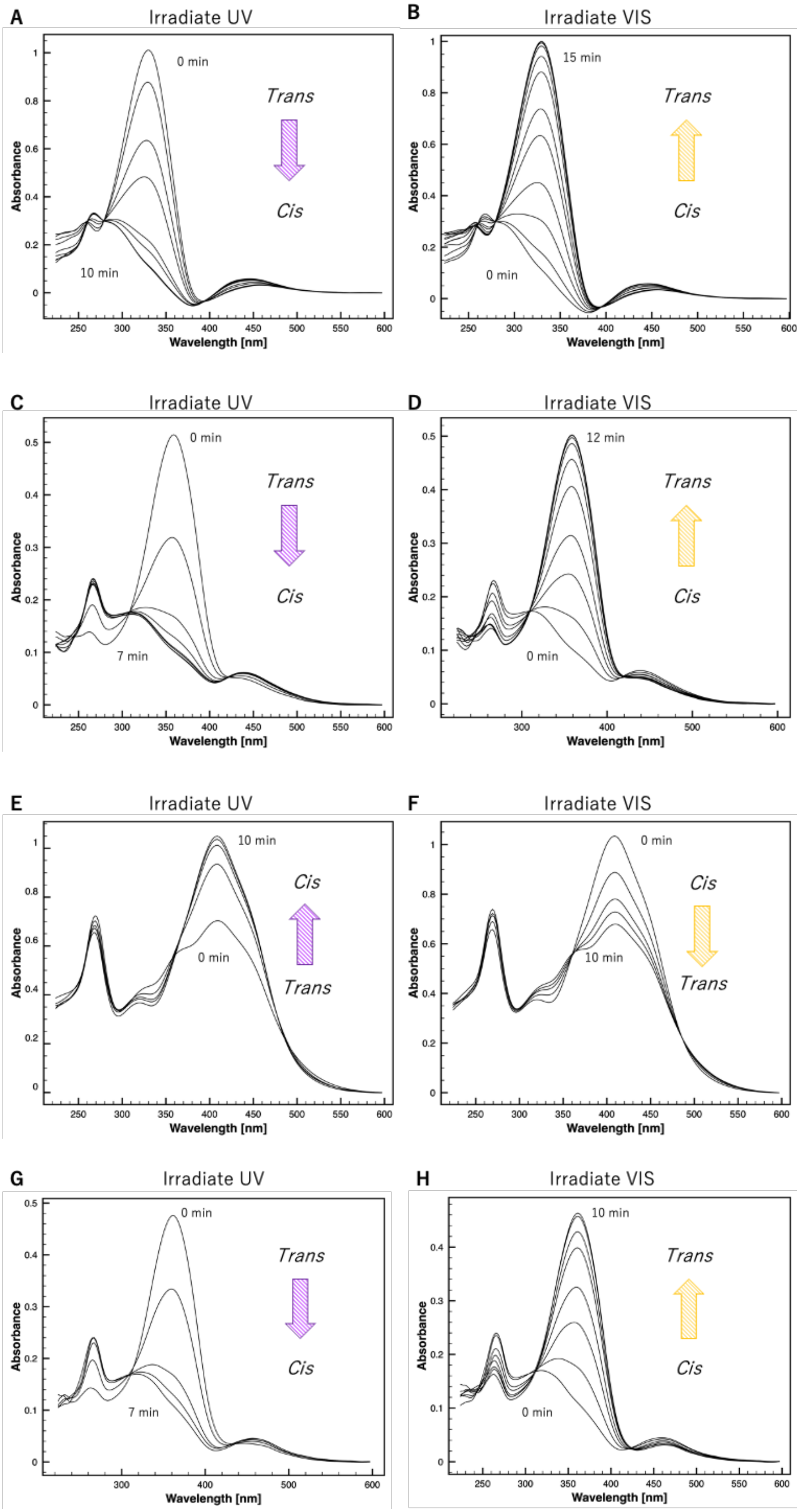


Fig. 2-14. アゾベンゼン誘導体の光異性化確認 (A)PAM UV 照射 (B)PAM VIS 照射

(C)CASAB UV 照射 (D)CASAB VIS 照射 (E)AABM UV 照射 (F)AABM VIS 照射 (G)SABM UV 照射 (H)SABM VIS 照射

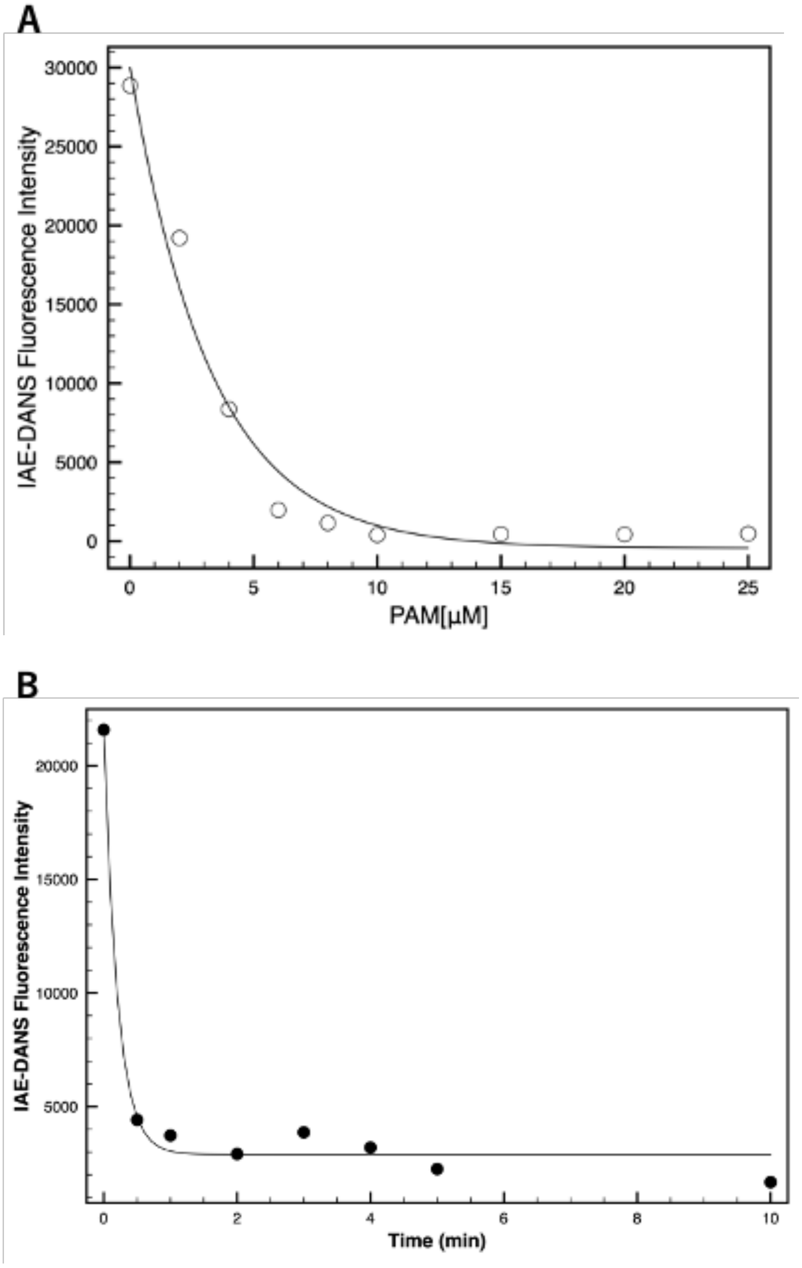


Fig. 2-15. Sos S732C 変異体へのアゾベンゼン誘導体修飾 (A)S732C への濃度依存的 PAM 修飾の IAE-DANS バックタイトレーション (B) S732C 変異体への PAM 修飾時間依存性の IAE-DANS バックタイトレーション

A

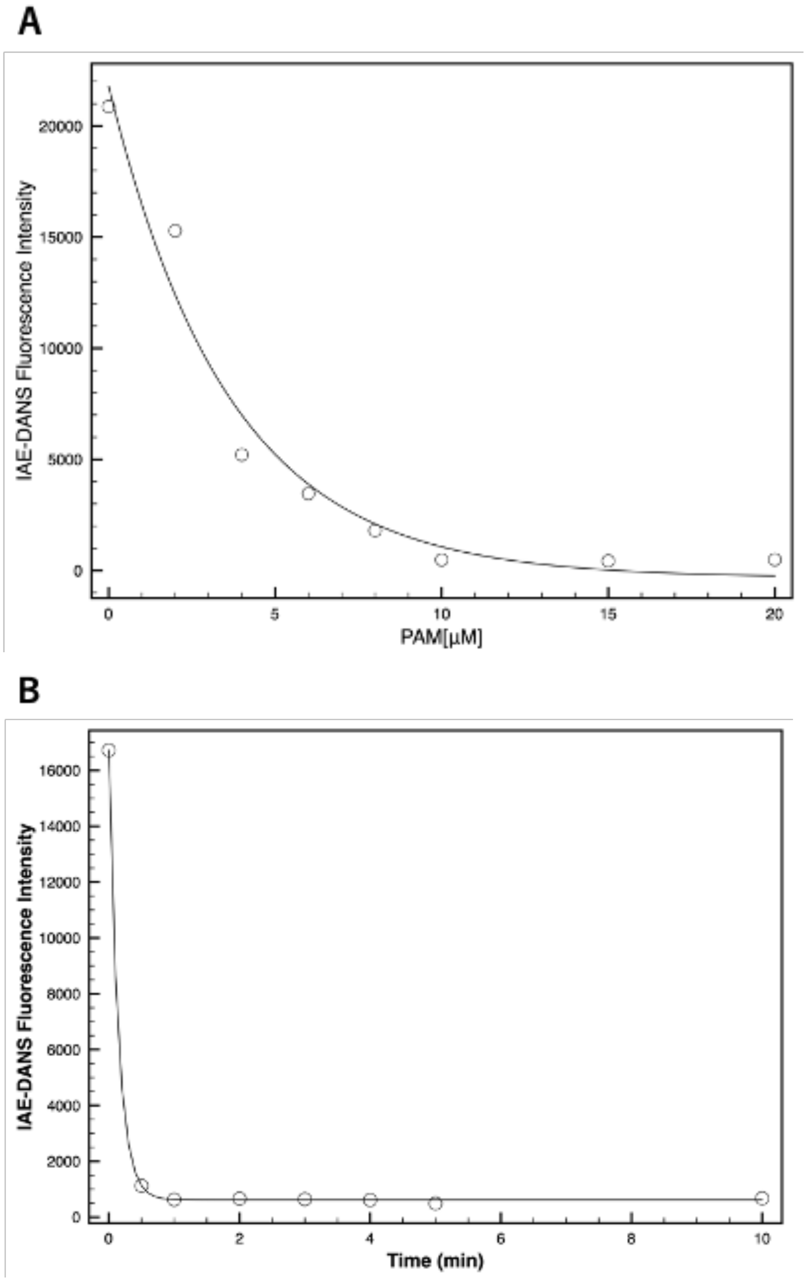


Fig. 2-16. Sos S881C 変異体へのアゾベンゼン誘導体修飾（A)S881C 変異体への濃度依存的 PAM 修飾の IAE-DANS バックタイトレーション　(B) S881C 変異体への PAM 修飾時間依存性の IAE-DANS バックタイトレーション

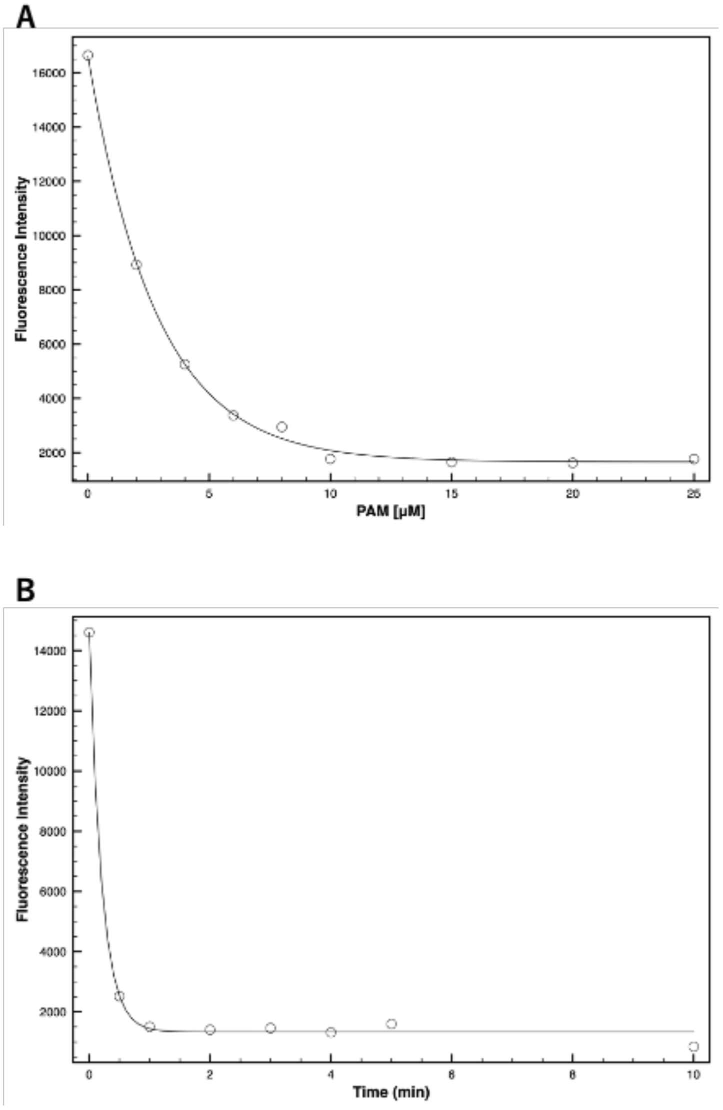


Fig. 2-17. Sos K679C 変異体へのアゾベンゼン誘導体修飾（A)K679C 変異体への濃度依存的 PAM 修飾の IAE-DANS バックタイトレーション（B)K679C 変異体への PAM 修飾時間依存性の IAE-DANS バックタイトレーション

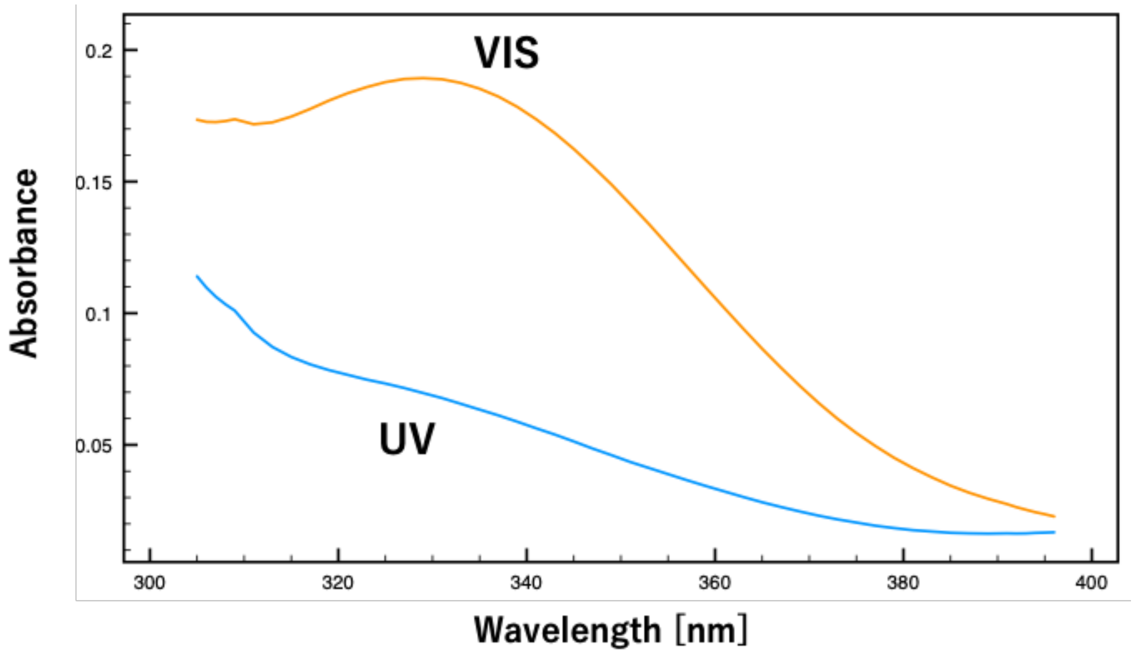


Fig. 2-18. アゾベンゼン誘導体修飾 Sos 変異体の光照射による吸光スペクトルの変化

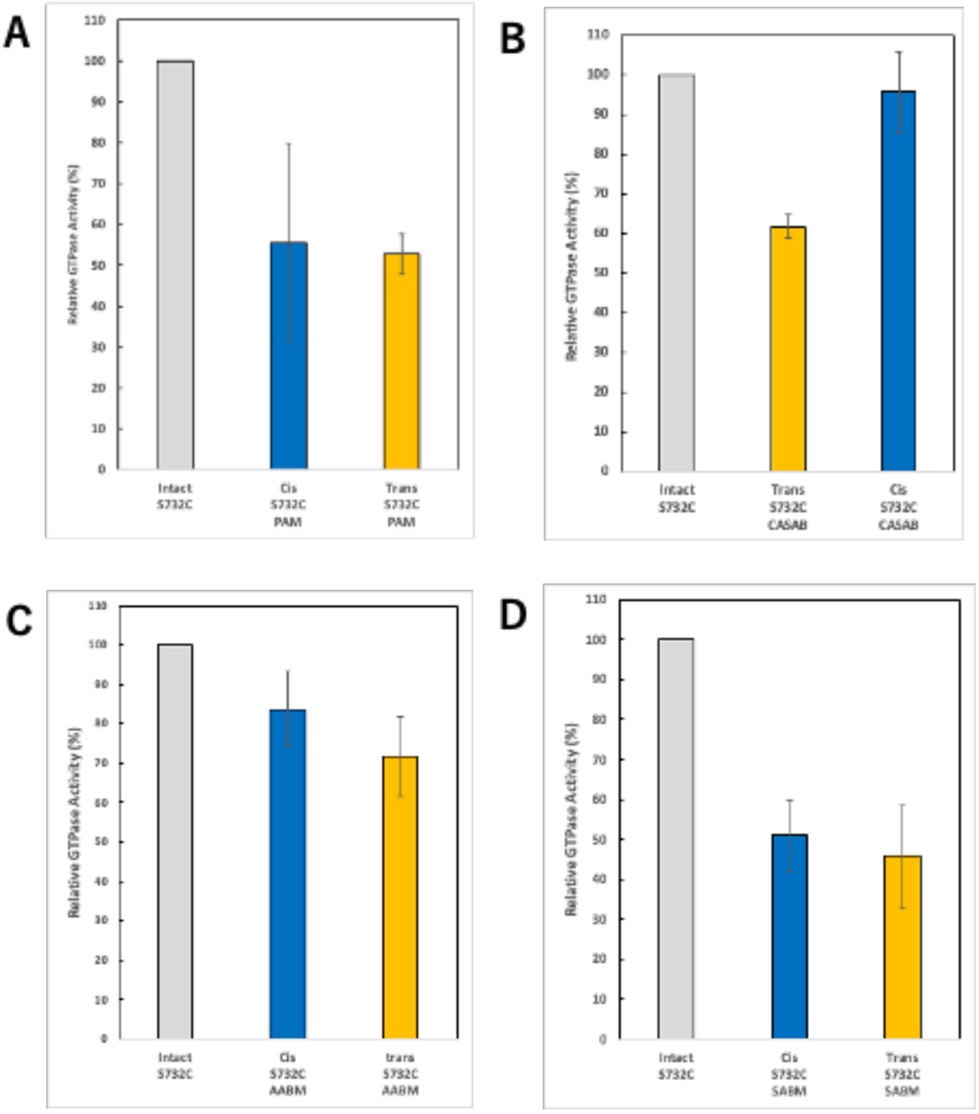


Fig. 2-19. アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S732C 変異体を用いた HRas GTPase サイクル活性測定

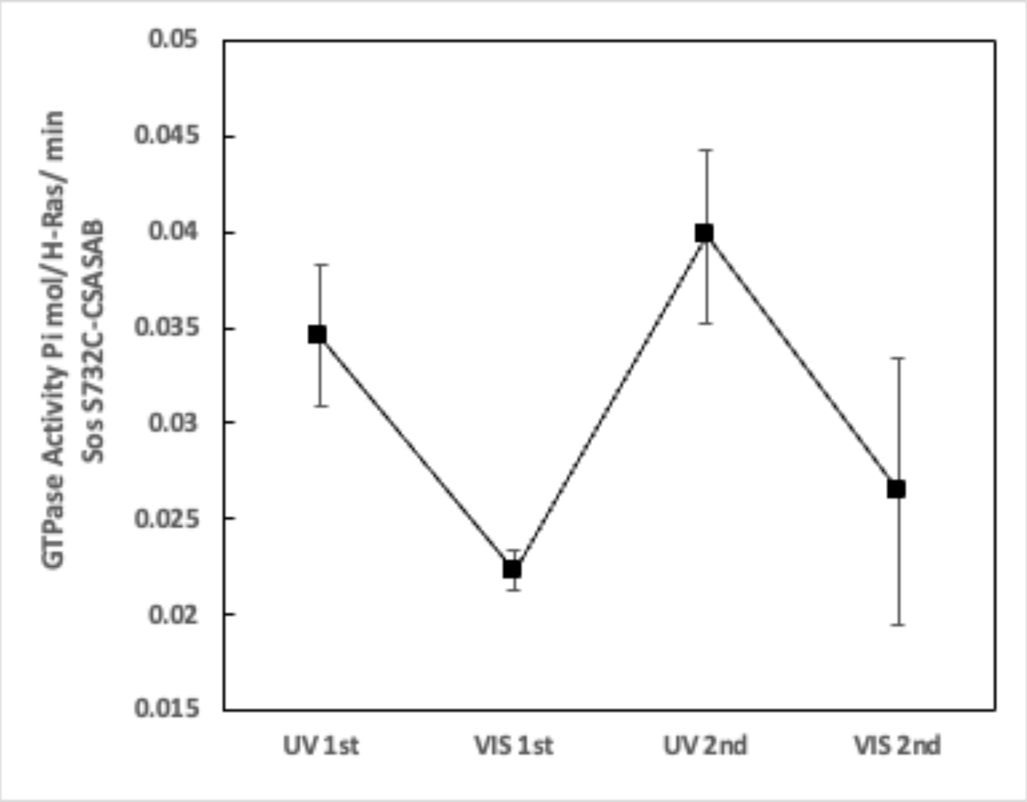


Fig. 2-20. CASAB 修飾 Sos S732C を用いた GTPase サイクル活性測定の光可逆的制御

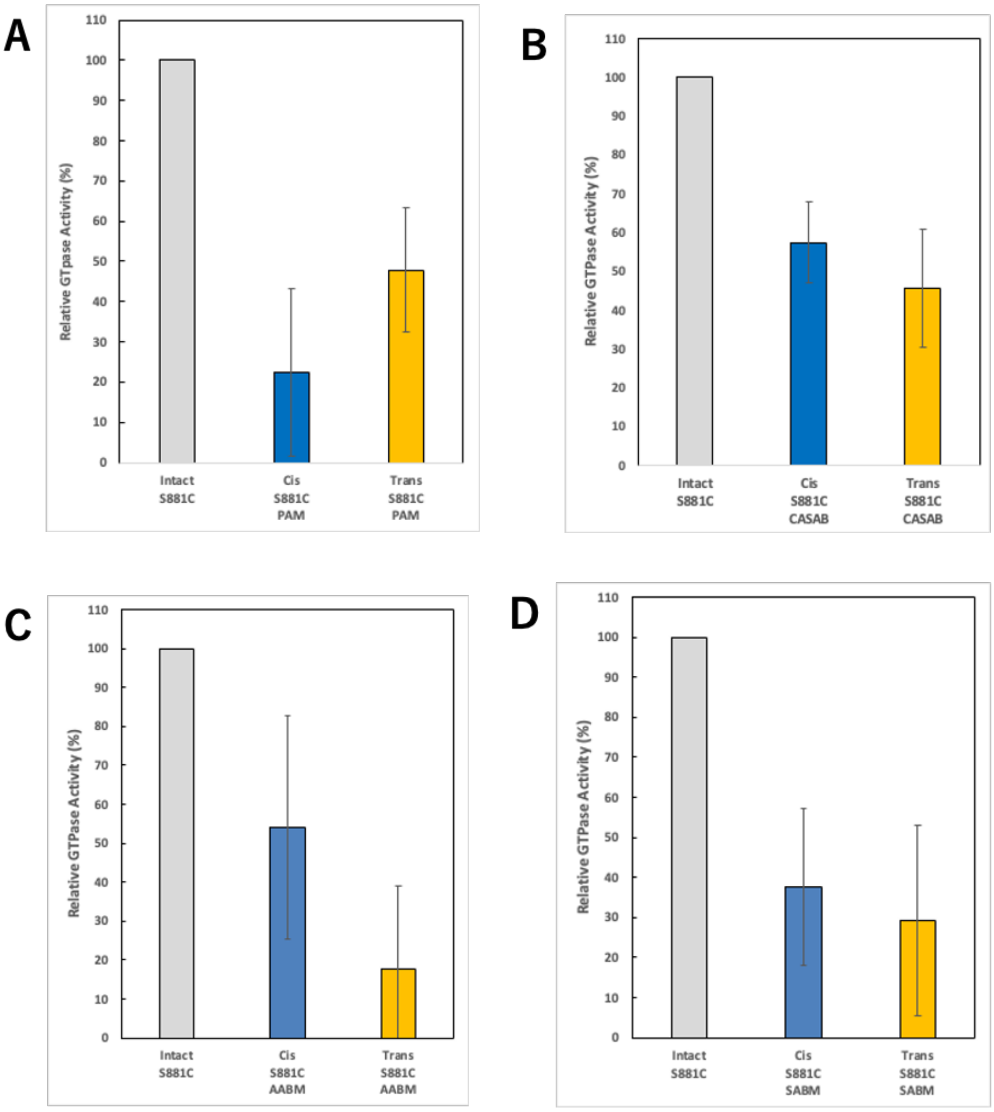


Fig. 2-21. アゾベンゼン誘導体修飾 Sos S881C 変異体を用いた GTPase サイクル活性測定

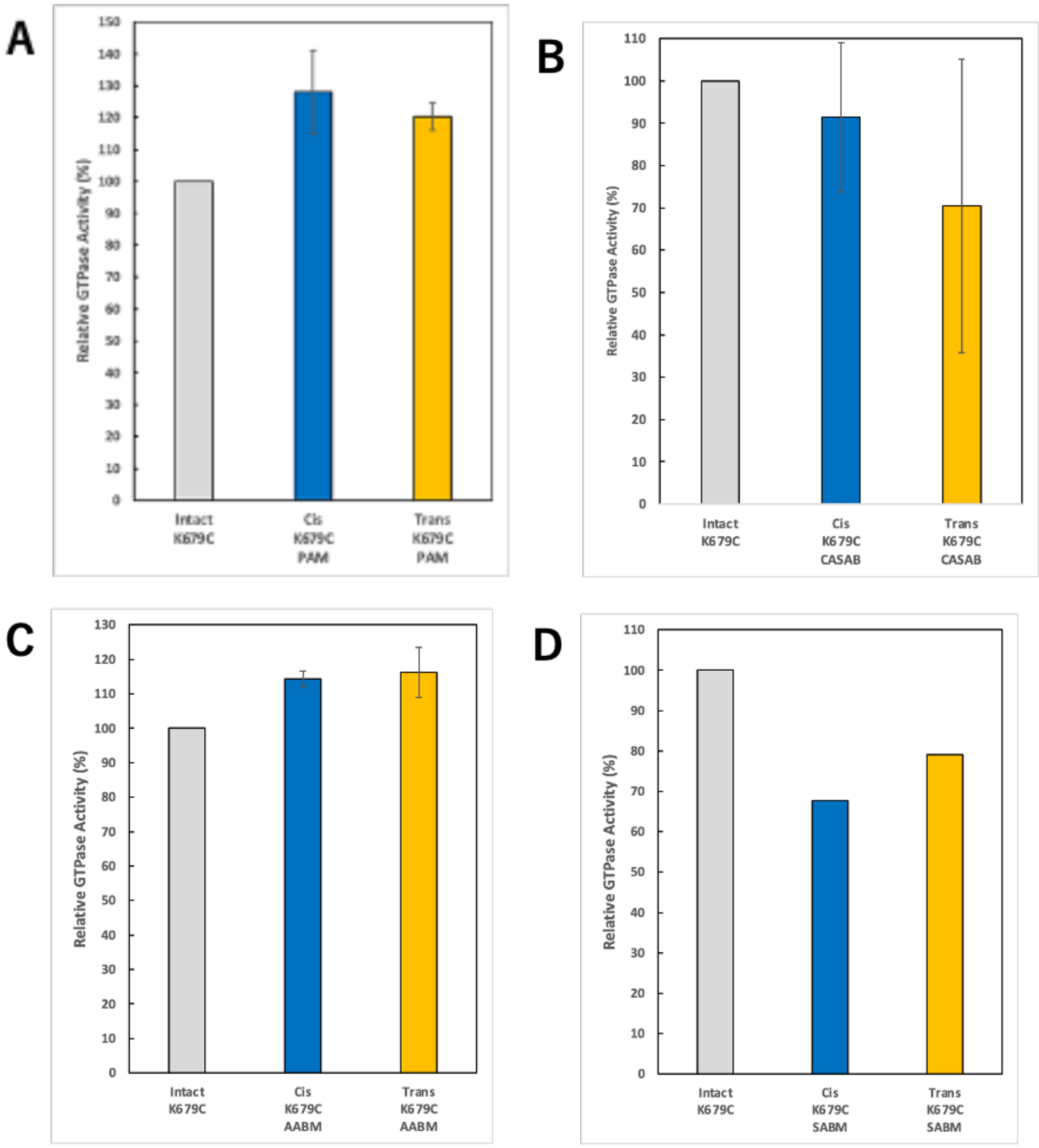


Fig. 2-22. アゾベンゼン誘導体修飾 Sos K679C 変異体を用いた HRas GTpase サイクル活性測定

第三章

光応答性タンパク質融合 HRas による GTPase 活性の光可逆的制御

3.1 本章の要旨

低分子量 GTPase Ras は細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たし、分子スイッチとして機能します。 この研究では、Ras GTPase 活性を光調節するための分子調節デバイスとして光応答性タンパク質を使用しました。 久富氏によって開発された光応答性タンパク質 Aureochrome1 の変異体であるフォトジッパー (PZ)とフォトクロミズムに伴い多量体形成をする Dronpa は、融合タンパク質として Ras の C 末端に組み込まれました。Ras-PZ 融合タンパク質の 3 つの構築物は、Ras と PZ の間に異なる長さのスペーサーを組み込んだ。 これらは、大腸菌発現系を用いて発現、精製した。 Ras-Dronpa は、青色光照射時および紫外光照射で光異性化を示したが、光異性化に伴う多量体形成を示さなかった。Ras-PZ 融合タンパク質は、青色光照射時および暗所で光異性化を示した。また Ras-PZ は光照射により二量体化をした。Ras-Dronpa は、Ras 調節因子であるグアニンヌクレオチド交換因子と GTPase 活性化タンパク質存在下で GTPase 活性を示したが、光異性体間で活性の差は見られなかった。

Ras-PZ は、調節因子存在下の GTPase 活性が光異性化によって制御された。 光応答性タンパク質は、光調節分子デバイスとして低分子 GTP アーゼの酵素活性の光スイッチングに応用できることが示唆された。

3.2 緒言

低分子 G タンパク質 Ras は、細胞内シグナル伝達において重要な役割を果たすグアニンヌクレオチド結合タンパク質です。 Ras は分子スイッチとして機能し、 GTP と結合すると活性化して下流シグナルを伝達し、GDP と結合すると不活性化して下流シグナル伝達を停止する。 この分子スイッチは、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）や GTPase 活性化タンパク質（GAP）などの外部要因によって制御されます。 GEF は Ras 結合 GDP を GTP と交換することで Ras を活性化しますが、GAP は Ras 結合 GTP を GDP に加水分解して Ras を不活性する。 Ras のスイッチング機構は分子レベルで広く研究されている。

特に、G タンパク質と ATP 駆動モータータンパク質は、P ループ、スイッチ I、スイッチ II などの共通の触媒部位構造と、ヌクレオチド加水分解サイクルと連動する分子機構を持つ。 したがって、これらのヌクレオチド結合タンパク質は、共通のヌクレオチド結合タンパク質を祖先に持つと考えられている。 ATP 加水分解による運動力への変換と GTP 加水分解による細胞シグナル伝達の下流酵素の活性化のメカニズムが分子レベルで共通であると考えられる。したがって、ヌクレオチド駆動の機能的タンパク質は生体分子機械であると考えられる。機能性分子デバイスを機械的機能領域に組み込むことで、生体分子機械の制御が可能になると期待されています。 外部刺激に応答して構造を可逆的に変化させる黒ミック化合物は、バイオナノマシンにおける制御分子デバイスの重要な候補である。光照射により異性化するフォトクロミック化合物は、バイオナノマシンへの応用に特に便利です。

フォトクロミック化合物にはいくつかの種類が報告されています。アゾベンゼンは、紫外線や可視光の照射下でシス-トランス異性化を起こし、分子サイズや物性が大きく変化する代表的なフォトクロミック分子です。 以前に、当研究室では、キネシンの機能部位にアゾベンゼン誘導体を組み込むことにより、キネシンの機能、ATP アーゼ、および運動性の光可逆的調節が可能になることを実証した。 続いて、当研究室では、触媒部位に位置する Switch1、Switch2、および P ループの近傍にアゾベンゼン誘導体を導入することにより、HRas GTPase 活性の光制御を実証した。さらに、HRas の C 末端に位置する機能的な HVR ドメインにアゾベンゼン誘導体を組み込むと、GTPase 活性と多量体化の制御が可能になることを明らかにした。

光応答性タンパク質は自然界に存在し、一部の生物の生理学的機能は光によって制御される。 光応答性タンパク質は、光による外部刺激により構造および多量体形成を誘導することができ、細胞内シグナル伝達および局在化の光学的制御のためのツールとして広く使用されている。本研究では、単量体蛍光タンパク質の Dronpa と、大阪大学の久富らが開発した光応答性機能タンパク質であるフォトジッパー（PZ）を利用した。Dronpa は、Pectiniidae 由来の光スイッチ機構を持つ単量体蛍光タンパク質である。Dronpa の蛍光は、シアン光照射でオフ(dark-state)になり、紫外光照射でオン(bright-state)になる。また bright-state では多量体を形成し、147 番目のリジンをアスパラギンに置換することで四量体を形成しやすく

なることが明らかになっている。PZ は、Vaucheria frigida 由来の光受容体タンパク質 Aurochrome1 に基づいて開発された新規な光応答性機能タンパク質である。 PZ は、Light-Oxygen-Voltage（LOV）ドメインと basic region/leucine zipper（bZIP）で構成されます。 青色光にさらされると二量体を形成し、暗闇に置かれると単量体になり、LOV ドメインとロイシンジッパーは分子内で相互作用する。

この研究では、調節分子デバイスとして光応答性タンパク質を組み込むことで、Ras GTPase の可逆的な制御が可能になることを実証しました。 スペーサーの最適化が検討され、分子レベルでの正確な分子設計の可能性が示唆されました。

3.3 実験材料と方法

3.3.1 試薬と機器

オリゴヌクレオチドの合成はユーロフィンジェノミクスを利用した。制限酵素およびその他の酵素は TOYOBO または TAKARA のものを使用した。大腸菌 DH5 α は TAKARA、Rosetta2(DE3)pLysS と pET15b は Novagen のものを使用した。リンカーのデリーションは Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit(BioLabs)を使用した。その他の試薬は断りのない限り Wako の試薬を使用した。

また、超高速遠心機(超遠心)は Optima XE-90 Ultracentrifuge (BECKMAN COULTER, US)を使用し、小型超高速遠心機は himac CS 120GX (HITACHI, JPN)を使用し、高速遠心機は himac CR 22G (HITACHI, JPN)を使用した。小型高速遠心機は MX-150 (TOMY, JPN) を使用した。タンパク質定量などには、分光光度計の UVmini-1240 UV-VIS SPECTROPHOTOMETER (SHIMADZU, JPN)を使用した。吸光スペクトラムの測定には U-3000 Spectrophotometer (HITACHI, JPN)を使用した。蛍光分光光度計は、F2500 Fluorescence Spectrophotometer (HITACHI, JPN)を使用した。CD スペクトラムの測定は、Chirascan(Applied Photophysics, UK)を使用した。マイクロプレートリーダーは iMark microplate reader (biorad)を使用した。PCR は PC707 (Astec)を使用した。オートクレーブには AUTOCLAVE SS-325(TOMY)を使用した。少量培養の場合は超音波破砕に Bioruptor (COSMO BIO)を使用し、大量培養の場合は、超音波破砕に VP-30S CULTRAS. HOMOGENIZER (TAITEC)を使用した。

3.3.2 大腸菌発現用ベクターの構築

Dronpa 融合 Ras (Ras-Dronpa)は、Ras 触媒ドメイン（1-166 aa）を N 末端に配置し、Dronpa の全長 1-222 アミノ酸残基を C 末側に配置した。Dronpa は四量体形成を促進する点変異 K145N と素早い光異性化を可能にする点変異 V157G を組み込んだ配列を用いた。HRas と Dronpa の立体障害を考慮して、GS リンカー（LESGGSGGGS）を組み込んだ。Photozipper 融合 Ras (Ras-PZ)は、HRas 触媒ドメイン（1-166 aa）を N 末端に配置し、Cys162 と Cys182 がセリンに置換された Aureo1 PZ ドメイン（113-348 aa）を C 末端に配置した。 Ras-Dronpa 同様に HRas と PZ の立体障害を考慮して、GS リンカー（LESGGSGGGS）を組み込んだ。 これらの DNA は pET21a のマルチクローニングサイトへ導入するための設計をした。5’末端に BamH1 の認識配列、3’末端に Xho1 の認識配列を組み込み、His-tag は目的タンパク質の C 末に配置した。設計した DNA 配列は Integrated DNA Technologies (IDT, JPN)に合成依頼をした。合成 DNA 1000ng を 100 μL TE buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA に溶解し、合成 DNA の一部と pET21a を BamH1

及び Xho1 を用いて 37℃で 20 時間制限酵素処理をした。制限酵素処理をした溶液を 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて DNA をゲルから精製した。精製した pET21a と合成 DNA をモル比 1:3 となるように混合し、15℃で 30 分ライゲーションを行った。ライゲーション溶液を大腸菌 DH5αに形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5 %NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin に塗布し、37℃で一晩倒置培養した。100 μg/ml ampicillin を含む 3 mL 2×YT: 1.6% bacto-triptone, 1% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl にシングルコロニーから植菌し、37℃で一晩浸透培養した。培養液を 1.5 ml エッペンに移し、遠心(15 Krpm, 5 分, 4 ºC)し、上清を捨て沈殿に 100 μL Solution 1: Solution I: 50 mM Glucose, 25 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA を加えピペッティングし、200 μL Solution II: 0.2 N NaOH, 1% SDS を加え 8 回倒立攪拌し、5 分間氷上でインキュベートした。150 μL Solution III: 5 M AcNa を加え 8 回倒立攪拌し、3 分間氷上でインキュベートした。遠心(15 Krpm, 5 分, 4ºC)し、400 uL フェノール・クロロホルムを分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(15 Krpm, 5 min, 4 ºC)し、800 uL 100% EtOH を分注したエッペンに上清を移し、ボルテックスで攪拌した。遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、上清を捨て沈殿に 1mL 70% EtOH を添加し、遠心(16 Krpm, 5 min, 4ºC)し、沈殿をロータリーエバポレーターで 15 分間乾燥した。乾燥後、20 uL TE+RNase Buffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 30 μg/ml RNase A を加え、15 分間 37 ºC でインキュベートし、プラスミドを回収した。

Ras-PZ を鋳型に、bZIP 内の basic region を取り除いた Ras-PZΔB、および GS リンカーをさらに 5 残基短くした Ras-PZΔBG を、Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Bio Labs Japan Inc.)を使用して構築した。

理化学研究所の佐甲博士のご厚意によりヒト野生型 H-Ras (残基 1 〜 189) プラスミドの cDNA を提供していただき、PCR によって増幅し、pET42c ベクターに組み込んだ。また、HRas 触媒ドメイン (1-166 aa)プラスミドも構築した。このプラスミドは、C 末端から 23 aa が除去され、PCR を使用して増幅されました。 GEF (Sos cat; 564-1049 aa) および GAP (NF1 GRD ドメイン; 1195-1528 aa) cDNA は、以前に記載されているように調製した。

3.3.3 組換えタンパク質の発現と精製

得られたプラスミドでタンパク発現用大腸菌 E.coli Rosetta2(DE3)pLys2 を形質転換し、LB-Amp 寒天培地: 1.5% Agar, 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 4 mM NaOH, 100 μg/ml ampicillin もしくは 50 μg/ml kanamycin で一晩倒置培養を 37ºC で行った。シングルコロニーを LB-Amp 培地 5 mL: 1% bacto-triptone, 0.5% bacto-yeast

extract, 0.5% NaCl, 100 μg/ml ampicillin に植菌し、37 ºC で一晩振盪培養した。一晩前培養させた培養液を新たな LB-Amp 培地 4.8 ml に 200 μl 植菌し、37ºC で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加えた。Ras-PZ にはリン酸リボフラビンを最終濃度 50 μM になるように加えた。18℃で 24 時間振盪培養させた。菌液を高速遠心(1,500 x g, 15 min, 4ºC)し、沈殿に PBS: 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Sodium phosphate, 1.47 mM Potassium phosphate 300 μl を加え再懸濁し、15 分間(ON:30 sec, OFF:30 sec)超音波破砕した。高速遠心(16 Krpm, 20 分, 4ºC)し、上清と沈殿に分け、沈殿に PBS 300 μl を加え再懸濁し、SDS-PAGE でタンパク質の発現を確認した。

Ras-Dronpa は以下の方法で大量培養と精製を行った。少量培養でタンパク質の発現を確認できたコロニーの培養液 150μL を、500 ml 三角フラスコに入れた LB-Amp 培地 150 mL に植菌し、一晩浸透培養させた。2 L 三角フラスコに対して LB 培地 1L を入れて、計 6 L の LB 培地をオートクレーブした。冷えてから ampicillin を最終濃度 100 μg/mL になるように加え、LB-Amp 培地 1L に対し一晩前培養させた培養液 20 ml を加えて 37ºC で振盪培養させた。OD600=0.4-0.6 になったら IPTG を最終濃度 0.5 mM になるように加え、37ºC で 4 時間振盪培養させた。　その後、高速遠心により集菌し、沈殿を 1 L あたり 10 ml HEM buffer: 10 mM HEPES , pH7.2 , 1 mM MgCl2, 1 mM EGTA, 25 mM NaCl で懸濁し、50 mL コーニングチューブ 3 本に分け高速遠心により菌体を沈殿させ、上清を捨て菌体のみを-80ºC で保存した。

　大腸菌封入体から組換えタンパク質を Co2+キレートカラム(1.6×3 cm)を用いて 2.5 ml/min の流速で精製した。保存した菌体を解凍し 1L 培地あたりの菌体に対し 10 mL の Sonication buffer: 500 mM NaCl, 20 mM MOPS, pH7.0, 1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.8 mg/ml Leupeptin, 0.1 mg/ml Aprotinin, 1 mg/ml Pepstatin を加え懸濁した。懸濁液を氷上で超音波破砕（ON:30 sec, OFF:90 sec×5 回）した。超遠心管に移し、45 Ti ローター（Beckman)で超遠心(200,000 × g, 1 時間, 4ºC)した。Co キレートカラムにカラム体積 5 倍量の Equilibrium buffer: 20 mM MOPS, pH7.0,　500 mM NaCl,1 mM MgCl2, 0.2 mM DTT を流して安定化させてから、超遠心した上精サンプルをカラムにアプライし Ras-Dronpa をカラムへと吸着させた。Wash buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 5 mM Imidazole, 0.2 mM DTT で十分に洗い、Elution buffer: 20 mM MOPS pH7.0, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 200 mM Imidazole, 0.2 mM DTT により、Ras-Dronpa を溶出させフラクションコレクターを用いて分取した。溶出液を SDS-PAGE により、タンパク質の精製の確認を行なった。精製した Ras-Dronpa を VIVASPIN20 5000 MWCO PES (SARTORIUS)を用いて濃縮し、Dialysis buffer:30 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 0.5 mM DTT で透析した。超遠心(HITACHI)を行ったあとマイクロビュレットを用いて濃度決定をし、液体窒素にエッペン

ドルフチューブを入れて冷やしながら 50 μl ずつ分注して急速凍結し、-80ºC で保存した。

3.3.4　分光学的測定

Ras-Dronpa の光異性化は室温で 5 cm 離れたところから光照射を行った。Ras-Dronpa を最終濃度 50μM になるように測定バッファー: 30 mM Tris-HCl pH7.5, 120 mM NaCl, 2 mM MgCl2 に希釈した。多量体を形成する Brigth-state への異性化は Black-Ray lamp(16W)(UVP Inc.,San Gabrial, USA)を使用し紫外線照射(366nm)を行い、単量体を形成する Dark-state への光異性化は青色 LED 照射(500 nm)を行った。吸光スペクトルは U-3000 spectrophotometer (HITACHI 社)を 用いて測定した。

Ras-PZ の光異性化は室温で行った。最終濃度 5 μM になるよう緩衝液（30 mM Tris-HCl、120 mM NaCl、2 mM MgCl2、および 1 mM DTT; pH 7.5）で希釈した。5cm の距離からブルーライトを照射するか、暗所で静置することで異性化した。 青色光の照射は、暗状態を青色状態に変換するために使用されました。 暗所でのインキュベーションを使用して、青色の状態を暗色の状態に変換しました。

3.3.5 SEC 測定

高速サイズ排除クロマトグラフィー(SEC-HPLC)を行い、光応答性タンパク質融合 Ras の光異性化に伴う多量体形成の確認をした。カラムの平衡化と分画には SEC-HPLC Buffer; 30 mM Tris-HCl, pH7.5, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl2 を用いた。TSKgel G3000SWXL column (TOSOH, Tokyo, Japan; particle size: 6 μm, internal diameter: 7.5 mm, length: 30 cm, injection volume: 100 μl）の場合は、20 μM のサンプルを流速 1.0 mL/min でインジェクトし、280 nm の吸光度を測定した。測定には SCL-10A VP(Shimadzu)を用いた。

3.3.6 GEF、GAP 存在下での GTPase 活性測定

GTPase 活性は、以前に確立された方法を使用して測定した。 GTPase アッセイバッファー（30 mM Tris-HCl、60 mM NaCl、2 mM MgCl2; pH 7.5）中の H-Ras (2 μM）を、2 μM GEF および GAP の存在下で 10 分間プレインキュベートしました。 続いて、1 mM GTP を添加して GTPase アッセイを開始した。25 ℃ で 30 分間インキュベートした後、10 % トリクロロ酢酸を添加して反応を停止しました。 17360 × g、4 ℃で 3

分間遠心分離した後、上清を BioMol Green Reagent と混合し、25 ° C で 30 分間インキュベートして、GTP 加水分解によって生成された Pi の量を定量的に測定しました。Ras-Dronpa の bright state は、 10 分間の紫外線照射(366nm)によって誘導した。Dark-state は、20 分間の青色 LED 照射によって誘導した。Ras-PZ の青色状態は、15 分間の青色 LED 光照射によって誘導されました。 Ras-PZ を暗所で 60 分間インキュベートして、暗状態に変換しました。 光応答性タンパク質融合 Ras の GTPase 活性は、GTPase アッセイバッファー中 25℃で測定されました。

3.3.7 Basal GTPase 活性測定

Basal GTPase 活性は、GEF および GAP の非存在下で GTP 加水分解によって生成された Pi の量に基づいて決定した。 反応は、GTPase アッセイバッファーで 30 μM H-Ras または Ras-PZs を使用して、37℃で 30 分間インキュベートした。１０％トリクロロ酢酸を添加することにより反応を停止した。4 ° C、17360 × g で 3 分間遠心分離した後、上清を BioMol Green 試薬と混合し、25 ° C で 30 分間インキュベートして、GTP 加水分解によって生成された Pi の量を定量的に測定しました。

3.4 結果と考察

3.4.1 光応答性蛋白質融合 Ras の設計

本研究では、Ras の機能を人為的に制御する分子デバイスとして光応答性タンパク質に着目した。
Dronpa K145N は、シアン光照射で単量体(dark-state)になり、紫外光照射で四量体(bright-state)になる。Ras と Dronpa を融合することで Ras の機能を光可逆的に制御が可能な Ras を設計した。HRas の触媒ドメイン(1-166 aa)を N 末側に配置し、C 末側に Dronpa を配置した。Fig. 3-2 に示すように多量体形成をすることで Ras と外部制御因子との相互作用を妨げると予想した。
PZ は、久富らによって Aureochrome1 をもとに開発された光可逆ジッパーデバイスである。Fig. 3-3 に示すように、PZ は青色光照射下および暗闇で可逆的なダイマー - モノマー変換を示した。 Ras と光応答性タンパク質 PZ の融合タンパク質は、Ras の機能を制御する制御分子デバイスとして設計した。PZ は、Ras の触媒ドメイン(1-166 aa)の C 末端に配置した。LOV ドメインは暗状態では N 末端に近いため、PZ の N 末端に Ras を配置すると、Dark-state では LOV ドメインと外部制御因子との相互作用が立体的に妨げられると予想される。Fig. 3-3 に示すように、3 つのコンストラクトは、Ras と PZ の間に異なる長さのスペーサーを使用して設計した。
Ras-PZ は、Ras (1-166 aa) が PZ の N 末端に結合していました。 bZIP ドメインの basic region と GS リンカーは、Ras と PZ の間のスペーサーとして配置されました。Basic region は柔軟な構造を持っているため、LOV ドメインによる立体障害を受けにくいと予測される。そこで、ras-PZ を繋ぐスペーサーを短く切り詰めた Ras-PZΔB および Ras-PZΔBG を設計した。

3.4.2 光応答性蛋白質融合 Ras の調製と分光学的特性

設計されたコンストラクトは、大腸菌発現システムを使用して発現され、確立された方法に従って金属キレートアフィニティーカラムで精製されました。 Fig. 3-4, 5 の SDS-PAGE で示されるように、精製されたタンパク質の分子量は、設計された構築物の分子量と同一であった。光応答性タンパク質融合 Ras が光応答性を保持していることを確認するため、光異性化に伴う吸光スペクトルの変化を測定した。Ras-Dronpa は 500 nm の光を照射により 500 nm のピークが減少していき、366 nm の光照射によって上昇した（Fig. 3-6)。これは Dronpa と同様のスペクトル変化であり、光異性化していることが確認された。

Ras-PZ は暗状態で PZ とほぼ同じ吸収スペクトルを示しました。 暗状態では、Ras-PZ は、LOV ドメインのリボフラビンに起因すると考えられる 447 nm にピークを持つスペクトルを示した。Ras-PZ に青色光を照射すると 447 nm のピークが減少し、スペクトル変化は 7 分後に完了した。 対照的に、青色光照射によって飽和したスペクトルは、暗闇では 60 分以内に初期状態に戻りました。Ras-PZΔB および Ras-PZΔBG も、青色光照射および暗所でのインキュベーション後に Ras-PZ と同様のスペクトル変化を示しました。 すべての RAS-PZ は、暗状態および青状態で PZ の吸収スペクトルとほぼ同じ吸収スペクトルを示します。 Ras-PZ、Ras-PZΔB、Ras-PZΔBG の経時的な吸光度スペクトル変化をモニタリングしました。 スペクトル変化を Fig. 3-7 に示し、スペクトル変化から推定したスペクトル変化の半変換時間を表 Table 1 にまとめました。Ras と PZ を連結する切断型スペーサーは、青色状態と暗状態の間の異性化の変換を両方向に加速します。スペクトル変化は、Ras-PZ 構築物が青色光照射および暗所でのインキュベーションにより光異性化することを明確に示している。

3.4.3 光異性化に伴う Ras-PZs の単量体-二量体形成

久富は 、PZ は暗闇では単量体を形成し、青色光照射下では二量体化することを示しました。 SEC-HPLC を使用して、Ras-PZ コンストラクトが光異性化を伴うモノマー-ダイマー変換能力を保持していることを確認しました。 暗状態では、Ras-PZ、Ras-PZΔB、Ras-PZΔBG はそれぞれ 9.23、9.35、9.4 分で溶出しました。 暗所での融合タンパク質の溶出時間は、融合タンパク質がモノマーであることを明確に示した。青色光照射下では、Fig. 3-9 (A-C)の青色の線に示すように、融合タンパク質は二量体化を示しました。Ras-PZ、Ras-PZΔB、Ras-PZΔBG は 7.9 分、ΔB は 8.1 分、ΔBG は 8.2 分にピークを示し、それぞれの二量体の分子サイズに相当します。 これらの結果から、Ras-PZ の構造が光異性化により変化し、青色光により二量体化が誘導されることが確認されました。すべての Ras-PZ のモノマーのピークはシャープで明確ですが、ダイマーのピークは非常に幅広いです。 RAS-PZ の二量体ピークの積分値から、Ras 触媒ドメインを結合するスペーサーが短い融合タンパク質が明らかになり、PZ は暗所ではより小さな二量体ピークを示した。 これは、表 I に示す暗状態と青状態の間の高速変換と一致している可能性があります。しかしながら、Ras-PZΔB と Ras-PZΔBG の変換時間はほぼ同じでした。 したがって、二量体の形成は、2 つのドメイン間のより高い立体障害によるものである可能性があります。 最も短いスペーサーを有する Ras-PZΔBG は、他の Ras-PZ よりもロイシンジッパーと Ras 触媒ドメインとの間の立体障害が高く、その結果、二量体を形成する親和性が低下します。

Ras-Dronpa も同様の手法を用いて光異性化に伴う多量体形成の確認を試みたが、dark-state と bright-state で溶出曲線に差は確認されなかった（Fig. 3-8)。

3.4.4 Ras GTPase 活性の光制御

まず Ras-Dronpa の GTPase 活性を測定したところ、外部因子である GEF、GAP 存在下での GTPase 活性を示したが、Bright-state と Dark-state の光異性体間での活性に差は確認されなかった（Fig. 3-10)。これは SEC-HPLC の結果からもわかるように、Ras-Dronpa は光異性化に伴って多量体-単量体形成を誘導していないためと考えられる。
次に全ての Ras-PZ の Ras GTPase サイクルのどのステップが光異性化の影響を受けるかを調べるために、basal GTPase 活性 および調節因子（GAP および GEF）濃度依存性 GTPase 活性を調べました。 まず、Ras-PZ、Ras-PZΔB、Ras-PZΔBG、Ras(1-189)、対照としての Ras(1-166)のすべての basal GTPase 活性を暗所で測定し、比較した。 Fig. 3-11 に示すように、Ras 触媒ドメイン（1-166)、Ras (1-189)、および Ras-PZ は暗状態で異なる固有 GTPase 活性を示しました。 HVR または PZ を触媒ドメインに追加すると、basal GTPase 活性が互いに異なるレベルで加速されました。 暗状態では、野生型 Ras (1-189)、Ras-PZ、Ras-PZΔB、および Ras-PZΔBG は、触媒ドメイン Ras（1-166）よりもそれぞれ 1.5、2、3、および 8 倍高い GTPase 活性を示しました。 スペーサーが短いほど GTPase が顕著に加速され、触媒ドメインと Zipper 領域または LOV ドメインの分子内相互作用が示されました。 興味深いことに、青色の状態では、すべてのコンストラクトの GTPase 活性は暗状態の場合とほぼ同じでした。 したがって、固有活性に対する二量体形成の影響はありません。
Ras の GTPase サイクルは GAP と GEF の存在下で発生し、GTPase 活性が加速されます。 我々は、加速された GTPase 活性を使用して、過剰な GTP の存在下での Ras 機能の光制御をモニタリングしました。 光可逆的な単量体 - 二量体変換による Ras-PZ とその制御因子である GAP および GEF との相互作用の光制御は、GAP および GEF によって加速される GTPase 活性に反映されます。 青色光および暗条件下での GAP および GEF による GTPase 活性の加速を調査しました。 Ras-PZ の GAP および GEF 濃度依存性 GTPase 活性は、明らかに光異性化の影響を受けました（Fig. 3-12)。 Ras-PZ に対する GAP または GEF の親和性と GTPase 活性の Vmax は、青の状態と暗の状態で異なりました。 Ras-PZ の調節因子の解離定数を推定し、表 II にまとめました。 GEF に対するコントロール Ras (1-166) の Kd 値は、同じ条件で 7.74 μM であり、Vo et al によって報告された野生型 GTP 状態 Ras の Kd 値 8 μM と類似しています (85)。表 II に示すように、GEF の場合、暗状態の Ras-PZ は、対照と比較してはるかに小さい Kd 値を示しました。 反対に、GAP では、Ras-PZ の Kd 値は対照と有意な差はありませんでした。

3 つの Ras-PZ は、暗状態よりも青状態の方が調節因子に対して高い親和性と最大の GTPase 活性を示しました。 これらの結果は、Ras-PZ に対する GAP と GEF の親和性の変化により、暗状態 - 青状態の光異性化が GTP 加水分解ステップと GDP から GTP への交換ステップの両方に影響を与えることを示唆しています。

GAP および GEF の青色状態での GTPase の Vmax が暗状態での Vmax よりも高かった理由を説明するために、GEF 変異体 W729E (SOS) を使用しました。 この研究では、GEF として SOS を使用しました。 SOS には 2 つの Ras 結合部位があります。1 つは Ras 結合 GDP を GTP で置換する触媒部位で、もう 1 つは GTP 結合 Ras が結合してヌクレオチド交換反応を促進するアロステリック部位です (86)。 SOS 誘発ヌクレオチド交換反応の速度は、GTP 結合 Ras がアロステリック部位に結合することによって活性化されることが明らかにされています。 フリードマンら。 GEF 変異体 W729E (アロステリック部位のトリプトファン残基がグルタミン酸に置換されている) がアロステリック部位への GTP-Ras 結合を無効にすることを実証しました (86)。 変異体 W729E および GAP の存在下で Ras-PZΔB の GTPase 活性を測定しました。 Fig. 3-13 に示すように、青色の状態と暗色の状態の間で GTPase 活性に有意な差は観察されませんでした。 したがって、GTP-Ras-PZ の SOS (GEF) のアロステリック部位への結合は、光異性化によって制御されている可能性があります。

PZ が光スイッチとして機能することを示すために、Ras-PZ、Ras-PZΔB、および Ras-PZΔBG の暗状態および青色光状態における GTPase 活性の光制御の再現性を調べました。 GTPase 活性の光制御は光可逆的であり、Ras-PZ 変異体の暗光状態と青色光状態の交互の変化は、GTPase の制御において高い再現性を示しました。 HRas (1 -166 aa) をコントロールとして使用しました。Fig. 3-14A に示すように、青色光状態の Ras-PZ は暗状態よりも 1.57 倍高い活性を示しました。 さらに、Ras-PZΔB および Ras-PZΔBG は、暗状態よりも青状態でそれぞれ 2.8 倍および 3.1 倍高い活性を示しました。 調節効率は、Ras と PZ を結合するスペーサーの長さに依存します。 スペーサーが短いほど、暗状態と青色光状態の間で GTPase 活性の相対的な差がより顕著になりました (Fig. 3-15)。 暗状態の Ras-PZ は、コントロールと比較して 2 つの制御因子の存在下で GTPase 活性の大幅な増加を示しました。 これは、表 II に示すように、GEF の Ras-PZ に対する親和性が対照に対する親和性よりも高いためです。 一方、Ras-PZΔBG はコントロールよりも有意に低い GTPase 活性を示しました。 GAP にはアルギニンフィンガーとして知られる特定のアルギニン残基があり、これが触媒領域に結合し、効果的な GTP 加水分解を促進する高度に機能的な触媒部位を形成することが知られています (87)。 RAS-PZ△BG は Ras 触媒ドメインと PZ をつなぐスペーサーが短くなります。 したがって、暗状態で GAP が折りたたまれた形状の RAS-PZ△BG に結合すると、LOV ドメインが立体障害によって触媒部位のアルギニンフィンガーの位置に影響を及ぼし、その結果、対照と比較して GTPase 活性が低下する可能性があると考えられます。

3.5 考察

これまで、我々はフォトクロミック化合物を ATP 駆動モータータンパク質を制御する制御ナノデバイスとして、また低分子 GTP アーゼをバイオナノマシンとして使用してきました。 アゾベンゼンやスピロピランなどの典型的なフォトクロミック分子の光異性化に関連する分子構造変化は、分子デバイスでよく研究されています(66)。 したがって、これらのデバイスは、分子設計を通じて生体分子マシンの機械的機能部位に導入できます。
しかし、フォトクロミック化合物を生体分子機械に導入するには化学修飾が必要となる場合があり、タンパク質の変性を誘発するなどの欠点があります。さらに、生体内で生体分子機械を化学修飾することは一般に困難であり、化学修飾された生体分子機械を細胞に導入することも容易ではない。 したがって、生体内での応用は非常に限られています。 具体的な例として、細胞膜を透過して標的バイオナノマシンに結合し、化学修飾を行わずに光可逆性を制御できる小さなフォトクロミック化合物を生体内で使用することができる。このような化合物は、光スイッチング機構を有する新規な機能性医薬品として期待されている。 我々は、複数の異性化状態を形成し、複数の段階で Eg5 の機能を制御する有糸分裂キネシン Eg5 阻害剤の合成に成功しました（86-88)。予備実験では、それが細胞内で光可逆的に作用することを観察しました(88)。 一方、光応答性タンパク質は分子が大きいにもかかわらず、光可逆的で正確な構造変化を起こすことができます。 そのため、生体分子マシンの制御デバイスとしての利用が大いに期待されています。 さらに、これらのタンパク質は遺伝子によってコードされているため、細胞内で発現させることができ、これはフォトクロミック有機化合物にはない利点です。 光応答性タンパク質は、光遺伝学の分野で細胞機能を制御するために使用されてきました。 Dronpa と Aureochom-1 は、生体分子ナノマシンの制御に使用される一般的な光応答性タンパク質です（89-90)。
久富らは、Aurochrome-1 を切断することによって PZ を開発しました。これは、暗闇および青色光照射時の光異性化によるモノマーとダイマー間の効率的な可逆的変換を示しました。 機械的な仕組みや特性も徹底的に解析されています。 したがって、PZ を分子設計による光制御デバイスとして生体分子マシンの機能構造に導入すれば、効率的な光制御が期待できます。 そこで本研究では、光応答性タンパク質である PZ を用いて Ras 活性を可逆的に制御した。光応答性タンパク質をナノデバイスとして Ras に導入する場合、導入する分子の機械的構造を決定することが重要です。 私たちは機能的な機械部位として Ras の HVR ドメインに焦点を当てました。 Ras を含む小型 GTPase は、触媒ドメインと HVR ドメインから構成されます（92)。 HVR は、細胞内シグナル伝達に関与する Ras の脂質化および多量体化を介した Ras の細胞膜への結合に関連しています。 さらに、in vitro 研究では、HVR ドメインが GTPase サイクル中の構造変化を通じて触媒ドメインと相互作用することが示唆されました（93)。 我々は以前、Ras の HVR ドメインのシステイン残基にアゾベンゼン誘導体を導入すると多量体化が誘導されることを示しま

した。さらに、我々は、GTPase 活性と多量体化がアゾベンゼンのシス-トランス光異性化によって光可逆的に制御できることを示しました（80）。 したがって、HVR ドメインは、Ras 機能を制御するための調節分子デバイスの導入に適した機構的機能部位です。暗闇では、PZ は折りたたまれて単量体になりますが、青色光が照射されると伸びて二量体に変化します。 したがって、HVR 領域への PZ の導入により、Ras 触媒ドメインと HVR ドメイン間の相互作用、および生理学的に重要な多量体 - 単量体構造の可逆的な模倣が可能になると考えられています。
Fig. 3-14 に示すように、ＧＡＰおよびＧＥＦの存在下での Ras-PZ 融合タンパク質のＧＴＰアーゼ活性は、光可逆的に調節された。 光制御されたモノマー - ダイマー変換も光可逆的に誘導されました（Fig. 3-9）。 さらに、Ras と PZ の間のスペーサーのサイズを設計することにより、効果的な制御が可能になりました（Fig. 3-15）。 この観察は、生体分子マシンの機能部位に対応する位置に、分子シグネチャを有する光制御デバイスとして光応答性タンパク質を導入することが、生体分子マシンの機能を光可逆的に制御する一般的な方法として使用できることを示唆している。
したがって、我々は分子レベルで PZ を使用した Ras GTPase の光調節機構の可能性を提案します。オリジナルの設計では、光異性化によって大きな構造変化を引き起こす PZ を HVR の代わりに機能部位に導入することで、立体障害の変化を引き起こし、調節因子 GAP および GEF との相互作用を変化させ、その結果 GTPase 活性の調節が行われました。さらに、HVR を PZ 自体で置換することにより、Ras 機能の光制御が誘導されることが期待されます。 なぜなら、HVR ドメインは GDP および GTP と結合すると構造が変化することが知られているからです（93）。 KRas4B では、HVR は GDP 結合状態で触媒ドメインと相互作用し、GTP 結合状態ではこの相互作用がキャンセルされます。我々の予備的な FRET 実験では、HVR と G ドメイン間の距離が GDP 結合状態に近づき、GTP 結合状態では増加することも示した(データは示さず)。 Fig. 3-11 に示すように、触媒ドメイン Ras (1-166) に HVR または PZ を付加すると、basal GTPase 活性がそれぞれ異なるレベルで加速されます。 暗状態では、野生型 Ras (1-189)、Ras-PZ、Ras-PZΔB、および Ras-PZΔBG は、触媒ドメイン Ras (1-166) よりもそれぞれ 1.5、2、3、および 8 倍高い GTPase 活性を示しました。 スペーサーが短いほど GTPase が顕著に加速され、触媒ドメインと Zipper 領域または LOV ドメインの分子内相互作用が示されました。 HVR を PZ で置換すると、(GAP および GEF の非存在下で) コントロールの Ras よりも高い固有 GTPase 活性が誘導されました（1-166）。 これは、PZ が HVR と同様に触媒ドメインに立体的に影響を与えることを示しています。 ただし、固有の GTPase 活性は、モノマー - ダイマー変換による PZ の光異性化の影響を受けませんでした（Fig. 3-11）。 したがって、これらの結果は、Ras-PZ の basal GTPase 活性が PZ の光異性化によって調節されていないことを示唆しています。 対照的に、GAP および GEF の存在下での GTPase 活性は、PZ の光異性化に伴って顕著な変化を示しました

(Fig. 3-14)。 これは、PZ の光異性化に伴う大きな構造変化により、Ras と調節因子 GAP および GEF との相互作用が影響を受けたためと考えられます。 Ras-PZ が青色光の下で伸長されて二量体を形成すると、その触媒ドメインが比較的自由になり、GAP と GEF が結合しやすくなります。 暗所で折り畳むと、LOV ドメインは Ras 触媒ドメインに近づき、立体障害により GAP と GEF の結合を阻害すると考えられています。 Fig. 3-12 に示すように、ＧＡＰおよびＧＥＦの濃度依存性Ｒａｓ ＧＴＰａｓｅ活性を測定することによって、Ｒａｓに対するＧＡＰおよびＧＥＦの親和性の光可逆的変化が観察された。 これは、Ras 触媒ドメインと PZ を接続するスペーサーの長さを短くすると、光異性化に伴う GTPase 活性の変化が著しく異なるという事実によっても裏付けられます (Fig. 3-15)。 しかし、GEF 結合が飽和した状態で青と暗の状態で観察される GTPase 活性の違いは、他の要因によるものと考えられます（Fig. 3-12）。 GEF として使用された SOS は、Ras-GDP が結合し、Ras-GTP が結合してその活性を制御する触媒部位の反対側にアロステリック部位を有する。 飽和 GEF 結合条件下での光異性化に関連する Ras GTPase 活性の変化(Fig. 3-12)は、このアロステリック部位への Ras-GTP-PZ 結合の光可逆的制御によるものであると推測します。

この仮説を検証するために、我々はアロステリック部位への Ras-GTP 結合を無効にすることが知られている SOS 変異体 W729 を使用しました（85)。 Fig. 3-13 に示すように、W729 細胞では光可逆性 Ras GTPase 活性に有意な変化は観察されませんでした。 したがって、Ras-GTP の SOS アロステリック部位への結合は、PZ の光異性化によって光調節され、それによって GTPase 活性の変化が誘導されると考えられます。 これを確認するために、我々は、触媒部位を 1 つだけ持ち、アロステリック部位を持たない別の GEF である RasGRF1 を使用して予備実験を実行しました（86,96)。その結果、 Ras-PZ は blue-state では高く、dark-state では低くなるような活性は示さなかった（未発表データ)。

以上のように、GEF として SOS、GAP として NF1 を用いた Ras GTPase サイクルの特異的な機械機構に、光制御デバイスとして PZ を導入することで、Ras GTPase 活性を光可逆的に制御することに成功しました。 したがって、細胞シグナル伝達や Ras の生理機能を反映する下流エフェクターの光可逆的制御に応用できます。

結論として、光応答性タンパク質を人工制御デバイスとして機能部位に導入することにより、低分子量 G タンパク質 Ras を光可逆的に制御する方法を実証しました。 これは in vitro での実験ではあるが、光応答性タンパク質を分子デバイスとして生体分子機械の機械機構に組み込むことで、さまざまな生体分子機械を光可逆的に制御できると考えられる。 さらに、遺伝子工学によって細胞内で発現させれば、細胞レベルでの光の制御が可能になる可能性がある。

Table I 光異性化に伴うスペクトル変化の半変換時間

	Ras-PZ	Ras-PZΔB	Ras-PZΔBG
Blue to Dark state	**10.02 min**	**9.06 min**	**9.23 min**
Dark to Bule state	**0.51 min**	**0.38 min**	**0.34 min**

Table II GAP および GEF に対する Ras-PZ の Kd 値

		Control Ras (1-166aa)	Ras-PZ	Ras-PZAB	Ras-PZABG
GEF	**Blue state**	**-**	**0.28 μM**	**0.64 μM**	**1.21 μM**
	Dark state	**7.74 μM**	**0.63 μM**	**1.05 μM**	**1.78 μM**
GAP	**Blue state**	**-**	**0.04 μM**	**0.08 μM**	**0.06 μM**
	Dark state	**0.03 μM**	**0.04 μM**	**0.14 μM**	**0.10 μM**

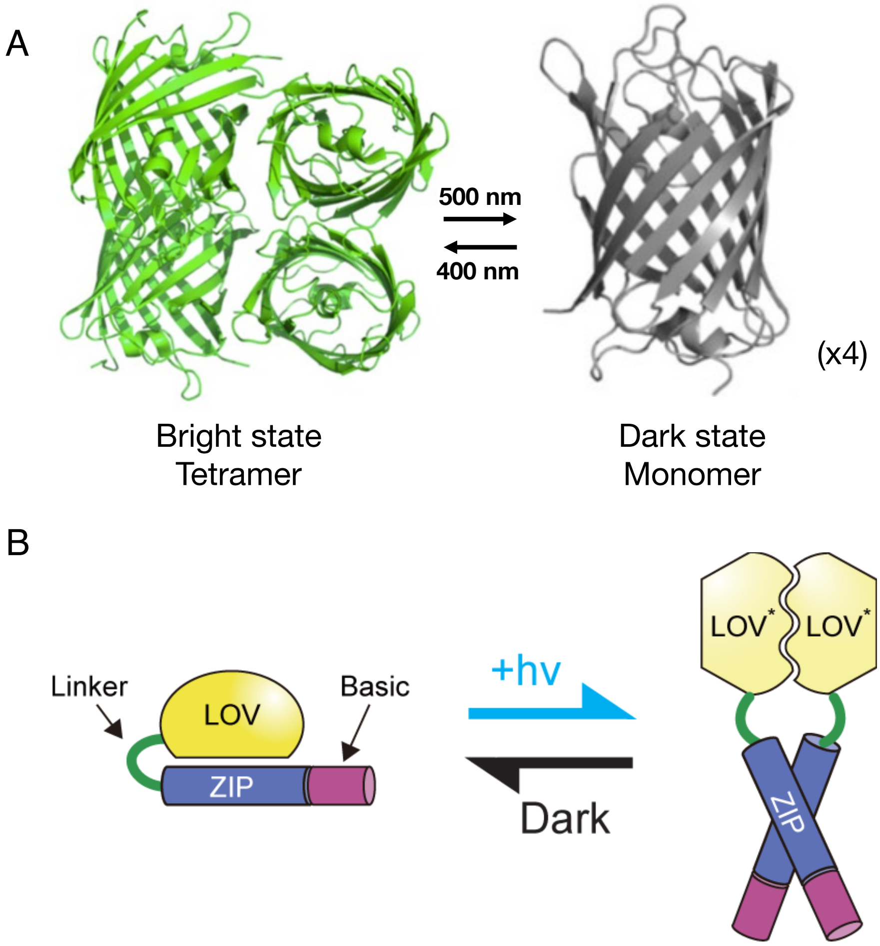


Fig. 3-1 (A) Dronpa 光異性化の模式図 (B) Photozipperの光異性化の模式図

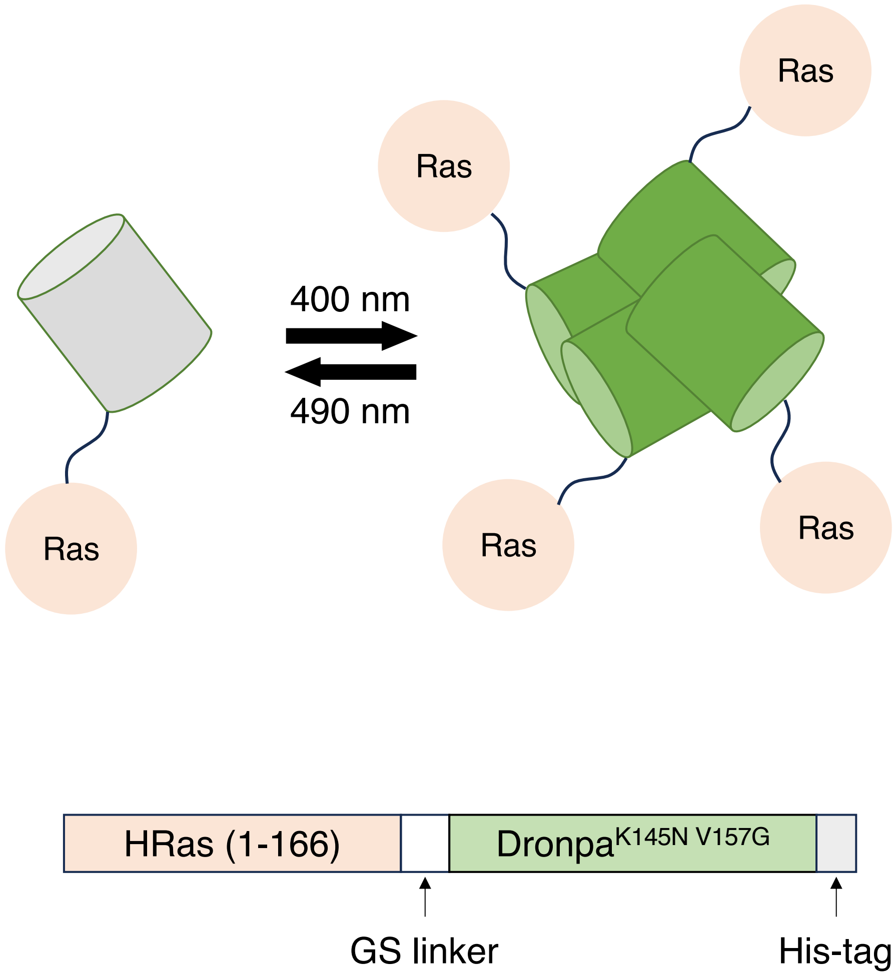


Fig. 3-2 (A) Ras-Dronpaの光制御の模式図(B) Ras-Dronpaの設計図

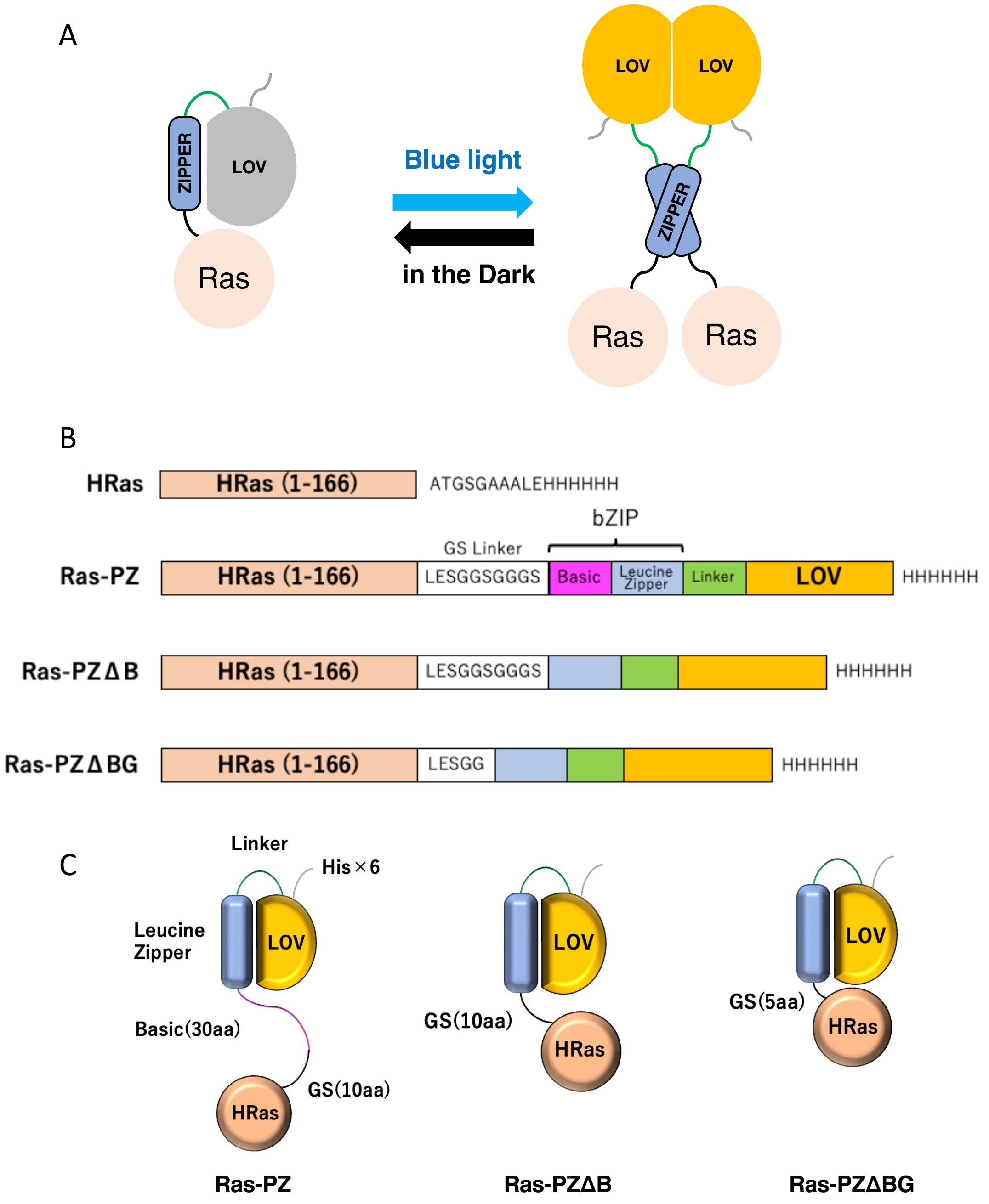


Fig. 3-3 (A) Ras-PZの光制御の模式図(B) Ras-PZの設計図 (C) Ras-PZの概念図

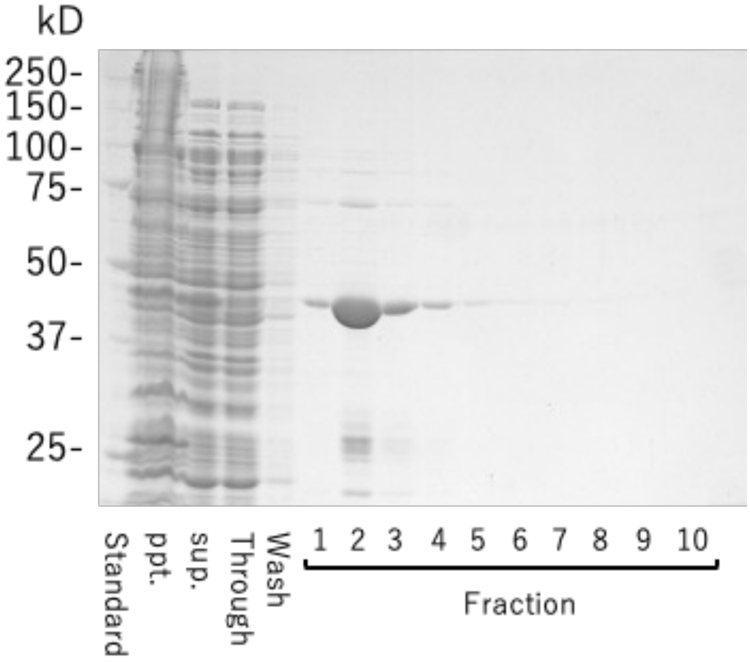


Fig. 3-4 SDS-PZGEによるRas-Dronpa精製確認

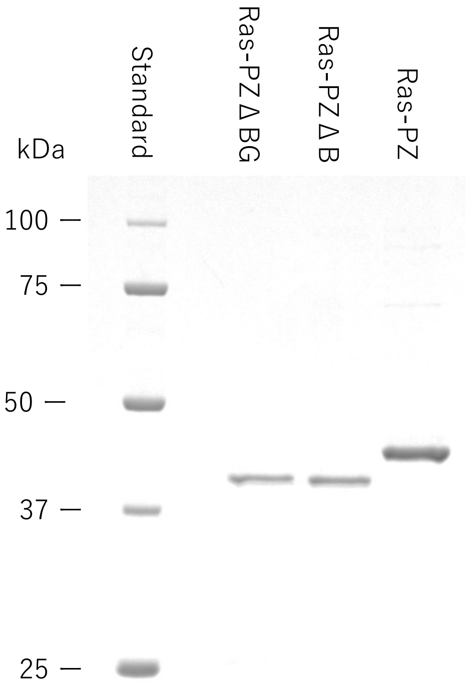


Fig. 3-5 Ras-PZsの精製確認 標準 (レーン 1)、Ras-PZΔBG (レーン 2)、Ras-PZΔB (レーン 3)、および Ras-PZ (レーン 4) を含むクマシー ブリリアント ブルー (CBB) 染色 SDS-PAGE

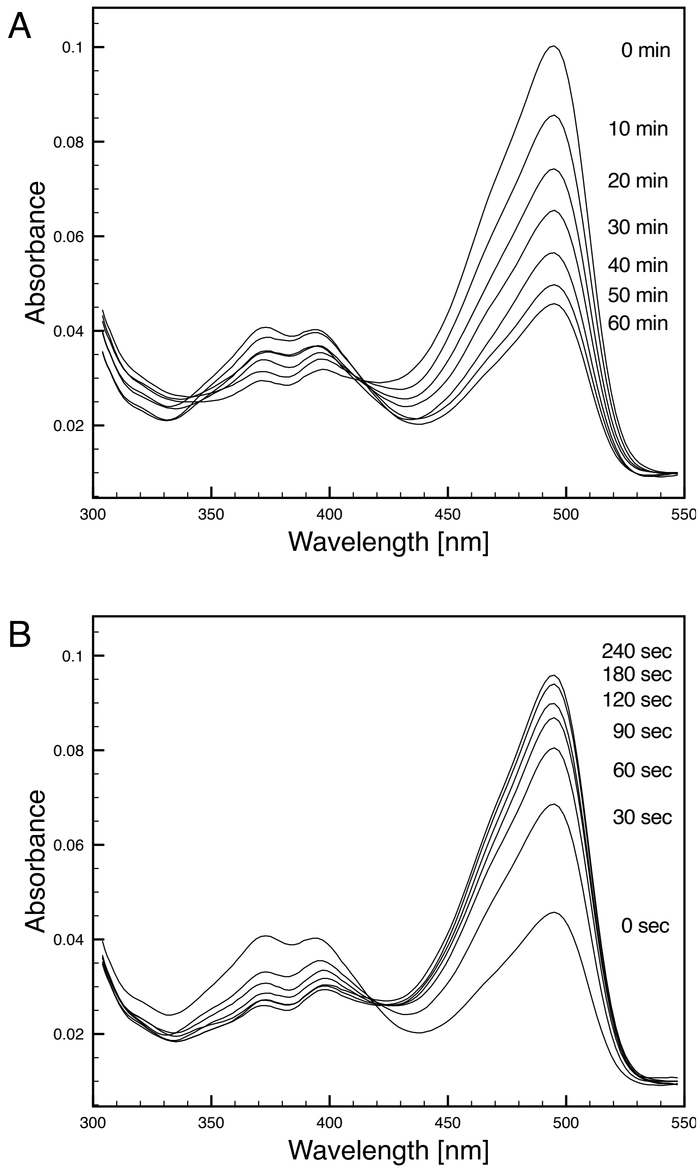


Fig. 3-6 Ras-Dronpaの光異性化に伴う吸光スペクトルの変化 (A) Ras-Dronpaへの 500 nm光照射によるスペクトルの経時変化 (B) Ras-Dronpaへの366 nm光照射によるスペクトルの経時変化

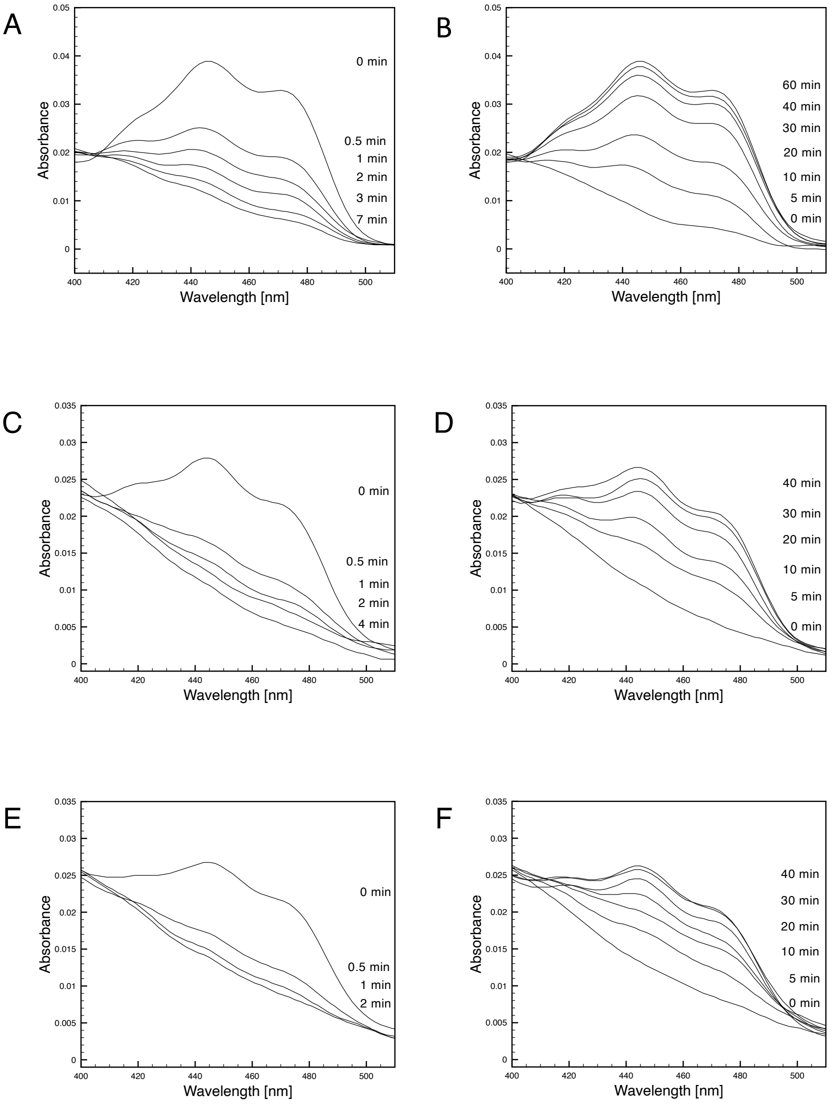


Fig. 3-7 Ras-PZの光異性化に伴う吸収スペクトル変化 Ras-PZ(A)、Ras-PZΔB(C)、Ras-PZΔBG(E)の25°C青色LED照射時の吸収スペクトルの経時変化 。 暗所でインキュベートした Ras-PZ (B)、Ras-PZΔB (D)、または Ras-PZΔBG (F) の吸収スペクトルの時間依存性変化。 この実験では、Ras-PZ を 25°Cでインキュベートしました。

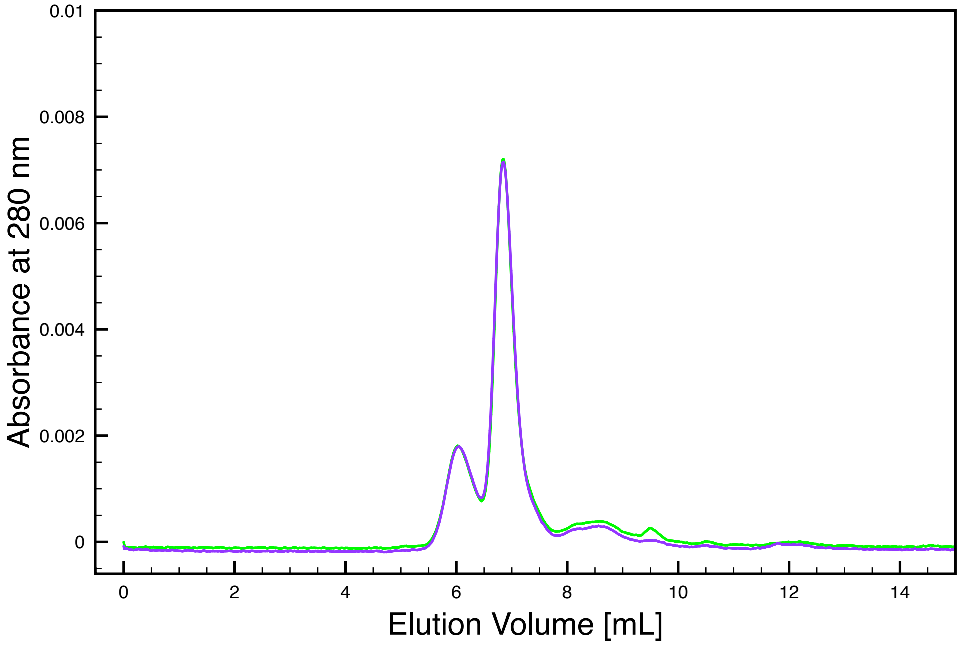


Fig. 3-8 SEC-HPLCによる Ras-Dronpaの構造測定

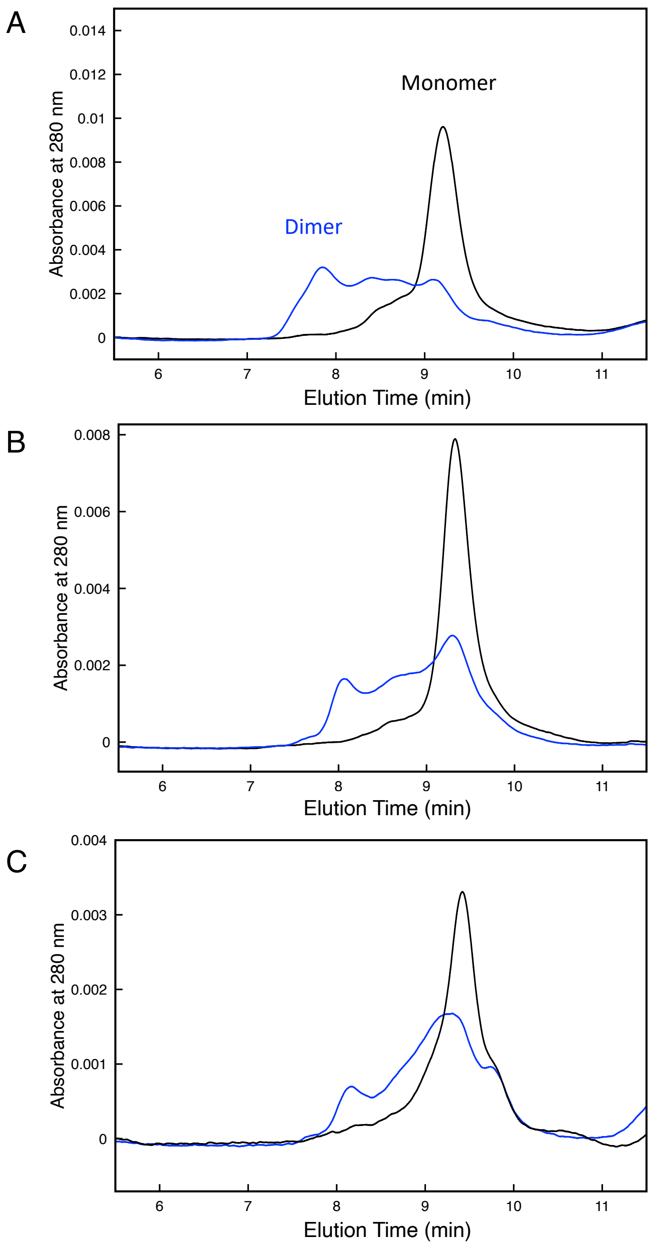


Fig. 3-9 SEC-HPLC を使用した Ras-PZ の形成のモニタリング。 暗状態 (黒線) および青状態 (青線) での (A)Ras-PZ、(B)Ras-PZΔB、および (C)Ras-PZΔBG の溶出プロファイル。 これらのサンプルを、300 mM NaCl、30 mM Tris-HCl、pH 7.5、および 2 mM MgCl2 で平衡化した SEC-HPLC (TSKgel G3000SWXL カラム) に注入しました。

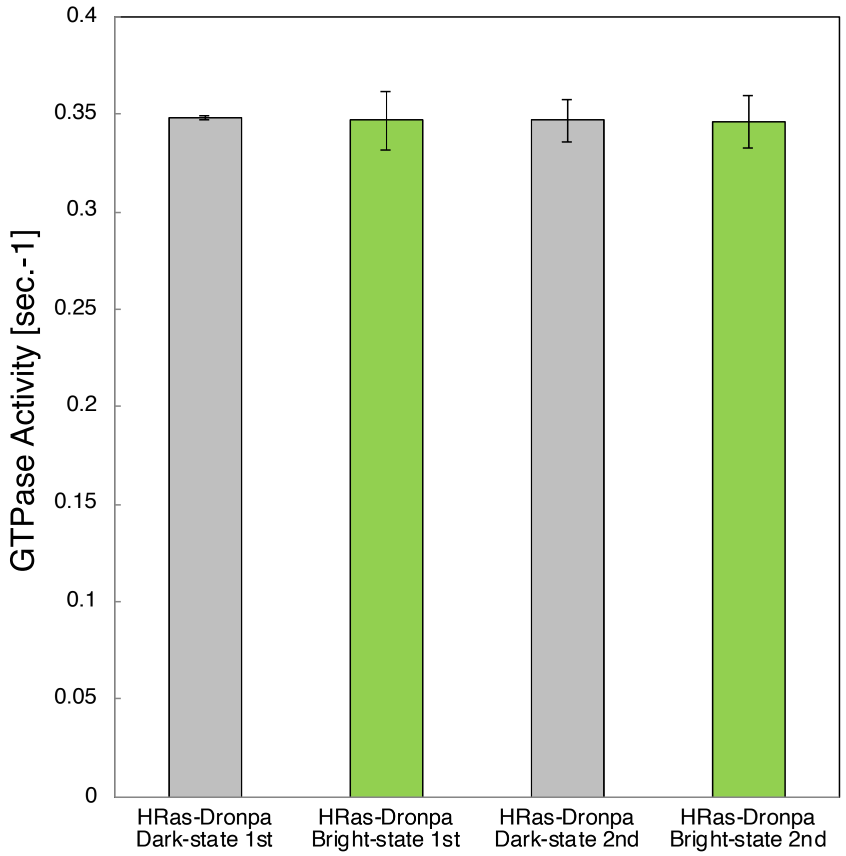


Fig.3-10 Ras-DronpaのGTPase活性 GEF、GAP存在化でのGTPase活性を
GTP加水分解時に放出される遊離リン酸の量を定量することで測定した。

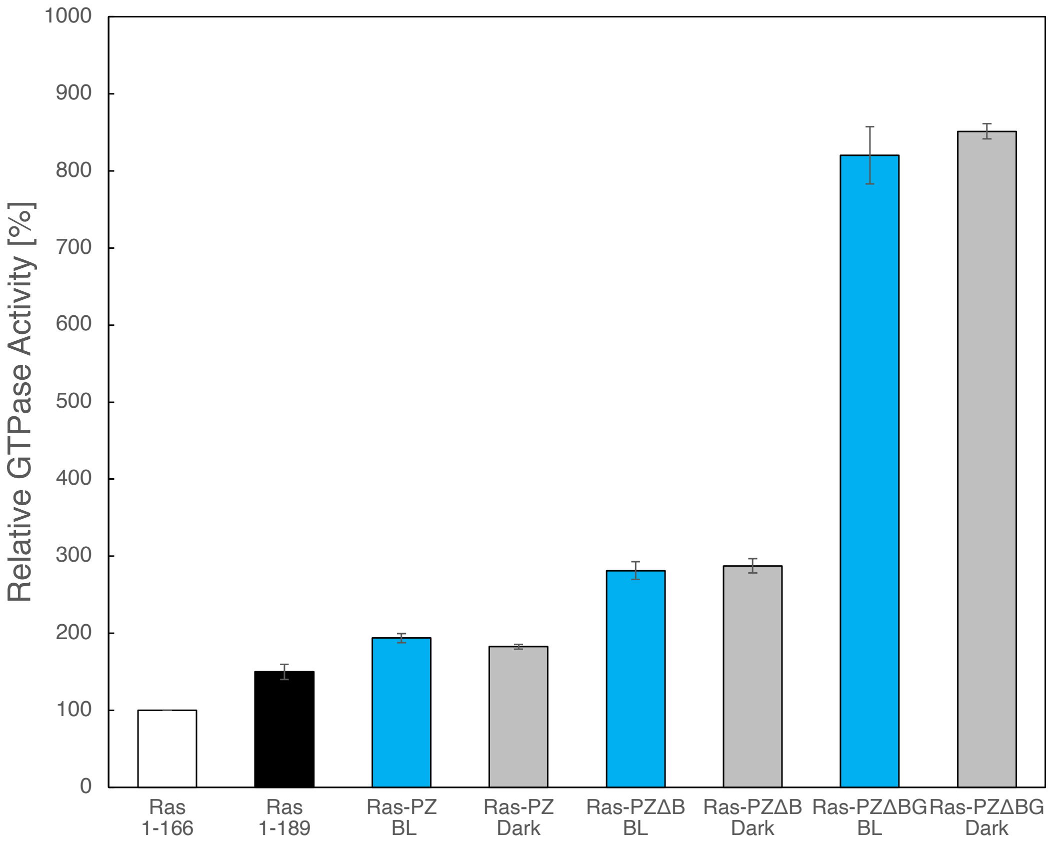


Fig. 3-11 Ras-PZsの Basal GTPase 活性 30 mM Tris-HCl pH7.5、60 mM NaCl、2 mM MgCl2、1 mM GTP、37°C。 のアッセイ溶液中の 30 μM HRas 1-166 aa (コントロール)、HRas 1-189 aa、Ras-PZ、Ras-PZΔB、または Ras-PZΔBG の存在下での GTP 加水分解の速度を測定した。 GTPase アッセイの前に、Ras-PZ に青色 LED を 15 分間照射するか、暗所で 60 分間インキュベートしました。

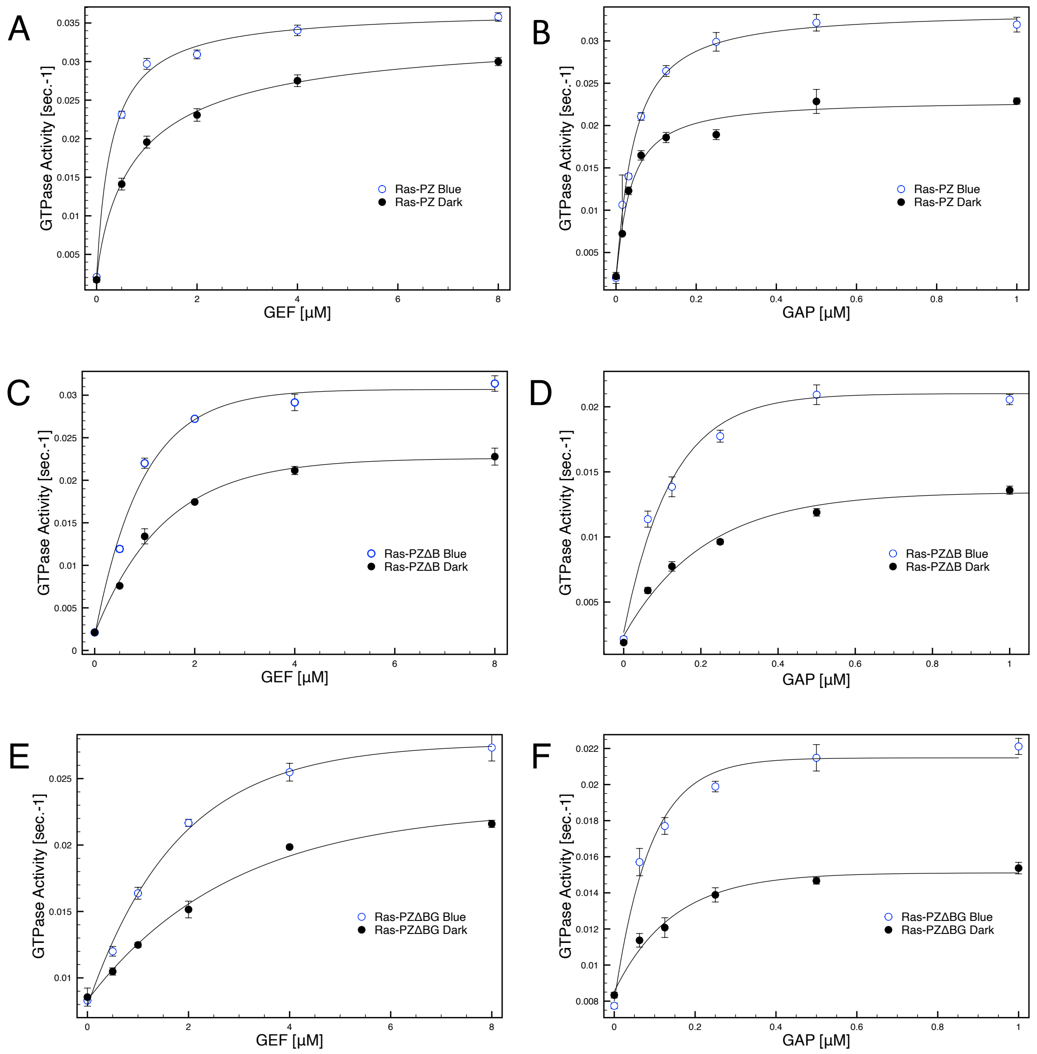


Fig. 3-12 GEF または GAP に対する親和性に対する Ras -PZ 異性体の影響。 GEF および GAP の存在下での GTPase 活性に対する Ras-PZ 光異性体の影響を、30 mM Tris-HCl pH7.5、60 mM NaCl、2 mM MgCl2、および 0 ～ 8 μM GEF、2 uM GAP および 2 μM Ras-PZ (A)、Ras-PZΔB (C)、または Ras-PZΔBG (E) および 0 ～ 1μM GAP、2μM GEF および 2 μM Ras-PZ (B)、Ras-PZΔB (D)、または Ras-PZΔBG (F)を含む 1 mM GTP からなるアッセイ緩衝液中で測定しました。

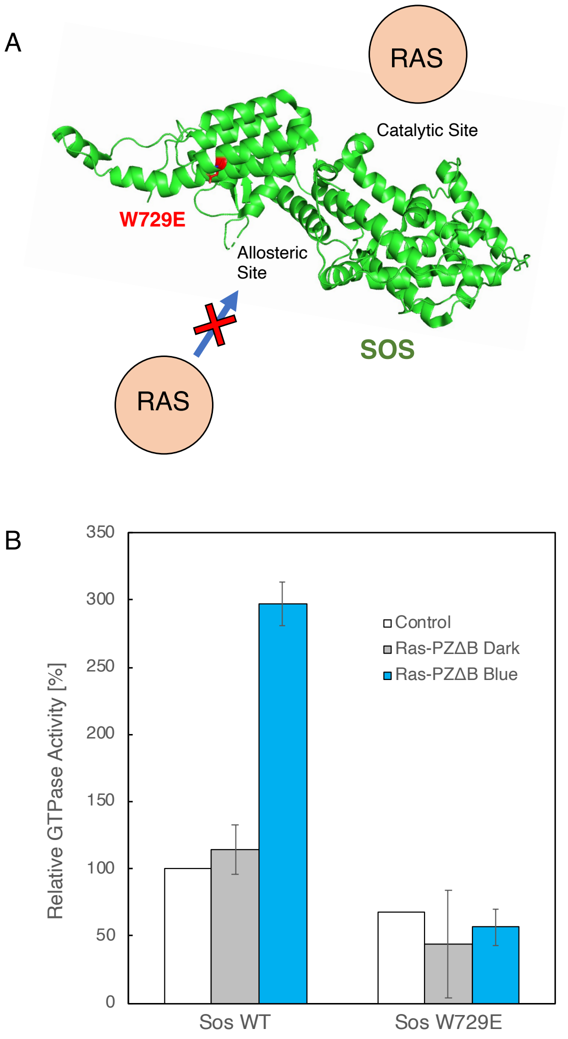


Fig. 3-13 Sos のアロステリック部位による活性化。 (A)Sos W729E は、アロステリック Ras への結合が損なわれた変異体です。 (B) 30 mM Tris-HCl pH7.5、60 mM NaCl 、2 mM MgCl2 および 1 mM GTP、25°Cのアッセイ溶液中、2 μM Sos WT または W729E、2 μM GAP、2 μM HRas (コントロール) または Ras-PZΔB の存在下での GTP 加水分解速度を測定した。

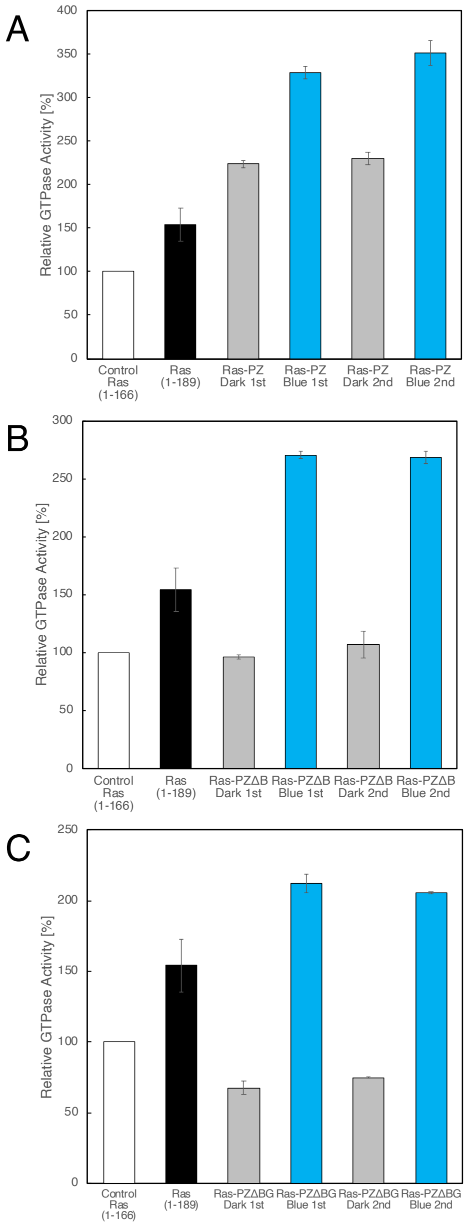


Fig. 3-14 GTPase 活性 Ras-PZ の光制御。 2 μM GEF、2 μM GAP、2 μM HRas 1-166 aa(コントロール)、HRas 1-189 aa、Ras-PZ(A)、Ras-PZΔB(B) または Ras-PZΔBG(C)存在下で30 mM Tris-HCl pH7.5、60 mM NaCl、2 mM MgCl2、1 mM GTP のアッセイ溶液中、25°Cの条件下でGTP 加水分解速度を測定した。GTPase アッセイの前に、Ras-PZ に青色 LED を交互に照射するか、暗所でインキュベートしました。 青と暗の交互を 2 回繰り返した。

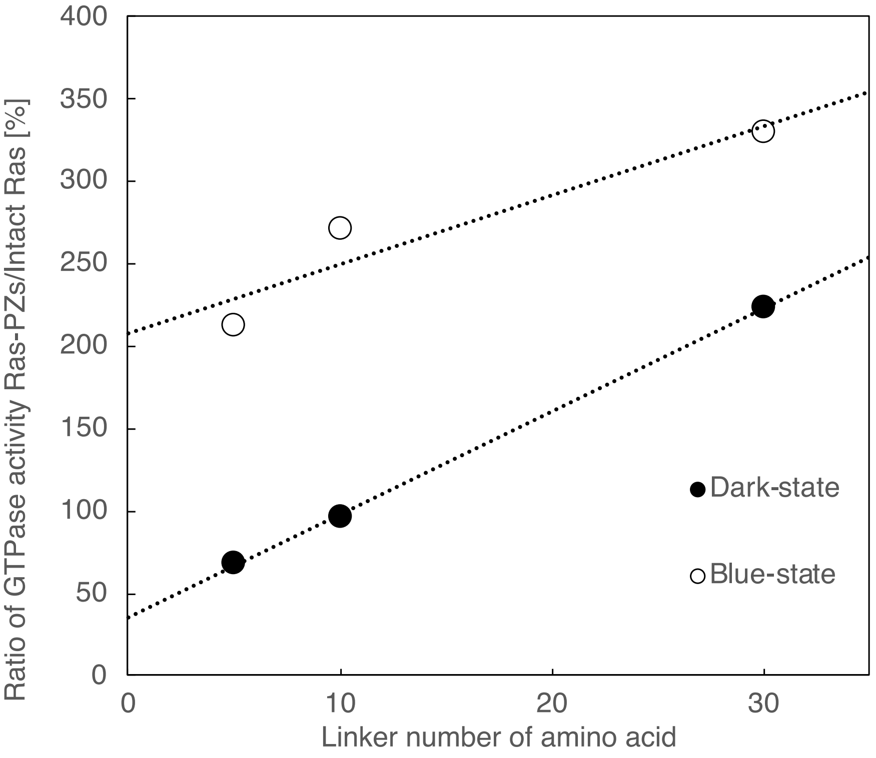


Fig. 3-15 リンカーの長さとGTPase活性の光制御効率の相関図　Ras-PZ の青色状態 (○) または暗状態 (●) の相対 GTPase 活性をリンカーの長さに対してプロットしました。 RasとPZを繋ぐGSリンカー（10aa）とPZ内の塩基性領域（20aa）をリンカーとみなします。

第四章

総括と展望

4.1　総括

本研究では、まず低分子量 G タンパク質 Ras の外部調節因子である Sos の変異体にフォトクロミック分子を導入し、その機能を外部刺激である光刺激によって可逆的に制御することで Ras GTPase 活性の光制御をおこなった。次に光応答性タンパク質 Dronpa または Aureochrome1 と HRas の触媒ドメインを融合することで、光応答性機能を持つ GTPase を作製し、GTPase 活性の光可逆的な制御をおこなった。本研究の独創的な点は、HRas 自体ではなく、その外部制御因子を用いて HRas の機能を人工的に制御することである。これまでの研究では、HRas の GTPase の核を構成する Swith1、Switch2、P-loop の近傍、そして触媒ドメインと独立した制御ドメイン HVR へフォトクロミック分子であるアゾベンゼン誘導体を導入することで HRas 本来の GTPase の光制御することが行われてきた。HRas の分子スイッチ機構は外部因子である GEF と GAP によって制御を受けている。GEF は Ras に結合している GDP を GTP へと置き換えることで Ras が下流のエフェクターと結合できるようになり下流へのシグナル伝達が活性化させる。この GEF による Ras のヌクレオチド交換反応を制御することができれば、Ras のシグナル伝達も制御が可能になると考えられる。そこで本研究では代表的な Ras-GEF の一つである Sos にフォトクロミック分子を修飾することで、HRas の GTPase の光制御する発想に至った。この方法では、外部因子である Sos への化学修飾により HRas 本来の活性を損なうことなく GTPase を制御できるという利点がある。

第二章では、フォトクロミック Sos 変異体を用いた HRas GTPase の光制御実験について述べた。まずフォトクロミック分子修飾に適した Sos 変異体を調製した。Sos は二つの Ras 結合部位を持ち、結合した Ras のヌクレオチドを交換するカタリティック部位と GTP 結合 Ras が結合することでヌクレオチド交換が促進されるアロステリック部位が存在する。この二つの Ras 結合部位の近傍にシステインを点変異で導入し、チオール基反応性アゾベンゼン誘導体(PAM、CASAB、AABM、SABM)を修飾した。アロステリック部位の近傍にある K679C、S732C とカタリティック部位近傍にある S881 を調製した。この調製した K679C、S732C、S881C に PAM と CASAB の修飾をおこない、精製した修飾 Sos 変異体を用いて HRas GTPase サイクルアッセイをおこなった。PAM 修飾 S732C は修飾により活性が減少し、また光異性体間での活性の差が見られなかった。CASAB 修飾 S732C では Trans 状態で活性が減少し、Cis 状態で活性が増加することが確認された。これはアロステリック部位への Ras の結合に極性が重要であると予想される。また trans 型と cis 型での活性に差が見られたのは、trans 型と cis 型の間で para に付加されたスルホン基の位置が変化することで Ras-Sos 間相互作用に影響を及ぼすと考えられる。S881C は PAM 修飾、CASAB 修飾ともに活性が減少した。これはアゾベンゼン修飾による立体障害のためだと考えられる。CASAB 修飾 K679C は光異性化による活性の変化が見られなかった。CASAB 修飾 S732C は、また光可逆的に活性の制御を示した。今後の計画としては、S732C に修飾した CASAB が光異

性化に伴いどのような挙動をしているのかの解析と、正電荷を持つ AABM 修飾をした Sos 変異体の活性の測定を行い、より高効率な光制御を模索していく。

第三章では、光応答性タンパク質融合 HRas の GTPase 光可逆制御について述べた。これまで当研究室ではタンパク質へのフォトクロミック分子修飾を行い HRas の活性の制御に成功してきた。しかしながらタンパク質への化学修飾は細胞内実験への応用が難しい点が挙げられる。そこで本研究では HRas 活性制御の新たなデバイスに光応答性タンパク質 Dronpa と Photozipper を起用した。まず光応答性タンパク質と HRas の融合タンパク質の設計をおこなった。HRas は 1-166 アミノ酸残基からなる G ドメインのみで GTPase 活性を持つことが明らかになっている。そこで今回は 1-166 残基のみを用いた。Dronpa は四量体形成を誘導する変異 K145N とより早い速度で異性化をする変異 V157G を含む変異体を用いた。Photozipper は二量体形成の安定化させる bZIP 領域と光応答の機能を持つ LOV ドメインを含む 113-348 アミノ酸残基を用いた。融合タンパク質は N 末側に HRas(1-166)、Dronpa を C 末側に配置し、両タンパク質間を 10 残基からなる GS リンカーで繋いだ。Photozipper も同様の配置で設計をおこなった。Ras-Dronpa、Ras-PZ は同様に光異性化を示した。Ras-Dronpa は光異性化に伴う構造の変化を示さず、400 nm を照射しても多量体形成を誘導することはできなかった。これは HRas と Dronpa 間のリンカーの長さが不十分な為、立体障害を起こしているため多量体形成を阻害している可能性が挙げられる。また GTPase サイクルアッセイは活性を示したが光異性体間での差は示さなかった。Ras-PZ は、光異性化に伴い構造を変化することが SEC-HPLC の結果から明らかになった。GTPase サイクルアッセイでは、青色 LED 照射で活性が増加し、暗所にインキュベートで活性が減少した。光異性体間での差が示された。この結果から PZ の光異性体間で活性の制御が示された。ここでより高効率な光制御を実現のために新たな Ras-PZ をデザインした。PZ の N 末側のベーシック領域は柔軟な構造を持つ。GS リンカーと合わせて HRas と PZ の間に 40 残基の柔軟な領域を持つため、HRas が光異性化による影響を受けづらいと考えられる。そこで PZ のベーシック領域(113-142aa)を削除した Ras-PZΔB と、さらに GS リンカーを 5 残基切断した Ras-PZΔBG を調製した。Ras-PZΔB、ΔBG は Ras-PZ と同様に光異性化を示し、また光異性化に伴う構造の変化を示した。GTPase サイクル活性測定では、Dark-state と Blue-state 間で、大きな活性の差を示した。Ras-PZ の光異性体間の活性の差は Ras の触媒ドメインと PZ を繋ぐリンカーの長さに依存することが明らかになった。それぞれの Ras-PZ に対し調節因子の濃度依存的 GTPase 活性を測定することで、Ras-PZ の光異性化は調節因子 GEF、GAP との相互作用に影響を及ぼしていることが示唆された。また本研究で用いた GEF である Sos のアロステリック部位が機能しなくなる変異 W729E を用いた GTPase 活性では、光異性体間での活性亜の差が観測されない。このことから、Ras-PZ の GTPase 活性の光制御には Sos のアロステリック部位との相互作用が重要であることが示唆された。Ras-PZ の光制御機構は、複合的な要素によって調節されていると考えられる。

4.2　展望

本研究では、機械的生体分子スイッチとして細胞内情報伝達を制御する情報伝達経路の分岐点に位置し、特異的に標的タンパク質に結合することで時間的・空間的に経路選択を行い、細胞の増殖・分化・運動、脂質小胞の輸送、遺伝子発現などの調節に関与している 低分子量 G タンパク質の 1 つである Ras の活性を、外部調節因子である Sos にフォトクロミック分子を導入した光応答性 Sos 変異体を用いることで、光可逆的な制御に成功した。また光応答性タンパク質である Photozipper の一部を HRas の触媒ドメインと融合することで光応答性機能を持つ Ras を調製し、Photozipper の光異性化に伴う GTPase 活性の制御に成功した。これは調節タンパク質との相互作用や情報伝達の標的タンパク質との相互作用を光制御し、Ras の関与する情報伝達を人工的な制御ができる可能性を示唆している。また、低分子量 G タンパク質である Ras, Rho, Rab, Ran, Sar/Arf は機能 的にも構造的にも酵母から哺乳類まで極めて高度に保存されていることから他の低分子量 G タンパク質に応用することで Ras の関与する情報伝達だけでなく低分子量 G タンパク質 の関与する情報伝達も同様に光制御できる可能性を示唆している。

本研究では、Sos の二つの Ras 結合部位の近傍にシングルシステインを導入し、そこへチオール基反応性アゾベンゼン誘導体を修飾することで、Ras へのヌクレオチド交換反応の制御をおこなったが、二価架橋性アゾベンゼン誘導体を Ras との相互作用部位の近傍に限らず Sos の α ヘリックスに導入することで劇的な構造の変化を誘導することで、さらに効果的な光制御が期待される。

本研究で示した生体分子機械の仕組みを利用しその機能を人工的に制御する方法は、今後その機械的仕組みに対する見識が深まることで汎用性が高くなることが期待できる。

参考文献

1. Mermall, V., Post, P. L. and Mooseker, M. S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. Science 279, 527-533

2. Ian A. Prior, Paul D. Lewis and Carla Mattos. (2012) A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. Cancer Res. 72, 2457-2467

3. Mermall, V., Post, P. L. and Mooseker, M. S. (1998) Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. Science 279, 527-533

4. Mehta, A. D., Rock, R. S., Rief, M., Spudich, J. A., Mooseker, M. S., and Cheney, R. E. (1999) Myosin-V is a processive actin-based motor. Nature 400, 590–593

5. Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R. (2003) Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. Science 300, 2061–2065

6. Forkey, J. N., Quinlan, M. E., Shaw, M. A., Corrie, J. E., and Goldman, Y. E. (2003) Three-dimensional structural dynamics of myosin V by single-molecule fluorescence polarization. Nature 422, 399–404

7. Burgess, S., Walker, M., Wang, F., Sellers, J. R., White, H. D., Knight, P. J., and Trinick, J. (2002) The prepower stroke conformation of myosin V. J. Cell Biol. 159, 983–991

8. Walker, M. L., Burgess, S. A., Sellers, J. R., Wang, F., Hammer, J. A., 3rd, Trinick, J., and Knight, P. J. (2000) Two-headed binding of a processive myosin to F-actin. Nature 405, 804–807

9. Nguyen H, and Higuchi H. (2005) Motility of myosin V regulated by the dissociation of single calmodulin. Nat Struct Mol Biol. 12, 127-32

10. Miguel Vicente-Manzanares, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein & Alan Rick Horwitz. (2009) Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10, 778-790

11. Searching for the Mind with Jon Lieff, M.D. "http://jonlieffmd.com/blog/yet-another -new-type-

of-neuroplasticity-with-myosin-motors"

12. Ebashi S. (1974) Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca-troponin-tropomyosin system. Essays Biochem. 10, 1-36

13. Pfitzer G. (2001) Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. J Appl Physiol. 91, 497-503

14. Means AR, Bagchi IC, Vanberkum MFA and Kemp BE. (1991) Regulation of smooth muscle myosin light chain kinase by calmodulin. Adv Exp Med Biol. 304, 11-24

15. Ikebe M and Morita J. Identification of the sequence of the regulatory light chain required for the phosphorylation dependent regulation actomyosin. J Biochem. 266, 21339-21342

16. Kamisoyama H, Araki Y and Ikebe M. (1994) Mutgenesis of the phosphorylation site (Serine 19) of smooth muscle myosin regulatory light chain and its effects on the properties of myosin. Biochemistry. 33, 840-847

17. Konishi K, Katoh T, Morita F and Yazawa M. (1998) Conformation, filament assembly, and activity of single-headed smooth muscle myosin. J Biochem. 124, 163-70

18. Cremo CR, Sellers JR and Facemyer KC. (1995) Two heads are required for phosphorylation-dependent regulation of smooth muscle myosin. J Biochem. 270, 2171-5

19. Rovner AS, Fagnant PM and Trybus KM. (2003) The two heads of smooth muscle myosin are enzymatically independent but mechanically interactive. J Biochem.. 278, 26938-26945

20. Ronald D. Vale, Thomas S. Reese, and Michael P. Sheetz. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell. 42, 39-50

21. Sarah Rice, Abel W. Lin, Daniel Safer, Cynthia L. Hart, Nariman Naber, Bridget O. Carragher, Shane M. Cain, Elena Pechatnikova, Elizabeth M. Wilson-Kubalek, Michael Whittaker, Edward Pate, Roger Cooke, Edwin W. Taylor, Ronald A. Milligan, and Ronald D. Vale. (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. Nature. 402, 778-784

22. Brendza KM, Sontag CA, Saxton WM, and Gilbert SP. (2000) A kinesin mutation that uncouples motor domains and desensitizes the gamma-phosphate sensor. J Biol Chem. 275, 22187-22195

23. Hackney, D.D. (1988) Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release .Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 6314-6318

24. Hackney, D.D. (1994).Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 6865-6869

25. Miki H., Okada Y., and Hirokawa N. (2005)Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. Cell Biology. 15, 467-476

26. Vallee RB and Sheetz MP. (1996) Targeting of motor proteins. Science. 271, 1539-1544

27. Andrew T. Mackey and Susan P. Gilbert. (2000) Moving a Microtubule May Require Two

28. Heads: A Kinetic Investigation of Monomeric Ncd. Biochemistry. 39, 1346-1355

29. Lisa M. Klumpp, Andreas Hoenger, and Susan P. Gilbert. (2003) Kinesin's second step. Proc

Natl Acad Sci U S A. 101, 3444-3449

30. 伊藤広, 西村明幸, 永井裕介. (2013) 三量体 G タンパク質シグナル制御機構の新たなる 展開. 生化学第 85 巻第 7 号, 532-542

31. Ivan Rayment. (1996) Kinesin and myosin: molecular motors with similar engines. Structure. 4, 501–504

32. Ronald D. Vale and Robert J. Fletterick. (1997) The Design Plan of Kinesin Motors. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 745–77

33. Vale, R.D., Milligan, R.A. (2000) The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. Science. 288, 88-95

34. Kull, F. J., Vale, R.D. and Fletterick, R. (1998) The case for a common ancestor: kinesin and myosin motor proteins and G proteins. J. Muscle Res. Cell Motil. 19, 877-886

35. Sablin, Elena P., Kull, F. Jon, Cooke, Roger, Vale, Ronald D. and Fletterick, Robert J (1996) Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd. Nature. 380, 555-559

36. Kull, F. Jon, Sablin, Elena P., Lau, Rebecca, Fletterick, Robert J. and Vale, Ronald D. (1996) Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. Nature. 380, 550-555

37. Vale, Ronald D. (1996) Switches, latches and amplifiers: common themes of G proteins and molecular motors (Commentary). J Cell Biol. 135, 291-302

38. Oldham WM, Hamm HE. (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. Nat Rev Mol Cell Biol. 9, 60-71

39. Van Eps N, Preininger AM, Alexander N, Kaya AI, Meier S, Meiler J, Hamm HE, Hubbell WL. (2011) Interaction of a G protein with an activated receptor opens the interdomain interface in the alpha subunit. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 9420-9424

40. Paduch M, Jeleń F, Otlewski J. (2001) Structure of small G proteins and their regulators. Acta Biochim Pol. 48, 829-850

41. Sharon L Campbell, Roya Khosravi-Far, Kent L Rossman, Georey J Clark and Channing J Der. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. Oncogene. 17, 1395-1413

42. Ingrid R. Vetter and Alfred Wittinghofer. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science. 294, 1299–1304

43. Maurer T, Garrenton LS, Oh A, Pitts K, and et al. (2012) Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 5299-5304

44. Ingrid R. Vetter and Alfred Wittinghofer. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. Science. 294, 1299–1304

45. Karen A. Maegley, Suzanne J. Admiraal, and Daniel Herschlag. (1996) Ras-catalyzed hydrolysis of GTP: A new perspective from model studies. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 93, 8160–8166

46. Jingling Liao, Fumi Shima, Mitsugu Araki, Min Ye, Shin Muraoka, Takeshi Sugimoto, Mei Kawamura, Naoki Yamamoto, Atsuo Tamura, Tohru Kataoka. (2008) Two conformational states of Ras GTPase exhibit differential GTP-binding kinetics. Biochemical and Biophysical Research Communications. 369, 327–332

47. Alfres Wittinghofer and Herbert Waldmann H. (2000) Ras: A molecular switch involved in tumor formation. Angew Chem Int Ed. 39, 4192–4214

48. John F. Hancock. (2003) RAS PROTEINS: DIFFERENT SIGNALS FROM DIFFERENT LOCATIONS. Molecular Cell Biology. 4, 373-382.

49. Javier de Castro Carpeño, Cristóbal Belda-Iniesta. (2013) KRAS mutant NSCLC, a new opportunity for the synthetic lethality therapeutic approach. Translational Lung Cancer Research. 2, 142-151

50. Kevin D. Corbett and Tom Alber. (2001) The many faces of Ras: recognition of small GTP-binding proteins. TRENDS in Biochemical Sciences. Sci. 26, 710–716

51. Fernández-Medarde A and Santos E. (2011) Ras in Cancer and Developmental Diseases. Genes & Cancer. 2, 344–358

52. Ian A. Prior, Paul D. Lewis and Carla Mattos. (2012) A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. Cancer Res. 72, 2457-2467

53. Johannes L. Bos and Alfred Wittinghofer. (2007) GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. Cell 129, 865-871

54. Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-bind- ing switch in three dimensions. Science 294, 1299–1304.

55. Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D., and Kuriyan, J. (1998). The structural basis of the activation of Ras by Sos. Nature 394, 337–343.

56. Worthylake, D.K., Rossman, K.L., and Sondek, J. (2000). Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. Nature 408, 682–688.

57. Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A., and Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regu- lator of chromosome condensation (RCC1). Cell 105, 245–255.

58. Goldberg, J. (1998). Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. Cell 95, 237–248.

59. Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R.S., Alexandrov, K., and Rak, A. (2006). Nucleotide exchange via local protein unfolding–structure of Rab8 in complex with MSS4. EMBO J. 25, 1445–1455.

60. Kai Zhang and Bianxiao Cui. (2015) Optogenetic control of intracellular signaling pathways. Trends in Biology, Vol. 33, No.2, 92-100

61. Xin X. Zhou and Michael Z. Lin. (2012) Optical Control of Protein Activity by Fluorescent Protein Domains. Science, 338, 810-814

62. Yoichi Nakatani and Osamu Hisatomi (2015) Molecular Mechanism of Photozipper, a Light-Regulated Dimerizing Module Consisting of the bZIP and LOV Domains of Aureochrome-1. Biochemistry, 54, 3302-3313 Nakatani Y. and Hisatomi O. (2015) Molecular Mechanism of Photozipper, a Light-Regulated Dimerizing Module Consisting of the bZIP and LOV Domains of Aureochrome-1. *Biochemistry 54, 3302-3313*

63. Hisatomi, O., and Furuya, K. (2015) A light-regulated bZIP module, photozipper, induces the binding of fused proteins to the target DNA sequence in a blue light-dependent manner. *Photochem. Photobiol. Sci. 14, 1998-2006*

64. Nakatani Y. and Hisatomi O. (2018) Quantitative analyses of the equilibria among DNA complexes of a blue-light-regulated bZIP module, Photozipper. *BPPB 15, 8-17*

65. Tsukuno, H., Ozeki, K., Kobayashi, I., Hisatomi, O., and Mino, H. (2018) Flavin-Radical Formation in the Light-Oxygen-Voltage-Sensing Domain of the Photozipper Blue-light Sensor Protein. *J. Phys. Chem. B 122, 8819-8823*

66. Ozeki, K., Tsukuno, H., Nagashima, H., Hisatomi, O., and Mino, H. (2018) Dimeric Structure of the Blue Light Sensor Protein Photozipper in the Active State. *Biochemistry 57, 494-497*

67. Tateyama, S., Kobayashi, I., and Hisatomi, O. (2018) Target Sequence Recognition by a Light-Activatable Basic Leucine Zipper Factor, Photozipper. *Biochemistry 57, 6615-6623*

68. Kobayashi, I., Nakajima, H., and Hisatomi, O. (2020) Molecular Mechanism of Light-Induced Conformational Switching of the LOV Domain in Aureochrome-1. *Biochemistry 59, 2592-2601*

69. Nakajima, H., Kobayashi, I., Adachi, Y., and Hisatomi, O. (2021) Transmission of light signals from the light-oxygen-voltage core via the hydrophobic region of the β-sheet surface in aureochrome-1. *Sci. Rep. 11, 1-10*

70. Tsuji, A., Yamashita, H., Hisatomi, O., and Adachi, Y. (2022) Dimerization processes for light-regulated transcription factor Photozipper visualized by high-speed atomic force microscopy. *Sci. Rep. 12, 1-11*

71. Medarde, A.F., and Santos, E. (2011) Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Gene & Cancer 2, 3, 344-358*

72. Campbell, S.L., Far, R.K., Rossman, K.L., Clark, G.J., and Der, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene 17, 1395-1413*

73. Gasper, R., and Wittinghofer, F. (2020) The Ras switch in structural and historical perspective. *Biol. Chem. 401, 1, 143-163*

74. Vale, R.D. (1996) Switches, Latches, and Amplifiers/ Common Themes of G Proteins and Molecular Motors. *J. Cell Biol. 135, 291-302*

75. Kull, F.J., Vale, R.D., and Fretterick, R.J. (1998) The case for a common ancestor/ kinesin and myosin motor proteins and G proteins. *J. Muscle Res. Cell Motil. 19, 877-886*

76. Szymański, W., Beierle, J.M., Kistemaker, H.A.V., Velema, W.A., and Feringa, B.L. (2013) Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev. 113, 6114-6178*

77. Yamada, M. D., Nakajima, Y., Maeda, H., and Maruta, S. (2007) Photocontrol of Kinesin ATPase Activity Using an Azobenzene Derivative. *J. Biochem. 142, 691-698*

78. Ishikawa, K., Tamura, Y., and Maruta, S. (2013) Photocontrol of mitotic kinesin Eg5 facilitated by thiol-reactive photochromic molecules incorporated into the loop L5 functional loop. *J. Biochem. 155, 3, 195-206*

79. Iwata S. and Maruta S. (2015) Photocontrol of the GTPase activity of the small G protein K-Ras by using an azobenzene derivative. BB Reports 4, 268-276

80. Nahar, R., Noor A, A.M., Alrazi, I.M., and Maruta S. (2021) Photocontrol of GTPase Cycle and Multimerization of the Small G-Protein H-Ras using Photochromic Azobenzene Derivatives. *Biosci., Biotech. Res. Asia 18, 4, 661-672*

81. Zhang, K., and Cui, B. (2015) Optogenetic control of intracellular signaling pathways. *Trends Biotechnol. 33, 2, 92-100*

82. Toyooka, T., Hisatomi, O., Takahashi, F., Kataoka, H., and Terazima, M. (2011) Photoreactions of Aureochrome-1. *Biophys. J. 100, 11, 2801-2809*

83. Hisatomi, O., Takeuchi, K., Zikihara, K., Ookubo, Y., Nakatani, Y., Takahashi, F., Tokutomi, S., and Kataoka, H. (2013) Blue Light-Induced Conformational Changes in a Light-Regulated Transcription Factor, Aureochrome-1. *Plant Cell Physiol. 54, 1, 93–106*

84. Hisatomi, O., Nakatani, Y., Takeuchi, K., Takahashi, F., and Kataoka, H. (2014) Blue Light-induced Dimerization of Monomeric Aureochrome-1 Enhances Its Affinity for the Target Sequence. *JBC 289, 25, 17379–17391*

85. Vo, U., Vajpai, N., Flavell, L., Bobby, R., Breeze, A. L., Embrey, K. J., and Bolovanov, A. P. (2016) Monitoring Ras interactions with the nucleotide exchange factor son of sevenless (sos) using site specific NMR reporter signals and intrinsic fluorescence. *J. Biol. Chem. 291, 1703-1718.*

86. Freedman, T.S., Sondermann, H., Friedland, G.D., Kortemm, T., Bar-sagi, D., Marqusee, S., and Kuriyan, J. (2006) A Ras-induced conformational switch in the Ras activator Son of sevenless. *PNAS 103,45, 16692–16697*

87. Gerwert, K., Mann, D., and Kotting, C. (2017) Common mechanisms of catalysis in small and heterotrimeric GTPases and their respective GAPs. *Biol. Chem. 398, 523-533*

88. Sadakane, K., Alrazi, I.M., and Maruta, S. (2018) Highly efficient photocontrol of mitotic kinesin Eg5 ATPase activity using a novel photochromic compound composed of two azobenzene derivatives. *J. Biochem. 164, 4, 295-301*

89. Sadakane, K., Takaichi. M., and Maruta, S. (2018) Photo-control of the mitotic kinesin Eg5 using a novel photochromic inhibitor composed of a spiropyran derivative. *J. Biochem. 164, 3, 239-246*

90. Alrazi, I.M., Sadakane, K., and Maruta, S. (2021) Novel photochromic inhibitor for mitotic kinesin Eg5 which forms multiple isomerization states. *J. Biochem. 170, 2, 229-237*

91. Zhou, X.X., Chung, H.K., Lam, A.J., and Lin, M.J. (2012) Optical Control of Protein Activity by Fluorescent Protein Domains. *Science, 338, 6108, 810-814*

92. Mitra, D., Yang, X., and Moffat, K. (2012) Crystal Structures of Aureochrome1 LOV Suggest New Design Strategies for Optogenetics. *Structure 20, 698-706*

93. Lungu, O.I., Hallet, R.A., Choi, E.J., Aiken, M.J., Hahn, K.M., and Kuhlman, B. (2012) Designing Photoswitchable Peptides Using the AsLOV2 Domain. *Chem. Biol. 19, 507-517*

94. Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U.R., and Albert, S. (2007) Ras oncogenes and their downstream targets. *BBA 1773, 1177-1195*

95. Chavan, T.S., Jang, H., Khavrutskii, L., Abraham, S.J., Banerjee, A., Freed, B.C., Johannessen, L., Tarasov, S.G., Gaponenko, Gaponenko., Nussinov, R., and Tarasova, N.I. (2015) High-Affinity Interaction of the K-Ras4B Hypervariable Region with the Ras Active Site. *Biophys. J. 109, 2602-2613*

96. Lenzen, C., Cool, R.H., Prinz, H., Kuhlmann, J., and Wittinghofer, A. (1998) Kinetic Analysis by Fluorescence of the Interaction between Ras and the Catalytic Domain of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Cdc25Mm. *Biochemistry 37, 7420-7430*