

情報伝達タンパク質 Ras/RAF 間の分子認識反応の 1 分子キネティクスとダイナミクス  
～細胞内 1 分子可視化解析法を中心に～

日比野 佳代

独立行政法人理化学研究所佐甲細胞情報研究室

## 1. 細胞内情報伝達システム

細胞は、外部の環境に対して、柔軟に応答します。細胞膜で受け取られた信号は、細胞内情報伝達システムを介して処理され、様々な細胞応答を引き起こします。情報伝達システムはたくさんの種類の生体分子で構成されており、生体分子間の生化学反応に支えられて機能しています。細胞情報伝達システムでもっとも良く研究が進んだものの一つに“Ras-MAPK”システムがあります。私が研究対象としている“Ras から RAF への反応”は、このシステムの上流部に位置し、情報伝達を ON/OFF 制御するスイッチのような役割をする要の反応です。Ras から RAF への情報伝達制御は、Ras と RAF の正しい分子認識によって実行されると考えられていますが、生細胞内における Ras/RAF 分子認識反応のキネティクスやダイナミクスはよくわかっていません。

## 2. これまでの Ras/RAF 分子認識モデルと問題点

Ras は低分子量 G 蛋白質で、GDP を結合した不活性化型と GTP を結合した活性化型の間を、ヌクレオチドの交換反応と加水分解反応によりいきまします。細胞の増殖因子刺激を契機に、Ras が活性化すると、下流の標的タンパク質の一つ RAF に含まれる Ras 結合ドメインと Ras との親和性が上昇し、相互作用をします。Ras は、その活性にかかわらず、細胞膜に局在しているため、Ras との結合は RAF の細胞質から細胞膜への局在変化を引き起こします。RAF が移行した細胞膜では、RAF を活性化するまだ同定されていないキナーゼが待っていて、RAF をリン酸化して活性化させ、活性化型 RAF は下流へ信号を伝えられると考えられています。このように、Ras は RAF の細胞内局在を調節することで、RAF の活性を調節していると考えられてきましたが、最近、もっと複雑な機構を示唆するような報告がされています。①RAF には、二つの Ras 結合領域があること。②RAF は closed 型と、open 型の少なくとも 2 つの構造をとり、RAF が closed 型をとっているときには Ras 結合領域の一つが RAF の C 末のドメインと分子内相互作用していること。③RAF の構造変化と活性化には関係があり、④Ras が恒常的に活性化した細胞の中では RAF は open 型になっていること、などです。これらのことを総合すると、Ras から RAF への情報伝達反応の過程には、RAF の構造変化や未知のキナーゼによる RAF のリン酸化反応など複数の反応が関わっている可能性がありそうです。この反応過程をどの様に調べたらよいのでしょうか？例えば、情報伝達反応が起こっている最中の

細胞内で、Ras と RAF の結合解離反応を直接見たり、Ras と反応中の RAF の構造変化を見たりすることで、反応キネティクスと RAF の構造変化の関係を調べることは、有効な方法の一つと考えられますが、従来用いられている生化学的、分子生物学的な方法による、多数分子の平均的な挙動の解析だけでは難しそうです。

### 3. 細胞内でタンパク質の動態を 1 分子ごとにみる

生きた細胞で実際に起こっている生化学反応を直接見て調べようという試みは、近年、非常に精力的に行われています。Ras-MAPK システムに関しても、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をもとにした蛍光プローブの開発のおかげで、システムを構成する生体分子の細胞内局在変化はもちろん、いくつかの構成要素については活性化や構造を検出することができるようになりました。一方で、細胞の中で分子の挙動を 1 分子ごとに見ることができるようになりました。今回は、この方法を組み合わせて、Ras/RAF の分子認識反応の 1 分子キネティクスとダイナミクスの解析と、RAF の構造変化の 1 分子可視化解析を実現しました。

### 4. 1 分子キネティクスとダイナミクス

キネティクス (化学反応速度論) 解析とは、いろいろな環境下で反応速度を測り、得られた実験結果を説明するための必要最低限の反応経路をきめて、反応速度がどのような機構によって規定されているかを推測するものです。キネティクス解析を用いて得られる情報は、結合速度定数、解離速度定数、酵素反応の速度定数などで、どれも、反応を特徴つける重要なパラメーターで、反応の時系列解析から得ることができます。多数分子の反応を解析するときには、全ての分子の反応を同期させる必要があるのですが、細胞の中の全ての分子の反応を同期させることはほぼできません。今回用いた 1 分子キネティクス解析では、細胞の中でバラバラにおこっている個々の分子の 1 回ごとの反応を直接見て測り、統計解析の段階で反応の始まりをそろえることで、仮想的に反応開始を同期させた時系列データとして解析します。これにより、細胞の中でキネティクス解析が可能となりました。RAF の構造の 1 分子可視化解析は、既に開発されていた FRET プローブを改良して行いました。

### 5. Ras/RAF 分子認識反応の 1 分子キネティクスとダイナミクス

これらの方法を用いて、細胞内で情報伝達反応をしている最中の、Ras/RAF 分子間の結合解離反応を 1 分子ごとに直接見て測り、分子間の反応キネティクスを決定し、反応の中間状態の有無や中間状態に関わる分子内構造変化等、分子認識反応の素過程の組み立てを直接調べた結果、Ras/RAF 分子認識反応のメカニズムが少しずつ分かってきました。今回の研究結果から提案された Ras/RAF の分子認識モデルは、「活性化型 Ras が RAF の構造変化を誘導する」というこれまで考えられていなかった Ras の活性を含むユニークなモデルです。分科会

では、最新のデータを含めて、Ras/RAF 分子認識機構、RAF の活性化機構について議論したいと思います。

RAF の様に構造変化をする情報伝達分子は他にも多く知られています。今回紹介する細胞内1分子可視化解析による、1分子キネティクスとダイナミクスの研究は、工夫次第で他の情報伝達タンパク質への応用も可能です。皆さんが興味をもっている生命現象にアプローチする際、新しい研究戦略の一候補となると嬉しく思います。