

【目的】 Ras は低分子量 GTPase の一種であり、不活性型の GDP 型から活性型の GTP 型に変換することで下流にシグナルを伝達する分子スイッチとして機能する。Ras の活性化の指標である GTP 結合型の存在割合（以後、活性割合）は GTP 加水分解速度 (k_{hy}) と GTP 交換速度 (k_{ex}) によって決定されるが、これまでの *in vitro* 解析によって得られた野生型 Ras の活性割合は 40%程度であり、シグナル依存的に活性化する分子スイッチとしての役割を説明することが出来なかった。そこで本研究では、生細胞内でのタンパク質の構造情報を取得できるインセル NMR 法を用いて細胞内 RAS の GTP 結合型割合の観測を行った。さらに、細胞内で RAS の k_{hy} や k_{ex} を変調させる要因の探索を行い、特定のタンパク質をノックアウトした細胞を用いたインセル NMR 法を確立して細胞内因子が Ras の活性に与える影響の定量を試みた。

【方法】 Ile 側鎖メチル基を選択的に ^1H - ^{13}C 標識した Ras（野生型および発癌性変異体）を HeLaS3 細胞に導入し、バイオリアクターを用いて培地を灌流しながら連続的な NMR 測定を行い、細胞内における Ras の GTP 結合型割合のリアルタイム観測を行った。

【結果】 細胞内における Ras の GP 型割合は野生型、発癌性変異体のいずれにおいても *in vitro* よりも低下していた。特に野生型 Ras については *in vitro* では 40%が GTP 型として存在したのに対し、細胞内では不活性型の GDP 型に保持されていたことから、細胞内での計測結果は Ras の分子スイッチとしての役割を正しく反映していることが示された。また、細胞内における GTP 結合型割合の低下の要因として、細胞内では Ras の k_{hy} が上昇し、 k_{ex} が低下していることが明らかとなった。細胞内における k_{hy} と k_{ex} の低下の要因を探るため、様々な分子クラウダーを添加して、細胞内分子混雑環境を模倣した条件下における k_{hy} ならびに k_{ex} の測定を行った。その結果、グリセロール存在下では k_{ex} が野生型および全ての変異体で顕著に低下したことから、粘性の増大によって細胞内 Ras の k_{ex} の低下が引き起こされていることが明らかとなった。また、細胞内における k_{hy} が上昇する因子を探索するため、HeLa 細胞の破碎液存在下における Ras の k_{hy} の測定を行った。その結果、Ras の加水分解促進因子 (GAPs) に非感受性の発癌性変異体 G12V についても加水分解の促進が観測されたことから、破碎液中に未知の加水分解促進因子が存在することが明らかとなった。また、破碎液を分子量サイズで分画して検討を行った結果、分子量 30~50 KDa の画分に Ras の GAPs が含まれることが明らかとなった。さらに、ノックアウト細胞を用いたインセル NMR 法を開発し、コントロール細胞との比較から特定の細胞内因子の寄与を定量できることを示した。

インセル NMR 法を用いた細胞内 Ras の GTP 結合型割合の定量

