

102. インセル NMR 法を活用した細胞内蛋白質の活性計測

西田 紀貴

千葉大学 大学院薬学研究院 薬品物理化学研究室

Key words : インセル NMR, 動的構造, 低分子量 GTPase

結 言

RAS は受容体型チロシンキナーゼの下流で働く代表的な低分子量 GTPase であり、EGF などの細胞外刺激に応じて不活性型の GDP 結合型から活性型の GTP 結合型へと変換される。GTP 結合型の RAS は下流のエフェクター分子と結合することで細胞内シグナル伝達経路が活性化され、細胞の増殖などが制御される。また、RAS の特定の残基に対する遺伝子変異は恒常的な RAS の活性化とそれに伴う細胞の異常増殖を引き起こすため、RAS は肺癌などの主要ながんの原因タンパク質として知られている。RAS は速度 k_{hy} で定義される GTP 加水分解反応と速度 k_{ex} で定義される GDP - GTP 交換速度反応の 2 つの活性を持ち、この反応速度のバランスで活性型である GTP 結合型 RAS の存在割合が決定される。しかし、*in vitro* で測定された k_{hy} と k_{ex} から野生型 RAS の GTP 型割合を算出すると、その 30% 以上が活性型の GTP 結合型として存在すると推定され、これは RAS が上流からの刺激依存的に活性化する分子スイッチとしての機能と矛盾する。よって、実際の細胞内において RAS の k_{hy} 、 k_{ex} は GTPase 活性化タンパク質 (GAP) やグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) など様々な細胞内因子により変調を受けていると考えられる。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い、その経時変化から細胞内における RAS の k_{hy} 、 k_{ex} を算出した [1]。

その結果、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 の加水分解を促進する因子が含まれることが明らかとなった。さらに、ロ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。

方法および結果

1. GTP 再生系を用いた RAS の k_{hy} 、 k_{ex} の同時算出法の確立

これまでの RAS の活性解析では GTP 結合型 RAS を用いて加水分解反応を、GDP 結合型 RAS と GTP アナログを用いて交換反応を観測することで k_{hy} 、 k_{ex} をそれぞれ個別に算出していたが、実際の細胞中の RAS では過剰量の GTP

存在下で加水分解反応と交換反応が同時に生じている (図 1A)。細胞内と同様に GTP 濃度が一定に保たれた条件下で k_{hy} 、 k_{ex} を同時に算出する方法を確立するため、Ile δ 1 methyl 基を選択的に同位体標識した野生型 RAS および発がん性変異体 G12V、G13D、Q61L について、酢酸キナーゼ (AcK) とアセチルリン酸 (AcP) によってサンプル中の GTP 濃度を維持する GTP 再生系存在下での NMR スペクトルを連続的に取得した。NMR スペクトル上で GDP 結合型と GTP 結合型に対応してシグナルが分離する Ile 21 のシグナル強度比から fGTP を算出し、その経時変化を理論式にフィッティングさせることで k_{hy} 、 k_{ex} を同時算出した。本手法により算出した k_{hy} 、 k_{ex} は野生型および発がん性変異体 RAS についてこれまで個別に算出された値と概ね一致し、この手法を用いることで細胞内においても RAS の fGTP の経時変化から k_{hy} と k_{ex} を算出することが可能であると判断した。

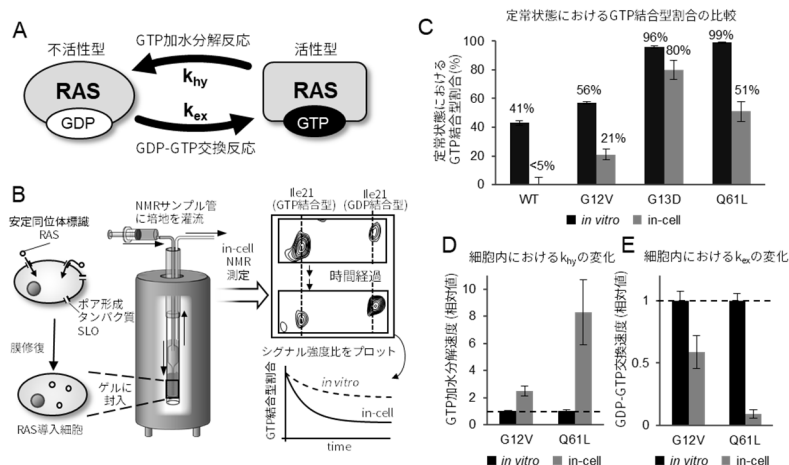


図 1. インセル NMR 法を用いた Ras の GTP 結合型割合の定量

- Ras の GTP 型割合は GTP 加水分解速度定数 (k_{hy}) と GDP-GTP 交換速度定数 (k_{ex}) によって決定される。
- RAS の細胞内 GTP 結合型割合リアルタイム観測の模式図。
- RAS 野生型 (WT) および発がん性変異体 (G12V、G13D、Q61L) 活性型割合における *in vitro* とインセルでの比較。
- D、E) *in vitro* とインセル間における発がん性変異体 (G12V、Q61L) の GTP 加水分解速度 (D) および GDP-GTP 交換速度 (E) の比較 (*in vitro* の値を基準)。

2. インセル NMR 法による細胞内 RAS 活性型割合の直接観測

次にインセル NMR 法による生細胞中の RAS の GTP 結合型割合 (fGTP) の直接観測を行った。安定同位体標識 RAS をポア形成タンパク質 Streptolysin O により HeLa S3 細胞内に導入し、NMR サンプル管に封入した後に培地をサンプル中に灌流することで細胞を生存させながら細胞内 RAS の NMR スペクトルを連続的に取得した (図 1B)。GTP 及び GDP 結合状態で異なる化学シフトを示す I21 シグナルに基づいて各時間における RAS の fGTP を算出し、その値を追跡したところ、野生型 RAS では 5% 未満、G12V、G13D、Q61L はそれぞれ 21%、80%、50% 程度の fGTP で定常状態に達していた (図 1C)。この値を *in vitro* における計測値と比較すると、野生型 RAS およびいずれの変異体についても細胞内では fGTP が顕著に低下していることが明らかになった (図 1C)。特に野生型 RAS については細胞内においてほとんど不活性型として存在していることが示され、この結果は細胞外刺激非存在下では野生型 Ras がほぼ不活性型であるという先行報告と一致した。さらに細胞内における fGTP の低下率 (*in vitro* 比) は変異体毎に異なっており、*in vitro* で測定した RAS の fGTP が細胞内環境下における fGTP とは必ずしも相関しないことが明らかになった。また、このインセル NMR 実験において fGTP の経時変化が観測された G12V と Q61L 変異体について前項の手法で細胞内における k_{hy} および k_{ex} をそれぞれ算出した結果、いずれの変異体においても細胞内では *in vitro* よりも k_{hy} が上昇、 k_{ex} が低下しており、これらの反応速度の変化により細胞中での RAS は *in vitro* よりも fGTP が低く

保たれていることが示された (図 1D)。

3. 細胞内における分子複雑環境が RAS の k_{hy} 、 k_{ex} に与える影響の解析

このような活性の変調に分子複雑環境による非特異的な作用が寄与しているのではないかと考え、高濃度の BSA や Ficoll、グリセロールの添加により再現した分子複雑環境が RAS の活性に与える影響を調べた。その結果、BSA や Ficoll といった高分子の添加は k_{hy} 、 k_{ex} の双方に影響を与えなかった一方で、30% glycerol 存在下での RAS の k_{ex} は約 1/2 に低下した (図 2A)。同様の例として分子拡散速度が反応の律速となる炭酸脱水酵素がグリセロールやスクロース溶液中では反応速度が低下する一方、RAS と同じく Ficoll には影響を受けないことが報告されており、RAS の k_{ex} についても分子拡散速度の低下が影響を与えていると考えられる。具体的には RAS から解離した GDP が分子拡散速度の低下によりもとの RAS への再結合が誘起され、本来の遊離の GTP との交換反応との競合が生じることが k_{ex} の低下の原因であると考察している (図 2B)。

また、細胞内在性タンパク質を分子量に応じて分画し、RAS の GTP 加水分解活性に与える影響を調べたところ (図 2C)、分子量 30~50 kDa の画分中のタンパク質によって G12V 変異体の k_{hy} が増大することが判明した (図 2D)。RAS の k_{hy} を促進させる既知の因子として RASGAPs というタンパク質群が細胞内に存在するが、G12V 変異体は RASGAPs により GTP 加水分解反応が促進されないことが知られており、さらに既知の RASGAPs の分子量はいずれも 50 kDa を超えていることから、この因子は RASGAPs とは異なる新規の細胞内タンパク質であることが示唆された。

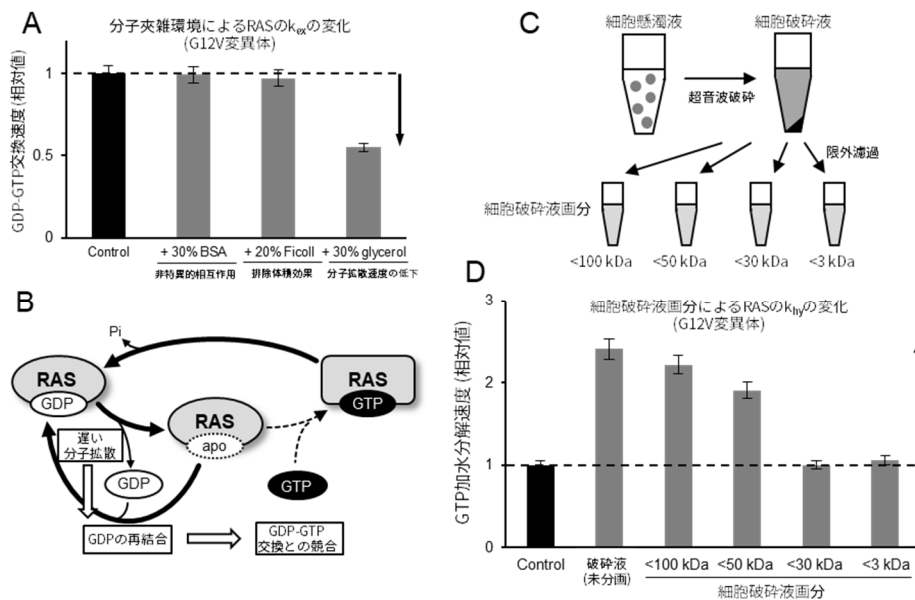


図 2. 分子複雑系による RAS の活性の変調

- A) 様々な分子複雑環境下での RAS (G12V 変異体) の GDP-GTP 交換速度の変化 (非添加時の値を基準)。
- B) 分子複雑による分子拡散速度の低下が k_{ex} 低下を引き起こす機構のモデル。
- C) 細胞の破碎と限外濾過による細胞内在性タンパク質の分子量分画法の模式図。
- D) 細胞破碎液画分の添加による RAS (G12V 変異体) の GTP 加水分解速度の変化 (非添加時の値を基準)。

4. ノックアウト細胞を用いた細胞内制御因子の影響の定量

細胞内における Ras の活性割合の低下を引き起こす因子として、本研究では Ras の k_{hy} を増大させる GTPase 活性化タンパク質 (GAP) に着目し、そのうち代表的な p120、NF-1 について CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集によって KO 細胞の構築を行った。まず、標的の GAP 遺伝子を特異的に切断するように設計した一本鎖ガイド RNA (sgRNA) と Cas9 ヌクレアーゼを発現する pX330 ベクターを構築した。また、切断したゲノムに対して抗生物質 Puromycin の耐性遺伝子が相同性組換えによってノックインされるようにターゲティングベクターを構築した。2 つのベクターを

Hela S3 細胞に導入後、Puromycin によるセレクションを行い、ウェスタンブロットにより p120 および NF-1 の発現が検出されないクローン株を選別した (図 3A)。

構築した各 GAPKO 細胞 (p120KO 細胞、NF-1KO 細胞) を用いてインセル NMR 測定を行った。Ile の δ 位メチル基を選択的に ^1H 、 ^{13}C 標識した Ras を Streptolysin O を用いた可逆的な膜透過処理により細胞内に導入し、バイオリアクター装置を用いて NMR サンプル管内に培地を灌流しながら NMR スペクトルを連続的に取得した。I21 のシグナル強度に基づいて Ras の GTP 結合型割合を算出し、定常状態における各細胞内の GTP 結合型割合を通常細胞と比較した。まず野生型 Ras を導入した p120 および NF-1KO 細胞について細胞内 GTP 結合型割合を解析した。その結果、通常細胞と同様に野生型 Ras は完全に GDP 結合型として存在していることが示された。よって、野生型 Ras は p120、NF-1 以外の内在性 GAP や、他の細胞内因子により GDP 結合型に保持されている可能性が考えられた。

そこで次に通常細胞内において一部が GTP 結合型として存在し、GAP による加水分解促進効果を受けることが明らかとなっている T35S 変異体を用いて同様の解析を行った (図 3B)。その結果、p120KO 細胞内の GTP 結合型割合は通常細胞と同程度であったのに対し、NF-1 KO 細胞内では GTP 結合型割合が通常細胞に比べて有意に上昇していた (図 3E)。さらに、通常細胞において T35S と同程度の GTP 結合型割合を示す一方、GAP による加水分解促進効果が非常に小さいことが知られる G12V 変異体についても解析した。その結果、GAP の KO に伴う細胞内 GTP 結合型割合の有意な変化は観測されなかったことから、NF-1KO 細胞内の T35S で観測された GTP 結合型割合変化は NF-1 の KO に由来するものであることが裏付けられた。

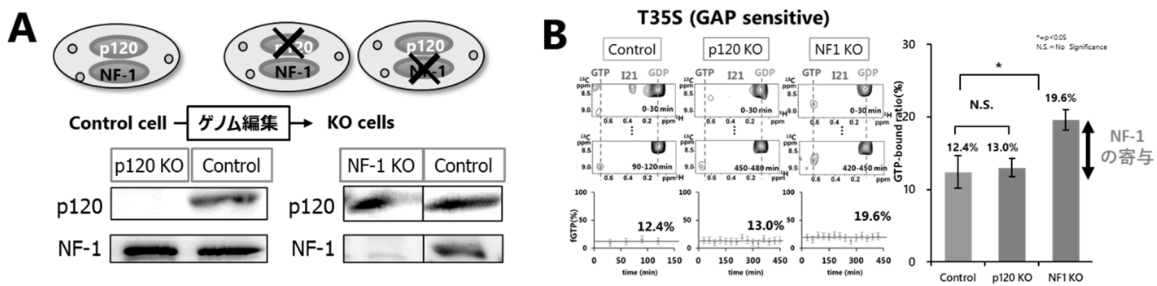


図 3. ノックアウト細胞を用いた細胞内因子の寄与の定量

- A) RasGAP である p120 および NF-1 をゲノム編集法によりノックアウトした細胞の調製
- B) ノックアウト細胞を用いたインセル NMR 観測における GAP 感受性の T35S の細胞内 GTP 型割合。
t-test, *P<0.05.

考 察

本研究では、インセル NMR 法を用いて細胞内環境下における Ras の GTP 結合型割合を直接観測し、その活性を規定する k_{hy} や k_{ex} を定量的に明らかにすることに成功した。細胞内における Ras の GTP 結合型割合は *in vitro* よりも顕著に低く、細胞内の分子混雑環境における k_{ex} の低下や、内在性の GTP 加水分解促進因子による k_{hy} の上昇が存在することも明らかとなった。このように細胞内分スイッチである Ras の活性はそれ自身のもつ intrinsic な活性に加えて、細胞内のさまざまな環境因子によっても適切に制御されており、本研究の結果はこれらの影響を考慮することが必要であることを明確に示している。

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 実験によって細胞内タンパク質の機能を解析する新規手法を確立した。さらにその手法によって細胞内における GTP 結合型である活性型 Ras の割合の低下に対して NF-1 が寄与していることを明らかにした。本手法は GAP だけでなく幅広い細胞内因子の機能解析について適用可能である。また、p120 はリン酸化された受容体を認識する SH2 ドメインを介して細胞外刺激依存的に Ras を不活性化するのに対し、NF-1 による Ras の不活性化は刺激非依存的であると考えられている。したがって、NF-1 のみが Ras

の GTP 結合型割合に影響を及ぼすという本研究の結果は、インセル NMR によって観測している Ras の活性状態が刺激非存在下における状態を反映していると解釈できる。

本研究の結果は NF1 の欠失により神経系を含めた全身の細胞増殖異常をもたらす疾患神経線維腫症 1 型の原因が、刺激非存在下の細胞内における Ras の活性化であることを実験的に示すものであり、今後インセル NMR を用いて様々な Ras 関連疾患の原因解明が期待される。

文 献

- 1) Zhao Q, Fujimiya R, Kubo S, Marshall CB, Ikura M, Shimada I, Nishida N. Real-Time In-Cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-Bound Levels of RAS Cell Rep 2020 Aug 25;32(8):108074. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108074.