

# 博士論文

論文題目 in-cell NMR 法による細胞内 RAS の活性型割合の観測と

その制御機構の解明

氏名 趙 慶慈

略語

DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCM	flow cytometry
FBS	fatal bovine serum
FID	free induction decay
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAP	GTPase-activating protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	guanine nucleotide exchange factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSQC	hetero-nuclear single quantum coherence
HMQC	hetero-nuclear multiple quantum coherence
IPTG	isopropyl- $\beta$ -d-thiogalactopyranoside
MWCO	molecular weight cut-off
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PDB	protein data bank
ppm	parts per million
PI	propidium iodide
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLO	streptolysin O
S/N	signal-to-noise
SOFAST-HMQC	band-selective optimized-flip-angle short-transient HMQC

## 目次

第 1 章 序論 .....	5
1-1. 低分子量 GTPase RAS の細胞内機能 .....	5
1-2. RAS の構造的基盤 .....	7
1-3. <i>in vitro</i> における RAS の活性 (GTP 加水分解活性および GDP-GTP 交換活性)の測定 .....	11
1-4. RAS の活性を制御する細胞内因子 .....	13
1-5. in-cell NMR 法を用いた細胞内 RAS の活性状態のリアルタイム観測 .....	14
1-6. 本研究の目的 .....	18
第 2 章 材料と方法 .....	19
2-1. 試薬 .....	19
2-2. 細胞 .....	19
2-3. バッファーおよび培地組成 .....	19
2-4. 大腸菌発現系によるタンパク質の調製 .....	22
2-4-1. RAS 発現ベクターの調製 .....	22
2-4-2. 大腸菌によるタンパク質の発現 .....	22
2-4-3. 菌体破碎 .....	23
2-4-4. Ni <sup>2+</sup> アフィニティーカラム精製 .....	23
2-4-5. GTP 結合型への交換反応 .....	24
2-5. FITC 標識 RAS の調製 .....	24
2-6. SLO による細胞へのタンパク質導入法 <sup>24</sup> .....	25
2-7. FCM による細胞の解析 .....	25
2-8. バイオリアクター装置 <sup>21</sup> .....	26
2-8-1. Mebiol gel を用いた細胞懸濁液のゲル化 .....	26
2-8-2. バイオリアクターにおける培地の灌流システム .....	26
2-9. NMR 測定 .....	27
2-9-1. <i>in vitro</i> 系での NMR 測定 .....	27
2-9-2. in-cell NMR 測定 .....	27
2-10. 細胞 lysate の調製 .....	27
2-11. 細胞 lysate 画分のプロテオーム解析 .....	28
第 3 章 結果と考察 .....	29
3-1. Ile の NMR シグナルに基づく RAS の fGTP の定量 .....	29
3-1-1. 大腸菌発現系を用いた RAS の調製 .....	29
3-1-2. Ile $\delta$ 位メチル基のシグナルを用いた <i>in vitro</i> における RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ の測定 .....	31

3-1-3. GTP 再生系を用いた $k_{hy}$ , $k_{ex}$ 同時算出法の確立.....	36
3-2. in-cell NMR 法による細胞内における RAS の活性評価 .....	42
3-2-1. RAS 導入細胞の調製 .....	42
3-2-2. RAS の in-cell NMR 測定.....	45
3-2-3. RAS の細胞内 $k_{hy}$ , $k_{ex}$ についての考察 .....	50
3-3 RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ に変調を与える細胞内因子の探索.....	51
3-3-1. 分子混雑環境が RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ に与える影響の解析.....	51
3-3-2. 細胞内低分子生理物質が RAS の $k_{hy}$ に与える影響の解析 .....	56
3-3-3. 細胞 lysate に含まれる RAS 変異体の $k_{hy}$ を増大させる因子の解析.....	59
3-3-4. プロテオーム解析による細胞 lysate 画分中のタンパク質の同定.....	62
3-3-5. 一過性発現 lysate を用いた TBC1D13 の HeLa S3 内在性発現の確認、および RAS に対する GAP 活性の解析.....	65
3-3-6. リコンビナント調製した TBC1D13 の RAS に対する GAP 活性の解析.....	67
3-3-7. RABGAP と RAS の相互作用機構 .....	72
第 4 章 総括と今後の展望.....	76
参考文献 .....	81
謝辞 .....	84

## 第 1 章 序論

### 1-1. 低分子量 GTPase RAS の細胞内機能

RAS は EGFR などの受容体型チロシンキナーゼや T 細胞受容体の下流で働く代表的な低分子量 GTPase であり、機能が類似した複数のアイソフォームを持つ(HRAS, KRAS, NRAS)<sup>1</sup>。不活性型である GDP 結合型 RAS は細胞外刺激に応じて遊離の GTP と交換することにより活性型である GTP 結合型へ変換され、GTP 結合型の RAS は結合している GTP を GDP へ加水分解することで不活性化される<sup>2</sup>。活性型の GTP 結合型 RAS は RAF や PI3K などの複数の下流のエフェクターと相互作用することで MAPK-ERK 経路や PI3K-AKT 経路など様々なシグナル伝達経路を活性化し、細胞内の増殖・分化・運動を制御している (Figure 1)<sup>3</sup>。このように、RAS は細胞内シグナル伝達経路において分子スイッチとして中心的な役割を果たしている。

また、RAS の特定の残基の変異による恒常的な活性化はがんを引き起こすことが知られており、ヒトのがん全体では 30%以上、特に膵臓がんで 90%、大腸がんで 50%程度と重篤ながんにおいて高確率で RAS 遺伝子の変異が検出されている<sup>4</sup>。そのため変異した RAS は代表的ながん原タンパク質として、抗がん剤における重要な創薬ターゲットとなっている。

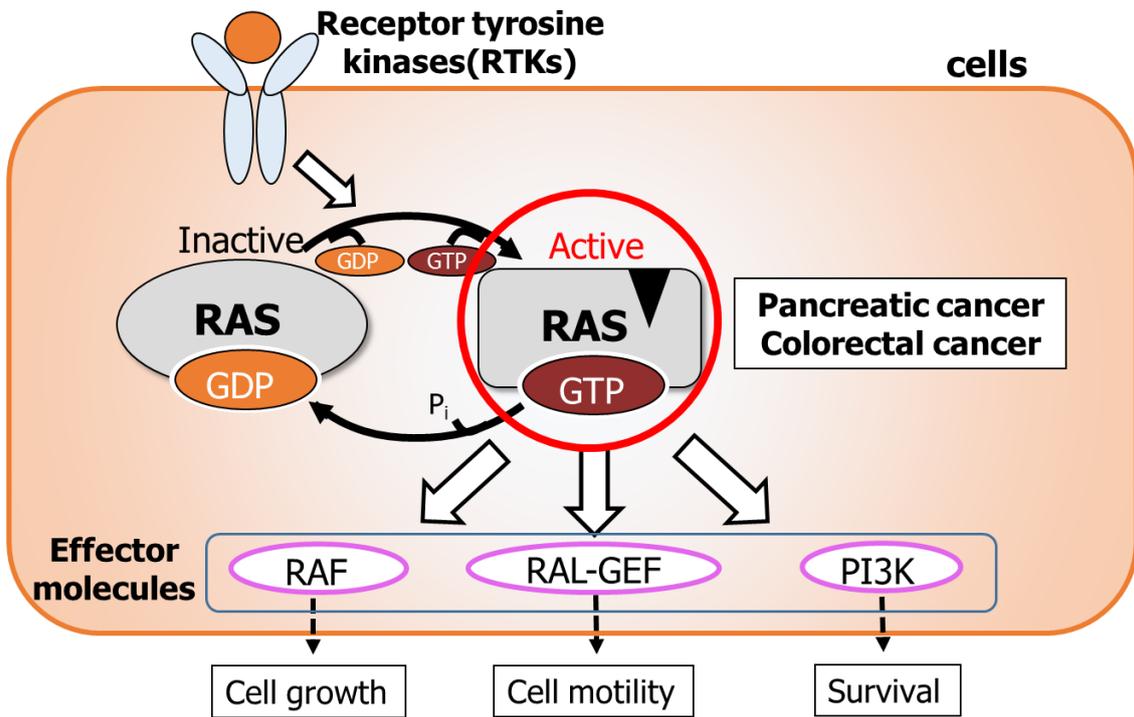
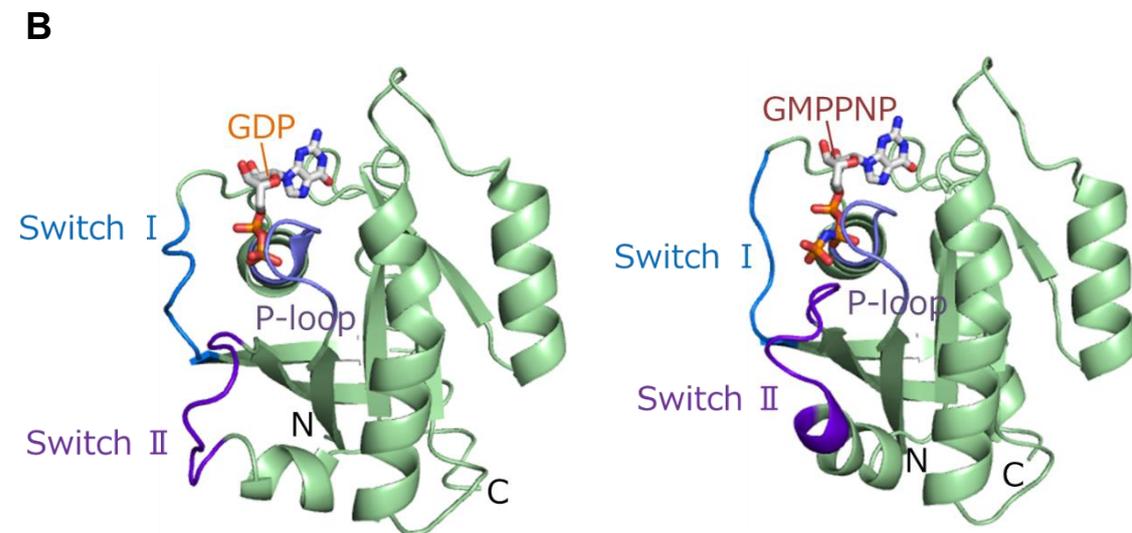
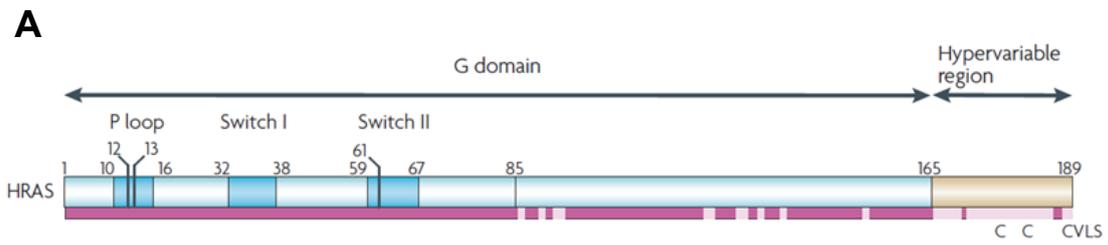


Figure 1 低分子量 GTPase RAS の細胞内機能

細胞内における RAS の活性化に伴うシグナル伝達経路の模式図。

## 1-2. RAS の構造的基盤

RAS は分子量 22 kDa のタンパク質で、N 末端約 170 残基の G ドメインと、C 末端の 25 残基程度の Hypervariable region (HVR) から構成される (Figure 2A)。RAS の G ドメインは、中央に 6 本のストランドからなる  $\beta$  シートとその周囲の 5 本の  $\alpha$  ヘリックスからなる構造をしており、マグネシウムイオンとヌクレオチドを保持する。RAS G domain の立体構造において GDP 結合型 RAS および GTP 結合型 RAS の間で、ヌクレオチド結合領域近傍にある P-loop (残基番号 10-16)、Switch I (32-38) および Switch II 領域 (59-67) が大きく異なっており、この構造の違いによりエフェクター分子など他の分子との結合親和性が制御されている (Figure 2B)<sup>2,5</sup>。遺伝子解析によりがんの原因となる RAS の変異の 98% は G12、G13、および Q61 の 3 つの残基に集中していることが知られている<sup>6</sup>。これらはいずれも GTP のリン酸基の近傍 (p-loop: G12 & G13, Switch II: Q61) に位置しており (Figure 2A)、これらの残基の変異は GTP 結合型を安定化して恒常的なシグナルの活性化を引き起こすと考えられている。

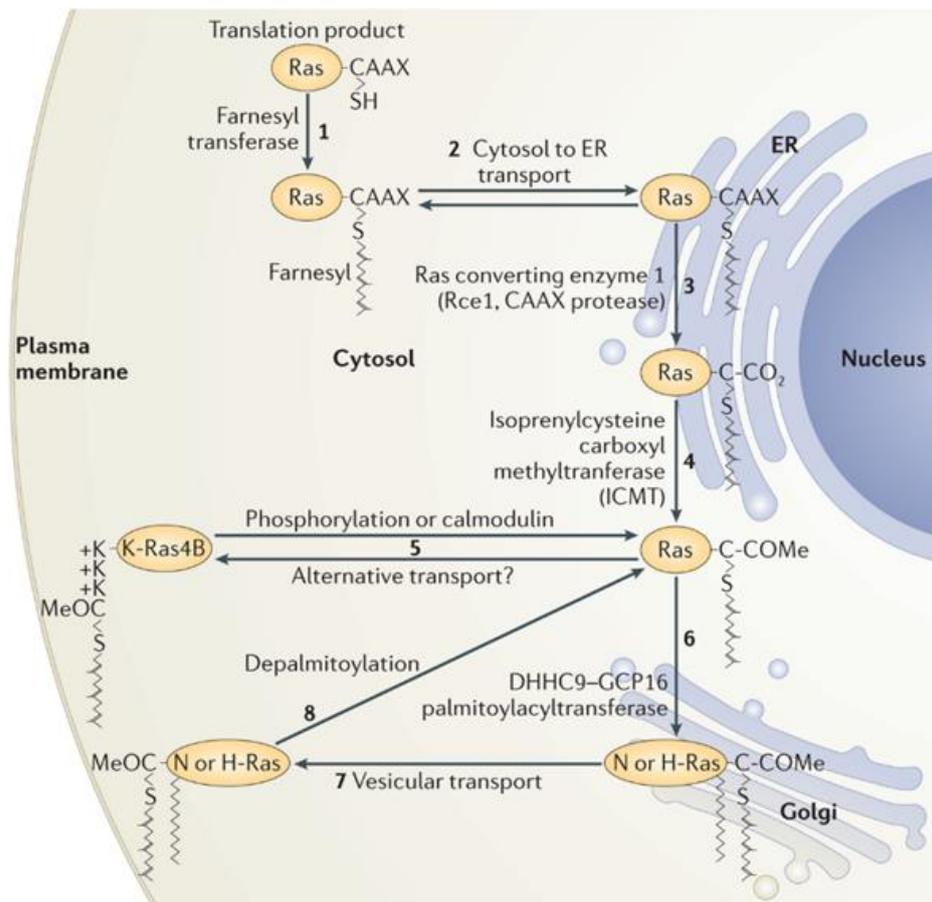


**Figure 2 RAS のドメイン構成と立体構造**

(A) RAS (HRAS) の一次構造。(B) (左) GDP 結合型 RAS (PDB code : 4Q21)<sup>2</sup>, (右) GTP アナログ (GMPPNP) 結合型 RAS (PDB code : 5P21)<sup>5</sup> の結晶構造。

また、C 末端の Hypervariable region は翻訳後修飾を受ける部位であり、RAS の細胞内局在に関与する。この領域内の CAAX モチーフ内の Cys 残基に対して Farnesyl transferase による脂質修飾や、RAS converting enzyme 1 (RCE1) による C 末端のプロセッシング、Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) によるメチル基の保護を受けることにより RAS は細胞膜に局在し、細胞外刺激により活性化した EGFR を起点とする細胞膜上でのシグナル伝達が起きる (Figure 3)<sup>7</sup>。

RAS のアイソフォーム間 (HRAS, KRAS, NRAS) において HVR の配列は大きく異なっており、それに伴い例えば HRAS において CAAX モチーフに対する Farnesyl 化以外にも 2 箇所の Cys 残基に Palmitoyl 化が生じるなど脂質修飾の部位やその数に差があることが知られている<sup>7</sup>。一方で Gドメインの配列は RAS アイソフォーム間でよく保存されており (90% identity)<sup>8</sup>、ヌクレオチドの結合部位や GTP 加水分解のメカニズム、相互作用するエフェクター分子などの基本的な機能は共通している。



**Figure 3 RAS の脂質修飾と細胞内局在<sup>7</sup>**

RAS は mRNA からの翻訳後、Farnesyl transferase によって CAAX モチーフ中の Cys 残基が脂質修飾を受ける。その後 RCE1 や ICMT によるプロセッシングを受けて細胞膜に局在化する。RAS のアイソフォームのうち HRAS と NRAS は HVR に Palmitoylation 修飾が生じることが知られている。

### 1-3. *in vitro* における RAS の活性 (GTP 加水分解活性および GDP-GTP 交換活性)の測定

RAS は速度定数  $k_{hy}$  で定義される GTP 加水分解反応と速度定数  $k_{ex}$  で定義される GDP-GTP 交換反応の 2 つの活性を持ち、これら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、「fGTP」が決定される (Figure 4A)。これまでに *in vitro* における RAS の  $k_{hy}$  および  $k_{ex}$  を NMR 法により定量する手法が開発されている<sup>9,10</sup>。この手法では、均一  $^{15}\text{N}$  標識を施した HRAS の NMR スペクトルを連続的に取得し、GDP 結合型と GTP 結合型で化学シフトが異なる残基のシグナル強度比から各時間における fGTP を算出し、fGTP の経時的変化に基づいて  $k_{hy}$  や  $k_{ex}$  を算出する (Figure 4 BCD)。その結果、解析した RAS の発癌性変異体 (G12V, G13D, Q61L)のうち、RAS/G12V および RAS/Q61L 変異体では GTP 加水分解速度が野生型 RAS に比べてそれぞれ 10 倍、80 倍低下しているのに対し、RAS/G13D 変異体では GTP 交換反応速度が野生型 RAS に比べて 15 倍上昇していることが明らかとなっている (Figure 4CD)<sup>10</sup>。

さらに、この方法により求めた *in vitro* における  $k_{hy}$   $k_{ex}$  から、以下の式 (Eq1)に従って反応が平衡に達した定常状態における RAS の fGTP を算出することができる。

$$\frac{[Ras_{GTP}]_{t \rightarrow \infty}}{[Ras_{GTP}]_0 + [Ras_{GDP}]_0} = \frac{k_{ex}}{k_{hy} + k_{ex}} \dots \text{(Eq1)}$$

その結果、発がん性 RAS 変異体はいずれも野生型より高い定常状態での fGTP を持っており、残基の変異に伴う  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の変化により活性型である GTP 結合型が野生型 RAS よりも安定化していることがわかる (Figure 4E)。一方でこの値から、野生型 RAS についても定常状態でその 1/3 が GTP 結合型として存在すると推定されるが、細胞内において細胞外刺激が存在しない状態では GTP 結合型の野生型 RAS はほとんど存在しないことが知られている<sup>11</sup>。そのため *in vitro* で算出した  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  からは細胞外刺激に応じて活性化するという RAS の分子スイッチとしての機能を説明できない。

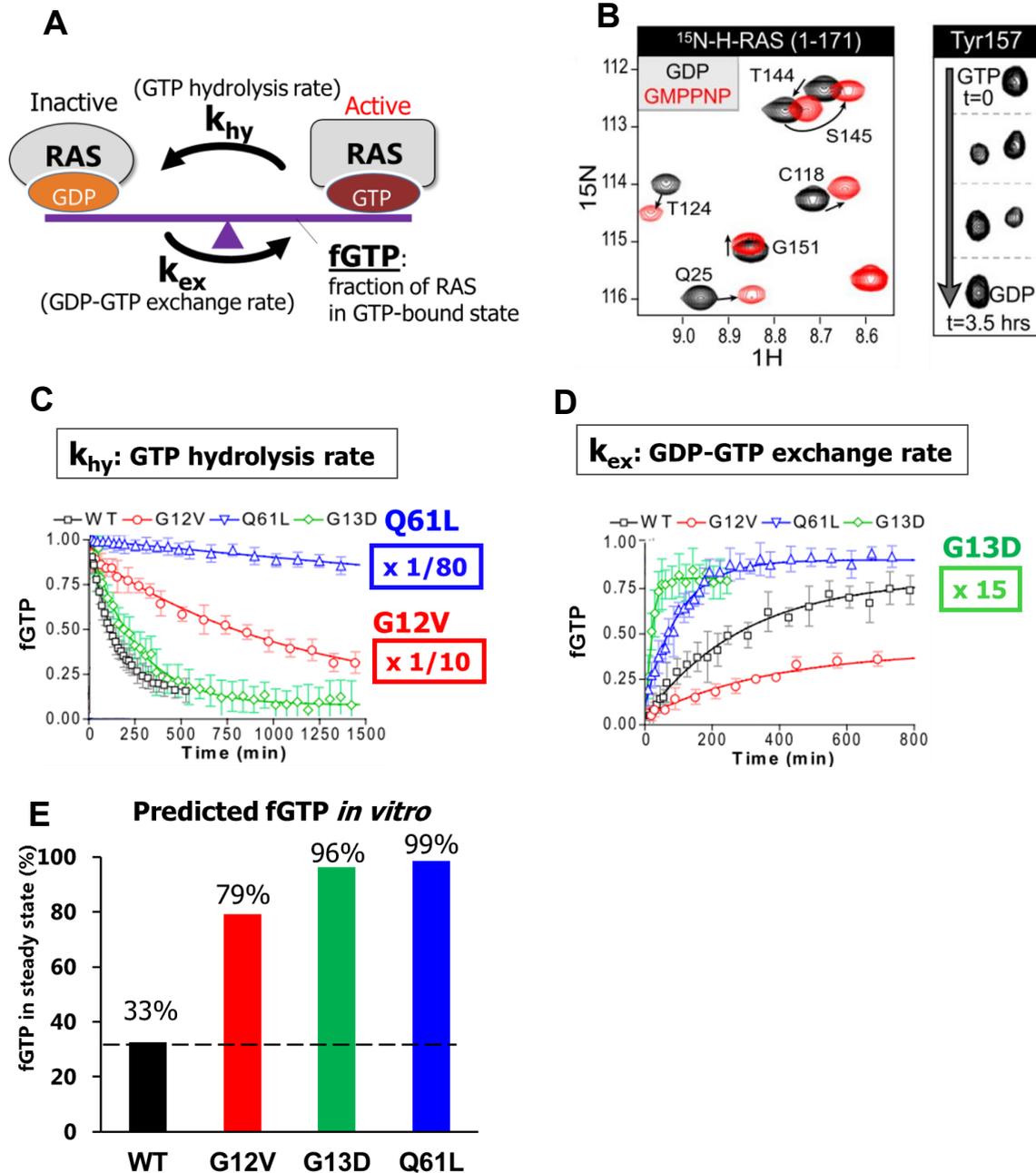


Figure 4 NMR 法を用いた RAS の GTP 加水分解活性および GTP 交換活性の定量<sup>10</sup>

(A)GTP 結合型 RAS の存在割合(fGTP)とそれを決定する GTP 加水分解速度定数( $k_{hy}$ ), GTP 交換速度定数( $k_{ex}$ )。 (B) GDP 結合型 RAS (黒) 及び GMPPNP 結合型 RAS (赤) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの重ね合わせ (左) と Y157 シグナルの経時変化の様子 (右)。 (C) GTP 結合型 RAS の fGTP の経時変化からの  $k_{hy}$  の算出。 (D) GDP 結合型 RAS に対して 10 等量の GMPPNP を添加した際の fGTP の経時変化からの  $k_{ex}$  の算出。 (E) *in vitro* における  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  から算出した、野生型および発がん性変異体 RAS の定常状態における fGTP の値。

#### 1-4. RASの活性を制御する細胞内因子

細胞内には RAS の活性をそれぞれ異なる機序によって変調させる因子が多数存在することが知られている。具体的には、p120GAP や NF1 などの RASGAP ファミリーは GTP 結合型の RAS に結合し、RAS の GTP 加水分解反応を促進させる<sup>12</sup>。また、SOS1 や RAS-GRF1 などの RASGEF は刺激により活性化した EGFR などに結合し、膜上において RAS の GDP-GTP 交換反応を促進することで刺激依存的な RAS の活性化を達成している<sup>13</sup>。このように細胞内の RAS の活性状態は、様々な細胞内因子により制御されており、実際の細胞内における  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  は、*in vitro* で算出された値に対してこれらの細胞内因子の存在によって変調を受けていることが考えられる (Figure 5)。

先行研究<sup>9,10</sup>では活性制御タンパク質を過剰発現させた細胞破碎液 (lysate) を RAS に添加して RAS の活性変化を解析する実験が行われているが、このような lysate を用いた実験では、活性制御タンパク質やエフェクター分子、遊離の GTP といった細胞内分子の濃度や局在、恒常性などの細胞内環境を再現することは困難である。以上から、細胞内での RAS の活性 ( $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$ ) を評価する為には、実際の細胞内環境下の RAS を解析する必要がある。

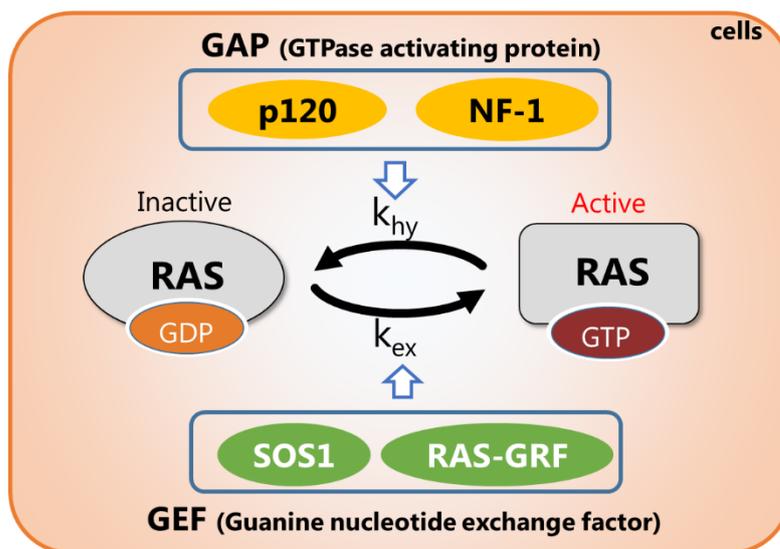


Figure 5 細胞内における RAS 活性を制御する様々な因子  
調節タンパク質および細胞外刺激依存的な調節タンパク質による活性変化の模式図。

#### 1-5. in-cell NMR 法を用いた細胞内 RAS の活性状態のリアルタイム観測

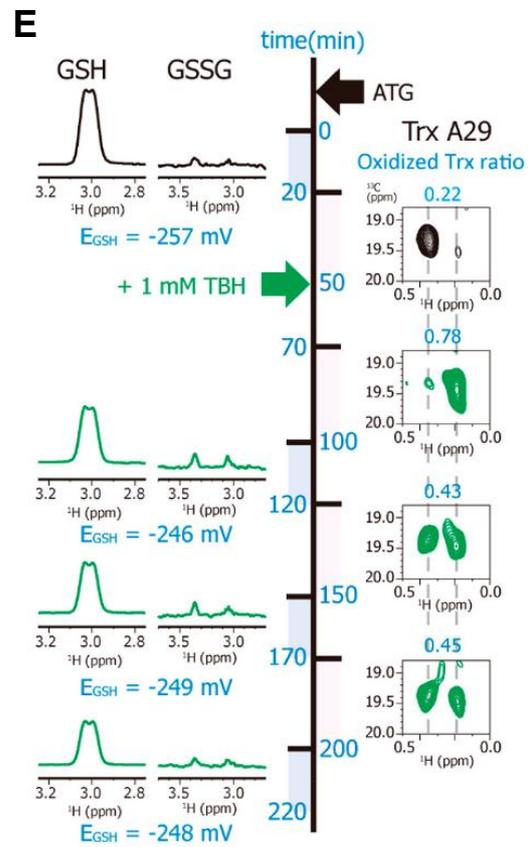
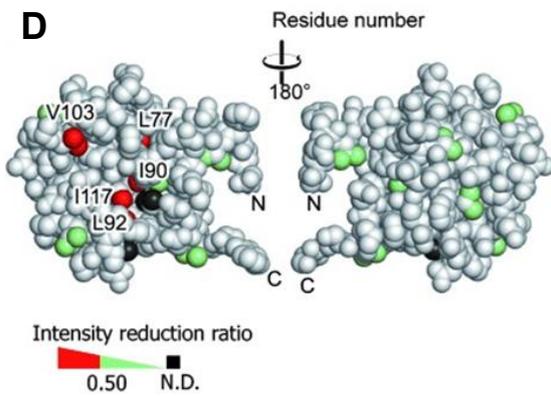
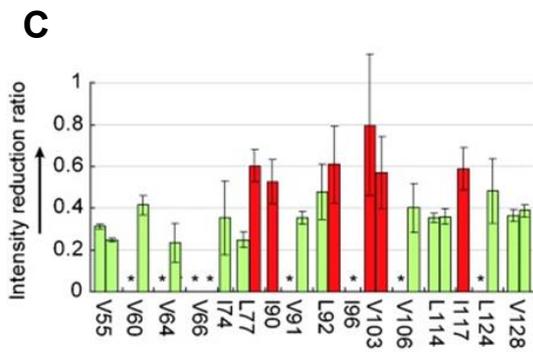
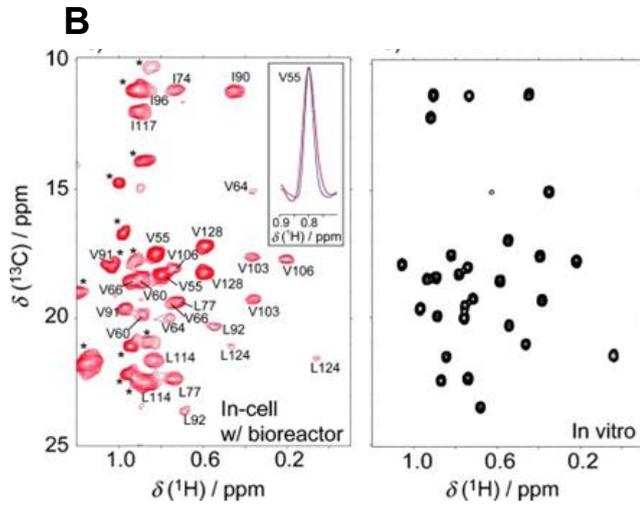
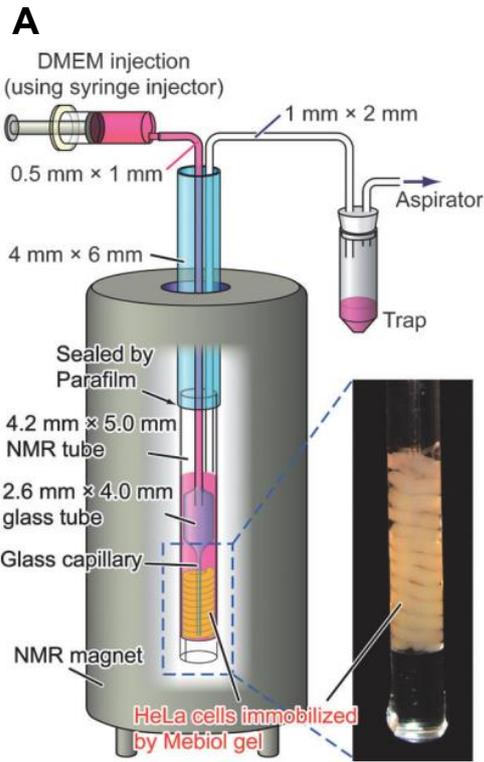
細胞内における RAS の活性化状態を調べる主な手法として、これまでは RAS のエフェクター分子、RAF の RAS 結合ドメイン (RBD) を固定したビーズを用いて、細胞破碎液中の GTP 結合型の RAS を検出する方法であるプルダウン法<sup>14</sup>が広く用いられてきたが、この方法では細胞を破碎した時点での GTP 結合型の RAS の存在量しか解析することができず、GTP 結合型/GDP 結合型の量比や、生きた細胞中での経時変化を追跡することは困難だった。

一方で生きた細胞内環境下にあるタンパク質の情報を得る手法として in-cell NMR 法が挙げられる<sup>15</sup>。この手法では、細胞内に発現あるいは導入した安定同位体標識タンパク質について、その NMR シグナルを直接観測することによって、細胞内環境下におけるそのタンパク質の構造情報を得ることができる。例えばこれまでに大腸菌内に発現した金属結合ドメイン NmerA<sup>16</sup>、TTHA1718<sup>17</sup>を始め、カエル卵母細胞内に導入した免疫グロブリン結合ドメイン GB1<sup>18</sup>、哺乳細胞内に導入した Ubiquitin<sup>19</sup>、天然変性タンパク質  $\alpha$ -Synuclein<sup>20</sup> などの構造情報の取得が行われている。この方法により細胞内のタンパク質の構造決定<sup>17</sup>やリン酸化<sup>18</sup>、N-アセチル化<sup>20</sup>などの細胞内翻訳後修飾の観測が達成されている。ただし、in-cell NMR 法では細胞を高密度に NMR サンプル管中に懸濁して測定を行うため、NMR 測定中に栄養源が枯渇して細胞内環境が経時的に劣化し、細胞死や観測対象となるタンパク質の漏出が起こる。そのためこれらの in-cell NMR 観測では細胞内を生理的環境に保ったまま長時間の NMR 測定を行うことはできなかった。

この問題を解決するために、当研究室においてバイオリアクターシステム<sup>21</sup>が開発されている。この方法では温度可塑性ゲルと懸濁した細胞を NMR サンプル管にコイル状に封入した上で、シリンジポンプにより NMR サンプル管内に培地を灌流することにより NMR 測定中にも細胞に対して新鮮な培地を供給し続けることが可能である (Figure 6A)<sup>21</sup>。それに

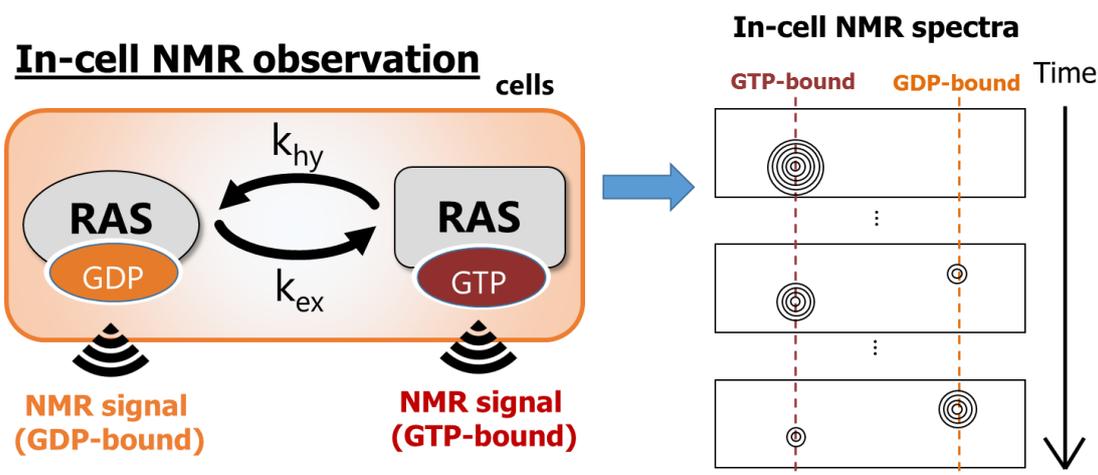
より細胞を生理的条件下に保ったまま細胞内に導入したタンパク質の in-cell NMR 測定を長時間行うことが可能となっている。この系を用いることでこれまでに細胞内に導入した CAP - Gly1 (CG1) domain の NMR シグナルの観測 (Figure 6B)、および CG1 と細胞内在性微小管の間の生理的環境下での相互作用部位の転移交差飽和法 (Transferred Cross Saturation: TCS) 法による解析 (Figure 6CD)<sup>21</sup>が行われている。さらに、バイオリアクターを用いた in-cell NMR 法では測定途中の細胞に対して培地中にリガンドや阻害剤などを添加することが可能であり、これにより酸化剤 (*tert*-butyl hydroperoxide: TBH) や Thioredoxin 還元酵素の阻害剤 (aurothioglucose: ATG) の添加に応じた細胞内における Thioredoxin の酸化還元状態の変化をリアルタイムに観測し、経時変化を追跡することに成功している (Figure 6E)<sup>22</sup>。

したがって、この方法により細胞内に導入した安定同位体標識 RAS の NMR スペクトルを連続的に取得し、GTP 結合型と GDP 結合型で化学シフトが異なる NMR シグナルの強度比を解析することで、細胞内における fGTP の経時変化を追跡することができると考えた (Figure 7)。



**Figure 6 バイオリアクターを用いた in-cell NMR 観測法**

(A) バイオリアクターによる NMR サンプル管内細胞に対する培地の灌流法の模式図。(B) バイオリアクターを用いた CG1 の細胞内 NMR シグナルの観測と *in vitro* NMR スペクトルの比較<sup>21</sup>。(C,D) TCS 法に基づいたラジオ波照射時の CG1 の各残基の NMR シグナル強度の低下の解析 (C)と、シグナル強度が大きく低下した残基の CG1 の構造 (PDB code: 2CP5) へのマッピング (D)<sup>21</sup>。(E) in-cell NMR 法を用いた酸化剤 (TBH) および Thioredoxin 還元酵素阻害剤 (ATG) 添加に応じた Thioredoxin の細胞内酸化還元状態変化の経時観測<sup>22</sup>。各時間における細胞内グルタチオンの酸化還元状態 (左) と Thioredoxin の酸化還元状態 (右) を交互に追跡した。



**Figure 7 in-cell NMR 法を用いた細胞内 fGTP の経時的観測の概略図**

細胞内に導入した安定同位体標識 RAS の NMR スペクトルを連続的に取得し、GTP 結合型と GDP 結合型で化学シフトが異なるシグナルの強度比を解析することで、細胞内における fGTP の経時変化を追跡することができる。

#### 1-6. 本研究の目的

したがって本研究では、RAS を対象とした in-cell NMR の観測手法を開発し、細胞内における fGTP をリアルタイムに観測する系を確立することで、fGTP の経時変化から実際の細胞内環境下における RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を算出することを目的とした。さらに観測結果をもとに RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を制御する細胞内因子の探索を行い、細胞内における RAS の活性制御機構の解明を行った。

(本論文の研究内容の一部は査読付き国際誌にて公表済<sup>23</sup>。)

## 第2章 材料と方法

### 2-1. 試薬

特に断らない限り、試薬はナカライテスクもしくは和光純薬より購入した。99.9%  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 、99.8%  $\text{D}_2\text{O}$ 、 $\alpha$ -ketobutyric acid は Cambridge Isotope Laboratories より購入した。Fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) は、Dojindo より購入した。

### 2-2. 細胞

HeLa S3 細胞は JCRB より購入し、PenStrep、GlutaMAX、10% FCS を含んだ DMEM 培地中、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下にて培養した。スピナーフラスコ (90 rpm) を用いて培養した。HeLa S3 細胞の浮遊培養は  $1.0 \times 10^6$  cells/mL となった時点で  $2.5 \times 10^5$  cells/mL となるよう継代を行った。細胞培養液からの細胞の回収は 400 g, 3 min の遠心操作によって行った。

### 2-3. バッファーおよび培地組成

本文において記載が無い限り、水は Milli Q 水を用いた。また、バッファーの組成は以下に示すものを用いた。

#### PBS

1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM  $\text{NaCl}$ , 2.7 mM  $\text{KCl}$ , pH 7.4

#### HBSS

137 mM  $\text{NaCl}$ , 5.4 mM  $\text{KCl}$ , 0.25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.2 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1% w/v D-glucose, 30 mM HEPES-KOH, pH 7.2

HBSS + 1 Ca

1 mM CaCl<sub>2</sub>を含む HBSS

HBSS + 5 Mg

5 mM MgCl<sub>2</sub>を含む HBSS

RAS 精製バッファー

20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5

菌体保存バッファー

10% v/v glycerol を含む RAS 精製バッファー

NMR バッファー

10% v/v D<sub>2</sub>O を含む HBSS + 5Mg

SDS-PAGE サンプルバッファー

123 mM Tris-HCl, 20% v/v glycerol, 4% w/v SDS, 0.002% w/v bromophenolblue

Cell lysis バッファー

50 mM Tris-HCl (pH 7.4) , 150 mM NaCl, 1% Triton, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA

#### LB 培地

tryptone	10 g/L
yeast extract	5 g/L
NaCl	5 g/L

以上の組成の培地をオートクレーブにより滅菌後、室温にて放冷した。アンピシリン溶液を終濃度 100 mg/L となるように培地に加えた。LB プレートは上記組成の培地に 10 g/L agar を加え、90 mm×15 mm シャーレを用いて作製した。

#### <sup>15</sup>N D<sub>2</sub>O M9 最小培地

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g/L
<sup>2</sup> H-D-glucose	2 g/L
ampicillin	100 mg/L

以上の組成の培地を D<sub>2</sub>O に溶解し 0.22 μm のフィルターにより滅菌した以下の溶液を加えた。

1 M MgSO <sub>4</sub>	2 mL/L
1 mg/mL biotin	1 mL/L
50 mg/mL thiamine	100 μL/L
0.1 M CaCl <sub>2</sub>	1 mL/L

(全て D<sub>2</sub>O 溶液)

培地作製の際に使用する器具は全て Milli Q で洗いオートクレーブをした後 80°C の乾熱器で完全に乾燥させたものを用いた。

## 2-4. 大腸菌発現系によるタンパク質の調製

特に断らない限り各リコンビナントタンパク質は大腸菌発現系を用いて、N 末端に 6 x His tag を付加した融合タンパク質として発現した。

### 2-4-1. RAS 発現ベクターの調製

RAS を始めとするタンパク質は 6 x His tag を N 末端に有する pET15b ベクターにクローニングした。また、RAS 発癌性変異体 (G12V、G13D、Q61L) の発現用ベクターは、野生型 RAS の発現用ベクターを鋳型として、QuikChange 法による一塩基置換を行うことで作製した。

### 2-4-2. 大腸菌によるタンパク質の発現

リコンビナントタンパク質を発現する pET-15b プラスミドを、ヒートショック法により BL21 (DE3) codon plus RP (Agilent) に導入した。形質転換株の選択は 100 µg/mL ampicillin を含む LB 培地プレートを用いて行った。

#### 【LB 培地によるリコンビナントタンパク質の発現】

RABGAP や p120GAP などのリコンビナントタンパク質の発現には非標識 LB 培地を用いた。まず、100 µg/mL の ampicillin を含む LB 培地 10 mL に、形質転換を行った大腸菌の単一コロニーを植菌し、振盪培養器にて 37°C、16 時間培養を行い、前培養とした。前培養した培養液を遠心操作し、回収した菌体を 100 µg/mL の ampicillin を含む LB 培地 900 mL に加え、37°C にて本培養を開始した。OD<sub>600</sub> の値が 0.6 となった時点で IPTG を終濃度 1 mM となるように添加し、そのまま 16 時間誘導培養を行った。培養終了時の OD<sub>600</sub> は 1.5-1.7 であった。

#### 【均一 $^2\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ 標識, Ile $\delta 1$ 位メチル基選択的 $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ 標識 RAS の発現】

均一  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  標識, および Ile  $\delta 1$  位メチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した RAS の発現は、 $\text{D}_2\text{O}$  M9 培地を用いて行った。まず上記と同様に、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の ampicillin を含む LB 培地 10 mL に、形質転換を行った大腸菌の単一コロニーを植菌し、振盪培養器にて  $37^\circ\text{C}$ 、8 時間培養を行い、前々培養とした。次に前々培養した培養液を遠心操作し、回収した菌体を  $\text{D}_2\text{O}$  M9 培地 100 mL に加え、振盪培養器にて  $37^\circ\text{C}$ 、16 時間培養し、前培養とした。前培養した培養液を遠心操作し、回収した菌体を  $\text{D}_2\text{O}$  M9 培地 900 mL に加え、 $37^\circ\text{C}$  にて本培養を開始した。OD<sub>600</sub> 値が 0.5-0.6 となった時点で  $\alpha$ -ketobutyric acid (methyl  $^{13}\text{C}$ , 3,3- $^2\text{H}$ ) 40 mg/L を培地に添加し、振盪培養器の設定温度を  $25^\circ\text{C}$  に下げ、培養を続けた。その 1 時間後に IPTG を終濃度 1 mM となるように加え、発現タンパク質の誘導を開始し、その後 16 時間の培養を行った。培養終了時の OD<sub>600</sub> 値は 0.7-1.0 であった。

#### 2-4-3. 菌体破碎

大腸菌培養液を  $4^\circ\text{C}$ 、7,000 rpm、15 分間遠心することにより集菌し、1 mM DTT, 0.4% NP-40, 1 mM PMSF を加えた菌体保存バッファー 60 mL に懸濁し、Sonifier 250 (BRANSAON) を用いて 0.5 秒、power 5 の間欠超音波パルスを氷上にて 3 min x 6 set 行い菌体を破碎した。菌体破碎後、 $4^\circ\text{C}$ 、14,000 g、30 分間遠心することにより上清画分を回収した。

#### 2-4-4. $\text{Ni}^{2+}$ アフィニティーカラム精製

タンパク質の精製は、N 末端に付加した 6 x His-tag を利用して、His-select  $\text{Ni}^{2+}$  affinity gel (SIGMA) を用いたオープンカラムによって行った。1 L 培養スケールの場合には、5 mL の体積の His-select  $\text{Ni}^{2+}$  affinity gel をオープンカラムに充填し、あらかじめ精製バッファーで平衡化しておいてから、カラムに大腸菌上清画分をアプライし、5 mL の精製バッファーによって 10 回洗浄を行

った。その後、10 mM イミダゾールを含む精製バッファー5 mL を 5 回流することで非特異的にレジ  
ンに吸着したタンパク質を溶出させた後に、100 mM イミダゾールを含む精製バッファーを 5 mL ず  
つアプライすることによって目的タンパク質を溶出させた。SDS-PAGE 解析によって、タンパク質が  
溶出した画分を確認して回収した。以上の操作は全て室温にて行った。また溶出したタンパク質  
の性状解析として Ni<sup>2+</sup>アフィニティーカラム精製後のサンプルについて Superdex 75 10/300 GL も  
しくは Superdex 200 10/300 GL increase (GE Healthcare) によるサイズ排除クロマトグラフィーを行  
った。

#### 2-4-5. GTP 結合型への交換反応

大腸菌発現系により発現した RAS は主に GDP 結合型であるため、必要に応じて GTP 結  
合型への交換反応を行った。10 mg/mL の RAS 溶液 1 mL に対して、EDTA と GTP をそれぞ  
れ終濃度 10 mM、5 mM となるように添加し、室温にて 1 時間インキュベートすることで  
RAS からヌクレオチドを解離させた。その後 MgCl<sub>2</sub> を終濃度 20 mM となるように加えるこ  
とで、過剰量存在する GTP を RAS に結合させた。GTP 結合型への交換反応を完了した RAS  
は、4°Cにて Econopac 10DG (Bio-Rad) カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより  
精製した。Econopac 10DG カラムに対して、5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む HBSS で平衡化をしてから、  
カラムに GTP 結合型 RAS をアプライし、5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む HBSS を 1 mL ずつアプライ  
することによって目的タンパク質を溶出させた。

#### 2-5. FITC 標識 RAS の調製

0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.0) に溶解した 2 mg/mL RAS に対して、DMSO に溶解  
した 100 mg/mL FITC (DOJINDO) をモル比が 10 等量となるように加え、室温にて 3 時間  
反応させ FITC 標識を行った。反応後、終濃度 50 mM の塩化アンモニウムを添加して反応  
止めを行い、Econopac 10DG カラムによって未反応の FITC を除去した。

## 2-6. SLOによる細胞へのタンパク質導入法<sup>24</sup>

SLO (BioAcademia) は 10 mM DTT, 50% v/v glycerol を含む PBS に 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度に溶解し、1.5 mL LoBind tube (Eppendorf) に分注して $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存したものをを用いた。

SLO を用いて in-cell NMR 測定用の RAS 導入細胞を調製するために、まず、およそ  $1 \times 10^8$  個の HeLa S3 細胞をスピナーフラスコから回収し、7 mL の HBSS で 2 回洗浄した。その後、CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いた FCM 解析によって細胞数を定量し、 $7 \times 10^7$  個の細胞を HBSS 35 mL に懸濁して、15 ng/mL となるように SLO を加え  $4^{\circ}\text{C}$ にて 10 分間静置した。次に、冷却した 7 mL の HBSS で細胞を 2 回洗浄することで細胞に結合しなかった SLO を除去した。その後、細胞を 15  $\mu\text{M}$  FITC 標識 RAS および 2 mM Ile $\delta$ 1 位  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  標識 RAS および 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む HBSS 400  $\mu\text{L}$  に懸濁し、 $30^{\circ}\text{C}$ にて 20 分間インキュベートすることで、細胞膜上に SLO によるポアを形成し、目的のタンパク質を細胞内に導入した。導入後、HBSS+1Ca を 15 mL 加え、室温にて 15 分間インキュベートすることによって細胞膜を修復した。細胞膜の修復後、遠心を行い、上清を取り除いた後の細胞ペレットをさらに 16% Percoll (GE Healthcare) による密度勾配遠心にかけることによって死細胞の除去を行った。10 mL の HBSS+1Ca で 2 回洗浄し、得られたサンプルを以後の in-cell NMR 解析などに用いた。

## 2-7. FCMによる細胞の解析

FCM 解析には SLO 処理後の  $5 \times 10^6$  個の細胞を 500  $\mu\text{L}$  の HBSS+1Ca に懸濁し、細胞内に導入されている FITC 標識 RAS 由来の 525 nm における蛍光強度を観測した。また、膜非透過性の核染色試薬である PI (SIGMA) を用いて死細胞を染色し、670 nm における PI 由来の蛍光も同時に検出した。得られた結果において、FITC-positive, PI-negative な細胞を RAS 導入細胞、PI-positive な細胞を死細胞として判別した。FCM 解析には CytoFLEX (Beckman Coulter) を用いて解析した。PI は 0.5 mg/mL の濃度にて PBS に溶解し、 $4^{\circ}\text{C}$ 保存したものをを用い、PI の終濃度は 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とした。FCM 解析では  $1 \times 10^4$  個の細胞をカウントした。

## 2-8. バイオリアクター装置<sup>21</sup>

### 2-8-1. Mebiol gel を用いた細胞懸濁液のゲル化

Mebiol gel (Mebiol) は凍結乾燥状態で購入し、10 mL の DMEM に懸濁して用いた (8% w/v)。調製した Mebiol gel は分注後-20°Cにて保存した。

まず、Mebiol gel 100  $\mu$ L を用いて  $3.0 \times 10^7$  個の SLO 処理した細胞を氷上で懸濁した。この細胞懸濁液を、氷冷したパスツールピペットを用いて 4°C の DMEM で満たしたシゲミ管に注入すると、細胞懸濁液をストリング状に注入することができる。この時、円を描きながら穏やかに注入することで、細胞懸濁液をコイル状にサンプル管内に堆積させる。その直後に 37°C の湯浴に入れることで、コイル状のまま細胞懸濁液をゲル化した。

### 2-8-2. バイオリアクターにおける培地の灌流システム

NMR サンプル管内への培地の灌流は、4.0 mm (外径)  $\times$  2.6 mm (内径) のガラス管の先端をキャピラリー状に加工したチューブを、コイル状にゲル化された細胞懸濁液を含むサンプル管内に挿入する。ガラス管は外径が 4.0 mm の部分を 3 cm 程残すことにより、ガラス管が NMR サンプル管内部に隙間なく設置され、ゲルを崩すことなくガラスキャピラリーを正確にサンプル管中央部へ設置することが出来る。このガラス管に 1.0 mm  $\times$  0.5 mm の poly-ethyl-ethyl-ketone (PEEK) チューブを接続し、サンプル管底部に培地を連続的に供給した。この時、PEEK チューブ内に生じた気泡がガラス管部に到達しても、ガラス管の 4.0 mm の部分に気泡をトラップすることが可能である。培地の灌流は、シリンジインジェクターによって 50  $\mu$ L/min の流速で行い、NMR 測定を行っている間、連続的に灌流を行った。サンプル管の中部には、培地回収用のテフロンチューブを設置し、アスピレーターにつなげて余剰の培地を吸引した。これらのチューブは 6 mm (外径)  $\times$  4 mm (内径) のシリコンチューブの内部を通して NMR サンプル管に接続し、チューブの亀裂や吸引のトラブルが起きた際にも、培地が NMR マグネット内を汚染しないよう、厳重な対策をとった。

バイオリアクターにて用いた培地は、粉末状態で購入した DMEM (Gibco) に、25 mM HEPES-NaOH (pH 7.4), 20% D<sub>2</sub>O, Pen-Strep (Gibco), GlutaMAX (Gibco), 10% FBS を添加し、SteriCup (Merck)を用いて滅菌して用いた。灌流した培地は、実験に用いる直前に、十分脱気してから 37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間攪拌することで CO<sub>2</sub> を溶存させたものを用いた。

## 2-9. NMR 測定

### 2-9-1. *in vitro* 系での NMR 測定

バッファーは特に断りのない限り NMR バッファーを用い、溶媒の重水率は 10% D<sub>2</sub>O とした。タンパク質試料は、特に断りのない限り終濃度 200 μM となるように調製した。NMR 測定は cryogenic TXI probe を装備した Avance 500 および 800 (Bruker Biospin) を用いて 37°C にて <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC pulse sequence を用いて測定した。NMR 測定、及び得られた FID シグナルのフーリエ変換や解析は Topspin (Bruker) を用いて行った。

### 2-9-2. *in-cell* NMR 測定

*in-cell* NMR 測定は cryogenic probe を装備した Avance 800 を用いて測定した。測定温度は 37°C とした。また、全ての 2D スペクトルは SOFAST-HMQC 法<sup>25</sup>によって測定を行った。SOFAST-HMQC 測定において、120° 励起パルスには Pc9 (2000 μsec)、リフォーカスパルスには Rsnob (800 μsec) の shaped pulse を用い、それぞれの中心周波数は 1 ppm とした。SOFAST-HMQC 測定における磁化回復の待ち時間を 0.1 sec として測定した。NMR 測定、及び得られた FID シグナルのフーリエ変換や解析は Topspin (Bruker) を用いて行った。

## 2-10. 細胞 lysate の調製

細胞 lysate (Whole lysate) は HeLa S3 細胞に対して同体積の HBSS+5Mg Buffer (含プロテ

アーゼインヒビター) を添加して懸濁した後、Branson Microtip, 10% Power, total 1 min で超音波破碎し、 $1.25 \times 10^7$  cell に分注して $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。この Whole lysate に対して 15,000g, 30 min 遠心することで、不溶性画分を除いた上清を取得した。熱処理を行った lysate は lysate 上清を  $95^{\circ}\text{C}$  5 min 加熱したあと、凝集物を 15,000 g, 30 min 遠心して除くことで調製した。さらに分子量による lysate の分画は、lysate 上清を異なる MWCO を持つ Amicon Ultra 4 (MWCO 3K, 30K, 50K, 100K) を用いて限外濾過することにより行った。

#### 2-11. 細胞 lysate 画分のプロテオーム解析

$2.5 \times 10^7$  cell の HeLa S3 lysate を 15,000 g, 30 min 遠心した上清について、Amicon Ultra 50K を用いて MWCO 50K のメンブレンを通過した下部の溶液を回収し、これをさらに Amicon Ultra 30K を用いて濃縮し、MWCO 30 K のメンブレンを通過しなかった画分を回収することにより解析サンプルを調製した。(最終体積: 150  $\mu\text{L}$ )

lysate 画分サンプルを TCA 沈殿することでタンパク質を濃縮し、trypsin によりペプチド断片化したあと、質量分析計 : Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific), HPLC : EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific) を用いてペプチド断片化サンプルの液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS/MS) を行った。LC-MS/MS の結果に対し、peptide の retention time と分子量からアミノ酸配列を予測する MASCOT (Matrix Science Ltd) によりサンプル中のペプチドおよびそのペプチド配列を含むタンパク質の同定を行った。得られたデータは Scaffold (Proteome software) で解析した。

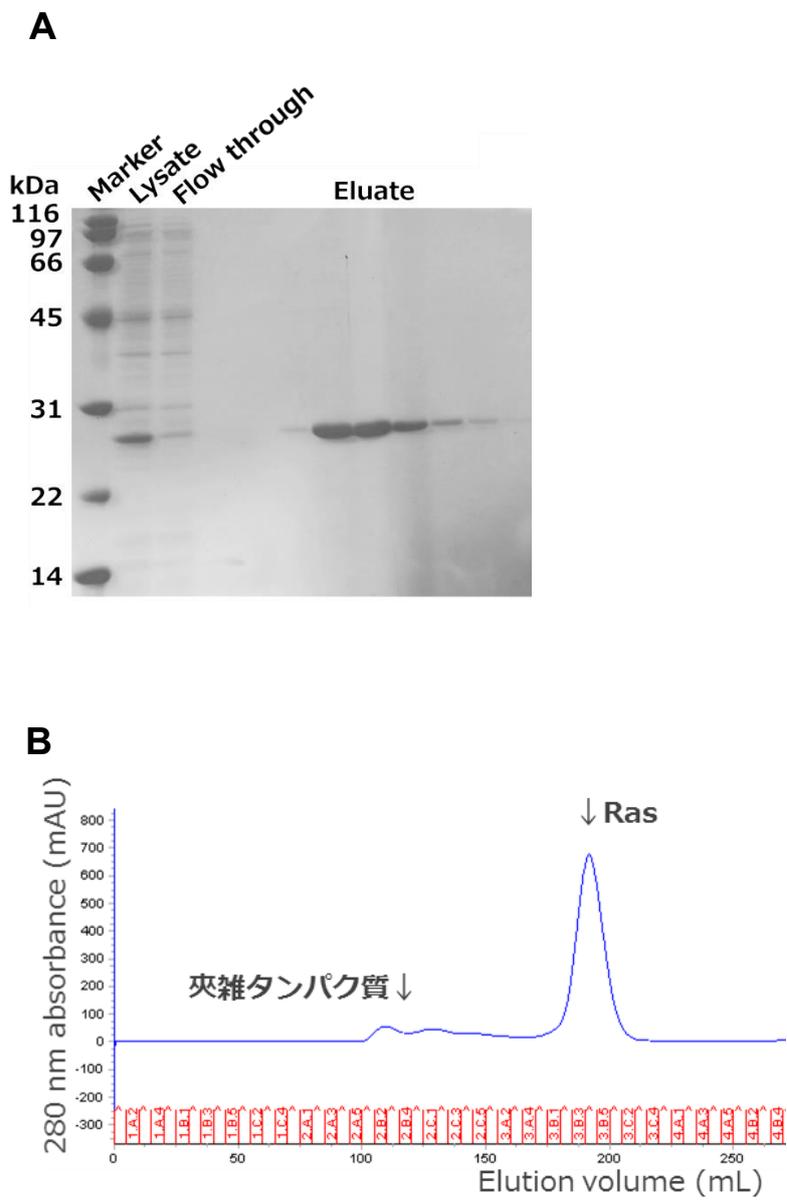
## 第3章 結果と考察

### 3-1. Ile の NMR シグナルに基づく RAS の fGTP の定量

#### 3-1-1. 大腸菌発現系を用いた RAS の調製

1-2 で述べたように、HVR を含む全長の RAS は細胞内において脂質修飾を受けて細胞膜に局在する。細胞膜に結合したタンパク質は運動性の低下により NMR シグナルが広幅化し、シグナルの感度が非常に悪くなることが予想される。一方で HVR を欠失した G-domain のみの RAS は細胞膜に局在せず細胞質中に拡散すると考えられる。この RAS G-domain を細胞内に導入して観測することは細胞膜上でのシグナル伝達による活性化は評価できないものの、刺激に依存しない細胞内 fGTP や  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の評価については可能であると判断した。そのため本研究では、細胞内に導入した RAS の NMR シグナルを高感度で検出するため、N 末端側に 6 x His-tag を付加した HRAS の G-domain を観測対象にした。また、Ile  $\delta 1$  位のメチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識することで methyl-TROSY 法<sup>26</sup>による観測を行うことにした。

そこでまず、RAS の Ile  $\delta 1$  位メチル基の NMR シグナルを利用した RAS 活性評価方法の確立を目指した。RAS の発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) codon plus RP に形質転換して重水 M9 培地中で大量培養を行い、誘導時に安定同位体標識  $\alpha$ -ketobutyric acid を添加した。菌体破碎後の可溶画分から、 $\text{Ni}^{2+}$ アフィニティーカラムによって精製した (収量 20 mg/L culture)。SDS-PAGE 解析およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 解析から十分な純度の RAS が調製できたと判断した (Figure 8AB)。



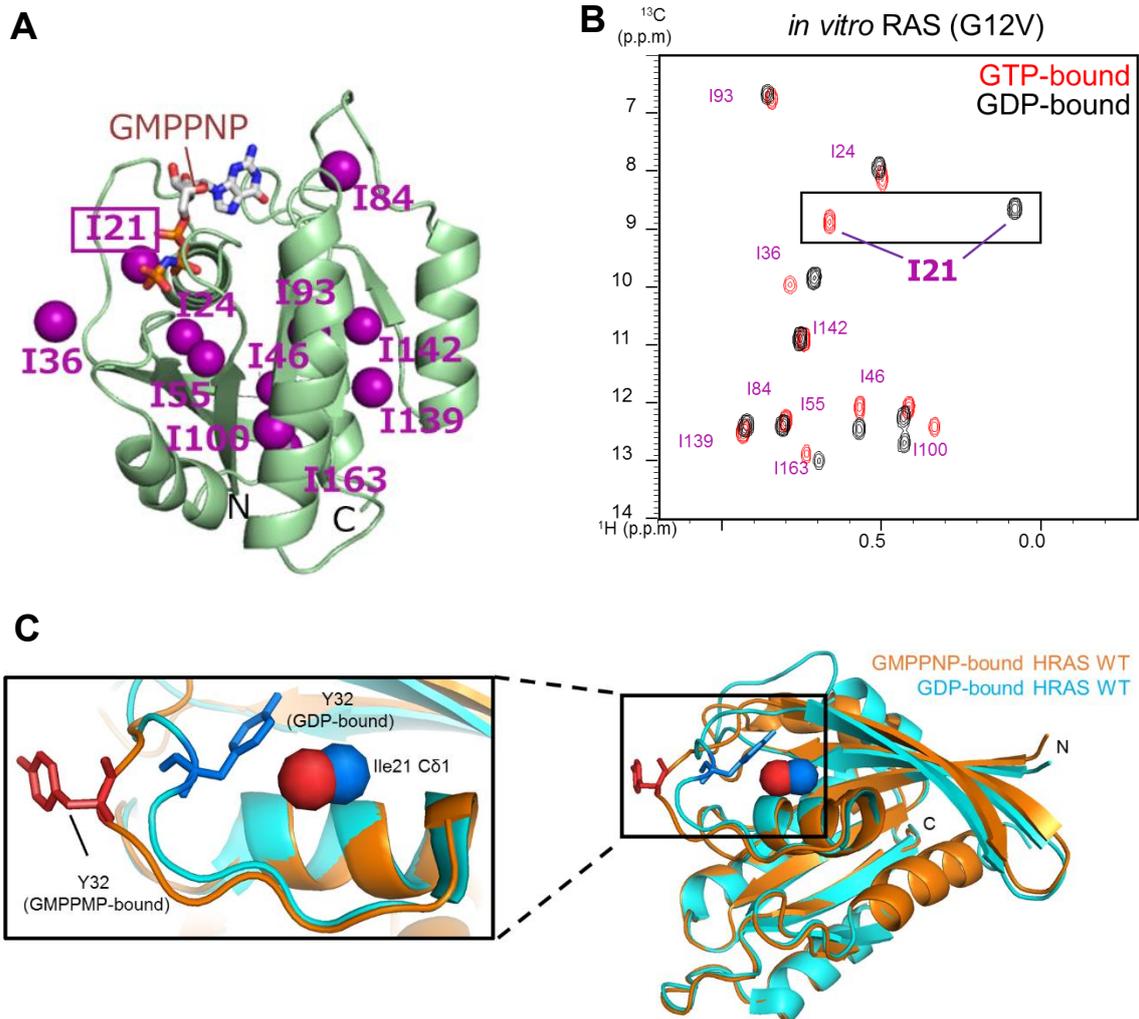
**Figure 8 安定同位体標識 RAS の精製**

(A)  $\text{Ni}^{2+}$ アフィニティー精製後の各画分の SDS-PAGE 像。(B) サイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロファイル(280nm 吸光)。

### 3-1-2. Ile $\delta$ 位メチル基のシグナルを用いた *in vitro* における RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ の測定

調製した Ile  $\delta$  位メチル基選択的標識 RAS について、まず RAS/G12V 変異体を用いて GDP 結合型および GTP 結合型の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを取得した (Figure 9AB)。その結果、スペクトル中に RAS 中の 11 個のシグナルが観測され、それぞれ先行研究<sup>27</sup>に基づいて Ile シグナルの帰属を移行した (Figure 9B)。これらの Ile シグナルのうちおよそ半数のシグナルについて、GDP 結合型と GTP 結合型で  $^1\text{H}$  の化学シフトが異なっており、特に Ile21 (I21) のシグナルが GDP 結合型と GTP 結合型とで顕著な化学シフト変化を示すことが分かった。また、野生型や他の変異体についても同様の NMR スペクトルを取得した結果、各 Ile の NMR シグナルの化学シフトが変異によらず概ね一致することを確認した。

Ile  $\delta$ 1 位メチル基の  $^1\text{H}$  の化学シフトは、近傍の芳香環の環電流シフトにより規定される。I21 は、Switch I に位置する Y32 の配向の変化によって環電流効果を受ける影響の度合いが変化する残基である (Figure 9C)。したがって、GDP 結合型および GTP 結合型における Switch I 領域のコンフォメーション変化が I21 の化学シフト変化に反映されたと考えられる。



**Figure 9 Ile  $\delta 1$  位のメチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した RAS の NMR 測定**

(A) Ile  $\delta 1$  位のメチル基をマッピングした GMPPNP 結合型 RAS の結晶構造。(B) Ile  $\delta 1$  位のメチル基を選択的に  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識した GDP 結合型 (黒) と GTP 結合型 (赤) の RAS/G12V の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。(C) GDP 結合型 RAS および GMPPNP 結合型 RAS における I21 と Y32 の位置関係の比較。

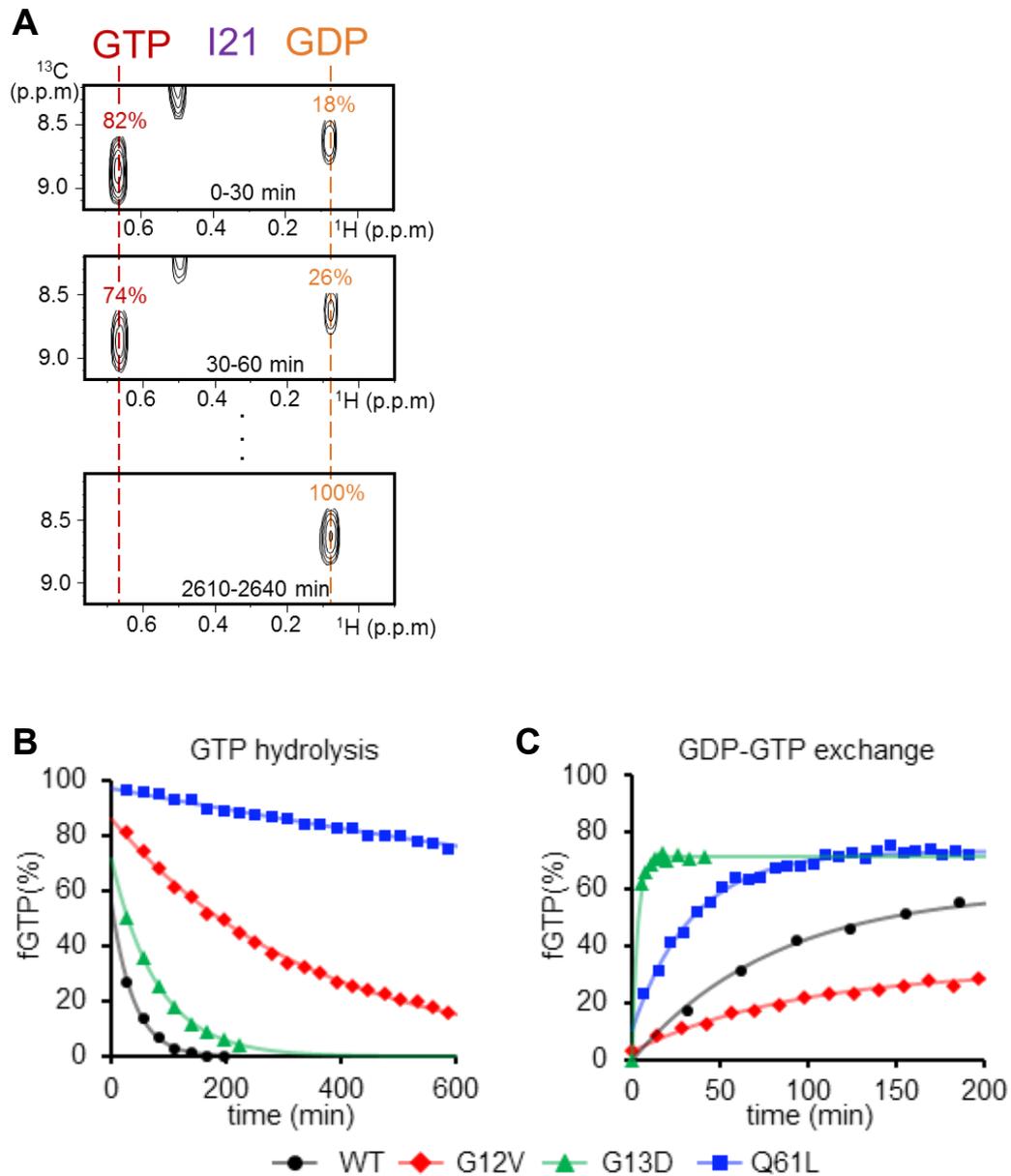
そこで、I21 のシグナル強度比から  $f_{GTP}$  を算出し、その経時変化から  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を算出することを試みた。GTP 結合型 RAS/G12V について 37°C 条件で連続的に NMR スペクトルを取得し (Figure 10A)、I21 のシグナル強度比から見積もられる各時間の  $f_{GTP}$  をプロットした (Figure 10B)。この経時変化に対して以下の式 (Eq2) を用いて最小二乗法によるフィッティングを行った結果、 $k_{hy}$  が  $2.88 \times 10^{-3} / \text{min}$  と算出された。同様に野生型や他の変異体に対しても行ったところ、RAS の  $k_{hy}$  はそれぞれ Table 1 のように算出された。

$$[Ras_{GTP}]_t = [Ras_{GTP}]_0 \exp(-k_{hy}t) \quad \dots (\text{Eq2})$$

また RAS の  $k_{ex}$  の算出に際しては、GTP 非加水分解性アナログである GTP $\gamma$ S を 2 等量添加した条件下にて GDP 結合型 RAS の NMR スペクトルを連続的に取得した。I21 シグナル強度比から  $f_{GTP}$  の経時変化をプロットし、以下の式 (Eq3) を用いて最小二乗法によるフィッティングを行うことで、 $k_{ex}$  を算出した (Figure 10C, Table 1)。

$$[Ras_{GTP}]_t = [Ras_{GTP}]_0 + [Ras_{GDP}]_0(1 - \exp(-k_{ex}t)) \quad \dots (\text{Eq3})$$

これらの Ile シグナルを用いた 37°C 条件下での  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の算出の結果、野生型に比べて  $k_{hy}$  については G12V 変異により 1/10 に低下、Q61L 変異で 1/80 倍に低下、 $k_{ex}$  については G13D 変異により 26 倍上昇しており、これは先行研究<sup>10</sup>において 25°C で  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  シグナルを用いて測定された  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の変化と概ね対応した (Table 2)。



**Figure 10** 37°C *in vitro*におけるRASのGTP加水分解速度の算出

(A) RASG12Vの $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMRスペクトル中におけるI21シグナルの経時変化 (37°C, 200  $\mu\text{M}$  GTP結合型RAS, HBSS + 5 Mg, 10%  $\text{D}_2\text{O}$ )。 (B) 37°CでのGTP加水分解反応における野生型および各発がん性変異体RASのfGTPの経時変化。 (C) 37°CでのGDP-GTP交換反応における野生型および発がん性変異体RASのfGTPの経時変化。

	$k_{hy}$ ( $\times 10^{-3}/\text{min}$ )	$k_{ex}$ ( $\times 10^{-3}/\text{min}$ )
WT	25.7	12.4
G12V	2.88	10.9
G13D	12.5	327
Q61L	0.407	29.2

**Table 1 *in vitro* における RAS の GTP 加水分解速度**

	$k_{hy}$ (compared to WT)		$k_{ex}$ (compared to WT)	
	37°C	25°C <sup>10</sup>	37°C	25°C <sup>10</sup>
G12V	x 0.11	x 0.10	x 0.88	x 0.52
G13D	x 0.49	x 0.35	x 26	x 15
Q61L	x 0.016	x 0.013	x 2.4	x 3.2

**Table 2 野生型に比べて各変異による  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の変化**

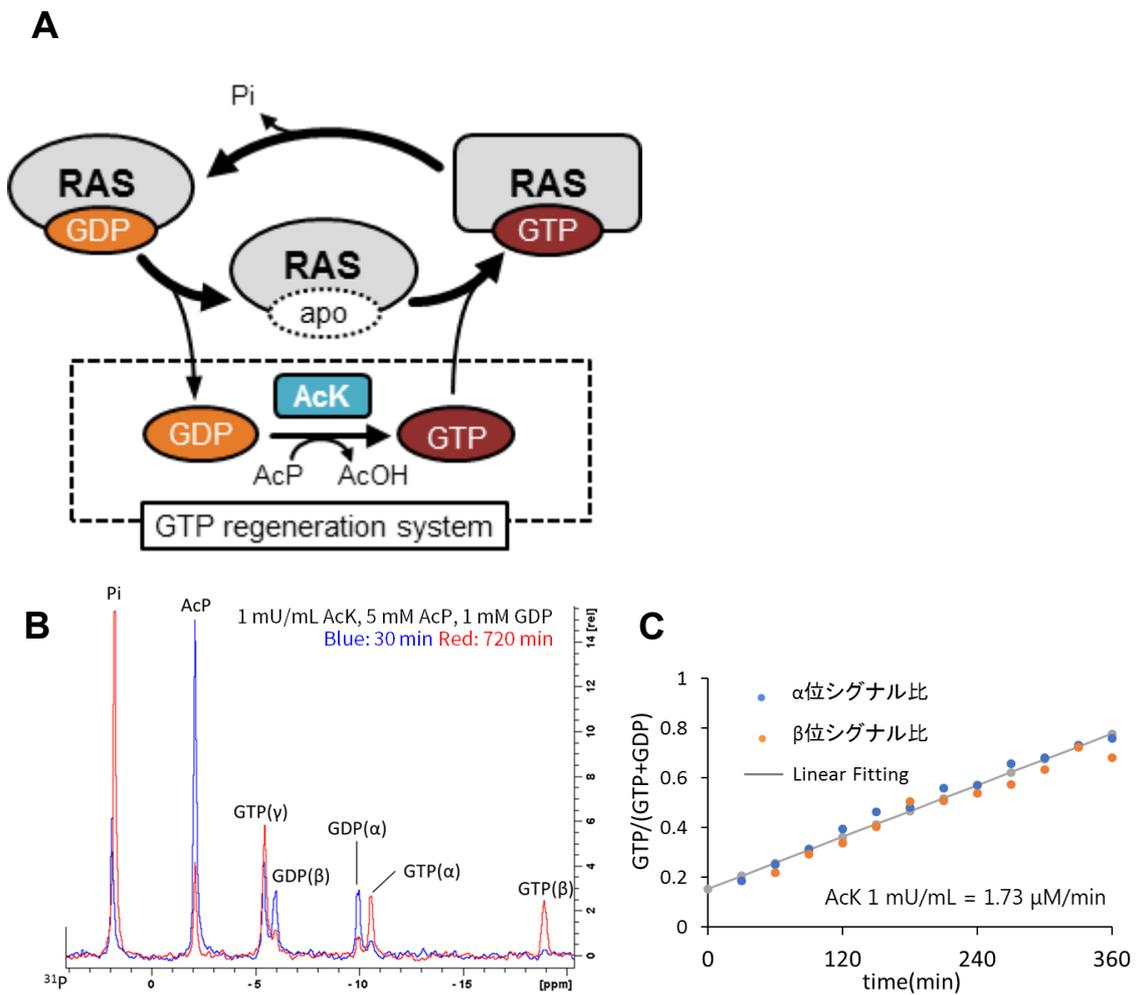
(37°C: 本研究中で測定, 25°C: 先行研究の結果 <sup>10</sup>)

### 3-1-3. GTP 再生系を用いた $k_{hy}$ , $k_{ex}$ 同時算出法の確立

細胞内では GDP に比べて過剰量の GTP が存在する状況で GTP 加水分解反応と GDP-GTP 交換反応が同時に生じており、3-1-2 のようにこの 2 つの反応を個別に観測することはできない。そのため、in-cell NMR においては fGTP の経時変化から  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を同時に算出する必要がある。そこで細胞内のように GTP が一定の濃度で存在する条件下を *in vitro* で再現することで、 $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を同時算出する方法を確立し、また細胞内で算出した  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  に対する *in vitro* でのコントロールにすることができると考えた。

RAS が単独で存在する *in vitro* 測定条件では経時的に GTP が加水分解されるため、系の GTP 濃度が減少する。そこで酵素 Acetate kinase (AcK) とその基質 Acetyl phosphate (AcP) によって遊離の GDP を GTP にリン酸化する「GTP 再生系<sup>28</sup>」を用いることで、RAS によって加水分解された GDP を GTP に再生し、細胞内のように遊離の GTP 濃度の恒常性が保たれている状態で fGTP の経時変化を追跡することができると考えた (Figure 11A)。

まず RAS 活性測定条件中における AcK の GDP リン酸化活性を <sup>31</sup>P-NMR 測定によって算出した。その結果、<sup>31</sup>P スペクトル上において GDP 由来の  $\alpha$  位および  $\beta$  位のリン原子のシグナルの経時的減少とそれに伴う GTP 由来の  $\alpha$  位および  $\beta$  位のリン原子のシグナルの増大が観測され、RAS 活性測定条件においても GTP 再生系が機能することが確かめられた (Figure 11B)。 $\alpha$  位および  $\beta$  位のリン原子の GTP/(GTP+GDP)シグナル強度比の経時変化に対しそれぞれ線形近似により AcK の活性を算出した結果、どのリン原子のシグナル強度を基準に算出するかに関わらず RAS 活性測定条件において AcK 1 mU/mL の GDP リン酸化活性は 1.73  $\mu$ M/min であることが分かった (Figure 11C)。



**Figure 11 Acetate kinase (AcK)による GTP の再生活性の算出**

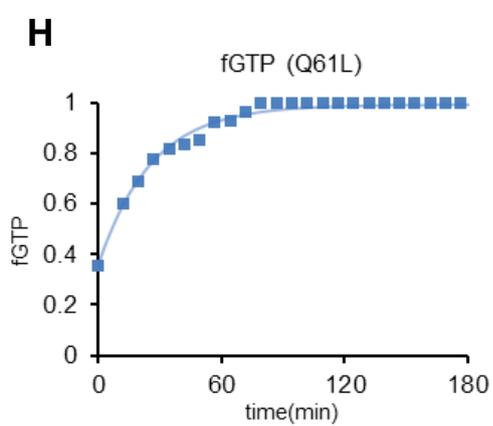
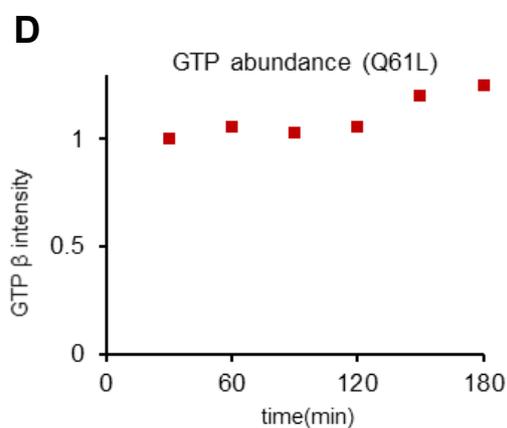
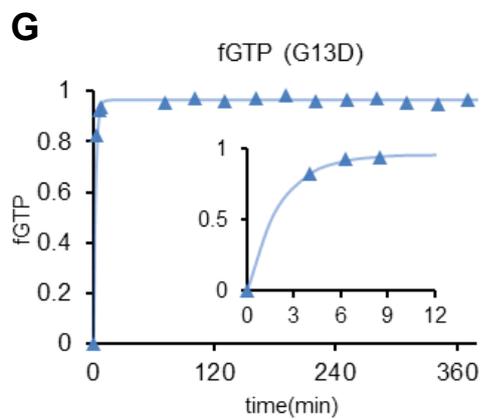
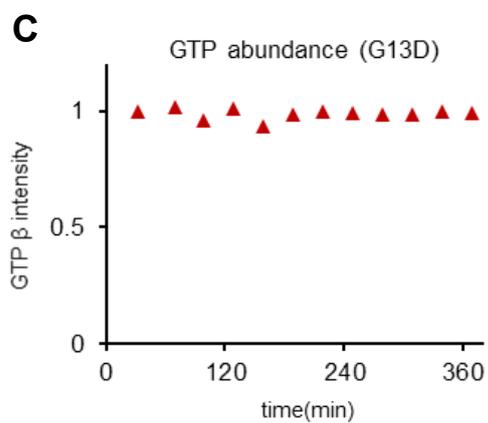
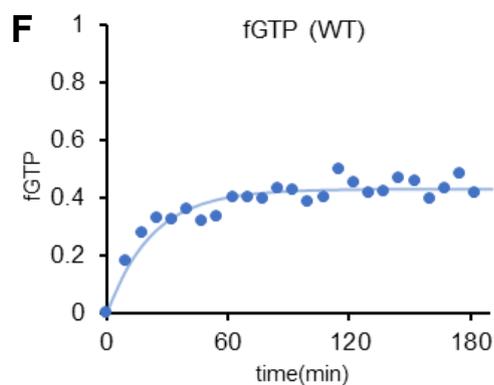
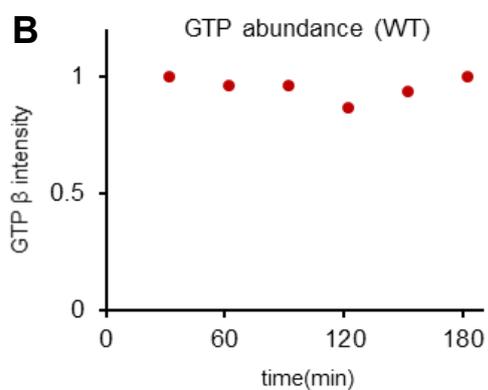
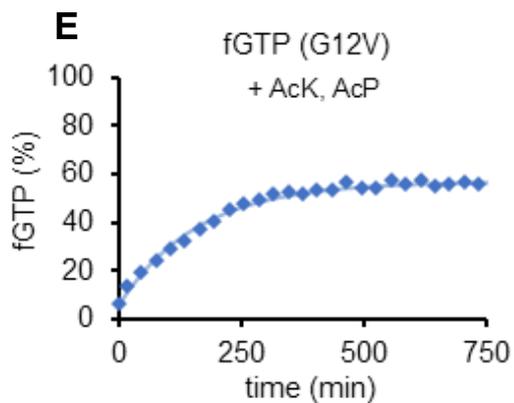
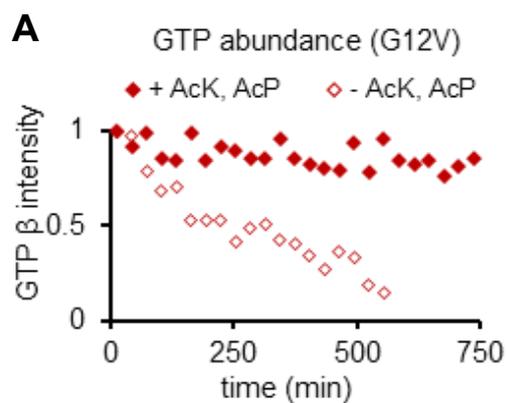
(A) Acetate kinase (AcK)を用いた GTP 再生系の模式図。 (B) 1 mM GDP に対し、GTP 再生系 (1 mU/mL AcK, 5 mM AcP)を添加したサンプルにおける測定開始直後 (青)と 720 min 後 (赤)の  $^{31}\text{P}$  スペクトル変化と各シグナルの帰属。 (C) グアニンヌクレオチドの  $\alpha$  位 (紺色),  $\beta$  位 (オレンジ) シグナル強度比から算出されるサンプル中の GTP 存在割合とフィッティングによる AcK の活性の算出。

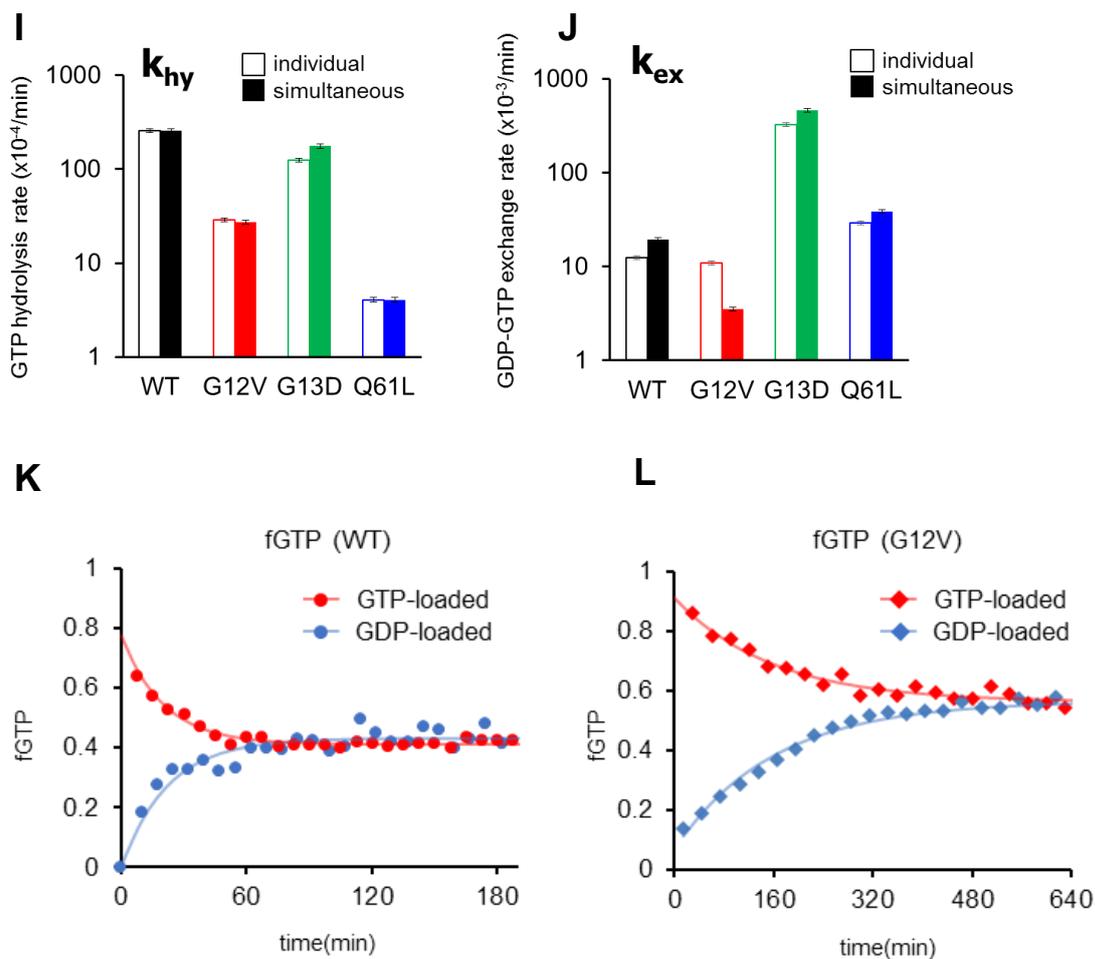
そこで GDP 結合型の RAS/G12V に対して十分量の AcK を含む GTP 再生系を添加し、<sup>31</sup>P NMR スペクトルにおける GDP および GTP の β 位のシグナル強度比より系中の GTP 濃度を、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルにおける I21 のシグナル強度比から fGTP をそれぞれ同時に測定することで追跡した。系中の GTP 濃度について、AcK, AcP 非添加状態では経時的に減少する一方で、AcK と AcP の存在する GTP 再生系下では系中の GTP 濃度が保たれていることを確認した (Figure 12A)。また同様に野生型 RAS, RAS/G13D, RAS/Q61L についても GTP 再生系下において測定中の系中 GTP 濃度が保たれていることを確認した (Figure 12BCD)。

この GTP 再生系中において観測された fGTP について以下の非線形微分方程式 (Eq4) を用いたフィッティングを行うことで、 $k_{hy}$  および  $k_{ex}$  を同時にそれぞれ算出した (Figure 12E)。また同様に野生型 RAS および RAS/G13D, RAS/Q61L についても GTP 再生系中での  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の同時算出を行った (Figure 12FGH)。

$$[Ras_{GTP}]_t = \frac{([Ras_{GTP}]_0 + [Ras_{GDP}]_0)k_{ex}}{k_{hy} + k_{ex}} + \frac{[Ras_{GTP}]_0k_{hy} - [Ras_{GDP}]_0k_{ex}}{k_{hy} + k_{ex}} \exp(-(k_{hy} + k_{ex})t) \dots \text{(Eq4)}$$

この方法により測定された  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  (Figure 12IJ, simultaneous) は野生型および変異体において 3-1-2 で算出した値 (Figure 12IJ, individual) とおおよそ一致し、このフィッティング法を用いることで細胞内においても 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。さらに野生型 RAS および RAS/G12V について、GTP 結合型を初期状態として同様に GTP 再生系中での  $k_{hy}$  と  $k_{ex}$  を算出したところ、GDP 結合型から測定した場合と同じ  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$ , および定常状態での fGTP を示した (Figure 12KL, Table 3)。そのため、本手法で算出する  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  は初期状態の fGTP に依存しないことが明らかになった。





**Figure 12 GTP 再生系中における  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の同時算出**

(A)  $^{31}\text{P}$  NMR 観測によるサンプル中 GTP 濃度の追跡。GTP 再生系存在下(塗り潰し)、GTP 再生系非存在下(白抜き)のそれぞれの GTP  $\beta$  位リン酸のシグナル強度をプロットした。(B-D) GTP 再生系中における野生型 RAS (B), RAS/G13D (C), RAS/Q61L (D), のサンプル中 GTP 濃度の追跡。(E) GTP 再生系存在下での GDP 結合型 RAS/G12V の fGTP の経時変化。(F-H) GTP 再生系中における野生型 RAS (F), RAS/G13D (G), RAS/Q61L (H) の fGTP の経時変化。(I, J) fGTP 経時変化から Eq4 をフィッティングすることで算出した  $k_{hy}$  (I),  $k_{ex}$  (J) (塗り潰し)。3-1-2 でそれぞれ個別に算出した値(白抜き)と比較した。(K, L) GTP 結合型から測定を開始した GTP 再生系における野生型 RAS (K), RAS/G12V (L) の fGTP の経時変化。GDP 結合型から測定を開始したプロット(E, F)と比較した。

	$k_{hy}$ ( $\times 10^{-3}/\text{min}$ )	$k_{ex}$ ( $\times 10^{-3}/\text{min}$ )
WT (GTP-loaded)	26.1	20.4
WT (GDP-loaded)	25.7	19.5
G12V (GTP-loaded)	2.79	3.57
G12V (GDP-loaded)	2.72	3.54

**Table 3** 初期状態の fGTP が  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の同時算出法に与える影響

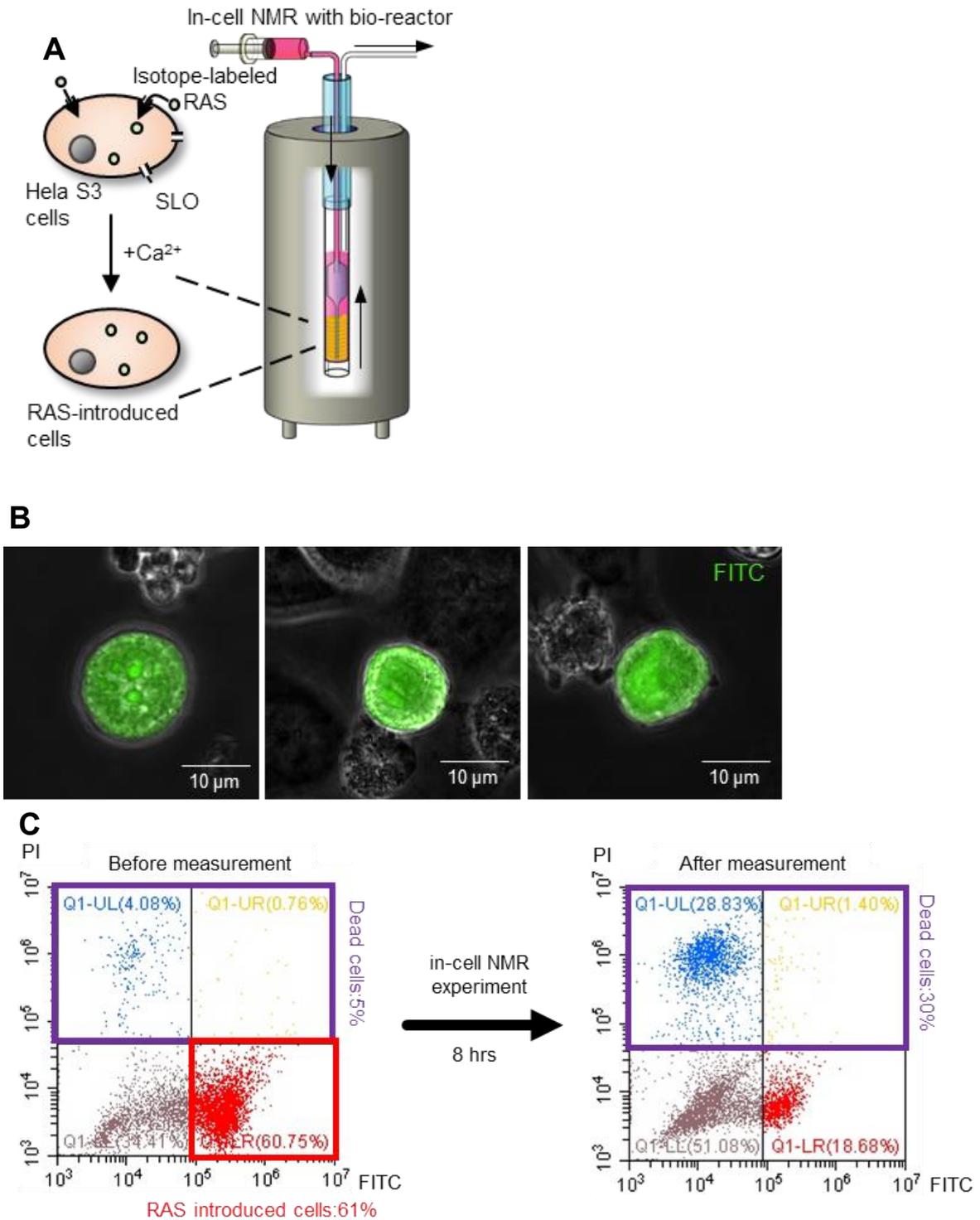
### 3-2. in-cell NMR 法による細胞内における RAS の活性評価

3-1 で確立した系を用いて実際の細胞内における RAS の fGTP および  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を評価するために、RAS の in-cell NMR 測定を行った。

#### 3-2-1. RAS 導入細胞の調製

まず、RAS の in-cell NMR 測定を行うにあたり、RAS 導入細胞の調製を行った。当研究室で確立した細胞膜に可逆的なポアを形成する Streptolysin O (SLO) による導入法<sup>24</sup>によって、HeLa S3 細胞内に RAS を導入した (Figure 13A)。具体的には、 $1 \times 10^8$  個の HeLa S3 細胞に対して 15 ng/mL の SLO を添加して細胞膜に結合させた後に、約 1.5 mM 程度まで RAS を濃縮した溶液に懸濁した状態で 30°C にてインキュベートしてポアを形成させることで RAS を導入した。安定同位体標識 RAS とともに FITC 標識した RAS も少量添加し、FCM 解析により調製した細胞の RAS 導入量を測定した。インキュベート開始約 20 分後に RAS 導入細胞の平均蛍光強度の飽和が観測されたため、この時点で HBSS+1Ca を添加し  $Ca^{2+}$  刺激による細胞膜の修復を行った。その後、16% percoll を用いた密度勾配遠心により死細胞除去を行った。この時点での RAS の細胞内分布について、共焦点顕微鏡観察を行ったところ FITC 標識した RAS は細胞質中に均一に分布していることが分かった (Figure 13B)。FCM 解析により最終的に調製した細胞のうち RAS 導入細胞の割合は 61%、死細胞の割合は 5% と見積もられた (Figure 13C)。このうち  $3.0 \times 10^7$  個の細胞を in-cell NMR 測定に使用した。調製した細胞を温度可塑性の Mebiol gel と混合し、NMR サンプル管内にコイル状に封入してゲル化した。この状態のサンプル管中央部にバイオリアクター装置先端のガラスキャピラリーを挿入し、シリンジポンプを用いて DMEM を 50  $\mu$ L/min の速度で注入した。過剰な DMEM はサンプル管上部のチューブを介してアスピレーターによって吸引した。このように培地を灌流することで、培地成分を細胞に供給し、老廃物や漏出タンパク質を除去した。また、測定後の細胞についても FCM 解析を行ったところ、死細胞の割合は 30% と見積もられたこ

とから、in-cell NMR 測定中に 74%の細胞が生存状態に保たれていたことを確認した (Figure 13C)。



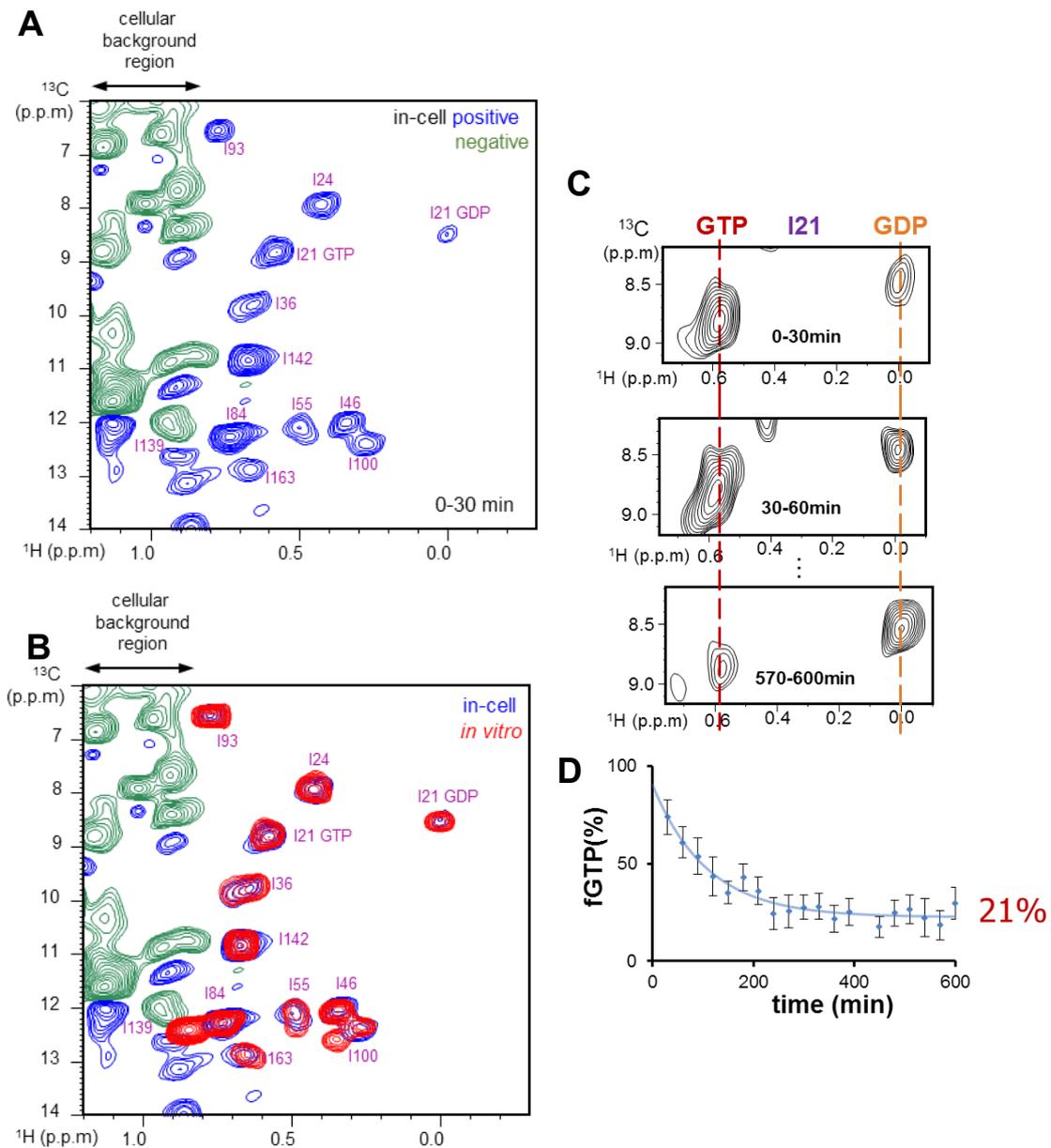
**Figure 13 RAS 導入細胞の調製**

(A) SLO 処理により HeLa S3 細胞中に導入した RAS の in-cell NMR の模式図。(B) FITC-RAS 導入細胞の共焦点顕微鏡像。(C) in-cell NMR 測定前の細胞の FCM 解析。4 つに区切られた領域のうち上部が PI ポジティブである死細胞、右下が FITC ポジティブである RAS 導入細胞を表す。

### 3-2-2. RAS の in-cell NMR 測定

発癌性変異体 RAS/G12V について 1 測定約 30 分間の in-cell NMR スペクトルを連続的に取得した結果、観測可能な 11 個全ての Ile シグナルが観測された (Figure 14A)。また、それぞれのシグナルの化学シフトは *in vitro* で測定したスペクトルとほぼ一致し、細胞内の RAS は *in vitro* とほぼ同じ構造をとっていることが示唆された (Figure 14B)。

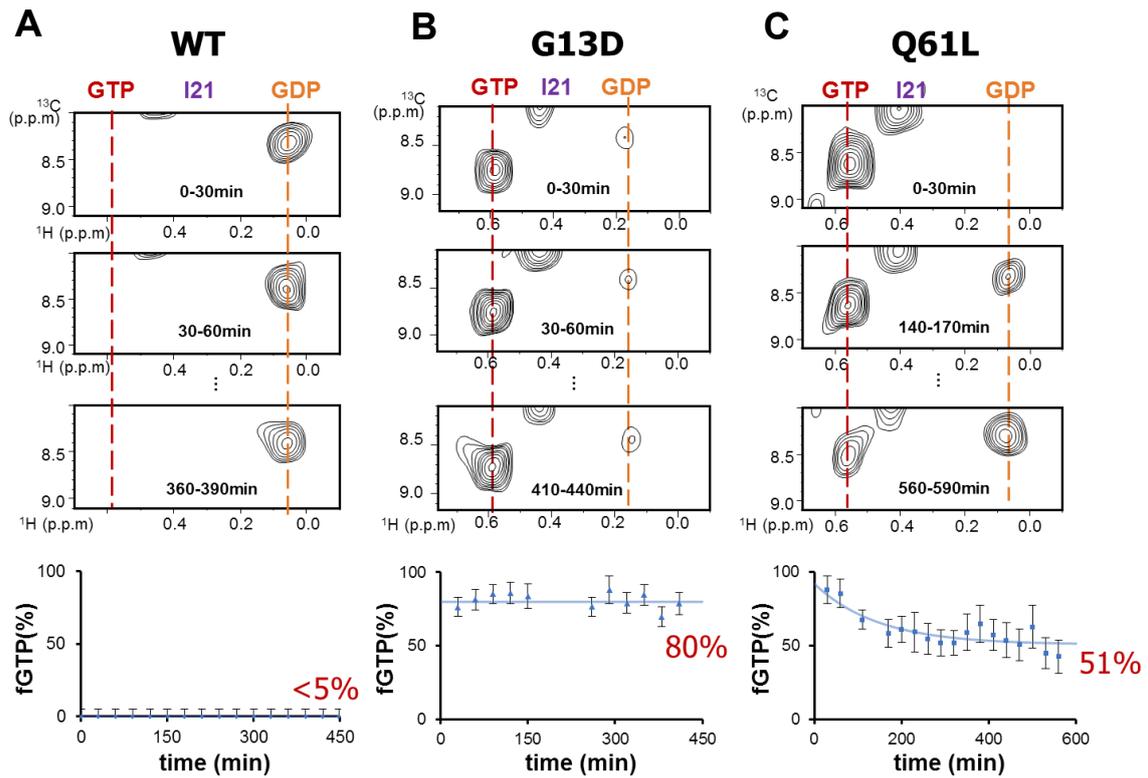
GTP 結合型と GDP 結合型とで異なる化学シフトを示す I21 のシグナル強度比 (Figure 14C) から、各時間経過時における fGTP を見積もり、時間を横軸としてプロットした。その結果、fGTP は測定開始直後のスペクトルにおいて 74%と見積もられ、その後経時的に減少し、測定開始約 300 分後付近では 21%で定常状態に達していた (Figure 14D)。



**Figure 14 RAS/G12V の in-cell NMR 測定**

(A) 測定開始 0-30 分後の細胞内導入 RAS/G12V の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  SOFAST HMQC スペクトル。(B) *in vitro* と細胞内の Ile $\delta$ 1 位シグナルの比較。(C) 細胞内導入 RAS/G12V の I21 シグナルの拡大図。測定開始 0-30 分、30-60 分、570-600 分後のスペクトルを並べて示す。(D) 各時間経過時における fGTP のプロットとフィッティング曲線。

同様に、野生型 RAS、RAS/G13D、および RAS/Q61L についても測定を行い、I21 シグナル強度比からそれぞれ fGTP の経時変化をプロットした (Figure 15)。その結果、細胞内での定常状態における fGTP はそれぞれ 5%未満、80%、51%と見積もられた。



**Figure 15 野生型 RAS および RAS/G13D、RAS/Q61L 変異体の in-cell NMR 測定**

細胞内に導入した野生型 RAS (A)、RAS/G13D (B)、RAS/Q61L (C) 変異体の I21 シグナルの拡大図と経時変化(上)、 および各時間経過時における fGTP のプロットとフィッティング曲線 (下)。

これらの in-cell NMR 観測により定量した定常状態における細胞内 fGTP を、3-1-3 で定量した *in vitro* での fGTP と比較した (Figure 16)。その結果、解析を行った全ての RAS について、細胞内環境下での定常状態における RAS の fGTP は *in vitro* よりも低下していた。特に野生型 RAS は細胞内ではほとんどが不活性型である GDP 結合型として存在しており (Figure 16, 黒色)、刺激非存在下では野生型 RAS が不活性型であるという先行報告<sup>11</sup>と一致した。また、*in vitro* では RAS/Q61L が 99% で最も高い fGTP を示していたのに対し、細胞内では RAS/Q61L (51%) よりも RAS/G13D (80%) の方が高い fGTP を有していた (Figure 16, 緑色 (RAS/G13D), 青色 (RAS/Q61L))。したがって、実際の細胞内における RAS の fGTP は *in vitro* で計測した値とは必ずしも相関しないことが明らかになった。

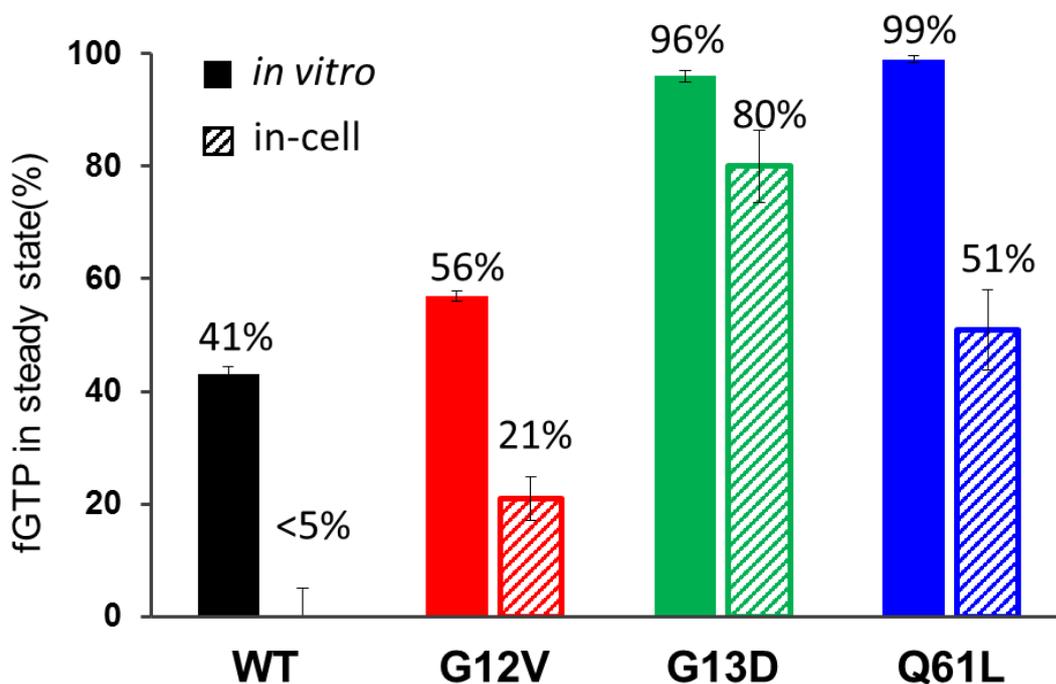
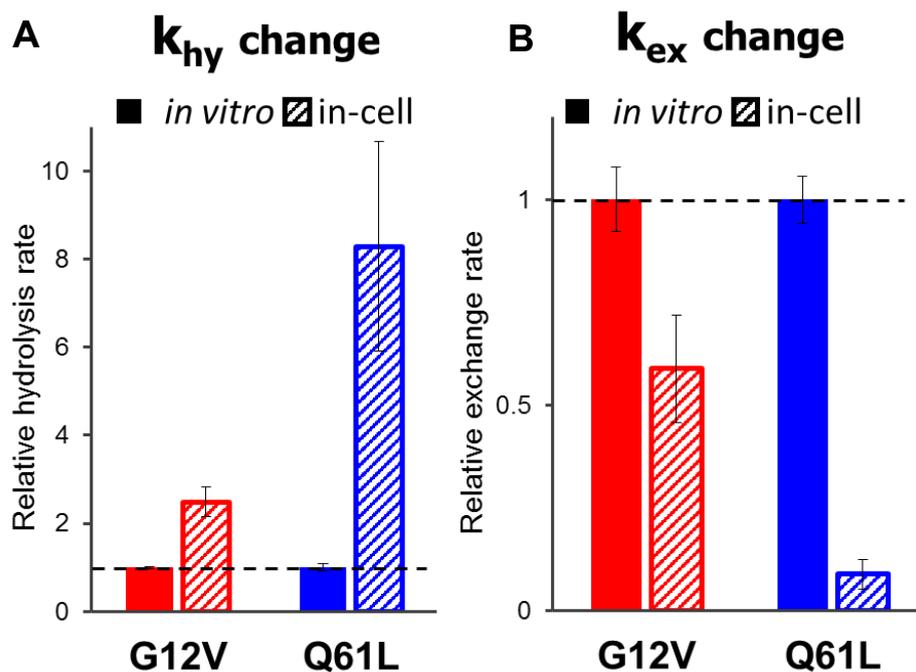


Figure 16 定常状態における RAS の fGTP の比較

*in vitro* での定常状態の fGTP を塗り潰しで、細胞内での定常状態の fGTP を斜線で図示した。

また、RAS/G12V と RAS/Q61L については、in-cell NMR 測定中に細胞内における fGTP の経時変化を観測することができた。この経時変化から 3-1-3 の方法でフィッティングによる細胞内  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の同時算出を行った結果、まず  $k_{hy}$  について、細胞内における RAS/G12V の  $k_{hy}$  は  $7.2 \times 10^{-3}$  /min、RAS/Q61L の  $k_{hy}$  は  $3.4 \times 10^{-3}$  /min と算出され、それぞれ *in vitro* と比較して 2.6 倍、8.3 倍に上昇していることが明らかになった (Figure 17A)。また  $k_{ex}$  については、細胞内における RAS/G12V の  $k_{ex}$  は  $2.1 \times 10^{-3}$  /min、RAS/Q61L の  $k_{ex}$  は  $3.4 \times 10^{-3}$  /min と算出され、それぞれ *in vitro* と比較して 0.6 倍、0.1 倍に低下していることが明らかになった (Figure 17B)。以上のことから、細胞内では *in vitro* と比べて RAS の  $k_{hy}$  が上昇し、なおかつ  $k_{ex}$  が低下しているために、定常状態における fGTP が低下していることが示唆された。



**Figure 17 RAS/G12V および RAS/Q61L の  $k_{hy}$  および  $k_{ex}$  (*in vitro* と *in-cell* との比較)**

RAS/G12V, RAS/Q61L の *in vitro* および細胞内 (*in-cell*) における  $k_{hy}$  (A),  $k_{ex}$  (B) の比較。RAS/G12V, RAS/Q61L それぞれの *in vitro* における  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を 1 として規格化した。 *in vitro* での値を塗り潰し、細胞内での値を斜線で図示した。

### 3-2-3. RAS の細胞内 $k_{hy}$ , $k_{ex}$ についての考察

前項の in-cell NMR 測定の結果から、野生型 RAS およびすべての発癌性変異体において、細胞内では定常状態における fGTP が低下していることが明らかとなった (Figure 16)。特に RAS/G12V および RAS/Q61L については、細胞内では *in vitro* と比べて  $k_{hy}$  が上昇していることおよび  $k_{ex}$  が低下していることが示された (Figure 17)。野生型 RAS および RAS/G13D については GTP 結合型と GDP 結合型の比が経時変化しなかったため細胞内の  $k_{hy}$  および  $k_{ex}$  を算出することは困難であったが、これら野生型 RAS および RAS/G13D についても細胞内において  $k_{hy}$  の上昇と  $k_{ex}$  の低下が起きていることが考えられる。

これらの活性変化の原因について、まず野生型 RAS については細胞内在性の RASGAP による  $k_{hy}$  促進効果の寄与を受けていることが考えられる。一方で、RASGAP はアルギニン残基中心とする活性部位「Arg finger」を持ち、Arg finger によって水分子を介した GTP 加水分解の中間体が安定化されるのに対して発がん性 RAS 変異体はそれぞれ Arg finger との立体障害 (G12V, G13D) および中間体形成に必要なグルタミン残基の変異 (Q61L) により RASGAP による加水分解促進効果を受けないことが知られている<sup>29</sup>。そのため、RAS/G12V を始めとした RAS 変異体の細胞内での  $k_{hy}$  増大に対して RASGAP 以外の要因が寄与していることが考えられる。また、RAS の  $k_{ex}$  を制御する因子として細胞内に GEF や guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) が存在するが、GEF は  $k_{ex}$  の増大にのみ関与しており、GDI は RAC や RAL などの他の GTPase の  $k_{ex}$  を低下させることが知られているものの<sup>30</sup>、RAS をターゲットとする GDI が存在することはこれまで報告されていない。

以上から in-cell NMR 測定において観測された  $k_{hy}$  と  $k_{ex}$  の変化を既知の制御因子のみでは説明することができないと考え、RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を制御する細胞内因子を探索することとした。

### 3-3 RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ に変調を与える細胞内因子の探索

#### 3-3-1. 分子混雑環境が RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ に与える影響の解析

RAS の活性に影響を与える要素としてまず細胞内特有の分子混雑環境に着目した。細胞内はタンパク質などの高分子が 300-400 mg/mL という高濃度で存在する分子混雑環境であり (Figure 18A)、このような細胞特有な環境ではタンパク質間の非特異的な相互作用や分子の空間自由度が低下する体積排除効果、高い溶液粘性による分子の拡散速度の低下などが生じる<sup>31</sup>。この分子混雑環境が RAS の活性に対してどのような影響を与えるのかを解析するため、それぞれの環境効果を以下の crowder reagent を用いて *in vitro* で再構成し、3-1-2 の個別算出法で RAS/G12V 変異体の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  をそれぞれ算出した (Figure 18BC)。

<crowder reagent と高濃度添加時に引き起こされる効果>

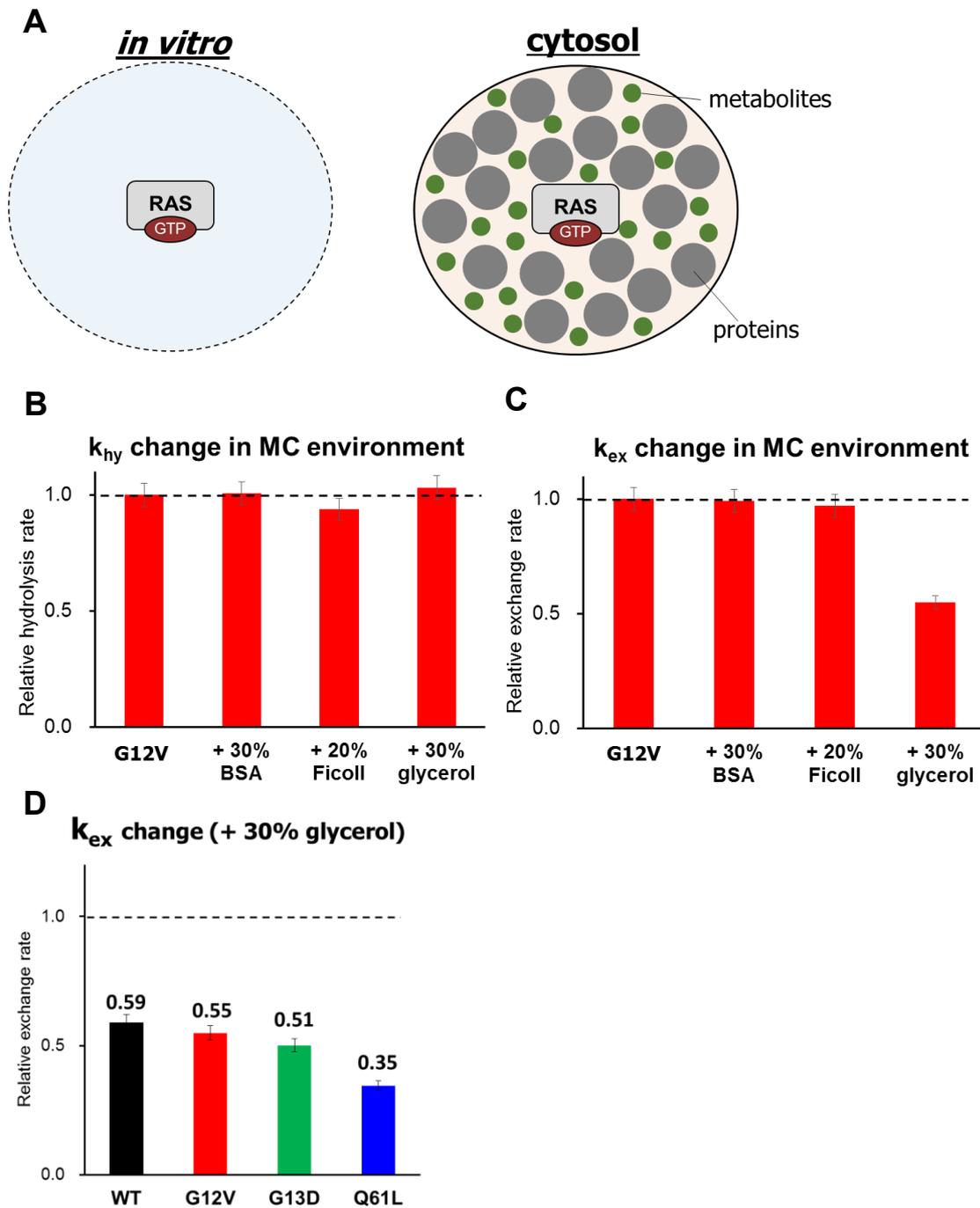
Bovine serum albumin (BSA) ... タンパク質間非特異的相互作用

Ficoll... 体積排除効果

glycerol... 高粘性環境

測定の結果、まず  $k_{hy}$  については BSA, Ficoll, glycerol のいずれが存在する条件でも非添加状態に比べてほとんど変化しなかった (Figure 18B)。そのため細胞内で観測されたような  $k_{hy}$  の上昇に対して分子混雑環境は寄与していないと判断した。また  $k_{ex}$  についても BSA, Ficoll 存在下での変化が観測されず、タンパク質間非特異的相互作用や体積排除効果は RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  に影響を与えないことが分かった (Figure 18C)。一方で 30% glycerol 存在下での RAS/G12V の  $k_{ex}$  は glycerol 非添加状態から 0.59 倍に低下していることが明らかになった (Figure 18C)。

glycerol 溶液中での  $k_{ex}$  の低下が細胞内で起きている変化と対応するかどうかさらに検証するため、野生型および他の変異体についても高粘性環境が活性に与える影響を調べた (Figure 18D)。その結果、 $k_{ex}$  について RAS/G12V と同様に野生型や全ての変異体において 30% glycerol 中では 0.6 から 0.35 倍程度の顕著な低下が観測された。このことから glycerol によって再構成された高粘性環境下では RAS の変異に関わらず  $k_{ex}$  が低下することが明らかになった。また、30% glycerol 存在下における RAS の  $k_{ex}$  は RAS/G12V では非存在下の 0.55 倍、RAS/Q61L では 0.35 倍であり、RAS/Q61L の方が RAS/G12V に比べて低下率が大きかった。このことは、3-2-2 の in-cell NMR 観測結果において、RAS/Q61L の方が RAS/G12V に比べて細胞内における  $k_{ex}$  の低下率が大きいことと対応している (Figure 17B)。以上より、in-cell NMR で観測された細胞内 RAS の  $k_{ex}$  の低下は細胞質中の高粘性環境が寄与していることが明らかになった。

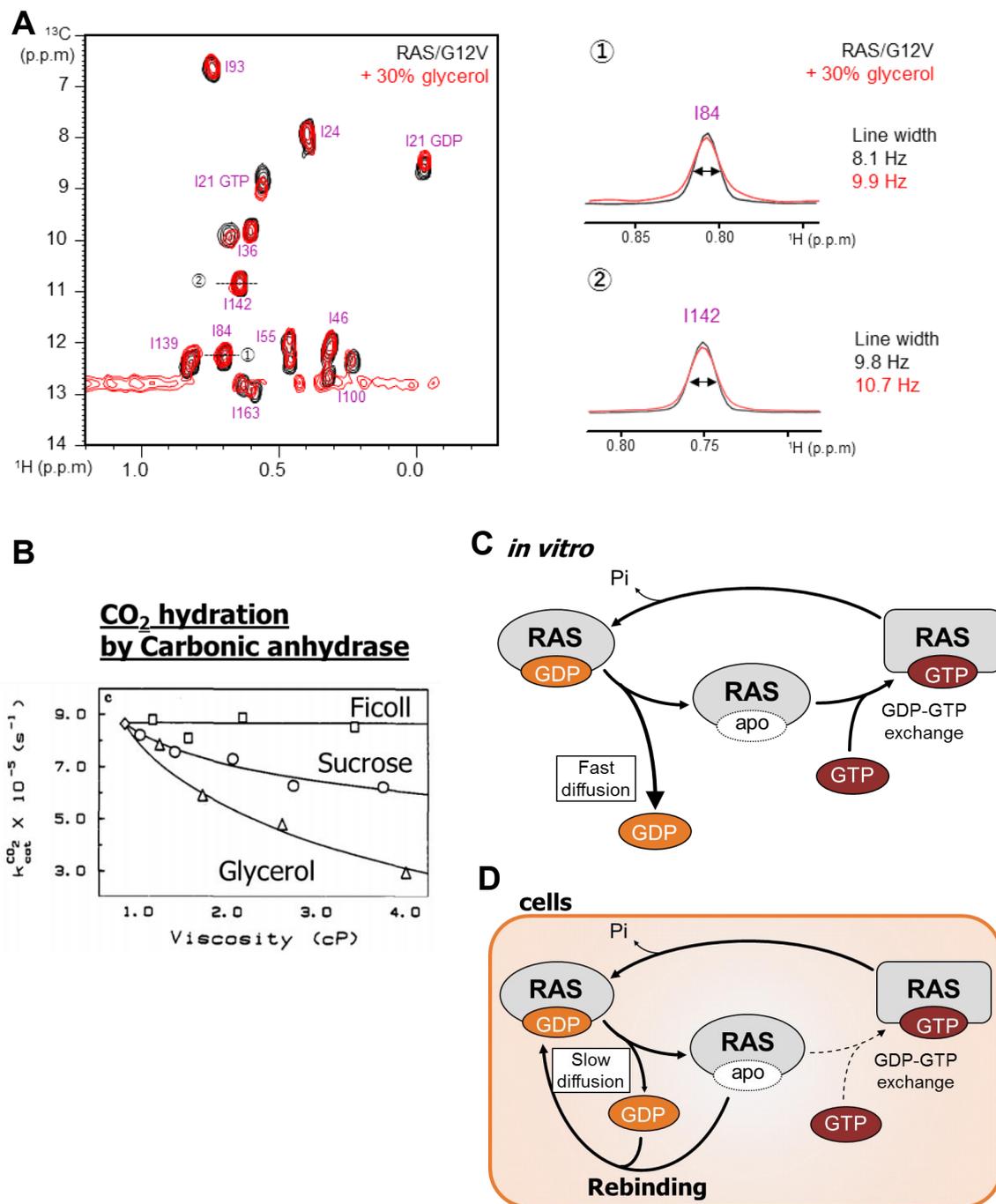


**Figure 18** 分子混雑環境が RAS 活性に与える影響の解析

(A) 細胞内における分子混雑環境の模式図。(B,C) 各 crowder reagent 存在下での RAS/G12V の  $k_{hy}$  (B)  $k_{ex}$  (C) の算出。それぞれ非添加状態の RAS/G12V の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を 1 として規格化した。(D) 30% glycerol 添加時の野生型および変異体 RAS の  $k_{ex}$  の算出。非添加状態の  $k_{ex}$  を 1 として規格化した。

高粘性環境下における RAS の  $k_{ex}$  低下のメカニズムを考察するために、glycerol 添加に伴う RAS の構造変化を NMR スペクトルにより調べた (Figure 19A)。その結果、溶液粘性の増大による Ile シグナル線幅の増大は観測されたものの、それぞれのシグナルの化学シフトの変化は観測されなかったことから、 $k_{ex}$  の低下は RAS の構造変化によるものではないと判断した。

本研究で観測された、グリセロール添加時に活性が低下するが Ficoll 添加の影響は受けないという現象は、これまで溶液の粘性により影響を受けることが実証されているタンパク質のうち、炭酸脱水酵素 (Carbonic anhydrase) のような反応の律速段階が溶液の分子拡散となる酵素でも報告されている (Figure 19B)<sup>32</sup>。したがって、RAS の  $k_{ex}$  の低下においても溶液分子拡散速度の低下が寄与していると考えられる。RAS の GDP-GTP 交換反応においては GDP の解離が律速段階であり<sup>33</sup>、溶液の分子拡散速度は GDP の解離速度には影響しないものの、分子拡散速度の低下により RAS から解離した GDP が十分に拡散されずにもとの RAS への再結合が誘起される (Figure 19CD)。よって、高粘性環境下で生じる GDP の再結合が、本来の遊離の GTP との交換反応と競合することが  $k_{ex}$  の低下の原因であると考えた。



**Figure 19** 高粘性環境による  $k_{\text{ex}}$  の低下機構の考察

(A) glycerol 添加 (赤), 非添加 (黒) の間での RAS/G12V の NMR スペクトルの比較(左)と代表的な Ile シグナル (①I84, ②I142) の線幅の比較(右)。 (B) 各 crowder reagent (Ficoll, sucrose, glycerol) 添加に伴う炭酸脱水酵素の酵素活性の比較<sup>32</sup>。 (C,D) 高粘性環境における  $k_{\text{ex}}$  の低下機構のモデル。 *in vitro* の低粘性環境に対し (C)、細胞内では高粘性環境による分子拡散速度の低下が RAS から解離した GDP の再結合を誘起し、見かけの GTP との交換速度を低下させる (D)。

### 3-3-2. 細胞内低分子生理物質が RAS の $k_{hy}$ に与える影響の解析

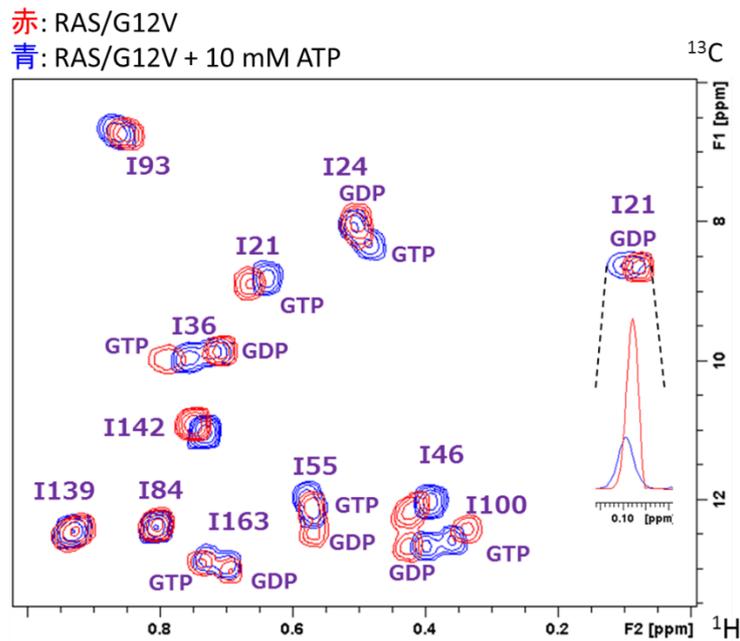
次に、RASGAP 非感受性である RAS/G12V, RAS/Q61L 変異体においても細胞内において  $k_{hy}$  が増大している要因として、ATP などの細胞内に豊富に存在する低分子生理物質に着目した。先行研究のマイコプラズマ細胞質内の全原子 MD シミュレーションから、本来の基質ではない低分子がタンパク質の溶液露出面と頻繁に相互作用することが示唆されており<sup>34</sup>、細胞内生理物質の存在によって RAS の加水分解速度が変調を受けるかどうかを解析した。

RAS の活性への影響を与えうる細胞内生理物質として、細胞内に豊富 (数 mM) に存在する生理物質である ATP および還元型グルタチオン、さらに RAS グルタミン残基および RASGAP のアルギニン残基が GTP 加水分解反応の活性残基であることを考慮して遊離アミノ酸のグルタミンおよびアルギニンに着目して、それぞれを 10 mM 添加した状態で RAS/G12V の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを連続的に測定した。

低分子生理物質の添加による Ile 化学シフト変化を解析したところ、ATP 添加時に GDP 結合型の I21 シグナルの広幅化 (シグナル強度は 1/3 に低下) および GTP 結合型および GDP 結合型の両方において I84, I139 以外の全ての Ile シグナルの化学シフト変化が観測された (Figure 20)。この結果から、RAS のヌクレオチド結合型によらず、遊離の ATP の RAS に対する相互作用が存在することが明らかになった。一方、RAS の in-cell NMR スペクトル上では ATP 添加に対応する化学シフト変化は生じていないことから (Figure 14B)、RAS 以外の分子が存在する細胞内では RAS と非特異的に相互作用する ATP の実効濃度は低いと考えられる。また、グルタチオンやアミノ酸の添加時には化学シフトの変化は生じなかったため、顕著な相互作用が存在しないことが示唆された。

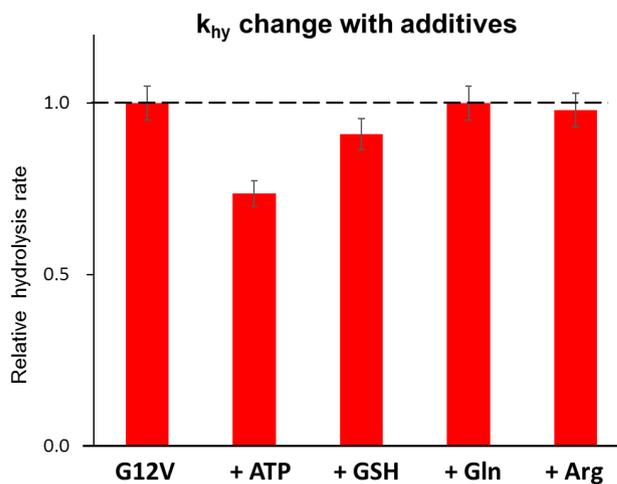
次に、I21 もしくは I100 のシグナル強度の経時変化を基にそれぞれの添加条件下での RAS/G12V の  $k_{hy}$  を算出した (Figure 21)。その結果、ATP 添加時の  $k_{hy}$  は 0.74 倍、それ以

外の条件での  $k_{hy}$  はコントロールとほぼ同じ値であり、いずれも加水分解促進効果を示さなかった。したがって、本項で検討した細胞内低分子生理物質は細胞内 G12V の加水分解速度上昇に対して寄与していないことがわかった。



**Figure 20** ATP の添加による RAS/G12V の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルの変化

10 mM ATP 添加時 (青)と非添加時 (赤)の RAS/G12V の  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル。GDP 結合型 I21 については  $^1\text{H}$  方向の NMR シグナルの切り出しも表示した。



**Figure 21** 細胞内生理物質が RAS/G12V の  $k_{\text{hy}}$  に与える影響の解析

各 10mM の ATP, 還元型グルタチオン (GSH), グルタミン (Gln), アルギニン (Arg) を添加した際の RAS/G12V の  $k_{\text{hy}}$  を測定して、非添加状態の RAS/G12V の  $k_{\text{hy}}$  を 1 として規格化した。ATP 添加時のみ、GDP 結合型 I21 のシグナルが広幅化したため、I100 のシグナル強度を用いて  $k_{\text{hy}}$  を算出した。

### 3-3-3. 細胞 lysate に含まれる RAS 変異体の $k_{hy}$ を増大させる因子の解析

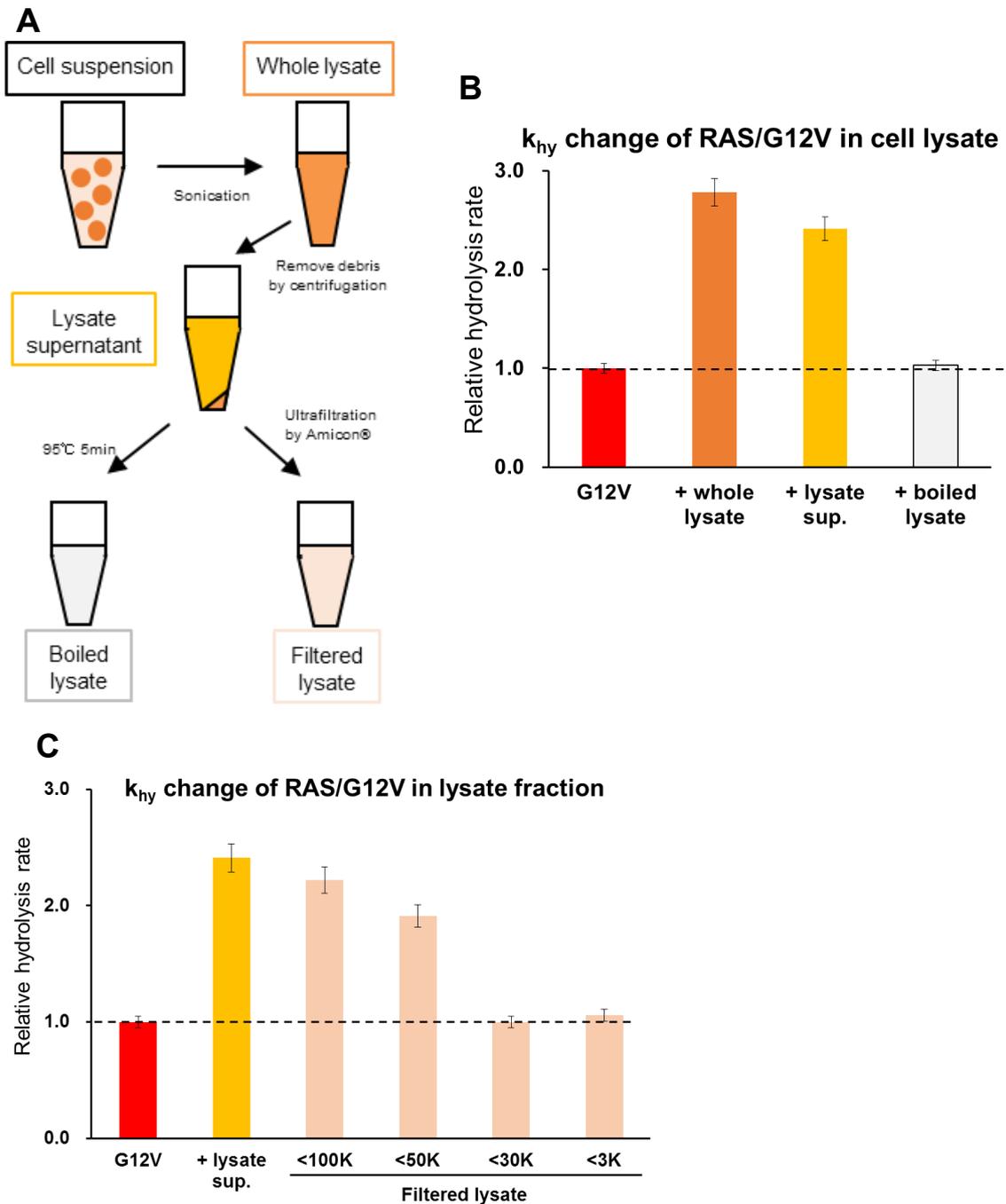
RASGAP による加水分解促進効果を受けないにもかかわらず細胞内で  $k_{hy}$  が増大した発がん性変異体 RAS/G12V に対し、分子混雑環境や細胞内生体物質との非特異的な相互作用では  $k_{hy}$  の増大が見られなかったことから、RASGAP 以外に RAS に対して特異的に相互作用する因子が細胞内に存在し、その因子が RAS 変異体の細胞中での  $k_{hy}$  の増大に寄与している可能性を考えた。

そこで、RAS 変異体の  $k_{hy}$  を上昇させる細胞内因子が存在するかどうかを、細胞の破碎液(lysate)を用いて解析した (Figure 22A)。HeLa S3 細胞の lysate を超音波破碎法により調製し、lysate 全体 (Whole lysate)および、Whole lysate から細胞膜や核などの不溶性画分を除いた遠心上清(lysate sup.)を添加した条件における RAS/G12V の GTP 加水分解速度定数をそれぞれ算出した。

測定の結果、Whole lysate 中での RAS/G12V の  $k_{hy}$  は lysate 非添加のコントロールに比べ 2.8 倍程度上昇しており、また lysate sup.中での  $k_{hy}$  もコントロールに比べ 2.4 倍程度上昇していた (Figure 22B)。不溶性画分を除いた lysate 上清中における RAS/G12V の加水分解速度が Whole lysate と同程度に上昇していたことから RAS/G12V の  $k_{hy}$  を上昇させる成分が細胞質の可溶性画分に存在していることが明らかとなった。さらに、lysate 画分を熱処理 (95°C, 5 min)すると RAS/G12V に対する加水分解促進活性が失活したことから (Figure 22B)、加水分解促進因子が細胞内のタンパク質成分であることが示唆された。

そこでこの加水分解促進因子がどのようなタンパク質であるのかをさらに解析するため、lysate 上清から限外ろ過によって、分子量が 3K, 30K, 50K, 100K 以下の成分を抽出し、加水分解促進効果を示す細胞内成分の分子量の見積もりを行った (Figure 22C)。

測定の結果、MWCO (Molecular weight cut off) 30K, 3K のメンブレンを通過した lysate 画分を添加した RAS/G12V はコントロールとほぼ同じ  $k_{hy}$  を示したのに対し、MWCO 100K のメンブレンを通過した lysate 画分を添加した RAS/G12V の  $k_{hy}$  はコントロールの 2.22 倍、MWCO 50K のメンブレンを通過した lysate 画分を添加した RAS/G12V の  $k_{hy}$  はコントロールの 1.91 倍と限外ろ過前の lysate sup. と同様に加水分解促進活性を示した (Figure 22C)。この結果から加水分解促進因子は、主に分子量 30K~50K 程度の画分に存在することが分かった。既知の RASGAP ファミリー (p120, NF-1 等) の分子量はいずれも 50K を超えており<sup>35</sup>、RASGAP 以外の細胞内タンパク質が RASGAP 非感受性である RAS/G12V 変異体に対しても加水分解促進活性を有することが明らかになった。



**Figure 22 細胞 lysate に含まれる RAS 変異体の  $k_{hy}$  を促進させる因子の解析**

(A) 各 lysate サンプル、および分子量画分の調製の模式図。(B) HeLa S3 細胞の破碎液(Whole lysate)および lysate 遠心上清 (lysate sup.), 加熱処理した lysate (boiled lysate) を添加した際の RAS/G12V の  $k_{hy}$  の測定。非添加状態の RAS/G12V の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。(C) HeLaS3 細胞 lysate の遠心上清から分子量ごとに限外濾過した lysate 画分 (filtered lysate) を添加した際の RAS/G12V の  $k_{hy}$  の測定。非添加状態の RAS/G12V の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。

### 3-3-4. プロテオーム解析による細胞 lysate 画分中のタンパク質の同定

3-3-3 で行った lysate 実験により存在が示唆された RASGAP と異なる  $k_{hy}$  促進因子が具体的にどのタンパク質であるかを同定するために、RAS/G12V 変異体に対して  $k_{hy}$  促進効果を持つ分子量 30K~50K の細胞 lysate 画分に含まれるタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に同定し、そのうち RAS/G12V に対して  $k_{hy}$  促進効果を与える可能性のある分子について解析を行うこととした。

lysate 画分中に実際に含まれるタンパク質群の同定は、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて多数のタンパク質を同時に同定できる、アプロサイエンス (現: アンテグラル) 社の shotgun proteomics 法の受託解析サービスを利用した (Figure 23)。その結果、HeLa S3 lysate 30k-50kDa 画分中に全 1172 種のタンパク質が同定された。そのうち、検出された Unique peptide 数が僅か、もしくは検出分子量やクロマトグラフィーでの保持時間が予測値と異なるため存在の信頼度が低いタンパク質 (probability 90% 以下) を除いた 883 種類のタンパク質を解析対象とした。

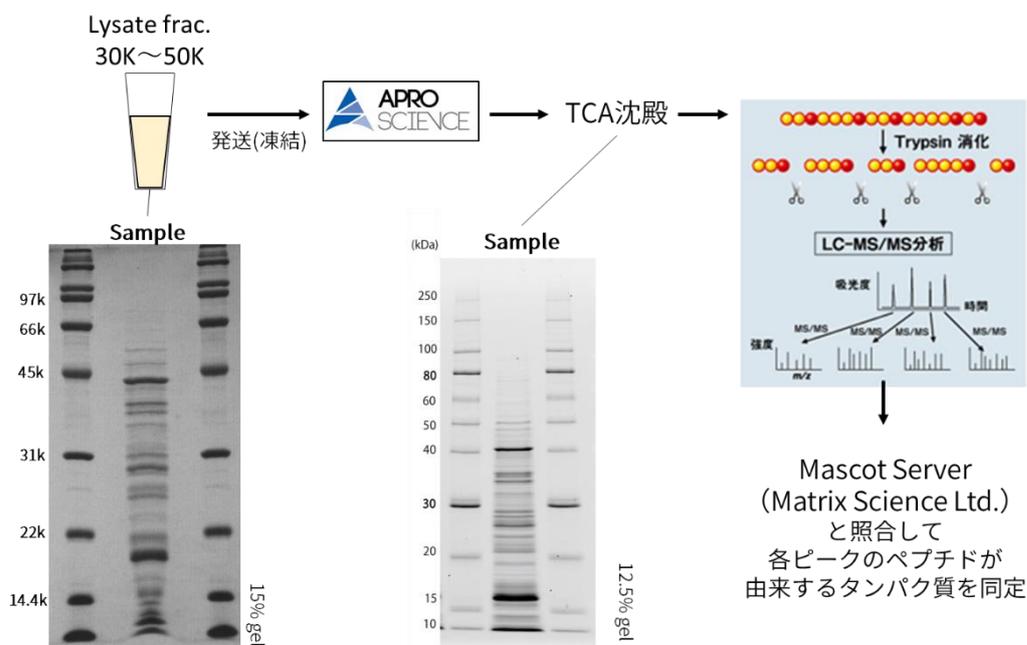


Figure 23 Shotgun proteomics による lysate 画分中のタンパク質の同定  
サンプル調製時、TCA 沈殿後の lysate 画分の SDS-PAGE 像を併せて示す。

この 883 種類のタンパク質群のうち、GTPase の  $k_{hy}$  増大に寄与する可能性のある分子を調査した結果、既存の RASGAP ファミリーについてはペプチド配列が検出されておらず、883 種類のタンパク質群中に含まれていなかった一方で、RAS と異なる低分子量 GTPase RAB に作用する RAB GAP の一種である TBC1D13 のペプチド配列が検出されており (Figure 24)、この分子が 883 種類のタンパク質群に含まれていることがわかった。この TBC1D13 については、RAB35 の  $k_{hy}$  を上昇させる機能を有することが調べられている<sup>36</sup>。一方で一部の RABGAP については RAB 以外の GTPase に対しても作用するという二重特異性を持ち、例えば、RABGAP の一種である TBC1D10C (Carabin) について、RAS 野生型に対しても  $k_{hy}$  増大効果 (GAP 活性) を有するということが報告されている (Figure 25)<sup>37</sup>。そのためこの TBC1D13 についても二重特異性を持ち、RAS 変異体に対して GAP としての活性を有する可能性に着目した。

Sequence Coverage	Protein	Accession	Category	Bio Sample	MS/MS Sa.	Prob	%Spec	#Pep	#Unique	#Spec	%Cov
100%	TBC1 domain family member 13 O...	Q9NVG8	HeLa S3 30k-50k Lysate	HeLa S3 30k...		92%	0.0060%	1	1	1	3.0%

Protein Sequence	Similar Proteins	Spectrum	Spectrum/Model Error	Fragmentation Table
<b>Q9NVG8 (92%), 46,555.5 Da</b> <b>TBC1 domain family member 13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TBC1D13 PE=1 SV=3</b> <b>1 exclusive unique peptides, 1 exclusive unique spectra, 1 total spectra, 12/400 amino acids (3% coverage)</b>				
M S S L H K S R I A   D F Q D V L K E P S   I A L E K L R E L S   F S G I P C E G G L   R C L C W K I L L N Y L P L E R A S W T   S I L A K Q R E L Y   A Q F L R E M I I Q   P G I A K A N M G V   S R E D V T F E D H P L N P N P D S R W   N T Y F K D N E V L   L Q I D K D V R R L   C P D I S F F Q R A   T D Y P C L L I L D P Q N E F E T L R K   R V E Q T T L K S Q   T V A R N R S G V T   N M S S P H K N S V   P S S L N E Y E V L P N G C E A H W E V   V E R I L F I Y A K   L N P G I A Y V Q G   M N E I V G P L Y Y   T F A T D P N S E W K E H A E A D T F F   C F T N L M A E I R   D N F I K <b>S L D D S</b> <b>Q C G I T Y K</b> M E K   V Y S T L K D K D V E L Y L K L Q E Q N   I K P Q F F A F R W   L T L L S Q E F L   L P D V I R I W D S   L F A D D N R F D F L L L V C C A M L M   L I R E Q L L E G D   F T V N M R L L Q D   Y P I T D V C Q I L   Q K A K E L Q D S K				

Figure 24 LC-MS/MS により検出された TBC1D13 の配列

TBC1D13 の全長配列中から LC-MS/MS により検出した配列を黄色でハイライト表示した。サンプルの還元時にカルバミドメチル化されたシステインは緑色で表示した。

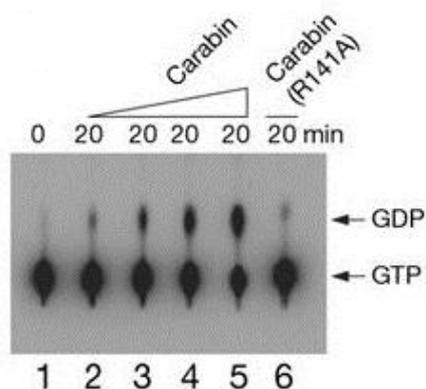


Figure 25 TBC1D10C (Carabin)による RAS 野生型の GTPase 活性促進<sup>37</sup>

RAS: 10 nM に対して TBC1D10C (Carabin): 0nM (lane 2) , 10nM(lane 3), 20nM(lane 4) 50nM(lane 5,6)添加 し、thin-layer chromatography によりヌクレオチドを分離した。 lane 6 で添加した R141A は不活性変異体を使用した。

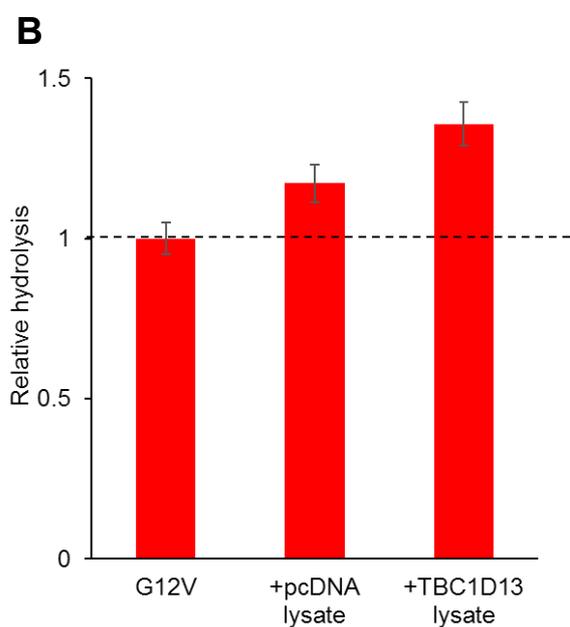
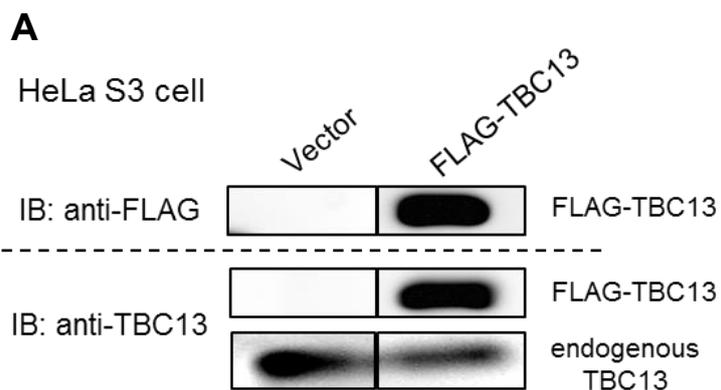
(参考文献<sup>37</sup>Figure 3B を引用)

### 3-3-5. 一過性発現 lysate を用いた TBC1D13 の HeLa S3 内在性発現の確認、および RAS に対する GAP 活性の解析

RAS 変異体に対して GAP としての活性を有する分子の候補である TBC1D13 が HeLaS3 細胞において内在性で発現していることを確認し、また TBC1D13 を一過性発現した lysate を RAS 変異体に添加した際に  $k_{hy}$  の上昇が観測されるかどうか調べた。

まず、N 末端に FLAG-tag を融合した全長の TBC1D13 を発現するベクターを HeLa S3 細胞に導入し、TBC1D13 の細胞内発現について TBC1D13 特異的抗体 (Atlas Antibodies)、および抗 FLAG-tag 抗体 (SIGMA) を用いた Western blot によって検出を行った。FLAG タグの検出の結果、発現ベクターを導入した細胞において FLAG-tag が付加された TBC1D13 の理論分子量に対応するバンドが検出されたことから、ベクター導入による細胞内での一過性発現が示された (Figure 26A)。また、TBC1D13 特異的抗体を用いた検出では、FLAG-tag 抗体と同じ位置に検出されるバンドの他に、より低分子量側にバンドが一つ検出され、またこのバンドは backbone ベクター (pcDNA) のみを導入した細胞でも検出されたことから、TBC1D13 が HeLa S3 細胞において内在性発現されていることが確認された (Figure 26A)。

次にこの TBC1D13 の一過性発現が確認された lysate について、backbone ベクター (pcDNA) を Transfection した lysate をコントロールにして RAS/G12V に対する  $k_{hy}$  促進効果を調べた (Figure 26)。測定の結果、backbone ベクターを Transfection した lysate 中の RAS/G12V の  $k_{hy}$  は lysate 非添加のコントロールに比べて 1.17 倍であった一方、TBC1D13 発現細胞の lysate 中では 1.36 倍に上昇した。TBC1D13 の一過性発現により RAS/G12V に対する  $k_{hy}$  促進効果が増大したことから、TBC1D13 が RAS 変異体に対して GAP 活性を有することが示唆された (Figure 26B)。



**Figure 26 一過性発現 lysate を用いた TBC1D13 の HeLa S3 内在性発現の確認、および RAS に対する GAP 活性の解析**

(A) HeLa S3 細胞における TBC1D13 (TBC13) の内在性発現および一過性発現の確認。(上側) 抗 FLAG 抗体による一過性発現 FLAG-TBC1D13 の検出。(下側) TBC1D13 特異的抗体による内在性 TBC1D13 と一過性発現 FLAG-TBC1D13 の同時検出。(B) backbone ベクター (pcDNA) 導入細胞、および TBC1D13 一過性発現細胞 lysate を添加した際の RAS/G12V の  $k_{hy}$  の測定。非添加状態の RAS/G12V の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。

### 3-3-6. リコンビナント調製した TBC1D13 の RAS に対する GAP 活性の解析

TBC1D13 が RAS に対して GAP 活性を有するかどうかをより詳細に調べるため、TBC1D13 のリコンビナントタンパク質の調製を行った。先行研究<sup>36</sup>に従い、N 末端 His-tag 融合の TBC1D13 を LB 培地中で非標識誘導培養を行い、菌体の Ni<sup>2+</sup> アフィニティー精製を行った。TBC1D13 は可溶性画分によく発現し、78 mg/L culture の収量を得た。また精製した TBC1D13 はほぼモノマーとして存在することを SEC により確認した (Figure 27AB)。

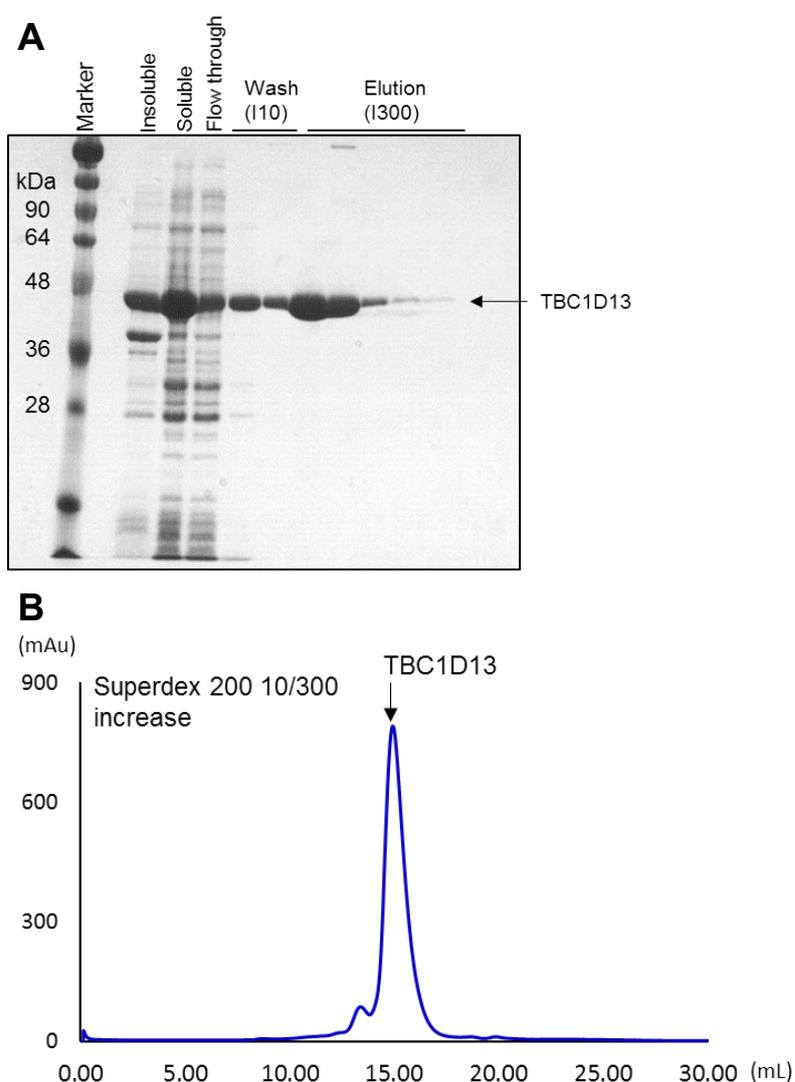
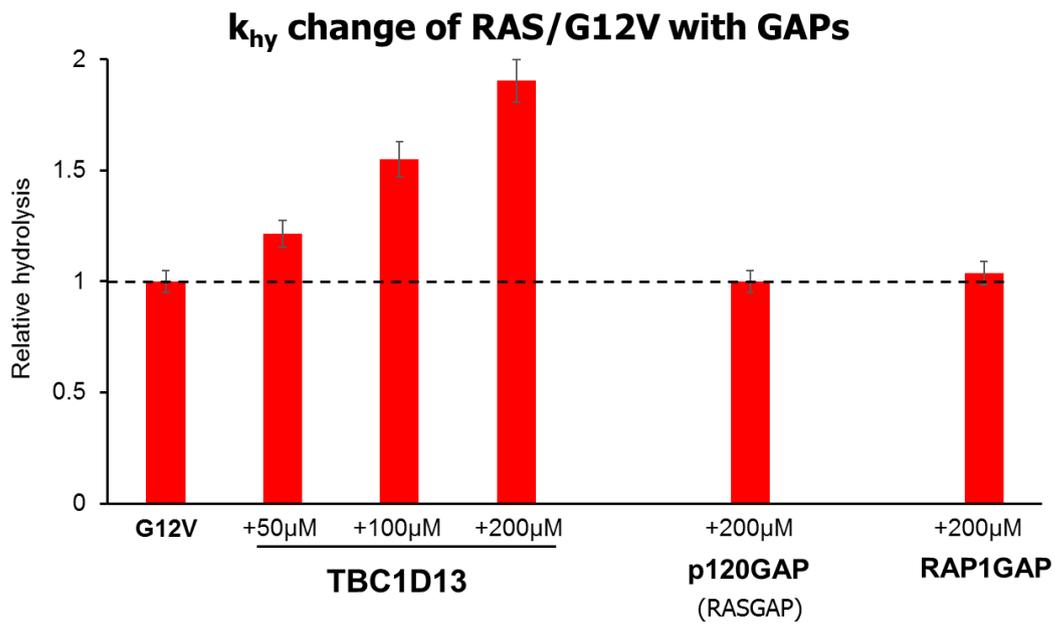


Figure 27 大腸菌発現系による TBC1D13 の調製

(A) Ni<sup>2+</sup>アフィニティー精製後の SDS-PAGE 像。(B) サイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロフィール(280nm 吸光)。

次に精製した TBC1D13 を RAS/G12V に対して以下のように濃度条件を割り振って添加して、GTP 加水分解速度を測定した。さらに、添加する GAP の比較対象として TBC1D13 と同様に大腸菌発現系で調製した RAS 本来の GAP である p120GAP (RASA1) の GAP ドメイン(残基番号 715-1047)、および低分子量 GTPase である RAP1 に対する GAP であり、RASGAP や RABGAP などと異なり活性残基としてアルギニンのかわりにアスパラギンを有することが知られている RAP1GAP の GAP ドメイン(残基番号 75-415)を添加した際の  $k_{hy}$  変化も測定して、比較を行った (Figure 28)。

測定の結果、p120GAP や RAP1GAP を添加した際には RAS/G12V の  $k_{hy}$  は非添加の状態に比べて変化せず、これらの GAP は RAS/G12V に対しては活性を有さないことが確認された。一方で、TBC1D13 を添加した際の  $k_{hy}$  は添加する TBC1D13 濃度依存的に増大し、200  $\mu$ M 添加時に、非添加の状態の 2 倍程度まで増大した。この結果から、TBC1D13 は RASGAP などのその他の GAP と異なり *in vitro* においても RAS/G12V に対して  $k_{hy}$  促進活性を有することが明らかになった。



**Figure 28** リコンビナント調製した TBC1D13 の RAS に対する GAP 活性の解析

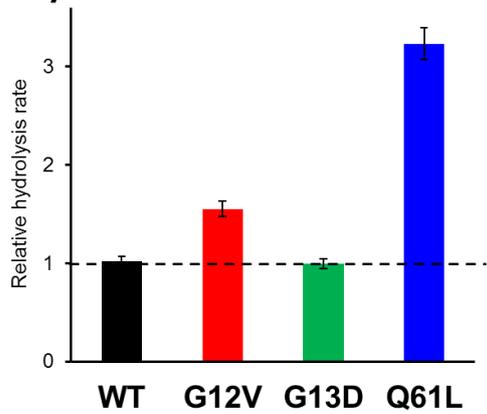
各濃度の TBC1D13、および p120GAP, RAP1GAP を添加した際の RAS/G12V の  $k_{hy}$  を測定した。RAS/G12V 濃度は 100  $\mu$ M とした。非添加状態の RAS/G12V の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。

3-2 の in-cell NMR の結果では RAS/G12V だけでなく、RAS/Q61L についても細胞内における  $k_{hy}$  の増大が観測されていることから、TBC1D13 が野生型を含めた G12V 以外の他の RAS 変異体に対しても GAP 活性を有するかどうか解析を行った (Figure 29)。

野生型および各発がん性変異体に TBC1D13 を添加して  $k_{hy}$  を測定した結果、RAS/Q61L の  $k_{hy}$  は非添加状態に比べて 3.2 倍増大した。これは同量の TBC1D13 を RAS/G12V に加えた際の増加比に比べて大きかった (Figure 29)。一方で、野生型 RAS および RAS/G13D に対して TBC1D13 を添加しても非添加の状態から  $k_{hy}$  の増大は観測されなかった (Figure 29)。したがって、TBC1D13 の GAP 活性が RAS の変異体に対して選択性を有することが示唆された。

3-2-2 の in-cell NMR 観測結果においても、RAS/Q61L は RAS/G12V よりも *in vitro* 比で高い  $k_{hy}$  上昇を示した一方 (Figure 17)、RAS/G13D の *in vitro* に比べた細胞内での fGTP の低下率は RAS/G12V や RAS/Q61L 変異体より小さかった (Figure 16)。このように、in-cell NMR 測定結果と TBC1D13 の GAP 活性についての RAS 変異体の選択性の間に相関が見られたことから、細胞内在性の TBC1D13 や同様の機構をもつ RABGAP が細胞内での RAS 変異体の  $k_{hy}$  上昇に寄与していると考えた。

### $k_{hy}$ change (+100 $\mu$ M TBC1D13)



**Figure 29 TBC1D13 の GAP 活性の RAS 変異体選択性**

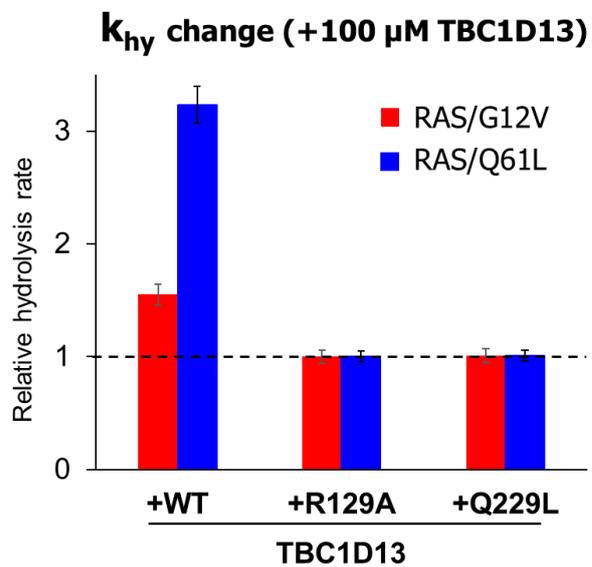
100  $\mu$ M TBC1D13 添加時の野生型および変異体 RAS の  $k_{hy}$ 。それぞれの非添加状態の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。

### 3-3-7. RABGAP と RAS の相互作用機構

TBC1D13 を含む RABGAP は本来のターゲットである RAB に対してファミリー内でよく保存されている Arg finger (I/VxxDxxR モチーフ)とともに Gln finger (YxQ モチーフ)の 2つの活性残基によって加水分解中間体を安定化することが知られている<sup>38</sup>。

TBC1D13 の RAS 変異体に対する活性化機構が RAB に対する機構と類似するかどうかを明らかにするため、TBC1D13 の活性残基と予想される I/VxxDxxR モチーフ中の R129, および YxQ モチーフ中の Q229 をそれぞれ変異した R129A および Q229L 変異体について RAS/G12V, RAS/Q61L それぞれに対する GAP 活性を解析した (Figure 30)。

RAS/G12V, RAS/Q61L に対して TBC1D13/R129A, TBC1D13/Q229L 変異体をそれぞれ添加して  $k_{hy}$  を測定した結果、TBC1D13/R129A, TBC1D13/Q229L 変異体のいずれを添加した場合も RAS/G12V, RAS/Q61L の  $k_{hy}$  は非添加状態と一致した(Figure 30)。このように、R129, Q229 のいずれの残基が変異しても GAP 活性が喪失したことから、これらの残基が RAB と同様に RAS 変異体に対しても活性残基として作用することが明らかになり、RAS:TBC1D13 間の作用が先行研究<sup>38</sup>で解かれた RAB:RABGAP 複合体構造から明らかになっている加水分解促進機構と類似した作用機序をもつことが示唆された。



**Figure 30 TBC1D13 の活性残基変異体の GAP 活性解析**

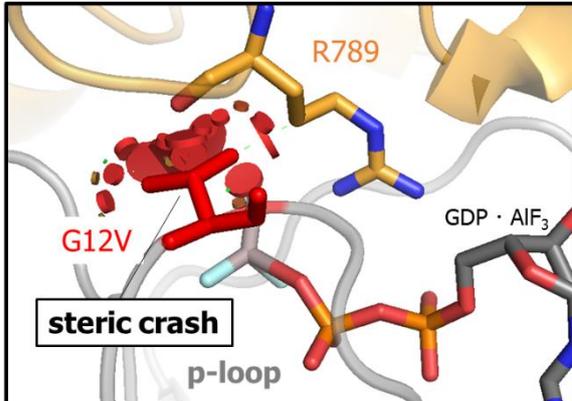
TBC1D13、および活性残基変異体 (R129A, Q229L)を添加した際の RAS/G12V, RAS/Q61L の  $k_{hy}$  の測定。RAS 濃度は 100  $\mu$ M で測定した。それぞれ非添加状態の  $k_{hy}$  を 1 として規格化した。

RABGAPファミリーである TBC1D20 と RAB1B の複合体構造<sup>38</sup>と、RAS と p120GAP の複合体構造<sup>29</sup>を比較すると、p120GAP の活性アルギニン残基 (Figure 31A 左, R789) は RAS の結合ヌクレオチドに対して p-loop 側 (Figure 31A 左手前)から挿入されており、p-loop 上の G12 に対するバリン残基などの嵩高い残基への変異により Arg finger との立体障害が引き起こされることがわかっている (Figure 31A 左)。一方で、TBC1D20:RAB1B 複合体構造において、TBC1D20 の Arg finger (Figure 31A 右, R105)は RAS の Switch I 領域にあたる方向 (Figure 31A 右奥)から挿入されており、p-loop 上の G12V 変異は TBC1D20 のアルギニン残基に対して立体障害を持たないことが示唆される (Figure 31A 右)。この配向の違いにより RABGAP は立体障害を回避し、RAS/G12V 変異体に対して GAP として相互作用できると考えた。さらに、RAS の Q61 のようなグルタミン残基は GTP の加水分解中間体を安定化するのに必要であることが知られている (Figure 31B 左)<sup>5</sup>。RABGAP では RASGAP と異なり、アルギニンの他にグルタミンを活性残基として有しており (Figure 31B 右, Q144)、RAB のグルタミン残基の代わりにヌクレオチドと水素結合する (Figure 31B 右)<sup>38</sup>。そのため、RABGAP は RAS/Q61L 変異体のようにグルタミンによる水素結合能力が失われた変異体に対しても GAP として相互作用できると考えた。

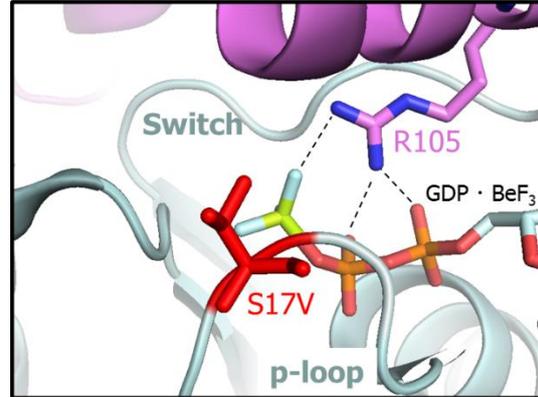
TBC1D13 による GAP 活性は RAS/G12V, RAS/Q61L 変異体のみ観測された (Figure 29)。この結果から残基の変異により、水和水を介した GTP 加水分解中間体の形成能が大きく失われている RAS/G12V, RAS/Q61L 変異体に対しては TBC1D13 が Arg, Gln finger により水和水を提供することである程度 GTP 加水分解能を回復させるのに対し、野生型や変異が  $k_{hy}$  に対して大きく影響しない RAS/G13D については RAS 単体で GTP 加水分解中間体を形成できるため、TBC1D13 が結合しても GTP 加水分解速度の上昇を引き起こさないと考えた。

A

**RAS:p120GAP(RASGAP)**

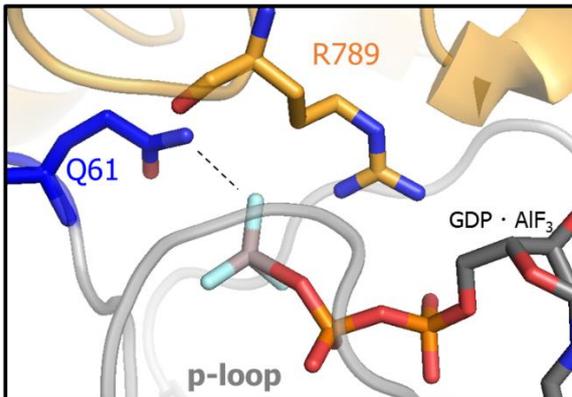


**RAB1B:TBC1D20(RABGAP)**

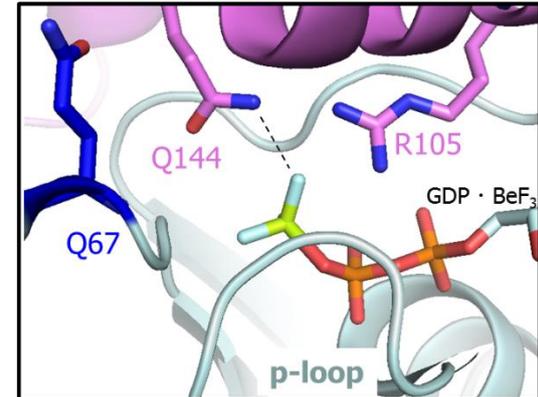


B

**RAS:p120GAP(RASGAP)**



**RAB1B:TBC1D20(RABGAP)**



**Figure 31 RAS:RASGAP 複合体と RAB:RABGAP 複合体の構造の比較**

(A) GTPase に対する p120GAP (左) および TBC1D20 (右) の Arg finger 挿入位置の比較。RAS において、G12V 変異によって Arg finger と生じる立体障害を赤色円に表示した (左)。また、RAB1B において同様の p-loop 領域の変異 (S17V) による立体障害は生じなかった (右)。(B) RAS:RASGAP 複合体中における Q61 の位置 (左) と RAB に対する TBC1D20 の Gln finger の挿入位置 (右)。

(PDB ID RAS:p120GAP(1WQ1)<sup>29</sup> RAB1B:TBC1D20(4HLQ)<sup>38</sup>)

## 第4章 総括と今後の展望

本研究では、in-cell NMR 法により、活性型である GTP 結合型 RAS の存在割合, fGTP を細胞内の生理的環境下においてリアルタイムに観測する系を確立し、さらにその経時変化から fGTP を決定する RAS の活性速度定数である GTP 加水分解反応速度  $k_{hy}$  と GDP-GTP 交換速度  $k_{ex}$  を評価した (Figure 32)。この結果を *in vitro* で計測した値と比較したところ、RAS 野生型、およびその発がん性変異体である RAS/G12V, RAS/G13D, RAS/Q61L 変異体について、いずれも定常状態における fGTP は細胞内環境下では *in vitro* よりも低下していることが明らかとなった (Figure 32)。また、細胞内では *in vitro* と比べて RAS の  $k_{hy}$  が上昇している一方で、 $k_{ex}$  については低下していることがわかり、この活性の変化により定常状態における fGTP が低下していることが明らかとなった (Figure 32)。このような細胞内での  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  の変調の原因について探索を行った結果、細胞内分子混雑環境の特に粘性に伴った分子拡散速度の低下により RAS の  $k_{ex}$  が低下していること、および TBC1D13 のような RABGAP が RASGAP と異なり RAS の変異体に対しても加水分解促進効果を有することを明らかにした (Figure 32)。

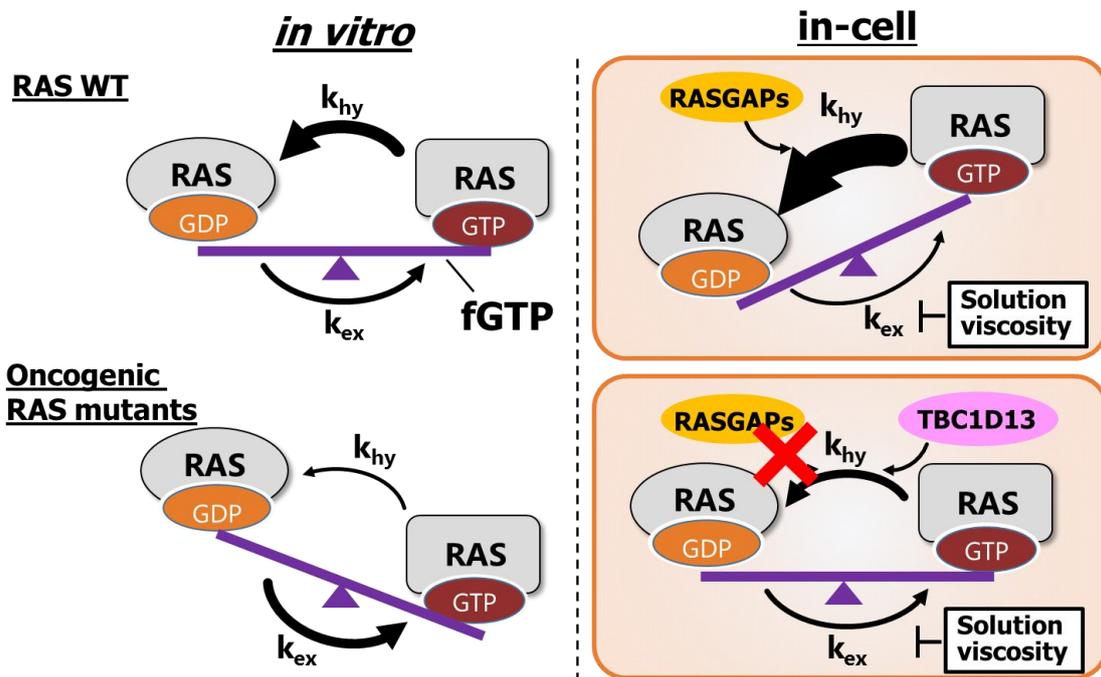


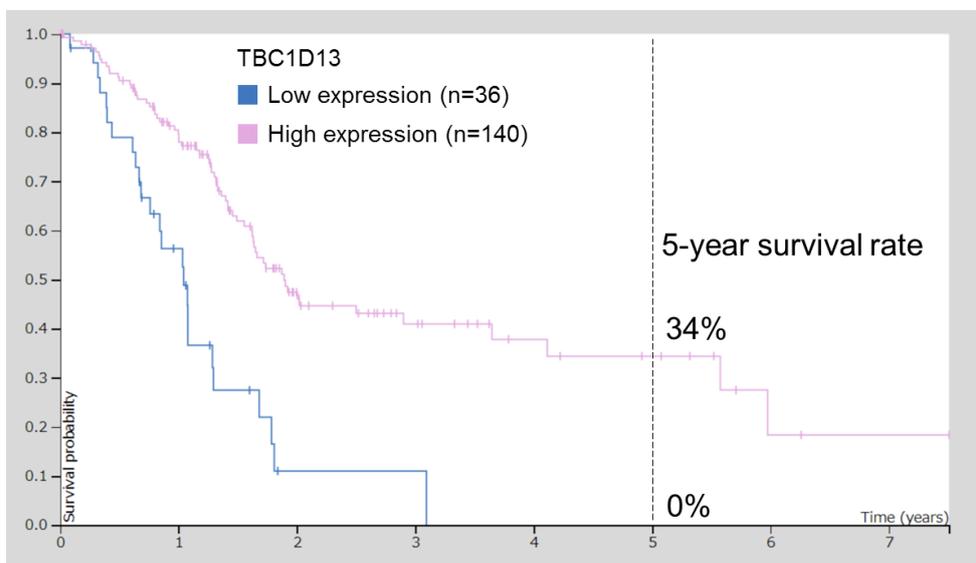
Figure 32 本研究で解明した RAS の活性 ( $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$ ) の細胞内変調

細胞内の RAS は  $k_{hy}$  の増大と  $k_{ex}$  の低下により *in vitro* に比べて活性型の GTP 結合型の割合 (fGTP) が低く保たれている。  $k_{ex}$  の低下に対しては高い溶液粘性による分子拡散速度の低下が寄与しており、また TBC1D13 のような RABGAP が本来の RASGAP と異なり RAS の変異体に対しても  $k_{hy}$  の増大をもたらすことを明らかにした。

本研究では C 末端の HVR を除いた G-domain のみの RAS を解析対象としていたが、1-2 で述べたように HVR を持つ全長の RAS は HVR の CAAX モチーフに対して Farnesyl 化などの翻訳後修飾を受けることが知られている。これらの翻訳後修飾は RAS の細胞膜への局在とそれに伴う刺激依存的なシグナル伝達に必要である一方で、本研究で in-cell NMR 観測を行った細胞質中に存在する RAS G-domain の fGTP については、野生型 RAS が細胞内ではほとんど不活性型として観測されたように、細胞外刺激が存在しない状態である基底状態における細胞内の fGTP を反映していると考えられる。RAS の変異による発がんは細胞外刺激に関わらず増殖シグナルが異常活性化することにより引き起こされることから、基底状態の fGTP の計測は RAS の発がんメカニズムの解明やその阻害薬の開発に有用である。近年、RAS を標的とした創薬の期待が高まっており、RAS と特異的に結合することで活性化を阻害する化合物が多数報告されている<sup>39,40</sup>。今後、このような RAS の活性化を阻害する化合物をスクリーニングし細胞内における薬効を正確に評価する上で、本研究で確立した細胞内環境下での RAS の活性状態を評価する手法の活用が期待される。さらに、今後 HVR を有した全長の RAS を対象に in-cell NMR 観測による fGTP の定量法を確立することで、刺激依存的な RAS の活性化のリアルタイム観測についても達成されることが期待される。また、脂質二重膜を模倣したナノディスクを用いた先行研究によって細胞膜に局在した RAS は一定のコンフォメーションで G-domain と細胞膜との相互作用<sup>27</sup>や RAS 同士の二量体化<sup>41</sup>が起きることが報告されている。そのため全長 RAS の in-cell NMR 観測により、細胞膜上での相互作用についてその構造情報が取得できることも期待できる。

また、本研究で RABGAP の一種である TBC1D13 が RAS の発がん性変異体に対して GTP 加水分解促進活性を有することを明らかにした。これまでに知られている TBC1D13 の機能としては、ヒト脂肪細胞において RAB35 の活性化を抑制し、インシュリン依存的な GLUT4 の細胞膜への輸送を阻害することが報告されているが<sup>36</sup>、その他の機能についての解析は行われていない。そこで、がん患者の mRNA 発現量を網羅的に解析したデータベース The Human Protein Atlas<sup>42</sup> に登録されている TBC1D13 の発現量とがん患者の生存率の情報を解析した結果、膵臓がん患者において TBC1D13 の高発現群は 5 年生存率が 34%であるのに対して、低発現群は 5 年生存率が 0%であった (Figure 33)。膵臓がんは 90%以上が G12D, G12V を中心とした RAS の変異を保有することが知られており<sup>4</sup>、そのため TBC1D13 が生体内で発がん性変異した RAS に対して GAP としてその活性度を低下させ、がんの悪化を抑制する機能を有する可能性が示唆される。

本研究で行った *in vitro* 解析において TBC1D13 を RAS/G12V の 2 倍量添加した際の  $k_{hy}$  上昇は 2 倍程度であり、*in-cell* NMR 測定中の細胞内の RAS 濃度 (< 50  $\mu$ M 程度) を考慮すると細胞内在性の TBC1D13 のみでは *in-cell* NMR 測定で観察される RAS 変異体の高い  $k_{hy}$  上昇率を説明できないと考えられる。そのため類似の機構を有する RABGAP で TBC1D13 よりもさらに RAS に対する GAP 活性が高いものが存在する可能性も示唆される。今後 RABGAP と発がん性 RAS 変異体の相互作用メカニズムをより詳細に解析することで、変異した RAS を選択的かつ直接不活性化するような新規のがん治療薬開発につながることを期待できる。



**Figure 33 膵臓がん患者における TBC1D13 の発現量に依存した 5 年生存率の比較**

The Human Protein Atlas<sup>42</sup> 中の TBC1D13 の mRNA 発現量と膵臓がん患者の生存率の情報を解析。

## 参考文献

1. Wennerberg, K., Rossman, K. L. & Der, C. J. The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 843–846 (2005).
2. Milburn, M. V. *et al.* Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939–945 (1990).
3. Simanshu, D. K., Nissley, D. V. & McCormick, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **170**, 17–33 (2017).
4. Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res.* **72**, 2457–2467 (2012).
5. Pai, E. F. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351–2359 (1990).
6. Hobbs, G. A., Der, C. J. & Rossman, K. L. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J. Cell Sci.* **129**, 1287–1292 (2016).
7. Ahearn, I. M., Haigis, K., Bar-Sagi, D. & Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 39–51 (2012).
8. Gorfe, A. A., Grant, B. J. & McCammon, J. A. Mapping the nucleotide and isoform dependent structural and dynamical features of Ras proteins. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **16**, 885–896 (2008).
9. Marshall, C. B. *et al.* Probing the GTPase cycle with real-time NMR: GAP and GEF activities in cell extracts. *Methods* **57**, 473–485 (2012).
10. Smith, M. J., Neel, B. G. & Ikura, M. NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4574–4579 (2013).
11. Young, A., Lou, D. & McCormick, F. Oncogenic and Wild-type Ras Play Divergent Roles in the Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Cancer Discov.* **3**, 112–123 (2013).
12. Bollag, G. & McCormick, F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. *Nature* **351**, 576–579 (1991).
13. Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**, 337–343 (1998).
14. Taylor, S. J., Resnick, R. J. & Shalloway, D. Nonradioactive determination of Ras-GTP levels using activated ras interaction assay. in *Methods in Enzymology* vol. 333 333–342 (Academic Press, 2001).
15. Luchinat, E. & Banci, L. In-cell NMR: a topical review. *IUCrJ* **4**, 108–118 (2017).

16. Serber, Z. *et al.* High-Resolution Macromolecular NMR Spectroscopy Inside Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2446–2447 (2001).
17. Sakakibara, D. *et al.* Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. *Nature* **458**, 102–105 (2009).
18. Selenko, P. *et al.* In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 321–329 (2008).
19. Inomata, K. *et al.* High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **458**, 106–109 (2009).
20. Theillet, F.-X. *et al.* Structural disorder of monomeric  $\alpha$ -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* **530**, 45–50 (2016).
21. Kubo, S. *et al.* A Gel-Encapsulated Bioreactor System for NMR Studies of Protein–Protein Interactions in Living Mammalian Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 1208–1211 (2013).
22. Mochizuki, A. *et al.* Balanced Regulation of Redox Status of Intracellular Thioredoxin Revealed by in-Cell NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 3784–3790 (2018).
23. Zhao, Q. *et al.* Real-Time In-Cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-Bound Levels of RAS. *Cell Rep.* **32**, 108074 (2020).
24. Ogino, S. *et al.* Observation of NMR Signals from Proteins Introduced into Living Mammalian Cells by Reversible Membrane Permeabilization Using a Pore-Forming Toxin, Streptolysin O. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10834–10835 (2009).
25. Schanda, P., Kupče, Ě. & Brutscher, B. SOFAST-HMQC Experiments for Recording Two-dimensional Deteronuclear Correlation Spectra of Proteins within a Few Seconds. *J. Biomol. NMR* **33**, 199–211 (2005).
26. Tugarinov, V., Hwang, P. M., Ollerenshaw, J. E. & Kay, L. E. Cross-Correlated Relaxation Enhanced  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Methyl Groups in Very High Molecular Weight Proteins and Protein Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 10420–10428 (2003).
27. Mazhab-Jafari, M. T. *et al.* Oncogenic and RASopathy-associated K-RAS mutations relieve membrane-dependent occlusion of the effector-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 6625–6630 (2015).
28. Small, E. & Addinall, S. G. Dynamic FtsZ polymerization is sensitive to the GTP to GDP ratio and can be maintained at steady state using a GTP-regeneration system. *Microbiology*, **149**, 2235–2242 (2003).

29. Scheffzek, K. *et al.* The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* **277**, 333–339 (1997).
30. Cherfils, J. & Zeghouf, M. Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* **93**, 269–309 (2013).
31. Ellis, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 597–604 (2001).
32. Pocker, Y. & Janjic, N. Enzyme kinetics in solvents of increased viscosity. Dynamics aspects of carbonic anhydrase catalysis. *Biochemistry* **26**, 2597–2606 (1987).
33. Klockow, B., Ahmadian, M. R., Block, C. & Wittinghofer, A. Oncogenic insertional mutations in the P-loop of Ras are overactive in MAP kinase signaling. *Oncogene* **19**, 5367–5376 (2000).
34. Yu, I. *et al.* Biomolecular interactions modulate macromolecular structure and dynamics in atomistic model of a bacterial cytoplasm. *eLife* **5**, e19274 (2016).
35. Scheffzek, K. & Shivalingaiah, G. Ras-Specific GTPase-Activating Proteins—Structures, Mechanisms, and Interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, a031500 (2019).
36. Davey, J. R. *et al.* TBC1D13 is a RAB35 Specific GAP that Plays an Important Role in GLUT4 Trafficking in Adipocytes. *Traffic* **13**, 1429–1441 (2012).
37. Pan, F. *et al.* Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin. *Nature* **445**, 433–436 (2007).
38. Gavriljuk, K. *et al.* Catalytic mechanism of a mammalian Rab-RabGAP complex in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 21348–21353 (2012).
39. Janes, M. R. *et al.* Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* **172**, 578-589.e17 (2018).
40. Canon, J. *et al.* The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* **575**, 217–223 (2019).
41. Lee, K.-Y. *et al.* Two Distinct Structures of Membrane-Associated Homodimers of GTP- and GDP-Bound KRAS4B Revealed by Paramagnetic Relaxation Enhancement. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 11037–11045 (2020).
42. Uhlen, M. *et al.* A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **357**, (2017).

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、本研究課題を行う貴重な機会とそのため最高の環境を与えて下さり、また、数多く大変貴重で的確な御指導、御助言、および励ましの御言葉を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 嶋田一夫 前教授 (現 国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター チームリーダー)に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、常に正しい方向を示し続けて下さり、研究活動の様々な面で密接な御指導を直接賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 西田紀貴 前准教授 (現 千葉大学大学院 薬学系研究院 薬品物理化学研究室 教授)に深く感謝致します。

本研究に関して、セミナーなどを通じて多くの御助言を下さり、本研究がより良い内容となるように御支援いただきました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 上田卓見 准教授、幸福裕 助教に深く感謝致します。

本研究の実施にあたり、私の直属の先輩として細胞内に導入した RAS の in-cell NMR 観測における様々な実験手法の基礎を築いていただいた東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 藤宮 瑠勇 修士に深く感謝いたします。

さらに研究に対して適切なお助言やご意見を頂けるだけでなく、研究生生活を送る上で様々な形でお世話になりました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室の皆様 に深く感謝致します。

最後に、これまでの27年間の長い間にわたって私を温かく見守り、支援して下さった家族に心より感謝いたします。