

## 論文の内容の要旨

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

**【背景】** 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

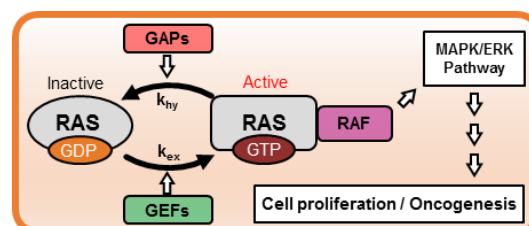
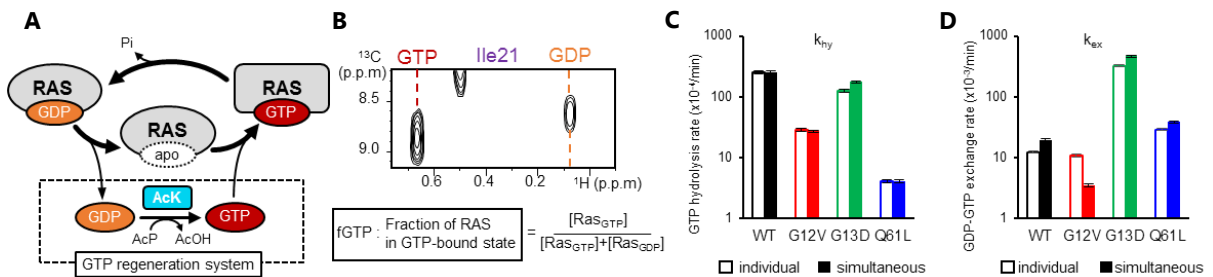


Figure 1 RAS の活性状態と細胞内活性制御機構の模式図

などが制御される (Figure 1)。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 は膵臓がん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 (fraction of RAS in GTP-bound state: fGTP) 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 fGTP 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、これら *in vitro* における  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  からは上流からの刺激依存的に活性化するという RAS の分子スイッチとしての機能を説明できない。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 (Figure 1)。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 in-cell NMR 法を用いて細胞内 RAS の fGTP 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。さらに、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。

## 【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 加水分解反応または GDP-GTP 交換反応から  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を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おり、細胞中においてこれら 2 つの反応を個別に観測することはできない。そこでこの条件下で  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  を同時に算出する方法を確立するため、Ile  $\delta 1$  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 RAS/G12V, RAS/G13D, RAS/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 (Figure 2A)。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 (Figure 2B)、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。その結果、本手法により算出した  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  はこれまで個別に算出された値と概ね一致した。よってこの手法により細胞内においても 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 (Figure 2CD)。



## ② in-cell NMR 法による細胞内 RAS 活性型割合の観測

次に in-cell NMR 法による生細胞中の RAS の fGTP の観測を行った。同位体標識 RAS をポア形成タンパク質 SLO 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 (Figure 3A)。取得したスペクトルから各時間における細胞内の 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、RAS/G12V, RAS/G13D, RAS/Q61L はそれぞれ 21%, 80%, 50% 程度の fGTP で定常状態に達していた。この値を①で算出した *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 (Figure 3B)。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 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 in-cell NMR 実験において fGTP の経時変化が観測された RAS/G12V と RAS/Q61L 変異体について①の同時算出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 fGTP は *in vitro* よりも低く保たれていることが示された (Figure 3CD)。

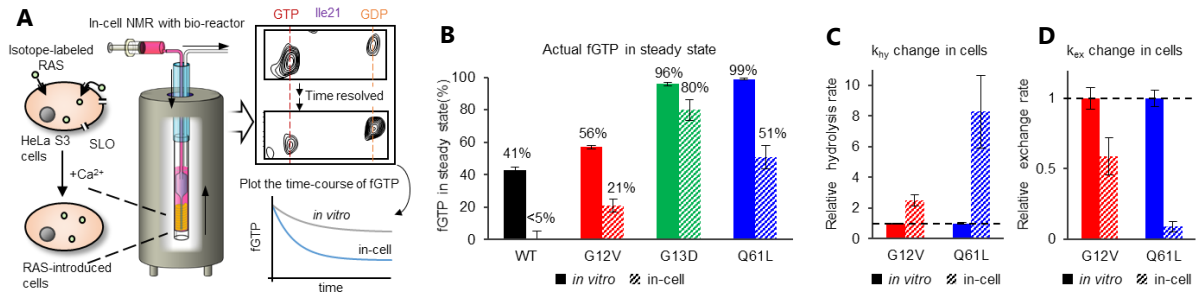


Figure 3 (A) in-cell NMR 法による細胞内 RAS の fGTP の直接観測法の概略図 (B) *in vitro* および細胞中での定常状態の RAS の fGTP の比較 (C,D) *in vitro* と in-cell 間における発がん性 RAS 変異体の加水分解速度(C)および交換速度(D)の比較

### ③ crowder reagent を用いて再構成した分子混雑環境が RAS の $k_{hy}$ , $k_{ex}$ に与える影響の解析

このような細胞中での RAS の  $k_{hy}$  の上昇と  $k_{ex}$  の低下について、特に野生型 RAS の  $k_{hy}$  上昇に対して RASGAP による寄与が考えられるものの RAS/G12V や RAS/Q61L などの発がん性 RAS 変異体は RASGAP による加水分解促進効果を受けないことが知られており、これらの変異体の in-cell NMR 測定において観測された  $k_{hy}$  の上昇を RASGAP の存在のみでは説明することはできない。また、RAS の  $k_{ex}$  を制御する因子として GEF は  $k_{ex}$  の増大にのみ関与しており、 $k_{ex}$  を低下させる細胞内因子はこれまで知られていない。

そこで RAS の新規の活性制御機構を解明するため、RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  に影響を与える要素として細胞内特有の分子混雑環境に着目し、この環境で生じる体積排除効果や粘性の増大などを様々な crowder reagent を用いて再構成した。その結果、野生型 RAS および発がん性変異体の  $k_{ex}$  について glycerol 添加時の高粘性条件下で顕著な低下が観測されたことから、 $k_{ex}$  の低下に対して細胞内の高粘性環境が寄与していることが明らかになった (Figure 4AB)。高粘性環境下では分子拡散速度が低下により RAS から解離した GDP の再結合が誘起される。この GDP の再結合が遊離の 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 4CD)。

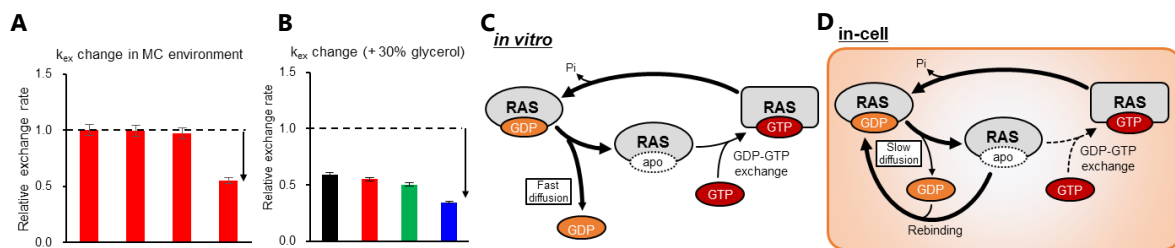


Figure 4 (A) crowder reagent の添加による RAS/G12V の  $k_{ex}$  の変化 (B) glycerol 添加条件下での野生型 RAS および変異体の  $k_{ex}$  低下 (C,D) *in vitro* での GDP-GTP 交換(C)に対して細胞内の高粘性環境下では分子拡散速度の低下により GDP の再結合が促進されることで RAS の  $k_{ex}$  低下が生じる

### ④ 発がん性変異体 RAS の GTP 加水分解反応を促進させる細胞内因子の探索

crowder reagent によって再構成した分子混雑環境下では発がん性 RAS 変異体の  $k_{hy}$  上昇は観測されなかった一方で HeLa S3 細胞の破碎液上清を RAS/G12V に添加したところ  $k_{hy}$  が増大し、加水分解反応の促進が観測された。そこで加水分解促進効果を示す細胞内成分の分子量を見積もるために、細胞破碎液上清から限外ろ過膜を用いて調製した各分子量画分の加水分解促進効果を調べた結果、加水分解促進因子が分子量 30K~50K のタンパク質成分であることが判明した (Figure 5A)。さらに、この

30K~50K の分子量画分についてプロテオーム解析を行った結果、RAS とは異なる GTPase, RAB35 に対する RABGAP である TBC1D13 を含む 883 種類のタンパク質群を同定した。一部の RABGAP については野生型 RAS に対しても活性を有するという二重特異性を持つことが報告されていることから、TBC1D13 について発がん性 RAS 変異体に対して加水分解促進効果を与える可能性を検証した。リコンビナント TBC1D13 の RAS/G12V に対する加水分解促進活性を解析した結果、本来の RASGAP と異なり、RABGAP である TBC1D13 が RAS/G12V に対して一定の加水分解促進活性を有することが明らかになった (Figure 5B)。さらに、野生型や他の RAS 変異体に対する加水分解促進活性を解析したところ TBC1D13 は RAS/Q61L に対して RAS/G12V よりも高い加水分解促進活性を示した一方で、野生型 RAS および RAS/G13D に対しては加水分解促進活性を有さず、TBC1D13 の加水分解促進活性が RAS の変異体に対して選択性を有することが分かった (Figure 5C)。②の in-cell NMR 観測結果において、RAS/Q61L は RAS/G12V よりも *in vitro* 比で高い  $k_{hy}$  上昇を示しており、また *in vitro* に対する細胞中での RAS/G13D の fGTP 低下率は RAS/G12V, RAS/Q61L 変異体よりも小さかったことから、細胞中での  $k_{hy}$  の上昇に対して TBC1D13 および類似の機構を有する RABGAP の寄与が存在することが示唆された。

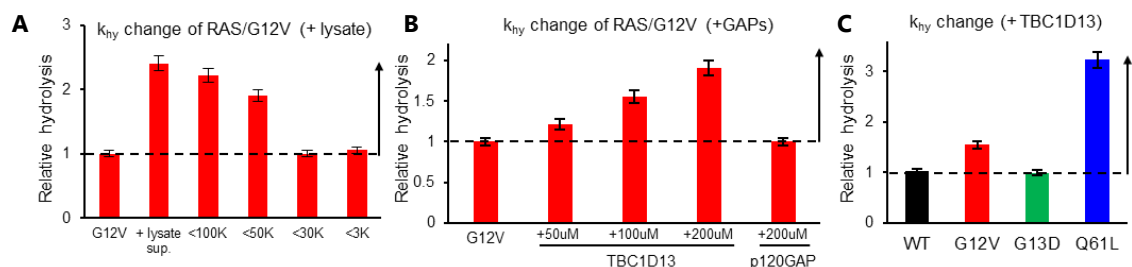


Figure 5 (A)細胞破碎液の分子量画分存在下での RAS/G12V の  $k_{hy}$  の変化 (B) TBC1D13 及び RASGAP (p120GAP) 添加による RAS/G12V の  $k_{hy}$  の変化 (C) 野生型 RAS および RAS 変異体間での TBC1D13 による  $k_{hy}$  促進効果の比較

**【総括】**本研究ではがんの主要な原因となる RAS について、活性型である GTP 結合型の割合を細胞内においてリアルタイムで直接観測することに成功し、また観測の結果から細胞特有の環境要因や既知の RASGAP 以外の GAP によっても RAS の  $k_{hy}$ ,  $k_{ex}$  が制御されていることを明らかにした (Figure 6)。本手法を用いることで、人工的に再現することが困難であった細胞内の環境におけるタンパク質の状態を直接評価できるため、RAS をはじめとした標的タンパク質に対する阻害剤の細胞内での有効性の評価に本手法が応用されることが期待される。また今後発がん性 RAS 変異体に対する GTP 加水分解促進因子 TBC1D13 や類似の RABGAP と RAS 変異体と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。

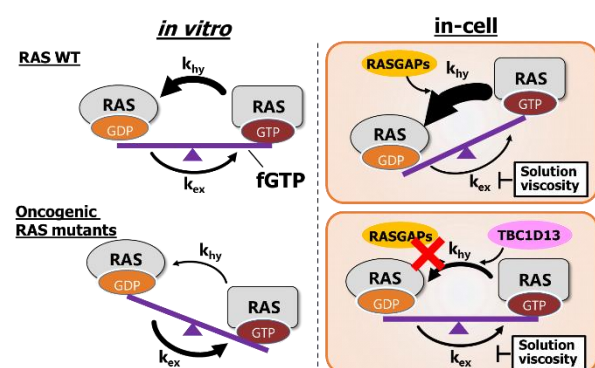


Figure 6 本研究で明らかにした RAS の細胞内活性制御機構

**【参考文献】** Zhao Q., Fujimiya R., Kubo S., Marshall C.B., Ikura M., Shimada I., Nishida N., Real-Time In-Cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-Bound Levels of RAS. *Cell Reports* 32(8):108074 (2020)