

審査の結果の要旨

氏名 趙慶慈

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、と題する本論文は、細胞内に導入した低分子量 GTPase RAS について、細胞内 NMR 観測法 (in-cell NMR 法) によって活性型である GTP 結合型の存在割合 (fGTP) を経時的に追跡し、細胞内における RAS の GTP 加水分解速度定数 (k_{hy}) と GDP-GTP 交換速度定数 (k_{ex}) を解析したものである。本論文は全 4 章から構成されており、第 1 章では序論、第 2 章では実験方法を記述している。第 3 章の 3-1 節では同位体標識 RAS を用いた k_{hy} 、 k_{ex} の解析系の確立について、3-2 節では in-cell NMR 法を用いた RAS の細胞内 fGTP や k_{hy} 、および k_{ex} の定量について、3-3 節では RAS の k_{hy} 、 k_{ex} に影響を与える細胞内因子の探索について記述している。第 4 章では全体の結論と今後の展望を述べている。

本論文の内容について、まず NMR を用いた RAS の k_{hy} 、 k_{ex} の解析系について、インロイシン (Ile) を選択的に ^1H - ^{13}C 標識した RAS を調製し、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、その経時変化から k_{hy} 、 k_{ex} を算出する方法を確立している。さらに、細胞内環境のようにサンプル中の GTP 濃度を維持する GTP 再生系を用いて k_{hy} 、 k_{ex} を同時算出する方法についても確立している。

続いて、in-cell NMR 法により取得した生細胞中の RAS の NMR スペクトルから各時間における細胞内の fGTP を算出して追跡することにより、野生型 RAS および代表的な RAS の発がん性変異体 (RAS/G12V, RAS/G13D, RAS/Q61L) について、いずれも細胞内では fGTP が *in vitro* での値に比べて顕著に低下していることが明らかにしている。また、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 について細胞内における k_{hy} および k_{ex} をそれぞれ算出することにより、いずれの変異体におい

でも細胞内では *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を明らかにしている。

さらに、細胞名における RAS の活性の変調は既知の細胞内因子による寄与では説明できないことから、本論文では RAS の k_{hy} 、 k_{ex} に影響を与える細胞内因子を探索している。まず細胞内の分子混雑環境、その中でも高粘性環境による分子拡散速度の低下が RAS の k_{ex} を低下させることを明らかにしている。次に、細胞の破砕液上清の添加が RAS の GTP 加水分解反応を促進させることを見出し、細胞破砕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ることにより、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を明らかにしている。さらに、分子量 30K~50K の分子量画分中に含まれるタンパク質群をプロテオーム解析により同定し、そのタンパク質群のうち TBC1D13 という因子について、RAS/G12V に対して一定の加水分解促進活性を有することを明らかにしている。加えて、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す一方で、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を明らかにしている。本論文中の *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タンパク質の寄与が存在することを提唱している。

がんの原因となるタンパク質 RAS について、本研究で明らかにした細胞内における RAS の活性の変調、およびそれに影響を与える細胞内因子は RAS の細胞内活性制御機構に重要な知見を与えるものであり、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ものである。さらに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は 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の活用が期待される。したがって、これらを行った学位申請者は、博士(薬科学)の学位を得るにふさわしいと判断した。