

発がん性タンパク質 RAS の活性を制御する新たな仕組みを発見 RAS の活性型割合が細胞内環境下で低下していることを in-cell NMR 法により観測

千葉大学大学院薬学研究院 西田紀貴 教授の研究グループは、独自に開発したバイオリアクター型の細胞内 NMR 観測法(in-cell NMR 法)¹⁾ を用いて、細胞内でがんの主要な原因となる RAS タンパク質の活性化の様子をリアルタイムで観測することに成功しました。また観測の結果から、細胞特有の環境要因により RAS の活性化が制御されることも明らかになりました。

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ようになるため、RAS をはじめとした標的タンパク質、またはそのシグナル経路上流のタンパク質に対する阻害剤の細胞内での有効性を評価するために、本手法が応用されることが期待されます。

本研究成果は 2020 年 8 月 26 日 (日本時間) に「Cell Reports」に掲載されました。

■ 研究の背景

RAS タンパク質は、体内で不活性 (GDP 結合) 型から活性 (GTP 結合) 型へ変換されることで細胞増殖などを制御する分子スイッチの役割を果たしています (図 1)。この RAS を恒常的に活性化させ細胞増殖を促進し続けてしまう遺伝子変異は、主要ながんの原因となっています。そのため、抗がん剤開発プロセスの一つとしても細胞内における RAS タンパク質の活性化割合とその制御機構を調べることは重要です。

一方で、従来の細胞生物学的な手法では細胞内にある RAS の活性型割合を正確に定量・評価することは容易ではありませんでした。

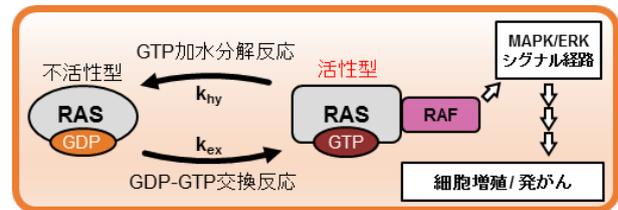


図 1: RAS のヌクレオチド結合サイクルと下流のシグナル伝達経路

■ 研究手法: 生細胞中における発がん性タンパク質 RAS の活性型割合リアルタイム観測

研究グループは、これまでに細胞を生きのまま NMR 装置内で長時間保持できるバイオリアクター装置を開発し、生細胞をリアルタイムで長時間観測できる in-cell NMR 法を確立しました。本研究ではこの手法を利用して、同位体標識をした野生型と複数の遺伝子変異型の RAS を細胞内に導入し、不活性型と活性型それぞれから発せられるシグナルの違いを観測することで、細胞内における活性型の割合をリアルタイムに計測することに成功しました (図 2)。その結果を試験管内 (*in vitro*) での計測結果と比較しました。さらに観測された活性型の割合の経時変化から RAS の活性化に関わる 2 つのパラメータ、「GTP 加水分解速度」と「GDP-GTP 交換速度」を算出しました。

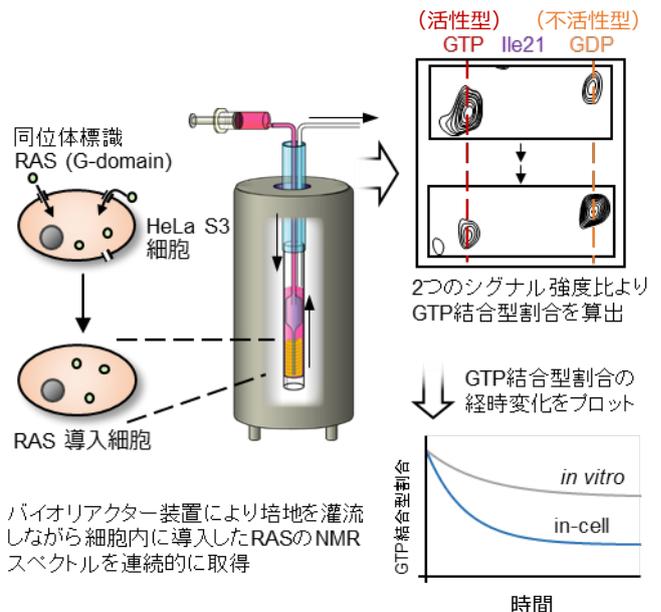


図 2: リアルタイム細胞内 NMR 観測法と本研究での実験の概要

■ 研究の成果

① 細胞内では活性型の割合が顕著に低いことが判明

算出された活性型 RAS の割合は、*in vitro* よりも今回の装置を用いて計測した結果 (*in-cell*) のほうが顕著に低いことが分かりました (図 3 (a))。また *in-cell* では、活性型 RAS を不活性化する GTP 加水分解速度が *in vitro* よりも高かった一方で、不活性化型から活性型へ変換する GDP-GTP 交換速度が *in vitro* よりも低いことが明らかになりました (図 3 (b)(c))。

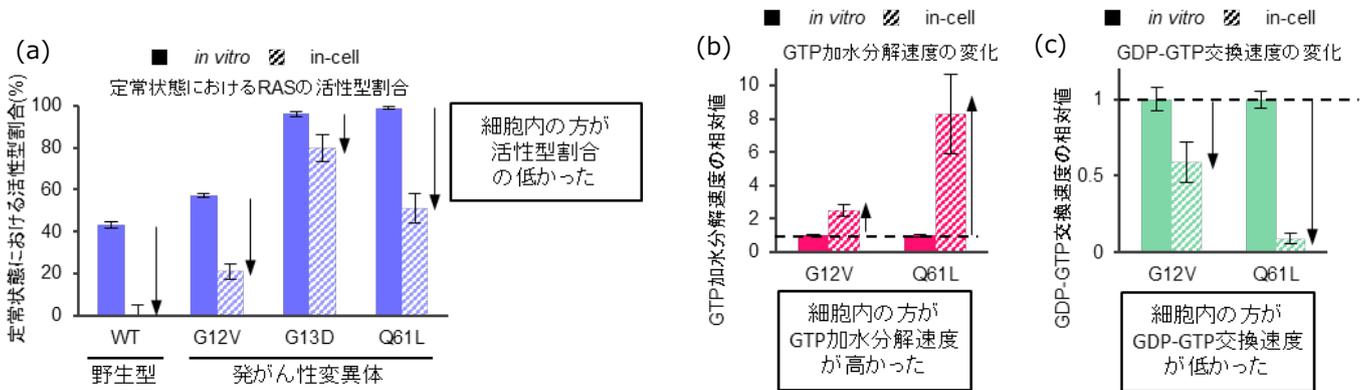


図 3 :

a) RAS 野生型 (WT) および発がん性変異体 (G12V, G13D, Q61L) 活性型割合を *in vitro* と *in-cell* で比較した結果。
b, c) *in vitro* と *in-cell* 間における発がん性変異体 (G12V, Q61L) の GTP 加水分解速度 (b) および GDP-GTP 交換速度 (c) の比較 (*in vitro* の値を基準)。

② 細胞内の環境が活性化を制御する要因を特定

さらに研究グループは、*in-cell* と *in vitro* での結果の違いが生じた要因を明らかにするために、細胞内の環境下で予測される様々な影響のうち、どの要因が活性型の割合低下に寄与しているのかを調べました。

その結果、高い溶液粘性が GDP-GTP 交換速度を低くすること (図 4(a))、および、特定の分子量 (30 ~ 50kDa) の細胞内在性タンパク質の働きが GTP 加水分解速度を上昇させること (図 4(b)) が明らかになりました。このタンパク質は、既に GTP 加水分解速度を上昇させるタンパク質群として知られているものとは分子量などの点で異なっており、GTP 加水分解速度を上昇させる未知のタンパク質が細胞内に存在することが示唆されました。

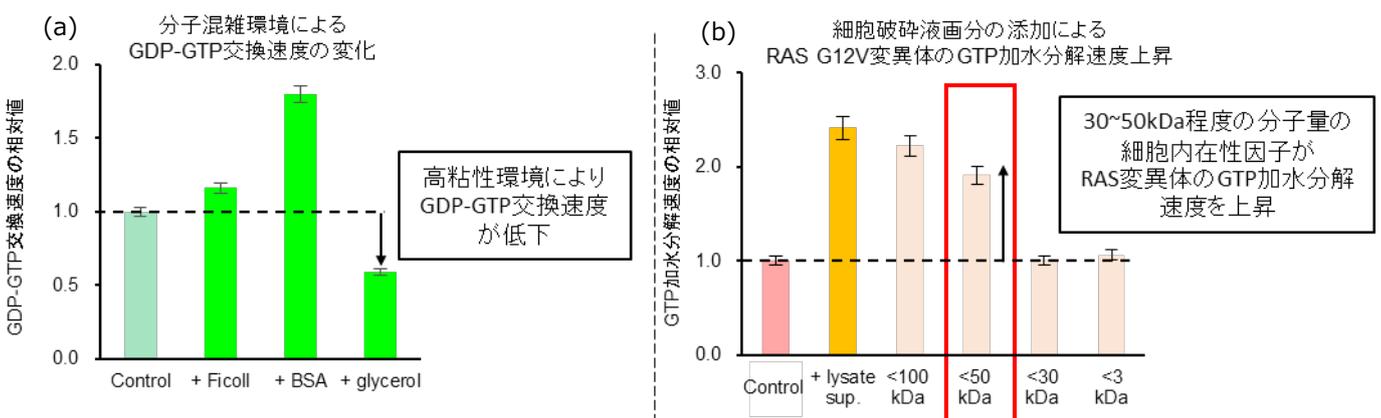


図 4 :

(a) 様々な分子混雑模倣環境下での RAS (野生型) の GDP-GTP 交換速度の変化。Ficoll : 体積排除効果、BSA (ウシ血清アルブミン) : 非特異的相互作用、glycerol : 溶液の粘性をそれぞれ再現。非添加時の値を基準。
(b) 細胞破砕液およびその分子量画分の添加による RAS (G12V 発がん性変異体) の GTP 加水分解速度の変化。非添加時の値を基準。

■ 今後の展望

本研究により、バイオリアクター型の in-cell NMR 法を用いることで、試験管中では再構成することが困難な、生体内により近づいた環境でのタンパク質の状態を直接評価できることが示されました。また、細胞内という環境下において、RAS の活性化が抑制されることとそのメカニズムも明らかにすることができました。今後、RAS をはじめとしたがんの原因となるタンパク質に対する阻害剤の有効性を、より実際に近い状態で評価する手法の一つとして、本手法が応用されることが期待されます。

■ 用語解説

1) バイオリアクター型 in-cell NMR 法 :

in-cell NMR 法は細胞内に観測対象の安定同位体標識タンパク質を導入することで、そのタンパク質が実際に機能する細胞内環境下における構造情報を抽出する手法である。研究グループでは、細胞を温度感受性のゲルに封入したうえで培地を灌流させるバイオリアクター型 in-cell NMR 法を開発した。これにより、細胞を生理的条件下に保持したまま長時間の in-cell NMR 観測を行うことが可能となった。

■ 論文情報

著者 : Qingci Zhao, Ryu Fujimiya, Satoshi Kubo, Christopher B. Marshall, Mitsuhiko Ikura, Ichio Shimada, Noritaka Nishida*

タイトル : Real-time In-cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-bound Levels of RAS

雑誌名 : Cell Reports

DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108074

■ 研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費助成事業 (JP17H06097、26119005、20H04693)、日本医療研究開発機構 (AMED) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業「中分子シミュレーション技術の開発」、2019 年度内藤記念科学財団研究助成の支援により遂行されました。

また本研究は 東京大学 嶋田一夫名誉教授 (現:理研 BDR チームリーダー)およびトロント大学伊倉光彦教授との共同研究です。

本件に関するお問い合わせ・取材のお問い合わせ
千葉大学大学院薬学研究院
西田 紀貴 (教授)
TEL: 043-226-2934 メール : nnishida@chiba-u.jp

