

## GTP 結合型低分子量 GTPase の細胞内局在の網羅的解析

●佐藤 孝哉 ◆上田 修司

神戸大学大学院医学系研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

近年、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析、メタボローム解析など、遺伝子発現の各段階や生体分子などを総体として扱う研究が盛んに進められている。しかし、「蛋白質の活性」のレベルでの網羅的解析は容易でなく、これまでにほとんど例がない。一方で、細胞内シグナル伝達系の多くの反応が蛋白質の活性により制御されていることを考慮すると、ある蛋白質ファミリーに属する全ての蛋白質の活性動態を網羅的に解析することは、シグナル伝達ネットワークを解析する上で重要であると考えられる。そこで本研究では、細胞内シグナル伝達系で機能している一群の低分子量 GTP 結合蛋白質 (GTPase) のうち、細胞の増殖、生存、分化、運動、接着、分裂など、多岐にわたる生命現象に関与している Ras ファミリーと Rho ファミリーを研究対象として、それらの活性動態の網羅的解析を目指している。具体的には、18 種類の Ras ファミリー GTPase および 20 種類の Rho ファミリー GTPase 全てについて、それぞれの活性型 (GTP 結合型) を *in situ* で可視化する方法を開発し、特異的な活性制御機構を網羅的に解析することを目的としている。さらに、種々の細胞系においてこれらの GTPase が構成するネットワークの調節機能を解明することも目指している。Ras ファミリーおよび Rho ファミリー GTPase は、細胞内の様々な部位に局在して、多様な生理機能を担っているが、同一の分子種であっても担っている機能ごとに異なる細胞内部位で異なる調節を受けていると予想される。従来の生化学的な解析法では、各 GTPase の細胞全体での活性化状態を定量的に測定することは可能であったが、細胞内部位特異的な活性化を検出することは不可能であった。このため、細胞内での局在や空間性を考慮した制御機構の解析は、現在でも非常に遅れている。本研究の特色は、単に生化学的に酵素活性を定量するのではなく、共焦点レーザー顕微鏡を駆使して、活性型分子の細胞内での局在を三次元的に可視化するという点である。すなわち、通常行われるプロテオミクス解析においては、主に蛋白質の種類と量を測定するのに対して、活性化状態を位置情報とともに網羅的に検出するという意味で、大変ユニークなアプローチであると考えられる。

低分子量 GTPase は、細胞内の様々な部位に局在するとともに、それらの活性は、特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) を介して調節されている。全ての GTPase は GTP を結合したコンフォメーションが活性型であるので、GTP 結合型 (活性型) には結合するが GDP 結合型 (不活性型) には結合しないポリペプチド (蛋白質ドメイン) との結合を測定することにより、活性型を検出することが可能である。本研究では、各 GTPase に特異的な標的蛋白質中の GTPase との結合に関与するドメインを測定用プローブとし、エピトープタグを利用して免疫蛍光染色法によりプローブを検出することで、GTP 結合型のみを *in situ* で可視化する実験系の確立を目指す。そのためには、18 種類の Ras ファミリー GTPase および 20 種類の Rho ファミリー GTPase について、可能な限り特異性の高いプローブポリペプチドを作製する必要がある。特異性の高い標的蛋白質が既に知られている GTPase については、その結合ドメインをプローブとして応用する。特異性の低い標的蛋白質しか知られていない GTPase については、結合ドメインへの変異導入などにより、結合特異性がより

高いプローブを作製する。これらについて、それぞれの GTPase との結合定数を計測することにより、プローブの特性を検討する必要がある。

はじめに、動物培養細胞系で、細胞外因子による刺激あるいは細胞周期の変動などに伴う各 GTPase の応答 (活性化) の網羅的な解析を進めていきたい。これと平行して、細胞内部位に特異的な活性調節に関わる GEF の同定を進めていく予定である。とくに Rho ファミリーに対する GEF は、Dbl ファミリーと DOCK ファミリーを合わせて約 80 種類知られているが、細胞内空間やシグナルに特異的な制御機構が明らかにされている例は少ない。そこで、各 GEF の異所性発現や siRNA を用いたノックダウンとその基質である GTPase の活性化部位の可視化法を組み合わせ、活性調節機構の解明を目指していく計画である。この際、従来行なわれてきたように、特定の分子にのみ着目してシグナルを解析するのではなく、あるファミリーに属する全分子の活性化状態を同一条件下で比較可能な解析を行いたい。

次に、この手法をマウスの初代培養細胞や組織切片に応用し、種々の遺伝子改変マウスを用いて、個体レベルでの表現型の解析と細胞レベルでの解析を結び付けることを目指している。また、ヒト癌病理切片などに応用し、例えば各種の癌においてどの低分子量 GTPase が活性化されているかを網羅的かつ定量的に解析することを計画している。一方、ELISA 法や蛍光強度の定量法を組み合わせることにより、この系を多種類の薬剤のハイスループットスクリーニング法に改変し、分子標的治療、分子標的創薬に応用できる技術に発展させることも目指している。

## ＜2007 年度の研究の当初計画＞

2006 年度までの研究を継続し、各種 GTPase に対して特異的なプローブの作製と検出感度、特異性の改善を計画している。また、組織切片への適用、ハイスループット検出系の確立も、今年度の課題である。これらと平行して、現在進めている種々のシグナル伝達系の解析に応用して、細胞内部位特異的な GTPase の活性化機構の解明を進めることを計画している。

組織切片での活性化部位検出に関しては、現在解析を進めている骨格筋でのインスリン刺激に応答した糖取込み誘導のシグナル伝達系に応用することを計画している。2006 年度までの筋芽細胞株を用いた解析から、ラッフル膜上での Rac1 の活性化が重要であることを見出しているが、これを分化誘導した筋管やマウスの骨格筋で実証することが重要である。準備状況としては、既に Rac1 特異的なプローブを作成し、培養細胞株では内在性 Rac1 の活性化の検出が成功していることから、今年度中にある程度条件設定が可能であると考えている。

## ＜2007 年度の成果＞

活性型 Ras を認識するプローブを開発し、大腸癌細胞、肺癌細胞などにおいて、内在性の Ha-Ras や Ki-Ras の活性化部位を可視化することに成功した。一方、複数の結合ドメインについて、それぞれ異なるタグをもつプローブを用意し、上記の Ras が活性化している癌細胞株において Rac1 の活性化部位の二重染色を行ない、同一細胞で二種類の GTPase の活性化部位を比較できることを示した。この手法を用いて、種々の系で GTPase 間のクロス

トークを解明することが可能となった。

2006年度までに確立した内在性 Rac1 の活性化部位の可視化技術を (1) 骨格筋細胞でのインスリン刺激に応答した糖取込み誘導のシグナル伝達系における Rac1 の機能解析、(2) Rac1 によるトランスフェリン受容体および上皮増殖因子受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシスの抑制機構の解析、に応用した。まず (1) に関しては、筋芽細胞株 L6 において、インスリン刺激に応答したホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ依存性の Rac1 の活性化は、細胞表面のラッフル膜上で起こり、これがインスリン応答性の糖取込みに重要であることを既に明らかにしてきた (論文投稿中)。今年度は、分化誘導した筋管において、同様の Rac1 の活性化部位の可視化法を応用し、筋管においてもインスリン依存的に細胞膜表面で Rac1 が活性化されることを示した (論文投稿中)。現在、マウス骨格筋における Rac1 の活性化部位の可視化条件の検討を進めており、エレクトロポレーション法で導入したプラスミドから発現した活性型変異体の検出には既に成功している。(2) に関しては、GEF の一種である Ost-III の作用によって核周辺領域で特異的に活性化される Rac1 が、クラスリン依存性受容体エンドサイトーシスの抑制に関与することを示した。(成果公表リスト中、論文 5)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

これまでに、動物培養細胞において内在性の Cdc42 や Rac1 の活性化領域を可視化する手法を確立することができた。これらの単一の GTPase に選択的に反応するプローブは他に例がなく、多種類の GTPase の網羅的解析を行なうにはこの特性は非常に重要である。また同様の手法による活性型 Ras の細胞内局在の同定に関しては、本年度我々が初めて成功した。FRET 法に比べて、遺伝子導入の必要がなく、多重染色が容易であることから、今後 Ras や Rac1 が深く関与している細胞癌化機構の研究に大きく貢献すると考えられ、特に多検体解析での有用性が期待される。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

多種類の Ras ファミリー、Rho ファミリー蛋白質それぞれに特異的なプローブを作製する作業は、進行中であるが、当初の見込みよりも時間を要している。また、生体組織への応用は、骨格筋や血管内皮細胞で検討中であるが、現在のところまだ完全なアクセス系は確立できていない。ハイスループット検出系の構築も現在進行中である。

#### <今後の課題>

これまでの研究に引き続き、各種 GTPase に対して特異的なプローブの作製と検出感度、特異性の向上をはかる。ハイスループット検出系に関しても今後さらに改良を加える必要がある。

遺伝子導入をせずに内在性 GTPase の活性化部位を可視化できることが本解析法の最大の利点であり、FRET 法をはじめとする他の手法では、マウス組織での解析は困難である。したがって、本解析法を種々の遺伝子改変マウスの初代培養細胞や組織切片に応用し、個体レベルでの解析に関係づけることが非常に重要であると考えている。

マウス組織での解析の一つとして、現在、マウス骨格筋における Rac1 の活性化部位の可視化条件の検討を進めており、今後、生体へのインスリン注射に反応した骨格筋の内在性 Rac1 の活性化の検出を目指す計画である。一方、今年度までに、Ras ファミリー GTPase である Rap1 に対する二種類の GEF (RA-GEF-1, 2) のノックアウトマウスを作製し、これらの GEF を介する細胞間接着の制御に関する研究を進めてきた (成果公表リスト中、論文 4 および論文 6)。その中で、RA-GEF-1 が胎生期の血管形成を制御している可能性が示された。そこで、2008 年度以降、血管内皮細胞での Rap1 の活性動態の解析を進めることを計画している。現在、胎生 7.5 日目のマウスから摘出した尿膜の培養系を確立しつつあり、この系で Rap1 の活性化領域の可視化を試みる予

定である。

一方、各種の癌において、どの低分子量 GTPase が活性化されているかを網羅的かつ定量的に解析する計画も進めている。Ras ファミリー、Rho ファミリー GTPase は、細胞癌化と悪性化の種々のステップに関与していることが知られているので、多様な組織由来の様々な悪性度を示す癌細胞において、どの GTPase がどの領域でどの程度活性化されているかを解析することが重要であり、今後解析を進めていきたい。

さらに、当解析法の応用として、薬剤のハイスループットスクリーニング系の開発も計画している。それを通じて、分子標的治療、分子標的創薬の手掛かりが得られる可能性がある。具体的な例としては、各種プローブを用いた可視化法に ELISA 法や蛍光強度の定量法を組み合わせ、多種類の薬剤の Ras ファミリーおよび Rho ファミリー GTPase の活性化状態への効果を網羅的にスクリーニングすることが可能である。

#### <成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディングス (査読付きのものに限る)

1. 0601282108  
Edamatsu, H., Satoh, T., Kataoka, T.: Ras and Rap1 activation of PLC  $\epsilon$  lipase activity. *Methods Enzymol.* 407, 99-107 (2006)
2. 0601282118  
Satoh, T., Edamatsu, H., Kataoka, T.: Phospholipase C  $\epsilon$  guanine nucleotide exchange factor activity and activation of Rap1. *Methods Enzymol.* 407, 281-290 (2006)
3. 0601282126  
Satoh, T.: The signaling network of Ras family and Rho family GTP-binding proteins in mammalian cells. in *Cellular Signaling and Apoptosis Research* (Alex R. Demasi, ed) Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA 221-246 (2007)
4. 0706121835  
Yoshikawa, Y., Satoh, T., Tamura, T., Wei, P., Bilasy, S. E., Edamatsu, H., Aiba, A., Katagiri, K., Kinashi, T., Nakao, K., Kataoka, T.: The M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 pathway mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  dependent regulation of integrin activation in splenocytes. *Mol. Biol. Cell* 18, 2949-2959 (2007)
5. 0706121926  
Ieguchi, K., Ueda, S., Kataoka, T., Satoh, T.: Role of the guanine nucleotide exchange factor Ost in negative regulation of receptor endocytosis by the small GTPase Rac1. *J. Biol. Chem.* 282, 23296-23305 (2007)
6. 0708241805  
Wei, P., Satoh, T., Edamatsu, H., Aiba, A., Setsu, T., Terashima, T., Kitazawa, S., Nakao, K., Yoshikawa, Y., Tamada, M., Kataoka, T.: Defective vascular morphogenesis and mid-gestation embryonic death in mice lacking RA-GEF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 106-112 (2007)
7. 0801111955  
Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J., Seino, S.: Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19333-19338 (2007)

2) データベース/ソフトウェア

該当なし

3) 特許など

該当なし

4) その他顕著なもの

該当なし