

活性型低分子量 GTPase の細胞内局在の網羅的定量解析技術の開発とその応用

●佐藤 孝哉 ◆上田 修司

神戸大学大学院医学研究科

<研究の目的と進め方>

細胞内情報伝達系においては、多数の蛋白質が複雑なネットワークを形成している。その制御機構を理解する一つの手法として、あるファミリーに属する蛋白質の活性動態を網羅的に解析することは非常に有用であると考えられる。しかし、蛋白質の活性動態に関しては、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなどの場合と異なり、網羅的な解析がほとんど行われていない。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 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比較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考えられる。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必要がある。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。

動物培養細胞系では、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多くはない。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、ヒト癌病理解片などに応用し、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。

<2008 年度の研究の当初計画>

2007 年度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予定である。定量化や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。一方、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、2008 年度には、インスリン刺激に応答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、昨年度までに、Ras ファミリー GTPase である Rap1 の 2 種類の調節因子 (RA-GEF-1、RA-GEF-2) のノックアウトマウスを作製した。それらの表現型の解析により、RA-GEF-1 が胎生期の血管形成を制御している可能性が示唆されたので、2008 年度には、マウス胎児から摘出した尿膜の血管内皮細胞での Rap1 の活性動態の解析を進めることを計画している。

<2008 年度の成果>

以前より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の解析を行ない、特に Rho ファミリー GTPase である Rac1 の重要性を検討してきた。今年度は、この系において Rac1 の下流で Ras ファミリー GTPase である RalA が重要な機能を担っている可能性を示唆する結果が得られたの

で、RalAの活性化部位の可視化を試みた。特異的標的分子 Sec5のRalA結合ドメインをもとにプローブを作成し、筋芽細胞株L6を分化誘導させた筋管において、遺伝子導入したRalA活性化型変異体が特異的に強く認識されることが確認できた。今後、このプローブを用いて、インスリン応答性のRalAの活性機構とくにRac1の関与などについて解析を進めていく予定である。

遺伝子操作マウスの組織での解析の一つとして、Rasファミリーに属するRap1の活性化部位の可視化に成功した(論文投稿中)。Rap1の調節因子であるRA-GEF-1の全身でのノックアウトマウスを作成したところ、胎生期における血管網形成の不全により、E9.5までに致死となることが明らかとなった。そこで今年度は、単離した尿膜の組織培養系でのRap1の活性化状態の検討を行った。E8.5の野生型およびRA-GEF-1ノックアウトマウスから尿膜を単離し、24時間培養して血管網の形成を観察したところ、RA-GEF-1ノックアウトマウスでは、野生型マウスで見られるような血管網の形成が著しく抑制されていることが明らかとなった。一方、E8.5においては、野生型マウスの尿膜の血管内皮細胞で実際にRA-GEF-1が発現していることが確認された。そこで組織培養前後の尿膜を固定した後、活性化型Rap1を可視化したところ、野生型ではE8.5で単離した直後でも24時間培養した後でも、血管内皮細胞でのRap1の活性化が観察されたのに対して、RA-GEF-1ノックアウトマウスでは、いずれの時期にもRap1は全く活性化されていなかった。Rap1に対する活性化因子は多数知られ、それぞれが細胞種特異的、発生段階特異的、シグナル特異的に機能していると考えられているが、本研究結果により、尿膜におけるE8.5からの血管網形成にはRA-GEF-1が主要な役割を果たしており、この時期のRap1の活性制御は他の制御因子では置き換えられないことが明らかとなった。

<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Rasファミリー(Ras, Rap1, RalAなど)およびRhoファミリー(RhoA, Cdc42, Rac1など)の活性化領域を可視化する手法を開発してきた。これらのGTPaseの内在性分子の活性化領域を選択的に検出する方法を確立することは、多種類のGTPaseの網羅的解析を行なう際に、非常に重要である。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などから、今後RasやRac1が深く関与している細胞癌化機構など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。

また本年度は、マウス尿膜において胎生期の血管新生が誘導される系に本解析法を応用して、Rap1の制御因子のうちRA-GEF-1が特異的に機能していることを示した。本研究手法を応用することで、マウス胎児組織でのGTPaseの活性化の可視化に初めて成功した一例であり、内在性分子の解析が可能である本研究法の有用性を示した研究成果といえる。

<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。生体組織への応用に関しては、当初計画のうち、尿膜の血管内皮細胞での検討は完了し、現在論文投稿中である。しかし、インスリン刺激に反応した骨格筋の内在性Rac1の活性化の検出については、現在のところまだ完全なアッセイ系は確立できていない。遺伝子導入法や免疫染色法などは確立されたので、まずは活性化型変異体を用いたコントロール実験にて、可視化法の条件検討を行なう必要がある。

一方、ハイスループット検出系の構築も現在検討中であるが、ELISA法で定量化した場合に、刺激に反応した活性化の割合が低く、阻害効果などを高感度に検出するのはまだ難しい。画像解析の場合は、非特異的な発光を人為的に除去した上で計測することができるが、ELISA法ではそれができないため、検出の時点での非特異的発光を低くすることが必要であると考えられる。

<今後の課題>

今年度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ことが重要である。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。今後はこの点を重要課題として研究を推進していきたい。また、多種類のGTPaseの活性化を同時に計測できることも本研究法の大きなメリットであるので、それを生かした研究を推進することも重要である。細胞癌化や我々が今年度見出した骨格筋でのインスリンシグナル伝達系でのRac1とRalAのクロストークのように、複数のGTPaseがネットワークやカスケードを形成している系の解析に重点的に取り組む計画である。

<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)

- 601282126
Sato, 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)
 - 0706121835
Yoshikawa, Y., Sato, 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- α -dependent regulation of integrin activation in splenocytes. *Mol. Biol. Cell* 18, 2949-2959 (2007)
 - 0706121926
Ieguchi, K., Ueda, S., Kataoka, T., Sato, 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)
 - 0708241805
Wei, P., Sato, 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)
 - 0801111955
Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Sato, 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)
 - 0805151922
Ueda, S., Kataoka, T., Sato, T.: Activation of the small GTPase Rac1 by a specific guanine nucleotide exchange factor suffices to induce glucose uptake into skeletal muscle cells. *Biol. Cell* 100, 645-657 (2008)
- 2) データベース/ソフトウェア
なし
- 3) 特許など
なし
- 4) その他顕著なもの
なし