

# 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<sup>1)</sup> ◆上田 修司<sup>2)</sup>

1) 神戸大学大学院医学研究科 2) 神戸大学大学院農学研究科

## <研究の目的と進め方>

近年、複雑な生命システムの制御機構を理解するために、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオームなどの遺伝子発現の各段階の総体を網羅的に解析する研究が盛んに進められている。さらに、メタボローム、フェノームと称される代謝系や表現型の網羅的解析も行なわれている。これらの手法は、細胞内シグナル伝達ネットワークの解明を目指す際にも非常に有効であると考えられている。しかし、ほとんどの細胞内シグナル伝達系は蛋白質の活性により制御されているので、そのネットワークを理解するためには、遺伝子発現情報を解明するだけでは不十分であり、蛋白質の活性化状態に関する情報を収集することが必須である。さらに、従来の生化学的解析から蛋白質の活性化状態に関する情報を得ることに加えて、それぞれの蛋白質が活性化されている細胞内部位を同定することが極めて重要である。しかし現在のところ、細胞内シグナル伝達ネットワークの制御機構に関して、「蛋白質の活性」レベルでの「三次元的な細胞内位置情報」を含む網羅的解析は、ほとんど例がない。そこで本研究では、細胞内シグナル伝達系で主要な役割を果たしている低分子量 GTP 結合蛋白質 (GTPase) を対象として、それらの細胞内での活性化動態を網羅的に解析することにより、種々の細胞の生命システムを制御するシグナルのネットワークを解き明かすことを目指している。

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 GTPase のうち、Ras ファミリーと Rho ファミリーを研究対象としている。これらの低分子量 GTPase は、いずれも、細胞内の種々の部位に局在して、細胞の増殖、生存、分化、運動、接着、分裂、小胞輸送などの多岐にわたる三次元的な細胞応答に関与している。したがって、局在部位ごとに厳密な制御を受けていることが予想され、その制御機構をシグナル伝達系ごとに解明することがとくに重要である。低分子量 GTPase は、それぞれ特異的な Guanin nucleotide exchange factors を介して調節されていることが知られており、多数の低分子量 GTPase と Guanin nucleotide exchange factors が複雑な情報ネットワークを形成している。Ras ファミリー蛋白質には 18 種類、Rho ファミリー蛋白質には 20 種類の分子種が知られているが、これら全てについて、細胞内での三次元情報を含む活性化状態を解析することが、本研究課題の第一の目標である。

低分子量 GTPase の細胞内活性化領域の可視化法としては、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) を利用した方法が広く用いられている。この方法には、生細胞における継時変化を測定できるという非常に大きな利点がある。しかし、YFP や CFP などの蛍光蛋白質を融合させたインディケータの発現ベクターを導入することが必須であり、内在性 GTPase の挙動を観察することは困難である。また、複数の GTPase の活性化状態を同時にモニターすることが難しいという欠点もある。これに対して、後に詳細に説明する我々の分子イメージング法は、内在性分子の活性化を観察するのに十分な検出感度が確保されているとともに、多重染色法により複数の GTPase の活性化状態を同時に計測することも可能

である。また、FRET 法に比べて手順がはるかに簡便である点からも、網羅的解析に適していると考えられる。そこで本研究では、内在性分子の活性化状態を解析できるという利点を生かして、生体組織におけるシグナル伝達分子の活性化動態の解析技術の開発と応用を第二の目標としている。

さらに、この分子イメージング法をハイスループットスクリーニング系へと発展させることを第三の目標としている。それにより、多種類の正常あるいは病態細胞の高速定量解析や多種類の薬剤候補化合物の細胞への作用の網羅的解析などが可能となる。このような研究手法は、癌や糖尿病をはじめとする多種多様ないわゆるシグナル伝達病に関して、それらの発症機構の解明、従来よりも格段に選択性の高い分子標的薬の開発、新規の診断法や治療法の開発などに役立つことが大いに期待される。

## <研究開始時の研究計画>

本研究で用いる低分子量 GTPase の活性化部位の可視化法は、活性型 GTPase と標的分子の特異的な蛋白質間相互作用を応用している。具体的には、標的蛋白質中の GTPase との結合に関与するドメイン (CRIB ドメインなど) を GTP 結合型 (活性型) には結合するが GDP 結合型 (不活性型) には結合しないプローブとして用いる。GTP 結合型に特異的に結合したプローブを免疫蛍光染色法により検出することで、GTP 結合型を *in situ* で可視化することが可能である。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた三次元画像解析により、核周辺や細胞膜などの各細胞内領域における活性化を立体的に再構成することも可能である。Rho ファミリー GTPase である Rac1 の例を図 1 に示した。

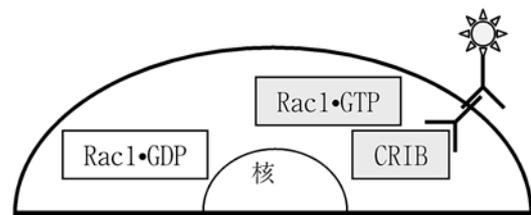


図1 活性型 (GTP 結合型) Rac1 の可視化法の原理。固定した細胞にエピトープタグをつけた CRIB ドメインを反応させる。CRIB ドメインは、GTP 結合型に選択的に結合する。GTP 結合型に結合した CRIB ドメインは、その後、特異抗体を用いた免疫蛍光染色法により可視化する。

まずは、種々の Ras ファミリー、Rho ファミリー分子種について、特異性の高いプローブを作製することを計画している。特異的な標的分子が知られている分子種に関しては、その標的分子の結合ドメインを利用して、特異的なプローブを作成する。一方、Ras ファミリーの場合、複数の GTPase が標的分子を共有する例が多いため、既知の標的分子の結合ドメインをそのままプローブに用いても特異性の確保が難しい。そこで、変異の導入により特

異性の高いプローブを人工的に作製する、標識性および非標識性の異なる特異性をもつ複数のプローブを組み合わせて作用させることで特異性を確保する、などの方法を検討する必要がある。

次に、検出方法の高性能化を計画している。FRET法に比較して、本研究の可視化法は、(1) 遺伝子導入を行わずに内在性のGTPaseの活性化状態を検出すること、(2) 容易に多重染色が可能であることが原理的に大きな利点であると考えられる。これらを実現するためには、分子数の少ない内在性GTPaseも検出可能にするようなプローブの高感度化と多種類のプローブと標識を同時に用いることができる系の構築が必須である。そこで、従来の蛍光標識に比べてより高性能の蛍光物質による標識、プローブの直接標識、種々の波長の蛍光標識の組み合わせなどに関して、条件検討を行なう。

さらに、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計画している。そのためには、組織ごとに独自の固定法や検出法を確立する必要がある。具体的には、比較的固定が容易で、培養細胞系の場合に近い条件での検出の可能性が期待できる血球細胞と肝細胞への応用を計画した。また、ヒト癌病理切片などに応用し、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、ハイスループットスクリーニング法の構築に関しては、マルチタイプレートを用いたELISA法や蛍光強度の定量法を組み合わせた系の確立を計画した。

## <研究期間の成果>

### (1) 活性型RasファミリーおよびRhoファミリーGTPaseを認識するプローブの作成と活性化部位の可視化法の開発

Rasファミリーに関しては、Raf-1、Ral-GDS、RAPL、Sec5などの標的分子のGTPase結合ドメインを利用して、H-Ras、K-Ras、N-Rasを強く検出するプローブ、Rap1、Rap2を強く検出するプローブ、RalAを強く検出するプローブなどを作成した。活性型Rasを認識するプローブを用いて、大腸癌細胞、肺癌細胞などにおいて、それぞれ内在性Ha-Ras、内在性Ki-Rasの活性化部位の可視化に成功した。

Rhoファミリーに関しては、PKN、Dia、POSH、ACK1、PAK1などの標的分子のGTPase結合ドメインを利用して、RhoAを特異的に認識するプローブ、Racを特異的に認識するプローブ、Cdc42を特異的に認識するプローブなどを作成した。とくにRac1とCdc42に関しては、動物培養細胞において内在性分子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(図2)。

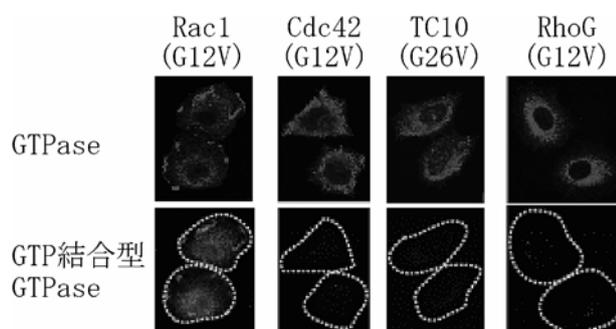


図2 Rac1の活性化部位の可視化。ヒトHeLa細胞に各種GTPaseの活性化変異体を発現させた。上段には、GTPaseの発現を示した。下段には、活性型(GTP結合型)Rac1の検出用プローブによる染色を示した。

### (2) 活性型RasファミリーGTPaseと活性型RhoファミリーGTPaseの多重染色

異なるタグを結合した活性型Rasを認識するプローブと活性型Rac1を認識するプローブを用意し、K-ras遺伝子の変異により癌化している細胞株(Panc-1膵臓癌細胞)において、Rasと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。これにより、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。

### (3) 骨格筋細胞でのインスリン依存性糖取り込みの制御におけるRhoファミリーGTPase Rac1の機能解析

ヒトにおいて骨格筋は全身の糖代謝の約75%を担っており、骨格筋におけるインスリン依存性糖取り込みの障害は、2型糖尿病の原因の一つと考えられている。したがって、骨格筋における糖取り込みのメカニズムの解明は、糖尿病克服のために非常に重要である。骨格筋におけるインスリン依存性の糖取り込みは糖輸送担体GLUT4を介している。通常は細胞質に存在するGLUT4小胞が、インスリンなどの外部からの刺激に反応して細胞膜へと移行し、細胞膜と融合した後にGLUT4が細胞膜表面に発現することにより、骨格筋細胞内への糖取り込みが誘導される。

我々は、筋芽細胞株L6を用いて、インスリンに反応したGLUT4の細胞膜移行におけるRhoファミリーGTPase Rac1の機能解析を進めてきた。まず、本研究で開発したRac1の活性化部位の可視化法を応用して、インスリン刺激に反応したRac1の活性化が起こる部位を解析した。その結果、分化誘導した筋管の細胞表面のラッフル膜上でRac1の活性化が起こることが明らかとなった。また、インスリン応答性のRac1の活性化は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ依存性であることも明らかとなった。さらに、(1) siRNAを用いてRac1をノックダウンした細胞では、インスリン応答性のGLUT4の細胞膜移行が抑制されること、(2) 恒常的活性型Rac1変異体を導入するとGLUT4の細胞膜移行が誘導されることが明らかとなり、Rac1は、インスリンに反応したGLUT4の細胞膜移行において重要な役割を果たしていると考えられた。

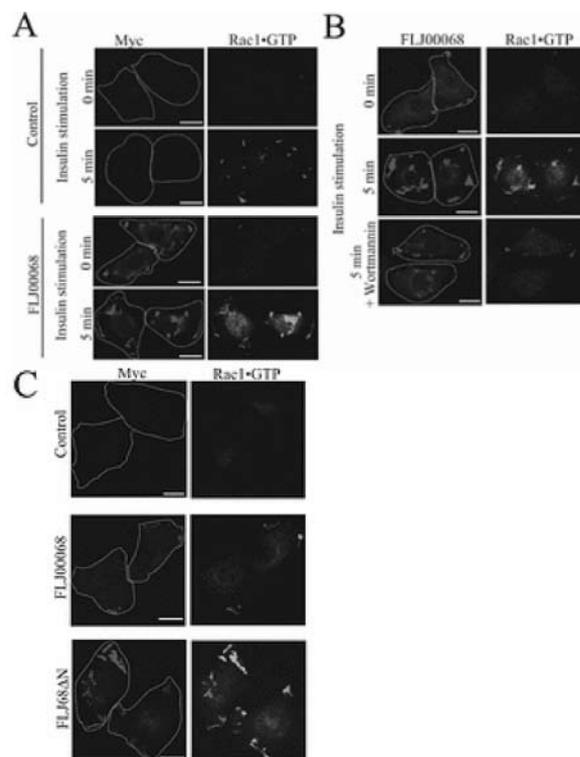


図3 筋芽細胞株L6におけるインスリン応答性のRac1の活性化を制御するグアニンヌクレオチド交換因子FLJ00068の同定。(A) Mycタグを付加したFLJ00068を過剰発現しているL6細胞とコントロールのL6細胞において、インスリン刺激(5分)に応答したRac1の活性化を可視化した。左側にMyc-FLJ00068の発現、右側に活性化型Rac1(Rac1-GTP)を示した。(B) Mycタグを付加したFLJ00068を過剰発現しているL6細胞におけるインスリン応答性のRac1活性化に対するホスファチジルイノシトール3-キナーゼ特異的阻害剤ワートマニンの効果を示した。(C) FLJ00068および恒常的活性化型FLJ00068変異体(FLJ68ΔN)を過剰発現しているL6細胞におけるRac1の活性化状態を可視化した。スケールバー; 20 μm (Ueda *et al.*, *Biol. Cell*, 100(11), 645-657 (2008)より引用)

一方、このシグナル伝達系においてRac1の活性化を制御しているグアニンヌクレオチド交換因子の同定を試みた。骨格筋で強く発現している種々のグアニンヌクレオチド交換因子をスクリーニングした結果、インスリン受容体の下流で、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ依存的にRac1の調節を担っているグアニンヌクレオチド交換因子として、FLJ00068を同定した(図3)。

#### (4) Rac1によるクラスリン依存性受容体エンドサイトーシスの負の調節機構の解析

ヒト子宮頸癌HeLa細胞に活性化型Rac1を発現させると、トランスフェリン受容体や上皮増殖因子受容体のエンドサイトーシスが抑制される。その分子機構と生理的役割の解明を目指して、エンドサイトーシス誘導時のRac1の細胞内領域特異的な活性化動態の解析とその制御因子の同定および活性制御機構の解析を進めた。その結果、グアニンヌクレオチド交換因子Ostのサブライスバリエーションの一種Ost-IIIが、細胞内膜系で選択的にRac1を活性化し、クラスリン依存性エンドサイトーシスを制御することを明らかにした(図4)。

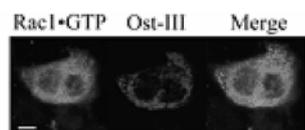


図4 Ost-IIIを異所性発現させたHeLa細胞におけるRac1の活性化の検出。左から順に、活性化型Rac1(Rac1-GTP)の局在とOst-IIIの発現を示した。スケールバー; 10 μm (Ieguchi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 282(32), 23296-23305 (2007)より引用)

#### (5) マウス胎児尿膜におけるグアニンヌクレオチド交換因子RA-GEF-1によるRap1の活性制御と血管網形成のメカニズムの解析

遺伝子操作マウスの組織での解析の一例として、RasファミリーGTPase Rap1の活性化部位の可視化に成功した。Rap1のGEF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、本研究で開発した可視化法を応用して、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なった。E8.5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、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。以上の結果より、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(図5)。

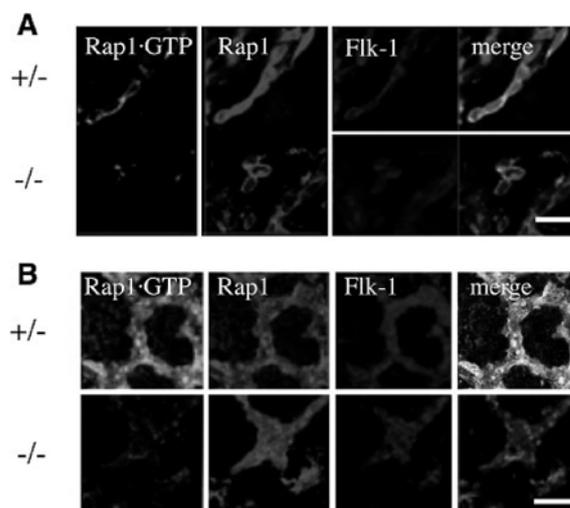


図5 マウス胎児尿膜の組織培養系におけるRap1の活性化の検出。胎生8.5日のRA-GEF-1ヘテロ(+/-)およびノックアウト(-/-)マウスから尿膜を単離し、*in vitro*で0時間(A)または24時間(B)培養した。左から順に、活性化型Rap1(Rap1-GTP)を特異的に認識するプローブ、抗Rap1抗体、抗FLK-1(血管内皮細胞マーカー)抗体を用いて免疫蛍光染色を行なった。スケールバー; 50 μm (Kanemura *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387(4), 754-759 (2009)より引用)

#### <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の内在水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、特に組織や切片への応用、多検体解析での優位性が期待される。実際に本解析法を応用して、マウス尿膜において胎生期の血管新生が誘導される際に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。この研究成果は、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、内在水分子の解析が可能である本研究法の有用性を示したものである。

#### <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。特異的な標的分子が存在しないGTPaseに関しては、特異性の低い結合ドメインへの変異導入を

経て特異的なプローブを作成することを計画したが、実際には期待したほどの成果には結びつかなかった。網羅的解析という観点からは、全てのGTPaseに対してそれぞれ特異的なプローブを揃えてシグナル伝達ネットワークの解析を行なうことが最終的な目標であったが、実際には、複数のGTPaseのシグナル伝達系間のクロストークを解析する手段は得られたが、全てのGTPaseを対象とするという当初の目標には至らなかった。

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、論文にて発表することができた。しかし、インスリン刺激にตอบสนอง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が確立できていない。骨格筋に関しては、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。胎児尿膜や骨格筋の他に、当初は血球系細胞や肝細胞での解析なども計画したが、まだ顕著な成果は得られていない。

一方、ハイスループット検出系の構築も現在進行中である。ELISA法により定量する系は確立することができたが、刺激にตอบสนองした活性化の程度が相対的に低く、阻害効果などを高感度に検出するのはまだ難しい。ELISA法では非特異的な発光を人為的に除去することなどができないため、検出の時点での非特異的な発光を低くする改良が必要であると考えられる。

#### <今後の課題、展望>

本研究に引き続き、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。細胞癌化や我々がこれまでに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のクロストークなどのように、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。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

##### 1) 論文

1.0908281441

Ono, R., Kumagai, H., Nakajima, H., Hishiya, A., Taki, T., Horikawa, K., Takatsu, K., Satoh, T., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T.: *Mixed-lineage-leukemia (MLL)* fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant *Hox* expression and Raf activation, *Leukemia*, in press (2009).

2. 0907242045

Kanemura, H., Satoh, T., Bilasy, S. E., Ueda, S., Hirashima, M. and Kataoka, T.: Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387(4), 754-759 (2009).

3. 0907242008

Aoki, T., Ueda, S., Kataoka, T. and Satoh, T.: Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10, *BMC Cell Biol.*, 10, 56 (2009).

4. 0903181915

Bilasy, S. E., Satoh, T., Ueda, S., Wei, P., Kanemura, H., Aiba, A., Terashima, T. and Kataoka, T.: Dorsal telencephalon-specific *RA-GEF-1* knockout mice develop heterotopic cortical mass and commissural fiber defect, *Eur. J. Neurosci.*, 29(10), 1994-2008 (2009).

5. 0805151922

Ueda, S., Kataoka, T. and Satoh, 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(11), 645-657 (2008).

6. 0801111955

Shibasaki, T., Takahashi, H., Miki, T., Sunaga, Y., Matsumura, K., Yamanaka, M., Zhang, C., Tamamoto, A., Satoh, T., Miyazaki, J. and Seino, S.: Essential role of Epac2/Rap1 signaling in regulation of insulin granule dynamics by cAMP, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(49), 19333-19338 (2007).

7. 0708241805

Wei, P., Satoh, T., Edamatsu, H., Aiba, A., Setsu, T., Terashima, T., Kitazawa, S., Nakao, K., Yoshikawa, Y., Tamada, M. and Kataoka, T.: Defective vascular morphogenesis and mid-gestation embryonic death in mice lacking RA-GEF-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363(1), 106-112 (2007).

8. 0706121926

Ieguchi, K., Ueda, S., Kataoka, T. and 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(32), 23296-23305 (2007).

9. 0706121835

Yoshikawa, Y., Satoh, T., Tamura, T., Wei, P., Bilasy, S. E., Edamatsu, H., Aiba, A., Katagiri, K., Kinashi, T., Nakao, K. and 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(8), 2949-2959 (2007).

10.0601282126

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).

11.0601282118

Satoh, T., Edamatsu, H. and Kataoka, T.: Phospholipase C  $\epsilon$  guanine nucleotide exchange factor activity and activation of Rap1, *Methods Enzymol.*, 407, 281-290 (2006).

12.0601282108

Edamatsu, H., Satoh, T. and Kataoka, T.: Ras and Rap1 activation of PLC  $\epsilon$  lipase activity, *Methods Enzymol.*, 407, 99-107 (2006).

13.0601282135

Satoh, T.: ACK1, *Nature The Alliance for Cellular Signaling-Nature Signaling Gateway Molecule Page*, A000186 (2005).

14.0601282041

Nur-E-Kamal, A., Zhang, A., Keenan, S. M., Seraj, J., Satoh, T., Meiners, S. and Welsh, W. J.: Requirement of activated Cdc42-associated kinase for survival of v-Ras-transformed mammalian cells, *Mol. Cancer Res.*, 3(5), 297-305 (2005).

15.0601272048

Tadano, M., Edamatsu, H., Minamisawa, S., Yokoyama, U., Ishikawa, Y., Suzuki, N., Saito, H., Wu, D., Masago-Toda, M., Yamawaki-Kataoka, Y., Setsu, T., Terashima, T., Maeda, S., Satoh, T. and Kataoka, T.: Congenital semilunar valvulogenesis defect in mice deficient in phospholipase C  $\epsilon$ , *Mol. Cell. Biol.*, 25(6), 2191-2199 (2005).