

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06565

研究課題名(和文)細胞小器官の機能動態に介在するARLファミリー低分子量Gタンパク質群の解析

研究課題名(英文) Analysis of the ARL-Family GTPases involved in the functional dynamics of cellular organelles

研究代表者

紺谷 圏二 (Kontani, Kenji)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30302615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内物質輸送に介在するARLファミリー低分子量Gタンパク質群の機能的・生理的役割の解明を目指した研究を行い、細胞内におけるそれらのグアニンヌクレオチド結合状態(活性化状態)を解析する手法の開発に成功した。その手法により、細胞内におけるARFPR1の活性化状態を初めて明らかにし、ARFPR1が一般的なARFファミリー分子とは異なりGDP結合型でも膜に結合していること、及び膜に結合した状態でグアニンヌクレオチド結合型が制御されている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん原遺伝子産物RASを代表とする低分子量Gタンパク質は、ヒトでは150種類以上が知られているが、細胞内におけるグアニンヌクレオチド結合状態(活性化状態)が明らかにされているものは非常に少ない。本研究で開発したHPLCベースのアッセイ系は、原理的にはどのような低分子量Gタンパク質にも適応可能であり、本手法により、これまで不明であった低分子量Gタンパク質の細胞内における活性化状態が解析可能となり、それらが介在する種々の細胞応答における機能的役割や、活性制御機構の解明、それらの異常に起因する疾患の分子基盤の解明、などに大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the functional and physiological roles of ARL-family GTPases that mediate intracellular membrane trafficking. We developed a method to analyze their guanine-nucleotide bound forms (activation states) in the cell. With this method, we clarified for the first time the activation state of ARFPR1 in cells. We found that ARFPR1, unlike general ARF-family GTPases, binds to the membrane even in its GDP-bound form and that its guanine nucleotide-bound form may be regulated in its membrane-bound state.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 細胞小器官 オルガネラ RAS ARF RHEB HPLC

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質はヒトでは 150 種類以上が知られており、一次構造上の特徴から、RAS、RHO/RAC、RAB、ARF/ARL、RAN のサブファミリーに分類される。それらは一般に不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型の二つの構造変換を介して、上流からのシグナルを下流へと伝達する“分子スイッチ”として機能している。低分子量 G タンパク質群によって制御される細胞応答は多岐にわたっており、細胞増殖や分化、細胞骨格系の制御、細胞内物流輸送、細胞質・核間輸送などである。一方で近年、生化学的性状あるいは一次構造の観点から、既存の低分子量 G タンパク質とは異質な分子量 G タンパク質が多数存在することが明らかとなり、低分子量 G タンパク質の活性調節機構と生理機能は新たな展開を見せようとしている。例えば申請者はこれまでに、RAS サブファミリーに属する DI-RAS や ARF/ARL サブファミリーに属する ARL8 が、一般的な G タンパク質が細胞内で通常 GDP 結合型で存在するのとは逆に、主に GTP を結合した状態で存在し、神経機能やリソソーム機能に介在することを明らかにしてきた。また、RAB サブファミリーに属する RAB45 や ARF/ARL サブファミリーに属する ARL13b が、グアニンヌクレオチドとの結合に必要な G ドメインに加えて、コイルドコイルやプロリンリッチドメインを有する、マルチ機能ドメイン G タンパク質として一次繊毛の形成や機能などに介在することを報告してきた。しかし、それらの低分子量 G タンパク質に関して、機能調節の要である G サイクル (グアニンヌクレオチド結合状態の変化) の分子基盤については未だ不明な点が多い。特に、ARF/ARL サブファミリーのうち、ARL 分子群については、ARF との相同性から主にデータベースを用いて同定された経緯もあり、生理的役割や活性制御機構について理解が遅れている。以上のような研究背景から、申請者は“細胞小器官の機能動態に介在する ARL ファミリー低分子量 G タンパク質群の解析”という本研究課題の着想に至った。

### 2. 研究の目的

前述のように、多くの ARL ファミリー分子群については、活性制御分子やエフェクター分子は不明である。ARL ファミリー分子群が、細胞内においてどのようなグアニンヌクレオチド結合状態にあるかを明らかにすることは、活性制御因子群の同定及び機能評価を行う上で重要である。そこで本研究では、ARL ファミリー分子群をはじめとする低分子量 G タンパク質の、細胞内におけるグアニンヌクレオチド結合状態を評価可能なアッセイ系の構築と、それらの活性制御機構の解明に向けた研究を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 各種細胞株の作製と免疫沈降

HEK293T 細胞および Hela 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、AAVSI 遺伝子座に各種遺伝子の発現カセットを挿入して作製した。細胞内における低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド状態の解析を行う目的で、細胞を 1% Triton X-100 を含むバッファーで可溶化後、抗 FLAG 抗体もしくは抗 PA 抗体を結合させた Dynabeads Protein G を用いて FLAG タグまたは PA タグ付加低分子量 G タンパク質を免疫沈降した。ビーズを洗浄後、酸性バッファーでタグ付加低分子量 G タンパク質をビーズから解離させた。その後、熱変性により結合していたグアニンヌクレオチドを解離させ、その画分を限外濾過膜によりタンパク質成分などを除去した画分を、HPLC 用サンプルとしてその後の解析に用いた。

#### (2) IP-RP-HPLC (ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography) によるグアニンヌクレオチドの定量

イオンペア試薬としては、TBA-B(tetrabutylammonium bromide)を用いた。C18 逆相カラムによるグアニンヌクレオチドの分析は、移動相として、20% アセトニトリル、80% 30 mM リン酸バッファー(pH 7.0)、10 mM TBA-B を用いたイソクラティック溶離による分析を行った。

#### (3) 蛍光検出 HPLC によるグアニンヌクレオチドの定量

蛍光ラベル化試薬として、DMPG(3,4-Dimethoxyphenylglyoxal)を用い、グアニンヌクレオチドを蛍光誘導体化し、C18 逆相カラムを用いた蛍光検出 HPLC による分析を行った。移動相としては、1.4% THF、2.8% アセトニトリル、12.5 mM リン酸バッファー(pH 8.0)を用いた。

#### (4) 精製リコンビナントタンパク質を用いた低分子量 G タンパク質 RHEB の生化学的特性

ヒト RHEB (野生型および疾患変異型) を GST 融合タンパク質として大腸菌に発現させ、定法に従って精製 GST-RHEB 融合タンパク質を得た。それらの精製タンパク質と <sup>35</sup>S-GTPγS または <sup>3</sup>H-GDP を用いて、フィルターアッセイによりグアニンヌクレオチド結合速度および解離速度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IP-RP-HPLC による低分子量 G タンパク質の活性化状態測定法の確立

GDP および GTP の標品を用いた IP-RP-HPLC の条件検討により、GDP および GTP の検出限界が約 0.5 pmol の測定系を構築できた。この測定系を用いて、既に細胞内におけるグアニンヌクレオチド結合状態が明らかになっている HRAS などの低分子量 G タンパク質について、FLAG タグ付加したタンパク質を細胞内に発現させて免疫沈降し、それらに結合したグアニンヌクレオチドを解析した。その結果、既存の報告と同様のグアニンヌクレオチド結合状態であることが確認された。従って、IP-RP-HPLC を用いることにより、細胞内から免疫沈降した低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド結合状態を解析可能であると考えられた。

##### (2) IP-RP-HPLC 法を用いた低分子量 G タンパク質 RHEB の活性化状態の測定

低分子量 G タンパク質 RHEB はインスリンなどの刺激に応答し、mTORC1 を活性化するシグナル伝達分子である。TSC1/2 は RHEB の GTP 加水分解反応促進因子 (GAP) であり、RHEB の機能を負に制御することが知られている。IP-RP-HPLC 法が細胞内の低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチド結合状態の変化をモニターできるかを検証する目的で、FLAG-RHEB を発現させた Hela 細胞を用いて、各種条件下で、FLAG-RHEB の活性化状態を解析した。その結果、定常状態における FLAG-RHEB の GTP 結合型の割合は約 16% であり、既存の報告と同様の結果であった。また siRNA により TSC1/2 をノックダウンした細胞においては、FLAG-RHEB の GTP 結合型の割合は約 70% となったことから、IP-RP-HPLC 法により、細胞内における RHEB の活性化状態の変化を解析できると考えられた。

##### (3) 各種の神経疾患変異が RHEB の G サイクルに与える影響の解析

IP-RP-HPLC 法により、大腸菌から精製した GST-RHEB のグアニンヌクレオチド結合状態についても解析可能であることが分かった。さらに、細胞から免疫沈降により精製した TSC1/2 を用いた実験により、GST-RHEB の GTP 結合型の割合が、TSC1/2 共存下で時間依存的に低下することも確認出来た。近年、神経疾患で同定された RHEB の変異 (P37L 及び S68P) が活性化型 RHEB の割合を上昇させることが報告されているが、そのメカニズムは不明であった。そこでまず IP-RP-HPLC 法により、それらの RHEB 変異体の TSC1/2 に対する感受性を検討したところ、RHEB/P37L は TSC1/2 に対して非感受性であることが分かった。一方、RHEB/S68P は TSC1/2 により、弱いながら GTP 加水分解反応が促進された。また、RHEB/P37L は野生型と同程度の GDP 解離速度及び GTP $\gamma$ S 結合速度を示したが、RHEB/S68P は野生型に比べて、両者の速度が上昇していた。以上により、RHEB/P37L は主に TSC1/2 に対して非感受性であることが GTP 結合型の比率上昇に寄与しており、RHEB/S68P については、TSC1/2 に対して低感受性且つグアニンヌクレオチド交換反応が亢進していることが、GTP 結合型の比率上昇に寄与していると考えられた。

##### (4) 蛍光検出 HPLC による低分子量 G タンパク質の活性化状態測定法の確立

前述の IP-RP-HPLC 法では、細胞に過剰発現させた低分子量 G タンパク質の活性化状態は測定可能であったが、内在性レベルの低発現量のものについては、検出感度の問題から測定することが出来なかった。この問題を克服するために、グアニンヌクレオチドを蛍光誘導体化して蛍光検出 HPLC で高感度に定量する系の確立を行った。その結果、GDP および GTP の検出限界が約 5 fmol の高感度測定系を設定することに成功した。この測定系を用いることにより、細胞に内在性レベルで低発現させた FLAG-RHEB を免疫沈降により回収して、それに結合した GDP および GTP を定量的に解析することが可能となった。さらに、この FLAG-RHEB 発現細胞を、飢餓状態から栄養状態に変化させた際に、FLAG-RHEB の GTP 結合型比率の上昇も捉えることに成功した。

##### (5) 低分子量 G タンパク質 ARFRP1 の活性化状態の解析

ARFRP1 は主にトランスゴルジ網の膜に局在し、ゴルジ体を経由する物質輸送に介在すると考えられている。これまでの研究からトランスゴルジ網への局在化に SYS1 が必要であることや、ARFRP1 のエフェクタータンパク質などが同定されているが、細胞内における ARFRP1 のグアニンヌクレオチド結合状態やその制御に関しては明らかにされていない。そこで、蛍光検出 HPLC 法により、ARFRP1 のグアニンヌクレオチド結合状態の解析を行った。ARF ファミリー一般に用いられる C 末端へのタグ付加は ARFRP1 の細胞内局在に影響を与えることが分かったため、C 末端近傍への internal タグとして PA タグを付加した ARFRP1-intPA を細胞に発現させ、抗 PA 抗体により免疫沈降を行い、解析を行った。その結果、ARFRP1-intPA は GTP 結合型と GDP 結合型の比が約 3 : 2 の割合で存在することが明らかとなった。細胞分画法により、ARFRP1 の殆どが膜画分に回収されたことから、一般的な ARF ファミリーとは異なり、ARFRP1 は GDP 結合型でも膜に局在し、膜に結合した状態で活性制御を受けることが示唆された。さらに、ARFRP1 の活性制御因子に関する手がかりを得る目的で、ゴルジ体を介したタ

ンパク質輸送を可逆的に阻害する Brefeldin A (BFA) を用いて、ARFRP1 の活性化状態に及ぼす影響を検討した。その結果、BFA の添加により ARFRP1-intPA の GTP 結合型の割合が約 30% 低下することが明らかとなった。この結果から、ARFRP1 の活性制御因子が BFA により直接または間接的に影響を受け、ARFRP1-intPA の GTP 結合型 ARFRP1 の割合が減少したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makoto Araki, Kaho Yoshimoto, Meguri Ohta, Toshiaki Katada, Kenji Kontani	4. 巻 297
2. 論文標題 Development of a versatile HPLC-based method to evaluate the activation status of small GTPases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 101428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉本果穂、荒木 信、紺谷圏二
2. 発表標題 蛍光ラベル化HPLCによる低分子量Gタンパク質のグアニンヌクレオチド結合型解析法の構築
3. 学会等名 第20回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 信、吉本果穂、紺谷圏二
2. 発表標題 蛍光検出HPLCを用いた低分子量Gタンパク質活性化状態の高感度測定法の確立とその応用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 信、吉本果穂、紺谷圏二
2. 発表標題 蛍光検出HPLCを用いた低分子量Gタンパク質の活性化状態解析法の構築とその応用
3. 学会等名 第19回 生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茅野剛史、荒木 信、紺谷圏二
2. 発表標題 パルミトイル化修飾を介した ARL15 の膜局在化機構の解析
3. 学会等名 第21回次世代を担う若手のためのファーマ・バイオフィォーラム 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 茅野剛史、荒木 信、紺谷圏二
2. 発表標題 パルミトイル化修飾を介した低分子量Gタンパク質ARL15の膜局在化機構の解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木 信、紺谷圏二
2. 発表標題 HPLCを用いた低分子量Gタンパク質の活性化状態解析法とKRAS阻害剤活性評価への応用
3. 学会等名 第81回 日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木 信、吉本果穂、呉実可子、紺谷圏二
2. 発表標題 蛍光検出HPLCを用いた低分子量Gタンパク質の活性化状態解析法とKRAS阻害剤評価への応用
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	荒木 信  (Araki Makoto)  (20552904)	明治薬科大学・薬学部・講師    (32684)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------