

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20624

研究課題名（和文）ゲノム編集法とインセルNMR法の融合による細胞内RAS制御機構の定量的解明

研究課題名（英文）Intracellular quantification of the activity of RAS signaling regulators by in-cell NMR with genome editing technique

研究代表者

趙 慶慈 (Zhao, Qingci)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：60907682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：RASタンパク質は細胞増殖シグナル経路における重要な分子スイッチであり、その細胞内での活性化状態はGTPase活性化タンパク質（GAP）などの制御因子により制御されている。本研究ではゲノム編集によりGAPをノックアウトした細胞を用いて、細胞内NMR解析により特定のGAPの細胞内寄与の定量化を行った。複数のGAPノックアウト細胞内における活性型RASの存在割合の比較から、GAPの一種NF1がRAS活性化の抑制に大きく寄与していることがわかった。さらに数理モデルを用いたシミュレーションにより、細胞内在性NF1の酵素活性がin vitroでの定量値より顕著に抑制されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量GTPase RASは細胞増殖のシグナル伝達における重要な分子スイッチであり、その制御の破綻はがんをはじめとする様々な疾患の原因となることが報告されているが、各制御因子が細胞内のRASの活性化状態にどの程度影響しているかは定量的に明らかにされていない。本解析手法は、実際の細胞内における特定の制御因子の寄与を定量的に捉えるものであり、様々な分子スイッチとその制御因子に対して適用可能であると考えられる。さらに、解析手法は創薬標的となるタンパク質の探索や、阻害剤の効果の評価にも応用可能である。

研究成果の概要（英文）：The RAS protein is an important molecular switch in the cell proliferation signaling pathway, and its activation state within the cell is regulated by regulatory proteins such as GTPase-activating proteins (GAPs). In this study, we utilized cells in which GAP was knocked out through genome editing and performed quantitative analysis of the intracellular contribution of specific GAPs using in-cell NMR analysis. By comparing the proportions of active RAS in multiple GAP knockout cells, we found that one type of GAP, NF1, significantly contributes to the inhibition of RAS activation. Furthermore, simulation using a mathematical model revealed that the enzymatic activity of intracellular NF1 is notably suppressed compared to its quantitative value in vitro.

研究分野：構造生物学

キーワード：In-cell NMR 核磁気共鳴法 分子夾雑 ゲノム編集 低分子量GTPase

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RAS タンパク質は低分子量 GTPase ファミリーに属する代表的なシグナル伝達分子であり、活性型の GTP 結合状態と不活性型の GDP 結合状態の間を交換することで細胞増殖などのシグナル経路における分子スイッチとして機能している。また、RAS はがんの原因となるタンパク質であり、遺伝子変異により活性型である GTP 結合型の RAS の存在割合 (= GTP 結合型割合) が恒常的に上昇することで様々ながんが誘発されることが知られている。従って、細胞内における RAS の GTP 結合型割合の制御機構を定量的に理解することはがん創薬の上で重要である。

申請者はこれまで核磁気共鳴法(NMR)によりタンパク質の細胞内における構造情報を取得する「細胞内 NMR 法(in-cell NMR 法)」を用いて、細胞内での RAS の GTP 結合型割合を観測する手法を開発している。さらに、その経時変化から RAS の活性である GTP 加水分解反応と GDP-GTP 交換反応の速度を細胞内にて定量することに成功している。その結果、細胞内では RAS の GTP 加水分解速度が *in vitro* より上昇している一方で GDP-GTP 交換速度は低下しており、そのため RAS の GTP 結合型割合は細胞内では低く制御されていることを明らかにした。[Zhao Q et al., *Cell Reports*, (2020)]

in-cell NMR 法で観測された GTP 結合型割合の低下の要因として、p120 や NF-1 のような RAS の GTP 加水分解反応を促進する GAP (GTPase 活性化タンパク質)をはじめとする様々な細胞内存在性の制御因子の寄与が考えられる。しかしながら、「どの制御因子がどの程度細胞内 RAS の GTP 結合型割合に影響を与えているか」という問いについては、これまで定量的な知見は得られていない。その理由として、制御因子の酵素活性や親和性といった活性制御パラメータを *in vitro* ではなく実際の細胞内(*in situ*)において定量する手法が存在しなかったことが挙げられる。そこで申請者は「ゲノム編集法により特定の制御因子をノックアウトし、それによる細胞内 RAS の GTP 結合型割合の変化を *in-cell NMR* 法を用いて解析する」という手法を開発することで上記の課題を解決できると考えた。この課題の解決により先述の問いに答えることは、制御因子の変異によって引き起こされる様々な疾患(神経線維腫症 1 型など)の発生メカニズムの解明につながる。

2. 研究の目的

本研究はゲノム編集法と *in-cell NMR* 法を組み合わせ、RAS に対する特定の制御因子の活性を実際の細胞内 (*in situ*)で定量する手法を開発し、細胞内において制御因子の RAS の GTP 結合型割合に対する寄与を定量的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では RAS の制御因子のうち、代表的な 2 種の GAP である p120 と NF-1 に着目し、以下の研究戦略で GAP のノックアウトによる細胞内 RAS の GTP 結合型割合の変化を *in-cell NMR* 法を用いて解析する。

CRISPR-Cas9 系ゲノム編集法を用いて配列特異的に GAP 遺伝子を切断することにより p120、NF-1 をそれぞれ選択的にノックアウトした細胞株を構築する。

構築した細胞株に対して安定同位体標識 RAS を導入し、申請者が確立した *in-cell NMR* 測定法を用いて各 GAP ノックアウト細胞内の RAS の GTP 結合型割合を観測する。そして GAP ノックアウト細胞とゲノム編集を行っていない Control 細胞の間で *in-cell NMR* 観測結果を比較し、p120 と NF-1 の細胞内 RAS の GTP 結合型割合低下に対する寄与を見積もる。

in-cell NMR 測定結果に基づいて細胞内での内在性 p120 および NF-1 の活性の算出を行う。GAP の存在下における RAS の GTP 結合型割合の経時変化は以下の 4 つの反応経路を含む数理モデルで記述できる (Fig.1)。

V1: GAP 非依存的な GTP 加水分解反応 (速度定数 k_{hy})

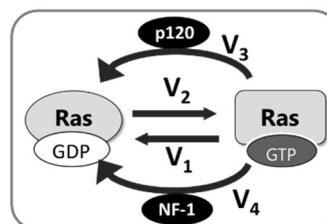
V2: GAP 非依存的な GDP-GTP 交換反応 (速度定数 k_{ex})

V3,4: GAP 依存的な GTP 加水分解反応

各 GAP の細胞内濃度を定量した上で、*in-cell NMR* で観測した Control 細胞および GAP ノックアウト細胞内 (V3 と V4 のいずれかの経路が存在しない) の GTP 結合型割合の変化に対して数理モデルをフィッティングさせ、実測した GTP 結合型割合変化をより良く再現できるような各 GAP の k_{cat} , K_m を決定する。

4. 研究成果

まず、p120、NF-1 について CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集によって KO 細胞の構築を行った (Fig. 2A)。標的となる GAP 遺伝子を特異的に切断するように設計した一本鎖ガイド RNA (sgRNA) と Cas9 ヌクレアーゼを発現する pX330 ベクターを構築した。また、切断したゲノムに対して抗生物質 Puromycin の耐性遺伝子が相同性組み換えによってノックインされるようにターゲティングベクターを構築した。2 つ



$$V_1 = k_{hy} * [Ras_{GTP}]_t$$

$$V_2 = k_{ex} * [Ras_{GDP}]_t$$

$$V_3 = \frac{k_{cat}^{p120} * [p120] * [Ras_{GTP}]_t}{K_m^{p120} + [Ras_{GTP}]_t}$$

$$V_4 = \frac{k_{cat}^{NF-1} * [NF-1] * [Ras_{GTP}]_t}{K_m^{NF-1} + [Ras_{GTP}]_t}$$

Fig 1 GAP タンパク質による細胞内での RAS の活性制御の数理モデル。

のベクターをHela S3細胞に導入後、Puromycinによるセレクションを行い、ウェスタンブロットによりp120およびNF-1の発現が検出されないクローン株を選別した。

次に構築した各GAPKO細胞(p120KO細胞、NF-1KO細胞)を用いてin-cell NMR測定を行った。Ileの δ 位メチル基を選択的に ^1H 、 ^{13}C 標識したRASをStreptolysin Oを用いた可逆的な膜透過処理により細胞内に導入し、当研究室で開発したバイオリクター装置を用いてNMRサンプル管内に培地を灌流しながら1測定30分間のNMRスペクトルを連続的に取得した。GTP及びGDP結合状態で異なる化学シフトを示すI21のシグナル強度に基づいてRASのGTP結合型割合を算出し、定常状態における各細胞内のGTP結合型割合を通常細胞と比較した。

まず野生型RASを導入したp120およびNF-1KO細胞について細胞内GTP結合型割合を解析した(Fig. 2A)。その結果、いずれのKO細胞内においても通常細胞と同様に野生型RASは完全にGDP結合型として存在していることが示された(Fig. 2D)。よって、野生型RASはp120、NF-1以外の内在性GAPや、他の細胞内因子によりGDP結合型に保持されている可能性が考えられた。

そこで次に、野生型と異なり通常細胞内において12.4%程度がGTP結合型として存在するT35S変異体を用いて同様の解析を行った(Fig. 2B)。その結果、p120KO細胞内のGTP結合型割合は通常細胞と同程度であったのに対し、NF-1KO細胞内のGTP結合型割合は通常細胞に比べて有意に上昇していた(Fig. 2E)。

この結果がNF-1のKOに由来するGTP結合型割合の変化であることを裏付けるためにGAPによる促進効果を受けるT35Sに対するControlとして、GAPによるGTP加水分解促進効果が非常に小さいことが知られるG12V変異体についても解析した(Fig. 2C)。その結果、G12V変異体ではGAPのKOに伴う細胞内GTP結合型割合の有意な変化は観測されなかった(Fig. 2F)。以上の結果から細胞内RASのGTP結合型割合に対して内在性NF-1の寄与が存在していることが明らかになった。

これらの実験結果をもとに、細胞内でのNF-1の細胞内活性パラメータの算出を行った。

はじめに、NF-1KO細胞中のGTP結合型割合からNF-1非依存的な経路v1、v2の速度の見積もりを行ったところ、 $k_{\text{hy}}=6.8 \times 10^{-3}/\text{min}$ 、 $k_{\text{ex}}=1.7 \times 10^{-3}/\text{min}$ のとき実験データと一致した。次に細胞内GAPの活性を求めるため、まず、合成フラグメントペプチドを用いたプロテオミクス解析により内在性のNF-1の細胞内濃度を絶対定量した結果、1細胞当たり300 zmol、細胞内濃度120 nMと見積もられた。この値を用いてv3のミカエリスメンテン式を含めた数理シミュレーションを行った結果、in vitroでのパラメータを用いるとNF-1の寄与によりGTP結合型割合は1%以下まで低下しており、実測した通常細胞内のGTP結合型割合12.4%から著しく乖離していた。これを受けて細胞内のv3経路のパラメータがin vitroと大きく異なることを示していると考え、細胞内のGTP結合型割合12.4%に一致するようにパラメータを変化させた結果、細胞内のNF-1は特異性定数 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ がin vitroよりも30分の1程度まで低下していることが明らかになった(Fig. 3)。

以上から本研究により、特定のタンパク質をロックアウトした細胞を用いたin-cell NMR実験によって細胞内タンパク質の活性を直接定量解析する新規手法を確立できた。近年の構造解析から、全長のNF-1が自己会合により二量体を形成し、二量体のNF-1はRASに対するGTP加水分解促進効果が阻害されていることが示されている。[Shreker M et al., *JBC* (2020)][Lupton CJ et al., *Nat. Struct. & Mol. Biol.* (2021)] このことを踏まえると、本研究の結果から、NF1は細胞内でほとんど2量体を形成し、活性を有する単量体のNF-1は細胞内では1/30程度しか存在しないことが示唆された。さらに、本研究において内在性p120の寄与が検出されなかったことについて、それぞれのドメイン構成からp120リン酸化された受容体を認識するSH2ドメインを介して細胞外刺激依存的にRASを不活性化するのに対し、NF-1によるRASの不活性化は刺激非依存的であると考えられている。したがって、NF-1のみが細胞内RASのGTP結合型割合に影響を及ぼすという本研究の結果は、in-cell NMRによって観測しているRASの活性状態が刺激非存在下における状態を反映していると解釈できる。また、RASはGAP以外にも様々な内在性タンパク質により活性が制御されていることから、本手法はGAPだけでなく幅広い細胞内因子の機能解析について適用可能と考えられる。

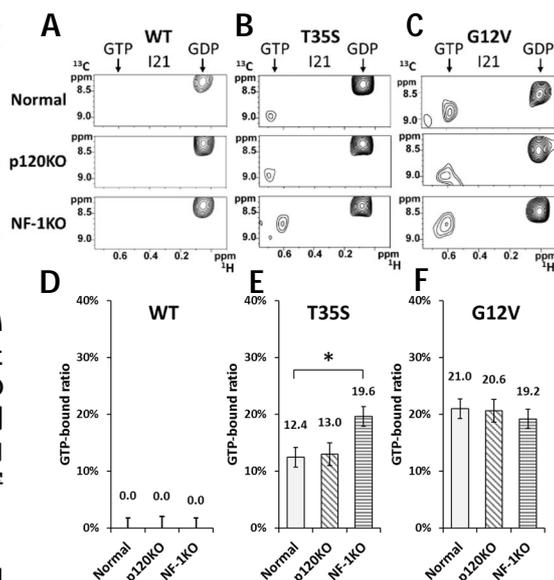


Fig 2(A-C)Control細胞および各GAPKO細胞のin-cell NMRスペクトルにおけるRASのI21シグナル((A)WT, (B)T35S, (C)G12V)。 (D-F)定常状態における各細胞内のGTP結合型割合の比較((D)WT, (E)T35S, (F)G12V)。

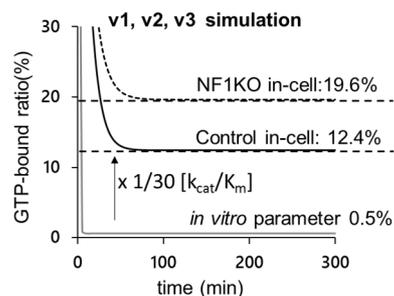


Fig 3 NF1制御下における細胞内RASのGTP結合型割合のシミュレーション

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 趙慶慈, 嶋田一夫, 西田紀貴 | 4. 巻 53(6) |
| 2. 論文標題 分子夾雑系が変調する細胞内タンパク質の構造と機能 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 月刊「細胞」 | 6. 最初と最後の頁 284-287 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 趙慶慈 |
| 2. 発表標題 Intracellular quantification of the activity of signaling regulators by in-cell NMR with genome editing technique |
| 3. 学会等名 学術変革領域クロススケール新生物学キックオフミーティング |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Qingci Zhao (Keiji Cho), Ryu Fujimiya, Satoshi Kubo, Christopher B Marshall, Mitsuhiko Ikura, Ichio Shimada, Noritaka Nishida |
| 2. 発表標題 Real-time In-cell NMR Reveals the Intracellular Modulation of GTP-bound Levels of Ras |
| 3. 学会等名 EMBO NMR Practical Course 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Qingci Zhao, Ichio Shimada, Nishida Noritaka |
| 2. 発表標題 ゲノム編集技術を活用した細胞内Rasの活性制御機構のin-cell NMR観測 |
| 3. 学会等名 第22回蛋白質科学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://researchmap.jp/qingcizhao>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|