

令和元年6月20日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07060

研究課題名(和文) 光スイッチ機構を持つ低分子量G蛋白質Rasの開発と細胞内情報伝達の光制御

研究課題名(英文) Development of Small GTPase with Photoswitching system and its application to photocontrol of intramolecular cell signaling

研究代表者

丸田 晋策 (Maruta, Shinsaku)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号：40231732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質Rasは、細胞の増殖・分化、遺伝子発現、細胞間接着などの重要な細胞機能の調節を行っている。また、GTP加水分解に関するアミノ酸の変異は細胞の癌化を誘導することが分かっている。Rasの生体分子機械的な仕組みを利用して外部刺激で制御することができれば、細胞機能の人工的な調節が可能になる。本研究では、RasとRasの制御因子の機械的な仕組みに光応答性のフォトクロミック分子を光スイッチとして導入して、Rasの機能を光可逆的に制御することを試みた。そして光可逆的にRasのGTPase活性が制御されることを明らかにした。また光可逆的にRasのGDP-GTP交換反応を制御出来る事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、重要な生理機能を担う低分子量G-蛋白質Rasを、情報伝達系の生体分子機械として捉え、その分子機械的仕組みに積極的に外部刺激応答性ナノデバイスを導入して人工的外部刺激で、Rasの細胞内情報伝達機能が制御出来る事を示した。このことにより、細胞の増殖、分化を人工的外部刺激で調節することが可能になると期待される。このRasの情報伝達機能を人工的に制御する方法を確立することにより、他の細胞機能を調節している低分子量G-蛋白質ファミリーへの応用も可能となる。細胞機能全体を人工的に制御するこの研究により、分子細胞の研究分野ばかりではなく医療分野へ貢献できることが強く期待できる。

研究成果の概要(英文)：Ras is one of the small GTPase that regulates key cell functions such as cell proliferation and differentiation, gene expression, and cell adhesion. In addition, mutations at the amino acids involved in GTP hydrolysis has been shown to induce canceration of cells. Since the structure of Ras and its molecular mechanism as a biomolecular machine have been well studied, it will be possible to control of cell function if Ras can be regulated by an artificial external stimulus utilizing the ingenious mechanism of Ras. In this study, we attempted to control the function of Ras reversibly by introducing photo responsive photochromic molecules as a light switch into the mechanical mechanism of Ras and the regulating factor of Ras. And we clarified that the GTPase activity of Ras is controlled reversibly. In addition, it was shown that this photochromic peptide can be used to control the GDP-GTP exchange reaction of Ras in a photoreversible manner.

研究分野：生物物理

キーワード：低分子量Gタンパク質 細胞内情報伝達 光制御 フォトクロミック分子 アゾベンゼン 制御因子 ペプチド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞には様々な生体分子機械が存在しており巧妙な仕組みで作動している。低分子量 G-蛋白質は、細胞情報伝達系の生体分子機械で、分子量 20~30kDa の GTP 結合蛋白質である。制御因子 GEF (Guanine exchange factor) の結合により活性部位の GDP が GTP 置き換わると Ras は活性化型になり、特異的標的分子に結合して細胞内情報を伝達する。そして GAP (GTPase activating protein) の結合により、GDP へ加水分解されることにより不活性化型になる。このように低分子量 G-蛋白質は細胞内で分子スイッチとして機能している。低分子量 G-蛋白質には、Ras, Rho, Rab, Ran, Sar/Arf の 5 つのファミリーが存在しており、それぞれ異なる細胞情報伝達の機能を担っている。その中で Ras は細胞の増殖、分化、遺伝子発現の調節などの重要な生理機能を担っている。GTP 加水分解に関するアミノ酸 Gly12, Gln61 が、他のアミノ酸に変異すると GTP 加水分解が阻害され、常に活性化型になることにより、細胞分裂が促進され、細胞の癌化を誘導することが分かっている。その構造と機能に関する活発な研究が、国内外で行われており、Ras の分子機械的構造と標的エフェクター活性化機構が明らかにされている。面白いことに Ras の構造は、細胞運動系の生体分子機械である ATP 駆動型分子モーター、キネシンやミオシンのモータードメインと極めて類似した構造を持つことから、これらは共通の祖先 Nucleotide binder から進化したと考えられている。これらの分子機械の Nucleotide 結合部位には P-loop, Switch I, Switch II と呼ばれる分子機械的仕組みを持つ保存された共通の構造が存在している。この分子機械的仕組みを巧みに利用して外部刺激で制御することができれば、細胞機能の人工的な調節が可能になると考えられる。

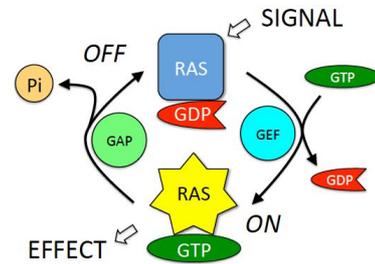


図 1 Ras の分子スイッチ機構

申請者らは、機械的な仕組みを持つキネシンやミオシンのエネルギー変換部位に、人工的制御ナノデバイスとして、光応答性のフォトクロミック分子を導入することにより、これらの生体分子機械を光可逆的に制御する一連の研究を展開してきた[新学術領域研究 (H20~H22) "光駆動型バイオナノマシンの研究"]。そして、従来型キネシンの微小管結合部位にフォトクロミック分子を導入して、ATPase 活性とモーター活性を可逆的に制御することに成功している。従って、この共通の機械的仕組みを持つ低分子量 G 蛋白質 Ras もフォトクロミック分子を用いて光可逆的に制御できることが強く期待できる。

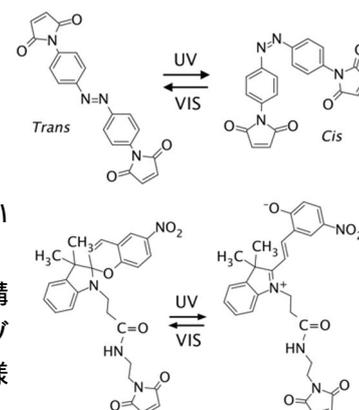


図 2 SH 基特異的二価架橋性のアゾベンゼン誘導体 ABDM (上)とスピロピラン誘導体 MA-

フォトクロミック分子は、異なる二つの波長の光で、可逆的に構造と性質を大きく変える化合物である。代表的なものとしてアゾベンゼンやスピロピランなどがある。スピロピランは、図 2 の様に可視光線照射で疎水性の閉環構造を示し、紫外線で開環した双性イオン構造をとり、劇的に性質と構造が変化するので、光スイッチとして可能性が注目されている。申請者らは、フォトクロミック分子を生体分子機械に導入するために、システイン残基のチオール基と特異的に架橋する官能基、Maleimide 基や Iodoacetyl 基をもつ幾つかのフォトクロミック分子(図 2)をこれまでに合成している。そして、これらをキネシンやミオシンなどの ATP 駆動型の生体分子モーターや情報伝達系生体分子機械のカルモジュリンに導入して、光可逆的に機能の制御が可能であることを示している。また Woolley らのグループは、二価架橋性のアゾベンゼン誘導体を用いて、合成ペプチドを分子内架橋して、ヘリックス構造をランダム構造へ光可逆的に変化させることに成功している。

### 2. 研究の目的

低分子量 G 蛋白質は、細胞情報伝達を行う生体分子機械で、GDP 結合型から GTP 結合型への転換により、特異的標的分子に結合して細胞情報を伝達する分子スイッチである。Ras は、低分子量 G 蛋白質の 1 つで、細胞の増殖・分化、遺伝子発現、細胞間接着などの重要な細胞機能の調節を行っている。また、GTP 加水分解に関係するアミノ酸の変異は細胞の癌化を誘導することが分

かっている。Ras の構造とその生体分子機械としての分子機構は良く研究されているので、その仕組みを巧みに利用して外部刺激で制御することができれば、細胞機能の人工的な調節が可能になる。本研究では、Ras と Ras の制御因子の機械的な仕組みに光応答性のフォトクロミック分子を光スイッチ(制御ナノデバイス)として導入して、Ras の機能を光可逆的に制御することを目的としている。

### 3. 研究の方法

始めに、低分子量 G 蛋白質 Ras と Ras 制御蛋白因子 GEF(Guanine nucleotide Exchange Factor)にフォトクロミック分子を導入するために、分子機械的機能部位にシステインを 1 つだけ持つ変異体を確立した遺伝子工学的手法を用いて調製する。次に申請者が確立している合成方法に従って、システインのチオール基と特異的に結合する官能基を持つフォトクロミック分子をアゾベンゼン、スピロピラン誘導体を合成する。Ras 変異体と Ras 制御蛋白因子を合成したフォトクロミック分子で化学修飾した後、in vitro での GEF 依存性 Ras GTPase 活性の光可逆的制御実験を行う。さらに、GEF の Ras 結合部位の構造をもつ合成ペプチドにフォトクロミック分子を導入した誘導体を合成する。そして、GEF と光可逆的に競合させることにより GEF 依存性 Ras GTPase 活性の制御実験を行う。

### 4. 研究成果

#### 4-1 Ras 機能部位へのフォトクロミック分子導入による光制御

Ras の機能部位に反応性のシステイン残基を持つ Ras 変異体を調製して、フォトクロミック分子であるチオール基反応性のアゾベンゼン誘導体を導入して、光可逆的に Ras の GTPase 活性と GDP-GTP 交換因子 GEF に依存する Ras のヌクレオチド交換反応を制御することを試みた。

#### [新規蛍光標識 GTP 誘導体の合成と特徴付け]

Ras の GTP との相互作用と GDP-GTP 交換反応の光制御をモニターするために、まず初めに蛍光で標識された新規 GTP 誘導体(2' (3')-O- {6-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)hexanoic acid-GTP ), NBD-GTP (図 3)を合成した。合成は、我々の研究室で確立している ATP 誘導体の合成方法に従って行った。そして Ras GTPase 分光学的な特徴付けを行った。蛍光標識 GTP 誘導体 NBD-GTP は、GTP と同程度の Ras への親和性と生理的作用を保持しており、Ras の GTP 結合と解離、そして GDP-GTP 交換反応をモニターすることができる有用な GTP 誘導体であることを明らかにした。

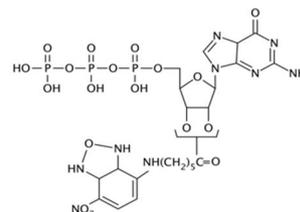


図 3 蛍光標識 GTP 誘導体 NBD-GTP

#### [機能部位に反応性のシステインを持つ Ras 変異体のデザインと調製そして生化学的特徴付け]

本研究では、癌性変異体と正常体の機能部位に光制御デバイスとしてフォトクロミック分子を導入するために、機能部位のアミノ酸を反応性のチオール基を持つシステインに置換した数種類の Ras 変異体を調製した。アミノ酸置換した部位を図 4 に示している。C118 は、天然に存在しているシステインで Ras タンパク質の表面に存在しているので、反応性の無いセリンに置き換えた C118S を変異体をベースにして、新に機能部位にシステインを導入した変異体をデザインした。Y32 は Switch I に位置しており GTP のリン酸と水分子を介して結合する触媒反応に影響を与える部位であると考えられる。I36 も Switch I に存在しており、リン酸と Mg イオンに直接結合している T35 に隣接している。Switch II にある Y64 は Switch I の E37 と相互作用しており、Ras の調節因子と相互作用する重要な部位に位置している。これらのデザインした変異体を確立した大腸菌発現系を用いて調製した。次に Ras の正常体と癌性変異体をベースにシステインを導入した変異体の GTPase 活性を測定した。正常体を元にした全ての変異体は Wild

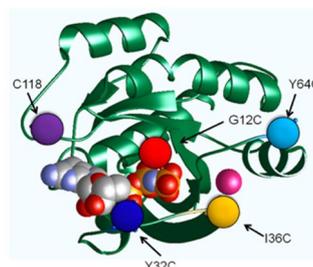


図 4 反応性のチオール基を持つシステイン残基に置換した Ras の機能部位のアミノ酸の位

Type より高い GTPase 活性をしめした。癌性変異体を利用したものでは、C118S と Y32C は癌性変異体より低い活性を示したが、それ以外の変異体は数倍高い GTPase 活性を示した。

#### [フォトクロミック分子の Ras 機能部位への導入と Ras 機能の光可逆的制御]

Ras 変異体の機能部位にフォトクロミック分子アゾベンゼン誘導体 4-phenylazophenyl maleimide (PAM)を確立した方法で導入した。図 2 に示している様に PAM は紫外線照射で親水性の性質を持つ Cis 型、可視光線照射で疎水性の Trans 型に分子サイズと性質が劇的に変化する。従って Ras の機能部位に PAM 導入することにより、光可逆的に Ras の生理的機能への大きな影響の変化を誘導することが期待できる。Ras に導入された PAM は結合部位において紫外線-可視光線照射により可逆的に光異性化(Cis-Trans)することが示された。

Ras変異体に導入したPAMを機能部位において、紫外線と可視光照射で光異性化させることにより、RasのGTPase活性が光可逆的に制御されることが示された。また修飾部位によって異なる方向性(GTPase活性の促進と抑制)の光制御が観察された。正常型Rasをベースに作成した変異体の機能部位にPAMを導入した場合、GTPase活性は正常型Rasに比較して低い値を示している。そして、I136C, Y64C, Y32Cでは紫外線照射でCis型にすると活性が低下し、可視光線照射によるTrans型では活性が増加した。そして、可逆的にGTPase活性が変化することが示された。

面白い事に、G12Cでは光異性化に伴う活性の変化が逆転していた。一方、癌性変異体をベースに作成

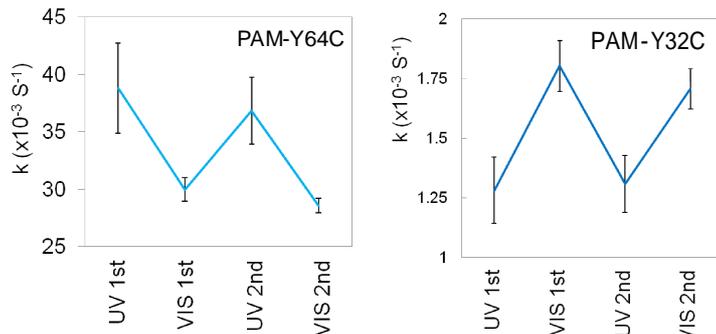


図 5 PAM 修飾 Ras 変異体 I36C と Y64C の GEF で誘導される GDP-GTP 交換反応の光可逆的制御 PAM-I36C(左)と PAM-Y64C(右)の GEF 依存的ヌクレオチド交換反応は、PAM の光異性化で制御された

した変異体にPAMを導入した場合、I36C以外はPAMの導入によりGTPase活性の促進が見られた。そしてY32C, Y64, C118にPAMを導入した変異体は、Cis型で活性が低下し、Trans型で活性が上昇した。G12CはPAMの導入で高いGTPaseの促進が見られるが、光異性化に伴う活性の変化は見られなかった。これに対してI36CはPAMの導入で活性の大きな増加は無かったが、光異性化に伴い、他の変異体と相反する活性の変化を示した。また蛍光標識GDP誘導体NBD-GDPを用いてPAM-Rasのヌクレオチド交換度が光制御されることが明らかになった。PAMを導入したRas変異体Y32CRasに結合している蛍光標識NBD-GDPが、光可逆的に異なる速度でGTPと置き換わっていることが示された。さらに PAMを導入したRas変異体I36CとY64CのGEF依存的GDP-GTP交換反応も光可逆的に制御された。可逆的に交換速度が制御できることが示された。面白い事に、I36CとY64Cに結合したPAMのCis-Trans光異性化に伴う交換反応の速度変化は、相反する結果になった。RasとGEFとの相互作用を可逆的に光制御することに成功した。

#### [まとめ]

以上のことより光応答性ナノデバイスであるフォトクロミック分子を用いることで Ras の GTPase 活性、GTPase サイクル調節タンパク(GAPs, GEFs)との相互作用を光制御し GTPase サイクルを光制御できることが示唆された。 GTPase サイクル調節タンパクと同様にエフェクター (c-Raf, RaIGDS など)との相互作用を光制御することで Ras の情報伝達を光制御が可能であることも期待される。また Ras ではなく GTPase サイクル調節タンパク(GAPs, GEFs)やエフェクター(c-Raf, RaIGDS など)にフォトクロミック分子を修飾することによって GTPase サイクルを光制御できることも示唆された。

#### 4-2 Ras 制御因子 GEF と競合するフォトクロミックペプチドを利用した光制御

Ras の GDP-GDP 交換反応を促進する因子 GEF(Guanine nucleotide Exchange Factor)の Ras 結合部位配列を持つペプチドを合成して、二価架橋性のアゾベンゼン誘導体 ABDM(azobenzene-dimaleimide)を導入した。そして光異性化によりペプチドの二次構造を変化させて、Ras と GEF の

相互作用を制御させ、Ras の GDP-GTP 交換反応を光異逆的に制御する事を試みた。

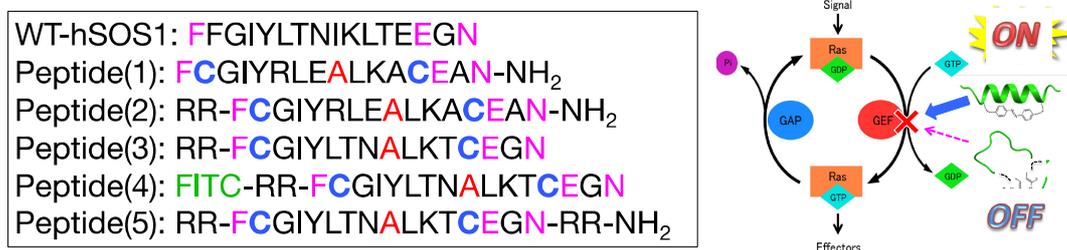


図 6 デザインしたペプチド(左)とフォトクロミックペプチドを利用した Ras の GEF 依存性ヌクレオチド交換反応の光可逆的制御の機構(右)

#### [設計したペプチドへの ABDM 修飾と二次構造の測定]

確立した方法に従ってペプチドを二価架橋性アゾベンゼン誘導体 ABDM で化学修飾した。そして逆相 HPLC で精製した。そして TOF-MS で分析して ABDM とペプチドが 1:1 で架橋されていることを確認した。またペプチドに架橋された ABDM が Cis-Trans の光異性化する事を吸収スペクトルの変化から確認した。さらに CD スペクトルの結果から、ABDM 未修飾のペプチドは、ランダムコイル構造をとることが確認された。一方で、ABDM 修飾後は典型的なヘリックスのスペクトルが確認できたことから、ABDM がペプチド二次構造の安定化に寄与していることが明らかとなった。また、可視光・紫外光をそれぞれ照射すると、観察されるスペクトルに差が見られたことから、ABDM の異性化に伴い、ヘリックス構造が一部崩れることが示唆された。

#### [ペプチドの阻害効果測定]

設計したペプチドのうち、Peptide (3) は水溶性が低く、ABDM の修飾が困難であった。Peptide(1) と (2) はヌクレオチド交換反応で阻害効果を殆ど示さなかった。Peptide(5) は、コントロールに比べて明らかな阻害効果を示し、*Trans-Cis* 異性体間での阻害効果の差が確認された。

#### [まとめ]

GEF ペプチドに二価架橋性アゾベンゼン誘導体 ABDM を分子内架橋することにより、ペプチドの二次構造が著しく安定化した。また、ABDM の光異性化に伴う構造変化によって、ペプチド二次構造が部分的に変化することが確認された。ABDM を導入した数種類のペプチドのうち ABDM-ペプチド No.5 は、SOS と競合阻害し、Ras のヌクレオチド交換反応を阻害することが確認された。また ABDM-ペプチド No.5 は、*Cis-Trans* 異性化に伴い有意に阻害活性が変化することが示された。これらのことから、フォトクロミック分子を導入したペプチドを用いて、Ras のヌクレオチド交換因子 GEF の Ras への結合を光可逆的に制御することにより、Ras の GDP-GTP 交換反応を間接的にコントロールできることが示された。

#### 4-3 新規 Ras 機能阻害ペプチドを利用した光制御

KRpep-2d は、高い親和性で GEF とは異なる部位に結合して Ras の GDP-GTP 交換反応を阻害する新しい環状構造を持つ阻害ペプチドである。この環状構造を形成する部位に二価架橋性のアゾベンゼン誘導体を導入して光可逆的にペプチド阻害活性を変化させて、Ras の GDP-GTP 交換反応を光可逆的に制御する事を試みた。

#### [修飾ペプチドの分光学的性質と修飾ペプチドの二次構造解析]

KRpep-2d に導入した幾つかのアゾベンゼン誘導体に紫外線と可視光線を照射して、*Cis-Trans* の光異性化にともなう吸光スペクトルの変化を測定した。紫外線照射におけるスペクトルの変化は、360nm に位置する吸光極大が減少しブルーシフトした。可視光線照射により、吸光度が回復し、レッドシフトした。このことにより、KRpep-2d に導入されたアゾベンゼン誘導体が紫外線、可視光線照射により *Cis-Trans* の異性化を起こしていることが示された。またこれらの結果

は、KRpep-2d に修飾したそれぞれのアゾベンゼン誘導体において、同様の結果が得られた。アゾベンゼン誘導体を導入した KRpep-2d の二次構造を、CD スペクトルを用いて解析した。KRpep-2d は、本来二次構造をとらないことが明らかになっており、修飾ペプチドにおいても典型的なランダムコイルのスペクトルが観測された。また光異性化間でのスペクトルの差は見られなかった。この結果から、KRpep-2d へのアゾベンゼン誘導体導入による二次構造への影響は見られないことが明らかになった。

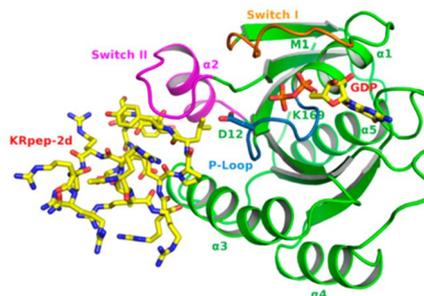


図 7 Ras のヌクレオチド交換反応を阻害する新規ペプチドと Ras の相互作用

#### [ヌクレオチド交換反応の測定と修飾ペプチドの阻害活性測定]

蛍光標識 GDP 誘導体 Mant-GDP を結合させた HRas・Mant-GDP を調製した。この mant-Ras を用いてヌクレオチド交換反応を測定した結果、GEF 非存在下では、蛍光強度に変化が見られないが、GEF を加えた段階で蛍光強度の減少が見られた。この結果から、Ras と GEF の相互作用によるヌクレオチド交換が正常に機能していることが示された。Mant-GDP と異なりアゾベンゼンの吸収波長領域と重ならない蛍光波長を持つ蛍光標識 GDP 誘導体を合成して Ras・NBD-GDP 複合体を調製した。そして Ras のヌクレオチド交換反応の光制御を観察した。アゾベンゼン誘導体 BSBCA22 で修飾した KRpep-2d は阻害活性を示したが、IodoAB 修飾 KRpep-2d と ABDM 修飾 KRpep-2d は阻害活性を示さなかった。また Trans 型 BSBCA22 修飾 KRpep-2d と Cis 型 BSBCA22 修飾 KRpep-2d の異性体間での阻害活性の差が見られた。

#### [まとめ]

BSBCA22 修飾 KRpep-2d を用いたヌクレオチド交換反応の阻害活性は未修飾の KRpep-2d と比べて阻害活性が減少した。これは BSBCA22 修飾によるアミノ酸の立体配座に変化が生じたためであると考えられる。また KRpep-2d はジスルフィド結合に挟まれた相互作用領域と両末端に存在するアルギニンリッチな領域とで構成されている。この両末端のアルギニン残基は、Ras との結合表面には位置しないがペプチドの親水性に大きく寄与しており、IodoAB、ABDM 修飾を施すことでペプチドの親水性が大きく減少してしまうため、阻害活性を示さなかったと考えられる。

#### 4-4 結論

Ras の機能部位に直接フォトクロミック分子を導入して光可逆的に Ras の GTPase 活性と交換因子 GEF 依存性 GDP-GTP 交換反応を光可逆的に制御できることが明らかになった。また、Ras の GEF 依存性 GDP-GTP 交換反応を阻害するペプチドにフォトクロミック分子を導入して間接的に Ras の GDP-GTP 交換反応を光可逆的に制御する事に成功した。このペプチドは細胞膜を透過する事ができるので、細胞レベルにおいて低分子量 G タンパク質 Ras を制御する事に利用できると考えられる。従って、細胞機能の制御や癌治療などへの応用が期待できる。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

〔学会発表〕(計 33 件)

〔図書〕(計 0 件)

#### 6 . 研究組織

##### (2)研究協力者

研究協力者氏名：梅木 伸久

ローマ字氏名：UMEKI, NOBUHISA