

実施課題名: 低分子量GTPase Rac1の細胞内動的構造解析

【背景】これまでのin vitroにおける解析から、低分子量GTPase Rac1はGDP結合型においてMg親和性の異なる2つの状態(A stateとB state)の平衡にあり、発がん性変異体P29Sでは平衡がMg低親和性のB stateに偏ることでGTP型への交換速度が上昇することが明らかとなっている。一方で、実際にRac1が機能する細胞内ではRac1を標的とする制御因子、および高濃度の分子混雑環境における排除体積効果などの影響から、in vitroとは異なる構造平衡にある可能性が考えられる。本課題では細胞内環境下におけるRac1の構造平衡をin-cell NMR法を用いて解析することにより、細胞内の分子混雑環境がRac1の動的構造に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【実施内容】Ileを選択的に $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ 標識したRac1をHeLa S3細胞内に導入し、生細胞内環境下におけるRac1のNMRスペクトル(in-cell NMRスペクトル)を取得した。(Fig.1a,b) GTP結合型とGDP結合型で異なる化学シフトを示すNMRシグナルの強度比に基づいてGTP結合型割合を算出した結果、細胞内のGTP結合型割合はin vitroに比べて顕著に減少していることが分かった(Fig.1b)。また、先行研究によりGDP結合型のI33のNMRシグナルはA state, B state間のfast exchangeを反映することが示されていることから、このシグナルについて細胞内とin vitro間で比較するとI33のNMRシグナルがA stateの存在割合の増加を示す化学シフト変化(Fig.1b)と構造交換速度の低下を示す線幅の増大の両方(Fig.1c)が観測されたことから、細胞内ではRac1の構造平衡がin vitroと異なっていることが明らかになった。

次に、この構造平衡の変調が細胞内でのRac1の活性化型割合の低下に寄与していると考え、どのような細胞内の作用が構造平衡の変調を引き起こしているのかを解析した結果、細胞内分子との特異的な相互作用により細胞内のRac1はGDPの解離が遅いA state構造の存在割合が増加している一方で(Fig.2a)、分子混雑環境下は構造交換速度の低下、すなわちにGDP結合状態の構造の安定化に寄与していることが明らかになった(Fig.2bc)。以上から、細胞内ではこれらの要因による動的構造平衡の変化が同時に生じており、その結果として細胞内ではGDPの解離に伴うGTP結合型への活性化が抑制されていることが明らかになった。

Fig. 1

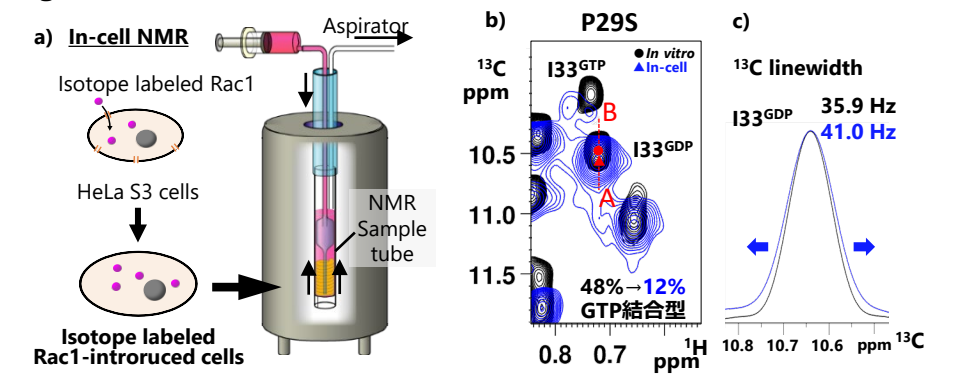


Fig.1 a) Rac1の細胞内導入とIn-cell NMR測定の概略図。b, c) in-cell, in vitro NMRスペクトルの重ね合わせによる化学シフト(b)および ^{13}C 方向の線幅の比較(c)。

Fig. 2

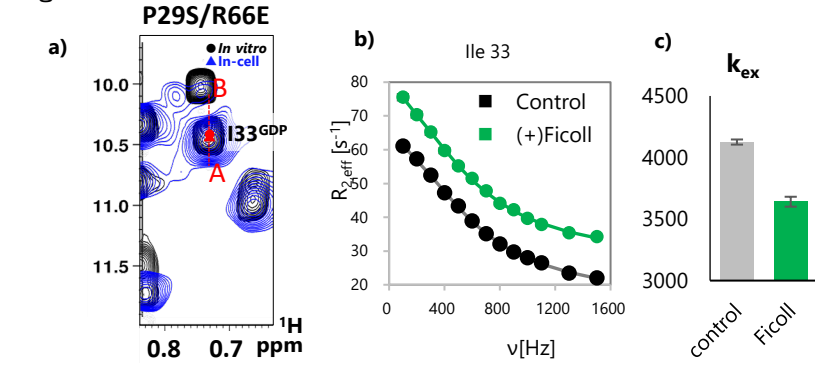


Fig.2 a) 細胞内因子結合部位を変異させたP29S (R66E) 変異体のin-cell, in vitro NMRスペクトル比較。b, c) 分子混雑環境下におけるCPMG緩和分散解析(b)と交換速度の比較(c)。

NMR プラットフォーム
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF21-01-038			
利用課題名	低分子量 GTPase Rac1 の細胞内動的構造解析			
所属機関	千葉大学			
所属部署	大学院薬学研究院			
役職・氏名	役職	教授	氏名	西田 紀貴
利用実施時期、及び期間	2022 年 2 月 1 日～2024 年 2 月 28 日			
	総利用日数: 20 日			
	☒ 当初計画どおり・ ☐ 当初計画変更 (変更理由)			

1. 本課題の概要・目的

細胞内は多種多様な生体高分子が混雑して存在する分子夾雑系であり、内在性の制御タンパク質による活性調節や分子混雑効果により、タンパク質の構造や活性は細胞内と in vitro で必ずしも一致しないことが明らかになりつつある。申請者はこれまでに細胞内環境下におけるタンパク質の構造情報を原子レベルで観測可能な In-cell NMR 法に関して、哺乳細胞に高効率で標的タンパク質を導入する手法や、細胞を生理的に保持したまま長時間の In-cell NMR 観測を可能とするバイオリアクター装置の開発を行ってきた。さらに開発した In-cell NMR 技術を低分子量 GTPase の Ras に適用し、細胞内における活性型 (GTP 結合型) 割合のリアルタイム観測から細胞内における Ras の活性パラメーターの定量に成功している。本課題では、低分子量 GTPase の Rac1 を解析対象として、野生型および発がん性変異体の In-cell NMR 観測を行い、細胞内における GTP 型割合の定量や Rac1 の動的構造解析からその発がん性メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 成果の概要

実施内容

これまでの in vitro における解析から、GDP 結合型の Rac1 は Mg 親和性の異なる 2 つの状態 (A state と B state) の平衡にあり、発がん性変異体 P29S では平衡が Mg 低親和性の B state に偏ることで GTP 型への交換速度が上昇することが明らかとなっている。一方で、実際に Rac1 が機能する細胞内では Rac1 を標的とする制御因子、および高濃度の分子混雑環境における排除体積効果などの影響から、in vitro とは異なる構造平衡にある可能性が考えられる。この Rac1 の動的構造平衡が細胞内分子混雑環境下でどのような状態にあるかを調べるため、次の方法で細胞内環境下における Rac1 の in-cell NMR 法による解析を行った。

Ile の $\delta 1$ 位メチル基を選択的に ^1H , ^{13}C 標識した Rac1 P29S を大腸菌発現系によって調製し、同位体標識 Rac1 を Streptolysin O を用いた膜透過処理により HeLa S3 細胞内に導入した。得られた細胞をゲルに封入した状態で NMR サンプル管内に培地を灌流しながら NMR スペクトルを取得した。上記の in-cell NMR 測定の結果、細胞内に導入した Rac1 の 10 個の Ile 残基由来のシグナルが観測され、GTP 結合型と GDP 結合型で異なる化学シ

フトを示す Ile のシグナル強度比に基づいて細胞内での GTP 結合型割合を 12%と算出した。一方 in vitro で細胞内と同様に遊離 GTP 濃度を一定に保った状態での GTP 結合型割合は 48%であり、細胞内での GTP 結合型割合は in vitro と比較して大幅に低下していた。また、細胞内で GDP 結合型 Rac1 の構造平衡状態がどのように変化するかを調べるため、2 状態の量比に応じて化学シフトが変化する I33 のシグナルについて in vitro における Rac1 のスペクトルと比較した。その結果細胞内では I33 の化学シフト変化が生じており、その変化の方向から細胞内では A state の存在割合が増加していることが分かった。さらにシグナル線幅については交換状態にない I111 などのシグナルに比べて細胞内では in vitro よりも増大していたことから二状態間の構造交換速度が低下していることが分かった。したがって Rac1 は細胞内では in vitro と異なった動的構造平衡状態にあることが本解析により明らかになった。

本課題により得られた成果と当初目標との比較

上記の解析により、当初目標で期待されたように細胞内環境下では Rac1 の構造平衡が in vitro の希薄環境下に比べて様々に変調することを示すことができた。そこで、この細胞内での GDP 結合型 Rac1 の構造平衡の変調が GDP-GTP 交換速度の低下を引き起こし、その結果細胞内での Rac1 の GTP 結合型割合の低下に寄与していると考え、どのような細胞内の作用が構造平衡の変調を引き起こしているのか明らかにするために解析を進めた。

まず、細胞内制御因子による特異的な相互作用に着目して、制御因子との相互作用に重要な switch2 領域に変異を導入した R66E 変異体を用いて in-cell NMR 解析を行った。その結果、R66E 変異体では I33 の線幅の増大は変異前と同様に観測された一方で細胞内の I33 の化学シフトは変異導入前とは異なり in vitro と近い値を示した。このことから細胞内の Rac1 は Rho-GDI を始めとした制御因子との相互作用により GDP の解離が遅い A state 構造の存在割合が増加していることが分かった。次に、細胞内環境下の分子混雑環境における排除体積効果の影響に着目して、分子混雑環境を再現する crowder 分子 (Ficoll)存在下での NMR スペクトルを解析した。その結果、分子混雑環境では I33 の化学シフト変化は起きない一方で、細胞内と同様に線幅の増大が生じていることが分かった。実際に分子混雑環境下で GDP 結合型 Rac1 の構造交換速度定数 k_{ex} の変化を定量するため、CPMG 緩和分散解析を行った結果、GDP 結合型 Rac1 の k_{ex} は分子混雑環境下では 11%低下していることが分かった。構造交換速度の低下は構造交換のためのエネルギー障壁の増大を意味することから、細胞内の Rac1 は排除体積効果により GDP 結合状態の構造の安定化が生じていると考えた。以上の結果から、細胞内では制御因子との相互作用による A state の増加と排除体積効果による GDP 結合状態の安定化が同時に生じていることが明らかになり、いずれの変化も GDP の解離に伴う GTP 結合型への活性化の抑制に寄与していると考えた。

成果発表

学会発表:

①小林航 **Elucidation of the structural dynamics underlying the intracellular regulatory mechanism of Rac1 activation state by in-cell NMR analysis** クロススケール新生物学 第 1 回若手の会 2022 年 11 月(優秀発表賞を受賞)

② 小林航、趙慶慈、道内克宗、外山祐樹、上田卓見、竹内恒、嶋田一夫、西田紀貴 **Elucidation of the structural dynamics underlying the intracellular regulatory mechanism of Rac1 activation state by in-cell NMR analysis** 第 45 回日本分子生物学会年会 2022 年 11 月

③Qingci Zhao, Katsuhiro Donai, Wataru Kobayashi, Yuki Toyama, Takumi Ueda, Koh Takeuchi, Ichio Shimada, Noritaka Nishida **“Elucidation of the structural dynamics underlying the intracellular regulatory mechanism of**

④小林航、趙慶慈、道内克宗、外山祐樹、上田卓見、竹内恒、嶋田一夫、西田紀貴 “Elucidation of the structural dynamics underlying the intracellular regulatory mechanism of Rac1 activation state by in-cell NMR analysis” 2023年11月（若手ポスター賞を受賞）

今後の展開

今後は分子混雑環境下において、どのような機序で構造安定性の上昇や GDP の解離を抑制する構造変化が生じているのかを詳細に明らかにするために、GDP 解離の中間体構造に着目して解析する。また、本課題で解析対象とした P29S 以外にも N92I 変異体など P29S とは異なる機序で GTP 結合型へ活性化されやすい変異体が知られている。今後は Rac1 の他の発がん性変異体についても細胞内環境が Rac1 の動的構造に対し与える影響を解析して比較する。

一方、細胞内におけるタンパク質の動的構造に関して直接解析した研究はこれまでにほとんど報告されていない。本研究で確立できた細胞内での動的構造平衡の in-cell NMR 解析法をその他のタンパク質についても本手法を応用することにより、実際にタンパク質が機能している分子混雑環境下における動的構造平衡状態を解き明かすことができると期待される。

3. 社会・経済への波及効果の見通し

GTPase の遺伝子変異によるシグナル伝達経路の異常活性化は細胞のがん化の主要な原因であり、重要な創薬標的として様々な研究が行われている。特に Ras については近年一部の RAS 変異体の GDP 結合型に対して共有結合し、GTP 結合型への活性化を阻害する医薬品が上市されている。一方で Rac1 を標的とした活性化阻害についての開発は進んでいない。先行の NMR を用いた動的構造の研究から GDP が解離しやすい Rac1 の B state には化合物が結合できる可能性のある隠れたポケット(cryptic pocket)が存在することが示唆されている。本研究において細胞内での Rac1 の動的構造を直接解析する手法を確立したことは、様々な分子が夾雑する細胞内でも特異的に機能するような cryptic pocket を標的とした分子の開発に役立つと考えている。

4. 利用における感想(改善要望等を含む)

サンプル調製、NMR 測定、データ解析やその後の解釈に至るまで、幅広いご支援をいただきました。特に In-cell NMR の場合は、細胞調製をオンサイトで行う必要があるため、NMR 測定以外の細胞調製に必要な機器を使わせていただけるのは大変有難いです。

5. 今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待

今後も高磁場装置の共通利用の継続をお願いできればと思います。

6. 成果公開延期の希望の有無

(○) あり : () なし

「あり」の場合理由:

現在投稿論文の作成中であるため。

7. その他

8. 利用施設

東京大学

溶液 800MHz

利用期間 1: 2022 年 3 月 1 日～2022 年 3 月 5 日

利用期間 2: 2022 年 4 月 1 日～2022 年 4 月 5 日

利用期間 2: 2023 年 4 月 1 日～2022 年 4 月 10 日

9. その他の利用施設