



## G タンパク質の活性化を蛍光で可視化する方法を開発

### ○ 概要

秋田大学(学長：南谷佳弘)大学院医学系研究科の前田深春助教、荒川将志助教、小松幸恵技術専門職員、齋藤康太教授は、生きた細胞内の低分子量 G タンパク質の活性化を蛍光で可視化する新たな方法を開発しました。

低分子量 G タンパク質は細胞内で分子スイッチとしてはたらき、細胞の増殖、分化、細胞内輸送といったさまざまな機能を制御するタンパク質です。低分子量 G タンパク質の活性化制御が破綻すると、がんや糖尿病、神経変性疾患などの重篤な疾患を引き起こすため、細胞内での G タンパク質の活性化状態を把握することは大変重要です。しかし、これまでの方法では生きた細胞内の内在 G タンパク質の活性化状態を直接捉えることはできていませんでした。

本研究では、低分子量 G タンパク質にペプチドをゲノム編集によって導入することで、生きた細胞内での低分子量 G タンパク質の活性化を蛍光として可視化する技術を新たに開発し、SAIYAN (Small GTPase ActIvity ANalyzing) システムと命名しました。この研究成果は日本時間 8 月 5 日 23 時に米国の科学雑誌 Journal of Cell Biology にオンライン掲載されました。

今後 SAIYAN システムを用いることで、さまざまな低分子量 G タンパク質の活性化を蛍光として測定できるため、低分子量 G タンパク質の制御破綻によって生じる多くの疾患の治療法開発などに役立つことが期待されます。

### ○ 研究の背景

低分子量 G タンパク質は、GDP 結合型 (スイッチ・オフ) と GTP 結合型 (オン) を行き来することで分子スイッチとしてはたらき、細胞の増殖や分化、細胞骨格、細胞内膜輸送など、さまざまな細胞応答を制御するタンパク質です。これまで、細胞内の低分子量 G タンパク質の活性化を検出する方法はいくつか知られていましたが、直接内在の低分子量 G タンパク質の活性化をリアルタイムで検出することはできていませんでした。

ほとんどの低分子量 G タンパク質は、GDP と結合した不活性化時には細胞質に存在しますが、活性化して GTP 結合型になると細胞内のさまざまな膜へと局在化し、その機能を発揮します。われわれはこの性質を利用し、ホルモンやコラーゲンなど小胞体からの分泌に関わる低分子量 G タンパク質である Sar1 の活性化を細胞内でリアルタイムに蛍光として検出することを試みました。

## ○ 研究結果

### 【SAIYAN システムの原理】

Sar1 は GTP 結合型の活性化状態となると、小胞体膜に結合し、小胞体からの分泌を担う COPII 被覆小胞の形成を促進します。そこで、Sar1 遺伝子の C 末端に蛍光タンパク質 mNeonGreen の一部を融合させた細胞をゲノム編集技術によって作製し、残りの蛍光タンパク質を小胞体膜上に発現させることで、小胞体膜に結合した Sar1 のみが mNeonGreen の蛍光として検出される系を構築しました。また、このシステムを SAIYAN (Small GTPase ActIvity ANalyzing) システムと命名しました(図 1)。

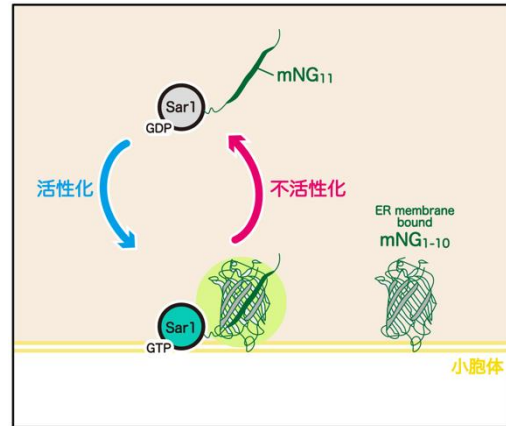


図1 SAIYANシステムの原理

### 【SAIYAN システムの評価】

Sar1 に SAIYAN を導入した細胞を観察すると、細胞内に点状に光る mNeonGreen 蛍光が観察されました。この蛍光パターンは、COPII 被覆小胞の形成場所である ER exit site のマーカーである Sec16 と共局在したことから、Sar1 は ER exit site において活性化していることがわかりました。また、Sar1 の活性化因子である Sec12 を発現抑制した細胞においては、mNeonGreen のシグナルは有意に減少していました。この結果は、活性化した Sar1 のみが蛍光として検出されていることを示唆しています(図 2)。

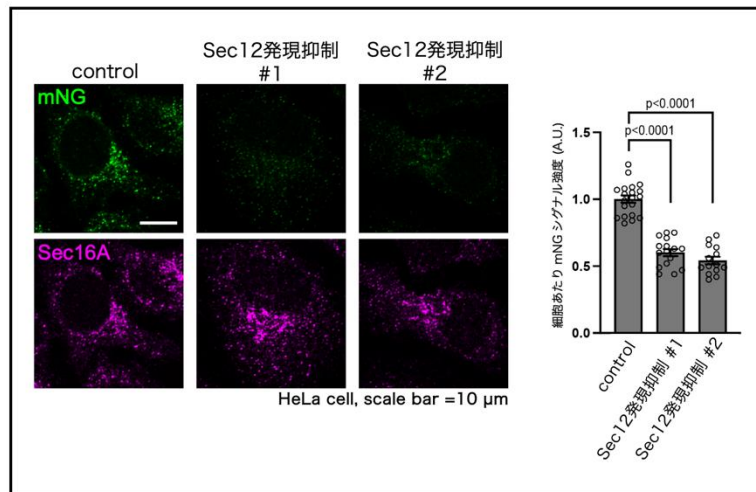


図2 Sec12発現抑制によってmNeonGreenシグナルは有意に減少する

### 【SAIYAN システムの応用：コラーゲン分泌時の Sar1 の活性化状態】

コラーゲンは、小胞体内で翻訳後すぐに巨大な複合体を形成するため、通常の COPII 被覆小胞に入りきらない巨大分子です。われわれはこれまで、コラーゲンの分泌時には Sar1 の活性が厳密に制御される可能性を示してきましたが、実際の Sar1 の活性化状態は不明でした。そこでヒト皮膚線維芽細胞由来の細胞株 BJ-5ta 細胞に SAIYAN システムを導入することで、コラーゲン分泌時の Sar1 の活性化状態の観察を行いました。その結果、BJ-5ta 細胞

では活性化 Sar1 が ER exit site を超えた領域まで広く分布していることが明らかになり、コラーゲン分泌の際には、通常の分泌の際と比べて、より多くの Sar1 が活性化している可能性が示されました(図 3)。

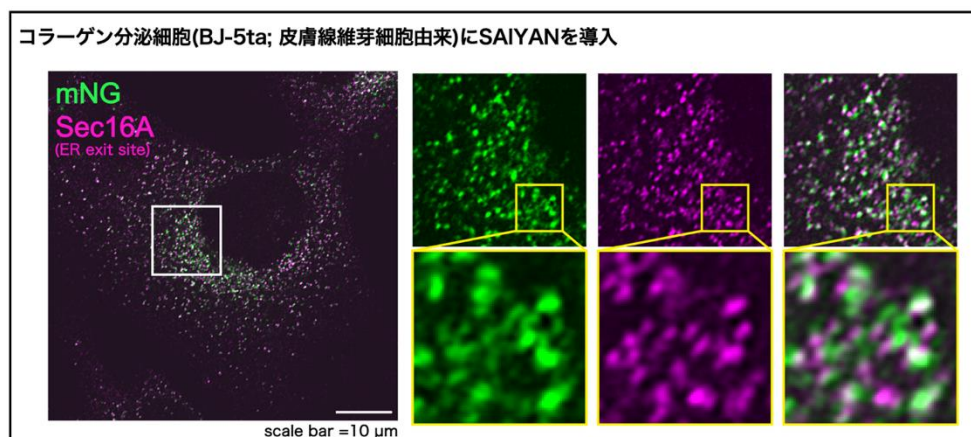


図3 コラーゲン分泌時の活性化Sar1の局在

#### ○ 本研究の意義と今後の展開

本研究により、これまで不明だった Sar1 の活性化状態を細胞内で可視化することに、はじめて成功しました。また SAIYAN システムを応用することで、コラーゲン分泌時に活性化 Sar1 が特異的な局在を示すことが明らかになりました。SAIYAN システムは特定のオルガネラで活性化する低分子量 G タンパク質に汎く応用可能です。今後 SAIYAN システムをさまざまな低分子量 G タンパク質に用いることで、低分子量 G タンパク質の制御破綻によって生じる多くの疾患の治療法開発などに役立つことが期待されます。

#### ○ 原論文

雑誌名 : Journal of Cell Biology

論文題目 : Small GTPase ActIvity ANalyzing (SAIYAN) system: a method to detect GTPase activation in living cells

著者 : 前田深春、荒川将志、小松幸恵、齋藤康太\* (\*責任著者)

Miharu Maeda, Masashi Arakawa, Yukie Komatsu, Kota Saito\*  
(\*corresponding author)

DOI : 10.1083/jcb.202403179

#### ○ 研究支援

日本学術振興会 (JSPS) 科研費、秋田大学研究プロジェクト強化支援事業、内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団、東レ科学振興会、住友財団、鈴木謙三記念医科学応用研究財団、安田記念医学財団、がん研究振興財団、旭硝子財団、高松宮妃癌研究基金、日本応用酵素協会、加藤記念バイオサイエンス振興財団、アステラス病態代謝研究会、稲盛財団、花王芸術・科学財団、小柳財団

#### 【お問い合わせ先】

秋田大学 大学院医学系研究科  
情報制御学・実験治療学講座 教授  
齋藤 康太

電話 : 018-884-6065 / FAX : 018-836-2603

Email : ksaito@med.akita-u.ac.jp