

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07897

研究課題名(和文) 高選択性阻害剤の創出を促進するMAP2Kの自己阻害機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis for auto-inhibition mechanisms of MAP2K

研究代表者

木下 誉富 (Kinoshita, Takayoshi)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90405340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：分子表面システインの置換による安定化及び宇宙実験による結晶高品質化により実現した高分解能X線結晶構造解析により、MAP2K7の2つの自己阻害機構を明らかにした。(1) Cys218-Gly145間のn-^{*}相互作用によるATP非結合型の自己阻害構造を形成する。(2) C末端配列が隣接分子をアロステリックに活性制御する。この知見に基づき設計したペプチド化合物は野生型MAP2K7に酵素阻害活性を示す。

研究成果の概要(英文)：High resolution crystal structure was achieved by the protein stabilization and crystallization in the space and depicted two auto-inhibition mechanisms. (1) The n-^{*} interaction of Cys218 with Gly145 occluded the ATP site. (2) The C-terminal extension bound to the N-terminal region of the adjacent molecules and worked as a negative regulator. A synthesized C-terminal region peptide moderately attenuated the enzyme activity.

研究分野：構造生物学、創薬化学

キーワード：X線結晶構造解析 キナーゼ アロステリック阻害 MAP2K

1. 研究開始当初の背景

Mitogen-activated protein kinase kinase (MAP2K) (MAP2K1 ~ MAP2K7 の7種) は分化増殖あるいはアポトーシスなど細胞の運命を握る、MAPK シグナルカスケードにおいて中心的な役割を果たすキナーゼ群である(図1)。各カスケードの破綻はそれぞれリウマチやガンなどの重篤疾患との関連が深く、MAP2K を標的とした阻害薬の創製研究が進められている。各カスケードはクロストークしないことから、阻害薬を開発するには構造類似性が高いMAP2Kをどう見分けるかが最大の課題となる。

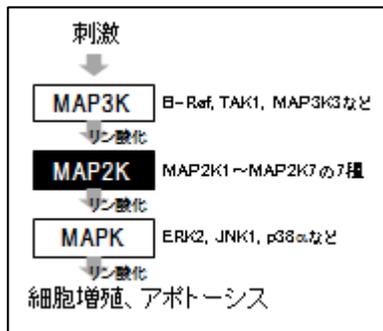


図1 MAPK カスケード

さらにMAP2Kを含めた全518種のキナーゼのATPに対する空間認識パターンはよく保存されており、ある特定のキナーゼを阻害するATP拮抗薬の創出は難しい。そこで、自己阻害構造に生じるアロステリック空間を利用した創薬研究に注目が集まっている。MAP2K1ではN末端制御ドメイン(NRD)が自己阻害構造を制御しており、この構造のATP結合部位近傍に特徴的な空隙が生じる(*Nature Struc. Mol. Biol.* 11 (2004), 1192)。ここに結合する特異的ATP拮抗阻害剤が開発され、BAY869766などの化合物が臨床研究へと進んでいる。なお、これまでにMAP2K4とMAP2K6の自己阻害構造にはこのような空隙は存在しないことを明らかにしている(*J. Biochem.* 151 (2012), 541; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400 (2010), 369)。以上のように自己阻害構造は多様であり、この際に生

じる特異的空間に結合するATP拮抗阻害剤は高選択性が期待できる。

2. 研究の目的

MAP2Kキナーゼ(MAP2K1 ~ MAP2K7)は細胞増殖やストレス応答に関与しており、その破綻はガンなどの重篤疾患に直結する。キナーゼ創薬において、特異的に作用するATP拮抗阻害剤は得難く、近年ATP結合領域外に作用させる戦略が重用される。MAP2K1の研究では、自己阻害構造に生じるアロステリック領域に結合する特異的阻害剤が、低副作用抗ガン剤として臨床段階にある。本研究では各MAP2Kの特異的阻害剤創出への突破口とすべく、X線結晶構造解析及び酵素機能解析によりMAP2K3, MAP2K5, MAP2K7の自己阻害機構を明らかにする。一方、申請者らはMAP2K1(MAP2K2), MAP2K4, MAP2K6の自己阻害機構が互いに異なることを示しており、これらと本研究成果を基盤として、各MAP2Kを分子標的とした高選択性阻害剤を創出していく。

3. 研究の方法

X線結晶構造解析、アミノ酸変異導入及び酵素活性測定によりMAP2Kの自己阻害機構の分子メカニズムを解明する。研究期間内に上記3つのMAP2Kについて、次の(1)~(4)の研究項目を実施する。

- (1) 発現条件、精製条件の最適化を行い、結晶化に適した高純度MAP2Kサンプルを取得する。
- (2) 精製サンプルのみでは不活性で、上流キナーゼの添加で活性を示すことを確認する。
- (3) X線結晶構造解析を行い、自己阻害機構のカギとなるアミノ酸を見出す。
- (4) 当該アミノ酸を変異させて活性化を意図したMAP2K変異体を調製し、酵素機能評価及びX線結晶構造解析により構造化学的な検証を加える。

4. 研究成果

(1) MAP2K7

X線結晶構造解析の結果、不活性体 MAP2K7 は ATP 非結合型の自己阻害構造を有することが示唆された。Cys218 と gly-rich loop 上の Gly145 に形成された n- σ^* 相互作用がこの構造を安定化している (図 2 左)。その結果として、ATP 結合部位が閉じて極端に狭くなり、ATP の結合を阻害すると考えられる。実際に、C218S 変異体では ATP 結合部位が開いた状態に移行する (図 2 右)。Cys218 は他の MAP2K には保存されておらず、Cys218 を介した自己阻害機構は MAP2K7 特有であると結論される。

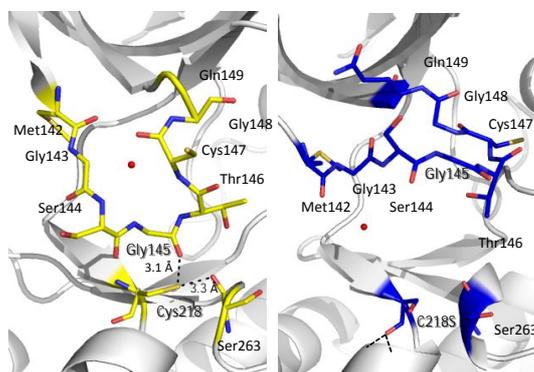


図 2 野生型 (黄) 及び C218S 変異体 (青) の Gly-rich loop の構造

さらに、JAXA の協力を得ながら国際宇宙ステーション「きぼう」において高品質化 C218S 結晶を調製し、1.3Å という高分解構造解析に成功した。得られた高精度構造から、C 末端配列が関与する、Cys218 が関与する機構とは異なるアロステリック活性制御機構が明らかとなった (図 3)。

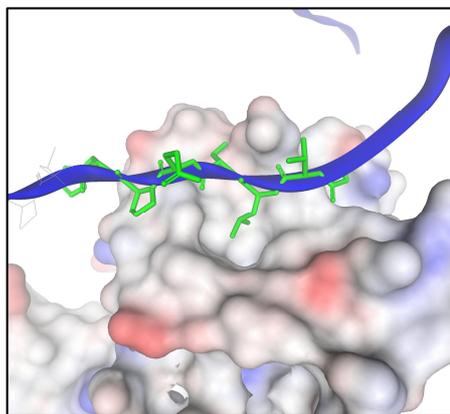


図 3 C 末端配列 (緑) が隣の分子に結合して形成される自己阻害構造

この知見に基づき設計したペプチド化合物は野生型 MAP2K7 に酵素阻害活性を示した。

今回見出した MAP2K7 の 2 つの自己阻害機構は MAP2K1 (2K1), MAP2K4, MAP2K6 のものと全く異っており、高選択性 MAP2K7 阻害剤の創出に向けた有力知見である。

(2) MAP2K3, MAP2K5

アフィニティーカラム及び陰イオン交換カラムを組合せた高純度精製法を確立した。ATP アナログとの複合体を調製し、結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、それぞれ結晶を得ることに成功した (図 4)。放射光施設において X 線実験を行ったところ、MAP2K3 では 3 Å 分解能、MAP2K5 では 8 Å 分解能の回折点を観測した。今後、結晶化条件を最適化して結晶の高品質化を図り、構造解析を実施する。

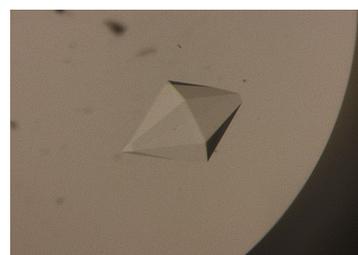


図 4 MAP2K3 の結晶

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

以下、本報告内容と関連の深い 4 件を抜粋

- (1) T. Kinoshita, T. Hashimoto, Y. Sogabe, T. Matsumoto, M. Sawa, High-resolution structure discloses the potential for allosteric regulation of mitogen-activated protein kinase 7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493** (2017), 313-317. 査読有 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.025)
- (2) 木下誉富、キナーゼを標的とした構造生物学および創薬の現状、*日本結晶学会誌* **59** 巻 (2017), 174-181. 査読有 (DOI: 10.5940/jcrsj.59.174)
- (3) Y. Sogabe, T. Hashimoto, T. Matsumoto, Y. Kirii, M. Sawa, T. Kinoshita, A crucial role of Cys218 in configuring

an unprecedented form of MAP2K7, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473** (2016), 476-481. 査読有
(DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.036)

- (4) Y. Sogabe, T. Matsumoto, T. Hashimoto, Y. Kirii, M. Sawa, T. Kinoshita, 5Z-7-oxozeanol covalently binds to MAP2K7 at Cys218 in an unprecedented manner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25** (2015), 593-596. 査読有
(DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.011)

〔学会発表〕(計 44 件)

以下、本報告内容と関連の深い8件を抜粋

- (1) 村川優花、宮園真吾、曾我部祐里、澤匡明、木下誉富、MAP2K3 の活性測定方法の開発及び結晶化条件の探索、第 17 回日本蛋白質科学会年会 (2017 年)
- (2) 村川優花、宮園真吾、曾我部祐里、澤匡明、木下誉富、自己阻害型 MAP2K3 の X 線結晶構造解析、日本結晶学会平成 29 年度年会 (2017 年)
- (3) 木下誉富、宇宙実験による MAP2K7 キナーゼの結晶高品質化及び X 線構造解析、AIST/JAXA 研究交流会～産学それぞれの立場から見たタンパク質結晶構造解析への期待～ (2017 年)
- (4) 橋本拓磨、曾我部祐里、松本崇、木下誉富、MAP2K7 の安定変異体の取得及び高分解能 X 線結晶構造解析、日本結晶学会平成 28 年度年会 (2016 年)
- (5) 橋本拓磨、曾我部祐里、松本崇、木下誉富、分子表面システイン置換による MAP2K7 の安定変異体の取得、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (2015 年)
- (6) 曾我部祐里、橋本拓磨、松本崇、木下誉富、ヒト MAP2K7 の自己阻害構造の解明、第 15 回日本蛋白質科学会年会 (2015 年)
- (7) 曾我部祐里、橋本拓磨、松本崇、木下誉富、Cys218 がカギとなる MAP2K7 の自己阻害構造、日本結晶学会平成 27 年度年会 (2015 年)
- (8) 橋本拓磨、曾我部祐里、松本崇、木下誉富、分子表面システインによる MAP2K7 の安定化と構造要因、日本結晶学会平成 27 年度年会 (2015 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 構造生物学分野 / 木下グループ
http://www.b.s.osakafu-u.ac.jp/~kino_t/index.html
- (2) 新しい医薬品のデザインにつながる宇宙実験成果を紹介
http://iss.jaxa.jp/kiboexp/news/180110_ltpcg.html

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
木下誉富 (Takayoshi Kinoshita)
大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：90405340

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者