

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870041

研究課題名（和文） 上皮成長因子キナーゼインヒビターの最適化

研究課題名（英文） Methods to improve inhibitors targeted to EGFR kinase

研究代表者

PARKER LORIEN (PARKER LORIEN)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号：60604999

研究成果の概要（和文）：

本課題では、立体構造に立脚したドラッグデザインの手法により、非特異的化合物から出発して薬剤改良サイクルでの最適化を経て特異性のある阻害剤の開発を目指している。そのなかの一つとして、特異性のある有力な AMP キナーゼの阻害剤が得られた。GAK については、初年度に得られた結晶化条件をもとに、新たな技術の導入によって十分なサイズの再現性のある結晶が得られ、さらなる結晶化条件の最適化を進めている。EGFR キナーゼ複合体については、二重変異体と AMP-PNP の立体構造に基づいたインシリコスクリーニングによって見いだされた複数の新規阻害剤候補の結晶化を進めた。

研究成果の概要（英文）：

We developed an AMP-kinase inhibitor through three rounds of optimization from a non-specific compound through to a specific and potent compound using structure guided drug design. For GAK significantly larger and more reproducible crystals were obtained but diffraction is still limited to 8Å. Further optimization of crystallization conditions is underway. Despite optimization, the EGFR kinase complexes did not show any electron density for the inhibitors. Currently, a new set of inhibitors, identified in 2013, through in silico screening using our double mutant AMP-PNP structure, have just entered crystallization trials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：Crystallography, Rational Drug Design, kinase inhibitor, Resistant mutants, EGFR Kinase, GAK, AMP Kinase

1. 研究開始当初の背景

現在、癌治療に使用されているヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) のキナーゼ活性阻害剤には、副作用や患者の薬剤耐性獲得という問題がある。主に、GAK のような他のキナーゼと EGFR のキナーゼ活性阻害剤が結合することがその要因と考えられる。EGFR や GAK の自然突然変異が阻害剤感受性/耐性の増減を引き起こす要因を理解することにより、阻害剤の改良が可能になると考えられる。AMP キナーゼ (AMPK) は代謝関連疾患および糖尿病に対する標的タンパク質として研究されている。以上、3種類のキナーゼの立体構造解析に基づく阻害剤開発は病気の治療に使う可能性にある新規阻害剤の発見に結びつくことが期待される。

2. 研究の目的

本課題は、EGFR のキナーゼ活性阻害剤の副作用や患者の薬剤耐性獲得といった問題に対し、結晶学的手法と医薬品化学的手法を用いて、合理的な癌治療薬の設計を目指す。EGFRK、GAK、AMPK といったキナーゼの阻害剤のヒット化合物とターゲットとするタンパク質の複合体の構造解析を目指す。

3. 研究の方法

一般に、合理的薬剤設計の戦略は3つのステージ (I: 化合物スクリーニング、II: 複合体の構造解析による阻害剤改良、III: 阻害剤の最適化と複合体の構造解析によるリード化合物開発) からなる。キナーゼと化合物の複合体の構造解析情報をもとにしたインシリコスクリーニングで得られる阻害剤の高分解能の結合情報を含む回折データを得るための結晶化条件の最適化を行い、キナーゼタンパク質と阻害剤の結合部位の情報を獲得する。次に、これらの阻害剤の構造情報を基に、新規化合物の設計・合成を行い複合体の結晶化を行う。

4. 研究成果

2年間の研究成果

キナーゼタンパク質と阻害剤の複合体の立体構造情報を基に、インシリコスクリーニングにより6種類のEGFR阻害剤を同定し、結晶化試験用に購入した。最初のソーキングで得られた結晶は、すべてサイズの小さな結晶で回折が弱かった。2011年度は、これらの結晶から得られた回折データでは、予測された阻害剤結合部位には、いずれも少ししか、あるいはまったく電子密度が見いだされなかった。それに加えて、回折データ強度は弱く、それに比して低分解能であった。結晶化

条件を最適化するためにさらに結晶化スクリーニングを行ったところ、サイズのより大きなしかも回折能のよい結晶が得られた。このように結晶サイズとモルフォロジーの改善が見られたにもかかわらず、阻害剤の結合部位の情報は獲得できなかった。共結晶条件のスクリーニングも行ったが、これらの実験からもよい結果が得られなかった。そこで、2012年度の開始時に、少し条件を変えて再度インシリコスクリーニングを行い、新規阻害剤が同定された。これらの中から、野生型あるいは変異体に対して選択性のある6種類ほどの新規阻害剤を選び、結晶化を進めた。AMPNPとの複合体やGefitinibとの複合体の例のように、これらの阻害剤との複合体の構造解析が成功することによって、選択性のより高い、より有効な阻害剤修飾部位が同定できるようになることが期待される。

GAK L120F 一塩基多型はEGFRK阻害剤であるGefitinibに対して高い感受性をもつ。このように特異性が増加する要因を解明するために、野生型GAKとL120F変異体の両方の立体構造解析を実行したいと考えた。2011年度はGefitinib-GAKキナーゼの変異体あるいは野生型の結晶化条件の最初のスクリーニングでは、サイズの小さい、再現性のない結晶しか得られず、扱っている途中で壊れてしまった。そこで、新たな結晶化条件の同定あるいは従来の結晶化条件の改善を試みるため、2012年度は、ランダムマトリックス法によるスクリーニングを実施した。この方法により、サイズの小さい、予備的な結晶を利用し、これらの結晶を砕いて小さな種結晶を調製した。野生型と変異体に対してスクリーニングが行われた、ほぼ400種類のすべての結晶化条件に、これらの種結晶を加えた。

これらの種結晶は、初期段階の結晶成長それ自体としては適切ではないと思われる条件のもとで結晶成長を促進した。この手法を利用して、結晶の堅牢性と同様に、結晶のサイズやモルフォロジーなどの結晶化条件の数を増やした (図1)。このような最適化を行い、結晶化条件の異なる30種類の結晶を試したところ、分解能は8Åであった。そこで、温度、タンパク質濃度、および結晶成長技術のさらなる最適化の研究を現在進めている。また、さらに異なる抗凍結剤や抗凍結技術の探索を進めている。

すでに構造が解かれているAMPKとCompound Cとの複合体の構造情報を使用して2011年度よりインシリコスクリーニング実験を行った。阻害剤候補としてCompound 1が同定された。実際、Compound 1はAMPKの全長と同様に、キナーゼドメインに対して強い阻害効果を示したが、しかしこの効果は、非特異的で、想定外であった。

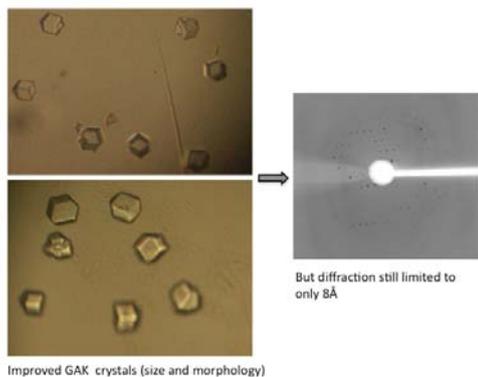


図 1

キナーゼドメインと Compound 1 との複合体の立体構造情報を使用して、より特異的な複数の阻害剤候補を開発するために、2012年度はこの化合物との複合体の構造を 2.9 Å の分解能で解いた(図 2 中央)。

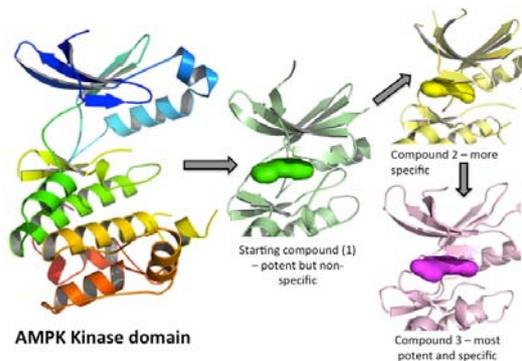


図 2

この立体構造を基に化合物改良を行い、一連の新たな化合物が合成された。化合物の“足場 (scaffold)”の左側を、いろいろな置換基に置き換えると、化合物の性質が著しく変化した。チアゾール基の代わりに MeO 基を有する Compound 2 は、Compound 1 に比べて特異性の増大がみられた。この化合物との複合体の立体構造を 1.75 Å の分解能で解いた(図 2 右上)。

この構造情報から、MeO 基は Met164 (この残基は Compound 1 の非特異性に寄与していた可能性がある) とジスルフィド結合を形成しないことが明らかになった。Compound 2 は Compound 1 と比べてヒンジ領域により接近し

て相互作用をしていた。この次の阻害剤最適化のラウンドにおいて、“足場”の右側の位置へのメチル基付加の影響を調べた。ほとんどの場合、メチル基の付いた化合物は、この位置に水素だけが付いている同等の化合物と比較して、特異性が增大していた。

Compound 3 は左側にピラゾール基を、右側にメチル基を有しており、Compound 1 と Compound 2 よりも特異性と阻害効果がより著しく増大していた。この化合物との複合体の構造を 2 Å の分解能で解いた。C-lobe 残基の Asp157 と 1 本の水素結合相互作用していることが、他の多くの C-lobe 残基との疎水性相互作用とともに、明らかになった(図 2 右下)。また、ヒンジ領域と最も大きな疎水性相互作用を有していた。

これらの結果は現在、論文に執筆を予定している。本研究は、インシリコスクリーニングから得られる比較的非特異的なヒット化合物から出発して、疾病における治療のための特異的な阻害剤候補に到達するという、いわゆる、構造から導くドラッグデザインがいかに有用であるかを表している(図 2)。

以上の実験の過程において、蛍光性物質を利用した新規なスクリーニング技術を開発した。この化合物は、キナーゼタンパク質溶液に入れると蛍光性タンパク質結晶を形成する、蛍光性キナーゼ阻害剤として見いだされた。本課題では、複数の化合物をこのようなタンパク質結晶に浸漬させ、キナーゼに結合する化合物、すなわち阻害剤候補との複合体タンパク質結晶の場合は蛍光が消光することを示した(図 3)。

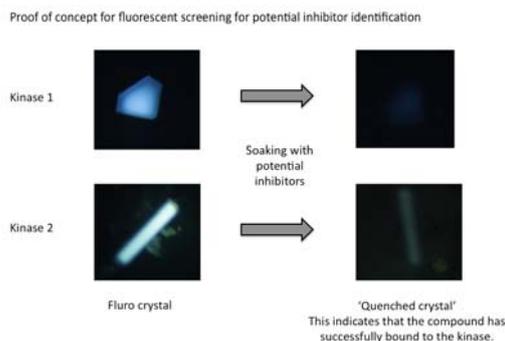


図 3

この方法は、新規な阻害剤との複合体の、回折に適した高品質結晶であれば、蛍光性がないことをすぐに見いだせるという利点がある。この新しい実験手法の詳細についても、論文の執筆を予定している。

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4件)

1) Seiko Yoshikawa, Mutsuko Kukimoto-Niino, Lorien Parker, Noriko Handa, Takaho Terada, Takako Fujimoto, Yumiko Terazawa, Motoaki Wakiyama, Masaru Sato, Satoshi Sano, Tomoyuki Kobayashi, Tetsuo Tanaka, Lirong Chen, Zhi-jie Liu, Bi-cheng Wang, Mikako Shirouzu, Seiji Kawa, Kentaro Semba, Tadashi Yamamoto and Shigeyuki Yokoyama, "Structural basis for the altered drug sensitivities of non-small cell lung cancer-associated mutants of human epidermal growth factor receptor", *Oncogene*, 32 (1), 27-38 (2013). 査読有

2) Lorien Parker, Hisami Watanabe, Keiko Tsuganezawa, Yuri Tomabechi, Noriko Handa, Mikako Shirouzu, Hitomi Yuki, Teruki Honma, Naoko Ogawa, Tetsuo Nagano, Shigeyuki Yokoyama and Akiko Tanaka, "Flexibility of the P-loop of Pim-1 kinase: observation of a novel conformation induced by interaction with an inhibitor", *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 68 (8), 860-866 (2012). 査読有

3) Hirofumi Nakano, Nae Saito, Lorien Parker, Yukio Tada, Masanao Abe, Keiko Tsuganezawa, Shigeyuki Yokoyama, Akiko Tanaka, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe and Tetsuo Nagano, "Rational evolution of a novel type of potent and selective proviral integration site in Moloney murine leukemia virus kinase 1 (PIM1) inhibitor from a screening-hit compound", *J. Med. Chem.*, 55 (11), 5151-5164 (2012). 査読有

4) Keiko Tsuganezawa, Hisami Watanabe, Lorien Parker, Hitomi Yuki, Shigenao Taruya, Yukari Nakagawa, Daisuke Kamei, Masumi Mori, Naoko Ogawa, Yuri Tomabechi, Noriko Handa, Teruki Honma, Shigeyuki Yokoyama, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano and Akiko Tanaka, "A novel pim-1 kinase inhibitor targeting residues that bind the substrate peptide", *J. Mol. Biol.*, 417 (3), 240-252 (2012). 査読有

[学会発表] (計3件)

1) Nakano, H., Saito, N., Parker, L., Tada, Y., Abe, M., Tsuganezawa, K., Yokoyama, S., Tanaka, A., Kojima, H., Okabe, T. and Nagano, T., "Discovery of a potent and selective Pim1 inhibitor by rational compound evolution", EFMC-ISMC2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry / 2012/09/02 - 2012/09/06 / Berlin, Germany.

2) Parker, L., Handa, N., Tomabechi, Y., Shirouzu, M., Tsuganezawa, K., Honma, T., Yuki, H., Tanaka, A. and Yokoyama, S., "Structural studies of Pim-1 kinase inhibitors", *Anticancer Drugs* 2011 / 2011/10/26 - 2011/10/27 / Stockholm, Sweden.

3) Parker, L., Handa, N., Shirouzu, M., Tsuganezawa, K., Honma, T., Yuki, H., Tanaka, A. and Yokoyama, S., "Structural studies of Pim-1 kinase inhibitors", XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (IUCr) / 2011/08/22 - 2011/08/30 / Madrid, Spain.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

P A R K E R L O R I E N (PARKER LORIEN)

独立行政法人理化学研究所・システム研究チーム・研究員

研究者番号：60604999