

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590056

研究課題名(和文)FGFR3病原活性変異体の活性化機構の解明

研究課題名(英文)The activating mechanism of the FGFR3 pathogenic mutants

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではガン細胞特異的に作用する医薬品の開発を促進するために、受容体型チロシンキナーゼFGFR3の病原活性変異体について、機能解析及びX線結晶構造解析を行い、活性化メカニズムの解明を目指した。N540T、K650M、G697C各変異体の $K_m(\text{ATP})$ 値は野生型の0.30～108倍へと大きく変化しており、このことはそれぞれの活性化機構が異なっている可能性を示唆する。一方、X線結晶構造解析に向けて野生型及び変異体について微小結晶を得ている。今後X線構造解析を進めて、各活性変異体の活性化における分子メカニズムを明らかにする。

研究成果の概要(英文)：In order to facilitate drug discovery for cancer, we aim to elucidate the activating mechanism of the FGFR3 pathogenic mutants by the functional and crystallographic analyses. The $K_m(\text{ATP})$ values of N540T, K650M, and G697C mutants varied from 0.30- to 108-fold compared with that of the wild type. The result implies that these mutants are activated via distinguished mechanisms. The exploration of crystallization condition has yielded the micro-crystals of the wild type and mutants. Ongoingly, we will perform the crystal analyses and elucidate the molecular mechanisms for the activation of the active mutants.

研究分野：シグナル伝達蛋白質の構造機能解析および創薬化学研究

キーワード：受容体型キナーゼ 病原活性変異体 X線結晶構造解析 酵素機能解析 FGFR3

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR)は細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通領域、細胞内キナーゼドメインからなるドメイン構造を有しており、細胞外から細胞内へのシグナル伝達を仲介し、繊維芽細胞の増殖・分化を誘導することで傷口の治癒や血管新生などの生命維持機能に大きく貢献している。正常組織において、FGFR はリガンド FGF の細胞外ドメインへの結合をきっかけとして、細胞内ドメインを自己リン酸化して活性化する。一方、ガン組織においては、FGF 非依存的に恒常的活性を示す FGFR 変異体が見つかっている。

FGFR3 には扁平上皮ガン、膀胱ガン組織において、恒常的活性を示す変異体 G697C 及び K650E がそれぞれ発見されている(*Nat. Genet.* **23** (1999), 18; *Int. J. Cancer* **117** (2005), 166)。これらの K650E 及び G697C の変異パターンは他の FGFR で報告されていない。さらに FGFR3 細胞内ドメインの野生型及び恒常的活性変異体の構造研究は進んでおらず、これら FGFR3 恒常的活性変異体が恒常的に活性を示す分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

受容体型チロシンキナーゼ Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) は細胞外から細胞内へのシグナル伝達を仲介し、繊維芽細胞などの増殖・分化を誘導する。正常組織では FGFR はリガンドとなる FGF 依存的に自己リン酸化して活性化する。一方、ガン組織において FGF 非依存的な恒常的活性を示す FGFR 変異体が発見されている。本研究では、X線結晶構造解析、分子生物学的改変及び酵素活性測定を行い、FGFR3 に特有の恒常的活性変異体 K650E 及び G697C の活性化メカニズムを原子レベルで解明する。この成果を基盤として、生命維持に必要である野生型に作用せず、恒常的活性変異体にのみ作用する低副作用抗ガン剤の論理的創出研究が始動する。

3. 研究の方法

(1) 野生型及び活性変異体の調製

野生型 FGFR3 の細胞内ドメインの遺伝子を pGEX6p-1 ベクターに組み込み、GST 融合蛋白質として大腸菌による大量生産を行った。大腸菌を破碎後、グルタチオンカラムにより精製して、粗精製サンプルを得た(機能解析用)。さらに GST を酵素切断、陰イオン交換カラムを用いて高純度化を図った。

活性変異体 (N540T, K650M, G697C) についても野生型と同様にサンプルを調製した。高純度化。C 末の天然変性領域の除去。大

腸菌破碎時に安定化剤。

(2) 酵素機能解析

ELISA 法により、各 ATP 濃度における野生型及び活性変異体の活性を測定した。それぞれラインウィーバーバークプロットにより、 $K_m(\text{ATP})$ 値を導き出した。

キナーゼ活性は、ATP の濃度が低いと最大反応速度 V_{\max} では反応が進まず、逆に過剰な ATP が存在する場合も ATPase 活性を示すことなどによって見掛け上のキナーゼ活性が低下する。このため、正確に V_{\max} の速度を測定し比較することは困難である。そこで、反応速度が理論上 V_{\max} の 1/2 となる ATP 濃度が K_M 値のときの活性を比較し、野生型の活性を 100%とした各変異体の比活性を求めた。

(3) 結晶化条件探索

各タンパク質サンプルに ATP アナログを作用させて安定化させた後に、Hampton Research 社の Crystal Screen HT 及び Index HT を用いて、結晶化条件の初期スクリーニングを行った。さらに結晶化条件すなわち沈殿剤の濃度、pH などを最適化した。

(4) X線回折実験

結晶をドロップから取り出して、抗凍結剤として 20%グリセロールを含む溶液に浸漬して液体窒素下で結晶を処理した。SPring-8 あるいは高エネルギー加速器研究機構において、各結晶を用いて X線回折実験を行った。

4. 研究成果

(1) 蛋白質サンプルの調製

初期検討において、精製サンプルに大腸菌由来のシャペロンが不純物として含まれることが推定された。これらシャペロンは FGFR の不安定構造部分に非特異的に吸着していると考えられた。そこで、C 末端にある天然変性領域を除いて実験を行ったところ、シャペロンの吸着が押さえられる傾向にあることがわかった。さらに大腸菌破碎バッファーに ATP あるいはカゼインを加えることにより、シャペロン吸着の低減に成功した。最終的にはイオン交換カラムを用いてシャペロンの完全除去している。

(2) 機能解析

野生型 FGFR3 のラインウィーバーバークプロットを図 1 に示す。この結果から $K_m(\text{ATP})$ 値を求めた。変異体についても同様のプロットを作成し、 $K_m(\text{ATP})$ 値を求めた。この結果、N540T 及び K650M については野生型のそれぞれ 3 倍、1/3 倍であった(表 1)。ATP 結合にあまり影響を与えていないことから、これらの変異体は野生型と同様のメカニズムを介して活性を示すと考えられる。一方、G697C の K_M 値は野生型の 100 倍以上大きくなっていった(表 1)。つまり、G697C 変

異体ではATP結合が極端に弱くなっており、野生型と異なる活性構造を経て酵素反応が進行すると推察される。

また、G697Cは他の変異体と比較すると高い活性を保っている。これは、ATPとの結合が弱いため回転数が上昇していることが考えられる他、基質との親和性、ADPとの親和性などの違いなども考えられる。

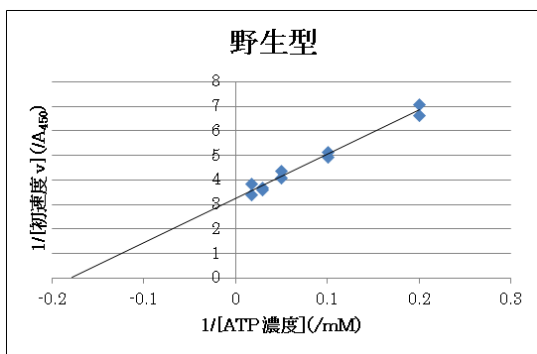


図1 野生型のラインウィーバークプロット

表1 野生型及び変異体の Km 値と比活性

| | Km(ATP) | 比活性 |
|-------|-----------|-----|
| 野生型 | 5.3 ± 0.6 | 100 |
| N540T | 16 ± 5 | 50 |
| K650M | 1.6 ± 0.6 | 7 |
| G697C | 570 ± 230 | 70 |

(3) 結晶化条件の探索

X線結晶構造解析を行い、機能解析から得た知見について分子レベルのメカニズムを明らかにする。

結晶化条件のスクリーニングにより、Index HT スクリーニングの E11 で結晶を得た(図2)。

Index HT/E11

20 mM MgCl₂
0.1 M HEPES pH7.5
20% poly(acrylic acid sodium salt)5100

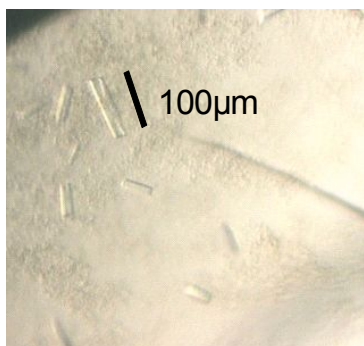


図2 FGFR3/G697Cの結晶

得られた結晶を用いてX線回折実験を行ったところ、8 Å の分解能の回折点を観測した(図3)。今後、構造解析レベルの結晶を得る

ため、結晶化条件の最適化及び結晶性の向上を目指す。

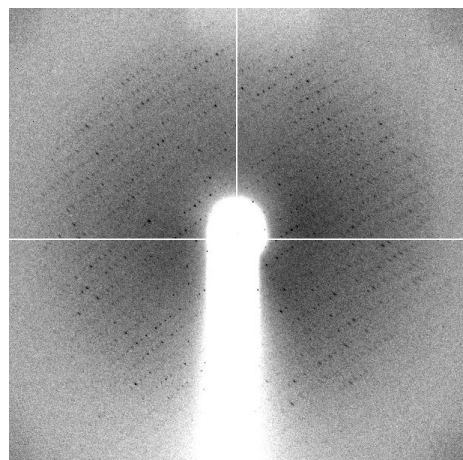


図3 FGFR3結晶から得られたX線回折像

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 9件)

仲庭哲津子、深田はるみ、黒木良太、木下誉富、ヒト MAP キナーゼ JNK1 の立体構造・機能・安定性に対する遊離システイン残基の置換効果、日本結晶学会誌 55 (2013), 197-202. 査読有

Z. Hou, I. Nakanishi, T. Kinoshita, Y. Takei, M. Yasue, R. Misu, Y. Suzuki, S. Nakamura, T. Kure, H. Ohno, K. Murata, K. Kitaura, A. Hirasawa, G. Tsujimoto, S. Oishi, N. Fujii, Structure-based drug design of novel potent protein kinase CK2 (CK2) inhibitors with phenyl-azole scaffolds, J. Med. Chem. 55 (2012), 2899-2903. 査読有

〔学会発表〕(計 27件)

露口正人、力津朗、藤井翔太、木下誉富、病原性 FGFR3 活性変異体の構造機能解析、バイオメディカルフォーラム 2015、2015年1月23日、大阪府立大学(堺市)

露口正人、力津朗、藤井翔太、曾我部祐里、桐井康行、木下誉富、恒常活性を示す FGFR3 病原活性変異体の構造機能研究、平成 26 年度日本結晶学会年会、2014年11月2日、東京大学(東京都)

木下誉富、構造生物学と創薬、第3回和漢研・がん研ジョイントセミナー、アカデミア創薬の心技体、2013年2月15日、金沢エクセルホテル東急(金沢市)

藤井翔太、力津朗、桐井康行、合田正貴、多田俊治、木下誉富、受容体チロシンキナーゼ FGFR3 の X 線結晶構造解析、平成 24 年度日本結晶学会年会、平成 24 年 10 月 25 日、東北大学（仙台市）

〔図書〕(計 2 件)

足立恵理、酒井克也、木下誉富、松本邦夫、HGF-Met 系を標的とするがん創薬の意義と開発、南山堂、次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学、2013 年、全 336 頁(118-125).

木下誉富、X 線結晶構造解析を利用した医薬品開発、シーエムシー出版、タンパク質結晶の新展開 - 新しい育成技術から構造解析・応用へ、2013 年、全 326 頁(205-214).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：キナーゼ阻害剤
発明者：辻本豪三、平澤明、村田克美、藤井信孝、大野浩章、大石真也、鈴木大和、ゾンイエホウ、仲西功、木下誉富
権利者：京都大学、近畿大学、大阪府立大学
種類：特許
番号：特願 2013-503519
出願年月日：平成 24 年 3 月 2 日
国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 誉富 (KINOSHITA Takayoshi)
大阪府立大学・理学系研究科・准教授
研究者番号：9 0 4 0 5 3 4 0

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者