

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860020

研究課題名(和文)チロシンキナーゼの安定同位体標識手法の確立と構造検出型阻害剤結合評価への応用

研究課題名(英文)Development of the method for production of isotope labeled tyrosine kinase and its application to analyze the conformational state for drug discovery

## 研究代表者

小橋川 敬博(Kobashigawa, Yoshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：90455600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では汎用的な安定同位体標識チロシンキナーゼの発現手法の開発と構造検出型阻害剤結合評価法の開発を行った。最初に、大腸菌によるチロシンキナーゼの発現を最適化するための発現ベクター、共発現パートナー、融合タグ、培養条件の検討を行い、効率的な調製手法を構築した。これを、11種類のチロシンキナーゼに対して適用し、8種類において安定同位体標識試料の調製に成功し、本手法の汎用性を確認した。また、選択的安定同位体標識試料を調製し、そのNMRスペクトルを観測することで、チロシンキナーゼの構造平衡状態の検出することが可能であることを確認した。チロシンキナーゼ阻害薬の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tyrosine kinases are key protein for cellular signal transduction. Their abnormal activation is abundantly observed in various human cancers, and thought to be attractive therapeutic targets. NMR is a powerful tool for drug discovery. Its use is, however, quite limited due to availability of the isotope labeled tyrosine kinase by difficulty in production by bacterial expression system. In the present project, we developed the general method for production of the isotope labeled tyrosine kinase, and applied for evaluating conformational state of tyrosine kinase by NMR. Initially, we optimized promoter, fusion-tag protein, culturing condition and co-expression partner, and revealed that isotope labeled catalytic domain of eight tyrosine kinases can be successfully expressed by using E.coli expression system. Moreover, we identified that conformational state could be detected by using selective isotope labeled sample. The present result will contribute for NMR based drug discovery.

研究分野：構造生物化学

キーワード：チロシンキナーゼ NMR 阻害剤 安定同位体標識

## 1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼはタンパク質のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素である。ヒトには97種類が存在し、細胞の分化、増殖、接着、免疫反応など細胞内の様々なシグナル伝達のトリガーとなっている。その活性は厳密に制御されており、発現の亢進、無秩序な活性化、不活性化はがんをはじめとして様々な疾患に関与する。そのため、重要な創薬標的分子となっており、実際に様々なチロシンキナーゼ阻害剤が臨床現場において抗がん剤として使用されている。

チロシンキナーゼの触媒ドメインであるキナーゼドメインはN-ローブとC-ローブの2つの領域からなる(図1)。2つのローブの間にATP結合部位と活性部位が位置し、その近傍には活性化ループとよばれる領域が存在する。チロシンキナーゼは不活性型構造(off-構造)と活性型構造(on-構造)の間の平衡状態にあり、非リン酸化状態ではoff-構造に平衡が偏っている。活性化ループには1つもしくは複数のリン酸化部位が存在し、そのリン酸化により平衡がon-構造へと偏ることで活性化される。

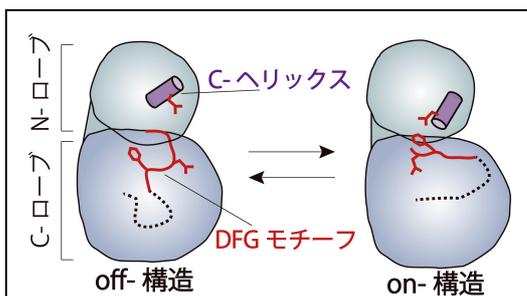


図 1: チロシンキナーゼの off-構造と on-構造の模式図

現在までに、多くのチロシンキナーゼ阻害剤が抗がん剤として認可されている。チロシンキナーゼ阻害剤の大半はATP拮抗阻害剤であるが、それらは大きく2つに分けられる。1つ目は活性型構造(on-構造)のチロシンキ

ナーゼを標的としているもの、2つ目は不活性型構造(off-構造)のチロシンキナーゼを標的としたものである。不活性型構造(off-構造)の方が、チロシンキナーゼ間での立体構造上の差異が大きいため、一般には後者の方がチロシンキナーゼ間での選択性および特異性が高い。そのため、創薬の初期段階において候補化合物が活性型構造(on-構造)と不活性型構造(off-構造)のいずれを標的とした阻害剤であるかを知ることは有用であり、迅速な構造検出型の薬剤結合評価法の確立が必要とされていた。

## 2. 研究の目的

NMRは適切な安定同位体標識試料を用いることで、見たい領域のみを観測できるという特徴がある。安定同位体標識試料を調製するためには大腸菌を用いた大量発現系の構築が不可欠である。チロシンキナーゼは宿主である大腸菌に対して毒性を示すために、可溶性タンパク質として得ることが一般には困難である。海外の大手の製薬企業においては昆虫細胞発現系を用いて安定同位体標識チロシンキナーゼの調製が行われた報告があるが、NMRサンプル1本あたり数百万円~数千万円となっており、現実的なコストではない。そのため、これまでに報告されたNMR解析の例はc-Abl、c-Src、EphB1、CSKに限られていた。そこで、本研究課題では一つ目の目的として、発現ベクターの最適化、共発現ホストの最適化により、汎用的な安定同位体標識チロシンキナーゼの発現手法の開発を目指した。また、選択的安定同位体標識手法を駆使して、薬剤がon-構造とoff-構造のいずれを標的としているかを迅速に検出するための手法、すなわち構造検出型の薬剤結合評価手法の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

大腸菌での大量発現、安定同位体標識試料の調製に成功している FGFR1 のキナーゼドメインでの知見に基づき、マルチクローニングサイトを含む発現ベクターセットを構築する。また、共発現パートナーの最適化のための大腸菌株セットを構築する。これらの中から最適な組み合わせをスクリーニングするためのストラテジーの構築を行い、多くのチロシンキナーゼへの適用を試みる。また、アミノ酸選択的同位体標識試料を用いて、迅速な構造検出型の阻害剤評価手法を構築する。on-構造と off-構造の判別の指標となる残基に着目し、その部分の構造情報の取得のための手法を構築する。具体的にはアミノ酸選択標識を用いて構造状態を迅速に検出する手法を確立する。

### 4. 研究成果

本研究課題では、大腸菌発現系によるチロシンキナーゼの生産の汎用化を行った。そのために、ベクター系を最初に構築した。チロシンキナーゼは大腸菌に対して毒性を示し、かつ、大腸菌体内において不溶性画分として発現される傾向がある。そこで、可溶性への発現効率が高めるために以下の工夫を行った。

- (1) pET 系ベクターに比較して可溶性への発現効率が高い pCold ベクターを利用する。
  - (2) 可溶性タグである、GB1 を付加する。
  - (3) 低温で発現を行う。
  - (4) 適切なシャペロンとの共発現を行う。
- 以上の可溶性を高める工夫に加えて、以下の点について工夫を行った。

- (4) 発現ベクターの大腸菌への保持の安定化のために、市販されているアンピシリン耐

性の pCold ベクターではなく、市販されていないカナマイシン耐性の pCold ベクターを使用する。

- (5) チロシンキナーゼの毒性を抑えることを目的として、チロシン脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）の1種である PTP1B を共発現させる。

図2は、実際に構築した pCold ベースのベクター pColdGK のプラスミドマップである。発現はコールドショックプロモーターである *cspA* により制御される。GB1、精製のための His-tag、タグ切断のための HRV3C プロテアーゼの切断配列、その下流にマルチクローニングサイトがあり、任意のタンパク質の遺伝子を挿入することができる。フォスファターゼについては、ストレプトマイシン耐性のプラスミドである pCDF-Duet1 に遺伝子を挿入し、T7 プロモーターにより発現を制御する。シャペロンの発現については、TAKARA の市販のシャペロンプラスミドセットを用いているが、これらはいずれもクロラムフェニコール耐性である。以上のように、キナーゼの発現ベクター、PTP1B の発現ベクター、シャペロンの発現ベクターではプラスミドのコピー数を制御する複製開始起点、耐性遺伝子が異なっており、同時に大腸菌に保持させることが可能となっている。シャペロンプラスミドはシャペロンタンパク質の組み合わせにより、5種類のベクターがあるが、そのうち、pG-KJE8 および pG-TF2 のみを使用した。シャペロンプラスミドセットではシャペロンタンパク質の誘導の際にテトラサイクリンもしくはアラビノースを使用するが、アラビノースは培地 1L に対して 2g 程度加える必要があり、炭素源となるため、<sup>13</sup>C で標識した試料を調製する際には使用できない。本研究課題では 10 種類のチロシンキナーゼで確認し

たところ、GroEL/GroES、もしくはGroES/GroEL/TFのいずれかを共発現させた場合が最も可溶性画分への移行率が高いことが明らかとなった。すなわち、アラビノースで誘導をかける必要があるDnaK/DnaJ/GrpEについては可溶性への移行率はチロシンキナーゼについては効果がないことが示唆され、テトラサイクリンで誘導を行うGroEL/GroES、もしくはGroES/GroEL/TFのいずれかの条件のみを試せば良いことが明らかとなった。以上の方法により、c-*Src*、Fyn、c-*Abl*、FGFR1、MerTK、VEGFR1、c-*Met*、CSKについて安定同位体標識試料の調製に成功した。一方で、Zap70、SYK、IGF1Rについては調製に成功しなかったが、いずれもATP結合ポケットの最深部にあるゲートキーパー残基がメチオニンになっており、本手法の適用限界についても、その傾向が明らかとなった。

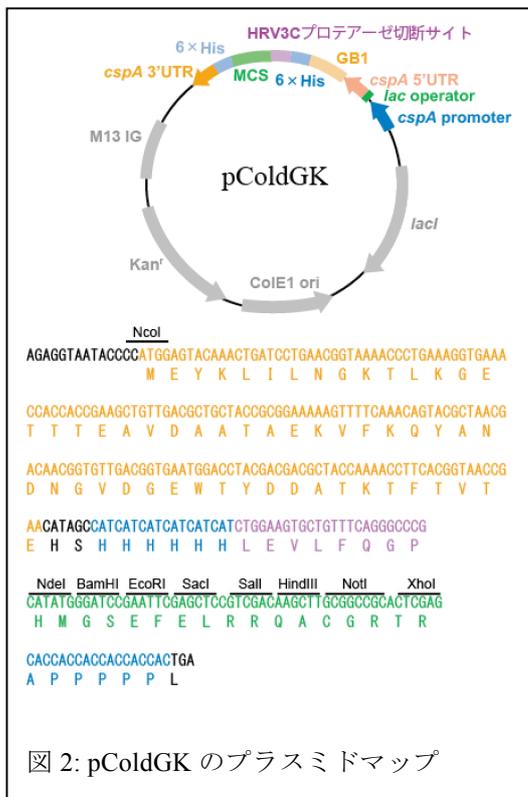


図 2: pColdGK のプラスミドマップ

次に、実際に本手法を用いて FGFR1 のキナーゼドメインについてメチオニンのメチル基を <sup>13</sup>C で標識した試料の調製を行った、こ

の試料について野生型およびV561M変異体について構造状態の解析を行った。V561M変異体はがん変異体であり、薬剤耐性変異体にもなっている。V561M変異体では、ヌクレオチド結合ループ近傍のメチオニンのNMRシグナルが、on-構造であるリン酸化体のシグナルと同様の変化をしており、ヌクレオチド結合ループが on-構造に似た状態となっていることが示唆された。PD173074との相互作用を解析したところ、変異体では薬剤の結合が弱くなっていた。野生型における複合体立体構造解析結果から、on-構造ではヌクレオチド結合ループとの立体障害が発生することが示唆されていたが、これと合致しており、メチオニン選択標識体のNMRスペクトルの利用が構造状態を検出する上で有用であることが示された。メチオニンは、疎水性アミノ酸残基の中では最も構造自由度が高く、柔軟性が必要な領域およびその周辺に存在していることが多い。そのため、多くのチロシンキナーゼにおいて、C-helix周辺、活性化ループ周辺、ヌクレオチド結合ループ周辺など、活性化に伴い構造が変化する領域に存在しており、メチオニンは構造検出プローブとしての汎用性は高いと言える。次に、他の薬剤(Ponatinib、Dovitinib)についても検討を行ったが、親和性の低下は見られなかった。それらの薬剤との複合体では、ヌクレオチド結合ループ周辺のスペースが大きく開いており、立体障害が発生しないことと合致する。以上のように、メチオニンのメチル基の安定同位体標識が構造状態を検出する上で有用なプローブとなり得ること確認された。メチオニンのメチル基の安定同位体標識はコストが低く、感度も高い。そのため、試料の濃度を下げたり、積算時間を減らしたりすることが可能であり、当初計画していたランタノ

イドおよびJ値を用いる手法よりも実用性および汎用性は高い。以上のように、汎用的な安定同位体標識試料チロシンキナーゼの調製手法の構築と、選択的安定同位体標識を利用した構造検出型薬剤結合評価法の構築という当初の研究目的は達成できたと考えている。

本研究課題の申請時に比べると、チロシンキナーゼのNMRによる解析例は世界的にも増えてきている。急激な伸びは見せておらず、相変わらず試料調製及びNMRの測定及び解析が困難である状況には変わりはない。本研究課題で構築した手法はチロシンキナーゼの大量調製を可能にするものであり、汎用性も高い。今後、様々なチロシンキナーゼに適用されることで、ますます多くのチロシンキナーゼについてNMRによる解析が進むと期待される。本研究課題で開発した手法を応用することで、阻害剤耐性変異体チロシンキナーゼによる薬剤耐性の分子機構の解明、新規チロシンキナーゼ阻害薬の開発へと応用されていくことが期待される。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 天野伸治郎、小橋川敬博、横川真理子、稲垣冬彦、NMR 解析へ向けた安定同位体標識チロシンキナーゼの大腸菌による発現手法の構築、第 13 回蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日～14 日、鳥取市とりぎん文化会館

(2) 横川真理子、小橋川敬博、天野伸治郎、

稲垣冬彦、NMR 法による非受容体型チロシンキナーゼの動的構造解析、第 13 回蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 12 日～14 日、鳥取市とりぎん文化会館

(3) 小橋川敬博、天野伸治郎、横川真理子、森岡弘志、Joseph Schlessinger、稲垣冬彦、チロシンキナーゼのリン酸化による活性化の構造メカニズム、第 42 回構造活性相関シンポジウム、2014 年 11 月 13 日～14 日、熊本市森都心プラザ

(4) 与座魁斗、小橋川敬博、森岡弘志、天野伸治郎、横川真理子、Joseph Schlessinger、稲垣冬彦、阻害剤耐性変異体チロシンキナーゼと阻害剤との相互作用の解析、第 42 回構造活性相関シンポジウム、2014 年 11 月 13 日～14 日、熊本市森都心プラザ

(5) 小橋川敬博、稲垣冬彦、チロシンキナーゼの NMR 解析へ向けた試み：受容体型チロシンキナーゼの活性化機構、第 53 回 NMR 討論会、2014 年 11 月 4 日～6 日、吹田市大阪大学

(6) Yoshihiro Kobashigawa、NMR analysis of the interaction between kinase domains required for activation of the receptor tyrosine kinase、International Symposium on Pharmaceutical NMR、2014 年 12 月 20 日、吹田市大阪大学

[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：  
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

[http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/  
bunseki/index.html](http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunseki/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小橋川 敬博 (KOBASHIGAWA Yoshihiro)  
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬)・  
准教授

研究者番号：90455600