

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293026

研究課題名(和文) 創薬への応用に向けたrasがん遺伝子産物の構造ダイナミクスの分子機構の解明

研究課題名(英文) Research on the molecular basis of conformational dynamics of oncogene product Ras for application to the development of its specific inhibitors

研究代表者

島 扶美 (shima, fumi)

神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号：60335445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：rasがん遺伝子産物Rasは多くのがんにおいて活性化が認められることから、その機能を阻害する抗癌剤(Ras阻害剤)の開発が切望されている。本研究では、特殊試料マウント法を利用したX線結晶解析によりRasの新規ポケット構造を決定するとともに、Ras阻害剤のRasへの安定結合と作用発現の妨げとなっているRasのポケット開閉運動のメカニズムを明らかにした。また、分子動力学計算の活用により開閉運動の詳細を解析するとともに、特殊結晶化法を利用したRasと低分子化合物との結合メカニズムの解析を通じて、保有するRas機能阻害剤の効率的な構造展開に向けた構造科学的盤情報を収集することができた。

研究成果の概要(英文)：ras proto-oncogene products Ras, is a member of small GTPases, which is frequently activated in a wide variety of human cancers, making them promising anti-cancer drug targets. In the present study, we determined the novel druggable pocket structure of Ras by Synchrotron X-ray crystallography utilizing Humid Air and Glue-coating (HAG) mounting method, which unveiled the molecular basis of conformational transition between the open and closed pocket structures. Molecular Dynamics simulation of the solved structures lead us to a reasonable agreement with experimental observations and the consequent scenarios on the transition. Further, crystal structure analysis of Ras/fragment-compound complex by cross-linking method gave us useful information on the structure-based design of Ras inhibitors.

研究分野：創薬科学

キーワード：医薬分子設計 分子標的薬 がん シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ras がん遺伝子産物 Ras は、低分子量 G 蛋白質であり、活性型である GTP 結合型 (Ras-GTP) と不活性型である GDP 結合型 (Ras-GDP) を行き来しながら細胞増殖・分化のシグナル伝達を制御する分子スイッチとして機能している。Ras には、アミノ酸配列の類似した Rap, R-Ras や M-Ras などの類縁体が存在し、Ras ファミリーを形成している。哺乳動物では H-, N-, K-Ras の 3 つのアイソフォームが存在し、ヒトのがんにおいては、そのいずれかが突然変異 (G12V 変異体など) により常時活性化 (細胞内で常時 GTP 型) している。がん細胞には、自身の生存自体をがん遺伝子 (もしくはその変異体) に頼る性質 (がん遺伝子中毒) があり、がん細胞においてがん遺伝子もしくはその産物の機能を阻害 (抑制) すると、急速ながんの退縮が起こることが知られている。グリベック (Bcr-Abl 阻害剤: 白血病治療薬) をはじめとする、近年開発された分子標的がん治療薬の多くは、がん遺伝子中毒と密接に関連する遺伝子産物を分子標的としている。同じくがん遺伝子中毒の性質を示す Ras は、大腸がんや膵臓がん (難治性) など多くのがんにおいて極めて高率に突然変異による活性化が認められることから、その機能を特異的に阻害する物質が開発されれば、多くのがんの治療が可能な画期的な新薬の提供が実現できる。

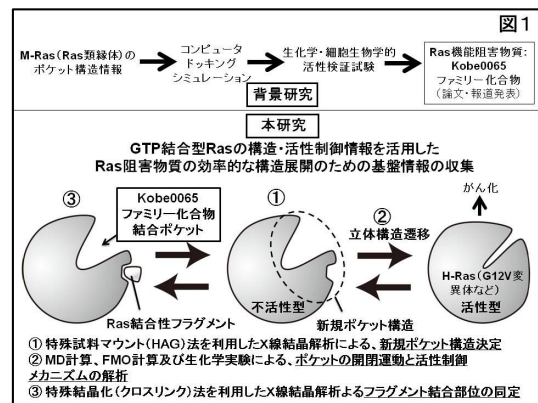
これまでの Ras 機能阻害剤開発の流れとしては、1990 年代の半ばから Ras の機能発現に必須の翻訳後脂質修飾ファルネシル化を阻害するファルネシル基転移阻害剤 (FTIs) が国内外の多数の製薬企業で開発された。しかし、ファルネシル化が Ras 特異的でないこと、ファルネシル化阻害を回避し別の脂質修飾 (ゲラニルゲラニル化) により活性化される Ras が存在することもあり、近年の米国等での臨床治験において、固形腫瘍については患者への延命効果が認められないことから、開発が頓挫している。また 2012 年以降は、FTIs とは異なるコンセプトで Genentech 社、Abbott 社 (Roche 社系列) などが、不活性型である Ras-GDP に特異的に結合し、Ras とヌクレオチド交換因子 Sos との相互作用を介する Ras-GTP (活性型) への変換を阻害する物質の開発研究について論文発表 (2012 年, PNAS 等) しているが、がん細胞での活性は極めて弱く、担がん動物モデルでの抗腫瘍活性は全く評価されていない。このように、現在世界的に見て、がん細胞内で優位な GTP 結合型の Ras に直接作用し、Ras の機能阻害活性を示す有望な分子標的薬は皆無であり、創造的かつ革新的な開発アイデアが切望されている。

申請者は背景研究で、これまで未解明であった Ras-GTP の分子表面上の薬剤結合ポケットを、Ras の類縁蛋白質 M-Ras の X 線結晶構造解析 (高輝度光科学研究センターと連携) を通じて、

世界に先駆けて解明 (2005 年, JBC) した。このポケットに結合し Ras の機能を阻害する物質を獲得するために、M-Ras のポケット構造情報に基づくコンピュータドッキングシミュレーションと生化学・細胞生物学的活性検証試験を駆使した独自の薬剤探索研究を行った結果、M-Ras のみならず H-, K-, N-Ras の機能をも阻害することで培養がん細胞の増殖を抑え、担がん動物モデルで市販の抗がん剤 (ソラフェニブ: Ras ではなく下流の Raf ならびに上流の VEGF 受容体の阻害剤) に匹敵する強い腫瘍増殖抑制作用を示す新規 Ras 阻害物質 (Kobe0065 ファミリー化合物) の同定に成功した (図 1、2013 年 4 月, PNAS)。申請者らの背景研究は、Ras 機能阻害剤開発の歴史上の極めて重要なマイルストーンとして Nature の姉妹誌 (2013 年 6 月 Nature Reviews Cancer) 等にハイライトされたが、8 年の研究期間を通じて、構造分類上 2 種類の Ras 機能阻害物質の獲得、という成果に留まった。

2. 研究の目的

本研究では、構造バリエーション豊かな多数の Ras 機能阻害物質の創出を将来可能にするために、以下の構造科学的・計算科学的手法を駆使して (図 1 ~) GTP 結合型 Ras の構造ダイナミクスと活性制御機構に係る創薬基盤情報を収集する。



(1) ヒトのがんと直接関連のない M-Ras の構造情報を利用した背景研究での結果を踏まえ、より効率的な薬剤探索を実現するために、本研究では、特殊試料マウント法 (HAG 法) を利用した X 線結晶解析 (高輝度光科学研究センターと共同) により、Ras のアイソフォームの 1 つ H-Ras (野生型ならびに G12V 変異体) の未解明の GTP 型における薬剤結合ポケット (不活性型ポケット) 構造をまず決定する。
 (2) 背景研究 (H-Ras、M-Ras ならびにその変異体を利用) では、GTP 型のポケットには立体構造遷移 (ポケットの開閉運動) が存在し、この運動が化合物の Ras への安定結合を妨げていることを核磁気共鳴法 (NMR) で確認している。よっ

てここでは、種々の溶液環境下での Ras の生化学的活性評価と、(1)で決定した構造情報を利用した分子動力学 (MD; Molecular Dynamics) 法、フラグメント分子軌道 (FMO; Fragment Molecular Orbital) 法(システム情報学研究科と共同)による計算を実施し、ポケットの開閉運動が Ras の活性に与える影響を原子レベルで詳細に解析する。

(3)また、保有化合物の将来の効率的な構造展開を可能にするために、特殊結晶化法(クロスリンク法)を利用して、溶液環境変化(温度、pH など)に伴う Ras の構造変化を結晶中で解析するとともに、難溶性の Ras 結合性フラグメント(分子量 200 未満の小分子化合物)を含めたより多くの化合物と Ras との相互作用解析を可能にするシステムを構築する。

3. 研究の方法

(1) **HAG (Humid Air and Glue-coating mounting) 法による H-Ras-GppNHp の X 線結晶構造解析**: □pGEX-6P ベクターを用いて大腸菌で H-Ras(1-166aa) を glutathione-S-transferase (GST) との融合蛋白質として大量発現し、GST 部分を切除後、陰イオンクロマトグラフィーで GDP 結合型として高純度 (95%以上) 精製する。加水分解されない GTP アナログである GppNHp を Ras に付加し、濃縮 (0.5mM) した後に蒸気拡散法にて結晶化する。ポロビニルアルコールをマウント剤として使用し結晶をコーティングした後、温度(クライオ条件あるいは室温)・湿度 (100%~80%) 調節下で X 線回折実験 (SPring-8: BL38) を行い、分子置換法により分子モデルを構築する。H-Ras(1-166aa)-GppNHp の結晶を用いた試験的な実験では、クライオ条件下で 100% から徐々に湿度を下げ、湿度 85% 付近 (低湿度) で結晶の空間群ならびに格子定数が変化すると同時に Ras の構造が State 2 から State 1 に大きく変化することが確認されている。よって、結晶にかかる応力と構造変化との関係を解析するために、湿度条件をこの付近で細かく設定した上で複数の回折データを回収し分子モデルを構築する。得られた State 1 ならびに State 2 の立体構造座標を用いて、分子内の水素結合、イオン結合、疎水性相互作用などの分子内相互作用のネットワークを解析する。特に、ポケット構造に近い 2 つの Switch 領域 (Switch I: 32-38aa, switch II: 60-75aa) ならびに GTP (GppNHp) 結合領域については、Ras の内因性の GTP 加水分解能と関連する水分子ならびに水分子を介する水素結合のネットワークを詳細に解析し、複数のスナップショット由来の構造情報を用いて、ポケットの開閉運動メカニズムを結晶学的に解析する。

(2) **MD 計算によるポケット開閉運動のメカニズムの解析と開閉運動が Ras の生化学活性に与える影響の評価**: H-Ras-GppNHp の複数の結晶構造情報 (State 1, State 2 ならびにその中間体) を用いて、分子動力学 (MD) 計算により、それぞれの State 構造の安定性を調べる。また、ポケット開閉に関しては、始状態と終状態を結ぶ運動方向にドライビングフォースをかけることで計算時間を大幅に短縮した MD 計算を行って、開閉の分子メカニズムを検討する。その際、Ras 周辺の水分子やイオンとの相互作用の影響についても詳しく調べる。さらに、下記□と関連して、圧力を付加した場合の MD シミュレーションも行う。

(3) **クロスリンク結晶を用いたポケット開閉運動のメカニズムの解析と Ras 結合性小フラグメントの結合メカニズムの解析**:

H-Ras-GppNHp の結晶に、クロスリンク剤(グルタルアルデヒド)を添加し、結晶中で Ras をポリマー化した後、種々の結晶溶液条件下 (pH, 温度、塩濃度の変化) で X 線回折実験を行い、複数の立体構造情報を回収する。結晶溶液変化に伴う、Ras の分子内相互作用の変化を詳細に解析し、Ras の生化学活性に影響を与える構造情報を抽出する。分子量 200 未満の低分子化合物 (小フラグメント) を購入し、クロスリンク法にて補強した Ras の結晶に高濃度でソーキング (溶剤としては 10%~50% DMSO を使用) して Ras と Ras 結合性小フラグメントとの複合体結晶を作成し、X 線結晶解析により立体構造を決定する。構造の異なる 2~3 種類の小フラグメントの同時ソーキングも実施し、結晶構造中で小フラグメントの結合が確認された場合には、保有する Ras 機能阻害物質の構造展開に利用する。X 線結晶解析による小フラグメントの結合確認が困難な場合には、多次元 NMR (水素核及び ¹⁵N 核) 測定による結合解析に切り替え、複合体の構造モデルを予測し、保有化合物の構造展開に利用する。

4. 研究成果

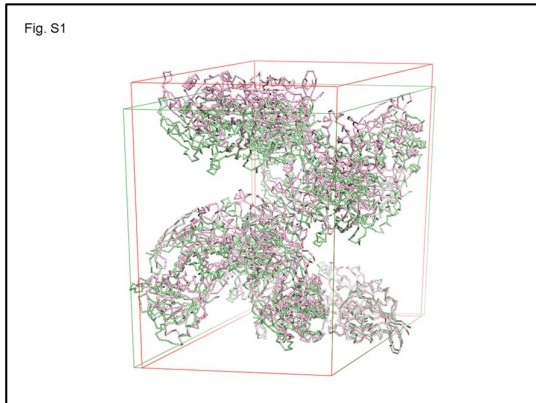
(1) **HAG (Humid Air and Glue-coating mounting) 法による H-Ras-GppNHp の X 線結晶構造解析と State 遷移メカニズムの解析**:

大腸菌で発現・高純度精製した H-Ras(1-166aa) を蒸気拡散法により結晶化した。放射光 (SPring-8) による X 線回折実験の結果、1.56 Å の分解能で空間群が R32 の結晶構造が得られた。分子内の水素結合ネットワークの詳細な解析の結果、2 つの Switch 領域に存在する重要な 2 残基 (Yyr32, Gln61) がいずれもグアニンヌクレオチド GppNHp と直接あるいは水分子を介する水素結合をしていたことから、構造のカテゴリー

としては State 2 に属するものの、GppNHp と各残基との結合様式が既知の State 2 (PDB ID: 3K8Y, 3V4F) とは異なる新規 State 2 構造 (PDB ID: 5B2Z=後述 Z64A) であり、構造的な特徴からは State 1 と State 2 との中間体構造であることが示唆された。

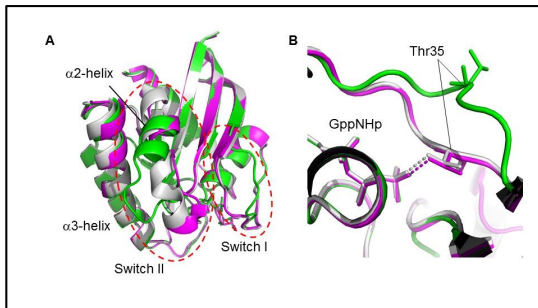
で得られた State 2 中間体の結晶について、クライオ条件下で 100% から徐々に湿度を下げたところ、湿度 87.95% (低湿度) で結晶の格子定数が変化することが確認された (図 2)。

< 図 2 >

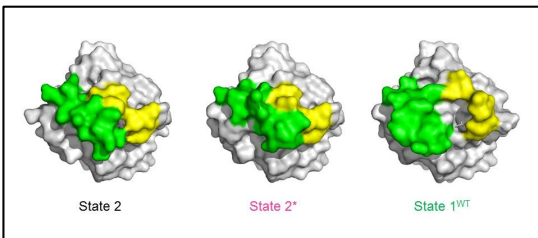


分子内の水素結合ネットワークの詳細な解析の結果、HAG 法で得られた結晶構造は、Switch I の Tyr32 の側鎖が外側に反転することで Thr35 と GppNHp との水素結合が解離し、その結果として Switch I ループが外側に反転することにより (図 3、緑色のモデル) Switch I と Switch II との間に $8.91 \times 10^5 \text{ \AA}^3 \sim 8.86 \times 10^5 \text{ \AA}^3$ の大きさのポケットが出現する新規 State 1 構造 (PDB ID: 5B30=後述 Z62A、図 4_右端のモデル: 黄色が Switch I, 緑色が Switch II) であることが確認された。

< 図 3 >



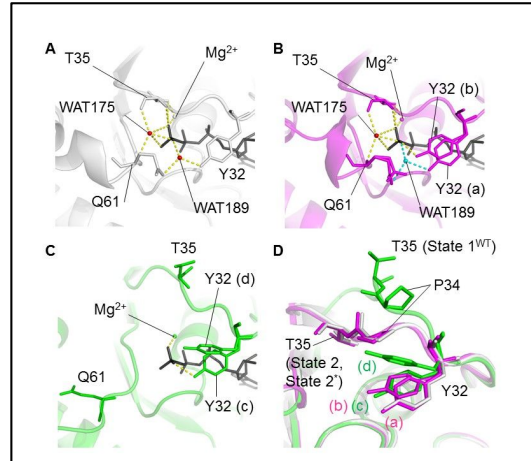
< 図 4 >



また、Switch I の反転運動は、Ras による GTP の加水分解において重要な役割を果たす 2 つの水分子 (機能水) WAT175, WAT189 の出現と消失に伴う Gln61 (Switch II), Tyr32

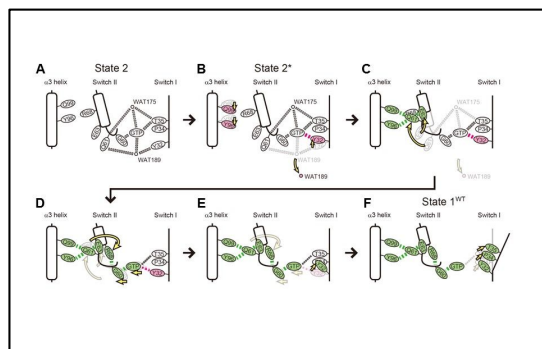
(Switch I) と当該水分子との水素結合ならびに、2 残基と GppNHp との直接あるいは当該水分子を介する間接的な相互作用の変化が、2 つの Switch 領域の開閉運動に大きく影響し、結果として、分子表面におけるポケット構造の出現と消失を制御していることが明らかになった (図 5、図 6)。

< 図 5 >



一連の構造解析の結果、State 2 から State 1 への分子表面のポケット出現 (構造遷移) のパスとしては、図 6 に示されるスキームの可能性が高いと考えられた。まず、Switch II に隣接する 3 ヘルックス内に存在する Gln96, Gln99 の側鎖の反転運動 (図 6 B) がきっかけとなり、Switch II の 2 ヘルックスのアミノ末端側に位置するループ内の Gln61, Glu64 などの残基の位置変化 (図 6 C) が起こる。その結果、Switch II 内の隣接残基 Gly60 の位置変化が起こるが、この変化は、GppNHp の位置変化を誘発し (図 6 D)、Thr35 を介する Switch I と GppNHp との相互作用を切断する結果、Switch I ループの外側反転を引き起こし (図 6 E, F)、最終的に 2 つの Switch 領域の間にポケットの出現に至ると考えられた。

< 図 6 >

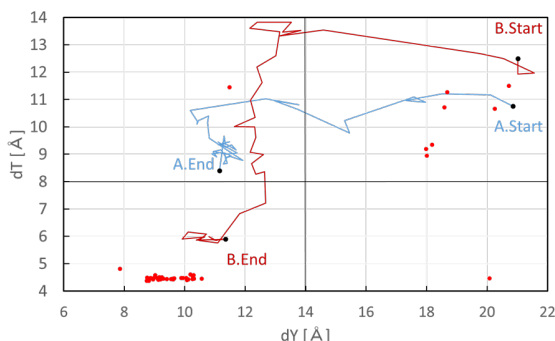


(2) MD 計算によるポケット開閉運動のメカニズムの解析と開閉運動が Ras の生化学活性に与える影響の評価:

GTP と結合した H-Ras の State 1/State 2 間の構造遷移を、ターゲット (目標構造) を設定する PaCS-MD 法を用いて解析した。State 1 (Z62A) からスタートして State 2

(Z64A) を目標とした MD 計算において、いきなり State 2 を目指すのではなく、まずは TS (遷移状態=中間) 構造 (Z61A) を目標とし、次に State 2 を目標とする、という 2 段階のシミュレーションを行うことで、Z62A→Z61A→Z64A の遷移過程を初めて再現することができた (H27 年度)。H26 年度のシミュレーションでは、途中で Switch II が過剰に閉じすぎることによって Switch I の構造変化を阻害していたが、H27 年度のシミュレーションにおいては、Switch I が閉じる際に Switch II がわずかに開くことで、State 2 への遷移が初めて可能となった (図 7)。H28 年度は、逆向き (State 2→State 1) の Z64A→Z62A の PaCS-MD シミュレーションを試み、この場合も Switch II は目標構造 (State 1) に近づいたが、Switch I がうまく開かなかった。但し、T35A 変異体では、State 2 から State 1 への遷移を確認することができた。また、以上の構造変化の MD トrajекトリーを詳しく調べることで、遷移がどのような分子機序で進行するかを解析し、Sci. Rep. 誌に発表した構造遷移のシナリオ (雑誌論文) との比較を行った。

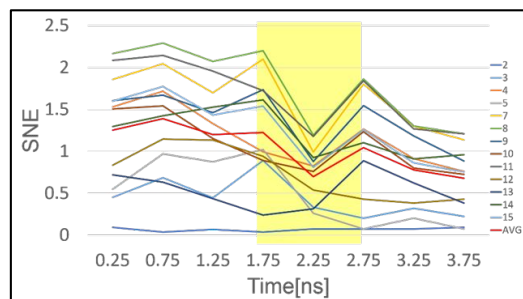
<図 7>_State 1 から State 2 への遷移 Trajectory を dY (Tyr64-GTP 距離) と dT (Thr35-GTP 距離) を 2 つの反応座標としてプロットしたもの。



State 1 から State 2 へ遷移する上記の MD シミュレーションの結果を用いて、構造変化に伴う、Ras 周囲の水分子を含む水素結合ネットワークに対するエントロピーの動的変化の解析も行った。状態変化をモニターする特徴量として、State-transition-based local network entropy (SNE) を定義し、構造遷移にとって重要な水素結合をノードとする反応ネットワークのダイナミクスを解析した。State 2 への遷移が完成した場合と完成しなかった場合の両方の計算を行い、水素結合間の相互情報量とともに、SNE も構造変化に伴って動的に変化して相転移的な振舞いを記述することができることが確認できた (図 8)。

<図 8>_State 1 から State 2 への遷移に伴う SNE の経時変化。番号は各ノード中心のネッ

トワークからの寄与を表わす。遷移状態に対応する黄色帯の時間領域で SNE は減少する。



(3) クロスリンク結晶を用いたポケット開閉運動のメカニズムの解析と Ras 結合性小フラグメントの結合メカニズムの解析:

前述の(1)の研究により、H-Ras(1-166aa) の R32 結晶については、HAG 法を用いた湿度調整で State 2 から State 1 への構造遷移が起きることを示してきた (H26 年度)。H27 度は、この遷移原因を構造に基づいて詳細に検討したところ、HAG 法を用いなくても溶液条件の変化、特に pH や添加する金属イオンの種類や濃度によって、2 つの State 間での構造遷移が促進あるいは阻害されることを示唆するデータが得られた。この結果を踏まえて、溶液中での構造遷移の実現に向け遷移条件を詳細に検討したところ、pH の上昇により構造遷移が起こること、また、Ras 分子中に存在するマグネシウムイオンと結晶中に存在するカルシウムイオンの濃度変化により、構造遷移が促進あるいは阻害されることが明らかになった。さらに、グルタルアルデヒドを用いた結晶の架橋により、遷移時に生じやすい結晶性の悪化を若干抑えられることも判明した。この架橋処理を行った結晶を用いて、低分子化合物 (小フラグメント) の浸漬実験を行ったところ、一部について結合が確認されたが、架橋によって一部の薬剤結合ポケットが塞がれている様子も同時に観察された。動的構造変化については、Ras 微小結晶に対して高輝度放射光ビームラインを用いたシリアル回折実験を試み、今後の解析に有望な結晶試料の調製ができた。

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 3 件)

Okada T, Lee AY, Qin LX, Agaram N, Mima T, Shen Y, O'Connor R, López-Lago MA, Craig A, Miller ML, Agius P, Molinelli E, Socci ND, Crago AM, Shima F, Sander C, Singer S. Integrin- α 10 dependency identifies RAC and RICTOR as therapeutic targets in high-grade myxofibrosarcoma. *Cancer Discov.* 査読有、6(10)、2016、1148-1165

Matsumoto S, Miyano N, Baba S, Liao J, Kawamura T, Tsuda C, Takeda A, Yamamoto M, Kumasaka T, Kataoka T, Shima F. Molecular Mechanism for Conformational Dynamics of Ras-GTP Elucidated from In-Situ Structural Transition in Crystal. *Sci Rep*. 査読有、6、2016、25931. doi: 10.1038/srep25931.

Shima F, Matsumoto S, Yoshikawa Y, Kawamura T, Isa M, Kataoka T. Current status of the development of Ras inhibitors. *J Biochem*. 査読有、158(2)、2015、91-99

〔学会発表〕(計 4件)

村嶋 陽亮、Haoliang Ke、松本 篤幸、枝松 裕紀、片岡 徹. Sortase, A を利用した翻訳後脂質修飾型 Ras の産生と構造生物学的研究、第 14 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2016 年 8 月 27 日、ロッジ舞洲(大阪府)

Y. Saito, Y. Hano, K.J. Fujimoto, T. Kumasaka, S. Matsumoto, T. Kataoka, F. Shima, S. Tanaka. State Transition Analysis of H-Ras with PaCS-MD Simulation, CBI 学会 2015 年大会 (2015 年 10 月 27 日、東京)

熊坂 崇、馬場 清喜、宮野 菜央、河村 高志、松本 篤幸、山本 雅貴、片岡 徹、島 扶美. Structural transition of Ras protein in crystal by humidity control (日本語演題名: 試料雰囲気湿度調整による Ras タンパク質の結晶内構造転)、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 26 日、あわぎんホール(徳島県)

松本 篤幸、宮野 菜央、馬場 清喜、jingling Liao、津田 智英美、竹田 あずさ、山本 雅貴、熊坂 崇、片岡 徹、島 扶美. Elucidating the molecular mechanism for conformational dynamics of GTP-bound H-Ras from the crystal structure of the state 1 conformation (日本語演題名: GTP 結合型 H-Ras の State 1 結晶構造情報に基づく立体構造遷移機構の解明) 第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 25 日、あわぎんホール(徳島県)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 2件)

名称: Ras 機能阻害作用を有するチオキノチアゾリジン誘導体
発明者: 片岡 徹、島 扶美、閔正博、笹原大輔
権利者: 神戸大学、神戸天然物化学株式会社

種類: 特許

番号: 出願国日本(PCT 経由) **特許登録番号 JP6014816** (2016)

出願年月日: 平成 23 年 5 月 10 日

国内外の別: 国内

名称: Ras 機能阻害作用を有するチオキノチアゾリジン誘導体 (THIOXOTHIAZO LIDINE DERIVATIVE HAVING RAS FUNCTION INHIBITORY EFFECT)

発明者: 片岡 徹、島 扶美、閔正博、笹原大輔

権利者: 神戸大学、神戸天然物化学株式会社

種類: 特許

番号: **特許登録番号 US9056862** (2016)

出願年月日: 平成 24 年 5 月 9 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/stin-dds/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島 扶美 (SHIMA, Fumi)

神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・教授

研究者番号: 60335445

(2) 研究分担者

片岡 徹 (KATAOKA, Tohru)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40144472

熊坂 崇 (KUMASAKA, Takashi)

公益財団法人高輝度光科学研究センター

タンパク質結晶解析推進室

研究者番号: 30291066

田中 成典 (TANAKA, Shigenori)

神戸大学・大学院システム情報学研究所・教授

研究者番号: 10379480

(3) 連携研究者

北原 亮 (KITAHARA, Ryou)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号: 70512284

(4) 研究協力者

なし