

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15106

研究課題名(和文) がん遺伝子産物Rasの動的な構造特性を介した機能発現メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of functional mechanism based on the dynamic properties for the onogene products Ras

研究代表者

松本 篤幸 (Matsumoto, Shigeyuki)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：00753906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：GTP結合型Rasタンパク質は、不活性型State 1と活性型State 2の2つの構造状態を行き来している。野生型H-RasのState 1ではがん変異が起こるGln61がその立体構造形成において中心的な役割を果たすことが明らかになっている。そこで本研究では代表的ながん変異Q61L・Q61Hと活性化メカニズムとの関連を調べるためそれらのState 1の結晶構造を決定し、さらに分子動力学計算を用いて動的振る舞いを解析した。その結果、変異導入によりGln61周辺領域の相互作用パターンの組み換えが引き起こされ、さらにQ61L変異では活性型様の構造的特徴を獲得することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子量GTPaseであるがん遺伝子産物Rasは、ヒトのがん全体の20 - 30%において突然変異による恒常的活性化が見られることから、学術的側面のみならずがん治療薬開発の標的として社会的に重要な生体高分子である。これまで変異によるRasの恒常的活性化メカニズムはGTP加水分解活性の低下の側面から主に議論されてきた。本研究の成果はがん変異により引き起こされる構造的特徴の変調を介した別の活性化メカニズムの存在を示唆しており、新たな作用機序を持つ分子標的薬開発のための手掛かりを与えるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：GTP-bound forms of Ras proteins adopt two interconverting conformations, “inactive” state 1 and “active” state 2. The crystal structure of wild-type H-Ras in state 1 showed that Gln61, on which an oncogenic mutation frequently occurs, plays a central role in its conformational stabilization. Here, aiming at investigating the relationships between the representative mutations, Q61L and Q61H, and their activation mechanism, we determine their crystal structures in state 1, and carry out the molecular dynamics simulations to obtain the dynamics properties. The results show that these mutations induce rearrangements of the interaction manners in the neighboring regions, and further, Q61L mutation results in acquirement of “active” state 2-like structural features.

研究分野：構造生物学

キーワード：Ras がん変異体 X線結晶構造解析 分子動力学計算 動的平衡

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は一般に溶液中で複数の異なる立体構造間をゆらぎながら存在している。この動的性質は適切な活性型構造と不活性型構造の交換など、その機能発現に直結している。このことからタンパク質の機能を知る上で、溶液中に存在する各構造状態の立体構造解析並びにそれらの立体構造遷移機構の解明は必要不可欠である。

H-Ras, K-Ras, N-Ras は哺乳動物で見られる低分子量 GTPase であり、下流へのシグナル伝達を行う GTP 結合型と不活性型である GDP 結合型を行き来することで、細胞の増殖や分化などにおける分子スイッチとして機能する。Ras は生命活動の中心的な役割を果たしている一方で、GTP から GDP への加水分解能が劇的に低下する突然変異により GTP 結合型が優位になることで細胞の異常増殖すなわち、がん化が引き起こされることが知られている。このような突然変異は多くのがんで高頻度に (がん全体の約 20~30%) 見られることから、がん細胞で蓄積している GTP 結合型 Ras の機能の理解は学術的・社会的両面において非常に重要である。

GTP 結合型 Ras は溶液中で 2 つの異なる構造、state 1 及び state 2、の平衡状態で存在することが知られている (state 遷移)。state 2 と state 1 はそれぞれ GTP と 35 番目のスレオニン (T35) との間の水素結合の有無によって定義づけられており、state 2 から state 1 への構造遷移によって switch I (残基番号 32-38) と switch II (残基番号 60-75) が外側に大きく開く open conformation を形成することが知られている。state 2 は下流の標的分子と相互作用する活性構造であることが知られている一方、state 1 の生理的役割に関する決定的な知見は「活性構造ではない」という点のみであり、これまで原子レベルでの議論はほとんどなされてこなかった。この最も大きな理由の一つとして state 1 の立体構造決定が困難であるという点が挙げられる。そのような状況の下、我々はこれまでにタンパク質結晶マウント法 “Humidity Air and Glue-coating (HAG) 法” を応用することで、野生型 state 1 の結晶構造を決定することに成功した。その結果、野生型 state 1 構造の安定化に 61 番目のグルタミン (Q61) が重要な役割を果たしており、Q61 の立体構造変化を引き金に分子全体に広がる水素結合ネットワークがドミノ倒しの様に組み替えられ、state 2 から state 1 への立体構造遷移を引き起こすこと、さらに state 1 の存在が Ras の機能発現の調節に寄与していることが示唆された。

興味深いことに、state 遷移で中心的な役割を果たす Q61 はがんの発症と直接的な関連が示されている変異導入部位である。代表的な Q61 がん変異として前立腺がんなどで見られる Q61L や Q61H が最も良く知られているが、いずれのアミノ酸置換においても側鎖構造が全く変わってしまうことから、それらのがん変異体の state 1 構造は野生型とは異なる性質を持つことが予測される。しかし上述の通り、state 1 の立体構造を通常の方法で実施することは困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では Q61 が置換されたがん変異体のうち、代表的な変異である Q61L 並びに Q61H を持つ H-Ras の state 1 について HAG 法を活用することで原子レベルの立体構造を決定し、がん変異体の state 遷移機構の手掛かりを得る。また state 遷移は動的過程であるため、そのメカニズムを理解するためには静的な原子レベルの立体構造情報に加えて溶液中における分子の振る舞いを解析する必要がある。そこで本研究で推進する立体構造解析によって得られた原子モデルに基づいて動的な立体構造情報を収集し、state 遷移を介した Ras の機能発現機構のより正確な記述を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、H-RasQ61L 並びに H-RasQ61H の State 1 の立体構造を決定し、さらに動的側面からその分子メカニズムを解析する。立体構造解析は大型放射光施設 Spring-8 の放射光源を利用した X 線結晶構造解析で実施する。大腸菌発現系を用いて精製し加水分解抵抗性アナログ GppNHp との複合体として得た機能ドメイン (残基番号 1-166) の state 2 結晶をハンギングドロップ法によって作成し、HAG 法によって引き起こされる相転移現象を利用して state 1 の回折データを取得する。さらに動的解析のため、一連の解析の結果決定された state 1 の立体構造モデル (Q61L<sup>state 1</sup>, Q61H<sup>state 1</sup>) 並びに既知の野生型 State 1 (WT<sup>state 1</sup>) の立体構造モデルを出発構造とする分子動力学 (MD) 計算を実施する。MD 計算エンジンとして GROMACS2016.5 を用い、5 つの初速度条件でそれぞれ 200 nsec (計 1 usec) の計算を実施した。計算機として NVIDIA GeForce GTX 1080Ti GPGPU を備えたワークステーションを用いた。

## 4. 研究成果

今回の X 線結晶構造解析の結果 Q61L<sup>state 1</sup> 及び Q61H<sup>state 1</sup> の立体構造をそれぞれ分解能 1.97 Å, 1.54 Å で初めて決定することができた (PDB entry はそれぞれ 7DPJ, 7DPH)。得られた立体構造はいずれの変異体も WT<sup>state 1</sup> と同様に GTP と T35 との間の水素結合が欠失し、switch I 領

域が外側に大きく開いた立体構造を有していた(図 1A)。Q61L<sup>state 1</sup> について、switch I 領域の主鎖構造は WT<sup>state 1</sup> の結晶構造と良く重なっていた(図 1B, D)。一方、switch II 領域は WT<sup>state 1</sup> の結晶構造と比較して GppNHp 近づいた活性型 state 2 様の立体構造を有していることが明らかになった(図 1B, D)。Q61H<sup>state 1</sup> について、switch I 領域は同様に WT<sup>state 1</sup> とよく似ていた一方、Switch II 領域は電子密度強度が非常に弱いため原子モデルを構築することができなかった(図 1C, D)。このことは Q61H 変異により Switch II の立体構造が顕著に不安定化されていることを示唆している。

これらのアミノ酸変異に伴う switch II 領域の立体構造変化が何に由来するのかを調べるため変異導入部位近傍の詳細な立体構造解析を行った(図 2)。WT<sup>state 1</sup> の Q61 は E63, Y96, Q99 との水素結合を介して switch II の立体構造を安定化している。Q61L<sup>state 1</sup> では側鎖がメチル基になっているため L61 は E63 並びに Q99 と側鎖を介した水素結合を形成できず、野生型の Q61 と比較して主鎖の大きな二面角変化を伴う再配置が引き起こされていた( $\phi, \psi$  それぞれ $-137.8, 115.1$  から $-60.9, -25.9$  の変化)。その再配置により L61 は WT<sup>state 1</sup> の E63 の位置を占有しており、その結果 Q61L<sup>state 1</sup> ではこの立体障害を避けるため switch II 全体が GppNHp へ近接した state 2 様の立体構造が形成されたと考えられる。一方 Q61H<sup>state 1</sup> は電子密度がほとんど観測できないため詳細な議論は困難であるが、変異により柔軟性が増加した結果、様々な構造が形成されていると予想される。

これらの結晶構造から読み取られる構造特性の変調を動的挙動の観点から解析するため、得られた結晶構造を出発構造にした MD 計算を実施した。計算の結果得られたトラジェクトリから C-alpha 原子の root mean square fluctuation (RMSF) を観察したところ、Q61H 変異により Q61L<sup>state 1</sup> や WT<sup>state 1</sup> と比較して switch II の N 末端側領域(残基番号 63-67)の柔軟性が顕著に上昇していることが明らかになった(図 3)。この Q61H<sup>state 1</sup> に特異的な振る舞いは結晶構造解析で観察された対応する領域の電子密度強度の顕著な減弱とよく一致している。このことから Q61H 変異は switch II 領域の立体構造状態の不安定化を引き起こすことが示された。一方 Q61L<sup>state 1</sup> の switch II 領域については大きな運動性の変化は見られず、別の分子内相互作用により安定性が維持されていることが確認された。

MD 計算中に出現する switch II の構造状態の分布を主成分分析により観察したところ、Q61L<sup>state 1</sup> は溶液中で WT<sup>state 1</sup> と有意に異なる分布を示していた(図 4A)。Q61L<sup>state 1</sup> と WT<sup>state 1</sup> について MD 計算で得られた構造群の平均構造と既報の各種活性型 state 2 のそれぞれの組み合わせについて、switch II 領域の root mean square deviation (RMSD) を比較したところ、Q61L 変異によって安定化される switch II 構造は不活性型 state 1 よりむしろ活性型 state 2 様の構造的特徴を有していることが明らかになった(図 4B)。switch II は下流のシグナル伝達分子との相互作用を担う領域であることが知られていることから、今回 Q61L<sup>state 1</sup> で観察された活性型 state 2 様の立体構造特性は Q61L 変異に

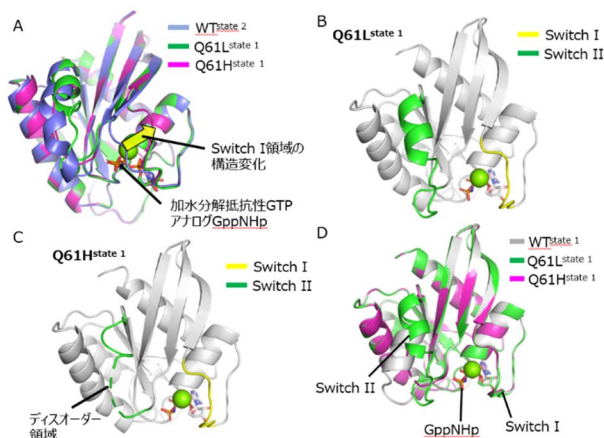


図 1. Q61L<sup>state 1</sup> と Q61H<sup>state 1</sup> の X 線結晶構造。(A) 野生型 state 2 からの立体構造変化。Q61L<sup>state 1</sup> (B) と Q61H<sup>state 1</sup> (C) の全体構造。(D) 野生型 state 1 との比較。

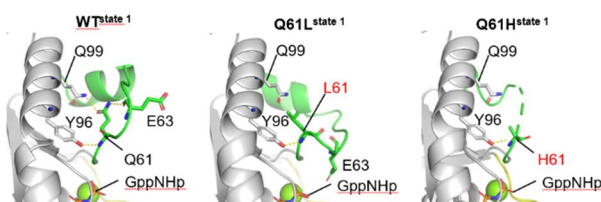


図 2. WT<sup>state 1</sup> (左), Q61L<sup>state 1</sup> (真ん中), Q61H<sup>state 1</sup> (右) の 61 番目のアミノ酸周辺の相互作用ネットワークの様子。黄色点線で水素結合を示す。

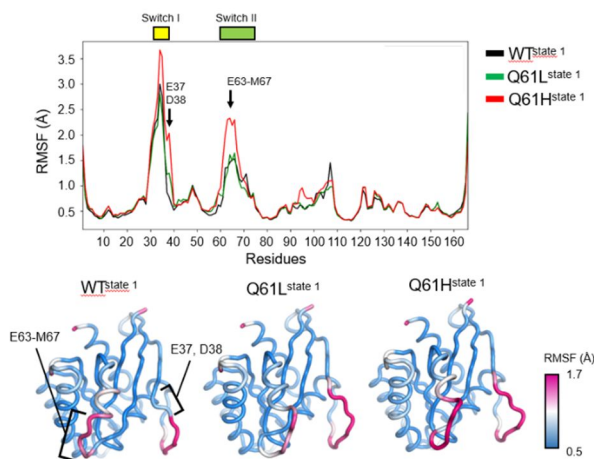


図 3. MD 計算から得られた溶液中での WT<sup>state 1</sup>, Q61L<sup>state 1</sup>, Q61H<sup>state 1</sup> の主鎖の柔軟性。RMSF 値が大きいほど柔軟性が高いことを示す。各立体構造は MD 計算で出現した構造群の平均構造で、RMSF 値で色分けされている。

よる活性化メカニズムの一部を担っているのかもしれない。Q61H<sup>state 1</sup>の switch II 領域については変異導入により顕著に立体構造が不安定化されるという興味深い観察結果が MD 計算から得られており、また主成分分析からも Q61L<sup>state 1</sup> 様すなわち state 2 様の構造特性を主に有することが示唆されている。しかし Q61H<sup>state 1</sup>の switch II 領域は実験的に立体構造が決定されていないため、今回の MD 計算には初期モデルに依存したアーティファクトが含まれる可能性があり、本課題の中では詳細な議論を進めなかった。また RMSF 解析からは変異導入により switch I の C 末端に位置する E37 と D38 における柔軟性が上昇していた (図 C)。これらのアミノ酸残基の位置は変異導入箇所から離れており、WT<sup>state 1</sup>で観察された Q61 を起点とする分子全体にわたる水素結合ネットワークを通じて switch I へと影響が及んだと考えられる。switch I 上に位置する D38 は下流シグナル伝達分子との相互作用の中心的な役割を果たすことが知られていることから、この観察結果は Q61L や Q61H 変異体には switch I を介したさらに追加の活性化メカニズムが存在しているのかもしれない。以上の成果は学術雑誌 Biochemical and Biophysical Research Communications を通じて社会一般広くに公表した (Matsumoto S. et al., 2021 Aug 6;565:85-90. )

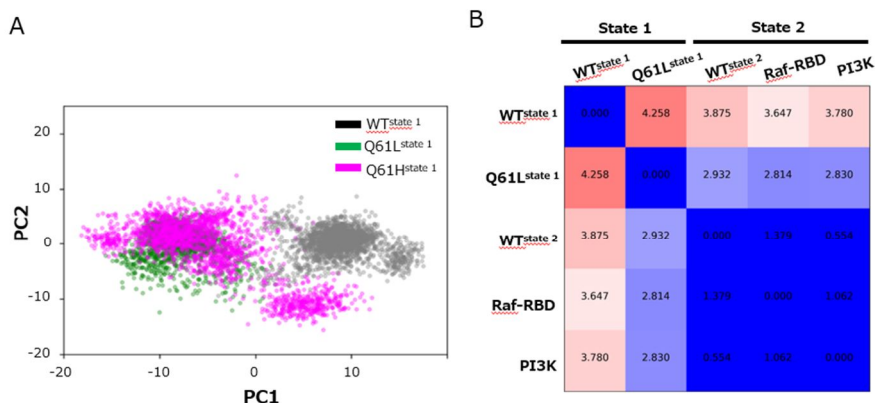


図 4. Q61 への変異導入によって獲得される switch II 領域の立体構造特性。(A) MD 計算で出現する switch II 立体構造状態の主成分解析。(B) WT<sup>state 1</sup>, Q61L<sup>state 1</sup> と各種活性型 state 2 との switch II 立体構造の比較。Raf-RBD と PI3K のラベルはそれら下流分子との複合体中の switch II を示す。組み合わせの立体構造が類似している時は数値が小さくなる (青傾向)。

これまで Ras がん変異体の活性化メカニズムは主に GTP 加水分解能の低下の観点から議論されてきた。本研究を通じて、Q61 のがん変異体には GTP 加水分解能の障害に加えて、分子全体にわたる相互作用ネットワークの変調に起因する追加の活性化メカニズムが存在していることが示唆された。Ras はがんにおける重要な薬剤標的にも関わらず決定的な分子標的薬はほとんど存在しておらず、今回の研究成果は新たな作用機序の薬剤設計に対する手掛かりを与えるかもしれない。また Ras で頻繁に観察されるがん変異として今回の研究対象である Q61L や Q61H の他に G12V や G13D など複数の重要な変異が知られている。今回の研究からは変異の種類ごとにそれぞれ分子挙動に対する影響が異なることが予想されることから、Ras に起因するがんの克服には変異の種類に応じたオーダーメイドの対策が必要になるかもしれない。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Shigeyuki, Taniguchi-Tamura Haruka, Araki Mitsugu, Kawamura Takashi, Miyamoto Ryo, Tsuda Chiemi, Shima Fumi, Kumasaka Takashi, Okuno Yasushi, Kataoka Tohru	4. 巻 565
2. 論文標題 Oncogenic mutations Q61L and Q61H confer active form-like structural features to the inactive state (state 1) conformation of H-Ras protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 85 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Shigeyuki, Araki Mitsugu, Isaka Yuta, Ono Fumie, Hirohashi Kenshiro, Ohashi Shinya, Muto Manabu, Okuno Yasushi	4. 巻 119
2. 論文標題 E487K-Induced Disorder in Functionally Relevant Dynamics of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 628 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Shigeyuki, Ishida Shoichi, Araki Mitsugu, Kato Takayuki, Terayama Kei, Okuno Yasushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Extraction of protein dynamics information from cryo-EM maps using deep learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Machine Intelligence	6. 最初と最後の頁 153 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42256-020-00290-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ke Haoliang, Matsumoto Shigeyuki, Murashima Yosuke, Taniguchi-Tamura Haruka, Miyamoto Ryo, Yoshikawa Yoko, Tsuda Chiemi, Kumasaka Takashi, Mizohata Eiichi, Edamatsu Hironori, Kataoka Tohru	4. 巻 591
2. 論文標題 Structural basis for intramolecular interaction of post-translationally modified H-Ras?GTP prepared by protein ligation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2470 ~ 2481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunaga Shota, Hano Yuta, Saito Yuta, Fujimoto Kazuhiro J., Kumasaka Takashi, Matsumoto Shigeyuki, Kataoka Tohru, Shima Fumi, Tanaka Shigenori	4. 巻 77
2. 論文標題 Structural transition of solvated H-Ras/GTP revealed by molecular dynamics simulation and local network entropy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Graphics and Modelling	6. 最初と最後の頁 51 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmgs.2017.07.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松本篤幸
2. 発表標題 深層学習技術による cryo-EM密度マップデータに隠された動的情報の抽出
3. 学会等名 第一回クライオ電子顕微鏡画像からの高度情報処理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeyuki Matsumoto
2. 発表標題 Novel insights into the structural perturbation induced by the oncogenic mutations, Q61L and Q61H, in Ras state 1
3. 学会等名 64th Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 篤幸 柯 浩亮 村嶋 陽亮 谷口-田村 はるか 宮本 涼生、吉川 陽子 津田 智恵美 熊坂 崇 溝端 栄一 枝松 裕紀 片岡 徹
2. 発表標題 翻訳後修飾型H-Ras・GTPIにおける分子内相互作用によるc-Raf-1認識のための立体構造の形成
3. 学会等名 consortium of biological sciences 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷口-田村 はるか 松本 篤幸 宮本 涼生 河村 高志 熊坂 崇 片岡 徹
2. 発表標題 がん遺伝子産物H-RasQ61L 変異体の構造解析
3. 学会等名 平成29年度 日本結晶学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------