

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06525

研究課題名(和文) がん治療薬の設計基盤となるSACLAによるRasの原子スケール動的構造解析

研究課題名(英文) Atomic-scale dynamic structural analysis of Ras by SACLA, which provide promising information on designing cancer therapeutic agents

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量G蛋白質RasはGTP結合型(活性型)とGDP結合型(不活性型)を行き来しながら細胞内シグナル伝達を制御する。Rasは医薬品開発の恰好のターゲットであるが医薬品開発成功例が極めて少ない。その原因の一つとして、RasのGTP加水分解機能に関連する薬剤結合領域の構造ダイナミクスが挙げられる。本研究では、Rasの基質として光制御可能なGTPアナログを用いてSACLA/Spring-8/NMRによる時分割構造解析を行った。その結果、これまで未解明であった天然型GTP結合型RasからGDP型に至る原子スケールでの分子動画の一部撮影に成功し、新たな創薬領域を開拓する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rasの機能攻略の難易度の高さの一要因として、他の抗がん剤の標的の薬剤結合ポケットにはない大きな揺らぎ=開閉運動の存在があげられる。ここでは、申請者が同定したリード化合物(特許取得済)の効率的な構造最適化を可能にするために、最新鋭のX線自由電子レーザー施設SACLAとPring-8をフル利用し、従来技術では解析困難だったRasの活性制御に直結した薬剤結合ポケットの開閉運動の構造ダイナミクスを原子スケールで解明する。Rasの構造・活性変化の世界初の原子レベルでのコマ撮り動画が作成できれば学術的インパクトは大きく、Ras阻害剤の構造デザインに活用できれば、健康社会への貢献も極めて大である。

研究成果の概要(英文)：Small GTPase Ras functions as a molecular switch by cycling between GTP-bound active and GDP-bound inactive forms in cell signaling pathways. Despite its importance as a cancer driver gene product, dedicated efforts to directly target Ras for decades still have not yielded therapeutic efficacy, due to limited structural information on natural GTP-bound Ras and its 'undruggable' nature of drug-binding site, i.e., structural dynamics hampering stable drug-binding, that is intriguingly linked to its GTP hydrolysis activity. Here to elucidate structural dynamics of natural GTP-bound Ras, we performed time-dependent structural analysis of photo-controllable caged-GTP-bound Ras on GTP hydrolysis process by SACLA, Spring-8 and NMR. Photo-irradiation to caged-GTP-bound Ras yielded natural GTP-bound Ras, leading to GTP hydrolysis for production of Ras-GDP. These results provide new insight into the structural dynamics of Ras, realizing novel strategies for development of Ras inhibitors.

研究分野：分子生物学

キーワード：分子動画 がん遺伝子産物 X線自由電子レーザー X線結晶構造解析 核磁気共鳴法 シグナル伝達

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞のみならず正常細胞にも作用を示す副作用の多い従来型の抗がん剤に変わり、近年、がん細胞特異的に機能亢進が認められる特定の蛋白質の機能を失活させる分子標的がん治療薬の開発が目覚ましい。特にがん遺伝子産物(がん関連酵素)の薬剤結合ポケットの構造情報は、開発初期の抗がん剤候補物質を市販薬に改良する過程では極めて重要な役割を果たしており、一般的には静的だが高精度のX線結晶構造の利用が主流となっている。

がん遺伝子産物 Ras は GTP 加水分解酵素であり、GTP 結合型(活性型)と GDP 結合型(不活性型)を行き来しながら細胞増殖を制御する分子スイッチとして機能する。がん全体の約 30%に突然変異による Ras の常時活性化(GTP 型の維持)が認められることから、最も有望な分子標的として 1990 年代半ばより国内外の製薬企業で種々の開発が進められてきたが、Ras の分子標的がん治療薬開発成功例はない。

2. 研究の目的

GTP 型 Ras の機能攻略の難易度の高さの一要因としては、他の抗がん剤の標的蛋白質の薬剤結合ポケットには見られない比較的大きな揺らぎ=開閉運動の存在があげられる。本研究では、申請者が背景研究で同定したリード化合物(特許取得)の効率的な構造最適化・臨床開発候補品創出を可能にするために、最新鋭の X 線自由電子レーザー施設 SACLA ならびに大型放射光施設 SPring-8 を利用して、従来技術では解析困難だった GTP 型 Ras の活性制御に直結した薬剤結合ポケットの開閉運動の構造ダイナミクスを原子スケールで解明する。具体的には、薬剤結合ポケットの開閉運動と連動する活性制御(GTP の加水分解=GDP 型生成による Ras の不活化)の分子メカニズムを SACLA で時分割解析し、Ras の構造・活性変化の世界初の原子レベルでのコマ撮り動画を作成することにより、Ras 機能阻害剤の構造デザインに利用可能な薬剤結合ポケットの構造調節情報を効率的に収集する。

電子を高エネルギー加速器の中で制御して運動させることにより得られる非常に強い光(SPring-8 の 10 億倍の明るさ)を利用した X 線自由電子レーザー施設を使用すれば、原子や分子の瞬間的な動きを観察することができる。日本が誇る超高品質の電子ビーム技術、ならびに超精密電子制御技術の粋を結集した SACLA は、2011 年の X 線レーザーの発振以降、測定・解析システムの改良を伴い着実に進化を遂げ、従来型の静的 X 線結晶解析では定性的な理解に留まっていた蛋白質の構造と機能への理解を変貌させつつある。申請者は、研究協力者である高輝度光科学研究センター(JASRI)・熊坂崇博士とともに、SPring-8 を用いた Ras の構造ベース創薬(SBDD)の研究実績ならびにその研究成果物の国内製薬企業への導出経験がある(図 1_②; リードの同定; 2013 年, PNAS)。また同様に連携を取る理研・岩田想博士の研究チームでは、SACLA を利用した連続フェムト秒結晶構造解析技術を開発し、膜タンパク質である微生物型ロドプシンのバクテリオロドプシンの時分割構造解析に成功している(2016 年, Science)。この新たな構造解析の技術の創薬ターゲット分子への応用は国内外を問わず新規性に富んでおり、得られる成果は世界を牽引する結果となることが期待される。本研究ではこれら 2 チームと有機的に連携し研究協力体制下で、上記光科学技術を最大限に活用して、最も有望な創薬ターゲット分子の一つであるにも関わらず、未だ有効な阻害剤(抗がん剤)開発の成功例がない Ras 蛋白質の、世界初となる原子レベルでの機能制御のメカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

Ras の動的構造を天然 GTP 結合状態で明らかにするため、光制御可能な GTP アナログ “caged-GTP (NPEcaged-GTP)” を利用し、世界最先端の X 線自由電子レーザー施設 SACLA ならびに大型放射光施設 SPring-8 と溶液および固体 NMR を駆使して、Ras のダイナミックな構造変化の解析を行った。これら複合的構造解析を通じて、Ras の薬剤結合ポケットの開閉メカニズムを原子スケールで捕捉し、新たな創薬基盤情報を収集した。

具体的な実施内容は以下の通り：

GTP 結合型 Ras (Ras/GTP) はポケットが開いた構造 (State 1 : 不活性型) と閉じた構造 (State 2 : 活性型) の 2 つの構造を遷移している。この構造遷移過程を SACLA により高分解能で解析するために均一かつ大量の高密度の微小結晶溶液を調整する。申請者は 2017 年度に、(光保護基 (cage : NPEcage)) を有する人工型 GTP との複合体 Ras (Ras/caged-GTP) に関して、SPring-8 による単結晶の構造解析と溶液 NMR による解析により、ポケットが開いた State 1 構造をとり、cage 離脱直後の天然 GTP 型 Ras は、速やかに State 1 から State 2 に構造遷移することを明らかにした。本研究では、研究協力者である神戸大学大学院医学研究科・榎野博士と博士課程大学院生 1 名と共同で HSQC_NMR による構造遷移過程の部位特異的な構造ダイナミクスを詳細に解明するとともに、SACLA による State 1 から State 2 への構造遷移の観測を行う。得られた Ras/caged-GTP 微結晶に光照射を行うことで光保護基離脱後の Ras/GTP の State 1 から State 2 への構造遷移について、JASRI・熊坂博士ならびに河村博士と共同で SACLA を用いた時分割結晶解析により可視化し、ポケット開閉運動を原子レベルでのコマ送り動画として捕捉する。

- ① GTP型RasのSACLAおよびNMRによるポケット開閉メカニズムの解明 (2019年度)：
- ② 時分割構造解析によるRas/caged-GTP複合体のGTP加水分解反応の解明 (2019年度ならびに2020年度以降)：

4. 研究成果

31P-固体 NMR による GTP 加水分解反応の速度論解析

Ras・caged-GTP の微結晶試料の GTP 加水分解反応速度を明らかにするために、ヌクレオチド内の 31P を観測核種として固体 NMR 測定を行い、State 遷移および GTP 加水分解反応に伴う NMR 信号の化学シフト値およびその信号強度の変化をトレースした。測定の結果、Ras の GTP 加水分解反応は光照射後すみやかに開始し、およそ 600 分で完結することが示唆された。また、 γ -リン酸に帰属される信号の強度の経時変化から、光照射後およそ 150 分までは State 1 と State 2 が平衡状態にあり、続く 150 分から 300 分程度までは、State 2 が GTP 結合型の主たる成分であることが示唆された (図 1-①)。

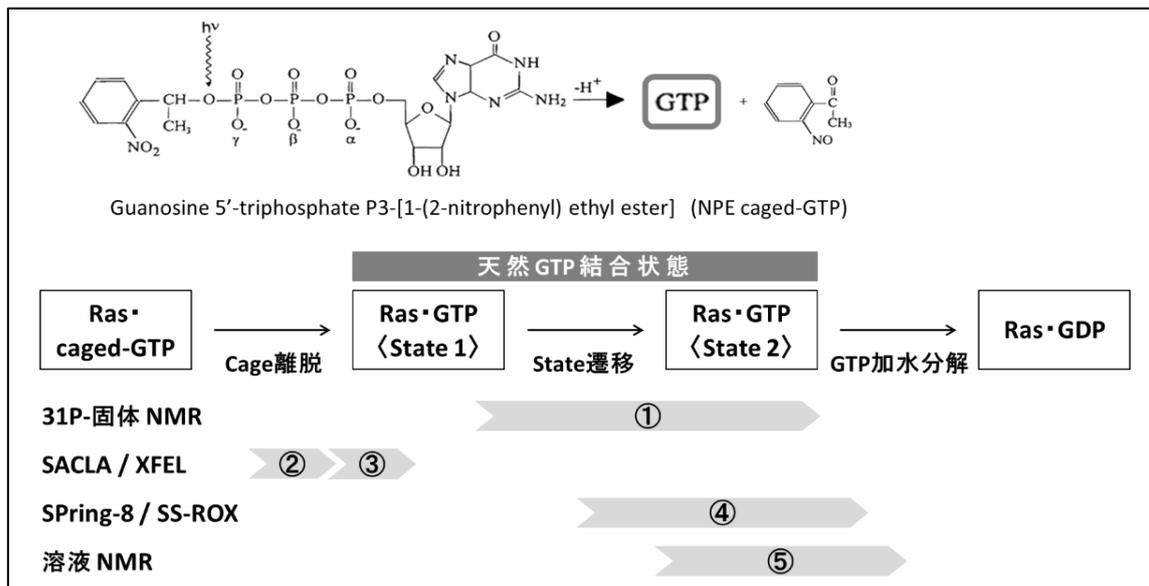
SACLA ならびに SPring-8 での X 線回折実験

31P 固体-NMR での速度論解析の結果に基づき、cage 離脱直後のミリ秒オーダーの構造変化を TR-SFX (Time-Resolved Serial Femtosecond X-ray crystallography) 法で、GTP 加水分解過程の時間オーダーの構造変化を SS-ROX (Serial Synchrotron Rotation X-ray crystallography) 法で捕捉した。

Ras・caged-GTP の微結晶試料を用いて TR-SFX 測定を行った結果、光照射後 18 ミリ秒と

48 ミリ秒の時点で構造情報を取得することに成功した。光照射前後での電子密度変化をあらわす電子密度差マップから、光照射後 18 ミリ秒で cage の離脱ならびに Switch I 領域の GTP の方向への動きが観測され (図 1-②)、光照射後 48 ミリ秒で天然 GTP 結合型 Ras の State 1 様構造をとることが示された (図 1-③)。さらに、SS-ROX 法を用いた結晶構造解析では、光照射後 5 時間程度で State 1 から State 2 への遷移を示唆する GTP 近傍の構造変化とそれに伴う GTP の電子の局在化を示唆する電子密度の変化が観測された (図 1-④)。

図 1 : SACL/SPring-8/NMR による Ras の GTP 加水分解反応の時分割構造解析



溶液 NMR による構造解析

Ras 分子全体の動きをより詳細に明らかにするため、 $1\text{H}/15\text{N}$ HSQC の連続測定を行い、GTP 加水分解反応に伴う NMR 信号の化学シフト値およびその信号強度の変化をトレースした。Gly12 に帰属される信号に着目すると、光照射後すぐに現れた State 1 を示す信号の強度が直ちに減少し、それに伴って GDP 結合型を示す信号強度の増加が捕捉された。このような光照射後の NMR 信号の時間依存的な強度変化に基づき、Ras のアミノ酸残基とそれが属する領域ごとに速度論解析を行った結果、GTP 加水分解反応に伴う Ras の構造変化は Switch 領域のみならず、それに隣接する $\alpha 3$ -helix や P-loop 等の領域でも顕著に生じていた。さらに、これらの領域の構造変化が Switch 領域よりも速い速度で生じていたことから、 $\alpha 3$ -helix と P-loop の構造変化とそれに伴うアミノ酸残基間の相互作用の変化が GTP 加水分解反応の引き金となっている可能性が示唆された (図 1-⑤)。

よって、本研究における網羅的時分割構造解析により得られた、Ras の酵素触媒反応における動的構造情報を統合・活用すれば、Ras の GTP 加水分解活性部位および隣接領域に結合し、GTP 加水分解反応 (不活性化) を促進することでがん細胞の増殖を抑制する作用を発現する、新規抗がん剤の分子設計・開発が可能になると推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Maho Saeki, Yoshiteru Makino, Shigeyuki Matsumoto, Takashi Kawamura, Eriko Nango, Takashi Kumasaka and Fumi Shima
2. 発表標題 Analysis of conformational dynamics of small G-protein Ras on GTP hydrolysis process by SACLA, SPring-8 and NMR
3. 学会等名 43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎野義輝、河村高志、松本篤幸、南後恵理子、岩田想、熊坂崇、島扶美
2. 発表標題 Caged-GTPを用いたがん遺伝子産物RasのSACLA、Spring-8、NMRによるGTP加水分解過程の構造変化の解明
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河村 高志, 榎野 義輝, 長谷川 和也, 中根 崇智, 馬場 清喜, 南後 恵理子, 田中里枝, 岩田想, 島扶美, 熊坂崇
2. 発表標題 微小結晶を利用したRas caged-GTP時分割測定を試み
3. 学会等名 第33回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム
4. 発表年 2020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
研究協力者	榎野 義輝 (makino yoshiteru) (80822337)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	熊坂 崇 (kumasaka takashi) (30291066)		
研究協力者	河村 高志 (kawamura takashi) (60547412)		

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