

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16055

研究課題名(和文) SACLA及びNMRを駆使した抗がん剤設計のためのRasタンパク質の動的構造解析

研究課題名(英文) Conformational dynamics of Ras using by SACLA and NMR for the development of anti-cancer drugs

研究代表者

槇野 義輝 (Makino, Yoshiteru)

神戸大学・医学研究科・特命助教

研究者番号：80822337

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加水分解反応過程を通して細胞増殖や生存維持に係る細胞内シグナル伝達を制御する分子スイッチとしての機能を担う。本研究ではRasを標的とした新規がん治療薬開発にむけた基盤的知見を収集するために、光制御可能なcaged-GTPを用いて、X線自由電子レーザー施設SACLA、大型放射光施設SPring-8、並びに核磁気共鳴(NMR)分光法を駆使することで、RasのGTP加水分解反応過程の動的構造情報を取得した。その結果、Rasの構造ダイナミクスが活性制御メカニズムを巧みに制御している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Rasはがん全体の約30%で常時活性化しており、がん治療薬の標的分子である。そのため、本研究で得られた機能構造相関の結果は新たな創薬基盤情報となり得る。さらに、RasのGTP加水分解反応は酵素触媒反応のひとつであり、その作用メカニズムを結晶構造解析のみならず溶液、固体NMRを融合して解明した試みは、他の低分子量G蛋白質等の作用メカニズムの解明へと波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Small GTPases Ras function as a molecular switch which regulates intracellular signal transduction, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis, through the GTP hydrolysis process. In this study, in order to obtain basic knowledge for the development of novel anti-cancer drugs targeting Ras, we performed structural dynamics analysis of Ras in the GTP hydrolysis process by SACLA, SPring-8 and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy using photo-controllable caged-GTP. As a result, we found that the unique structural dynamics of Ras may be controlling the GTP hydrolysis mechanism.

研究分野：構造生命科学

キーワード：NMR Ras蛋白質 SACLA/SPring-8 創薬科学 構造生命科学 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

ras がん遺伝子産物である低分子量 G タンパク質 Ras は活性型である GTP 結合型と、その加水分解反応によって生じる完全不活性化型の GDP 結合型を相互変換しながら細胞の増殖、生存維持、分化、細胞死などに関わるシグナル伝達の分子スイッチとしての役割を担っている。さらに GTP 結合型 Ras はエフェクター分子と結合しない State1 と、エフェクター分子と結合し、活性化させる State2 の間で平衡状態にある (図 1)。

ヒトのがん全体の約 30%において Ras が常時活性化するアミノ酸変異が認められ、Ras の GTP から GDP への加水分解反応が抑制されているため、がん細胞内ではエフェクター分子を活性化する GTP 結合型 Ras が蓄積し、細胞増殖シグナルが伝達され続ける。このため、Ras はがん治療薬の重要なターゲットの 1 つであり、Ras に関する多くの構造解析が行われてきた。その結果 2005 年に Ras の GTP 結合領域付近に低分子化合物が結合可能な特異的なポケット構造が存在することが見いだされた (Ye M. et al, J Biol Chem. (2005) 280(35), 31267-31275.)。また、ポケットの開閉運動が Ras の内因性 GTP 加水分解活性と関連があり、Ras とエフェクター分子の相互作用を介したシグナル伝達の制御に影響していることも明らかになってきている。このように Ras はがん治療における有望なターゲットであるにも関わらず、Ras のポケット開閉運動を含む加水分解反応過程の動的構造の詳細な情報が不足しているため、揺らぎをもつ Ras を標的とした臨床領域で有効ながん治療薬は研究開始当初においては見出されていなかった。具体的に未解明な点としては、天然 GTP 結合型 Ras タンパク質の構造情報、State 間の構造変化の詳細、Ras の GTP 加水分解反応によって不活性化するメカニズムの詳細の捕捉の 3 点である。特に、既存の Ras についての構造研究は加水分解が起こらない GTP アナログ (GppNHp) で行われてきた。そのため、天然 GTP 結合型 Ras の構造は解明されておらず、タンパク質の構造に立脚したがん治療薬の展開 (構造ベース創薬/SBDD) の大きな障壁の 1 つである。

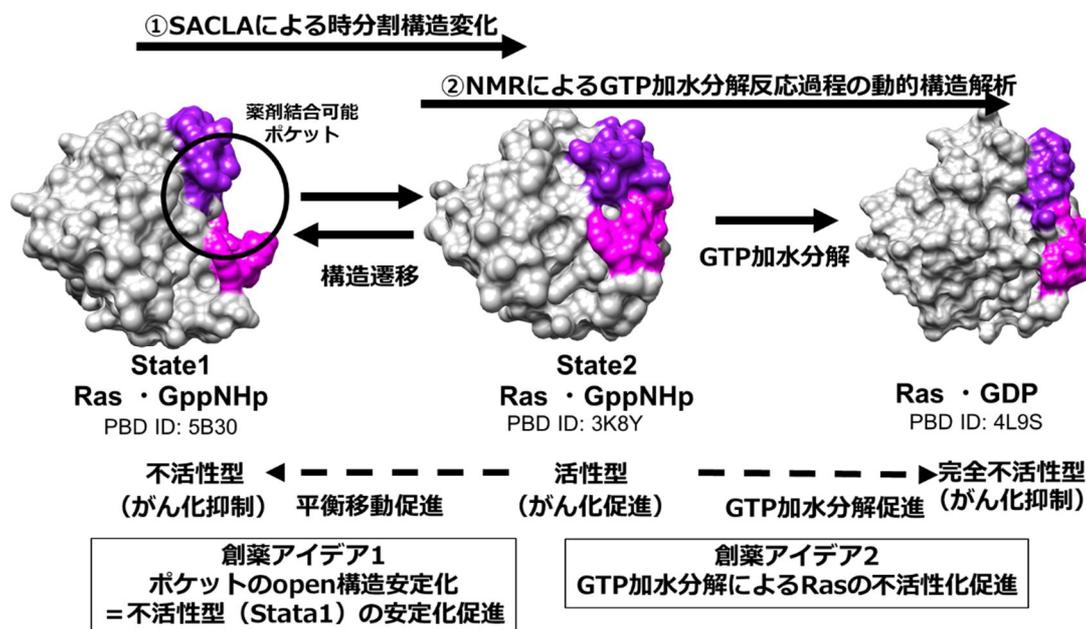


図 1 Rasタンパク質の構造

2. 研究の目的

本研究では、Ras タンパク質に関わる構造ベース創薬を前進させるため、その GTP 加水分解反応過程、すなわち酵素・触媒反応に基づく不活性化メカニズムを光制御可能な caged-GTP を用い、構造生物学的手法である核磁気共鳴 (NMR) 分光法、SPRING-8 での蛋白質 X 線結晶構造解析、並びに X 線自由電子レーザー (XFEL) 施設 SACLA におけるシリアルフェムト秒時分割 (SFX) 測定を駆使して、Ras 蛋白質の構造ダイナミクスと時分割の活性制御のメカニズムを原子スケールで明らかにすることを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 試料調整

Ras タンパク質試料は確立された大腸菌を用いた大量合成法によって調整した。特に NMR 測定用のサンプルは M9 最小培地を用いて ^{13}C 及び ^{15}N によって安定同位体均一標識したタンパク質試料として調整された。X 線結晶構造解析のための微結晶試料は蒸気拡散法をもとにして、均一かつ大量の高密度の微小結晶溶液として調整した。

Ras は内因性の GTP 加水分解活性を持つため、天然型 GTP 結合型 Ras は時々刻々と GDP 結合型へと構造変化する。本研究では、天然型 GTP 結合 Ras 並びに構造遷移過程における構造変化を捕捉するために光制御可能な caged-GTP を loading することで光照射によって天然型 GTP を生成することが可能な測定試料を調製した。

(2) 固体 ^{31}P NMR 測定

微結晶中での GTP 加水分解反応速度をトレースすることを目的として、微結晶溶液を用いた固体 ^{31}P _CP_MAS_NMR 測定を実施した。固体 NMR 分光器は 1H 共鳴周波数 500MHz (JEOL) を用い、MAS 回転数 10KHz、室温条件で実施した。測定サンプルは濃縮後、十分に結晶化リザーバーで湿潤した状態で、マイクロカプセルに封入し、ZrO₂ 試料管にインサートした。光照射は 365 nm の LED 光源を使用し、光照射後に直ちに測定を開始した。

(3) SACLA 及び SPring-8 での結晶構造解析

X 線結晶構造解析は上記 (1) で調整した微結晶サンプルを SACLA での時分割 XFEL 測定、並びに SPring-8 での高輝度光を用いた SS-ROX 法と呼ばれる測定等に供し、実施した。SACLA における XFEL 測定並びに、SPring-8 での X 線回折実験は JASRI・熊坂崇博士、河村高志博士らの協力の下実施された。測定用の微結晶サンプルとしては 1×10^7 個・ ml^{-1} 程度の濃度の微結晶溶液サンプルを調製し、必要量に濃縮して使用した。XFEL 測定では cage 離脱のためのポンプ光 (励起レーザー光) として近紫外光領域である 310nm の波長の光を使用し、時分割 X 線結晶構造解析を実施した。SS-ROX 法における光源は 365nm の LED 光源を使用し、上記 (2) の結果見積もられた幾つかのタイムポイントにおいて freeze trap し、凍結サンプルとして測定に供した。

(4) 溶液 NMR 測定

溶液 NMR 測定は Bruker Avance III 600 分光器を使用し 1H 共鳴周波数 600.13279833 MHz、測定温度 298K で実施された。測定サンプルはリン酸緩衝液中に均一に溶解した Ras・cage-GTP (400 μM) とした。測定手法は蛋白質の溶液 NMR 測定で一般的に用いられる ^{15}N HSQC をベースとして使用し、信号の帰属には必要な各種 3D NMR (hncac, hn(co)ca, hncacb, hn(co)cacb, hncoc, hn(ca)co など) を用いた。加えて光照射後に経時的な ^{15}N HSQC 測定を実施し、信号強度をトレースすることで部位特異的な構造変化を観測した。

4. 研究成果

(1) 固体 ^{31}P NMR による結晶中での GTP 加水分解反応の速度論解析

固体 ^{31}P _NMR による反応速度論解析では、近紫外光 (LED) 照射による cage 離脱後の GTP の ^{31}P _NMR 信号の時間変化を補足し、その速度論解析から X 線結晶構造解析において着目すべきタイムポイントを同定した。CP-MAS NMR 測定は、暗状態及び光照射後のおよそ 15 分から 48 時間までの様々なタイムポイントで行い、cage 離脱後の GTP 加水分解に伴う ^{31}P _NMR シグナルの時間変化を補足することに成功した。暗条件下での Ras・caged-GTP と光照射後 24 時間以上の時間経過した後の NMR スペクトルは光照射による cage 離脱と続く GTP 加水分解反応による GDP の産生を示していた。加えて、光照射後直後には天然型 GTP 由来の γ 、 β 、 α -リン酸のシグナルが観測され、GTP 型の γ -リン酸および β -リン酸の信号強度の減少にともなって GDP 型のシグナルが増大を補足した。GDP 型の γ -リン酸の信号強度変化に基づく結晶中での GTP 加水分解反応速度を解析した結果、Ras の GTP 加水分解反応は、光照射後 約 600 分で完結することが示唆された。また、-7 ppm 付近のピークは、GTP / State 1 型の γ -リン酸と GTP / State 2 型の β -リン酸の信号が重なりあったシグナルであり、それらの信号強度の経時変化を比較したところ、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 2)。

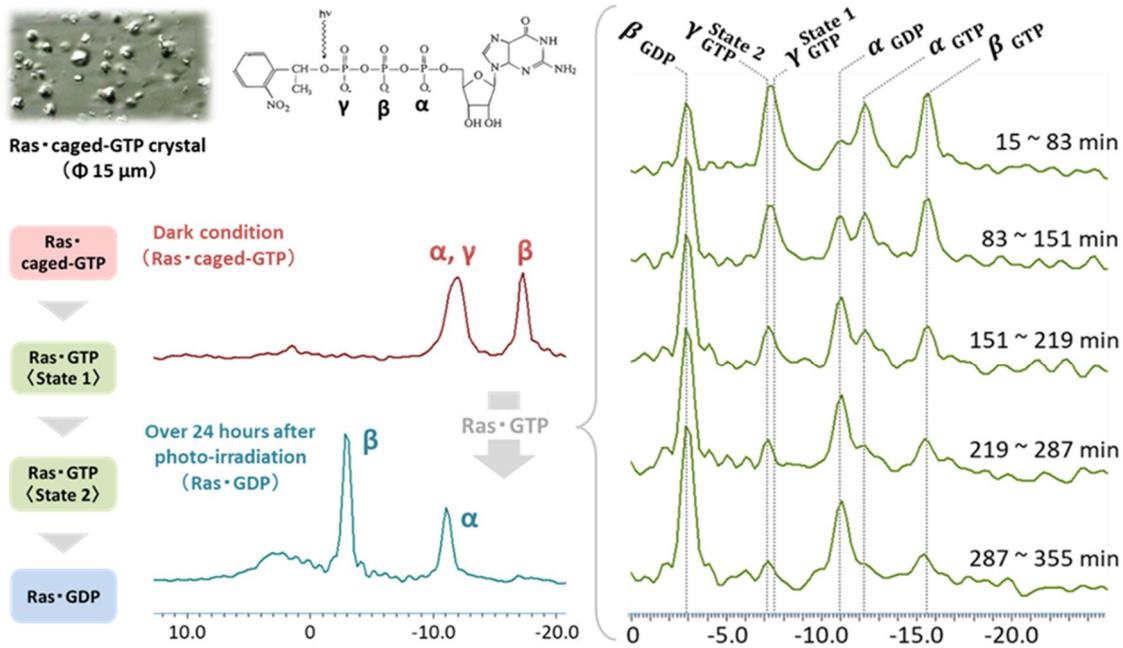


図 2. 固体³¹P NMRによるGTP加水分解反応の速度論解析

(2) SACLA 及び SPring-8 における時分割 X 線結晶構造解析

照射前の微結晶サンプルについて XFEL 測定並びに SS-ROX 測定を実施した結果、照射前の Ras·caged-GTP は、ポケットの開いた State 1 様の構造であることが示された。続いて、照射後による cage 離脱後の構造変化について SACLA 及び SPring-8 による時分割測定を実施した。XFEL 測定では cage 離脱のためのポンプ光（励起レーザー光）として近紫外光領域である 310nm の波長の光を使用した。一連の測定の結果、照射後に格子定数の時間変化が観測された。これら格子定数の変化は照射によって cage が離脱し、構造遷移とそれに続く GTP 加水分解に伴うタンパク質の構造変化が生じた結果であることが強く示唆される結果であった。照射直後の GTP 結合型 Ras の構造は、照射後数ミリ秒のタイムポイントで Ras のポケット部分に着目すると、State 1 様のポケットの開いた構造であり、照射による cage 離脱後の天然 GTP 型 Ras から State 1 様構造へ構造変化を示唆する構造情報の取得に成功した（論文投稿準備中のためデータ非公開）。また、SPring-8 での SS-ROX 法などによる X 線回折実験から、微結晶中の Ras は照射の数十時間後には Ras·GDP へと構造変化しており、その格子定数の変化などから議論すると、Ras の GTP 加水分解は State 1 から State 2 を経て GDP 型へと至る逐次的な変化であることが示唆された（図 3）。

また、固体 ³¹P NMR によって明らかとなった GTP 加水分解反応の時定数をもとに、複数のタイムポイントでの X 線回折実験（SS-ROX 法）を実施した結果、一連の GTP 加水分解反応におけるヌクレオチドとその近傍の電子密度変化を補足し、酵素・触媒反応で生じる GTP 近傍の構造変化の一部を解明した。

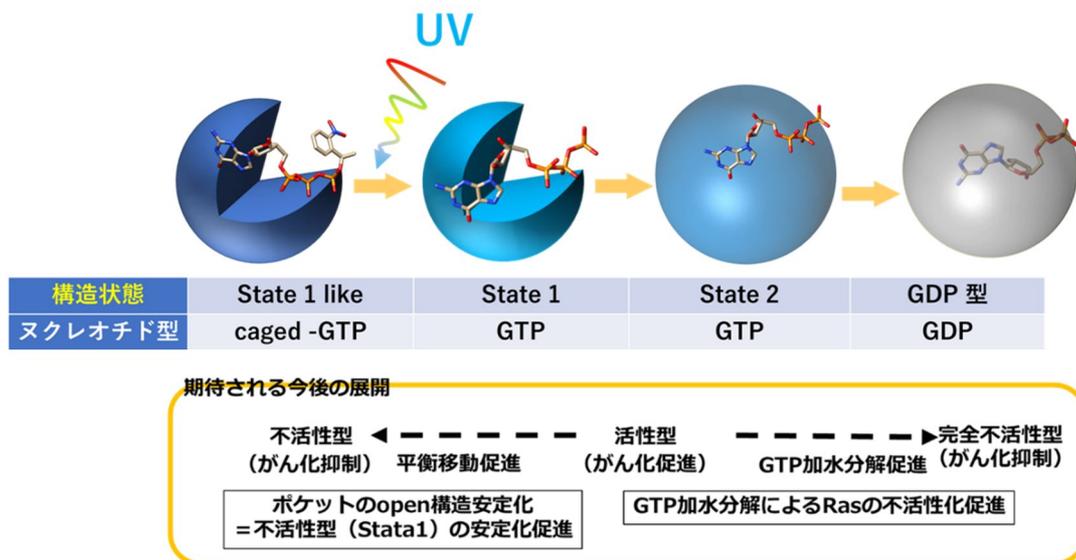


図3. 時間分解X線結晶構造解析で補足された逐次的なGTP加水分解反応プロセスのモデル

(3) 溶液 NMR による GTP 加水分解反応過程における部位特異的な構造変化の解明

溶液 NMR を用いた構造ダイナミクスを解析したところ、 ^{15}N -HSQC 等の NMR スペクトルの信号変化から、GTP 加水分解反応に伴う Ras の構造変化はポケット領域のみならず隣接した領域でも顕著に生じていることが明らかとなった。まず、暗状態での ^{15}N -HSQC 測定の結果、特定のアミノ酸残基の化学シフト値から、Ras・cage-GTP は溶液中でも結晶構造と同様な State 1 様の構造であることが示唆された。

Ras・caged-GTP からの cage 離脱のための光照射実験は光の波長 365nm の LED 光を NMR プロブの外で照射し、直ちに測定を開始することで行われた。その結果、溶液中では cage 離脱は速やかに進行し、その構造はおよそ 600 min. かけてゆっくりと GDP 型へと構造変化することが示された。興味深いことに、アミノ酸残基ごとに NMR シグナルの強度変化をトレースしたところ、GTP 加水分解反応に伴う Ras の構造変化は上述のポケット領域の構造変化に加えて、ポケットに隣接する P-loop、 $\alpha 3$ ヘリックスと呼ばれる領域においても顕著な構造変化が観測された(データ非公開)。すなわち Ras の GTP 加水分解反応に伴う構造変化は酵素触媒部位であるポケット並びに隣接する部位の構造変化も重要であることが示され、新たな創薬開発に資する構造情報になり得る知見を取得するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐伯茉帆, 横野義輝, 河村高志, 南後恵理子, 熊坂崇, 島扶美
2. 発表標題 低分子量G蛋白質RasのGTP加水分解過程におけるヌクレオチド近傍の構造変化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 2021年11月5日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島扶美, 横野義輝, 南後恵理子, 熊坂崇
2. 発表標題 光反応性基質を利用したがん遺伝子産物Rasの酵素触媒反応の可視化
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 2021年11月5日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横野義輝, 島扶美
2. 発表標題 SACLA/SPRing-8/NMRを用いたRasのアロステリック構造変化の解明
3. 学会等名 第5回徳島大学統合的がん創薬研究クラスター・合同オンラインミーティング 2022年3月8日
4. 発表年 2022年

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.
3. 学会等名 第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時分割測定の試み
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	島 扶美 (Shima Fumi)		
研究協力者	熊坂 崇 (Kumasaka Takashi)		
研究協力者	河村 高志 (Kawamura Takashi)		

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
---------	---------