

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590280

研究課題名 (和文) Ras の新規高次構造を標的とした抗癌剤の開発

研究課題名 (英文) Anti-cancer drug design targeting a novel tertiary structure of *ras* oncogene product

研究代表者

島 扶美 (SHIMA FUMI)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60335445

研究成果の概要 (和文)：

GTP 結合型 Ras (Ras-GTP) には、エフェクターと結合できる“シグナル ON”状態 (活性型) と、できない“シグナル OFF”状態 (不活性型) の 2 種類の立体構造が相互変換可能な状態で混在する。本研究では、GTP 結合型ながら不活性型の Ras の新規立体構造情報に基づくインシリコスクリーニングと種々の生化学・細胞学的活性検証試験を通じて、Ras に結合することでその機能を特異的に阻害する複数種類の低分子化合物の同定に成功した。

研究成果の概要 (英文)：

GTP-bound form of *ras* oncogene product Ras exhibits dynamic equilibrium between two interconverting conformations, “inactive” state 1 and “active” state 2. Based on a novel tertiary structure of Ras-GTP, we have performed *in silico* and *in vitro* screening for low molecular weight compounds which inhibit Ras function. Consequently, we have succeeded in identification of several hit compounds which specifically bind and inhibit Ras function *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：インシリコ、創薬、*ras* がん遺伝子、シグナル伝達、がん、低分子量 G 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

低分子量G蛋白質であるRasは、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) をスイッチしながら、細胞増殖・分化に関与するシグナル伝達を制御する。哺乳動物では、H-, N-, K-Rasという3つのRasのアイソフォームが存在し、ヒトのがんではそのいずれかの突然変異による活性化が高頻度に認められ、特に大腸がんや膵臓がん等においては、高率に活性化が確認されている。またRasには、アミノ酸配列が類似したRap, R-RasやM-Rasなどのホモロ

グが存在しRasファミリーを形成する。Ras-GDPからRas-GTPへの変換に伴い、Rasのアミノ末端側近傍に位置する2つの領域、switch Iとswitch IIに構造変化が起こる。Ras-GTPは、一般的に均一な活性型と認識されてきたが、構造生物学者らによるRasの³¹P核-NMRによる解析から、Ras-GTPでは、エフェクターと結合できる“ON”状態 (state 2 と呼ばれH-Rasでは主要なstate) と、できない“OFF”状態 (state 1) の2種類の構造が相互変換可能な状態で混在することが明らかになった。State 2 の立体構造は既知であ

ったが、state 1 については、立体構造が長らく未解明であった。しかし我々は、RasホモログM-RasのX線結晶構造解析と³¹P-NMRを通じてstate 1 の立体構造決定に世界に先駆けて成功した。State 1 ではswitch 領域周辺に、state 2 では認められない特異的ポケットが形成されていた。

2. 研究の目的

近年、発がんの分子機構に関する研究の進展に基づいて、癌遺伝子産物を分子標的とした抗癌剤の開発が急速に進んでいる。Ras は、ヒトの多くのがんにおいて、高率に活性化が認められることから、最も有望な抗癌剤開発のための分子標的と考えられるが、Ras の機能阻害を目指した抗癌剤開発の成功例は現在世界的に見ても存在しない状況になる。本研究は、Ras の新規立体構造に着目してインシリコならびに生化学・細胞生物学的スクリーニングを駆使した探索によって、研究開始当時申請者が保有していたヒット化合物（低分子化合物）の作用機序を明らかにするとともに、新たなヒット化合物を同定することを主たる目的とする。

3. 研究の方法

(1) 活性型 Ras を有する培養ヒトがん細胞株 (SW480, Panc1 など) ならびに Ras の活性化が認められないがん細胞株 (MCF-7, G361 など) を用いて、ヒット化合物の作用の Ras 特異性を検証した。また、化合物による Ras のシグナル伝達阻害を Ras の下流に位置するシグナル伝達分子の活性化レベルを測定することで評価した。上記がん細胞株を移植したモデル動物システムを用いて、市販の抗癌剤との薬理活性の比較を行った。

(2) 核磁気共鳴の手法の一つである Nuclear Overhauser Effect (NOE) を利用して、ヒット化合物の Ras 結合部位を明らかにした。

(3) 化合物の構造情報と生化学的活性情報を利用したコンピュータ能動学習法を利用して、新たなヒット化合物探索を行った。

(4) 種々の H-Ras、M-Ras 変異体を用いた NMR ならびに X線結晶構造解析を通じて、state 1 と state 2 の立体構造遷移のメカニズムを解明した。

4. 研究成果

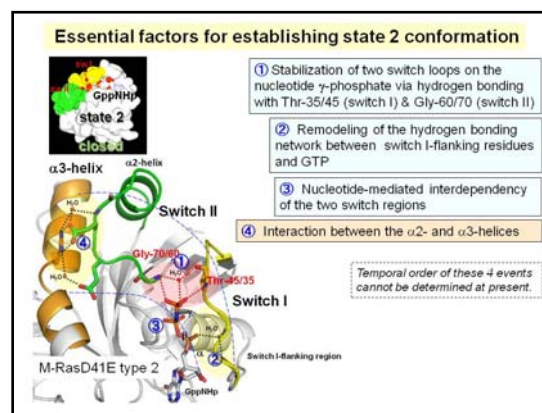
(1) ヒット化合物は、活性型 Ras を有するヒトがん細胞株に対して、足場非依存性の細胞増殖ならびに低血清中での細胞増殖などががん化形質を顕著に抑制する一方、Ras の活性化が認められないがん細胞株には抑制作用が示されなかったことから、ヒット化合物の Ras 特異性は高いことが確認された。また、Ras-Raf シグナル伝達系の下流に位置する MEK, ERK (セリン/スレオニンキナーゼ)

の活性化をそれぞれのリン酸化レベルの測定により評価したところ、顕著なリン酸化の低下が確認されたことから、ヒット化合物は Ras-Raf シグナル伝達系を特異的に阻害することが示唆された。さらに、前述のヒト大腸がん細胞株 SW480 を移植したヌードマウスにヒット化合物を経口投与し、腫瘍サイズの経時的变化を観察したところ、市販の抗癌剤治療薬 sorafenib (マルチキナーゼ阻害剤) に匹敵する強力な腫瘍増殖抑制作用が確認できた。ヒット化合物投与したマウスの腫瘍組織では、Ras-Raf シグナル伝達系が顕著に阻害されたことが示される免疫組織学的データ (MEK, ERK のリン酸化阻害) が確認できた。

Ras の機能阻害剤のインシリコスクリーニングに用いた実験材料ならびに方法論については、特許出願済みである (特許出願状況参照)

(2) ¹⁵N核ならびに¹³C核の安定同位体でラベルした Ras を用いて、ヒット化合物存在下で NOE測定を行ったところ、化合物の部分構造と距離的に近い (5 Å 以内) アミノ酸残が複数同定され、Ras とヒット化合物との複合体の構造モデル構築が構築された。

(3) 研究開始の時点で保有していたヒット化合物の構造・活性情報に基づくコンピュータ能動学習法を実施して候補化合物の選抜を行い、前述の生化学・細胞生物学的活性評価試験を行うことで、新たな母核構造を有す



る複数の新規ヒット化合物同定に成功した。

(4) H-Ras、M-Rasの種々の変異体を用いた³¹P-NMRならびにX線結晶解析により、2つのstate間の構造遷移には2種類のRasに共通のメカニズムが存在することが明らかになった。① GTPの γ 位のリン酸基とRasの2つのswitch領域に存在するThr35/45 (H-Ras/M-Rasのswitch Iの残基)とGly60/70 (H-Ras/M-Rasのswitch IIの残基)との水素結合は、state 2の構造安定化に極めて重要な役割を果たしていた (上図①と③)。この2種類の水素結合を発生させるためには、switch I近傍に位置する新たな領域pre-switch I (上図②)とswitch IIに隣接する $\alpha 3$ ヘリックス (上図

④)における水素結合のリアレンジメントが事前に起こることが明らかになった。また、Rasの類縁体の複数の結晶構造との詳細な構造比較を通じて、state遷移のメカニズムがRasに広く保存されている可能性が示唆された。

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)

1. Matsumoto, K., Shima, F., Muraoka, S., Araki, M., Hu, L., Ijiri, Y., Hirai, R., Yoshioka, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Tamura, A., and Kataoka, T. Critical Roles of Interactions Among Switch I-preceding Residues and Between Switch II and Its Neighboring α -helix on Conformational Dynamics of the GTP-bound Ras Family Small GTPases. *J. Biol. Chem.* (2011) **286** in press. (査読有)
2. Shima, F., Ijiri, Y., Muraoka, S., Liao, J., Ye, M., Araki, M., Matsumoto, K., Yamamoto, N., Sugimoto, T., Yoshikawa, Y., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Tamura, A., and Kataoka, T. Structural basis for conformational dynamics of GTP-bound Ras protein. *J. Biol. Chem.* (2010) **285** (29):22696-22705. (査読有)
3. Kobayashi, T., Hori, Y., Ueda, N., Kajiho, H., Muraoka, S., Shima, F., Kataoka, T., Kontani, K., Katada, T. Biochemical characterization of missense mutations in the Arf/Arf-family small GTPase Arl6 causing Bardet-Biedl syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* (2009) **381**(3): 439-442, 2009. (査読有)

[学会発表] (計8件)

1. 松本 耕祐、島 扶美、村岡 真、井尻 悠一、市川 晋也、荒木 望嗣、熊坂 崇、田村 厚夫、片岡 徹; Molecular mechanism of conformational transition of GTP-bound Ras revealed by the crystal structure analysis of M-Ras mutants [BMB2010 (第33回日本分子生物学会年回・第83回日本生化学会大会合同大会); 2010年12月/神戸]
2. 片岡 徹、島 扶美; New strategy for development of anti-cancer drugs targeting the *ras* oncogene products (指定演題・モーニングレクチャー) [第69回日本癌学会学術総会; 2010年9月/大阪]

3. 井尻 悠一、島 扶美、村岡 真、廖 静伶、松本 耕祐、荒木 望嗣、熊坂 崇、田村 厚夫、片岡 徹; GTP結合型Rasの構造遷移における分子メカニズムの解析 (ポスター発表) [第32回日本分子生物学会; 2009年12月/横浜]
4. 村岡 真、島 扶美、廖 静伶、片岡 徹; 出芽酵母の低分子量Gタンパク質Ras2のX線結晶構造解析 (ポスター発表) [第82回日本生化学会大会; 2009年10月/神戸]
5. Kousuke Matsumoto, Fumi Shima, Shin Muraoka, Jingling Liao, Yuichi Ijiri, Tohru Kataoka; Structural analysis of the novel statel conformation of Ras protein (ポスター発表) [「膜生物学グローバルCOE第3回ワークショップ」; 2009年7月/兵庫県・淡路]
6. 関 伸章、村岡 真、荒木 望嗣、吉本 梓希子、島 扶美、田村 厚夫、片岡 徹; GTP結合型H-Rasの高次構造多型性とエフェクターの新規認識機構 (ポスター発表) [BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会); 2008年12月/神戸]
7. Kousuke Matsumoto, Fumi Shima, Jingling Liao, Shin Muraoka, Tomoko Inoue, Min Ye, Takeshi Sugimoto, Yoko Yoshikawa, Moto Hiramatsu, Tohru Kataoka; New strategy to develop Ras specific inhibitors based on conformational equilibrium of Ras oncoprotein (ポスター発表) [第3回グローバルCOE研究討論会 兼グローバルCOE第2回ワークショップ; 2008年7月/神戸]
8. Moto Hiramatsu, Fumi Shima, Yoko Yoshikawa, Shin Muraoka, Satomi Kaizawa, Min Ye, Takeshi Sugimoto, Jingling Liao, Kousuke Matsumoto, Tohru Kataoka, New strategy to develop Ras specific inhibitors (ポスター発表) [第3回グローバルCOE研究討論会 兼グローバルCOE第2回ワークショップ; 2008年7月/神戸]

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 名称: Ras 機能阻害剤のスクリーニング方法
発明者: 片岡 徹、島 扶美、田村 厚夫、荒木 望嗣
権利者: 神戸大学
種類: 特許
番号: 特願 2011-023695

出願年月日：2011年2月7日
国内外の別：国内

2. 名称：変異型 Ras ポリペプチドの結晶
(MUTANT RAS POLYPEPTIDE CRYSTAL)

発明者：片岡 徹、島 扶美、田村 厚夫、
熊坂 崇

権利者：国立大学法人神戸大学、財団法人高
輝度光科学研究センター

種類：特許

番号：WO/2011/007773 (PCT/JP2010/061821)

出願年月日：平成22年7月13日（優先日：
平成21年7月14日）

国内外の別：国内→国外移行予定

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/molbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島 扶美 (SHIMA FUMI)

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60335445

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

熊坂 崇 (KUMASAKA TAKASHI)

高輝度光科学研究センター・利用研究促進

部門・副主席研究員

研究者番号：30291066