

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840014

研究課題名(和文) NMR法によるチロシンキナーゼの動的構造解析

研究課題名(英文) NMR analyses of the structural equilibrium in tyrosine kinases

研究代表者

横川 真梨子 (YOKOGAWA, MARIKO)

慶應義塾大学・薬学部・助教

研究者番号：60648020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：チロシンキナーゼが機能する際の構造動態を明らかにすることは、創薬や生命現象の解明に役立つ。本研究では、チロシンキナーゼに内在する構造平衡をNMR法により解析することで、チロシンキナーゼの活性を担う動的構造を明らかにすることを目的とした。

c-Src、Fyn、c-Ablの大腸菌での発現・精製プロトコルを確立し、リン酸化状態を制御したサンプルを調製した。安定同位体標識サンプルのNMRスペクトル測定を行うことで、リン酸化状態や薬剤の結合に伴うNMRスペクトル変化の検出に成功した。このスペクトル変化がチロシンキナーゼの機能に関わる構造平衡を反映している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tyrosine kinases are major targets for anticancer drug. To understand the dynamic regulation of tyrosine kinases, NMR analyses of the structural equilibrium were performed. In this study, E coli. expression system and purification protocol for c-Src, Fyn, and c-Abl were successfully established. NMR spectral changes upon phosphorylation of c-Src and upon binding to drugs were observed. NMR approach would be useful for understanding the dynamic processes in the regulation of tyrosine kinases.

研究分野：構造生物化学

キーワード：キナーゼ NMR

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼは、基質タンパク質のチロシン残基に ATP のリン酸基を転移させる酵素であり、リン酸化されたチロシン残基と他のタンパク質の相互作用を介して、細胞増殖や分化などの様々な生体機能に関与する。チロシンキナーゼの活性は、自身のリン酸化や他のドメインとの相互作用により厳密に制御されている。恒常的活性化を含むチロシンキナーゼの活性制御機構の破たんが様々ながんにおいて報告されていることから、チロシンキナーゼは重要な創薬ターゲットとして機能・構造研究が行われてきた。

チロシンキナーゼの活性本体であるキナーゼドメインは、NローブとCローブと呼ばれる2つのローブから構成される。基質やATPの結合部位、活性残基を含む触媒部位はNローブとCローブの間に存在する。非リン酸化状態における不活性型構造とリン酸化状態における活性型構造のX線結晶構造より、触媒部位が活性型構造を形成するためには、NローブのCヘリックスの配向とCローブの活性化ループの構造が重要であることが分かっている。このように、チロシンキナーゼをターゲットとした機能・創薬研究では、X線結晶構造解析が活性制御の分子機構や薬剤による阻害機構の解明に大きく貢献してきた。一方で、例えばキナーゼドメインの不活性型構造を標的とする阻害剤である imatinib は、c-Src と c-Abl の間で結合残基が保存されているにもかかわらず、c-Abl を選択的に阻害する (Seelinger MA. *et al.*, *Structure* (2007), 15, 299-311)。複合体の結晶構造だけでは分からない、この imatinib に対する感受性の違いは、非リン酸化状態のキナーゼドメインに内在する活性型と不活性型の構造間の平衡状態の違いに起因すると考えられている。すなわち、imatinib をはじめとする阻害剤の結合や変異、リン酸化は、キナーゼドメインに内在する構造平衡を変化させることでキナーゼ活性を調節していると考えられる。したがって、キナーゼ活性の理解には結晶構造による静的な構造情報のみでは不十分であった。

また、c-Src や c-Abl は自己阻害状態の結晶構造より、SH3 ドメイン、SH2 ドメインなどの制御ドメインとの相互作用による不活性化機構が明らかとなっている。活性化時にはこのドメイン間相互作用による抑制が解除される必要があるが、活性化時のドメイン間の相対配置は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、チロシンキナーゼに内在する構造平衡を NMR 法により解析することで、チロシンキナーゼの活性を担う動的構造を明らかにすることを目的とした。スナップショットとしての X 線結晶構造のみでは分からない、変異による活性発現機構や、薬剤に

よる活性制御機構を動的構造の観点から理解することにより、医療や創薬を推進する溶液 NMR 技術基盤を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) キナーゼの大腸菌発現・精製法の確立

NMR 法を用いた立体構造解析に向けて、非受容体型チロシンキナーゼの大腸菌における発現および精製プロトコルを確立する。発現に用いる大腸菌株やベクターの組み合わせを検討することで、大量発現に適した培養法を確立する。調製したタンパク質のリン酸化状態は、リン酸化チロシンに対する特異的抗体を用いたウェスタンブロット法および非変性 PAGE により確認する。非リン酸化体として調製したキナーゼを、ATP 添加による自己リン酸化、ならびに c-Src と Fyn は Csk によるリン酸化を *in vitro* で行うことにより、リン酸化体を調製する。

(2) キナーゼの NMR 法による立体構造解析

安定同位体標識を行ったキナーゼを調製し、NMR 測定を行う。非リン酸化体、リン酸化体、ATP の非加水分解アナログ結合型、阻害剤結合型などの様々な状態のサンプルを調製し、NMR スペクトルの変化を観測する。NMR シグナルの帰属は、部位特異的変異導入などにより行う。

4. 研究成果

c-Src、Fyn、c-Abl の全長およびキナーゼドメインの大腸菌発現系を構築し、発現・精製条件の確立に成功した。調製したタンパク質が非リン酸化体であること、自己リン酸化活性をもつこと、および c-Src と Fyn は Csk によりリン酸化されることを確認した。以上より、活性を保持したタンパク質の調製に成功したと判断した。

c-Src のメチオニン残基の側鎖メチル基を観測対象とした NMR 測定を行うことで、ATP の結合やリン酸化に伴うスペクトル変化を検出した。アミノ酸配列中のすべてのメチオニン残基メチル基の NMR シグナルが観測されていることを確認し、部位特異的変異導入により各シグナルの帰属を確立した。c-Abl は、メチオニン残基の側鎖メチル基の NMR 測定は行ったが、観測されたシグナル数がアミノ酸配列中のメチオニン残基数より少なく、NMR スペクトルの質も低かったため、測定条件の検討が必要であると判断した。

今後、リン酸化体や薬剤結合型などの様々な状態の c-Src について測定した NMR スペクトルを、本研究において確立した帰属と既知の c-Src の X 線結晶構造に基づき解釈し、各状態のタンパク質の動的構造に関する情報を得る。

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4件)

Kobashigawa Y., Amano S., Yoza K., Himeno R., Amemiya S., Morioka H., Yokogawa M., Kumeta H., Schlessinger J., and Inagaki F., Nuclear magnetic resonance analysis of the conformational state of cancer mutant of fibroblast growth factor receptor 1 tyrosine kinase domain., *Genes to Cells*, 査読有, 21(4), 2016, DOI : 10.1111/gtc.12345

Yokogawa M., Tsushima T., Noda NN., Kumeta H., Enokizono Y., Yamashita K., Standley DM., Takeuchi O., Akira S., and Inagaki F., Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions., *Scientific Reports*, 査読有, 6, 2016, DOI : 10.1038/srep22324

Toyama Y., Osawa M., Yokogawa M., and Shimada I., NMR Method for Characterizing Microsecond-to-Millisecond Chemical Exchanges Utilizing Differential Multiple-Quantum Relaxation in High Molecular Weight Proteins., *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 138(7), 2016, DOI : 10.1021/jacs.5b12954

Kobashigawa Y., Amano S., Yokogawa M., Kumeta H., Morioka H., Inouye M., Schlessinger J., and Inagaki F., Structural analysis of the mechanism of phosphorylation of a critical autoregulatory tyrosine residue in FGFR1 kinase domain., *Genes to Cells*, 査読有, 20(10), 2015, DOI : 10.1111/gtc.12277

[学会発表](計9件)

沢崎 綾一、今井 駿輔、横川 真梨子、臼井 遥子、星野 真一、大澤 匡範、ポリA上でのPABP多量体化の構造生物学的解析、日本薬学会第136回年会、2016年03月26日~2016年03月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

加納 花穂、外山 侑樹、岩橋 優太、間瀬 瑠子、横川 真梨子、大澤 匡範、嶋田 一夫、Gタンパク質三量体によるGタンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネル活性制御機構の構造生物学的解明、第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月01日~2015年12月04日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

外山 侑樹、大澤 匡範、横川 真梨子、嶋田 一夫、多量子遷移の緩和速度の差を利用した高分子量タンパク質のマイクロ秒か

らミリ秒オーダーの化学交換の解析法の開発、第54回NMR討論会、2015年11月06日~2015年11月08日、千葉工業大学(千葉県習志野市)

加納 花穂、外山 侑樹、岩橋 優太、間瀬 瑠子、横川 真梨子、大澤 匡範、嶋田 一夫、Gタンパク質三量体によるGタンパク質共役型内向き整流性カリウムチャネル活性制御機構の構造生物学的解明、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日~2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

横川 真梨子、津嶋 崇、野田 展生、久米田 博之、足立 わかな、榎園 能章、山下 和男、Daron M. Standley、竹内 理、審良 静男、稲垣 冬彦、Regnase-1によるmRNA切断機構の構造生物学的解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日~2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

横川 真梨子、津嶋 崇、野田 展生、久米田 博之、足立 わかな、榎園 能章、山下 和男、Daron M. Standley、竹内 理、審良 静男、稲垣 冬彦、Regnase-1によるmRNA切断機構の構造生物学的解析、第53回NMR討論会、2014年11月04日~2014年11月06日、大阪大学(大阪府吹田市)

Osawa M., Mase Y., Yokogawa M., Takeuchi K., Shimada I., Structural Basis for Regulation of G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel 1 (GIRK1) by G Proteins., 第52回日本生生物物理学学会年会、2014年09月25日~2014年09月27日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Toyama Y., Osawa M., Yokogawa M., Shimada I., Structural analyses of the gating mechanism of inwardly rectifying potassium channel., *International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2014年08月24日~2014年08月29日, Dallas (USA)

Osawa M., Mase Y., Yokogawa M., Takeuchi K., Shimada I., Structural Basis for Regulation of G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel 1 (GIRK1) by G Proteins. *International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems*, 2014年08月24日~2014年08月29日, Dallas (USA)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横川 真梨子 (YOKOGAWA, Mariko)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号：60648020