

分担研究報告書

*ras*がん遺伝子産物を標的とした治療薬開発のためのX線結晶構造解析

研究分担者 （氏名）熊坂 崇 （所属機関名 職名）高輝度光科学研究センター 副主席研究員

研究要旨

「*ras* がん遺伝子産物の新規立体構造情報に基づくがん分子標的治療薬の開発」を目指して、低分子 GTP 結合蛋白質の一種で細胞増殖の分子スイッチである *ras* 遺伝子産物を対象とした研究を行っている。本分担研究ではその一環として、Ras の構造変化を認識して結合する分子標的薬のデザインを効率的に行うための構造情報を得るため、主に X 線結晶構造解析の手法を用いて、Ras 蛋白質の変異体を含む種々の状態の分子構造ならびに薬剤複合体の構造を解明することを目的とする。

A．研究目的

Rasタンパク質は、低分子GTP結合タンパク質の一種で、転写や細胞増殖、細胞の運動性の獲得のほか、細胞死の抑制など数多くの現象に関わっている。Rasの異常は細胞のがん化に大きく関わるため*ras*遺伝子は原がん遺伝子に分類される。

また、Rasタンパク質は分子質量約21kDaの単量体分子であり、GTP/GDPの結合部位と、PI3キナーゼ（PI3K）やRaf、Ral-GEFと相互作用するためのエフェクターループと呼ばれる部位を有している。

不活性なRasはGDPと結合しているが、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）によりGTPと交換されると活性化する。Ras-GTPは、従来活性型と考えられていたが、エフェクター分子との結合能力を有するState 2構造（真の活性型）と有さないState 1構造（不活性型）との間での構造遷移（ゆらぎ）が存在することが近年のNMR解析で明らかになった。

我々はこれまでにX線結晶解析により、野生型Rasでは初めてとなるState 1の立体構造決定に成功した。このRasのState 1構造には分子表面に低分子化合物が十分挿入できるサイズのポケット構造が存在することが明らかとなった。このポケットに選択的に結合してRasの構造をState 1に安定化する物質は、Rasの機能を阻害する抗癌剤として作用する可能性があることに着目し、候補化合物をインシリコ選抜し、生化学・細胞生物学的手法を駆使して、選抜化合物の活性検証を行っている。その結果、培養癌細胞レベルおよび担癌モデル動物においても抗癌活性を示す複数のヒット化合物の同定に成功している。

本分担研究では、これらとRasタンパク質の複合

体構造を解明し、医薬品候補としてふさわしい活性獲得を目指したヒット化合物のデザインを推進することを目的としている。

B．研究方法

昨年までに、野生型Rasタンパク質結晶について、HAG (Humid Air and Glue-coating) 法を用いて、試料雰囲気湿度を下げることでState 2構造からState 1構造への変化を誘起できることが明らかとなった。

今年度は、薬剤ターゲット分子となるState 1構造を有する結晶を作り出す方法を確立することを目的とし、この変化をより詳細に解明するため、種々の条件を変化させつつ実験を行った。具体的には、野生型H-Ras R32型結晶を、HAG法にてマウントし、結晶格子の変化を誘起する。回折強度データは大型放射光施設SPring-8のBL41XUあるいはBL38B1にて測定し、解析計算を実施して、最終構造を得た。

さらに、リード化合物の誘導体を使用した複合体の結晶解析のための回折実験も合わせて開始している。

（倫理面への配慮）

タンパク質や有機化合物を材料としており、特に問題になる点はありません。

C．研究結果

SPring-8 BL38B1にて、2013年7月10日、12月6日のビームタイムを利用し、天然型H-RasのR32型結晶より、HAG法を用いた測定を行った。最終的に計8セットのデータを測定した。

コーティング剤の条件を検討して複数回実験を

行った結果、常に一定の湿度で格子定数の変化が見られた。この試料から得られた回折データに基づく分子構造は、昨年度に得られた構造と基本的に同じであり、構造の転移を再現性良く誘起する条件を見出したといえる。

また、転移現象をより詳細に調べるため、0.1% RH程度のステップで湿度を変化させて、格子定数の変化を追跡した。その結果、当初想像していた湿度の変化に対する格子変化の可逆性はなく、不可逆的であり、一旦State 1構造に変化すると、湿度を上昇させても、State 2構造に戻ることはなかった。したがって、この結晶系においては、むしろState 1構造のほうが安定であると言える。このことは、結晶パッキングにおける分子間の水素結合の数が、転移後に増えていることから示唆される。

ただし、転移過程に複数の経路が存在することを示唆する結果も得られている。7月の実験では、細かいステップで湿度を降下させた際に、R32 (H32)とは異なる空間群の結晶が見られている。しかし、12月の実験では、複数の結晶で試みたものの、同様の現象は見いだせなかった。これは、結晶の質的な問題にも関係するものと想像されるが、詳細は後述する。

一方、State 2構造を有する結晶とリード化合物の誘導体を使用した複合体構造の解析を開始した。残念ながら、現時点で化合物の電子密度を得るには至っていない。

D．考察

結晶を溶媒から露出させ、その雰囲気湿度調整によって、結晶に変化を誘起する試みは、これまでもなされてきたものの、成功例は少なかった。結晶はそもそも溶媒から露出させると不安定になり、含水量の多いタンパク質結晶では難しいと考えられていた。しかし、HAG法は高分子溶液をコーティング剤として用いることでその弱点を克服し、これまでにも多くの試料で安定に試料をマウントできることを示してきたが、今回の結果は結晶構造変化への利用も可能であることを示している。

この変化を誘起する原因は複数考えられるが、本件に関しては、浸透圧によるものと考えている [Baba et al., *Acta Cryst.* D69, 1839-1849 (2013)]. 浸透圧は水の活量に対応するため、その変化はタンパク質の水和構造にも影響を及ぼし得る。このState 構造の変化において、重要な役割を果たす水分子の水和に影響を与えたものと考えられる。

こうして結晶を構成する分子の構造相転移現象は、浸透圧の変化に伴って起こることが想定されるが、結晶状態を維持したまま分子構造の変化が

起こるかについては、さらに検討が必要である。H-Rasについても、結晶全体として中間状態となる異なる空間群の結晶を経由してState 1への変化を起こすケースと、State 1/2がそれぞれ局所的に変化を起こすケースの二通りが観察された。後者は、いわゆるモザイク広がりが高い試料で見られており、結晶の完全性が十分でない場合は、構造転移が局所的に速やかに起こるのであろう。より多くの構造バリエーションを集めるという視点に立てば、完全性の高い結晶を作成することも重要だといえる。

化合物との複合体解析に関しては、野生型Rasの溶液からState 1構造を有する結晶を直接得ることはできておらず、共結晶化や通常の浸漬法では難しいようである。State 2構造を有する結晶の調製が可能になったため、今後はこれに浸漬する方法をとることを進めていく。

E．結論

柔軟な構造を持つH-RasにHAG法を適用したところ、外場制御によって格子の状態を変化させることで、異なる分子構造を解析できることが明らかとなった。

以上のことから、薬剤ターゲットとなるState 1構造を有する結晶を安定に作成する方法を確立することができ、今後の薬剤との複合体結晶の作成に一步前進したと言える。

今後はこの構造について薬剤を浸漬させた結晶の構造決定を進めていきたい。

G．研究発表

1．論文発表

Shima, F., Yoshikawa, Y., Ye, M., Araki, M., Matsumoto, S., Liao, J., Hu, L., Sugimoto, T., Ijiri, Y., Takeda, A., Nishiyama, Y., Sato, C., Muraoka, S., Tamura, A., Osoda, T., Tsuda, K.I., Miyakawa, T., Fukunishi, H., Shimada, J., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Kataoka, T.

In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2013) **110**(20):8182-8187.

2．学会発表

(本件に関してはありません。)

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

特にありません。