

*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 熊坂 崇

公益財団法人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21 kDa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。

不活性型であるRasはGDPと結合しているが（Ras-GDP）、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）によりGDPがGTPと交換されると活性型（Ras-GTP）になる。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、培養がん細胞レベルおよび担がんモデル動物においても抗がん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

昨年度までに、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を明らかとし、その変化を詳細に解明した。

今年度は主に、野生型H-Ras R32結晶を種々の化合物溶液に浸漬させて得た薬剤複合体結晶のX線回折実験をHAG法により行った。本研究の目的は、薬剤結合構造を得ることにあるが、特に結晶化段階では作り出せないState 1構造に薬剤を結合させる方法を検討することを目指している。このため、薬剤を浸漬させた結晶について試料雰囲気湿度を変化させることも試みた。

さらに、リード化合物KMR084の部分構造からなる誘導体（ビルディングブロック化合物）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ない。

C．研究結果

SPring-8 BL38B1にて、2014年7月14日のピームタイムを利用し、野生型H-RasのR32型結晶に

ついて、薬剤を浸漬した浸漬した試料について HAG 法を用いた測定を行った。

Trypsin 阻害剤として知られている Benzamidine (以下、BZDN) を浸漬した結晶からは、分解能 1.3 Å の X 線回折データを測定した。解析の結果、 $R/R_{\text{free}} = 15.7/17.4\%$ となり、十分な精度で構造が決定できた。

電子密度を観察したところ、非対称単位に含まれる 1 分子の Ras 分子に対して 2 分子の BZDN が観測され、それぞれ 601, 602 の残基番号を与えた。601 は結晶中の分子間接触領域にあり、単独の Ras 分子への結合ではなく、アーティファクトと言える。しかし、602 はヘリックス 2 とコア β シートに挟まれる領域、すなわち Lys5, Val7, Asp54, Leu56 等の側鎖で囲まれた分子内のポケット領域に存在し、Ras 分子特異的に結合していることが分かった。

BZDN は単純な構造を持つため、創薬研究では Fragment screening にも用いられている。今回得られた構造は、2012 年に Maurer らが K-Ras について調べたもの (PDB ID: 4DSO) と同じ領域に有り [Maurer et al. PNAS, 109, 5299 (2012)]、この部分のアミノ酸側鎖は相同であるため、基本的に類似した結合様式を有していることが示された。

しかし、結晶内のタンパク質分子パッキング様式が若干異なるため、主鎖構造にもわずかながら違いがみられ、今回の構造は少なくとも 2 つのコンフォメーションを持ちつつ結合していることが分かった。4DSO では、BZDN のアミジン基は Asp54 の側鎖と静電相互作用しているが、本構造ではそれに加えて、一部分がベンゼン環の中心で 60 度程度回転して、Tyr71 のカルボニル酸素と相互作用できる状態になっていた。今回の構造は 4DSO と異なって、ヘリックス 2 がやや開いた構造をしており、近接する Tyr71 の側鎖は溶媒領域に向かって伸びて、結合ポケットのサイズをやや広げるとともに、Tyr71 のカルボニル酸素が BZDN に向かってやや近づいた結果とみることができる。その点では、ヘリックス 2 の可動性にもかかわらず、BZDN は結合能を有しており、その結合多様性は構造展開するフラグメントとしても有意義であることが明らかとなった。

さらに、薬剤未結合の H-Ras 構造と比較したところ、Thr74 がポケットの空間を作るように外に向かって動いていた。さらに、Tyr71 の側鎖は溶媒に向かって伸びたままなものの、そのカルボニル酸素は BZDN の二つ目のコンフォメーションを支えるようにアミジン基に向かって動いていることも分かった。

一方、研究代表者らのグループで Ras との直接結合が NMR で確認された KMR084 のビルディン

グブロック化合物についても同様の解析を行ったが、こちらは化合物に相当する電子密度を得ることができなかった。Tyr71 および Thr74 についても、薬剤未結合構造と類似しており、このポケットへの結合は見られなかった。

引き続き、その後の複数回のビームタイムを用いて BZDN およびビルディングブロック化合物と Ras との複合体結晶について、HAG 法による湿度調整条件下での構造転移を試みた。しかし、いずれの条件でも State 1 構造への転移は起こらなかった。

D. 考察

BZDN 分子の Ras への結合は、結合ポケットの可動性にもかかわらず安定に起こっており、こうしたフラグメント分子を可能な結合サイトについて探索する試みには一定の意義があると思われる。さらに、結合に伴って生じるタンパク質分子側の構造変化を詳細に調べることによって、こうした分子構造変化と Switch 領域の構造変化、ひいては State 制御との関連性について評価を行っていく。

一方、ビルディングブロック化合物についてはこれまでも複合体の解析を試みてきたが、成しできていない。特に今回、State 2 構造で薬剤浸漬した結晶の転移ができなかったことは、Ras 不活性化薬剤探索法としての HAG 法の一つの可能性を失ったことになる。今後は残された可能性、すなわち、State 1 構造を持つ結晶を安定に作成し、溶液中でも維持させたうえで、薬剤を浸漬する方法を確立することに集中する必要がある。このためには、湿度による構造転移の原因を解明せねばならない。

この原因は、これまで浸透圧によるものと考えてきた [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。実際、Tyr32 側鎖およびその水和水の構造変化がおきている。

しかし、もう少し丁寧に問題を見直す必要を感じている。実際、研究代表者のグループとの議論の中で、いくつかの可能性が上がってきている。次年度は、これらの検討を進めつつ、State 1 構造への薬剤浸漬による解析を行いたい。

E. 結論

今年度は薬剤浸漬結晶について、HAG 法による構造転移を試みた。残念なことに転移を起こすことはできなかったが、State 2 構造に結合した BZDN の構造が得られ、従来構造に加え新しい情報を得ることができた。

不活性構造への転移については、薬剤化合物を含まない結晶で安定に State 1 構造を作成、維持す

る方法を確立することが不可欠なことが判明した。
今後はこの方法について、転移原因を究明しつ
つ確立していきたい。

G．研究発表

1．論文発表
該当なし

2．学会発表
該当なし

H．知的財産権の出願・登録状況

1．特許取得
該当なし

2．実用新案登録
該当なし

3．その他
特記事項なし。