

若手研究者支援枠

国立大学法人神戸大学

事業実施期間：開始 平成30年10月1日～終了 令和2年3月31日

申請者役職・氏名 大学院医学研究科 特命助教 榎野 義輝

研究・事業名

抗がん剤設計のためのRasの動的構造解析

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

本研究では、新規がん治療薬を創出するための基盤的知見を得るべく、構造生物学の手法である核磁気共鳴 (NMR) 分光法、兵庫県が世界に誇る大型放射光施設 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) 測定を用いて、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行う。

低分子量 G 蛋白質 Ras はがん全体の約 30% で常時活性化しており、がん細胞の増殖・生存維持に係る機能を有する。その機能は薬剤が結合可能なポケットの開閉運動で制御されているが、その動的構造情報の不足により、申請時においては未だ有効な分子標的がん治療薬は見出されていなかった。近年では 2021 年 5 月に、Amgen 社の sotorasib (AMG510) が KRasG12C・GDP をターゲットとした抗がん剤として初めて米国 FDA に迅速承認されたこともあり、Ras はがん治療薬の標的分子として再び世界的な関心を集めている。そこで本研究では、申請者の専門である構造生物学的見地から NMR を用いた動的構造解析・反応速度論解析を行い、加えて世界最新鋭光科学技術・X 線自由電子レーザー施設 SACLA 等を利用することで、従来型の静的構造解析では困難であった Ras の構造ダイナミクスと活性制御メカニズムを時分割・原子分解能で解明し、得られた動的構造情報から阻害物質を効率的に見出し、新たな創薬基盤技術の構築に寄与する。

研究・事業の方法及び手段

がん遺伝子産物 Ras 蛋白質は薬剤結合部位に大きな揺らぎを持つため、静的構造情報のみを利用した従来型の理論的分子設計のみでは医薬品創出が困難である。そこで、まず揺らぎのある生体高分子の構造解析に秀でた NMR 分光法を用いて、Ras 蛋白質の機能発現に関わる GTP 加水分解反応における動的構造解析・反応速度論解析を行う。さらに、SPring-8 の 10 億倍の明るさを持つ SACLA と時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析を組み合わせた世界最先端の手法を用いることで、Ras 蛋白質の薬剤結合ポケットの開閉 (ゆらぎ) メカニズムを原子スケールで捕捉し、NMR 分光で得られる構造情報と組み合わせで解釈することで、新たな創薬基盤技術を開拓する。

1. GTP 型 Ras の SACLA および NMR によるポケット開閉

メカニズム (構造遷移パスウェイ) の解明:

GTP 結合型 Ras (Ras・GTP) は薬剤結合可能ポケットが開いた構造 (State 1: 不活性型) と閉じた構造 (State 2: 活性型) の 2 つの構造を遷移している (図 1)。この構造遷移過程を SACLA により高分解能で解析するには、均一かつ大量の高密度の微小結晶溶液が必要となる。我々はこれまでの研究において、光保護基 (cage) を有する人工型 GTP (委託合成: (株) ナード研究所、神戸研究所) との複合体 Ras (Ras・caged-GTP) に関して、SPring-8 による単一結晶の構造解析と溶液 NMR による解析によって、ポケットが開いた State 1 構造をとり、cage 離脱直後の天然 GTP 型 Ras は、速やかに State 1 から State 2 に構造遷移することを明らかにしてきている。そこで本申請課題では、NMR による構造遷移過程の部位特異的な構造ダイナミクスを詳細に解明するとともに、SACLA による State 1 から State 2 への構造遷移の観測を実施する。特に SACLA 測定用試料に関しては、均一な微小結晶溶液の大量調製が必要である。申請者は神戸大学・島扶美博士らと共同で微結晶試料の

最適化を行う。具体的な構造変化の観測方法としては、得られた Ras・caged-GTP 微結晶に光照射をすることで光保護基離脱後の Ras・GTP の State 1 から State 2 への構造遷移について、JASRI との共同で SACLA を用いた時分割により可視化し、ポケット開閉運動を原子レベルでのコマ送り動画として捕捉することを試みる。

2. 時分割構造解析による Ras・caged-GTP 複合体を用いた GTP 加水分解反応の解明:

Cage 離脱後の Ras・GTP に関しては、State 1 構造から State 2 構造へ遷移した後、酵素触媒反応により GTP が加水分解され Ras・GDP になることが、これまでの申請者らの溶液 NMR による先行研究により既に確認されている。溶液 NMR の結果ではポケット開閉運動 (構造遷移パスウェイ) と比較して GTP の加水分解の反応速度は遅いことが示唆されており、上述の 1. と同様の手法で光照射による保護基の離脱 → 天然型 Ras・GTP の State 1 → State 2 構造を経たのちの Ras・GTP → Ras・GDP の構造変化を SACLA 及び SPring-8 での測定で捕捉し、その加水分解過程を可視化する。

研究・事業の特徴 (新規性、独自性 等)

電子を高エネルギー加速器の中で制御して運動させることにより得られる非常に強い光 (SPring-8 の 10 億倍の明るさ) を利用した X 線自由電子レーザー施設を使用すれば、原子や分子の瞬間的な動きを観察することができる。日本が誇る超高品質の電子ビーム技術、ならびに超精密電子制御技術の粋を結集した X 線自由電子レーザー施設 SACLA は、2011 年の X 線レーザーの発振以降、測定・解析システムの改良を伴い着実に進化を遂げ、従来型の静的 X 線結晶解析では定性的な理解に留まっていた蛋白質の構造と機能への理解を変貌させてきている。本研究を進める上で連携をとる神戸大学・島扶美博士ならびに JASRI・熊坂崇博士は SPring-8 を用いた Ras の SBDD (構造ベース創薬) の研究実績と国内製薬企業への導出経験がある (2013 年, PNAS)。また本事業で計画する時分割結晶構造解析実験については、SACLA を利用したフェムト秒結晶構造解析が膜タンパク質である微生物型ロドプシンのバクテリオロドプシンについての成功例として報告されている (2016 年, Science)。この新たな構造解析の技術の創薬ターゲット分子への応用は国内外を問わず新規性に富んでおり得られる成果は世界的を牽引する結果となることが期待される。本研究では共同研究者らと有機的に連携することで、上記技術を最大限に活用し、最も有望な創薬ターゲット分子の一つであるにも関わらず、未だ有効な阻害剤 (抗がん剤) 開発の成功例がない Ras 蛋白質の、世界初となる原子レベルでの機能制御のメカニズムの解明を目指す。

立体構造に顕著な揺らぎを持つ Ras の薬剤結合ポケットに

安定的に結合してより強い活性を示す医薬品開発候補物質の理論的分子設計を効率的に進めるためには、揺らぎのメカニズムを原子レベルで解明する必要がある。申請者らのグループは本申請に先駆け、先行研究を実施し Ras・caged-GTP の微小結晶を用いた SACLA での試験測定を実施した。その結果、State 1 → State 2 → GDP 型への構造遷移を示唆するデータ収集に既に成功しており、申請時点においてさらに高分解能のデータを収集するための測定条件の最適化段階にある。

研究・事業により期待される効果

本研究が順調に推進され、成果をリード化合物の構造最適化に活用できれば、実現不可能と考えられてきた Ras を分子標的とした抗がん剤開発を一気に推進する起爆剤となる。将来研究も含め開発成功の暁には、その市場規模の大きさから、国内医薬品産業振興への多大な寄与が期待される。

さらに、GTP 結合型 Ras におけるポケットの開閉運動とそれに連動した GTP の加水分解反応は、Ras に類似したがん関連の低分子量 G 蛋白質 (Rap, Ral, Rac など) に広く認められる性質であるが、時分割での構造変化と機能発現 (いわゆる酵素触媒反応) の相関を原子レベルで解明した例はこれまでにない。よって本研究で成果が得られれば、Ras を皮切りとして、これら複数の低分子量 G 蛋白質に対する新規阻害剤開発研究に大きく波及し、それらを加速する可能性がある。

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

当該研究課題では、Ras蛋白質を標的とした新規がん治療薬を創出するための構造生物学的な基盤的知見を取得するために、光制御可能なGTPアナログであるcaged-GTPを活用し、NMR分光法を用いてRasの薬剤結合が可能なポケット領域の開閉運動を含むRas蛋白質の動的構造解析・反応速度論研究を実施した。併せて世界最新鋭の光科学技術・X線自由電子レーザー施設SACLA等を駆使した構造ダイナミクスと活性制御メカニズムを時分割・原子分解能で解明することを目的として研究を実施し、RasのGTP加水分解反応の分子動画作成の一部に成功した。

がん遺伝子産物Rasは低分子量G蛋白質であり、がん細胞の増殖・生存維持に係る機能を有する。このRas蛋白質はがん全体の約30%で常時活性化しており、がん治療薬創出の標的分子であるにも関わらず、従来の理論的分子設計のみでは医薬品創出が困難である。その1つの理由は、Rasの薬剤結合可能なポケット領域は比較的大きな揺らぎを持つことに起因し、その動的構造情報が不足していることであると考えられる。そこで本研究においては、揺らぎを持つ生体高分子の構造解析に秀でたNMR分光法を用いて、Rasの機能発現に関わるGTP加水分解反応における動的構造解析を行った。加えて世界最新鋭光科学技術・X線自由電子レーザー施設SACLAにおける時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析(XFEL)並びに大型放射光施設SPRING-8における結晶構造解析などを駆使し、Ras蛋白質の薬剤結合ポケットの揺らぎ(開閉)メカニズムを原子スケールで捕捉し、新たな創薬基盤技術を開拓するための動的構造情報を取得した。

①光制御可能なGTPアナログ(caged-GTP)の合成

低分子量G蛋白質であるRasは活性型のGTP結合型Ras(Ras・GTP)と不活性型のGDP結合型(Ras・GDP)を行き来することでその機能が制御されている。このようなRasのGTP加水分解活性のため、天然型GTP結合型Rasは時々刻々とGDP結合型へと構造変化をする。そこで本研究では光制御可能なcaged-GTPを用いることで、光照射をGTP加水分解反応のトリガーとして様々な構造解析を実施した。光反応性保護基cageは特定の波長の光を照射することで直ちに遊離する。従って、caged-GTPは光照射によって速やかに天然型GTPへと至る。本研究ではcaged-GTPのこれらの光反応性を活用し、光照射とNMR並びにSACLA/SPRING-8での測定における

構造変化を同期させ、天然型GTP結合Rasの構造並びにGTP加水分解反応過程におけるRasの構造変化を捕捉した。本研究ではNPE-cageと呼ばれる光保護基を使用した。この化合物は近紫外光によりcageの離脱が開始される。NPE-caged-GTPには2つのジアステレオマー(R体・S体)が存在し、両者は鏡合わせのような構造を持っている。互いに類似した物理的性質(分子量、融点など)を持つジアステレオマーの合成・分離は一般に容易ではない。本研究では、その合成経路の検討、並びに合成・分離を研究協力者である神戸大学・特命教授・森一郎博士の協力を得て実施した。構造解析には大量のcaged-GTPが必要であったが、その大量合成に先立ち、小規模での合成、分離・分取の検討を神戸大学大学院・理学研究科・准教授・松原亮介博士により実施した。その結果、効率的な合成経路・分離・分取の手法が見いだされ、2つのジアステレオマーの分離に成功した。実際の大規模合成は神戸市に研究所を有する(株)ナード研究所にて実施し、当該化合物の数十ミリグラムスケールでの合成・分離に成功し、構造解析に必要なcaged化合物安定供給が可能となった。当該研究所で合成された化合物は神戸大学・理学研究科・准教授田村厚夫博士の協力によりCD(円二色性)スペクトル測定により、その評価を実施した。CDスペクトルではNPE-caged-GTPのような光学活性を持つ物質の右円偏光、左円偏光の差を測定することで取得化合物がR体であるかS体であるかを分析可能である。その結果、CDスペクトルによる明確な円二色性の違いが観測された(図2)。さらにこれらの取得化合物についてNMR測定を実施した結果、R体・S体の2つの化合物ではそのジアステレオマーに起因するNMRスペクトルの化学シフト値の差異が観測された。このようにして、我々はNPE-caged-GTPの2つのジアステレオマーの取得に成功したが、S体のcaged-GTP及びRas・(S)-caged-GTPの蛋白質結晶は光に対しての不安定さを有していたため、本研究では主として光に対して安定なR体のcaged-GTPを使用し、caged-GTP結合型Ras(Ras・caged-GTP)の微結晶サンプルを調製し、XFEL測定等の構造解析実験に供した。

②SACLAによる時分割測定(XFEL測定)

Ras蛋白質の構造遷移過程をSACLAにより高分解能で解析するには、均一かつ大量の高密度の微小結晶溶液が必要であった。また、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。そこで、本研究では先に述べた光制御可能なcaged-GTPを用いることで、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した。SACLAを用いた高分解能の構造解析を行うために必要な均一かつ大量で高密度の微結晶溶液は、研究協力者である神戸大学・教授・島扶美博士の助言と協力を得て大量調製条件を検討した。その結果、Ras・caged-GTPを蒸気拡散法と呼ばれる手法により結晶化し、得られた結晶を種結晶として用いた微結晶の大量調製法を確立し、SACLAで測定可能な5-10 μ mの均一微結晶の大量調製に成功した。得られた微結晶サンプルはSACLAでのXFEL測定並びにSPRING-8での高輝度光を用いた微結晶サンプルのX線回折データを取得する手法であるSS-ROX法と呼ばれる測定等に供した。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 $\times$ 10⁷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測定並びにSS-ROX測定の結果、光照射前のRas・caged-GTP微結晶サンプルは、NMRで観測された溶液構造と同様のポケットの開いたState 1様の構造であることが明らかとなった。次いで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、時分割X線結晶構造解析を実施した。一連の測定の結果、光照射後に格子定数の時間変化が観測された。これは光照射によってcageが離脱し、構造遷移とそれに続くGTP加水分解に伴う蛋白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。光照射直後のGTP結合型Rasの構造は、光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、光照射による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(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は光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)。

③NMRを用いた Ras・caged-GTP の GTP 加水分解過程における部位特異的な構造変化の追跡

本研究では上述のX線結晶構造解析(SACLA・SPRING-8)に加えて、NMR分光法によるRasのGTP加水分解反応に伴う溶液中での蛋白質の構造変化をトレースする試みも実施した。NMR測定は神戸大学・医学研究科所管のBruker Avance III 600分光器を使用し1H共鳴周波数600.13279833MHz、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(400-1200 μ M)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

15N 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(hnca、hn(co)ca、hncacb、hn(co)cacb、hnco、hn(ca)coなど)を用いた。得られた15N HSQC スペクトルではそのシグナルの、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395nmのLED光をNMRプローブの外で照射し、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、その蛋白質構造はおよそ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。また、アミノ酸残基ごとにNMRシグナルの強度変化をトレースすることで、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、 α 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至った。

このようなRasに関する構造変化は、Rasを標的とした新規がん治療薬の開発の基盤となるのみならず、光制御可能な化合物を用いた研究手法として利用することで他の低分子量G蛋白質をターゲットとする創薬基盤技術への構造生物学的の寄与としても意義のある結果であった。

今後の展開

本研究事業の推進によって得られた蛋白質の動的構造情報の一部を、Rasをターゲットとした新規がん治療薬創出に向けた化合物の構造最適化に活用するで、これまで実現不可能であると考えられてきたRasを分子標的とした抗がん剤開発を推進する起爆剤になり得る。

特に本研究事業においては、① SACLAでのXFELによる時分割測定並びにSPRING-8でのX線結晶構造解析によってRas蛋白質の薬剤結合可能なポケット領域の開閉運動の可視化の一部を達成し、② NMRによるGTP加水分解反応に伴うRasの各領域の速度論解析によってポケット領域に隣接するp-loop、 α 3-ヘリックス領域の構造変化がRas分子のGTP加水分解反応を制御していることを示唆する結果を得るに至った。

このような、本研究で得られた構造データは、①Ras・GTPの薬剤結合ポケットを、がん化シグナルがOFFとなるようなポケットの開放状態に保つ(=Ras・GTPのState 1の安定化)、あるいは、②Ras・GTPからRas・GDPへと至るGTP加水分解反応を促進させる(=Rasの不活性化促進)を実現するための

基盤的知見となり得る(図3)。今後の展開として、本助成事業を発展させるべく、Ras蛋白質内の水素結合などを含めたアミノ酸-アミノ酸間相互作用等の詳細を他のcage化合物(例えばS体)などを使用して解明し、得られる構造生物学的知見を総合的に活用することで、新規がん治療薬の開発が大きく推進することが期待される。将来的な研究を含め新規がん治療薬が開発された暁には、その市場規模の大きさから国内医薬品産業の振興に対する多大な寄与が期待される。

また、本研究で一部解明したGTP結合型蛋白質のポケットの開閉運動と、それに伴うGTP加水分解反応はRasに類似した他のがん関連の低分子量G蛋白質(RapやRalなど)に広く共通した性質である。これら蛋白質の構造・機能相関の時分割での原子レベルの解析複数の低分子量G蛋白質に展開することで、新規シグナル伝達阻害剤開発の研究に大きな波及効果をもたらし、それらを加速することが期待できる。

