

称号及び氏名 博士(理学) 古屋 憲孝

学位授与の日付 2019年9月25日

論文名 X線結晶構造解析に基づいた TrkA 阻害剤の選択性発現機構の  
解明

論文審査委員 主査 木下 誉富  
副査 佐藤 孝哉  
副査 藤井 郁雄

# 論文要旨

## X線結晶構造解析に基づいた TrkA 阻害剤の選択性発現機構の解明

古屋 憲孝

### 1. 序論

ヒトには 518 種のキナーゼが存在し、それぞれ生体内の様々なシグナル伝達を担っている。それらは、上流からの刺激によって活性化し、ATP を用いて自己/基質をリン酸化、さらに下流へシグナルを繋げ、最終的にカルシウム濃度の上昇や遺伝子の転写制御を担っている。また、キナーゼは自己免疫疾患および疼痛等をはじめとする多くの疾患に関連する創薬ターゲットでもある。これまでに製薬企業・アカデミアによって盛んに研究されており、多くの医薬品あるいは医薬品候補化合物が報告されている。しかしながら、キナーゼ阻害剤の多くは非常に相同性の高い ATP 結合サイトへ競合するため、選択性の確保が主要な課題のひとつとなっている。特に Type-I と呼ばれる阻害剤は ATP サイトのみを利用するため、選択性は限定的である。Type-II 阻害剤は ATP 結合サイトと共に、その近傍にあり比較的相同性の低い、バックポケットと呼ばれるアロステリック領域を利用して選択性を高めている。

Tropomyosin receptor kinase A (TrkA) は受容体型チロシンキナーゼ (Receptor tyrosine kinase, RTK) の一種であり、他の RTK と同様、細胞外のリガンド結合領域、膜貫通領域、そして細胞内領域からなる。細胞内領域はさらに、膜近傍 (Juxtamembrane, JM) 領域とリン酸化を担うキナーゼドメイン、そして C 末端領域からなる。TrkA は 細胞外へリガンドの Nerve growth factor (NGF) が結合することによって活性化し、最終的に神経突起の伸長や分化を引き起こす。また、NGF-TrkA 経路は細胞内のカルシウム濃度上昇を通して、痛み受容体である TRPV1 を細胞膜へ輸送・活性化させ、痛覚に対する感受性を増強する。そのため、TrkA は疼痛の治療ターゲットとして注目されており、活発な研究が行われている。なお、TrkA を欠損した人は痛みを感じなくなることで、さらに抗 NGF 抗体 Tanezumab の臨床試験から、NGF-TrkA 経路のヒトにおける鎮痛メカニズムは証明されている。しかしながら、抗体薬は一般的に高額となり、さらに注射が必要となる。そのため、比較的安価で経口投与可能な低分子化合物の TrkA 阻害剤が求められている。

TrkA には、TrkB と TrkC の 2 つのサブタイプが存在し、それぞれ「BDNF および NT-4/5」と NT-3 の受容体である。Pan-Trk 阻害剤は体重増加の副作用を引き起こすため、TrkA 選択的な阻害が必要である。しかしながら、TrkA/B/C のキナーゼドメインは非常に相同性が高く、アミノ酸配列はほとんど同じである。また、それぞれの X 線結晶構造が報告されており、ATP 結合サイト周辺は、上述の Type-II 阻害剤が利用するバックポケットも含め、ほとんど違いが無い。そのため、TrkB/TrkC に対して選択的な TrkA 阻害剤の創成は非常に困難であると考えられてきた。そんな中、TrkA に対して選択的であるとされる阻害剤 V1 および A1 が報告された。

本研究では、V1, A1 それぞれの選択性発現機構を解明し、新たな薬剤の創成へと繋げるため、TrkA との複合体 X 線結晶構造を決定した。また、3次元立体構造から示唆されたメカニズムを裏付ける為、物理化学および生化学的実験を実施した。以下、阻害剤 V1, A1 の順に紹介する。

## 2. TrkA 選択的阻害剤 V1 のサブタイプ選択性発現機構

V1-TrkA 複合体の X 線結晶構造を取得したところ、興味深いことに、V1 は Type-I 阻害剤様の ATP 結合部位との相互作用に加え、隣の TrkA とも相互作用し、二量体化を誘導していることが示唆された。このように、タンパク質複合体を安定化させる化合物は Molecule Glue (分子糊) と呼ばれる。つまり、V1 は TrkA 二量体界面へ結合することにより、分子糊として二量体を安定化し、同時に二量体界面のアロステリックポケットを利用して結合力を稼いでいた (Fig. 1)。

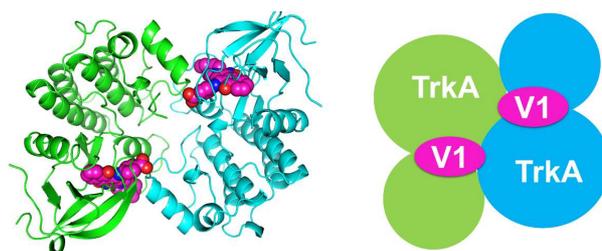


Fig. 1 結晶構造 (左) および模式図 (右)

このポケットは ATP 結合サイトの Met592 および近傍の Arg599 に加え、隣の TrkA 分子の Asn733 および Glu735 から形成されていた (Fig. 2)。中でも Glu735 は V1 と塩橋を形成しており、二量体形成において最も重要な働きをしていると示唆された。

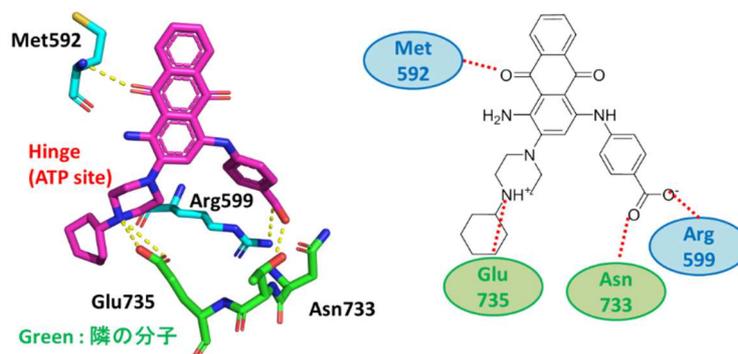


Fig. 2 V1 の結合様式 結晶構造 (左) および模式

しかしながら、上記の二量体が結晶中のみで形成されることも考えられた。そのため、Size-exclusion chromatography (SEC) にて溶液中での V1 添加によるダイマー化を検証した。まず、V1 の有無による比較をしたところ、V1 の添加によりピークが高分子量側へシフトした。このシフトはダイマー形成によるものと考えられる。続いて、化合物と相互作用している残基の内、結晶構造から最も重要であると示唆された Glu735 の Ala 変異体 (E735A) を作成し、同様の実験をおこなった。すると、予想通り E735A では V1 添加によってもピークシフトしなかった。一方、おもに主鎖で相互作用する Asn733 の変異体 (N733A) は、WT と同様に V1 添加でピークシフトした。このことは、結晶構造で示唆された「V1 が分子糊として働き二量体を安定化すること」を裏付けるものであった。

続いて、超遠心沈降速度計測法 (SV-AUC) により、化合物添加時の分子量変化をより詳細に検証した。SV-AUC は超遠心を用いて高分子の溶液中での分子量を求める方法である。V1 添加時の分子量は 62.5 kDa となり、ダイマーの理論値である 75 kDa と近い値となった。一方、V1 非添加時においては 33.0 kDa となり、モノマーの理論値である 37.5 kDa と一致する結果であった。この結果は、SEC での V1 添加によるピークシフトが、確かに二量体化によるもの

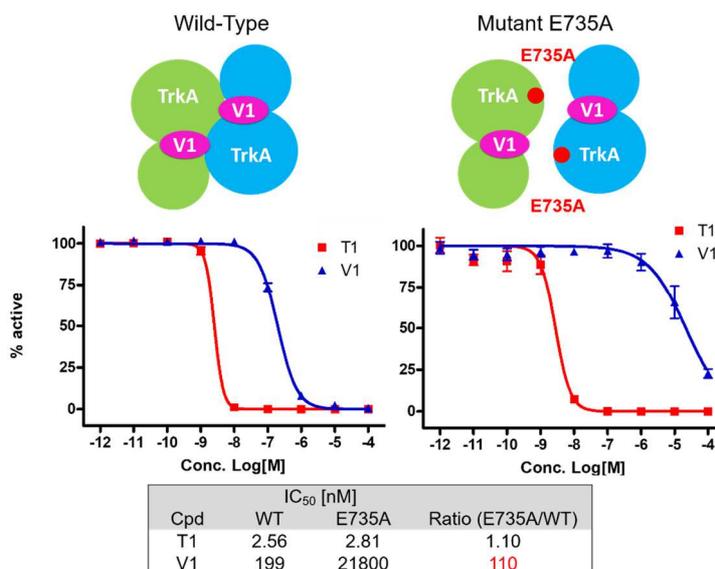


Fig. 3 ダイマー形成 あり/なし キナーゼアッセイ

であることを示している。

さらに、二量体化と阻害活性の関係を Wild type (WT) および E735A 変異体のキナーゼアッセイにて検証した。すると、Type-I 化合物である T1 は、WT および二量体化しない E735A 変異体ともに同程度の阻害活性を示した。一方、V1 は E735A 変異により 100 倍以上阻害活性が低下した (Fig. 3)。このことは、二量体化が V1 の阻害活性発現において非常に重要であることを示している。

最後に、V1 のサブタイプ選択性発現機構について議論する。二量体界面に注目すると、二量体化に重要な Glu735 は Trk ファミリーで保存されていた。しかしながら、重要な相互作用をしつつ、TrkA/B/C で保存されていない残基も多数確認された。そのため、TrkB と TrkC では TrkA のようなダイマーを形成せず、ダイマー界面のアロステリックポケットも存在できないことが予測された。実際、TrkB の SEC を実施したところ、V1 を添加してもピークシフトが起こらず、二量体化は確認されなかった。つまり、V1 は TrkA 特異的なダイマー界面のアロステリックポケットによって、選択性を発揮していると考えられる。

以上の結果から、ダイマー界面を利用した V1 の TrkA 選択性獲得メカニズムを示した。

### 3. TrkA 選択的阻害剤 A1 のサブタイプ選択性発現機構

A1 は Array Pharma 社により見出された化合物であり、細胞アッセイで TrkB / TrkC に対して約 1,000 倍という驚異的な選択性を示す化合物である。

結晶構造解析から、A1 は ATP 結合サイトと全く相互作用しておらず、バックポ

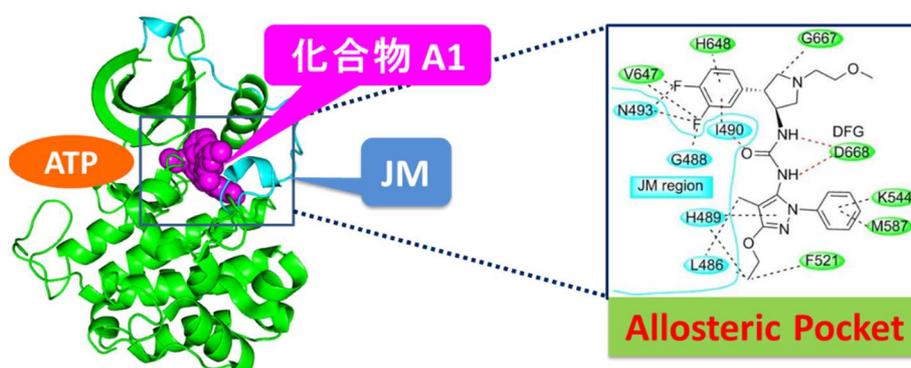
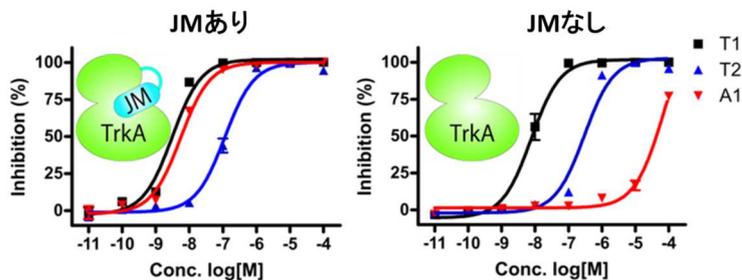


Fig. 4 TrkA-A1 複合体の結晶構造 (左) および結合模

ットへ結合していることが明らかになった。また、驚くべきことに、通常は観測されない JM 領域がキナーゼドメインと共に特徴的な結合ポケットを形成していた (Fig. 4)。JM 領域と相互作用する化合物の結晶構造は非常に珍しく、TrkA 以外では VEGF 受容体の事例のみである。JM 領域以外で A1 と相互作用する残基は、Trk のそれぞれのサブタイプ間で完全に同一であった。一方、JM 領域は相同性が低く、A1 と  $\pi$ - $\pi$  stack にて相互作用する His489 は TrkB および TrkC では保存されていない。また、TrkB および TrkC の JM 領域には、挿入配列が存在し、TrkA と同様のコンフォメーションはとり得ないと考えられた。これらのことから、JM 領域との相互作用が、A1 の選択性および阻害活性獲得において重要な役割をしていることが示唆された。



compound	Kinase IC <sub>50</sub> (nM)		
	JM+	JM-	Ratio (-/+)
T1 (Type I)	3.2	8.9	2.8
T2 (Type II)	119.3	287.2	2.4
A1	6.0	37163.3	6190.8

Fig. 5 JM あり/JM なし キナーゼアッセイ

さらに, JM 領域あり・なしの 2 種類の TrkA タンパク質を用いた *in vitro* アッセイを実施した. Type-I 化合物の T1 と Type-II 化合物の T2 は JM 領域有無に関わらず, それぞれ同等の阻害活性であった. 一方, A1 は JM ありの IC<sub>50</sub> が 6 nM であるのに対し, JM なしの IC<sub>50</sub> が 37  $\mu$ M と 6000 倍以上低下した (Fig. 5). この結果は, 結晶構造から示唆された A1 の JM 領域依存的な結合と一致する.

## 総括

本研究では, 2 種の阻害剤(V1, A1)と TrkA の複合体 X 線結晶構造に基づき, それぞれの阻害剤のユニークな選択性発現機構を示した.

第 2 章では, 結晶構造より, ダイマー界面のアロステリックポケットが V1 の選択性に関与することを示唆した. また, SV-AUC および SEC により, 「溶液中での V1 によるダイマー化」および「V1 のダイマー界面への結合」を裏付けた. さらに, 非ダイマー化変異体を用いたキナーゼアッセイにより, ダイマーの有無による阻害活性への影響を示した.

第 3 章では, JM 領域を含む TrkA-化合物複合体 X 線結晶構造を決定し, TrkA 選択的化合物における JM の選択性・結合活性への寄与を構造的に解明した. また, JM 領域あり・なしの TrkA を用いたキナーゼアッセイにより, 阻害活性における JM の機能を確認した. JM と阻害剤の相互作用が X 線結晶構造解析により明らかになることは非常に珍しく, TrkA 以外では, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) の事例 1 つのみである. 加えて, VEGFR では 1 つの Ile が僅かに相互作用しているだけであり, A1-TrkA 複合体のように, JM が化合物結合ポケットの 1/3 以上を占めるものは初めて発見された.

以上の知見は, TrkA のみならず, 他のキナーゼ選択的阻害剤の探索でも活用可能である.

## 発表論文

[1] The juxtamembrane region of TrkA kinase is critical for inhibitor selectivity.

**Furuya, N.**; Momose, T.; Katsuno, K.; Fushimi, N.; Muranaka, H.; Handa, C.; Ozawa, T.; Kinoshita, T., *Bioorg Med Chem Lett* **2017**, 27 (5), 1233-1236.

[2] Isoform-selective TrkA kinase inhibitor behave as molecular glue.

**Furuya, N.**; Momose, T.; Katsuno, K.; Fushimi, N.; Muranaka, H.; Handa, C.; Ozawa, T.; Sawa, M.; Kinoshita, T., *ACS chemical biology*, submitted.

## 関連論文

[1] Foretinib Overcomes Entrectinib Resistance Associated with the NTRK1 G667C Mutation in NTRK1 Fusion-Positive Tumor Cells in a Brain Metastasis Model.

Nishiyama, A.; Yamada, T.; Kita, K.; Wang, R.; Arai, S.; Fukuda, K.; Tanimoto, A.; Takeuchi, S.; Tange, S.; Tajima, A.; **Furuya, N.**; Kinoshita, T.; Yano, S., *Clin Cancer Res* **2018**, 24 (10), 2357-2369.

## 学位論文審査結果の要旨

学位論文提出者名： 古屋 憲孝

学位論文題目： X線結晶構造解析に基づいた TrkA 阻害剤の選択性発現機構の解明

TrkA は受容体型チロシンキナーゼの一種であり、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域から形成される。細胞内領域はさらに、膜近傍 (JM) 領域とキナーゼドメインからなる。TrkA は神経突起の伸長や分化を誘導し、疼痛の治療標的として注目されている。TrkA キナーゼ阻害薬の開発において、他キナーゼに対する選択性という問題が生じる。特に TrkA とサブタイプ TrkB 及び TrkC との相同性が高く、さらに開発を困難にする。実際、ほとんどの Trk 阻害剤は選択性が低いが、近年のスクリーニング研究から TrkA 選択的阻害剤 V1 及び A1 が見出された。本研究では、TrkA 野生型及び変異体について、X線結晶構造解析、酵素アッセイ、分子ふるいクロマトグラフィー (SEC)、超遠心沈降速度測定法 (SV-AUC) などの種々の実験を行うことで、両化合物の選択性発現機構を解明し、新たな薬剤の創出を目指した。

X線結晶構造解析から、V1 は TrkA のダイマー化を誘導することが示唆された。SV-AUC 及び SEC により、溶液中において V1 によるダイマー化が観測された。ダイマー形成に重大な意味をもつアミノ酸を変異すると、ダイマー化せず、かつ、阻害活性が大幅に減弱した。また、TrkB と TrkC は TrkA のダイマー化界面のアミノ酸を保存しておらず、ダイマー化しないと推測された。SEC 実験から、TrkB は V1 添加によるダイマー化は観測されなかった。以上から、V1 は分子糊として働き、TrkA に対する高阻害活性及び高選択性を発現していると結論された。

同様に X線結晶構造解析から、A1 は JM 領域を含む新規アロステリック部位に結合していることが判った。既存の低選択性阻害剤の TrkA 阻害活性は JM 領域の有無で変化しないが、A1 では JM を除去した場合に TrkA に対する阻害活性が大幅に減弱した。さらに、Trk サブタイプ間で JM 領域のアミノ酸配列が全く保存されていないことから、A1 は JM 領域との相互作用を介して TrkA に対して高阻害活性及び高選択性を発現していることが結論された。

以上のように、2 種の TrkA 阻害剤の高選択性発現機構を解明した本研究の成果は構造生物学及び創薬科学の分野において高く評価できる。本委員会は本論文が学位論文として十分な内容を有しており、本論文提出者は学位を授与するに十分な学力及び見識を有しているものと判断した。

学位論文審査委員会

委員長 教授 木下誉富

教授 藤井郁雄

教授 佐藤孝哉