

称号及び氏名 博士（理学） 宮野 菜央

学位授与の日付 平成 23 年 3 月 31 日

論文名 「Structural basis for the selective inhibitor of Src family kinases
(Src ファミリーキナーゼ選択的阻害剤創出の構造基盤)」

論文審査委員 主査 多田 俊治
副査 徳富 哲
副査 藤井 郁雄

論文要旨

序論

現在、わが国では年間 30 万人以上がガンで亡くなっており、ガンの治療は社会的にも急務となっている。従来の抗ガン剤は、DNA 合成や細胞周期を非選択的に阻害して、正常細胞より増殖の早いガン細胞を主に殺すことを目的としている。そのため、抗ガン剤により重篤な副作用を引き起こす場合も多かった。近年、細胞内でのシグナル伝達に関わるタンパク質リン酸基転移酵素（キナーゼ）の過剰な活性が、ガンの発症に関係することが明らかとなってきた。疾病に関わるタンパク質分子を特定してその働きを制御する医薬品のことを「分子標的治療薬」と呼ぶ。このような治療薬は、抗ガン剤であれば、ガン細胞に過剰発現しているキナーゼを特異的に阻害することから、従来に比べて有効性が高く、副作用が少ない化学治療法を可能とするので、近年、盛んにその開発が試みられている。しかし、キナーゼ遺伝子はヒトゲノム中に 518 種類もあり、その高次構造の類似性も極めて高い。したがって、特定のキナーゼを選択的に阻害する分子標的治療薬の創製には、標的とするキナーゼと他のキナーゼ間の僅かなしかし重要な構造の差異を見出すことが要求される。現時点において、この要求に唯一応え得るのが、高い精度でのタンパク質立体構造の決定が可能、阻害剤との相互作用の直接観察が可能といった特性をもつタンパク質 X 線結晶構造解析である。

Src はガン遺伝子として最初に同定された非受容体型チロシンキナーゼである。これまで Src と共通のドメイン構造を持つ構造類似性の高い 9 種のタンパク質が見出されており、それらを Src family kinase (SFKs : Src, Lyn, Yes, Lck, Fyn, Hck, Fgr, Blk, Frk) と呼ぶ。SFKs は SH3、SH2 およびキナーゼドメインからなり、いずれも個体の発生、細胞の分化、増殖に関わる重要なシグナル伝達分子として機能している。しかし、それらの活性の亢進はさまざまなガンや炎症性疾患に関係することから、SFKs は治療薬の標的として注目を集めている。

本研究では、Lyn を選択的に阻害する分子標的治療薬の設計に有用な構造情報を得ることを目的として、Lyn キナーゼドメインおよび対照としての Lck キナーゼドメインと阻害剤 (図 1) との複合体の構造をタンパク質 X 線結晶構造解析により決定することとした。

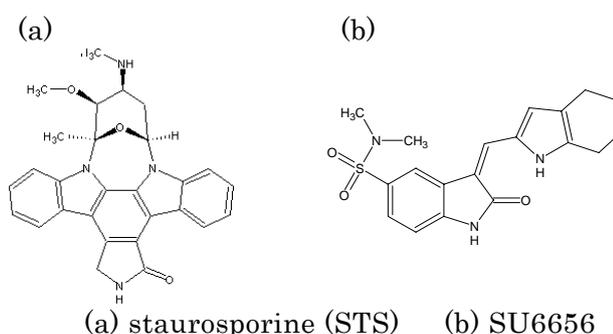


図 1 阻害剤の構造

第1章 ヒト型 Lyn キナーゼドメインの調製

ヒト型 Lyn キナーゼドメイン (233-512 残基、約 32 kDa) C 末端に 6×His-tag を付けた発現コンストラクトを構築し、昆虫細胞系で Lyn タンパク質を発現させ、Ni アフィニティークラムを用いて精製した。この粗精製液を陰イオン交換カラムを用いて精製したところ、Lyn が 4 本の Peak に分離されることを見出した。それぞれの Peak 成分に対して SDS-PAGE、Native-PAGE、および Western blotting による分析を行ったところ (図 2)、4 本の Peak 成分は、Lyn キナーゼドメインの Tyr397、Tyr508 および Thr398 でのリン酸化状態の相違であることが明らかとなった。Activation-loop (A-loop) 上にある Tyr397 がリン酸化するとキナーゼは活性を持つ。4 成分の活性を測定した結果、Tyr397 がリン酸化された Peak 3 と Peak 4 で予測通り高い活性値が得られた。

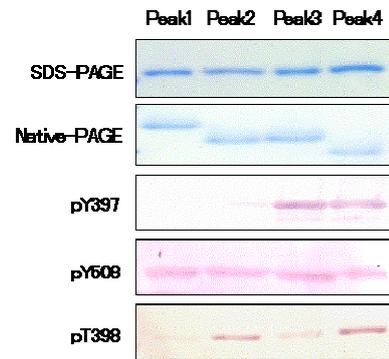


図 2 各種分析

第2章 Lyn-staurosporine 複合体の構造

4 成分それぞれを 9 mg/ml まで濃縮し、キナーゼの選択的阻害剤である staurosporine (STS) と共結晶化を行った。その結果、Peak 1 のサンプルのみ結晶化に成功した。得られた結晶につき回折 X 線測定を放射光施設・PF にて行い、分解能 3.0 Å のデータを得た。分子置換法を用いて Lyn-STC 複合体の構造を決定した ($R_{work} = 26.8\%$)。ヒト型 Lyn の構造報告はこれが初めてである。解析の結果、STS は ATP 結合サイトに入り込んでおり (図 3)、Lyn と 3 個の水素結合、1 個の CH-O 相互作用および 8 個の CH- π 相互作用を形成していることが明らかとなった。この結合様式は、先に報告されている Fyn-STC および Lck-STC で見出されたものとほぼ同一であり、この結果は、3 種のキナーゼに対する STC の阻害活性値に差がないことを裏付けているように思われる (IC_{50} : 1.3 nM (Lyn), 2.0 nM (Fyn), 1.5 nM (Lck))。

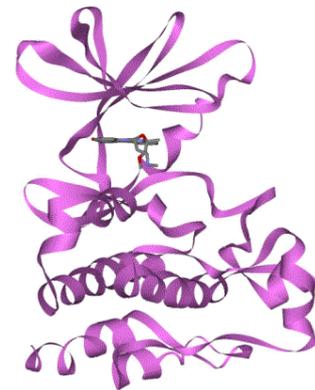


図 3 Lyn-staurosporine の構造

第3章 Lyn-SU6656 複合体の構造

共結晶化法により Lyn-SU6656 複合体の結晶を作製し、回折 X 線測定は、放射光施設・SPring-8 にて行った。分子置換法により構造を決定し、分解能 2.4 Å の構造 ($R_{work} = 17.5\%$) を決定した。その結果、1 分子の SU6656 に相当する電子密度が ATP 結合サイトに見出された。SU6656 は上下にある Leu 残基との疎水性相互作用およびヒンジ領域の主鎖と水素結合を形成して ATP 結合サイトに入り込んでいた。さらに、SFKs の活性化に重要な働きをする残基である Asp385 および ATP の取り込みに関与する Lys275 と SU6656 との間にも CH \cdots O 結合および水素結合の形成が見出された。興味深いことに、従来、A-loop は柔軟性が高く明確な電子密度を示さないことが多いが、本複合体では A-loop は一定のコンフォメーションを示し、活性に関与する DFG-motif のコンフォメーションも STC 複合体とは相違するものであったことから、誘導適合が生じたものと結論した (図 4)。

第4章 Lck-SU6656 複合体の構造

比較対象を目的として Lck-SU6656 複合体の構造解析を行った。Lck サンプルは共同研究先から恵与いただいた。共結晶化法により Lck-SU6656 複合体の結晶を作製し、回折 X 線測

定は、放射光施設・PFにて行った。分子置換法により構造を決定し、分解能 1.7 Å の構造 ($R_{work} = 18.3\%$) を決定した。電子密度分布図から、SU6656 が約 50% の占有率で ATP 結合サイトに存在し、同時に glycerol 分子が 50% の占有率で同サイトに存在するものと考えられた。SU6656 は上下にある Leu 残基との疎水性相互作用およびヒンジ領域の主鎖と水素結合を、一方、glycerol 分子は疎水性相互作用および 3 種のアミノ酸残基と水素結合を形成して ATP 結合サイトに入り込んでいた。glycerol は結晶化溶液に 10% (w/v) の高濃度で含まれていることから ATP 結合サイトに残ったものと考えている。

第 5 章 構造比較 ～Lyn 選択的阻害剤の分子設計に向けて～

キナーゼ非選択的阻害剤である STS と 3 種のキナーゼとの結合様式に有意な差はなかった。しかし、それらキナーゼの構造を詳細に比較した結果、ATP 結合サイト近傍において興味深い相違を幾つか見出すことができた。その一つは hinge 領域であり、Lyn においてのみ阻害剤分子が入り込めるような空間が存在していた。

さらに、この空間には阻害剤と静電的相互作用の形成が可能な Glu377 が近づいていることが明らかとなった。この構造的特徴から、STS に N-aminoethyl-N'-(2-pyridyl)urea のような置換基を導入した化合物などが Lyn 選択的阻害剤になるものと結論した。その他に、Fyn に特徴的な glycine-rich loop のカルボニル基や DFG-motif 近傍の空間、Lck に特徴的な α -helixD と α -helixG の間の疎水的な溝の存在が見出され

ており、これら構造特性は Fyn や Lck 選択的阻害剤の設計に有用であると考えられる。

SU6656 は SFKs に選択性を示す阻害剤である。一方、Lyn と Lck 間の阻害活性に差があるかどうかは曖昧であったことから、mobility shift assay 法によりそれぞれの IC_{50} 値を求めた。その結果、Lyn と Lck 間に差は無いことが確認された ($IC_{50}(\text{Lyn}) = 104 \text{ nM}$, $IC_{50}(\text{Lck}) = 62 \text{ nM}$)。このことに相応するように SU6656 は、いずれも ATP 結合サイトに類似した様式で入り込んでいた。しかし、Lyn においてのみ弱い相互作用に基づく A-loop と α -helixC との間にユニークなコンフォメーションの変化が生じていたことから (図 4)、この誘導適合に重要な働きをしていると推定した Glu289 について、SFKs 全てのキナーゼの相当部位のアミノ酸残基を検討した。その結果、側鎖での水素結合可能な Glu および Gln を持つもの (Lyn、Fyn、Fgr、Src、Yes)、水素結合が作れない Ala や Gly を持つもの (Lck、Hck、Blk)、静電反発を生じる可能性のある Arg を持つもの (Frk) の 3 種類に分類し得ることが明らかとなった。したがって、SU6656 のように Asp385 および Lys275 と相互作用可能な構造部位をもつ阻害剤は Lyn 選択性をもたらすことができると結論した。

キナーゼ阻害剤では、それが活性体に働くのか不活性体に働くのかは治療薬の観点から極めて重要な問題となる。今回解析を行った Lyn は不活性体であり、Glu289---Arg390 (主鎖 NH 基) の水素結合の他に Lys275---Glu290---Arg390 の水素結合を含むイオン結合ネットワークが形成されていた。一方、Lck は Tyr394 がリン酸化された活性体であり、興味深いことに、Arg387 (Lyn における Arg390 に相当) がリン酸化 Tyr394 と塩橋を形成する距離に接近しているため Lyn のようなネットワークは形成されていなかった。構造のこれらの相違に関連して、Lyn では DFG-motif 付近に固有の空間が生じていた。さらに、静電的相互作用が可能な Arg390 が阻害剤の方に向かっており、両者の構造的特徴を利用して、例えば SU6656 に 3-(methylamino) propionic acid のような置換基を導入した化合物などが Lyn 不活性体に対して選択的で親和性の高い阻害剤になり得ると考えられた。

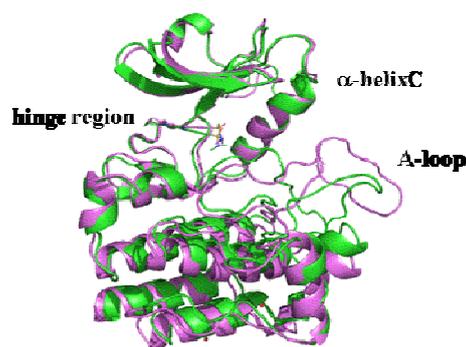


図 4 Lyn-SU6656 (ピンク)と Lck-SU6656 (緑)の重ね合わせ

結語

本研究では、ヒト型 Lyn の構造を明らかにした。また、現在の計算化学では予測困難である構造の誘導適合を本構造解析において見出し、*in Silico* 創薬におけるタンパク質 X 線結晶構造解析の有用性を示した。複合体の構造比較から、hinge 領域および DFG-motif での相互作用を同時に利用した Lyn 不活性体高選択的阻害剤の創出など、分子設計に有用な構造情報を得、新たな阻害剤分子設計指針を示すことができた。

審査結果の要旨

細胞内でのシグナル伝達に関わるタンパク質キナーゼの過剰な活性がさまざまなガンの発症に関係することが明らかとなり、有効性が高く副作用が少ない新たな化学治療剤の創製を目指したキナーゼ阻害剤の研究が盛んに試みられるようになって来た。しかし、キナーゼ遺伝子はヒトゲノム中に 518 種類もあり、その高次構造の類似性も極めて高く、特定のキナーゼを選択的に阻害する分子標的治療薬の創製は容易ではない。本学位論文は、9 種の極めて構造類似性が高いキナーゼからなっている Src ファミリープロテインキナーゼ (SFK) を題材として、標的キナーゼ・阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を行い、選択性の高いシーズの探索の可能性について論じたものである。

第 1 章では、SFK の一つであるヒト型 Lyn キナーゼドメインを昆虫細胞を用いた発現系で大量取得に成功し、X 線結晶構造解析への途を拓いたことを述べている。

第 2 章では、Lyn とキナーゼ非選択的阻害剤である staurosporine との複合体の構造を報告している。ヒト型 Lyn の構造報告はこれが初めてであり、阻害剤の結合様式および Lyn の構造的特徴を明らかにした。

第 3 章では、Lyn と SFK に選択的な阻害剤である SU6656 との複合体の構造解析について報告している。従来、A-loop は柔軟性が高く明確な電子密度を示さないことが多いが、本複合体では独特の一定のコンフォメーションを示していることを見出し、誘導適合が生じたと論じている。

第 4 章では、構造比較を目的として SFK の一つである Lck と SU6656 との複合体の構造解析を実施し、構造特徴について報告している。興味深いことに、類似した構造を持つにも関わらず、Lyn とは明らかに異なった相互作用形式であることを見出している。

第 5 章では、決定した 3 種のキナーゼ・阻害剤複合体の構造から、ATP 結合サイトに入り得る多環芳香化合物を骨格とし、ATP 結合サイトから hinge 領域に向けて陽イオン性の置換基、DFG-motif 付近の固有の空間を利用した陰イオン性置換基をそれぞれ導入することにより、Lyn 不活性体に対して選択的で親和性の高い阻害剤となり得るという極めて興味深い阻害剤分子設計を示すに至っている。また、一次構造の比較から、9 種の SFK は誘導適合を起こすものと起こさないものの 2 種に分けられるという興味深い結論を導き出している。

以上のように、本論文は、キナーゼの阻害剤分子認識への理解を深めており、創薬に関わる構造生物学の研究に大きく貢献している。したがって、本学位論文審査委員会は、当該論文が博士（理学）の学位を授与するに相当すると結論した。