

称号及び氏名 博士(理学) 露口 正人

学位授与の日付 令和2年3月31日

論文名 X線結晶構造解析に基づいた高選択性 CK2 α 1 阻害剤創出に向けた構造基盤の構築

論文審査委員 主査 木下 誉富
副査 藤井 郁雄
副査 円谷 健

論文要旨

『X線結晶構造解析に基づいた高選択性 CK2 α 1 阻害剤創出に向けた構造基盤の構築』

露口 正人

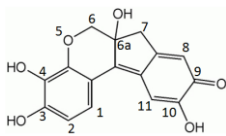
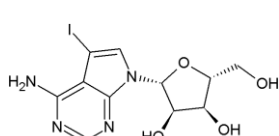
緒論

Casein kinase 2 (CK2) は、基質のリン酸化を介して様々な細胞プロセスに関与するセリン・スレオニンキナーゼであり、その活性サブユニットとして 相同性が非常に高い CK2 α 1、CK2 α 2 の2つのサブタイプがある。CK2 α 1 は広く発現しており、がんなどの重篤疾患の創薬ターゲットとされる。一方、精巣などで特異的に発現する CK2 α 2 の阻害は精巣毒性につながる。副作用を抑え安全性を確保するためには高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創成が望まれる。オフターゲットとなる他のキナーゼも同時に阻害すると、それぞれ副作用が起こる。多くのキナーゼのうちで、相同性が高い CK2 α 2 が最も分離が難しいオフターゲットとなる。一般に、キナーゼ阻害剤は ATP 結合サイト周辺に結合することが多いが、このサイトはキナーゼ間での相同性が非常に高い。高選択性阻害剤を設計する構造知見が不足していた。そこで、特徴的な阻害剤と CK2 α 1 あるいは CK2 α 2 との複合体について X 線構造解析及び生化学実験を行い、高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創出を可能とする構造基盤の構築を目指した。

hematein は、CK2 α 1 と CK2 α 2 に対して同等の阻害活性を示す (Table 1) が、CK2 α 1 に対しては ATP 非拮抗型、CK2 α 2 に対しては ATP 拮抗型で阻害活性を示す。この阻害様式の違いをもたらす原因を解明することでサブタイプ間での選択性向上の手掛かりを得られると考え、CK2 α 1 と CK2 α 2 の野生型および変異体について hematein との複合体の構造解析を行った。

5-iodotubercidin (5IOD) はアデノシン類似骨格を有しているが、CK1 γ 2 を含む多様なキナーゼに対して阻害活性に差が見られる (Table 1)。CK2 α 1 の 5IOD 複合体のX線結晶構造を解析し、Table 1 に示した他のキナーゼと 5IOD との相互作用様式を精査することで、高選択性阻害剤の設計が可能となる CK2 α 1 の ATP 結合サイトにおける構造の特徴が見出せると考えた。

Table 1 阻害剤の構造と阻害活性 (IC₅₀ (μ M)/K_d* (μ M))

	CK2 α 1	CK2 α 2	CK1 γ 2	ERK1	ERK2	Haspin	CLK1
<p>Hematein</p> 	0.2	0.4	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*	n.d.*
<p>5-iodotubercidin</p> 	10.9	n.d.*	0.4	1.2	0.9	0.009	0.007*

*no data

第1章 CK2 サブタイプ間の選択性獲得のための構造基盤

1-1 野生型 CK2 α 1/ α 2 - hematein 複合体の X 線結晶構造解析

野生型 CK2 α 1 及び CK2 α 2 と hematein の複合体結晶構造を解析した。両サブタイプには hematein の結合による主鎖の大きな構造差異は見られなかった。hematein は CK2 α 1, CK2 α 2 とともに ATP 結合サイトにのみ結合していたが、結合様式が著しく異なっていた (Fig. 1)。

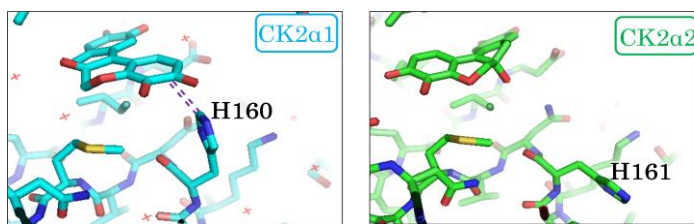


Fig. 1 CK2 α 1/ α 2 の His160/His161 と hematein の相互作用

CK2 α 2 と hematein の複合体構造では、His161 の側鎖が ATP 結合サイトと逆側を向いており (DOWN 構造)、hematein との相互作用は見られなかった (Fig. 2)。一方、CK2 α 1 と hematein の複合体では、His160 (CK2 α 2 の His161 に相当) の側鎖は ATP 結合サイト側を向いており (UP 構造)、hematein と CH- π 相互作用を形成していた (Fig. 1)。CK2 α 1 - hematein の複合体構造と CK2 α 1 - ATP アナログの複合体構造 (PDB code : 2PVR) と比較すると、UP 構造では His160 側鎖は ATP のリボースと接触する (Fig. 2) ことから、ATP のアクセスを妨げる立体障害となる。このことから、この UP 構造が ATP 非拮抗様式を呈する要因と考えられる。

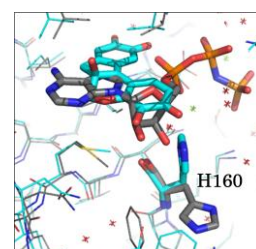


Fig. 2

AMPPNP/hematein 複合体の構造比較

1-2. His160 残基の重要性

CK2 α 1 の His160 をアラニンに置換した変異体 (H160A) を作製し、hematein との結合様式を X 線結晶構造解析により調べた。その結果、CK2 α 1 H160A 変異体では hematein の結合様式は CK2 α 2 型となることがわかった。このことから、CK2 α 1 に対する hematein の阻害様式は His160 の側鎖の UP 構造が重要であることがわかった。CK2 α 1 では hematein の 3 位のヒドロキシ基周辺の空間が広い。CK2 α 2 ではこのヒドロキシ基は hinge 領域と水素結合を形成している。このため、hematein の 3 位のヒドロキシ基をメトキシ基などの官能基に置換すると、CK2 α 2 型では立体障害により結合できず、CK2 α 1 型では結合に負の影響を与えない。これにより、CK2 α 1 選択性の向上が期待できる。さらに、CK2 α 1 の His160 の UP 構造/DOWN 構造を制御する要因を解明し、高選択性 CK2 α 1 阻害剤創出に向けた論理基盤の構築を図った。

1-3. His160 残基の UP 構造/DOWN 構造の制御機構の解明

His160 とその周辺は CK2 α 1 と CK2 α 2 で完全に保存されているため、UP 構造/DOWN 構造の制御にはアロステリック的要因が考えられる。側鎖は hematein と相互作用していないものの、hinge 領域の 2 残基が両サブタイプ間で異なっている (CK2 α 1 : His115, Val116 CK2 α 2 : Tyr116, Ile117)。そこで、CK2 α 1 の hinge 領域に変異を導入し、3 種類の α 2 型変異体 (H115Y, V116I, H115Y/V116I) を作製し、hematein との複合体構造について X 線結晶構造解析を行った。その結果、いずれの変異体についても CK2 α 1 型と CK2 α 2 型、両方の結合様式の存在を示す電子密度が見られた (Table 2)。このことから、CK2 α 1 と CK2 α 2 間の hinge 領域の 2 残基の

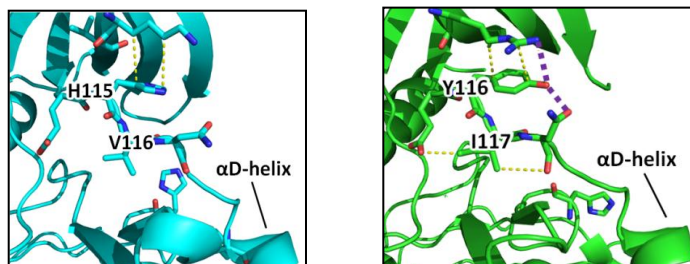


Fig. 3 hinge 領域の相互作用 (左 : CK2 α 1 右 : CK2 α 2)

違いは **hematein** の結合様式に影響を及ぼすことが示された。サブタイプ間で **hinge** 領域の相互作用を比較すると、CK2 α 1 に比べて CK2 α 2 ではより多くの相互作用が、広域に渡って形成されていた (Fig. 3)。この相互作用ネットワークが CK2 α 1 の **hinge** 領域の変異により変化し、CK2 α 2 型に近づいたことで下流の α D-helix の構造シフトに影響を与えた。最終的に、対面に存在する His160 の構造変化にも影響を与え、**hematein** の結合様式を一部 CK2 α 2 型に変化したものと考えられる (Fig. 4)。 α D-helix の動きに違いがあると仮定した場合、この近傍に結合するリガンドを設計することで CK2 α 1 に対する選択性を獲得することが可能であると考えられる。

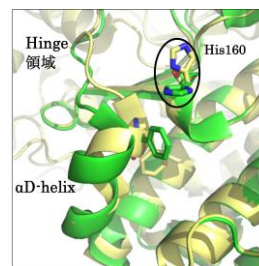


Fig. 4 hinge 領域と His160 の相関

Table 2 各 CK2 と **hematein** の結合様式の比率

	CK2 α 1 WT	CK2 α 1/ H115Y	CK2 α 1/ V116I	CK2 α 1/ H115Y/V116I	CK2 α 1/ H160A	CK2 α 2 WT
CK2 α 1 型	100	40	30	20	0	0
CK2 α 2 型	0	60	70	80	100	100

第 2 章 CK2 と他ファミリーキナーゼ間の選択性獲得のための構造基盤

CK2 α 1 と 5IOD の複合体について、X 線結晶構造解析を行ったところ、他のキナーゼと同様に 5IOD は ATP 結合サイトに結合しているものの、他のキナーゼと比べて相互作用が少ないことがわかった。C-lobe では、他のキナーゼ類で共通して形成されていた 3_{10} -helix と 5IOD のリボース水酸基の間の水素結合が CK2 α 1 と 5IOD の間では形成されていない。これは、Met163 が、他のキナーゼで保存されているロイシンと比べて大きいため、5IOD のリボース基を N-lobe 側へ押し上げた結果だと考えられる。この水素結合の有無によって、5IOD の CK2 α 1 に対する阻害活性は他のキナーゼに対する活性よりも弱くなったと考えられる。一方、N-lobe では、他のキナーゼにおいてはアラニンが保存されている残基が CK2 α 1 では Val66 となっており、こちらも ATP 結合ポケットを狭めている。これら疎水性アミノ酸の違いによって、CK2 α 1 の ATP 結合ポケットは他のキナーゼと比べて非常に狭くなっている。このため、平面性の高い骨格を用いることで他のキナーゼに対する選択性を向上させられると考えられる。さらに、 α D-helix がこれまでに報告されている構造に比べて大きく溶媒側にシフトし、その周辺に 5 分子の水分子が結合するポケット (以下 α D ポケット) が出現した (Fig. 5, 黒丸)。CK2 α 1 は、反応のリン酸源として ATP だけでなく GTP を利用するという特徴があり、その制御に α D-helix の構造変化が関与しているとされている。つまり、 α D ポケットは生理機能に影響を与える可能性のあるポケットだと考えられる。CK2 α の **hinge** 領域が他のキナーゼ群より 1 残基長くなっていることが、他のキナーゼ群では保存されている α D-helix と 3_{10} -helix の相互作用の形成を妨げ、 α D-helix を溶媒側にシフトすることを可能にしたと考えられる。つまり、 α D ポケットは、他のキナーゼでは形成されず、CK2 α 1 固有の構造だと推定される。以上のことから、 α D ポケットは CK2 α 1 高選択性阻害剤を設計する上で有力なターゲット部位であると考えられる。

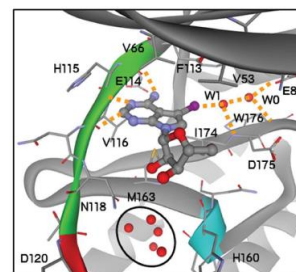


Fig. 5 5IOD の結合様式と α D ポケット

総括

第1章では、CK2 α 1/ α 2 サブタイプ間での選択性獲得のため、hematein の作用機序の解明を目指した。

2-1 では、hematein は CK2 α 1/ α 2 いずれに対しても ATP 結合サイトに結合しているものの、その結合様式に顕著な違いが見られた。その差異は His160 の UP 構造/DOWN 構造の違いから生じることが示唆された。さらに UP 構造では His160 側鎖は ATP のアクセスを妨げる立体障害となる。このことが ATP 非拮抗阻害の要因であると考えられる。2-2 では、CK2 α 1 の His160 をアラニンに置換すると hematein の結合様式は CK2 α 2 型へと変化することがわかった。このことから、ATP 非拮抗型阻害である CK2 α 1 の結合様式には His160 の側鎖との相互作用が必須であることが示された。CK2 α 1 では hematein の3位のヒドロキシ基の周辺の空間が広く、CK2 α 2 ではこのヒドロキシ基は hinge 領域と水素結合を形成している。このため、hematein の3位のヒドロキシ基をかき高い官能基に置換することで、CK2 α 2 に対する選択性の向上が期待できる。2-3 では、CK2 α 1 型と CK2 α 2 型の hematein の結合様式の違いが His160 (His161) から遠く離れた hinge 領域の2残基の違いに起因することを明らかにした。hinge 領域の変異によって完全に結合様式が変わることはなかったが、CK2 α 2 型の結合が主体になったことから、hematein と直接相互作用をしていない hinge 領域の残基の違いが結合様式に大きな影響を与えていることが示された。これは、hinge 領域での相互作用ネットワークの違いが α D-helix の動きに影響を与えているからだと考えられる。 α D-helix 近傍に作用するリガンドを設計することで、CK2 α 1 に高い選択性を有するリガンドとなる可能性がある。

第2章では、CK2 α 1 と 5IOD の複合体の結晶構造を解析した。その結果、5IOD の結合様式は他のキナーゼと類似するが、他のキナーゼと比べて相互作用が少ないことが判った。C-lobe では、CK2 α 特有のメチオニン残基により 5IOD のリボース基が N-lobe 側へと押し上げられ、3₁₀-helix 部位との水素結合形成を不可能にしていた。一方、N-lobe では、他のキナーゼではアラニンが保存されている残基が CK2 α 1 ではバリンとなっていた。これら疎水性残基の違いから、CK2 α 1 は他のキナーゼと比較すると ATP ポケットが非常に狭くなっていることが明らかとなった。このことから、平面性の高い骨格を用いることで CK2 α 1 と他のキナーゼ類の間で高い選択性が期待できる。また、5IOD の結合により CK2 α 1 固有と推測されるリガンド結合ポケット、 α D ポケットを見出した。このポケットに結合するリガンドを設計することで、新規の高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創出が見込まれる。

本研究では、CK2 α 1 に対する高選択性阻害剤の創出に向けた構造基盤の構築を行った。これらの結果から、CK2 α 1 に対する選択性の向上には、CK2 α 1 固有の α D ポケットを活用することが有効である。本研究成果は、高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創出研究のさらなる発展を促すものである。

文献

- 1) M. Tsuyuguchi, T. Nakaniwa, T. Kinoshita, Crystal structures of human CK2 α 2 in new crystal forms arising from a subtle difference in salt concentration, *Acta Cryst.* **F74**, 288–293 (2018).
- 2) M. Tsuyuguchi, T. Nakaniwa, M. Sawa, I. Nakanishi, T. Kinoshita, A promiscuous kinase inhibitor delineates the conspicuous structural features of protein kinase CK2 α 1, *Acta Cryst.* **F75**, 515-519 (2019).
- 3) M. Tsuyuguchi, T. Nakaniwa, A. Hirasawa, I. Nakanishi, T. Kinoshita, Structural insights for producing CK2 α 1-specific inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett.* **30**, 126837 (2020).

学位論文審査結果の要旨

学位論文提出者名： 露口 正人

学位論文題目：X線結晶構造解析に基づいた高選択性 CK2 α 1 阻害剤創出に向けた構造基盤の構築

Casein kinase 2 (CK2) は、基質のリン酸化を介して様々な細胞プロセスに関与するセリン・スレオニンキナーゼであり、その活性サブユニットとして 相同性が非常に高い CK2 α 1、CK2 α 2 の2つのサブタイプがある。CK2 α 1 は広く発現しており、がんなどの重篤疾患の創薬ターゲットとされる。一方、精巣などで特異的に発現する CK2 α 2 の阻害は精巣毒性につながる。副作用を抑え安全性を確保するためには高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創成が望まれる。オフターゲットとなる他のキナーゼも同時に阻害すると、それぞれ副作用が起こる。多くのキナーゼのうちで、相同性が高い CK2 α 2 が最も分離が難しいオフターゲットとなる。一般に、キナーゼ阻害剤は ATP 結合サイト周辺に結合することが多いが、このサイトはキナーゼ間での相同性が非常に高い。高選択性阻害剤を設計する構造知見が不足していた。本研究では、特徴的な阻害剤と CK2 α 1 あるいは CK2 α 2 との複合体について X 線構造解析、さらに変異体を使った生化学実験を行い、高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創出を可能とする構造基盤の構築を目指した。

X線結晶構造解析から、hematein は CK2 α 1、CK2 α 2 に対して全く異なる様式で結合することが明らかとなった。このことから、hematein に修飾を加えれば CK2 α 1 選択性が向上することが示唆された。さらなる変異体の X線結晶構造解析により、この結合様式の相違には保存された His160 の運動性の違いにより生じること、さらにこの運動性には hematein の結合に直接関与しない hinge 領域の2つのアミノ酸が関与していることを明らかにした。CK2 α 1 では hinge 領域及びそれに連なる α D-helix の柔軟性が高くなり、His160 の構造変化を許容することになり、その結果、hematein の結合により CK2 α 1 特有の構造を呈すると考えられる。

一方、CK2 α 1 と 5-iodotubericidin との複合体の X線結晶構造解析により、CK2 α 1 の ATP 結合領域の特徴を明確にして高選択性阻害の創出に向けた構造知見を見出した。とくに α D-helix 周辺に CK2 α 1 特有の疎水性ポケットの存在が明らかとなり、新たなアロステリック阻害剤の創出が期待される。

以上のように、2種の阻害剤の相互作用解析から高選択性 CK2 α 1 阻害剤の創出基盤を構築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 円谷 健