

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月18日提出

対象研究テーマ：HGF-Met系を中心とするがん転移・薬剤耐性のメカニズムと制がん研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：構造生物学を基盤とするHGF-Met系阻害の分子創薬研究

研究代表者：大阪府立大学大学院理学系研究科 准教授 木下誉富

研究成果の概要：

HGFβ・シード化合物複合体のX線構造に基づき、化合物の最適化を行った。相互作用が増すように設計しており活性向上が期待されたが、合成した約50誘導体はいずれも顕著な活性向上が認められなかった。そこで誘導体化合物を1つ選び、HGFβとの複合体のX線構造解析を行ったところ、シード化合物とは異なる相互作用様式で結合していることがわかった。この相互作用様式は、これら50誘導体に活性向上がなかったことを矛盾なく説明できる。さらに誘導体から4～5Å離れたところに、これまで注目していない正電荷及び負電荷サブポケットが存在していることがわかった。今後、これらのポケットを狙ったStructure-Based Drug Designを行い、高活性HGFアンタゴニストの創出を目指す。

研究分野：構造生物学、創薬化学

キーワード：X線結晶構造解析、Structure-Based Drug Design (SBDD)

1. 研究開始当初の背景

HGF (肝細胞増殖因子) はMet受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGFは肝臓をはじめ、腎臓、心血管系、脳神経系など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGFを投与・補充することが、肝硬変、急性・慢性腎不全、脳梗塞や筋萎縮性側索硬化症、皮膚潰瘍など様々な疾患の治癒・改善につながる事が明らかにされている。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが癌細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGFは様々な癌に対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met受容体系は癌の浸潤・転移阻止につながる分子標的になると考えられている。したがって、HGF-Met受容体系を阻害する分子 (HGF-Metアンタゴニスト) は癌の浸潤・転移・成長阻害につながる新規制癌分子になる。

2. 研究の目的

タンパク質の結晶化技術やX線結晶構造解析技術の進歩がコンピュータの進歩と相まって、構造生物学とバイオインフォマティクス技術を使用して新しい医薬を探索する手法が進展している。本研究では立体構造を基盤としたインシリコ創薬技術を駆使して、HGF-Met受容体系を阻害する低分子アン

タゴニストを創成することを目的とする。

3. 研究の方法

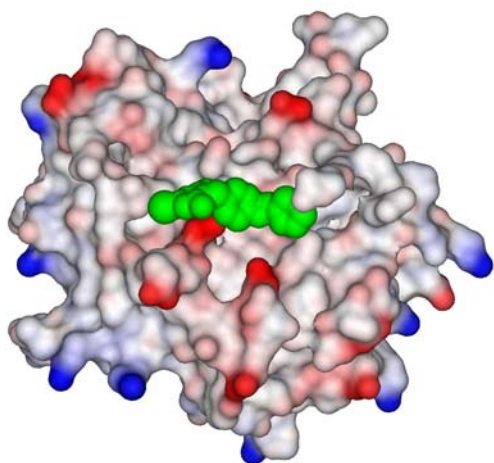
これまでの研究成果となるHGFβ-シード化合物複合体の立体構造に基づき、HGFβ鎖-Met相互作用面を遮断するHGFアンタゴニストを設計、合成した。得られた誘導体はHGFβ鎖-Metの結合阻害活性、HGF依存的細胞Scattering作用に対する阻害活性、HGF依存的Metリン酸化活性阻害、及びがん細胞の浸潤阻害活性により評価した。HGF分子内ドメインであるβ鎖の蛋白質サンプルを結晶化用を高純度精製し、誘導体化合物との複合体の結晶を調製した。この結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構においてX線回折データ測定を行い、構造解析を行った。

4. 研究成果

シード化合物のHGFβへの結合様式に基づき、新たに疎水性相互作用および水素結合を形成するように誘導体を設計した。ピロールを有する誘導体では活性が減弱するのみであった。一方、ベンゼン誘導体のいくつかは期待されたほどの活性向上を示さないものの、活性を保持していた。適切に相互作用が増加していれば、阻害活性は向上するはずである。そこで、ベンゼン誘導体とHGFβとの

複合体の X 線結晶構造解析を行ったところ、この誘導体はシード化合物に比べて約 4 Å 離れた位置に結合していることが判明した (図 1)。この X 線構造は、ベンゼン誘導体が HGFβ 鎖と期待された相互作用を形成しておらず、そのために顕著な活性向上につながらなかったことを示唆している。ベンゼン骨格から 4 ~ 5 Å のところに正電荷サブポケットと負電荷サブポケットが見られる。これらはピロール誘導体の X 線構造では化合物から遠く離れていたためにこれまで注目してこなかった。これらのポケットで適切に相互作用するように、論理的創薬手法である Structure-Based Drug Design 研究を展開し、高活性化化合物の創出を目指す。

図 1 誘導体 (緑) と HGFβ の結晶構造



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Sakai, K., Nakamura, T., Kinoshita, T., Nakamura, T., and Matsumoto, K. HGF-Antagonists: Structure, Activities, and Anti-cancer Approach. *Current Signal Transduction Therapy*, in press, 2011.
2. Matsumoto, T., Kinoshita, T., Kirii, Y., Yokota, K., Hamada, K., Tada, T. Crystal structures of MKK4 kinase domain reveal that substrate peptide binds to an allosteric site and induces an auto-inhibition state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 369-373, 2010.

[学会発表] (計 17 件)

1. 肝細胞増殖因子 HGFβ 鎖 / 阻害剤複合体の X 線結晶構造解析、仲庭哲津子、木下誉富、福田一弘、早田大真、松本邦夫、日本結晶学会平成 22 年度年会 (2010 年、大阪)

[図書] (計 1 件)

1. X 線結晶構造解析から Structure-Based Drug Design への応用と展開、木下誉富 (著者分担)、実験薬理学・創薬研究のストラテジー、日本薬理学会編、金芳堂 (2011 年)、83-89.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

1. キナーゼ阻害剤、特願 2011-048325

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

1. シグナル伝達蛋白質の構造生物学と創薬研究、木下誉富、金沢大学がん研究所セミナー (2011 年、金沢)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授
木下誉富

(2) 研究分担者

大阪府立大学大学院理学系研究科・ポスドク
仲庭哲津子

(3) 本研究所担当者

腫瘍動態制御・教授 松本邦夫