

2023 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## 研究成果報告書

## (1) 事業名 (下記より該当事業名を選択し、ほかは削除して下さい。)

共同研究員

## (2) 研究代表者

氏名：島 扶美

所属機関名・部局名・職名：神戸大学・大学院科学技術イノベーション研究科・教授

## (3) 研究課題名 (申請時に記載したものと同一課題名を記入して下さい。)

固体 NMR による低分子量 G 蛋白質 Ras の微結晶中での GTP 分解反応過程の反応速度論解析並びに構造解析

## (4) 蛋白質研究所受入担当教員

教員名：松木 陽 (研究室名：機能構造計測学)

## (5) 研究成果の概要 (公開)

\*背景および目的、方法と結果、について、公開して差し支えない範囲で 1 ページ以内で記載。

低分子量 G 蛋白質 RAS は *ras* がん遺伝子産物であり、GTP (活性型) /GDP (非活性型) 結合型のサイクルを介して下流のエフェクター分子との結合が制御され、細胞の増殖やがん化シグナル伝達を調節している。RAS の常時活性型変異が、がん全体のおよそ 30%において認められることから、RAS はがん創薬の明確なターゲット分子である。近年では 2021 年に、Sotorasib が KRAS G12C 変異陽性の非小細胞肺がんの適応で FDA の迅速承認を受け、2022 年には日本でも製造販売が承認されている。このように、RAS を分子標的とした創薬研究は再び注目されている。しかしながら、承認薬の適応が特定の変異型 KRAS・GDP に限られている点や既に薬剤耐性の問題も指摘されている点など克服すべき課題は健在している。現時点で活性型 RAS・GTP を標的にした抗がん剤は上市されておらず、その障壁の一つはこれまで解明されている RAS・GTP の構造が、人工の非加水分解性 GTP アナログである GppNHp を用いた構造であり、RAS の不活化反応である GTP 加水分解反応の動的構造情報の詳細が未解明である点が挙げられる。

そこで本研究では、天然 GTP 結合型 Ras の GTP 加水分解反応過程での動的な構造変化を解明するために、光制御可能な CagedGTP を用いて GTP 加水分解反応の開始を UV 光照射により巧みに制御し、NMR シグナルの経時変化から RAS 蛋白質の不活化機構に関わる速度論的解析を行った。

本研究では cagedGTP RAS の微結晶懸濁液の  $^{31}\text{P}$  NMR 測定を実施し、光照射には 365nm の LED 光源を使用した。光保護基 (cage) の脱保護 (uncage) をトリガーとして、GTP 加水分解反応を開始させ、 $^{31}\text{P}$ -CP-MAS 測定を実施し信号変化をトレースしたところ、光照射直後に生じた天然型 GTP の  $\beta$  リン酸由来の信号の減少と、それに伴う顕著な GDP 型由来の信号強度の増加が観測された。観測された信号強度の増加分を時間に対してプロットし、model fitting による速度論解析を実施したところ、GTP 型から GDP 型へ 1 次の反応速度で従うモデルにおいて、およそ  $4 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$  の速度定数をもって加水分解反応が進行しており、その速度は溶液中と凡そ同一の速度であった。