

平成28年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Project Promoting Support for Drug Discovery “The iD3 Booster”

実験調査課題名： (日本語) Ras/Raf シグナル伝達を阻害する新規抗がん剤の研究
(英語) Research on the development of novel anti-cancer drugs
inhibiting Ras/Raf signaling pathways

実験調査担当者 (日本語) 国立大学法人 神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科
教授 島 扶美

所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University
Fumi Shima, M.D., PhD. Professor

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

II. 成果の概要

- Raf の新規ポケットに結合する化合物 X のインシリコ類縁体探索で選抜した化合物について、母核構造から 5 つのカテゴリーに分類される複数のヒット化合物を同定することができた。各カテゴリーに属するヒット化合物はシングルトンではなく構造活性相関が確認された。また、NMR による結合解析の結果、Raf への領域特異的な結合作用が確認された。
- 組み換え細胞株を用いた東大創薬機構保有化合物ライブラリーのスクリーニングで得られた初期ヒット化合物について、細胞増殖抑制試験ならびに細胞内シグナル分子の検出試験を通じて、Ras/Raf/MAPK のシグナル伝達を抑制することにより細胞増殖を抑制する新規ヒット化合物の同定に成功した。
- 上記東大ヒット化合物のうち、*in vitro* 試験で顕著な活性を示したヒット化合物 Y について、東大創薬機構保有ライブラリーから類縁体探索を実施し、インシリコ選抜した化合物の活性評価を行ったところ、強力な活性を示す化合物が複数含まれることが確認された。
- cRaf1 の新規薬剤結合ポケットの立体構造をターゲットにしたドッキングスクリーニングにより選抜した化合物から初期ヒット化合物が得られた。濃度依存性試験の結果、出発化合物 X と同等もしくはそれ以上の強い *in vitro* 活性を示す化合物が複数含まれることが確認された。
- Based on the *in silico* screening for the analogues of a hit compound X, the compounds which specifically bind to the novel pocket on Raf protein were selected, and subjected by a series of *in vitro* assays. Consequently, we have succeeded in the discovery of the hit compounds classified into five groups. Each group was composed of a member of compounds and showed SAR. Furthermore, NMR analysis revealed that the representative compounds showed specific binding to the target protein Raf.
- We carried out the compound screening of the chemical library from Drug Discovery Initiative (DDI) in Tokyo University via the cell-based assays with the genetic recombinant cell lines. The primary hit compounds were subjected by a series of *in vitro* assays to detect activated signaling molecules. Finally, we have succeeded in the discovery of the novel hit compounds which significantly prevent cell proliferation by inhibiting Ras/Raf/MAPK signaling pathways.
- Since the above hit compounds from the DDI library included a compound Y which showed a significant *in vitro* activity, we carried out *in silico* screening for its analogues and subsequent *in vitro* assays, leading to identification of several hits which showed potent activity.
- Computer-based docking screening targeting a novel pocket in cRaf1 provided a primary hit discovery. Dose evaluation test revealed that some of the hit compounds showed equivalent and/or more potent activity compare to the compound X.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28年度 委託実験調査成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬支援推進事業 創薬総合支援事業
(英語) Project Promoting Support for Drug Discovery “The iD3 Booster”

実験調査課題名： (日本語) Ras/Raf シグナル伝達を阻害する新規薬剤の研究
(英語) Research of Novel Inhibitor for Ras/Raf Signal Transduction

実験調査担当者 (日本語) 公益財団法人高輝度光科学研究センター タンパク質結晶解析推進室
室長代理 熊坂 崇

所属 役職 氏名： (英語) Japan Synchrotron Radiation Research Institute, Protein Crystal Analysis
Division, Deputy Director, Takashi Kumasaka

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要

- cRaf-RBD を標的とする新規薬剤開発の構造基盤を与えるため、本試料の調製、単体ならびに化合物複合体の結晶構造解析を進めている。
- 今年度は、3種類のカラムクロマトグラフィを用いた精製プロトコルを確立して高純度試料を調製し、それを用いて 7,000 条件超の結晶化スクリーニングを実施した。しかし、タンパク質単体ならびに化合物複合体の結晶は得られなかった。これを受け、結晶化を目的とした変異導入を行い、大腸菌による発現を確認した。
- 別途進めていた標的タンパク質と Ras-GMP-PNP と複合体結晶化に成功した。

- To establish structural basis for novel drug development, we performed the preparation and crystallization of c-Raf-RBD.
- In this fiscal year, we prepared highly purified protein by a new experimental protocol using three types of chromatography. By using the purified sample, we examined crystallization trials with over 7,000 conditions. However, no protein crystal was obtained. To overcome the issue, we started trials of protein engineering to obtain well-crystallized proteins, and have been confirmed their expression in *E. coli*.
- As another route to obtain cRaf-RBD structures, we were successful in the crystallization of the complex between the target protein and Ras-GMPPNP.

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）
該当なし

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

- (4) 特許出願
該当なし