

キネシン CENP-E を用いた結晶化と X 線回折データの分解能の改善 Improvement of crystallization and collection of X-ray diffraction data of kinesin spindle protein CENP-E

渋谷明日香¹, 横山英志^{1,*}

¹ 東京理科大学大学院 薬学研究科

〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641

Asuka SHIBUYA¹ and Hideshi YOKOYAMA^{1,*}

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, 278-8510, Japan

1 背景

分裂期の細胞において重要な役割を果たすキネシン Centromere-associated protein E (CENP-E) は、がん治療の新たな標的分子として注目されている。これは、adenosine 5'-triphosphate (ATP) 駆動性モータータンパク質である [1]。CENP-E の阻害剤には不競合阻害剤 GSK923295, 競合阻害剤 3-chloro-4-isopropoxyl benzoic acid (CIBA) がある [2]。このうち GSK923295 は臨床試験第 I 相が終了しており、既存の抗がん剤よりも副作用が少ないことが報告されている。阻害剤の設計は、結晶構造を基にした合理的なアプローチが最適であるが、CENP-E モータードメインと阻害剤の複合体の結晶構造が未だに解明されていないため、既存の阻害剤よりも阻害効果の強い阻害剤の作製は難しい状況である。そこで今回我々は、CENP-E モータードメインと阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を行うために、調製から X 線照射までの条件検討を行った。

2 実験方法

ヒト CENP-E モータードメイン (1-339 残基、C 末に His tag を付与) を、低温発現が可能な pCold III ベクターに組み込んだ。これを用いて大腸菌 BL21(DE3) Codon Plus RIL を形質転換して培養し、タンパク質を大量発現した。菌体破碎後、Ni affinity、陽イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた三段階の精製を行った。溶出液を濃縮後、競合阻害剤 CIBA または ATP アナログを添加し、共結晶化を試みた。

共結晶化において、microseeding により得られた結晶を新たな種として作り替えていく過程を何度も繰り返した [3]。結晶を得た後、瞬間凍結前に用いる抗凍結剤を浸す時間について条件検討を行った。BL-1A もしくは BL-17A で、得られた結晶に X 線を照射した。

3 結果および考察

Ni affinity 精製において、調製条件の最適化を行った。溶出液の pH を、CENP-E の等電点よりも更に酸

性にした結果、沈殿が生じにくくなり、収量が約 6 倍に増加した。2.4 L 培養で得た溶液中のサンプルは、最終的に約 4 mg となった。

共結晶化して得られた結晶を用いて BL-1A で X 線を照射したところ、いずれも分解能 4-7 Å の回折像が得られた。これらの結晶を microseeding 法の種として用いて、新たに結晶を得た。BL-17A で X 線を照射したところ、最大分解能約 3 Å の回折像を得た。更にこの結晶を microseeding 法の種として用いて、新たに結晶を得て BL-17A で X 線を照射した。ATP アナログを添加し得た結晶から最大分解能 2.2 Å の、CIBA を添加し得た結晶から最大分解能 3.0 Å の回折像を得た。

更に高分解能の回折像を得るために、microseeding 法を繰り返して得た結晶を用いて、瞬間凍結前の操作の条件の最適化を行った。以前は抗凍結剤の濃度 50% の溶液に一瞬浸して瞬間凍結させていたが、結晶が入ったドロップに抗凍結剤を約 15 分かけて徐々に加え、抗凍結剤の最終濃度が 40-50% となるように調整した。その結果、最大分解能 2.0 Å の回折像を得ることに成功した。

謝辞

本研究は、静岡県立大学創薬探索センターの浅井先生および浅井研究グループの연구원の方々、そしてフォトンファクトリーのスタッフの方々の協力のもと行いました。この場をお借りして御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] H. Sardar *et al.*, *J. Biol. Chem.* **287**, 24894 (2012)
- [2] X. Qian *et al.*, *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 30 (2010)
- [3] A. D'Arcy *et al.*, *Acta Cryst.* **F70**, 1117 (2014)

* yokoyama@rs.tus.ac.jp