

# キネシン CENP-E と ATP アナログの複合体の X 線結晶構造解析 Structure determination of kinesin spindle protein CENP-E with ATP analog

渋谷明日香<sup>1</sup>, 鈴木翠<sup>1</sup>, 横山英志<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 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 SHIBUYA<sup>1</sup>, Akira SUZUKI<sup>1</sup> and Hideshi YOKOYAMA<sup>1,\*</sup>

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

## 1 背景

がんは日本の死因 1 位の疾患であるため、新たな抗がん剤の開発が求められている。そこで、がん治療の新たな標的分子として注目されているのが、細胞分裂において染色体集合などの重要な役割を担うキネシン Centromere-associated protein E (CENP-E) である。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、競合阻害剤 3-chloro-4-isopropoxyl benzoic acid (CIBA)、ATP と結合した CENP-E にのみ作用する不競合阻害剤 GSK923295 などがある [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。しかし現時点では、CENP-E モータードメインの結晶構造は ADP が結合した複合体のもののみ解明されており [3][4]、阻害剤との複合体の結晶構造が未だに解明されていないため、阻害剤候補の新たな作製は難しい状況である。そこで我々は、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ことを研究の目的とした。

以前我々は、精製した CENP-E に CIBA を添加し、結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、CENP-E は CIBA ではなく ADP と結合していたことが判明した。このことから、阻害剤との複合体の結晶を作製するためには、CENP-E から ADP を解離させる操作が必要であることが分かった [4]。そのため今回我々は、ADP の解離の方法を確立させ、更に CENP-E と ATP アナログとの複合体の X 線結晶構造解析を行うことを短期目標とした。

## 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、陽イオン交換を用いた二段階の精製を行った。0.45  $\mu\text{m}$  フィルターで不純物を除去した後、溶出液を濃

縮した。これに Apyrase を添加し、25°C でインキュベートした。更にゲルろ過クロマトグラフィーを行い、サンプルから Apyrase を除去した。これに競合阻害剤 ATP アナログを添加し、共結晶化を試みた。得られた結晶に、BL-17A で X 線を照射し、回折像を収集した。プロセッシングとスケーリングは XDS と SCALA を用いて行った。

## 3 結果および考察

Apyrase を添加しインキュベートをした後、サンプルは白濁していた。更にゲルろ過を行い、A280 での吸光度を測定したところ、二つのピークが見られた。このうちの一つは、過去の実験結果から CENP-E のものと考えられたため、もう一つのピークは Apyrase のものだと考察した。CENP-E だと考えられるピークでの溶出液を回収し、これを濃縮した。結晶化し得られた結晶を用いて、フォトンファクトリーの BL-17A で X 線を照射したところ、最大分解能 1.8 Å の回折像が得られた。現在構造解析中である。

## 謝辞

本研究は、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] Garcia-Saez *et al.*, *J. Mol. Biol.* **340**, 1107 (2004)
- [4] A. Shibuya *et al.*, *Acta Cryst.* **D77**, 280 (2021)

\* yokoyama@rs.tus.ac.jp