

キネシン CENP-E と阻害剤複合体の構造解析による阻害機構の解明 Structure determination and elucidation of function of kinesin spindle protein CENP-E with inhibitor

鈴木翠¹, 渋谷明日香², 荒川孝俊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

²城西国際大学 薬学部, 〒283-8555 千葉県東金市求名 1

Akira SUZUKI¹, Asuka SHIBUYA², Takatoshi ARAKAWA¹, and Hideshi YOKOYAMA¹

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

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai International University, 1 Gumyo, Togane City, Chiba, 283-8555, Japan

1 背景

Centromere-associated protein E (CENP-E)はキネシンファミリーに属する ATP 駆動性モータータンパク質であり、細胞分裂期において紡錘体赤道面への染色体の移動・整列に関与する。CENP-E の阻害剤は細胞分裂期特異的に作用するため、既存の微小管阻害薬に代わる副作用の少ない抗がん剤の候補として注目されている。CENP-E を標的とした阻害剤は現在数種類報告されているが、阻害能が高く優れた CENP-E 阻害剤は少ない。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、現在 CENP-E モータードメインの結晶構造は ADP 複合体及び ATP アナログ複合体のみ解明されており[1][2][3]、阻害剤複合体の結晶構造は未だ解明されていない。結合様式の異なる複合体構造を複数得ることにより多くの抗がん剤候補化合物を創出することができる。そこで我々は CENP-E の阻害剤として競合阻害剤である 3-chloro-4-isopropoxyl benzoic acid (CIBA)と不競合阻害剤である GSK923295を用いて阻害剤複合体の X 線結晶構造解析を行うことを研究の目的とした。

阻害剤との複合体の結晶を作成するためには、CENP-E から内因性の ADP を解離させる必要があることが以前の我々の研究から分かっている[3]。今回我々は阻害剤複合体調製の方法を確立させ、精製条件の検討により複合体の安定性を向上させた。

2 実験方法

ヒト CENP-E モータードメイン (1-339 残基、C 末端に His-tag を付与)を大腸菌発現系によって発現させ、His-tag を利用した Ni affinity 精製、陽イオン交換を用いた二段階の精製を行った。溶出液を濃縮し、ADP 加水分解酵素 *apyrase* による処理を行い、内因性 ADP を取り除き競合阻害剤 CIBA 又は ATP アナログを添加し、4°C で 24 時間インキュベートした。更

にゲル濾過クロマトグラフィーを行い、*apyrase* や不純物などを除去した。

得られた複合体を濃縮し、*Sitting drop* 蒸気拡散法を用いて 4°C の条件下で共結晶化を行った。ATP アナログとの複合体には不競合阻害剤 GSK923295 を添加して共結晶化を行った。得られた結晶に BL-17A で X 線の照射を行った。

3 結果及び考察

CENP-E モータードメインは熱安定性が低く、精製過程で白濁沈殿が見られていた。*apyrase* 反応の条件を 25°C から 4°C に変更した結果、白濁沈殿がなくなり収量が増加した。競合阻害剤 CIBA 複合体の結晶化でいくつかの結晶が得られ、X 線照射を行ったが現在のところタンパク質性の回折像は得られていない。また不競合阻害剤 GSK923295 複合体の結晶化では結晶が得られていない。

結晶が得られない理由としてタンパク質の安定性が関連していると考え、更なる安定性の向上のため精製条件の再検討を行った。pH 条件を 6.8 から 7.4 に変更した結果陽イオン交換後の収量が増え、最終的な収量が約 3 倍に増加した。5.6 L 培養で得られた目的タンパク質量は約 12 mg となった。今後は pH 条件を変更したサンプルで結晶化条件の探索を行い、結晶が得られ次第 X 線照射を行う予定である。

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] I. Garcia-Saez et al., J Mol Biol 340, 1107 (2004).
- [2] A. Shibuya et al., Acta Crystallogr. D 77, 280 (2021).
- [3] A. Shibuya et al., FEBS Lett. 597, 1138 (2023).

*yokoyama@rs.tus.ac.jp