

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,

〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1

² 城西国際大学 薬学部, 〒283-8555 千葉県東金市求名 1 番地

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

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 6-3-1 Niijuku, Katsushika-ku, Tokyo, 125-8585, Japan

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai International University, 1 Gumyo, Togane-shi, 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合理的に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。

阻害剤複合体の結晶を作成するには、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及びヌクレオチドを含まないCENP-E(以下CENP-E-free)の調製方法を確立させ、精製条件の検討によりタンパク質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を付加)を大腸菌発現系によって発現させ、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、内因性のADPを完全に除去するかATPアナログの添加を行い、4°C、15°C、20°C及び25°Cの条件で反応させた。反応時間は低

温(4°C)条件では24時間、その他の温度条件では2時間で反応を行った。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。

得られたタンパク質溶液を濃縮し、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アナログ複合体には不競合阻害剤GSK923295を添加し、CENP-E-freeには競合阻害剤であるCIBAを添加して共結晶化を行った。

3 結果及び考察

精製条件の検討によりタンパク質の安定性が向上し、CENP-E-freeの調製が可能となった。以前までの競合阻害剤複合体の調製・結晶化では精製途中に阻害剤との結合を行っていたため、結晶化の際には阻害剤が解離し、結晶が析出しにくかったと考えられる。CENP-E-freeの調製により、結晶化の際に阻害剤の添加を行うことで阻害剤との結合がより確実となり、現在様々な条件で結晶が得られている。

また今まで安定性の問題から結晶化することができなかったCENP-E-freeに関しても結晶化条件の検討を行い、いくつかの結晶が得られている。今後得られた結晶に関してX線回折実験を行う予定である。

不競合阻害剤複合体の結晶に関しては未だ得られていないため、ATPアナログ複合体の結晶を用いたソーキング法で複合体の結晶化を行っていく。

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