

キネシン CENP-E と阻害剤複合体の安定性の向上と結晶化 Improving the stability and crystallization of the kinesin CENP-E inhibitor complex

鈴木翠¹, 納富雅紗子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 青山学院大学 理工学部, 〒252-5258 神奈川県相模原市中央区淵野辺 5-10-1

Akira SUZUKI¹, Masako NOTOMI¹, 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 Department of Physical Sciences, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa, 252-5258, 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 の阻害剤として異なる阻害様式である競合阻害剤 1 種類と不競合阻害剤 3 種類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 ADP 解離段階における精製条件の検討により熱安定性の低い CENP-E の安定性を向上させた。また、不競合阻害様式である 3 種類の阻害剤について共結晶化及びソーキング法を用いて阻害剤複合体の結晶化を行い、高分解能で回折データを得ることに成功した。

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 を親和性の低い AMP まで加水分解することで解離させ、同時に ATP アナログとの結合を行なった。酵素反応は 4°C、

16 時間で行った。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 の条件下で結晶化を行った。ATP アナログ複合体に不競合阻害剤を添加し、共結晶化を行った。さらに ATP アナログ複合体の結晶を不競合阻害剤溶液に浸漬するソーキング法も試みた。

3 結果及び考察

酵素反応について 4°C、15°C、及び 25°C の条件で反応させ、反応とともに放出される無機リン酸の定量を行い、タンパク質の安定性を保ちながら複合体の調製を行える最適な調製法を確立した。

安定性の向上に加えて、グリセロールを含んだ溶液条件で結晶化を行うことで良質な単結晶を短期間で作成することに成功した。抗凍結剤であるグリセロールを含んだ結晶化条件のため、X 線回折実験時の結晶への影響が低減され、高分解能の回折データが得られている。さらに共結晶化が困難であった溶解性の低い阻害剤について阻害剤が溶解する溶液条件を検討し、ATP アナログ複合体の結晶を阻害剤溶液に浸漬するソーキング法についてもを行い、高分解能のタンパク質性の回折データが得られている。

今後得られた回折データを解析し、複合体構造を決定し、CENP-E の特徴的な阻害剤による阻害様式を解明していく。

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