

## Nemo-like キナーゼの結晶学的研究

○ 石原正章<sup>1</sup>、日下部吉男<sup>1</sup>、田中信忠<sup>1</sup>、中村和郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup>昭和大・薬

### 【はじめに】

Wnt シグナル経路に含まれる Nemo-like kinase (NLK)は、mitogen activated protein kinase (MAPK) family に属するセリン/スレオニンキナーゼの 1 種である。近年、Wnt シグナル経路や他のシグナル経路とのクロストークにおける NLK の多様な役割が続々と明らかにされている。NLK の機能の中でよく知られているものの一つとして、NLK が細胞質において T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF)をリン酸化することにより、NLK associated ring finger protein (NARF)による TCF/LEF のユビキチン化による分解誘導が挙げられる。TCF の分解により、Wnt シグナル伝達系が抑制される。Wnt 経路に異常をきたすと様々ながんになるといわれているが、その詳しい機構は解明されていない。NLK のもう一つのよく知られている機能として、核において転写因子 c-Myb をリン酸化することで、c-Myb のユビキチン化やプロテアソーム依存的分解を誘導することが挙げられる。c-Myb が必要以上に増加すると、急性骨髄芽球性白血病や赤芽球症を促進すると考えられている。従って、NLK を何らかの化合物により活性化させると、必要以上に増加した c-Myb の分解を誘導することが可能となる。

NLK の N 末端側には、他の MAPK 類にはないアラニン、グルタミン、ヒスチジンが多く含まれている特徴的な配列 (AHQ rich domain, AHQr)がある。ERK 類、JNK 類、p38 類に関しては立体構造解析が行われているが、MAPK ファミリーにおいて、NLK 及び ERK7 の立体構造解析はいまだ報告されていない。

従って、NLK の立体構造解析により、以下の 3 点に関する知見が得られると期待できる。

(i)NLK の立体構造を決定し、他の MAPK の構造と比較することで NLK 特有の AHQr の機能に関する知見が得られる。(ii)NLK はがん化に関係するタンパク質 c-Myb や NARF などとの複合体の立体構造解析により、ガン化に関するメカニズムの一端を解明することも期待できる。(iii)NLK と ATP 類似化合物との複合体の立体構造を決定することにより、NLK による ATP 認識機構を解明でき、NLK の活性化をより促進できるような新規化合物をデザインすることが可能となる。

### 【結果と考察】

ATP 類似化合物 AMP-PNP 存在下で NLK の結晶化を行った。得られた結晶の大きさは、 $0.1 \times 0.1 \times 0.4 \text{ mm}^3$ であった。この結晶を用いて、PF-AR NW12A において  $2.7 \text{ \AA}$ 分解能の回折強度データが得られた。結晶学的パラメーターは、空間群  $P2_1$ 、格子定数  $a = 135.2 \text{ \AA}$ ,  $b = 261.44 \text{ \AA}$ ,  $c = 146.74 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 100.4^\circ$ であった。

MAD 法による位相決定のため Se-Met 置換 NLK の発現・精製を行い、発現・精製に成功した。しかし、極微量しか精製サンプルしか得られておらず、まだ結晶が得られていない。