

# 22PO-am120S

## 細胞分裂に関わるキネシン CENP-E モータードメイン・リガンド複合体の精製と結晶化

○渋谷 明日香<sup>1</sup>, 小郷 尚久<sup>2</sup>, 澤田 潤一<sup>2</sup>, 浅井 章良<sup>2</sup>, 横山 英志<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京理大院薬, <sup>2</sup>静岡大院薬)

【目的】細胞周期の進行を阻害し細胞死を誘発させる事は、有効ながん治療法の一つである。その標的分子として注目されるキネシン Centromere-associated protein E (CENP-E)は、細胞分裂時に染色体に関わることで重要な役割を担うATP駆動性モータータンパク質である。CENP-Eの阻害剤は非分裂期に作用しないため、より副作用の少ない抗がん剤の候補となる。しかしCENP-EとATPアナログや阻害剤との複合体構造と結合様式は未だ不明であり、報告されている阻害剤の種類が少ない。そこでX線結晶構造解析による初めての反応機構の解明を目的とし、これらの複合体の結晶化及び構造の解析を試みた。

【方法】大腸菌発現系を用いてC末端にHis-tagを付加したCENP-E motor domain領域(339残基)を大量発現し、His-tagによるアフィニティークロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーの3段階の精製を行った。各精製後ATPアナログもしくは競合阻害剤を加え複合体を作製し、これを濃縮して得たタンパク質溶液を結晶化の試料とした。Reservoir溶液384条件、蒸気拡散法、4℃の条件下で結晶化させた。

【結果・考察】ゲル濾過クロマトグラフィーの結果ほぼ単一のピークとなり、最終的に2.4L培養で約4mgの精製サンプルを得た。粗結晶を種としてMicroseedingを行い、ATPアナログ Adenosine 5'-( $\beta$ ,  $\gamma$ -imido) triphosphate (AMPPNP)またはCENP-Eの競合阻害剤である3-chloro-4-isopropoxy benzoic acid (CIBA)を加えたタンパク質溶液を用いていくつかの単結晶が得られた。フォトンファクトリーで得られた結晶にX線を照射したところ、タンパク質性の回折パターンが得られた。今後は得られた回折強度データを収集し、構造の解析を行う。