

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07316

研究課題名(和文) 抗がん剤開発を指向したキネシンモーターの阻害機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of inhibition mechanism of kinesin motor to develop anti-cancer drugs

研究代表者

横山 英志 (Yokoyama, Hideshi)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・准教授

研究者番号：70433208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞分裂期特異的なキネシンモータータンパク質CENP-EやEg5とそれらの阻害剤との複合体構造を決定し、それら阻害剤による結合と阻害の様式を解明することで、新規な抗がん剤を設計する構造基盤を得ることを目的とした。Eg5モータードメインについて新規阻害剤との複合体のX線結晶解析と、等温滴定型カロリメトリーによる熱分析を行い、その阻害機構を解明した。CENP-Eのモータードメインについて先行研究より高分解能での構造決定を行い、構造の詳細について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂期特異的なキネシンモータータンパク質CENP-EやEg5とそれらの阻害剤との複合体構造解析による、阻害剤の結合阻害の機構を解明することで、新規な抗がん剤を設計する構造基盤が得られた。既存のタキサン、ビンカルカロイドなどの微小管阻害剤と異なり、キネシンモーターの阻害剤は非分裂期の微小管には作用しないため、副作用の少ない抗がん剤のリード化合物として期待できる。

研究成果の概要(英文)： In this study, I tried to determine the structures of the mitotic kinesin Eg5 and CENP-E and the complexes with their inhibitors were determined to elucidate the binding and inhibition mechanisms of the inhibitors and to develop novel anti-cancer drugs. For Eg5 motor domain, I performed X-ray crystal structure determination and isothermal titration calorimetry analyses, and elucidated the inhibition mechanisms. For CENP-E motor domain, I determined the crystal structure in higher resolution than the previous report, and elucidate the structural feature.

研究分野：構造生物学

キーワード：X線結晶構造解析 等温滴定型カロリメトリー キネシンモーター 阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

CENP-E もしくは Eg5 は双極性紡錘体の形成に関わるキネシン様の ATP 駆動性モータータンパク質である。CENP-E や Eg5 の機能阻害により細胞分裂が停止し、さらに細胞死が誘導される。CENP-E や Eg5 の阻害剤は非分裂期の微小管には作用しないため、既存のタキサン、ピンカアルカロイドなどの微小管阻害剤に比べ、神経毒性の少ない細胞分裂阻害剤として、すなわち副作用の少ない抗がん剤の候補として期待される。静岡県立大学 創薬探索センター 浅井章良 教授らの研究グループでは CENP-E や Eg5 のモータードメインに阻害作用を示す化合物をこれまで合成している。

申請者らはこれまでに Eg5 モータードメインと ATP 競合阻害剤である PVZB1194 との複合体構造を決定した。それまでに報告されていた Eg5 と阻害剤との複合体構造は、いずれも ATP 不競合阻害剤についてのものであったが、決定した PVZB1194 複合体構造では、阻害剤 PVZB1194 はこれまで報告されている ATP 不競合阻害剤の結合部位とは異なる部位に結合しており、ATP 競合阻害様式を示すにもかかわらず ATP 結合部位とは異なる部位に結合していた。

さらに申請者らはこれまでに ATP 不競合阻害剤で S-trityl-L-cysteine (STLC) アナログである PVEI21 や PVEI138 と Eg5 モータードメインとの複合体構造を明らかにした。STLC に対し、PVEI21 はメトキシ基を導入したもので、PVEI138 ではエチレンリンカーを導入してトリチル基間の運動性を低下させたものである。STLC に対し、PVEI21 は 10 倍、PVEI138 はさらに 10 倍、酵素阻害濃度  $IC_{50}$  値が向上する。これらの Eg5 との複合体構造を決定し、阻害剤結合部位を詳細に比較したところ、PVEI21 は STLC に比べ、メトキシ基導入により近辺の残基との立体反発により化合物全体がメトキシ基と反対方向に移動することで、メトキシ基と反対側近辺のアミノ酸側鎖との相互作用が増加することが分かった。このような阻害機構を阻害剤複合体構造を決定することにより明らかにすることができた。

CENP-E は、Eg5 とは異なるタイプのキネシンモータータンパク質である。Eg5 の阻害剤や、阻害剤複合体についてはこれまで多数の報告があるが、CENP-E については、ADP、 $Mg^{2+}$  結合構造が X 線結晶構造解析で報告されているが、阻害剤との複合体構造はこれまで明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

細胞分裂期特異的なキネシンモータータンパク質である CENP-E や Eg5 とそれらの阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析と熱分析を行うことにより、CENP-E や Eg5 の阻害剤による結合と阻害の様式を解明することで、新規な抗がん剤を設計する構造基盤を得ることを目的とした。それによりさらに阻害能を向上させた新規化合物を設計することが可能になると期待できる。本研究では、以上の目的のため、CENP-E や Eg5 のモータードメインの調製と阻害剤との複合体の結晶化を行い、良質な結晶を得て X 線結晶構造解析を行った。またそれらモータードメインと阻害剤の熱分析を行った。

## 3. 研究の方法

キネシンモータータンパク質 CENP-E や Eg5 のそれらの阻害剤による阻害機構を解明することを目的として、それら複合体の X 線結晶構造解析と熱分析を行った。

Eg5 モータードメインについては、その STLC 型阻害剤との複合体構造を決定した。また等温滴定型カロリメトリーにより Eg5 と STLC 型阻害剤との熱分析を行い、それらの解離定数と熱力学的パラメータを算出した。

CENP-E モータードメインについては、Eg5 と同様に発現プラスミドを用いた大腸菌発現系によるタンパク質調製を行った。タンパク質の精製は、His tag を利用した Ni affinity 精製、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより行った。タンパク質の調製後、阻害剤との結晶化を行った。

## 4. 研究成果

等温滴定型カロリメトリー (isothermal titration calorimetry, iTC200) により Eg5 モータードメインと S-trityl-L-cysteine (STLC) 型阻害剤との熱分析を行い、それらの解離定数と熱力学的パラメータを算出した。3 種の阻害剤について、エンタルピー項、エントロピー項に差異が得られ、それらの結合様式の違いが明らかになった。得られた結果とすでに明らかにしているこれらの複合体の X 線結晶項解析の結果を合わせて、論文にまとめた (Yokoyama *et al.* ACS Omega 2018)。

一方、ヒト CENP-E のモータードメイン (C 末に His tag を付与) について、大腸菌での

発現と精製 ( His tag を利用した Ni affinity 精製、イオン交換カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー ) を行った。このタンパク質は温度感受性が高いため、室温で変性しやすい傾向があったため常時低温での精製を行い、高純度の結晶化試料の調製に成功した。

得られる精製サンプルを用いて阻害剤との複合体の結晶化と放射光施設での X 線回折強度データの収集、分子置換法による構造解析を行った。決定した構造からは阻害剤の電子密度は確認できず、タンパク質発現時から内在性のヌクレオチド ( ADP ) が CENP-E モータードメインに結合しており阻害剤が結合できなかったことがその原因と考えられた。しかし 1.9 Å と先行研究より高分解能での構造決定を行うことができたので、構造の詳細について論文にまとめ、現在投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yokoyama Hideshi, Suzuki Kana, Hara Kodai, Matsui Ikuo, Hashimoto Hiroshi	4. 巻 76
2. 論文標題 Inactive dimeric structure of the protease domain of stomatin operon partner protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 515 ~ 520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2059798320005021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Hideshi, Mizutani Ryuta, Noguchi Shuji, Hayashida Naoki	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural and biochemical basis of the formation of isoaspartate in the complementarity-determining region of antibody 64M-5 Fab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54918-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Hideshi, Matsui Ikuo	4. 巻 46
2. 論文標題 The lipid raft markers stomatin, prohibitin, flotillin, and HflK/C (SPFH)-domain proteins form an operon with NfeD proteins and function with apolar polyisoprenoid lipids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Critical Reviews in Microbiology	6. 最初と最後の頁 38 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1040841X.2020.1716682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Hideshi, Sawada Jun-ichi, Sato Kohei, Ogo Naohisa, Kamei Nanami, Ishikawa Yoshinobu, Hara Kodai, Asai Akira, Hashimoto Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Structural and Thermodynamic Basis of the Enhanced Interaction between Kinesin Spindle Protein Eg5 and STLC-type Inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 12284 ~ 12294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.8b00778	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Yosuke, Yokoyama Hideshi, Matsui Ikuo, Miyazaki Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular Modeling and Simulation of Human Stomatin and Predictions for its Membrane Association	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2153-0602.1000216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Hideshi, Mizutani Ryuta, Noguchi Shuji, Hayashida Naoki	4. 巻 75
2. 論文標題 Structures of the antibody 64M-5 Fab and its complex with dT(6?4)T indicate induced-fit and high-affinity mechanisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications	6. 最初と最後の頁 80~88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18017661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara, K., Taharazako, S., Ikeda, M., Fujita, H., Mikami, Y., Kikuchi, S., Hishiki, A., Yokoyama, H., Ishikawa, Y., Kanno, SI., Tanaka, K., Hashimoto, H.	4. 巻 292
2. 論文標題 Dynamic feature of mitotic arrest deficient 2-like protein 2 (MAD2L2) and structural basis for its interaction with chromosome alignment-maintaining phosphoprotein (CAMP).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 17658-17667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.804237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hara, K., Uchida, M., Tagata, R., Yokoyama, H., Ishikawa, Y., Hishiki, A., Hashimoto, H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Structure of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bound to an APIM peptide reveals the universality of PCNA interaction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Crystallog. F	6. 最初と最後の頁 214-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2053230X18003242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小松友哉、松井郁夫、横山英志
2. 発表標題 全長構造解析を目的とする膜タンパク質ストマチンの調製と結晶化
3. 学会等名 第63回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口翔太郎、横井健汰、青木伸、横山英志
2. 発表標題 Ir(III)錯体との複合体構造解析のためのカルモジュリンの調製と結晶化
3. 学会等名 第63回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 キネシンCENP-Eと阻害剤の複合体の結晶化と構造解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Shibuya, Naohisa Ogo, Jun-ichi Sawada, Akira Asai, Hideshi Yokoyama
2. 発表標題 Crystallization and structure determination of CENP-E motor domain
3. 学会等名 6th International Symposium on Diffraction Structure Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideshi Yokoyama, Kana Suzuki, Kodai Hara, Ikuo Matsui, Hiroshi Hashimoto
2. 発表標題 Inactive dimer structure of the protease domain of stomatin operon partner protein
3. 学会等名 6th International Symposium on Diffraction Structure Biology 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松友哉、荻野早織、松井郁夫、横山英志
2. 発表標題 脂質ラフト局在膜タンパク質ストマチンの調製と結晶化
3. 学会等名 日本結晶学会 令和元年度年会および総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 阻害剤を添加したCENP-Eモータードメインの結晶構造解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻井ひとみ、原幸大、内藤麻里奈、菱木麻美、石川吉伸、横山英志、橋本博
2. 発表標題 細胞周期チェックポイントに関わる9-1-1複合体の調製と生化学的解析
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 キネシン CENP-E モータードメインの発現、精製及び結晶化
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 染色体の整列に関わるキネシンCENP-Eモータードメインの調製と結晶化
3. 学会等名 第62回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 キネシン CENP-E モータードメイン・リガンド複合体の結晶化
3. 学会等名 日本結晶学会 2018年度年会および総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渋谷明日香、小郷尚久、澤田潤一、浅井章良、横山英志
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 亀井七海、横山英志、小西佳史郎、原幸大、石川吉伸、松井郁夫、Patrick Forterre、橋本博
2. 発表標題 古細菌由来ペプチド輸送タンパク質の構造とペプチド認識機構
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考