

Terpendole E の KSP 阻害機構解析

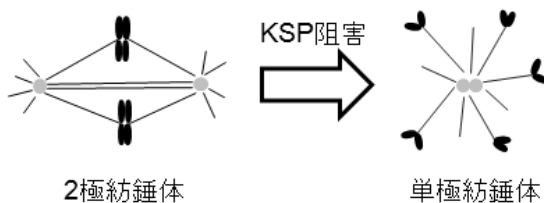
佐藤 功宗 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 臼井 健郎 (筑波大学 生命環境系)

背景および目的

現在臨床でよく使われる抗がん剤として微小管作用薬がある。その標的分子である微小管は細胞分裂期に紡錘体を形成するが、微小管作用薬により紡錘体形成に異常が生じた場合、紡錘体チェックポイントが活性化し、細胞周期の進行が停止する。この時、正常細胞では細胞周期進行が停止したままであるが、多くの腫瘍細胞では、紡錘体チェックポイントは活性化するものの細胞分裂は進行し、やがてアポトーシスにより腫瘍細胞特異的な細胞死が誘導される。一方、微小管作用薬は細胞内物質輸送など、間期の微小管機能も阻害してしまうため、末梢神経痛といった副作用を引き起こすことが知られている。そのため分裂期特異的な微小管阻害剤の開発が求められている。

KSP (Kinesin Spindle Protein、別名 Eg5) は、2つの中心体から逆平行に伸びる微小管を架橋し、+端方向へ移動するキネシンタイプのモータータンパク質である。分裂期に中心体(一端)から、微小管先端(+端)へ微小管上を移動することにより、2つの中心体を分離し、正常な2極の紡錘体を形成させる。そのためKSPを阻害すると中心体は分離出来ず、極を1つしか持たない異常な紡錘体(単極紡錘体)が作られる。



単極紡錘体は、微小管阻害剤を処理した細胞の紡錘体と同様、紡錘体チェックポイントを活性化し、腫瘍細胞特異的なアポトーシスを誘導する²⁾。さらにKSPは分裂期特異的に活性化するため、間期の微小管機能にはほとんど影響を与えないと考えられている。以上のことからKSP阻害剤は既存の微小管作用薬と比較して副作用の少ない抗がん剤になると考えられており、盛んに開発が行われている。

Terpendole Eは天然物由来のKSP阻害剤として初めて発見された化合物である³⁾。しかしながら、薬剤結合部位や阻害機構に関しては不明のままである。そこでterpendole EのKSP阻害機構を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. KSP モータードメイン の精製

GST タグを融合した KSP のモータードメインを大腸菌発現し、Glutathione Sepharose を用いて精製した。

2. KSP の ATPase 活性測定

KSP は ATP の加水分解によるエネルギーを用いて微小管上を+端方向へと移動する。そのため KSP のモーター活性は ATP 分解によって生じたリン酸量を定量化することで測定することができる。そこで、薬剤存在下、KSP、ATP、微小管を 30°C

で6分間反応させ、放出されたリン酸量を Malachite Green を用いて定量することで、KSPの微小管依存的ATPase活性に対する薬剤の阻害効果を検討した。

結果および今後の展望

詳細は発表会にて紹介する。

Reference

- 1) LC. Kapitein, EJ. Peterman, BH. Kwok, JH. Kim, TM. Kapoor and CF. Schmidt "The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks." *Nature*, **435**, 114-118 (2005)
- 2) W. Tao, VJ. South, Y. Zhang, JP. Davide, L. Farrell, NE. Kohl, L. Sepp-Lorenzino and RB. Lobell "Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage." *Cancer Cell*, **8**, 49-59 (2005)
- 3) J. Nakazawa, J. Yajima, T. Usui, M. Ueki, A. Takatsuki, M. Imoto, YY. Toyoshima and H. Osada "A novel action of terpendole E on the motor activity of mitotic kinesin Eg5." *Chem. Biol.*, **10**, 131-137 (2003)