

## Terpendole E の作用機構解析

関口 尚樹 (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・目的

細胞は正しい増殖のため、いくつかのチェックポイントにより細胞周期を厳密に制御している。その一つに、分裂期中期に染色体整列の遅延や紡錘体構造の異常が起きた際に活性化し、細胞周期進行を停止させる紡錘体チェックポイント (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) がある。SAC の活性化は微小管作用薬の抗腫瘍活性に重要なメカニズムであり、現在臨床で抗がん剤として用いられている微小管作用薬である taxane 類や, vinca alkaloid 類は、いずれも紡錘体構造を破壊し SAC を活性化する。SAC の活性化は正常な細胞では細胞周期の停止を引き起こすが、多くの腫瘍細胞では SAC が活性化するにも関わらず分裂が進行するため、細胞死が誘導され、抗腫瘍活性を示す。しかしながら微小管作用薬の多くは細胞内物質輸送などの間期微小管機能も阻害してしまうため、末梢神経痛などの副作用が問題となっている。

KSP (Kinesin Spindle Protein, Eg5) は N 末端にモータードメインを有する単量体からなるホモテトラマーであり、両極に 2 つずつモータードメインを向けた構造をとっている。この構造により、KSP は二つの中心体から伸びる逆平行な微小管と結合し、それぞれの微小管の一端側から + 端側に移動することで、中心体を引き離し、二極紡錘体形成を誘導する。そのため KSP 阻害は中心体の不分離による単極紡錘体形成を引き起こし (Fig. 1)<sup>1)</sup>、SAC を活性化する。さらに KSP は分裂期特異的に機能することや、KSP 特異的阻害剤は微小管に作用しないことから、これまでの微小管作用薬で問題とされていた末梢神経痛などの副作用を防ぐことができると考えられる。以上のことから KSP 阻害剤は副作用の少ない有望な抗がん剤として開発が進められている。

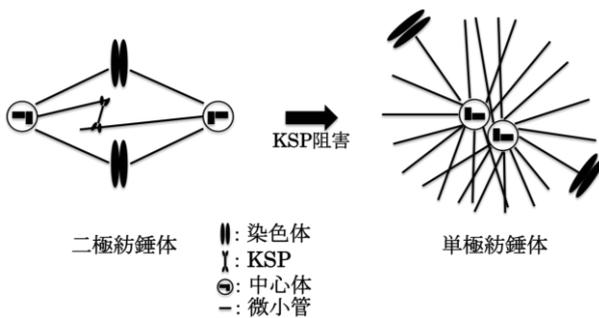


Fig. 1 KSP 阻害による単極紡錘体形成

Terpendole E (TerE, Fig. 2) は糸状菌 *Tolyocladium album* から単離された小分子化合物であり、KSP 阻害剤としては初の天然由来物質である<sup>2)</sup>。TerE は既存の KSP 阻害剤 (Strityl-L-cysteine, GSK-1) に耐性を示す変異 KSP に対しても野生型 KSP に対してと同程度の阻害活性を示す。このことから、TerE は既存の KSP 阻害剤とは薬剤結合部位が異なると考えられるが<sup>3)</sup>、TerE の薬剤結合部位は未だ明らかになっていない。そこで、TerE が結合する可能性のあるアミノ酸残基に変異を導入した KSP に対する TerE の KSP 阻害活性を、野生型 KSP に対する阻害活性と比較することで、TerE の KSP 結合部位の検討を行うこととした。

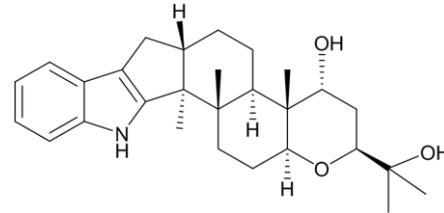


Fig. 2 Terpendole E (Ter E) の構造

### 方法

#### 1. KSP モータードメインの精製

His-tag 融合 KSP (野生型及び変異型) モータードメインを発現する pET21b 由来プラスミドを、大腸菌株 BL21(DE3) に導入した。遺伝子導入された大腸菌を、Ampicillin を含む液体培地で対数増殖期まで培養した後、培地中に isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside を添加することで T7 RNA ポリメラーゼを介した His-tag 融合 KSP モータードメインの発現を誘導した。大腸菌を破碎し、アフィニティ担体と混ぜ合わせて KSP モータードメインの His-tag と担体の Ni<sup>2+</sup> を結合させ、imidazole で溶出することで精製を行った。

#### 2. KSP の ATPase assay

モータータンパク質の運動は ATP の加水分解で生じるエネルギーを利用しているため、ATP の加水分解によって遊離した無機リン酸を定量することで KSP のモーター活性を測定することができる。

そこで TerE 存在下、KSP、微小管、ATP を混ぜ、30°C、6 分間反応させ、遊離した無機リン酸を Malachite Green Buffer (0.2 % Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.03 % Malachite Green Oxalate, 0.05 % Triton X-100, 0.7 M HCl) を用いて測定した。

### 結果・考察

詳細は発表会にて紹介する。

### 参考文献

- 1) T. U. Mayer *et al.*, Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype Based Screen. *Science*, **286**, 971-974 (1999)
- 2) J. Nakazawa *et al.*, A Novel Action of Terpendole E on the Motor Activity of Mitotic Kinesin Eg5. *Chem. Biol.*, **10**, 131-137 (2003)
- 3) Y. Tarui *et al.*, Terpendole E and its Derivative Inhibit STLC- and GSK-1-Resistant Eg5. *ChemBioChem*, **15**, 934-938 (2014)