

ヒト由来腎臓型グルタミナーゼの大腸菌を用いた組換え大量生産

日大生産工(院) ○中久喜 隆輔 日大生産工 吉宗 一晃

1. 緒言

この40年の間、日本人の死因で最も多いのが癌である。癌研究では、癌細胞の代謝に焦点を当てた薬剤の開発が行われている。癌細胞は低酸素条件などの生育に不利な条件でも代謝系を変化させて生存できるものがある。例えば、低酸素条件では酸素を用いる好気呼吸を行う細胞小器官であるミトコンドリアにおけるアデノシン三リン酸 (ATP) 合成よりも、非効率な解糖系の利用を高めて ATP を産生する。酸素を使わない解糖系を亢進させた癌細胞ではグルコースを大量に取り込み、大量に乳酸を産生することで低酸素濃度でも生存できる様になる。さらに癌細胞には正常細胞よりも大きな増殖速度をもつものもあり、このような癌細胞は増殖速度を維持するためにエネルギーとして用いられる ATP を多量に必要とする。このため解糖系だけでなく、ミトコンドリアにおける ATP 産生も促進される。ミトコンドリアでの ATP 産生のために不足する代謝物質を補うためにタンパク質の構成成分であるアミノ酸の一種であるグルタミン酸を取り込み、ミトコンドリア内での ATP 合成に必要な代謝経路であるクエン酸回路の代謝物質である α -ケトグルタル酸を補充する。 α -ケトグルタル酸はクエン酸回路で二酸化炭素等に代謝され、得られる還元力を使って ATP が合成される。このためグルタミンは癌細胞の重要なエネルギー源の一つとなる。癌細胞のミトコンドリアでは過剰な膜電位の上昇や活性酸素の発生も引き起こされる。この酸化還元状態を維持するために、癌細胞は活性酸素種から細胞を保護する働きのあるグルタチオンを多く生産する。グルタチオンはグルタミン酸、システイン及びグリシンから構成されるトリペプチドで抗酸化物質の

一つであり、癌細胞ではグルタチオンの材料となるグルタミンやシステインを過剰に取り込む。

この様に癌細胞は正常細胞と比較して代謝経路を変化させ、生育に不利な環境での生育やその大きな増殖速度の維持に対応している。この変化の一つにグルタミンを過剰に取り込むグルタミノリシスが知られている。グルタミノリシスではグルタミンを分解し、癌細胞の生育に必要な様々な物質に代謝している。このグルタミノリシスの最初の過程がグルタミナーゼによるグルタミンの加水分解である。グルタミナーゼはグルタミンと水からグルタミン酸とアンモニアを生成する反応を触媒するアミドヒドラーゼ酵素の1つであり、多くの生物に存在している。

ヒトは腎臓型 (GLS) と肝臓型 (GLS2) の2つのグルタミナーゼ遺伝子をもつ。GLS 遺伝子は様々な正常細胞でも生産されるのでより重要な働きを持つと考えられ、腎臓において生成するアンモニアによって pH を維持する働きが報告されている。さらに乳がんなどの癌細胞の一部では酵素活性の阻害によってその生育を抑制できることが報告されている。GLS2 は主に肝臓で発現し、尿素サイクルで窒素源を供給していると考えられている。GLS 遺伝子からはそれら C 末端の長さが異なる GAM, GAC 及び KGA の3種のグルタミナーゼが生産され、GAC と KGA がグルタミナーゼ活性を有する。これまでにこれらグルタミナーゼの阻害剤が多数報告されている。ヒトグルタミナーゼの活性中心に不可逆的に結合する 6-diazo-5-oxo-L-noeleucine (DON) は強力な阻害剤であるが、グルタミンに結合する他の酵素も阻害してしまうため、毒性が非常に高く治療薬として向かな

Overproduction of glutaminase from human in recombinant *Escherichia coli*

Ryusuke NAKAKUKI, Kazuaki YOSHIMUNE

い。 Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES)は二量体のグルタミナーゼ同士の接触面に可逆的に結合し、不活性型の四量体を安定化させて阻害する。この様な活性中心に結合しない阻害剤は、グルタミナーゼ活性のみを特異的に阻害し、他のグルタミン結合酵素を阻害しないので、治療薬の候補となりうる。この様な阻害剤の探索を目的として、大腸菌による GAC 及び KGA の組換え生産を試みたので報告する。

2. 実験方法

2-1 クローニングおよび酵素精製

GAC(1591 bp)のcDNAを人工合成し、GAC遺伝子およびKGA(1567 bp)それぞれの遺伝子をPCRで増幅した。得られたPCR産物を発現ベクターpET101に挿入し、大腸菌JM109を形質転換した。遺伝子の挿入は目的遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRにより確認した。

クローニングされたプラスミドDNAで大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、試験管培養を行った。遺伝子の発現誘導はイソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)の添加により行った。IPTG添加は培養開始直後もしくは集菌3時間前に行った。培養後、集菌体に10 mM Tris溶液を加え超音波破碎を行い、上澄み液のグルタミナーゼ活性を測定した。大量培養(2 L)した組換え酵素はDEAE-TOYOPEARLを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーをおこない、部分精製も試みた。

2-2 グルタミナーゼ活性測定

基質30 mMグルタミンを緩衝液中で酵素と30°Cで10分間反応させた。生成したグルタミン酸はグルタミン酸脱水素酵素及びヒドラジン存在下でNADと反応させることで生成されるNADHの吸光度を分光光度計により、測定波長340 nmで測定を行った。酵素活性は1分間に1 μmolのグルタミン酸を生成する酵素量を1 Uとした。タンパク質濃度はBCA法により定量し、ウシ血清アルブミンを標準とした検量線を用いて計算した。

3. 結果および考察

組換えGACは培養開始直後に0.1 mM IPTGを添加した場合が最も比活性が高くなった(0.46 U/mg)。一方で組換えKGAの発現量は集菌3時間前に0.1 mM IPTGを添加した際に最も高くなり、比活性は2.6 U/mgとなった。

グルタミナーゼ遺伝子を持たない発現ベクターで形質転換した宿主大腸菌から得られる無細胞抽出液の比活性は0.3 U/mgであったことから、組換えKGAが生産されたと考えられる。組換えGACについては発現に適した培養条件の検討が必要である。

組換えKGAはDEAE-TOYOPEARLに結合し、250 mM NaCl及び10 mM Tris (pH 7.5)を含む溶液で溶出された。

4. 参考文献

- 1) William, P. *et al. Future Med Chem*, **2017**, *9*, 223-243
- 2) Tianyu, H. *et al. Cell Research*, **2018**, *28*, 655-669
- 3) Ren, L. *et al. Can & Met*, **2020**, *8*, 1-13
- 4) Jon, W. *et al. Oncotarget*, **2010**, *8*, 734-40
- 5) Ahmad, A. *et al. Trends Cancer*, **2017**, *3*, 169-180
- 6) Michael, J. *et al. Future Med Chem*, **2013**, *14*, 1685-700