

ヒト由来腎臓型グルタミナーゼの組換えタンパク質生産と精製

日大生産工(院) ○村山由一、吉宗一晃

1. 緒論

癌は日本における死因第1位の疾患であり、効果的な治療法や治療薬の開発が求められている。近年では、癌細胞の増殖に関与している分子を標的とした治療薬の研究開発が盛んに行われている。

癌細胞は制御されることなく増殖し、浸潤と転移を繰り返している。そのため、通常細胞と比較して多量のエネルギーを必要としている。癌細胞ではグルコースの取り込みと解糖系でのエネルギー産生が亢進しており、グルコースは好氣的解糖系によって優先的に消費され、乳酸へと変換される。これは癌の特徴的な代謝形態である¹⁾。癌細胞は好氣的解糖系で発生する乳酸によって腫瘍環境のpHを酸性にすることで、浸潤や転移を促進している²⁾。

癌細胞では乳酸発酵だけでなく酸化リン酸化によるATPの産生も行っている。TCAサイクルの主要な炭素源はグルコース代謝産物のピルビン酸である。しかしほとんどの癌細胞では、グルコース由来の炭素源が失われた場合でもTCAサイクルが機能し続けていることが明らかになっている³⁾。癌細胞は不足する炭素源を補うために、グルタミノリシスと呼ばれるグルタミン代謝経路を活用している。グルタミノリシスでは、グルタミナーゼによって触媒される加水分解反応により、ミトコンドリア内でグルタミンをグルタミン酸に変換する。グルタミン酸は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) によって、TCAサイクルの中間生成物である α -ケトグルタル酸に変換される。癌細胞は、グルタミノリシスで合成される α -ケトグルタル酸をTCAサイクルに組み込むことで、ATPの産生を行っている。また、 α -ケトグルタル酸は、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH)1 及び、IDH2 によって触媒される還元性のカルボキシル化反応によってクエン酸にも変換される。

クエン酸はミトコンドリアを出て、細胞膜の合成に必要な脂肪酸の合成に利用される。さらに、グルタミン由来のグルタミン酸は、グルタチオンの合成にも寄与している。グルタチオンは活性酸素種によって引き起こされる損傷から癌細胞を保護する細胞内抗酸化物質としての役割を持っている⁴⁾。

このように、癌細胞はグルタミノリシスを利用することで生存に有利な環境を構築している。グルタミノリシスにおいて、グルタミンをグルタミン酸に加水分解する重要な役割を担う酵素がグルタミナーゼである。近年では、グルタミナーゼは分子標的抗癌薬の開発における標的分子として注目されている。実際にグルタミナーゼを阻害することで癌細胞の増殖を抑制できることが明らかとなっている⁵⁾。

哺乳類には、GLSとGLS2の2つのグルタミナーゼ遺伝子が存在する。GLS遺伝子は、C末端領域のみが異なる2つのアイソフォームを生成し、C末端が短い方はグルタミナーゼC(GAC)、C末端が長い方は腎臓型グルタミナーゼ(KGA)と呼ばれている⁶⁾。KGAは肝臓を除くすべての臓器で発現しており、特に脳や腎臓で強く発現している。GACは脳や肝臓では発現せず、主に脾臓や腎臓、肺で発現している⁷⁾。GLS2遺伝子からは、肝臓型グルタミナーゼ(LGA)とグルタミナーゼB(GAB)の2つのグルタミナーゼが生成される。GLS2は腫瘍抑制因子と考えられており、創薬研究の対象とはほとんどみなされていない。一方のKGA及び、GACは多くの種類の癌における発癌促進物質であり、抗癌標的になり得る重要なアイソフォームである。

これまでにいくつかのGLS阻害剤が報告されている。その1つである Bis-2-[5-(phenylacetamido)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]ethyl sulfide (BPTES)は強力なアロステリック阻害剤であり、KGA及び、GACの不活性化四量体を安定化させることで、その酵素活性を阻害する。BPTESは小細胞肺癌、腎細胞癌、乳癌など、様々な腫瘍モデルにおける癌細胞の増殖を抑制することが示されている。しかし、水溶性の

- Production and purification of recombinant human kidney-type glutaminase -

Yuichi MURAYAMA, Kazuaki YOSHIMUNE

低さから、治療薬の開発には至っていない。⁸⁾ 同様なアロステリック阻害物質として、Telaglenastat (CB-839)が新たに有力視されており、第I~II相臨床試験段階まで研究が進んでいる⁹⁾。

本研究では、腫瘍形成を促進するGLS遺伝子によってコードされるKGAの阻害薬の開発を最終目的とし、新規の阻害物質の探索及び、それらの阻害能力の調査を行うべく、KGAの組換えタンパク質生産と精製を行ったのでそれを報告する。

2. 実験方法および測定方法

2-1 組換えタンパク質生産と精製

KGA 遺伝子が挿入された発現プラスミドで大腸菌 BL21(DE3)株を形質転換した。形質転換体を、アンピシリンを含む 5 mL の LB 液体培地で 37°C、150 rpm の条件で 8 時間培養した。培養液を、アンピシリンを含む新しい 500 mL の LB 液体培地に加え、37°C、150 rpm の条件で一晩培養した。翌日、Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を終濃度 0.2 mM で培地に添加し、37°C、150 rpm で 3 時間培養して遺伝子発現を誘導した後、4°C、5000 rpm で 20 分間遠心分離することで菌体を回収した。回収した菌体を 10 mM Tris に懸濁して超音波破碎をし、遠心分離を行うことで酵素液を得た。

得られた酵素液を精製するため、DEAE-TOYOPEARL 樹脂を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。洗浄した樹脂をカラムに充填し、平衡化バッファーとして 10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.5)で平衡化した。酵素液をカラムに添加してさらに平衡化バッファーを流した後、50 mM NaCl を含んだ 10 mM Tris-HCl 溶液(pH 7.5)を流し、さらに NaCl 濃度を上げながら目的タンパク質を溶出した。

2-2 グルタミナーゼ活性測定

グルタミナーゼ活性の測定は 2 段階の反応によって測定した。最初の反応では、リン酸緩衝液中でグルタミナーゼとグルタミンを 30°C で 10 分間反応させることで、グルタミナーゼによる加水分解によってグルタミンが

グルタミン酸に変換される。反応の 2 段階目では、1 段階目の反応で生成されたグルタミン酸をヒドラジン緩衝液中にて、G α DH 存在下で NAD と 30°C で 60 分間反応させた。グルタミン酸と NAD との反応によって α -ケトグルタル酸と NADH が生成する。ここで、 α -ケトグルタル酸をヒドラジンで還元して平衡を NADH が生成する方向へ傾けることで、グルタミン酸をすべて NADH に変換することができる。生成される NADH を測定波長 340 nm で吸光度測定することで、グルタミナーゼによってグルタミンから変換されたグルタミン酸の濃度を定量した。

3. 結果及び考察

大量培養した菌体から得られた酵素液の活性測定を行ったところ、比活性は 48 U/mg であった。グルタミナーゼ遺伝子を含まない菌体から得た酵素液での比活性 0.05 U/mg であったことから、組換え KGA が発現していると判断した。

組換え KGA のタンパク質溶出は 100 mM NaCl を含んだ 10 mM Tris-HCl 溶液(pH 7.5)で溶出された。

参考文献

- 1) Maria, V. L. *et al.* Trends Biochem Sci, **2016**, *41*, 211-218.
- 2) Joanne, R. D. *et al.* J Clin Invest, **2013**, *123*, 3685-3692.
- 3) William, P. *et al.* Future Med Chem, **2017**, *9*, 223-243
- 4) Ji, Z. *et al.* EMBO, **2017**, *36*, 1302-1315.
- 5) Zhao, C. *et al.* L Med Chem, **2019**, *62*, 589-603.
- 6) Binghua, L. *et al.* eBioMedicine, **2019**, *39*, 239-254.
- 7) Lu, D. *et al.* Brain Behav Immun, **2021**, *92*, 139-156.
- 8) Wei, Y. *et al.* Clin Transl Oncol, **2021**, *23*, 2253-2268.
- 9) Renna, C. *et al.* ACS Pharmacol. Transl. Sci., **2021**, *4*, 1849-1866.