

ヒト腎臓由来グルタミナーゼのリン酸イオンによる活性化の制御

日大生産工(院) ○村山由一 吉宗一晃

1. 緒論

日本において、癌は死因第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分子標的薬の研究開発が行われている。

増殖能力の高い癌細胞の中には、より多くのエネルギーを産生するために通常の代謝に加えてグルタミノリシスと呼ばれるグルタミン代謝経路を利用しているものがある。グルタミノリシスにおいて、その中心的な役割を担う酵素がグルタミナーゼである。グルタミナーゼはグルタミンをグルタミン酸に加水分解する。グルタミン酸は、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GfDH) 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。この様な癌細胞は、グルタミノリシスを介して合成される α -ケトグルタル酸を TCA サイクルに組み込むことで、ATP を過剰に産生している。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、細胞膜の合成に必要な脂肪酸の合成に利用される。加えて、グルタミン由来のグルタミン酸は、グルタチオンの合成の前駆物質ともなる。グルタチオンは、活性酸素種による過度の酸化ストレス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担っている¹⁾。

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。そのため、グルタミノリシスにてグルタミンを加水分解するグルタミナーゼは、分子標的抗癌剤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²⁾。

最近の研究では、グルタミナーゼの阻害は癌だけでなく、老化予防や改善にも効果があることが報告されている。老化細胞では、リソソーム膜に損傷が生じており、それによって細胞内の pH が低下すると、老化細胞はグルタミナーゼを過剰発現させる。グルタミナーゼがグルタミンを加水分解する過程ではアンモニアが生成される。老化細胞

はグルタミナーゼを利用してアンモニアを大量に作り出すことで、細胞内の pH が酸性側に傾かないように pH を制御し、細胞死のリスクを低減させている。そのため、グルタミナーゼの阻害は老化細胞の除去を誘発でき、加齢に伴う腎機能障害、肺線維症の改善が期待される³⁾。

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遺伝子がコードするグルタミナーゼにはC末端領域のみが異なる2つのアイソフォームが存在し、短いC末端を持つグルタミナーゼC(GAC)、長いC末端を持つ腎臓型グルタミナーゼ(KGA)がある⁴⁾。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、主に膵臓や腎臓、肺で発現している⁵⁾。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。KGA及び、GACは多くの種類の癌において発癌促進物質として機能しており、抗癌標的になり得る重要なアイソフォームである。一步のGLS2は腫瘍抑制因子と考えられており、創薬研究の対象にはされていない。

グルタミナーゼ阻害剤としては、Telaglenastat (CB-839)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン (DON)、ビス-2-(5-フェニルアセトアミド-1,3,4-チアジアゾール-2-イル) エチルスルフィド (BPTES)などが知られている。DONは特異性が低いいため、医薬品には不向きである⁶⁾。BPTESはKGAとGACのアロステリック部位に強く結合して不活性な四量体を安定化させることで酵素機能を阻害する。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が、溶解度の低さから、医薬品の開発には至っていない⁷⁾。CB-839はBPTESと同様な強力なアロステリック阻害剤である。CB-839はグルタミナーゼ阻害薬の開発におけるリード化合物としても有力視されており、CB-839自体は第Iから第II相臨床試験段階まで研究が進んでいる⁸⁾。

KGAには、基質結合部位を覆う蓋のような構造が存在する。この蓋構造は基質であるグルタミンと結合すると、活性部位を覆うように構造変化

する。これは閉じた蓋構造と呼ばれ、基質のグルタミンが結合部位に効果的に固定されており、基質に対して高い親和性状態である考えられている。そして、グルタミン酸に変換されると、生成物が放出される⁹⁾。そこで、KGAのペプチド断片が蓋構造に結合し、構造変化を抑制することで阻害できると考えた。

本研究では、KGAの阻害薬の開発を最終目的とし、KGAの組換えタンパク質生産と精製、新規の阻害物質の探索及び、新規阻害方法の確立を試みたのでそれを報告する。

2. 実験方法

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、135 rpmの条件で8時間振盪培養した。アンピシリンを含む新しい500 mLのLB液体培地に培養液を加え、37°C、135 rpmの条件で一晩振盪培養した。翌日、終濃度が0.5 mMとなるようにIsopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)を培養液に添加し、37°C、135 rpmで3時間振盪培養した。培養後、4°C、5000 rpmで20分間遠心分離して菌体を回収した。菌体を10 mM KPBに懸濁して超音波破碎し、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 KPB (pH 7.5)で平衡化した。酵素液をカラムに充填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 KPB 緩衝液(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。

次に Butyl-TOYOPEARL 樹脂を用いた疎水性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%飽和量の硫酸アンモニウムを含んだ10 mM KPB 緩衝液 (pH 7.5)で平衡化した。酵素液にも10%飽和量の硫酸アンモニウムを加え、カラムに充填した。平衡化バッファーを送液し、硫酸アンモニウム濃度を下げながら目的タンパク質を溶出した。

2-2 KGA の分解

KGA 40 μL に1000 μg/mL キモトリプシン5 μL と10 mM KPB (pH 7.5)を混合し、30°Cで15分反

応させた。エタノールで溶解した50 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 μL を混合液に加えて反応を停止させた。反応液を限外ろ過し、得られたKGAのペプチド断片を阻害剤として用いた。

2-3 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、グルタミナーゼとグルタミンを30°Cで10分間反応させた。2段階目の反応では、1段階目の反応液をヒドラジン緩衝液中にて、G6PDH存在下でNADと30°Cで60分間反応させた。生成されるNADHを測定波長340 nmで吸光度測定し、酵素活性を評価した。

3. 結果及び考察

KGAは50 mMリン酸緩衝液中での活性が、Tris 緩衝液中での活性と比較して約9倍高くなった。そのため、活性測定ではKPB緩衝液中で反応を行った。

KGAのペプチド断片を反応系に添加しない場合のKGAの比活性は6.15 U/mgであるのに対して、ペプチド断片を添加した場合の比活性は6.06 U/mgであった。このことから、キモトリプシンによる分解で得られたKGAペプチド断片には阻害効果はないと分かった。

より分解箇所が特異的なタンパク質分解酵素の選択、反応条件の見直しなどが必要であると考えた。また、構造変化に寄与しているペプチド鎖に対して特異的に結合するペプチドの設計も必要であると考えた。

参考文献

- 1) Zhang, J. *et al.* EMBO J., **2017**, *36*, 1302-1315.
- 2) Chen, Z. *et al.* J Med Chem., **2019**, *62*, 589-603.
- 3) Johmura, Y. *et al.* Science., **2021**, *371*, 265-270.
- 4) Li, B. *et al.* EBioMedicine., **2019**, *39*, 239-254.
- 5) Ding, L. *et al.* Brain Behav Immun., **2021**, *92*, 139-156.
- 6) Ahluwalia, G. *et al.* Pharmacol. Ther., **1990**, *46*, 243-271.
- 7) Yu, W. *et al.* Clin Transl Oncol., **2021**, *23*, 2253-2268.
- 8) Costa, R. *et al.* ACS Pharmacol. Transl. Sci., **2021**, *4*, 1849-1866.
- 9) Nguyen, T. *et al.* J Biol Chem., **2022**, *298*, 101564