ヒト由来腎臓型グルタミナーゼの精製方法の検討

日大生産工(院)○霜崎瑞月、吉宗一晃

1. 緒論

日本で最も多い死因として知られるがんによる死者数は年々増加していることから、その治療薬の開発が求められている。また、近年ではがん細胞の代謝において関与している分子をターゲットとした治療薬の研究開発が行われている。

がん細胞は、正常細胞とは異なる代謝様式を用いて生存に必要なエネルギーを産生している。がん細胞は、増殖速度を維持するために多量のATPが必要である。そのため解糖系だけではTCA回路の炭素源が足りなくなるため、グルタミノリシスと呼ばれる代謝経路を用いて過剰にATP産生を行っている。グルタミノリシスでは、血中に豊富に含まれるアミノ酸であるグルタミンがミトコンドリア内でグルタミナーゼによってグルタミン酸に加水分解される。グルタミン酸は、グルタミン酸脱水素酵素 (GluDH) によってTCA回路の中間生成物である α -ケトグルタル酸に変換され、ATP産生のための炭素源としてTCA回路に補充される。そのため、グルタミノリシスはがん細胞の生育に必要な不可欠である。また、グルタミノリシスにおける最初の段階であるグルタミンをグルタミン酸に加水分解する酵素であるグルタミナーゼはがん細胞の生育において重要な働きをする。そのため、グルタミナーゼを阻害することでがん細胞の増殖を抑制できることがわかっている¹⁾。

哺乳類にはGLS1およびGLS2の2つのグルタミナーゼ遺伝子が存在する。GLS1からはC末端の長さが異なる2つのグルタミナーゼを産生される。C末端が短い方はグルタミナーゼC (GAC) と呼ばれ、主に膵臓や腎臓、肺において発現している。C末端が長い方は腎臓型グルタミナーゼ (KGA) と呼ばれ、肝臓を除くすべての臓器で発現しており、特に腎臓や脳において強く発現している。GLS2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産生される。GLS1は多くの種類のがんにおいて腫瘍促進因子として働くのに対し、GLS2は腫瘍抑制因子として考えられている²⁾。このことから、GLS1から産生されるGAC及びKGAを標的とした阻害剤の開

発が盛んに行われている。また、グルタミナーゼは主に二量体または四量体として存在し、無機リン酸のような陰イオン活性化因子によって四量体を形成することで触媒活性を示すことがわかっている³⁾。

現在までにGLS1が産生するグルタミナーゼに対する阻害剤が多数報告されている。6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) はグルタミナーゼの活性中心に不可逆的に結合する強力な阻害剤として知られている。しかし、グルタミノリシスだけでなく、他の代謝経路で用いられるグルタミナーゼも阻害してしまうため、治療薬としては向いていない。Bis-2-[5-(phenylacetamido)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]ethyl sulfide (BPTES) は、グルタミナーゼの不活性四量体を安定化するアロステリック阻害剤である。しかし、水溶性や薬物動態学的特性が低く治療薬の開発には至っていない。Telaglenastat (CB-839) はBPTESと同様のアロステリック阻害剤であり、現在臨床試験で用いられている唯一の阻害剤である⁴⁾。

近年、GLS1が老化細胞の生存に必須な因子であることが明らかになった。老化細胞を選択的に除去することをセノリシスという。GLS1が産生するグルタミナーゼに対する阻害剤はセノリシスを可能にし、様々な加齢現象や老齢病、生活習慣病の予防・治療薬の開発につながる事が期待される⁵⁾。

酵素の機能を調査していく研究を行う上で、組換えタンパク質の精製方法を適切に選択することは重要である。また、精製方法を組み合わせることにより、高純度な目的タンパク質を得ることができる。イオン交換クロマトグラフィーは、電気的な性質によりタンパク質を分離する方法である。タンパク質は全体として電荷を持っているため、反対の電荷を持つ担体に結合させることができる。溶媒の塩濃度を高くしていくと、イオン結合が弱くなっていき、結合力の弱いタンパク質から分離されていく。疎水クロマトグラフィーは、多くのタンパク質に存在する疎水性アミノ酸残基と担体との疎水性相互作用を利用して分離する方法である。タンパク質は硫酸アンモニウムなどの高濃度の塩を

含む溶液存在下で担体に吸着され、塩濃度を下げていくことで目的のタンパク質を分離することができる。Hisタグタンパク質精製はタンパク質のHisタグと樹脂に担持されている金属イオンが結合することを利用した方法である。ヒスチジンによく似た構造をもつイミダゾールを加えることで目的のタンパク質を分離することができる。代表的なレジンとしてコバルトをベースとしたものがあり、目的のタンパク質を高純度に精製することが可能である。

本研究では、がん細胞および老化細胞の生育を促進するGLS1遺伝子が産生するKGAに対する阻害剤の探索やその阻害機構の解析を行うために、KGAの組換えタンパク質を生産し、より高純度な酵素を得ることができる精製方法についての検討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および精製

KGA遺伝子が挿入された発現プラスミドを用いて、*Escherichia coli* BL21を形質転換した。形質転換した大腸菌 (*E.coli*) を終濃度0.1 mg/mLのAmpicillin (Amp) を含む5 mLのLB液体培地が入った試験管に植菌し、37°C、115 rpmで8時間振盪培養を行った。終濃度0.5 mg/mLのAmpを含む500 mLのLB液体培地が入った三角フラスコに試験管に入っている培養液を注ぎ、37°C、115 rpmで一晩振盪培養を行った。翌日、終濃度が0.2 mMとなるようにIsopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を培養液に加え、37°C、115 rpmで3時間振盪培養し、遺伝子発現を誘導した。培養液を3本の遠心ボトルに均等に分け、4°C、5000 rpmで20分間遠心分離を行い、菌体を回収した。回収した菌体1 gに対して5 mLの10 mM KPB (pH7.5) を加えて懸濁し、超音波破碎を行った。超音波破碎した溶液は10000 $\times$ gで15分間遠心分離を行い、上澄みを酵素液として回収した。

得られた酵素液は、陰イオン交換樹脂 (DEAE TOYOPEARL) を用いて精製を行った。洗浄した樹脂をカラムに充填し、10 mM KPB (pH7.5) で平衡化した後、酵素液を流し込んだ。10 mM KPB (pH7.5) を流し続け、OD₂₈₀で吸光度が0.01以下になったら、10 mM KPB (pH7.5) を含む50 mM NaClを流し、NaClの濃度を徐々に上げながら溶出を行った。

さらに、疎水クロマトグラフィー用樹脂 (Butyl TOYOPEARL) を用いて精製を行った。洗浄した樹脂をカラムに充填し、10 mM KPB (pH7.5) を含む10%硫酸アンモニウムで平衡

化した後、酵素液にも10 mM KPB (pH7.5) を含む10%硫酸アンモニウムを加えた状態で、カラムに流し込んだ。10 mM KPB (pH7.5) を含む10%硫酸アンモニウムを流し続け、OD₂₈₀で吸光度が0.01以下になったら、硫酸アンモニウムの濃度を徐々に下げながら溶出を行った。

また、上記の精製とは別にKGAのC末端にHisタグを導入し、TALON Metal Affinity Resinを用いた固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによる精製を行った。洗浄したレジンをカラムに充填し、10 mM KPB (pH7.5) で平衡化した後、酵素液を流し込んだ。10 mM KPB (pH7.5) を流し続け、OD₂₈₀で吸光度が0.01以下になったら、10 mM Tris-HClを含む250 mMイミダゾール (pH7.5) を流して溶出を行った。溶出液は10 mM KPB (pH7.5) で透析を行った。

2-2 グルタミンナーゼ活性測定

活性測定は2段階の反応で測定した。最初はKPB存在下においてグルタミンとグルタミンナーゼを30°Cで10分間反応させ、100°Cで3分間加熱して反応を停止させた。次に、反応液をNAD、G α DH、トリスヒドラジン緩衝液を含む溶液に加え、30°Cで1時間反応させた。生成したNADHを測定波長340 nmで吸光度測定することでグルタミン酸の濃度を定量し、活性を算出した。酵素活性は1分間に1 μ molのグルタミン酸を生成する酵素量を1 Uとした。

3. 結果及び考察

培養した菌体から得られた酵素液の比活性は、27 U/mgであった。陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した酵素液の比活性は120 U/mgであり、さらに疎水クロマトグラフィーにより精製した酵素液の比活性は160 U/mgであった。Hisタグ精製を行った酵素液の比活性は204 U/mgであった。以上の結果から、Hisタグ精製は、1ステップで高純度の目的タンパク質を得ることが可能であることがわかった。

参考文献

- 1) Jin, L. *et al. Oncogene*, 2016, 14, 3619-3625
- 2) Binghua, L. *et al. eBioMedicine*, 2019, 39, 239-254
- 3) Feng, S. *et al. Nat Commun*, 2024, 15, 1971
- 4) Wei Yu. *et al. Clinical and Translational Oncology*, 2021, 23, 2253-2268
- 5) Johmura, Y. *et al. Science*, 2021, 371, 265-270