

ヒト由来腎臓型グルタミナーゼのATPによる活性化を抑制するアデノシンの効果

日大生産工(院)◦霜崎瑞月、吉宗一晃

1. 緒論

がんは現在日本で最もも多い死因として知られており、厚生労働省によると令和6年では全死亡者に占める割合が23.9%である。そのため早急ながん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関与している分子をターゲットとした治療薬の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経路を用いて絶えず増殖するために必要なエネルギーを産生している。一般に哺乳動物の細胞では、好気条件下において、解糖系で生じるピルビン酸がミトコンドリアのTCAサイクルに入り、產生されたNADHを用いて電子伝達系でエネルギー分子であるATPを大量に産生する。これを酸化的リン酸化といい、1分子のグルコースからのATPの產生は、解糖系が2分子に対して、36分子とはるかに効率が高い。しかし、がん細胞は酸素が存在するのにもかかわらず、優先的に解糖系を亢進してATPを産生する。このように、がん細胞ではエネルギー効率の悪い代謝を行っているものも存在する。がん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。そのため、解糖系だけでなくミトコンドリアにおけるATPの产生も促進される。がん細胞では、血中に豊富に含まれるアミノ酸のひとつであるグルタミンがグルタミナーゼと呼ばれる酵素によってグルタミン酸に加水分解される。さらにグルタミン酸は、グルタミン酸脱水素酵素(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、ATP产生のための炭素源として利用される。この代謝経路はグルタミノリシスと呼ばれている。そのため、グルタミノリシスにおける最初の段階で働くグルタミナーゼをターゲットとしたがん治療薬の開発が行われている¹⁾。

哺乳動物には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產生される。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產生される。GLS2から產生されるLGAやGABは一部のがんにおいて腫瘍抑制因子として働くことが知られている。一方、GLS1から產生されるGACとKGAは多くの種類のがんにおいて腫瘍促進因子として働くため、これらをターゲットとした阻害剤の開発が注目されている²⁾。

今までにGLS1が產生するGACとKGAに対する阻害剤がいくつか報告されている。阻害剤である6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) は基質であるグルタミンと非常に類似した構造を有することから、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、他の代謝経路で機能するグルタミナーゼも阻害してしまうことから、副作用が大きいという点で治療薬として用いることは難しい。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。毒性は比較的低いものの、水溶性や薬物動態学的特性が低いことから治療薬として用いることは難しい。Telaglenastat (CB-839) はBPTESの水溶性や薬物動態学的特性を改善した阻害剤であり、臨床試験まで到達した唯一の阻害剤である³⁾。しかし、未だに治療薬として承認されている阻害剤は存在しないため、開発が求められている。

近年になって、GLS1が老化細胞の生存にも重要な因子であることが明らかになった。実際にGLS1が產生するGACとKGAに対する阻害剤を老齢マウスに投与したところ、老化細胞が除去され様々な加齢性の症状が改善されたことが報告されている。そのため、グルタミナーゼ

-Effect of Adenosine on the activation effect of Human Kidney-type Glutaminase-

Mizuki SHIMOZAKI, Kazuaki YOSHIMUNE

阻害剤はがん治療薬のみならず、老化細胞除去薬としても利用することができる⁴⁾。

グルタミナーゼの活性化因子として、アデノシン三リン酸（ATP）が知られている⁵⁾。このことから、本研究ではATPのリン酸部分を除いたヌクレオシドであるアデノシンに着目した。グルタミナーゼのATP結合ポケットに対して、アデノシンが作用することでATPによる活性化を抑制するのではないかと推測し調査を行った。

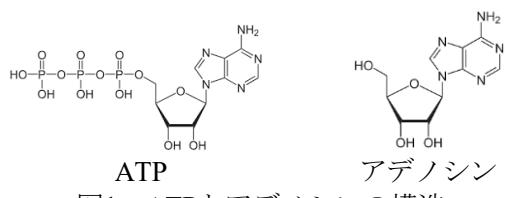


図1 ATPとアデノシンの構造

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*E. coli* BL21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Isopropylβ-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×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。

2-2 グルタミナーゼ活性測定

活性測定は2段階の反応で測定した。最初はグルタミンとグルタミナーゼを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。活性化因子である無機リン酸やATPおよびアデノシンを加える際は、このときに添加した。次に、反応液をNAD、G6DH、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 μmol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

細胞内濃度の無機リン酸 (35 mM)、ATP (5 mM) 存在下において、アデノシンの効果を調査したところ、無機リン酸存在下では大きな阻害は見られなかったのに対し、ATP存在下では阻害が見られた。さらに、ATP (5 mM) 存在下におけるアデノシンの阻害様式の決定と阻害定数の算出を行った。Lineweaver-Burk Plotから阻害様式は非競合阻害であることがわかった。Dixon Plotにより阻害定数はおよそ20 mMと算出された。本研究において、ATPによるKGAの活性化をアデノシンが阻害することが確認された。以上結果から、KGAのATP結合ポケットにアデノシンが入り込むことで、活性化を阻害していることが示唆された。細胞内には5 mM程度のATPが存在することから、グルタミナーゼのアデノシン結合ポケットをターゲットした阻害剤の開発が期待できる。

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) Wei Yu. et al. *Clinical and Translational Oncology*, 2021, 23, 2253-2268
- 4) Johmura, Y. et al. *Science*, 2021, 371, 265-270 *Oncology*, 2021, 23, 2253-2268
- 5) Nelson, D. et al. *Biochem J*, 1992, 282, 559-564