

# 立体構造解析を目的としたヒト由来腎臓型グルタミナーゼの大量生産と精製

古澤 優希、東邦大学 後藤 勝、日大生産工(院)吉宗 一晃

## 1. まえがき

近年、がんは日本で最もも多い死因である。また日本人の2人に1人は一生のうちに何らかのがんになるといわれている。このためがん細胞の代謝に注目した薬剤の開発の研究が行われている。

がん細胞は、その増殖速度を維持するためにより多くのエネルギーを産生する必要がある。そのため正常細胞とは異なる代謝経路を用いて生存に必要なエネルギーを産生していることが知られている。そのような代謝経路をグルタミノリシスと呼び、グルタミナーゼと呼ばれる酵素によってグルタミンがグルタミン酸へと加水分解されている。グルタミン酸はグルタミン酸脱水素酵素(GIDH)によって $\alpha$ -ケトグルタル酸へと変換され新たな炭素源としてTCA回路に供給されてATPを過剰産生する。以上のことよりがん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生み出している。そのためグルタミノリシスでグルタミンを加水分解し、グルタミン酸を生成しているグルタミナーゼは分子標的抗がん剤の開発における標的分子として注目されている。<sup>1)</sup>

ヒトには $GLS1$ と $GLS2$ と呼ばれる2つのグルタミナーゼ遺伝子が存在する。 $GLS1$ にはC末端が異なる2つのグルタミナーゼが產生される。C末端が短い方をグルタミナーゼC(GAC)と呼び、C末端が長い方を腎臓型グルタミナーゼ(KGA)と呼ぶ。GACは主に脾臓や腎臓、肺で発現している。KGAは肝臓を除くすべての臓器で発現しており、特に脳や腎臓で多く発現している。 $GLS2$ では肝臓型グルタミナーゼ(LGA)とグルタミナーゼB(GAB)と2つのグルタミナーゼが產生される。 $GLS1$ から產生されるグルタミナーゼは癌の腫瘍促進因子として働くのに対し、 $GLS2$ からのグルタミナーゼは腫瘍抑制因子として働いている。<sup>2)</sup>

これらのことから現在は $GLS1$ 由来のKGAとGACを標的分子とした阻害剤の開発が行われている。

現在までに $GLS1$ 由来のグルタミナーゼに対する阻害剤は多数報告されている。<sup>3)</sup>

阻害剤6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)はグルタミナーゼの活性部位に共有結合を行うが、グルタミノリシス以外の代謝経路で使用されるグルタミン代謝酵素を阻害してしまうことから、治療薬には向いていないと判断された。

Bis-2-[5-(phenylacetamido)-1,3,4-thiadiazol-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を行うアロステリック阻害剤である。この阻害剤に働く効果はタンパク質のアロステリック部位と呼ばれる場所に、基質とは異なる分子が結合することでその形が変化し、その機能に何らかの変化が生じる効果である。これによりタンパク質の活性部位の形状が変化し基質が結合できなくなるといったように酵素活性を制御することができる。しかし、BPTESは水溶性と薬物動態特性が低く、臨床応用の大きな障害となっており治療薬としてグルタミナーゼ阻害剤の開発には至っていない。

現在、最も注目されているものとしてBPTESと同様のアロステリック効果を持つ阻害剤であるTelaglenastat (CB-839) が有力視されており、臨床試験で研究されている唯一の $GLS1$ 遺伝子産物阻害剤である。BPTESとCB-839はアロステリック効果と呼ばれる効果によって酵素の阻害をおこなっている。

タンパク質の機能を利用した研究を行う上でタンパク質の立体構造を把握することは重要である。しかしタンパク質は顕微鏡などで観察することができないため、結晶化しX線解析を行った後に解析データの計算を行うことで立体構造を決定することができる。

タンパク質の結晶化をする際の目的タンパク質には高い純度が求められる。そのため、適切な精製方法を選ぶ必要がある。

イオン交換クロマトグラフィーは電気的な性質でタンパク質を分離する方法である。タンパク質が全体として電荷をもっている特徴を利用し、正電荷を示す塩基性タンパク質は負電荷をもつ担体(陽イオン交換体)に、負電荷を示す酸性タンパク質は正電荷を持つ担体(陰イ

Overproduction and Purification of kidney-type Glutaminase from Human  
For Crystal structure analysis.

Yuki FURUSAWA, Kazuaki YOSHIMUNE, and Masaru GOTO

オン交換体)に結合させる。試料をイオン交換体に詰めたカラムに結合させた後、タンパク質の溶出に使用する溶媒の塩濃度を高くしていくと、イオン結合が弱くなつていき、結合力の弱いタンパク質から順に溶出させることができる。

固定化金属クロマトグラフィーはヒスチジンtag(Hisタグ)融合タンパク質を特異的に分離する方法である。樹脂に担持されている金属イオンがHisタグ融合タンパク質に対して高い特異性を示すことを利用して、Hisタグ融合タンパク質を高純度に精製することができる。そして溶出にはヒスチジンと似た構造を持つイミダゾールが使用され、目的タンパク質の高純度での溶出が可能となっている。

本研究ではがんの腫瘍促進因子として働く*GLS1*から產生される KGAに対して阻害効果を持つ物質探索や立体構造を解析し従来よりも効率的な効率的な阻害効果を持つ物質の探索を行う。高純度で活性が高いKGAを得ることができる精製方法についての検討を行つた。

## 2. 実験方法および測定方法

### 2-1 組換えタンパク質生産

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。形質転換した大腸菌を、終濃度 0.5 mg/ml のアンピシリン(以下 Amp)を含む 5 mL の LB 液体培地に植菌し 37°C、105 rpm の条件で 8 時間振盪培養した。終濃度 0.5mg/ml の Amp を含む新しい 500 mL の LB 液体培地に培養液を加え、37°C、105 rpm の条件で一晩振盪培養した。翌日終濃度が 0.2 mM となるように Isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG)を培養液に添加し、37°C、105 rpm で 3 時間振盪培養した。培養後、ボトルに均等に分け 4°C、5000 rpm で 20 分間遠心分離して菌体を回収した。菌体に 10 mM KPB を加え懸濁して超音波破碎し、遠心分離を行うことで上澄み液から酵素液を得た。

### 2-2 タンパク質精製

得られた酵素液は、DEAE-TOYOPEARL 樹脂という陰イオン交換クロマトグラフィー用の樹脂によって精製を行つた。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一晩樹脂にタンパク質を保持させ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。

溶出したタンパク質をさらに固定化金属クロマトグラフィー用の TALON 樹脂によって精製を行つた。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。目的タンパク質溶液をカラムに充填して一晩樹脂にタンパク質を保持させさらに平衡化バッファーを流した後、10 mM Tris-HCl を含んだ 250 mM Imidazole を流して目的タンパク質を溶出した。

その後 10 mM KPB で一晩透析を行い、Imidazole を除去した。

### 2-3 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 KPB 存在下において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。次に、反応液を NAD、GIDH、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、グルタミナーゼの活性を算出した。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。

タンパク質定量法である BCA 法からビシンコニン酸溶液と硫酸銅溶液が含まれる溶液にグルタミナーゼを加え 37°C で 30 分間反応させた。生成した錯体を測定波長 562 nm で吸光度測定することでグルタミナーゼのタンパク質濃度を算出した。

### 3. 実験結果および検討

培養した菌体から得られた酵素液の比活性は、29 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 88 U/mg であり、さらに His タグ精製を行つた酵素液の比活性は 102 U/mg であった。

## 参考文献

- 1) Zhang, J. et al. EMBO J., 2017, 36, 1302-1315.
- 2) Ding, L. et al. Brain Behav Immun., 2021, 92, 139-156.
- 3) Wei Yu. et al. Clinical and Translational Oncology, 2021, 23, 2253-2268