

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790048

研究課題名(和文)新規抗ガン剤開発に向けたヘパラーゼの構造基盤の解明

研究課題名(英文)Structural basis for molecular mechanism of heparanase mediated cancer cell invasion and metastasis

研究代表者

田畑 香織(佐々木香織)(Tabata, Kaori)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90464388

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文):ヘパラーゼはヘパラン硫酸を特異的に分解するエンドグリコシダーゼの一つで、ガンの転移や浸潤に関与することが知られている。本研究では、ヘパラーゼの立体構造を明らかにすることを目的として研究を開始した。

大腸菌やカイコ等を用いて様々な発現系を検討し、目的のタンパク質を1Lの培養液から約5mgの可溶性画分として得ることに成功した。得られた組換えタンパク質を用いて抗体を作製し、ELISAでヘパラーゼ特異的に反応することを確認した。作製した抗体およびヘパラーゼとの複合体での結晶化を試み、微結晶を得ることに成功した。また、他のヘパラーゼ型のβ-グルクロニダーゼについても単結晶を得ている。

研究成果の概要(英文):Heparanase is an enzyme which involved in cancer cell invasion and metastasis. In this research, the purpose is to clarify the 3D-structure of heparanase.

I examined various protein expression systems using E. coli and silk worm, and succeeded in obtaining about 5 mg of the target protein from the 1L culture as a soluble fraction. The antibody was produced using the prepared recombinant protein as an antigen, and I confirmed that the antibody specifically recognized heparanase by ELISA. Then, I tried to crystallize complexes of heparanase with produced antibody, and succeeded in obtaining some micro crystals. Moreover, I also succeeded in obtaining the single crystals of beta-glucuronidase, which belongs to heparanase type enzyme.

研究分野:タンパク質科学

科研費の分科・細目:薬学・物理系薬学

キーワード:ヘパラーゼ X線結晶構造解析 ガン転移

1. 研究開始当初の背景

ヘパラーゼはヘパラン硫酸を特異的に分解するエンドグリコシダーゼの一つで、胚発生や傷の治癒などの生理活性を持っている。さらに、ガン細胞に過剰に発現しており、ガンの転移や浸潤、血管新生にも関与していることが明らかとなってきた。これらの現象はヘパラーゼが細胞外マトリックスを構成しているヘパラン硫酸を切断することやヘパラン硫酸に結合している上皮成長因子を切り出すことによって促進されるものと考えられている。

このためヘパラーゼの活性を阻害する物質を開発すれば優れた抗ガン剤に応用できるものと考えられることから、これまで多くの研究者によってヘパラーゼの研究が進められてきた。特に 1999 年に Vlodaysky ら [Nat. Med. (1999)] や Hulett ら [Nat. Med. (1999)] によって、ヘパラーゼの cDNA クローニングについての論文が発表されて以降、ヘパラーゼに関する研究が飛躍的に進んでおり、基質特異性やアミノ酸配列について詳細な研究が行われているが、X線結晶構造などの立体構造に関する情報は報告されていない。このため、ヘパラーゼ阻害剤の開発は試行錯誤に頼らざるを得ず、これまでにヘパラーゼ活性を阻害する物質の探索が行われ、PI-88 をはじめとする数種の候補化合物が発見あるいは合成されているが、今のところ臨床で使用されているものは皆無である。このような状況から、ヘパラーゼの立体構造の解明が強く望まれているのが現状である。そこで、申請者はヘパラーゼの立体構造を分子レベルで解明することを目的とした申請課題を着想するに至った。

また、申請者はコガネバナ α -グルクロニダーゼの研究を行った際に、本酵素がそれまでに知られていた α -グルクロニダーゼとは相同性を示さず、ヘパラーゼ型の酵素であることを明らかにした [Sasaki et al., J. Biol. Chem. (2000)]。さらに、コガネバナ α -グルクロニダーゼにおいて、求核種および酸塩基触媒として機能する 2 つのグルタミン酸残基および機能は不明であるが活性に重要な役割をもつチロシン残基を同定した。これらのアミノ酸残基はヘパラーゼでも保存されており、グルタミン酸残基については変異導入実験により活性残基であることが確認

されているが [Hulett et al., Biochemistry (2000)]、チロシン残基の機能については不明である。そこで、ヘパラーゼと基質や抗体との複合体の立体構造を明らかにすることで、ヘパラーゼの反応メカニズムおよびチロシン残基の役割の解明につながるのではないかと考え、申請課題を計画した。

2. 研究の目的

ガンの転移や浸潤に関与するヘパラーゼと基質や抗体との複合体の X 線結晶構造解析を行い、ヘパラーゼの酵素反応メカニズムを分子レベルで明らかにする。

さらに、ヘパラーゼの構造を基にしたヘパラーゼ阻害剤すなわち新規メカニズムの抗ガン剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌・カイコ等での発現系構築

ラット由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、ヘパラーゼ全長を増幅し、大腸菌発現用 (pET ベクターやコールドショックベクター) およびカイコ発現用、HEK293 細胞発現用のプラスミドに組み込み発現系を構築した。

なお、発現タンパク質の精製を容易にするために、ヒスチジンタグを融合した形で発現させ、ヒスチジンタグとヘパラーゼの間にはプロテアーゼサイトを導入し、後でタグを除去できるようにしておいた。

また、ヘパラーゼはプロセッシングを受け、8kDa と 50kDa のヘテロダイマーを形成して活性を示すことから、それぞれのドメインの発現系およびリンカーで連結した発現系も作製した。

(2) 精製条件検討

(1) で発現させた組換えタンパク質について、ニッケルアフィニティーカラムを用いて粗精製を行った。得られた目的のタンパク質をプロテアーゼ処理により、ヒスチジンタグを除去し、さらに、イオン交換カラムクロマトグラフィーやゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて精製した。

(3) ヘパラーゼ活性の確認

p-ニトロフェニルグルクロナイドを基質として精製した組換えタンパク質と反応させ、吸光度を測定することにより、酵素活性を測定した。

(4)抗体作製

ヘパラーゼをウサギに接種し、抗体を作製した。作製した抗体を用いてELISAによるヘパラーゼに対する特異性の評価を行った。

(5)ヘパラーゼの結晶化

精製したヘパラーゼ全長あるいは各ドメインについて結晶化条件を検討した。抗体と複合体を作ることによって安定化し結晶が得られる場合もあると考え、(4)で作製した抗体とヘパラーゼとの複合体についても結晶化の検討を行った。

4. 研究成果

まず、ラット由来 cDNA を用いてヘパラーゼ全長をコードする遺伝子をクローニングし、大腸菌発現用のプラスミドに組み込み発現系を構築した。大腸菌 BL21(DE3)を用いて発現を試みたが封入体に多く発現していたため、宿主や培養温度の検討を行ったが、改善は見られなかった。そこで、コールドショックベクターである pCold ProS2 ベクターを用いた発現系を検討したところ、可溶性画分に目的のタンパク質を発現させることに成功した。しかしながら、タグを切断した後、様々な精製条件を検討したが、SDS-PAGE にて単一バンドを示すまで精製することが出来なかった。

また、pFastBac1 に組み込んだものをトランスポジションしてバクミドを作製し、カイコ幼虫での発現も検討したが、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングで目的のバンドが見られなかった。

ヘパラーゼはプロセッシングを受け、8kDa と 50kDa のヘテロダイマーを形成して活性を示すことから、それぞれのドメインおよび各ドメインをリンカーで連結した発現系の作製を行った。リンカーの長さやリンカーを構成するアミノ酸の種類を変えたコンストラクトをいくつか作製し検討したところ、少量ではあるが可溶性として調製することに成功し、ウエスタンブロッティングにより目的のタンパク質であることも確認した。巻き戻し操作を必要としない可溶性画分として目的のタンパク質を調製できたことは、今後の機能解析および構造解析にとって大きな一歩であると考えられた。しかしながら、結晶化条件を検討するには十分な量が得ら

れなかったため、多く発現していた封入体からの巻き戻し操作を検討した。界面活性剤の種類や濃度の検討を行った結果、SDS-PAGE やウエスタンブロッティングにより目的のタンパク質のバンドを確認することができ(図1)、1Lの培養液から約5mgの組換えタンパク質を得ることに成功した。

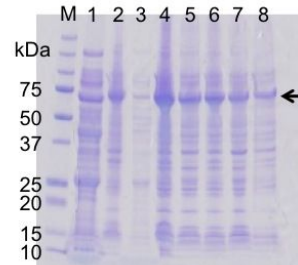


図1 SDS-PAGEによる可溶性条件確認
M: マーカー、レーン1: 界面活性剤A, 上清、レーン2: 界面活性剤A, ペレット、レーン3: 界面活性剤B, 上清、レーン4: 界面活性剤B, ペレット、レーン5: 界面活性剤C, 上清、レーン6: 界面活性剤C, ペレット、レーン7: 界面活性剤D, 上清、レーン8: 界面活性剤D, ペレット

可溶性画分に得られた目的のタンパク質について、p-ニトロフェニルグルクロナイドを基質として α -グルクロニダーゼ活性を測定したところ、調製した組換えタンパク質は酵素活性を有していることが明らかとなった。

次に、得られた組換えタンパク質を用いて抗体を作製した。ELISA により解析したところ、ヘパラーゼ特異的に反応することを確認した(図2)。

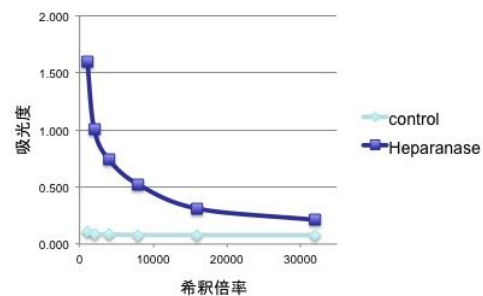


図2 ELISAによる抗体の特異性評価

さらに、ヒスタグによるアフィニティーカラムおよびイオン交換カラムを用いて精製した組換えタンパク質について結晶化条件の検討を行った。まずは、ヘパラーゼ単体での結晶化に取り組んだが、微結晶が得られたものの構造解析に適した結晶は得られなかった。そこで、抗体と結合させることで安定化し質の良い結晶が得られる可能性があると考え、結晶化を行う際に作製した抗体を

添加して検討した。その結果、ヘパラーゼ単体の結晶化条件検討の際と同様、微結晶しか得られなかった。

また、他のヘパラーゼ型の酵素であるコガネバナ β -グルクロニダーゼについてもカイコおよびプレバチルスを用いた発現系を検討した。カイコを用いた発現系では体液中に発現し、プレバチルスを用いた発現系でも可溶性に発現した。そこで、カイコ発現系で得られた体液からアフィニティーカラムやイオン交換カラムを用いてコガネバナ β -グルクロニダーゼを精製し、結晶化を行ったところ、単結晶を得ることに成功した(図3)。これまでに、カイコで発現させた組換えタンパク質で結晶が得られたという報告はなく、今回が世界初である。

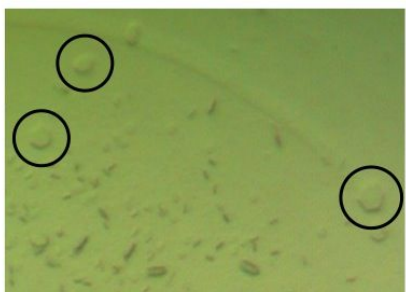


図3 コガネバナ β -グルクロニダーゼの結晶

さらに、調製した組換え β -グルクロニダーゼについて、バイカリンを基質として生成物であるバイカレインを HPLC により分析することによって活性を確認した。活性に関与するアミノ酸残基として、チロシンおよび2つのグルタミン酸残基が知られているが、チロシン残基の役割は不明であった。そこで、このチロシン残基をフェニルアラニン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸に変えた変異酵素を調製して活性を測定したところ、どの変異酵素についても活性を確認することが出来なかったことから、 β -グルクロニダーゼ活性を示すにはフェノール性の水酸基が重要であることが推察された。

今後は、現在得られている単結晶の結晶化条件をさらに詳しく検討し、構造解析を進めていきたいと考えている。詳細な立体構造を解明することにより、反応メカニズムの解明にもつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

今村聡、今村麻美、坂元政一、田畑香織、田中宏幸、森元聡、コガネバナ β -glucuronidase の反応メカニズムに関する研究、日本薬学会第132年会、平成24年3月31日、札幌

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田畑 香織 (TABATA, Kaori)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90464388