

学生優秀発表賞受賞者：藤川紗英 演題番号 082

組換えキヌレニンアミノ基転移酵素 2 の発現・ 精製と生化学的解析

藤川 紗英^{*1§} 藤垣 英嗣^{*1} 松尾 円香^{*1} 三東 由樹^{*1}
速水 啓介^{*1} 板羽 秀之^{*1} 山本 康子^{*2} 斉藤 邦明^{*2,3}

I. 研究の概要

【背景および目的】

キヌレニンアミノ基転移酵素(kynurenine aminotransferase; KAT)はキヌレニンのアミノ基転移を触媒する酵素で、キヌレニンをキヌレン酸(KYNA)へと変換する。ヒトのKATには4種類のアイソザイムが存在し、脳内でのKYNA産生はKAT2が中心的役割を担っている。KYNAはトリプトファン代謝の中心経路であるキヌレニン経路の代謝産物で、中枢神経系において興奮性アミノ酸受容体へのアンタゴニストとして働き、抗興奮作用や抗けいれん作用を持つことが知られている。脳でのKYNAの増加は、グルタミン酸の放出を抑制しドーパミンを低下させ、認知能力の低下や統合失調症の発症を引き起こすことが示唆されている。さらに、アルツハイマー病の患者では脳脊髄液中のKYNA濃度が異常高値を示しており、KAT2阻害剤はこれら疾患の治療薬として注目されている。

そこで、本研究ではバキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いて組換えKAT2(rKAT2)を精製し、その生化学的特性を解析した。

【方法】

rKAT2組換えバキュロウイルスの作製は、ヒト脳total RNAからRT-PCR法により得たrKAT2遺伝子とLife Technologies社のBac-to-Bac Baculovirus Expression Systemを用いて行った。rKAT2組換えバキュロウイルスを昆虫細胞(Sf9細胞)に感染させ、細胞溶解液よりHisタグの金属イオンに対する結合力を利用したアフィニティークロマトグラフィーによりrKAT2を精製した。rKAT2の純度および収量は、SDS-PAGEおよびBradford法により確認した。酵素活性測定は、各種濃度のキヌレニン、 α -ケトグルタル酸およびピリドキサルリン酸を含むリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)中にrKAT2を添加し、37°Cで30分反応させ、生成物であるKYNAを高速液体クロマトグラフィーで測定することにより行った。また、至適pHと至適温度の検討も行った。

【結果】

SDS-PAGEにより推定分子量である約48kDa付近に単一のバンドが確認され、高純度のrKAT2の精製に成功した。至適pHは8付近であり、至適温度は30度から60度と幅広かった。酵素の比活性は $3.3 \pm 0.2 \text{ nmol/min/mg}$ であり、酵素活性を保持したrKAT2が精製された。Michaelis-Menten

^{*1} 広島国際大学保健医療学部医療技術学科 [§] s312228@ym.hirokoku-u.ac.jp、

^{*2} 京都大学大学院、^{*3} 藤田保健衛生大学大学院

の式による解析では、キヌレニンに対する K_m 値は $2.9 \pm 1.1 \text{mM}$ 、 V_{max} は $64.3 \pm 21.6 \mu\text{M}/\text{min}$ であった。

【考 察】

今回の研究で高純度かつ活性を保持した rKAT2 を得ることができた。今後、この酵素を利用して KAT2 阻害剤の開発や酵素法を利用した新規キヌレニン測定法を開発などを行いたいと考えている。

II. 受賞の感想

今回が初めての学会発表であったにもかかわらず、このような賞を頂き大変うれしく思います。学会中はとても緊張しました。発表直前に何度も原稿を読み直し、質疑応答の想定をしていました。他の演者の方の発表を拝見し、圧倒されたのも覚えています。

本番では、原稿の読み飛ばしや言い間違いもあり、満足の行く発表とまではいきませんでした。このような場で発表が出来たことはとても貴重な経験となりました。また優秀発表賞に選出して頂けたこと、大きな自信と励みになりました。今後

も積極的にこのような場に参加したいと思います。

III. 将来への抱負

私の研究テーマは「組換えキヌレニンアミノ基転移酵素 2 の発現・精製と生化学的解析」という研究でした。今回行った研究が、将来臨床の場ですぐに役に立つことはないかもしれませんが。しかし、研究を行う上でのプロセスや、学会発表にあたっての準備などを行ったことが私自身の力になったと思っています。疑問に思ったことはどんなことでも調べ、日々進歩する医療の現場で常に最新の知識、技術を習得できるよう、向上心を失うことなく、これからの医療に貢献できるよう励んで参ります。

IV. その他

多くの先生や学生の方が参加された本学会では、学校の枠を超えた交流が持て、たくさんの刺激を受けることができました。多くのことを学ぶことができたとともに、新たな人間関係も築くことができました。このような機会を下さった方々に心から感謝申し上げます。