

タンパク質工学を駆使した酵素の超安定化 —半減期 1 2 分から 3 時間への挑戦—

愛媛大学工学部応用化学科 宮野 佳

1. 緒言

ヒトや動植物の体は生活しているうえで、バクテリアや真菌などの病原体に常にさらされている。ではなぜ、このような状況で健康に生きられるのだろうか。それは体に進入してきた病原体が増殖し、体に害を及ぼす前に、免疫系が働いて撃退しているからである。

白血球の約 60% を占める好中球は侵入してきたバクテリアを貪食し、食胞内で多量のスーパーオキシドを産生する。スーパーオキシド自身の殺菌能は低いのだが、派生する活性酸素種は強力な殺菌剤で、バクテリアを死に至らしめる。このスーパーオキシドを産生する酵素は NADPH oxidase と呼ばれる。

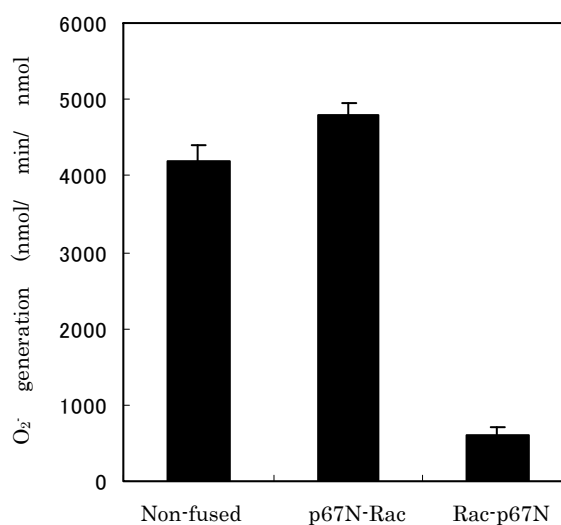
NADPH oxidase は、膜タンパク質の *cyt.b558*、サイトソル因子の *Rac*、*p67*、*p47* から成っている。この酵素は休止状態の好中球では不活性で各成分はバラバラに存在しているが、細胞が刺激を受けると 3 種類のサイトソル因子が *cyt.b558* と会合し、活性型 complex を形成すると考えられている。

サイトソル因子の *Rac* は低分子量 G タンパク質で GDP 結合型では不活性であるが、交換反応によって GTP が結合すると活性型となり、標的分子である *p67* と結合、コンフォメーション変化を引き起こす。この複合体が *cyt.b558* の活性化を行なう。また、*p47* も分子内自己制御をもっており、NADPH oxidase はサイトソル因子にもそれぞれ制御がかかっている。それは活性酸素が必要な時だけ産生され、宿主細胞に害にならないようにするためである。

このように様々な制御のため、酵素の著しい不安定性のため、NADPH oxidase を活性化状態で維持することが難しく、その性質、実体の研究は困難を極めていた。そこで、私はこの NADPH oxidase の不安定性を克服し、さらには単離することを目的として、タンパク質工学を駆使し 3 つのアプローチを試みた。

2. 67N-Rac 融合タンパク質の作成とその性質

NADPH oxidase の不活性化はサイトソル因子の解離にあることから、我々は相互作用すると考えられている *Rac* と *p67* の融合タンパク質を作



融合タンパク質の NADPH oxidase 活性化

成し、その性質を検討した。

p67 はアミノ酸 526 残基からなり、N 末端側の活性化部位、C 末端側の制御部位からなっている。活性化部位で充分活性化能があることから、融合タンパク質のサイズが大きくなりすぎるのを抑えるため、短縮型の p67N (1-210 残基) を用いた。融合タンパク質は p67N を N 末端側に配置した p67N-Rac と、その逆の配列の Rac-p67N の 2 種類を作製した。

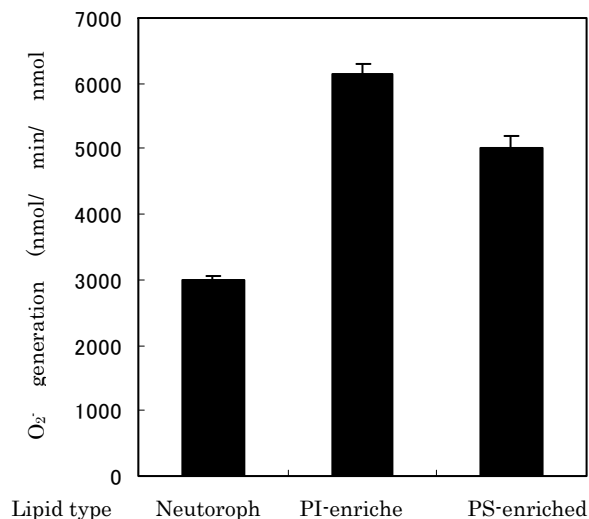
作製した 2 種類の NADPH oxidase 活性化能を調べたところ、p67N-Rac 融合タンパク質は融合させていない状態より、いくらか活性が上昇した。一方、逆の配列の Rac-p67N 融合タンパク質では、ほとんど活性が見られなかった。

さらに、25°C での酵素の安定化への効果を調べたところ、p67N-Rac 融合タンパク質は融合させていない状態より著しく安定性が上昇した。一方、Rac-p67N は融合させない状態と同じくらいの安定性であった。これらの結果から、Rac と p67N のつなぎ方によって、活性が大きく変化すること、また、ただサイトソリック因子を共有結合させたのでは酵素複体の安定性は得られない、結合の順序が重要であることが分かった¹⁾。

3. p67N-p47N 融合タンパク質の作成とその性質

次に、p47 と p67 の融合タンパク質の作成を行なった。p47 は p67 と同様に N 末端側に活性化部位、C 末端側に自己制御部位を持っている。我々は以前、p47 の N 末端側だけの p47N で高い活性が得られることを確認しており、今回作成した融合タンパク質もサイズが大きくなりすぎるのを抑えるため、p47N を用いた。N 末端側に p67N を配置した p67N-p47N 融合タンパク質と逆の配列の 2 種類を作成した。

酵素の再構成を行なうとき、活性化剤である SDS を加えないと oxidase の活性発現は起こらない。SDS の役割は未だ完全には分かっていないが、分子内制御の解除やサブユニット同士の電荷を中和して、反発を防ぐと考えられている。右の図は三種類の脂質組成の cyt.b558 と p67N-p47N 融合タンパク質を組み合わせ、SDS なしでの酵素活性化を行なった結果である。好中球の膜組成では、活性が低いのだが、PI、PS を高濃度にした場合、SDS なしでも活性が発現していた。これは、C 末端の自己制御をはずしている p67N-p47N 融合タンパク質を用い、なおかつ酸性リン脂質が膜を負電荷に片寄せ、正電荷をもったサイトソル因子を complex へ速やかに会合させたためと考えらる。SDS は高濃度存在すると、逆に酵素活性を阻害することから、この結果は酵素の安定化を行なっている我々

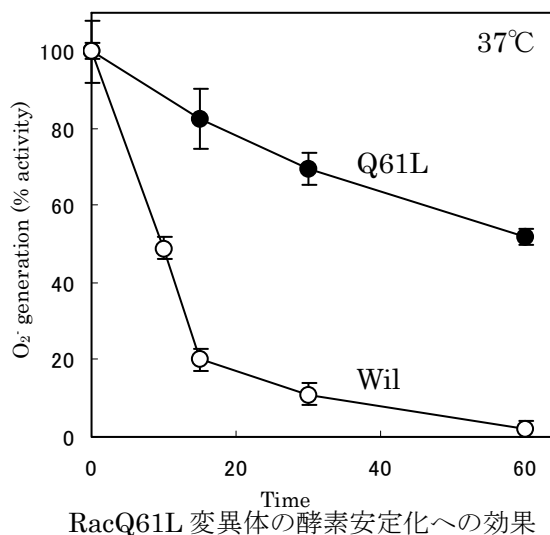


SDS を使わない NADPH oxidase の活性

にとっては非常に大きなものとなった²⁾。

4. RacQ61L と融合タンパク質による酵素の高度安定化

融合タンパク質を用いることで、室温での酵素の安定化は実現できたが、37°Cでの安定性はなお充分ではなかった。Rac は低分子量 G タンパク質で、GTP/GDP 交換反応によって、GTP が結合すると Rac は活性型になる。Rac は内在性の GTPase を持ち、これが GTP の加水分解を行なうことによって、Rac は GDP 結合型不活性となる。本研究ではこの内在性 GTPase を抑制するため、水分子の結合に必要と言われるアミノ酸残基 61 番目のグルタミンを他のアミノ酸に変異させることで Rac の GTPase 活性を抑え、常に活性型となった Rac によって、NADPH oxidase が安定化できるのではないかと考えた。



作成した RacQ61L を用いて、37°Cでの酵素熱安定性への効果を調べた。RacQ61L は、図に示すように wild type に比べ高い熱安定性を持っていた。検討の結果、安定化の理由は予想された GTP 分解の抑制効果だけでなく、Q61L 特有のコンフォメーションによるものであることが判明した。

次に、今まで作成した融合タンパク質と RacQ61L を組み合わせて、酵素の熱安定性を測定した。Rac wild では、37°Cでの半減期は13分であった。ところが、p67N-p47N 融合タンパク質と RacQ61L を用いた場合、半減期は約3時間と、今までにない安定な酵素複合体を得ることができた³⁾。

5. 結語

活性酸素は、好中球の殺菌作用以外に、体内の細胞や組織で様々な働きをすると報告されている。そのため、培養細胞などへの参加ストレス実験が重要になると思われる。しかしながら、未だ安定でクリーンな活性酸素発生マシンはない。今回、我々は非常に安定な酵素複合体を得られることに成功した。今後は、酵素複合体の構造に迫るとともに、O₂ 発生ナノマシンの作成に取り組んでいきたいと考えている。

【引用文献】

- 1) Miyano *et al.* (2001) **Biochemistry** vol. 40, No. 46, 14089-14097
- 2) Ebisu *et al.* (2001) **J.Biol. Chem.** vol. 276, No. 27, 24498-24505
- 3) Miyano *et al.* (2003) **Biochemistry** vol. 42, No. 1, 184-190