

酵素の秘密に迫る

— 遺伝子工学とタンパク工学を駆使して —

分子生命化学
田村 実

1. はじめに

数ある生体の防御システムの中で、貪食細胞（白血球の仲間）による病原体の殺菌は、その侵入に対して最前線で、真っ先に行なわれる自己防御システムである。同じ白血球でもリンパ球が飛び道具（抗体）を使って敵と闘うのに対し、こちらは体をはって相手と四つに組んで闘う、いわば格闘技派である。また前者が数日から数週間という時間のオーダーで応答するのに対し、こちらは数秒のうちに対応する点も大きなちがいである。我々はこの貪食細胞の中でも圧倒的多数（～90%）を占める好中球について、その貪食作用に深くかかわるスーパーオキシド生成酵素（通称NADPH oxidase）の実体としくみの解明に挑戦してきた。ここでは遺伝子工学を用いて酵素を無細胞系で再構成し、さらにタンパク工学により酵素成分を改変して安定化することにより見えてきた酵素の姿について紹介する[1]。

2. 好中球のスーパーオキシド生成酵素

図1に好中球による細菌の殺菌を模式的に示した。好中球は病原菌に出会うとこれを取り込み、食胞内に閉じ込めて、殺菌する。このとき殺菌剤として使われるのがスーパーオキシド (O_2^-) である。好中球の細胞膜にはこの O_2^- を生み出す酵素NADPH oxidaseが潜在的に存在し、刺激に応じてすみやかに活性化される。発生した O_2^- はさらに

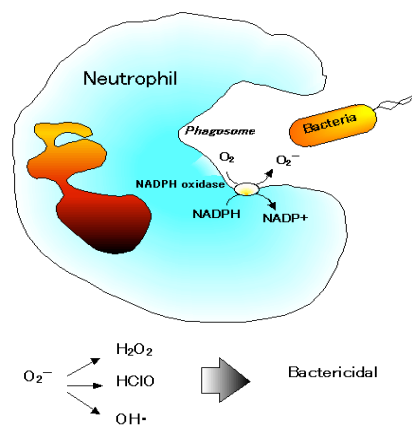


図1 好中球による細菌の貪食と殺菌

毒性のつよい過酸化水素、次亜塩素酸、 OH^- などに変えられてバクテリアを死にいらしめる[2]。NADPH oxidaseはNADPHから電子をうけとって酸素に付加するという単純な反応を触媒するが、ふだんは活性がなく、刺激を受けて活性を現わすものの、じきに消えてしまうという研究者泣かせの性質をもち、したがって単離もできず、長い間幻の酵素と呼ばれていた。

しかし、酵素がまぼろしでないことは、その欠損症の深刻な症状から明らかである。慢性肉芽腫症とよばれるこの酵素の遺伝的欠損症では、深刻な症状を呈す。すなわち患者は非常に感染しやすく弱い菌やカビの感染がしばしば命取りになる。また肉芽腫とって

感染したあとが傷になって残るのが特徴である。患者の好中球を調べると刺激しても O_2^- が出てないことがわかる。そして悲惨なことに、たいていの場合患者は成人まで生き永らえない。

3. O_2^- の体内での働き

それではこの O_2^- たくさん出れば出るほどよいのかというと、実は出過ぎても困る。 O_2^- は正式名称をスーパーオキシドアニオンラジカルといい、一種のラジカルであり反応性が高く、出過ぎれば宿主の細胞をも傷つけてしまう、そのうえ後述するように、生体内ではシグナル分子としての作用もあり、その不用意な発生は生体機能のバランスをくずすことにつながる。このような状況から、 O_2^- の生成酵素であるNADPH oxidaseは時間的、空間的に厳密に制御する必要がある。好中球には、そのための巧妙なしくみが備わっていると知られるがそのしくみは長い間謎であった。

4. 酵素の無細胞活性化

従来、本酵素を調べるには、好中球を特定の方法で刺激し、発生する O_2^- を測定するか、あるいは、刺激後ただちに細胞を潰し、細胞膜を取り出してその残存活性を調べるしか方法がなかった。1985年イスラエルのPickらはこの酵素を無細胞で活性化する方法を見出した。すなわち未刺激の好中球破碎してオルガネラ、サイトソル、細胞膜に分け、そのうちサイトソルと細胞膜を再び混ぜて、これにSDS(一種を加えると酵素が活性化された。細胞の外で酵素を活性化する方法は画期的なものであったが、得られた酵素はやはり不安定であった。また界面活性剤がなぜ必要なのかも不明であった。

図2はこのようにして活性化した酵素の安定性を見たものである。縦軸は O_2^- 生成能を表

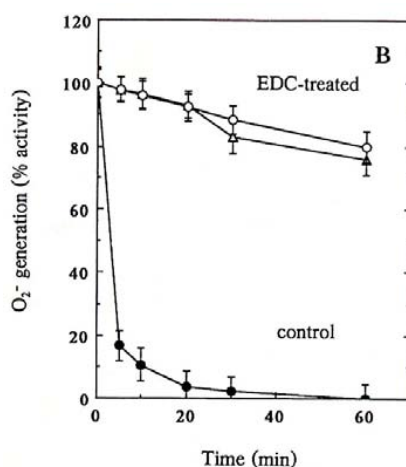


図2 NADPH oxidase は架橋剤EDCで安定化

している。Controlではすみやかに活性を失い、その半減期は3分であった。ところが活性化後 架橋剤EDCで処理すると、安定性がめざましく向上し半減期は3時間になった(EDC-treated)[3]。このことは酵素が多成分でできており、それらの会合が活性に必須であることを暗示した。ただ、残念なことに架橋した酵素は超高分子の複合体になり、それ以上の解析はできなかった。

5. サイトソル因子

一方、欠損症の患者に関する研究からNADPH oxidaseの必須成分として次のようなタンパク質が明らかになってきた。細胞膜にあるシトクロム b_{558} が酵素本体で、これはp22とgp91からなっている。ここでpはproteinのp、22は分子量22kDをあらわしている。一方サイトソルには活性化因子としてp47、p67、Racという3つのタンパク質が存在することが見出された。したがって上記の安定化の実験とあわせて考えると、酵素の活性化は次のようにイメージできる。すなわち、サイトソルにある因子タンパク質が何らかの刺激を受けて膜に近付いてきてシトクロムに会合し構造変化を引き起こして、活性状態にするとい

ということである。

6. 酵素の再構成と安定化—タンパク工学の導入

私は何とかして活性な酵素の姿がみたいと思い、それには純粋な酵素つまり純粋なタンパクで再構成した酵素を安定化する必要があると考え、まず純粋な再構成系を立ち上げることにした。上記のサイトソルの因子は遺伝子がクローニングされたので遺伝子を手に入れて遺伝子工学でタンパクをつくることにした。一方シトクロムはブタの好中球から精製したが、精製後、FADおよびリン脂質を加えることにより、nativeな構造をとらせた。こうして純粋な再構成系を確立した。これについて先のcrudeな系にならって、先ず架橋を試みたが、なぜか十分な効果がなかった。

そこでタンパク工学を導入することにした。戦略としては、とにかく活性な酵素会合体がはなれないようにすることを意図して、サイトソル因子のp47とp67あるいはp67とRacを融合させることを試みたが、このとき分子量が大きくなりすぎるとタンパクの発現がうまくいかないことがわかったので、これをさけるために、p47とp67については短縮型を使うことにした。またRacについては後で述べるように点変異を施して不活性の要因を除くことにした。図3はp67とp47の融合タンパク質の作成である。まず、p67の構造のうち活性化に必須な部分は、N末端から活性化domainまでであることがアメリカのLambethらによって明らかにされたので[4]、これ以降は短縮した。またp47については2番目のSH3 domainまでが必須であることがSumimotoらによって示されたので[5]、後の部分はカットした（これらを、以後p67N, p47Nと呼ぶことにする）。これらをつないでp67N-p47N, およびp47N-p67を作製した。二種のタンパクのつなぎめはスペーサーといって、どうい

アミノ酸にするかまたどのくらい

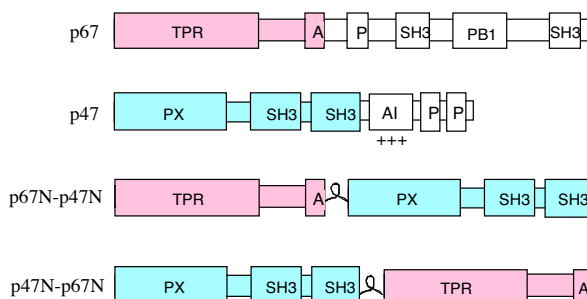


図3 融合タンパクの成立ちとドメイン構造

の長さにするか？でふつうかなり悩むところであるけれども、今回は最初であるのでとくにスペーサーは考慮せず、ただ必要上p67Nのストップコドンを変え、あとはEcoRIサイトを付けただけの最短のものにした。この結果、つなぎめは最短のSer-Glu-Pheとなった。あとでわかったことであるが、スペーサーをできるだけ短くすることがこの融合タンパクのポイントであった。幸運なことに我々は、最初からベストをつかんだのである。

このようにして作成した融合タンパクの活性化能を調べた。O₂⁻の検出と定量はシトクロムcを用いて測った。融合してない場合は全長でも短縮型でも5.5 (μmol/min per nmol b₅₅₈)前後の活性であるが、融合したp67N-p47Nではこのように40%ほど活性が高くなった(図4左)。これに対し逆向きにつないだ場合には非融合とほとんど変わらなかった。たった40%かと思うかも知れないが、そもそも末端どおしで連結すればタンパクどおしの位置関係が本来のものからずれ、活性がなくなっても不思議ではないのである。今回は活性があったばかりか、より高くなったということで我々には驚きであった。

図4右は安定性をみた結果である。黒い

線が非融合でこのような速度で失活していった。一方p67N-p47Nでは、非常に安定化され

もと近接した位置にあると考えた。一方逆に繋いだ時も活性が落ちなかったことは不思議

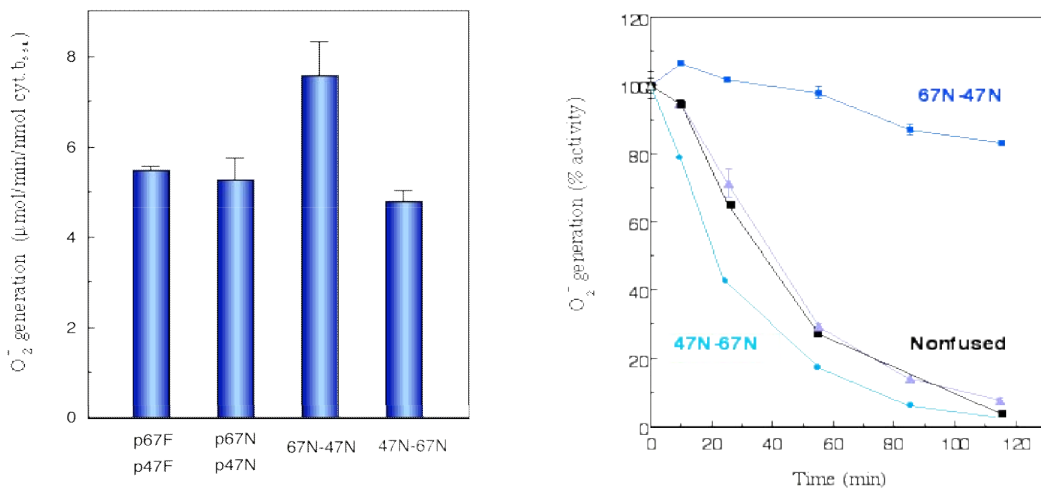


図4 活性化因子の融合と活性化能および酵素安定性

2時間でもなお、80%の活性が残っていた。一方p47N-p67Nの順につないだものでは非融合よりむしろ不安定になった。

融合によって酵素の性質は一体どう変わったのか。他の因子タンパクへの親和性の変化を見ると、融合タンパク質、とくにp67-p47では酵素への親和性が向上し、またRacの親和性を上げることが分かった。

7. 酵素複合体の構造

以上のことをもとにb₅₅₈上でのp47とp67の位置関係を推定した。図5は複合体を細胞の内側サイトソル側から見ている。これまで幾多のモデルが提唱されたが、ほとんどが膜の断面からながめたものであった。私はこの複合体の複雑さからいってこのアングルでは表現に限界があると感じ、初めて膜の内側から見た姿を描くことにした。P47のSH3 domainはp22のプロリン豊富領域(PRR)と相互作用することがわかっているの、近くに配置した。p67C末端とp47N末端をつないだ時には活性が高かったことからこれらはもと

だった。考えた結果2つの分子が環をまいたような形に配置させれば、謎が解決することに気づいた(図5)。この結果これらの末端もまた遠からず配置させることができた。安定性はこちらを繋いだ時にめざましく上昇したことから、この付近にあるp67のactivation domainを正しい位置に固定することが、活性の維持に重要であると考えられた[6]。

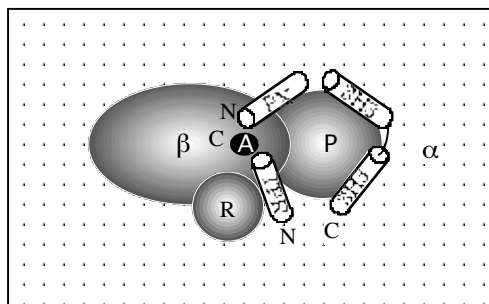


図5 NADPH oxidase 酵素複合体の推定構造

8. 刺激剤を使わない酵素活性化

予想もしなかったことであるが、p67N-p47Nを用いた時には、SDSを加えなくてもほぼ完全な活性があることがわかった。非融合ではSDSでは5.0 ($\mu\text{mol}/\text{min per nmol } b_{558}$)以上の活性があるが、SDSなしでは低い活性しかない。またp47N-p67Nでも同様である。ところが、p67N-p47NではSDSなしでこのレベルの活性が見られた。これはちょっとした偶然から見つかった。ふつうcyt. b_{558} の脂質化は生体膜に近い脂質組成で行っている。ところが彼が脂質化しようとしたとき、あいにくPEだけ足りなかった。ふと横を見るとPIが余っている。そこで彼はPEの代わりにPIを余分に入れた、とは後で聞いた。結果として酵素をSDSなしで活性化する方法が見い出されたのであった。この時ばかりは学生W君のアウトな性格がさいわいした。ために脂質組成を意図的に少しずつ変えて行ってみたのが右図である。実験はすべてSDSなしで行った。PIを全く含まない場合にはたとえp67N-p47Nを用いても活性がほとんど出ない。PIを増やしていくと活性が上昇し、20%含量あたりでmaxに達することがわかった。同様の現象は同じく酸性のリン脂質であるPSを用いても見られた。このような効果は、非融合やp47N-p67Nを用いた時にはみられなかった。したがって、酸性リン脂質とp67N-p47Nのコンビネーションで、活性化剤が要らなくなることが判明した[6]。

この現象について私は次のように考えている。P47は本来分子内の2ヶ所の相互作用によって閉じた構造をしている。SDSはこの作用を切ってopen構造すなわち活性型にすると思われる。我々は短縮型を使っているが、こちらの相互作用は残っているのでこれを切るためにSDSが必要であろう。ところがp67N-p47Nではヘッ드의p67Nに邪魔されて、初めから作用がなくなっていると思われる。

それではなぜ、酸性リン脂質が有効なの

だろうか。それについては次のように考えられる。Oxidaseの本体は塩基性のタンパク質であり、融合タンパク部分的には非常に塩基性

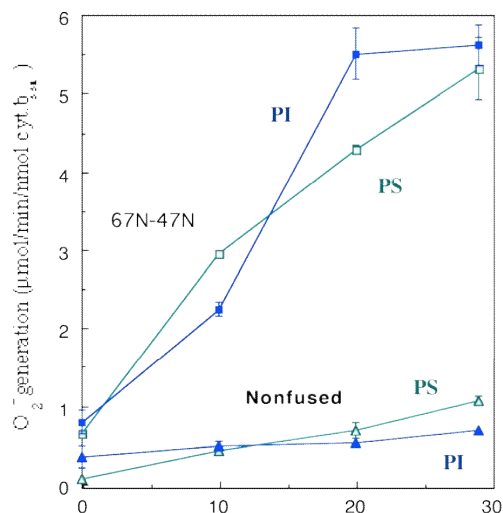


図6 酸性リン脂質によるSDSの代用

になっている。したがって、両者が近づくには、正電荷どうしの反発を乗り越えなければならない。酸性リン脂質が細胞膜（ベシクル）に入ると、この反発が解消されて、両者が相互作用できると考えられる。無細胞活性化におけるSDSの役割も、ひとつにはこの電荷の中和にあるのではないかと私はみている。

9. p67N-Rac融合

今度はp67とRacの融合タンパクである。p67NとRacをp67N-Racの順および逆の順につないだ融合タンパクを作成した[7]。なおp67-Racについては試みとしてスペーサーをSerで3残基長くしたものも作成した。図7は再構成した酵素のO₂生成活性である。67N-Racでは非融合よりもやや高い活性になった。p67N-Racであるペーサーを長くしたものでは、かえって活性がおちている。一方逆向きに繋いだ場合、活性はがたと落ちした。安定性

は非融合ではすみやかに失活するが、p67N-Racではこのように安定化された。一方Rac-p67Nの場合には安定化効果は見られなかった。なお、スペーサーを長くした場合にはかえって効果が落ちていた。ドイツのグループが、p67NとRacのcomplexの結晶構造を発表した[8]。この解析ではp67NのC端側は肝心のactivation domainの手前までしか見えていないが、その先にactivation domain 20残基あまりが入ることを考えると、p67NのC端とRacのN端が隣接することは充分可能と思われ、我々の結果をうまく説明できる。一方、p67のN端とRacのC端はかなり離れており、これらをつないだ時には、活性も安定性も低かったという結果をよく説明した。

そこで先程のp67N-p47Nの結果と合わせてシトクロム b_{558} 上の位置関係を考察した。その結果p67NのC端activation domainを中心にしてp47のN端とRacのN端が非常に近い位置にあるこのようなモデルが書けた。なおRacはC端で細胞膜と、また中間領域でシトクロムと結合していると言われている。

10. Rac常時活性化型

以上の結果からさらに安定化を徹底するにはp67とp47をこの順に、Rac-p67Nをこの順につなぐのが理想的であるということになるが、ひとつのタンパクのC末端から2つのタンパク質をつなぐことは遺伝子工学の原理からして不可能である。そこで、そのやり方はあきらめて、後者の結合は別の方法で強めることを考えた。RacはGDP型とGTP型があり後者のみが活性といわれている。活性型Racは自身のもつGTP分解活性によって徐々にGTPをGDPにかえ、不活性型になる。つまりタイマーのような働きをしている。p67と会合するのは活性型のみのはずなので、p67の解離をおさえるにはこのGTP分解活性をなくせばよいと考え、変異体をつくることにした。

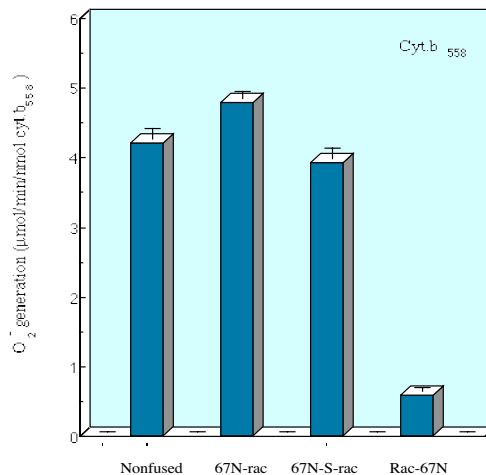


図7 p67 と Rac の融合体による活性化

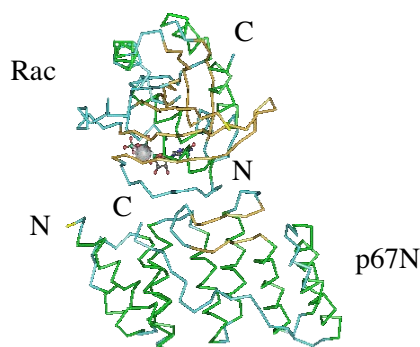


図8 p67N と Rac の会合体の結晶構造

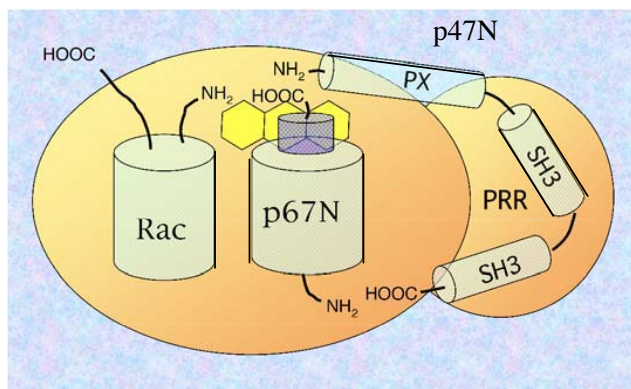


図9 酵素複合体の位置関係 (推定構造)

ここではGTP分解にかかわる領域のGln61をLeuに置きかえてGTP分解活性の低い変異体Q61Lをつくった。ここでQはGlnのLはLeuの1文字表示である。Gln61はGTP分解の際に水分子をがとりこむ役割をするといわれている。これを用いてまずは非融合の系で酵素を再構成し、安定性を見てみた。ここでは37度でおこなっている。Racでは半減期12分であったが、RacQ61Lでは5倍の1時間に延長された。なおRacQ61Lとp67の相互作用が本当につよめられているのかどうかをFar-western blotで検討し半定量した結果、結合は3倍以上につよめられていることが明らかになった[9]。

11. 究極の安定化複合体

以上のようにRacQ61Lによる安定化が確認されたので、先程の三つ組みcomplexの考えかたに基づいて、究極のペアーとしてRacQ61Lとp67-p47との組み合わせで酵素を再構成してみた。

そうすると予想通り、これまでにないほどの安定化が見られ、(図10最下段)37℃での半減期3時間となった。図10はこれまでの分子改変と安定性の結果をまとめたものである。四角はシトクロム b_{558} をあらわし丸はその上に会合した3つの制御タンパクをあらわしている。端的にいうと、p67-Racをつなぐと3倍安定になる、RacをQ61Lといれかえると、もっと安定になる、その上p67とp47をつなぐと飛躍的に安定化するということになる。以上の結果から、これら三者の連続的な結合が酵素の活性維持には不可欠である、と結論した。

12. 酵素反応の全体像

シトクロムが活性型になったあとは何が起きのだろうか。そのようすを図11に示した。ここでは視点を細胞膜の断面側において描いている。シトクロムの構造変化によって

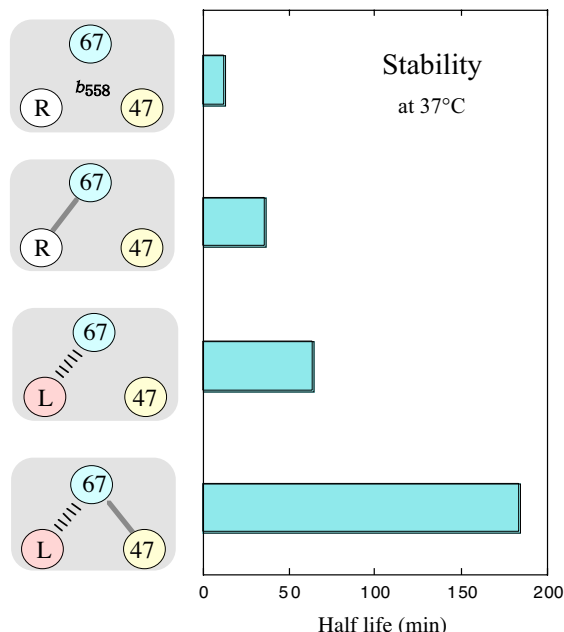


図10 酵素活性化因子の分子改変と安定性

フラビンとヘムの位置関係が整えられ、NADPHと酸素が結合し、NADPHから電子がFAD,ヘムそして酸素へと伝わる。その後生成物ははなれて次のサイクルがはじまる。NADPHは2電子供与体なので、実際には1回の反応で2個の O_2 が生じる。

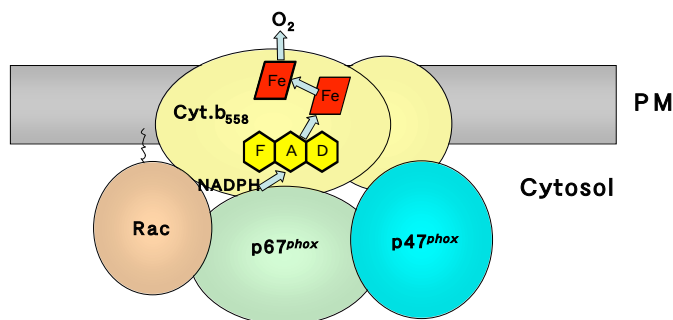


図11 活性化された酵素の反応の全体像

本酵素はこの反応を1秒間に100回という回転数で行う。まさに神業である。こうして殺菌に必要な O_2^- は短時間のうちに多量に生み出されることになる。

これまで無細胞系での話であったが、では細胞での活性化はどうなっているのだろうか。現在得られる情報を総合して考えると次のようになる。細胞外からの刺激は受容体を介して、特定の酵素に伝えられる。p47の構造変化はSDSの代わりにプロテインキナーゼCなどセリンキナーゼがリン酸化することで起こると思われる。またRacにGTPをのせるステップはシグナルをうけたGDP-GTP交換因子(GEF)によると考えられる。一方細胞膜内側の負電荷の増加は、ホスホリパーゼDによって増えてくるホスファチジン酸やPI-3キナーゼによるPI-3Pの増加によると思われる。このようにして活性化のスイッチが組み立てられ最終的にoxidaseが活性化するのだろう。

13. おわりに

最後にNADPH oxidaseのこれからの課題として我々が取り組もうとしているものを列挙したい。1) 活性型酵素の単離。これは、研究を始めた当初からの夢であり、前人未踏のチャレンジである。この目的にはごく最近我々が確立した純粋系での架橋が役に立つであろう[10]。2) 立体構造の解析。構造を推定するだけでなく、確実なものにしたい。手始めとして融合タンパクp67N-p47Nの結晶化を始めている。3) O_2^- 発生装置としての応用。安定化した酵素を利用して細胞実験のツールにすることを考えている。これについては、すでに試作品を完成している。4) 生理的な安定化因子の探索。細胞内での酵素の寿命は無細胞で活性化した場合よりも長い。これは細胞中に安定化因子が存在することを示唆している。我々は細胞骨格の構成タンパク質であるアクチンを中心に安定化因子の探索をすすめている[11]。5) 新規NADPH oxidase ホモログの活性化機構。最近、本酵素の類縁酵素が好中球以外の細胞に存在することが明らかになってきた。そこでこれらの酵素の実体と活性化についても研究をすすめたいと考え

ている。近年 O_2^- の生体内での機能は殺菌にとどまらず、シグナル分子として血管収縮や

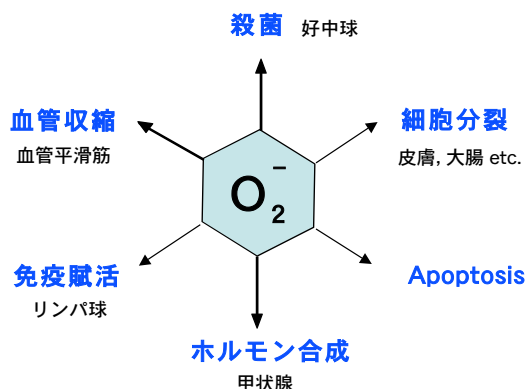


図12 体内における O_2^- の働き

細胞分裂、さらにはホルモン合成やアポトーシスにいたるまで様々な働きをもつことが明らかになってきている。またこれらの機能には上述の新規NADPH oxidaseが関わっていると思われ、現在世界的に注目されている。これら新しい酵素の構造と機能についても明らかにしたい。

謝辞 以上の仕事は、これまで教室に在籍した多くの大学院生および学部生の努力によって成し遂げられた。ここにこのことを記すとともに、感謝の意を表したい。また、本研究はDave Lambeth (Emory大学)を始め、内外のいくつかの研究室、研究者の協力を得て行われた。この場を借りてお礼申し上げたい。

文献

- [1] 宮野佳、田村実、住本英樹 (2005) 炎症・再生、印刷中
- [2] B.M. Babior (1984) Blood 64, 959-966.
- [3] M. Tamura, M. Takeshita, J.T. Curnutte, D.J. Uhlinger, J.D. Lambeth (1992) J. Biol. Chem. 267, 7529-7538.
- [4] C.H. Han, J.L. Freeman, T. Lee, S.A. Motalebi, J.D. Lambeth (1998)

- J. Biol. Chem. 273, 16663-16668.
- [5] K. Hata, T. Ito, K. Takeshige, H. Sumimoto (1998) J. Biol. Chem. 273, 4232-4236.
- [6] K. Ebisu, T. Nagasawa, K. Watanabe, K. Kakinuma, K. Miyano, M. Tamura (2001) J. Biol. Chem. 276, 24498-505.
- [7] K. Miyano, S. Ogasawara, C.H. Han, H. Fukuda, M. Tamura (2001) Biochemistry 40, 14089-14097.
- [8] K. Lapouge, S.J.M. Smith, P.A. Walker, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, K. Rittinger (2000) Mol. Cell 6, 899-907.
- [9] K. Miyano, H. Fukuda, K. Ebisu, M. Tamura (2003) Biochemistry 42 184-190.
- [10] K. Miyano, H. Kitahara, S. Ohmi, K. Kakinuma, M. Tamura (2004) Arch. Biochem. Biophys. 431, 129-137.
- [11] M. Tamura, T. Kai, S. Tsunawaki, J.D. Lambeth, and K. Kameda (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 276, 1186-1190.