

遺伝子融合による酵素安定化

NADPH oxidaseは活性が不安定で、そのことが本酵素の研究の妨げになっていました。私達は架橋という方法でこの問題を解決しましたが、この方法では残念ながら、架橋剤がサブユニットのどの部分とどの部分を結びつけたのかを明らかにすることができませんでした。そこで今度は、発想を変えて2つのサブユニットを遺伝子レベルで予め融合しておくという新しい手法を考えました。この方法は、どことどこをつなぐかを予め決められるので解析が必要ないのです。しかし、反面つなげる場所が限られており、つないだら活性が出なくなってしまうという可能性も高いのです。実際これまで遺伝子融合で活性がなくならず、しかも安定化したという例はほとんどありませんでした。

私達は、当時判明していたサブユニットp67, Rac, p47のうちから2つずつ選んで遺伝子融合を行ないました。その結果全くの幸運なことに、活性化能は保たれており、p67-Racの融合では安定性が9倍近くになりました。またp67-p47では8倍になっただけでなく、活性そのものが上昇しました。さらにこの場合、NADPH oxidaseの細胞外活性化で初めて刺激剤SDSを加えずに活性化が起こる系を初めて見いだしました。これらの系を用いて、サブユニットと酵素の結合の強さを明らかにしました。また融合させるタンパク質の順序を変えたり、スペーサーの長さを変えたりして、サブユニットと酵素の位置関係を明らかにし、p67のActivation domainが酵素のある部分に固定されることがこの酵素の活性化の本質であることを明らかにしました。

発表論文 Ebisu et al. (2001) JBC, 276, 2449; Miyano et al. (2001) Biochemistry, 40, 14089 (詳細はPublicationsを参照して下さい)