

Racによる活性化と安定化

NADPH oxidaseの活性化にはGTPタンパク質であるRacが必須です。GTPタンパク質はそれ自身on/offがあり、onになったと同時にタイマーがスタートして一定時間後にはoffになるという性質があります。私達はこのRacの性質が酵素の不安定な要因なのではないかと考え、タイマーの働かなくなったRacQ61L (Gln61をLeuに換えた変異体, 略号Q61L) を使って酵素活性を測定しました。Q61Lを用いると予想通り活性の寿命が5倍に伸びました。詳しく調べるとQ61Lでは酵素との親和性が向上しているだけでなく、もうひとつの因子p67の親和性も上げていることがわかりました。Q61Lでは酵素のFAD結合能も上がっていました。またp67との結合力も強まっていました。このQ61Lをp67と遺伝子融合させると安定性はさらに上がりました。一方Q61Lをp67-p47融合タンパク質と合わせて使うと、安定性は飛躍的に向上し、半減期は37°Cで実に3時間というとてつもないものになりました。

ところで、Racの活性化とはRacにGTPを乗せることにより起こります。RIラベルしたGTPをRacにのせると、20°Cで半減期10分くらいで加水分解されてGDPになっていきました。一方Q61LではもともとGTPが乗っており、時間をおいてもほとんど分解しませんでした。こうして酵素の不安定な理由が一つ明らかになり、同時に酵素を安定にすることができましたが、それだけではありません。Q61LがGTPを抱えたままであることがわかったので、以後はGTPを入れなくてよくなり、実験が楽になりました。

さらに、以上の結果は私たちが後にミクロの O_2^- 発生デバイスを創製するときの貴重なヒントになったのです。

発表論文: Miyano *et al.* (2003) *Biochemistry*, 42, 184 (詳細はPublicationsを参照して下さい)