

Title	Bacteroides gingivalis 381株のスーパーオキシドジ スムターゼのタンパク質性と酸素による誘導
Author(s)	天野, 敦雄
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3052206">https://doi.org/10.11501/3052206</a>
DOI	10.11501/3052206
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 6 】

氏名・(本籍)	あま 天	の	あつ 野	お 敦	お 雄
学位の種類	歯	学	博	士	
学位記番号	第	9377	号		
学位授与の日付	平成	2年	10月	5日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当				
学位論文題目	<i>Bacteroides gingivalis</i> 381株のスーパーオキシド ジスムターゼのタンパク質特性と酸素による誘導				
論文審査委員	(主査) 教授	常光	旭		
	(副査) 教授	岡田	宏	講師	平地 慶行 講師 滝川 正春

論文内容の要旨

一般に、通性嫌気性菌は酸素による障害を防御するため、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SODと略す)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの活性酸素を消去する酵素を有している。細菌のもつSODは、酸素の存在下では酵素誘導を起こし、酸素による毒性や食細胞による殺菌作用から、菌体を守る役割を担っていると考えられている。また、細菌の保有するSODの多くは、Fe-SOD、Mn-SODまたは両金属が結合したSOD(ハイブリッドSOD)であり、それぞれのSODは、活性中心に結合する金属に対して特異性をもつことが、*Escherichia coli*などで知られている。成人性歯周炎の有力な原因菌として注目されている偏性嫌気性菌である黒色素産生菌 *Bacteroides* 種の酸素毒性に対する抵抗性やそれに係わる酵素群については、これまで、殆ど知見が得られていない。

著者はまず、*Bacteroides* 種の13株について、菌体を超音波で破砕し、その遠心上清をEDTA存在下で充分透析して、得られた粗酵素標品を用い、酸素代謝に関連するいくつかの酵素活性をスクリーニングした。その結果、供試した菌株の全てに、SODおよびNADH-オキシダーゼ活性が認められ、特に、SOD活性は*B. gingivalis*が最も高い活性を有していた。しかし、これらの菌株にはカタラーゼおよびペルオキシダーゼ活性は認められなかった。また、供試菌の酸素耐性の評価は、嫌気的条件下で対数増殖期まで培養した菌株をCary and Blair液体移送培地にて懸濁し、35℃にて一定時間、曝気を行った後、再度、嫌気的条件下で5日間培養して生菌数を求め、生菌数が対数的に半減するのに要した曝気時間(T50)を酸素耐性を示す指標とした。供試菌株のSOD活性とT50で示された酸素耐性時間との相関性は $r = 0.814$ と非常に高く、NADH-オキシダーゼと酸素耐性との相関性も $r = 0.683$ とやや高いものであった。また、曝気による酵素活性の誘導は、高い酸素耐性を示した*B. gingivalis* 381株に、

SOD, NADH-オキシダーゼとともに誘導がみられたが、酸素耐性の低い *B. denticola* ATCC 33185 株では曝気による両酵素の誘導はみられなかった。嫌気的条件下で培養した *B. gingivalis* 381 株菌体からの SOD (anaero-SOD) の精製は、菌体超音波破碎液上清を 50% 飽和硫酸で塩析し、遠心後、その上清を phenyl - Sepharose 疎水性クロマトグラフィー、生体高分子用高速液体クロマトグラフィー (FPLC システム) で Q-Sepharose を用いたイオン交換クロマトグラフィーおよび Superose 12 カラムを用いたゲルろ過を組み合わせて行い、一方、曝気した菌体より得られた SOD (aero-SOD) の精製は、同じく phenyl - Sepharose カラム、FPLC システムで Mono-Q カラムと Q-Sepharose カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーを組み合わせて行った。その結果、anaero-SOD, aero-SOD とともに単一に精製され、分子量は約 46,000 で、約 23,000 の分子量をもつ 2 つのサブユニットからなると推定された。また、anaero-SOD は、350nm に Fe - SOD の特有な吸収を示し、aero-SOD は、475nm に Mn - SOD の特有な吸収を示した。原子吸光度計を用いて測定した精製酵素の含有金属量の結果からも、anaero-SOD は主に Fe - SOD より、aero-SOD は主に Mn - SOD よりなると考えられた。

精製酵素のアイソザイムの存在を調べるために、等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (IEF-PAGE 法) とポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native - PAGE 法) を行ったところ、IEF-PAGE 法によりそれぞれの pI が 5.25, 5.10, 5.00 の 3 つのバンドに分かれた。また、Native - PAGE 法によっても 3 つの酵素活性をもつバンドが認められ、酸素存在下では、3 つのアイソザイムがともに酵素誘導されることが示された。両精製酵素のそれぞれの 3 つのアイソザイムが、Fe - SOD か Mn - SOD かを判別するために、Fe - SOD を強く不活性化する  $H_2O_2$  による影響を調べた。その結果、anaero-SOD の 3 つの酸素活性をもつバンドは、全て不活性化されたが、aero-SOD は 2 つのバンドのみが不活性化された。このことより、前者は 3 つの Fe - SOD よりなるのに対して、後者は 1 つの Mn - SOD と 2 つの Fe - SOD よりなることが分かった。また、両酵素の配位金属を、塩酸グアニジンと 8-ヒドロキシキノリンを用い除去したアポ SOD は、ともに pI が 5.30 の均一なタンパク質であり、酵素活性化を示さなかった。このアポ SOD に再び  $Fe^{2+}$  または  $Mn^{2+}$  を再配位させると、再び酵素活性を発現するようになった。さらに、金属で再構築した両酵素の活性に対する  $H_2O_2$  による不活性化や  $NaN_3$  による活性阻害態度より、再構築された酵素は、Fe - SOD ならびに Mn - SOD それぞれのもつ特性を示すことが明らかとなった。また、anaero-SOD と aero-SOD のアミノ酸組成は酷似しており、aero-SOD のアミノ酸列は、調べられた 36 番目では anaero-SOD のそれと完全に一致した。

以上の結果より、*B. gingivalis* 381 株は酸素存在下では、SOD が菌体内で誘導されることが示された。また、嫌気培養および曝気された同菌株菌体より SOD を精製したところ、両精製 SOD には、ともに 3 つのアイソザイムが認められ、前者は全て Fe - SOD であり、後者は 1 つの Mn - SOD と 2 つの Fe - SOD から構成されていることが明らかとなった。しかし、両精製酵素は分子量、等電点、アミノ酸組成、部分的なアミノ酸配列は一致しており、さらに、アポ化した両 SOD および金属を再配位させた SOD は、同じ等電点をもつ単一のタンパク質であったことから、両 SOD は同一のアポタンパク質からなることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は *Bacteroides gingivalis* 381株よりスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を分離・精製し、本酵素のタンパク質特性と酸素による誘導について調べたものである。

その結果、1) 酸素存在下では、SODが菌体内で誘導されること、2) 嫌氣的培養および曝気された同菌株のSODには、ともに3つのアイソザイムが認められ、前者は全てFe-SODであり、後者は1つのMn-SODと2つのFe-SODから構成されていること、3) 両精製酵素は分子量、等電点、アミノ酸組成、部分的なアミノ酸配列は一致していること、4) アポ化した両SODおよび金属を再配位させたSODは、同じ等電点をもつ単一のタンパク質であることなどが明らかとなった。

この論文は酸素毒性に対する *B. gingivalis* 381株のもつ防御機構を解析する上で、重要な知見を与えるものであり、歯学博士の学位に十分値するものと認める。