



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	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3052206
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

①

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

天野 敦雄

Purification, Characterization and
Induction by Oxygen of
Superoxide Dismutase from
Bacteroides gingivalis 381

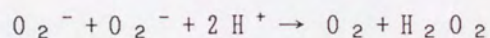
Atsuo Amano

緒言

生物への酸素障害は、反応性の低い酸素分子そのものよりも、より活性な分子種であるスーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2) やヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素によって生ずるといわれている。これらの活性酸素は、いずれも生体内で膜脂質、酵素タンパク質、DNAなどの酸化や脂肪酸からの脂肪酸ラジカルの形成の惹起などにより、種々の細胞機能を障害する¹⁻³⁾。一般に、生物はこれらの活性酸素による障害を防御するため、活性酸素を消去する機構として、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの活性酸素消去酵素や、活性酸素の消去低分子化合物（抗酸化剤）などを有している³⁾。

スーパーオキシドジスムターゼ (Super-oxide Dismutase ; EC 1.15.1.1, 以下SODと略す) は、 O_2^- 1分子が他の O_2^- 1分子を還元して H_2O_2 となり、一方の O_2^- は酸化されて O_2 と

なる自己酸化還元反応を，次に示すような反応を触媒する酵素である⁴⁾。



細菌のもつ SOD は，細菌が生育している環境下で，酸素による毒性や貪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⁵⁻⁷⁾。好気性菌は高い SOD 活性を有しているのに対し，偏性嫌気性菌には SOD 活性がみられないから，好気性菌の SOD 活性と菌の酸素に対する抵抗性との間には相関性があることが示唆された⁸⁾。しかし，その後，偏性嫌気性菌にも，低いながらも SOD 活性を保有しているものがあることが報告され⁹⁻¹³⁾，偏性嫌気性菌のもつ SOD 活性と酸素に対する抵抗性との関係が注目されるようになった。また，Nocardia asteroides¹⁴⁾ や Mycobacterium tuberculosis¹⁵⁾ などの強い病原性を有する菌株は，貪食細胞から放出される O_2^- を，細菌がもつ SOD によって消去することで，貪食細胞の攻撃から菌体を守ること

が示され、細菌の SOD は、細菌の病原性発現に重要な係わりをもつ酵素のひとつと考えられるようになった^{16, 17)}。

SOD には、活性中心に銅と亜鉛を含む Cu-Zn-SOD、マンガンを含む Mn-SOD および鉄を含む Fe-SOD が知られており、それぞれの SOD には、酵素学的性質に特徴がみられ、かつ、その分布も生物種や組織によってほぼ決まっている³⁾。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といわれている³⁾。例えば、Escherichia coli は、嫌氣的条件下で培養された場合には、Fe-SOD のみを有しているが、好氣的条件下においては、Fe-SOD、Mn-SOD およびハイブリッド SOD をもつようになる¹⁸⁾。また、これらの SOD のアポ酵素への金属の再配位実験の結果、アポ Fe-SOD は鉄との結合によってのみ酵素活性を回復し、アポ Mn-SOD では、マンガンとの

結合によってのみ酵素活性を回復する¹⁹⁾。
しかしながら、Propionibacterium shermanii²⁰⁾やStreptococcus mutans²¹⁾などの細菌では、生育培地の含有金属の種類に依存して、同一の酵素タンパク質から、Fe-SODまたはMn-SODが形成されることが示唆された。また、Bacteroides fragilisでは、嫌気的条件下にみられるFe-SODと酸素に暴露されることにより誘導合成されるMn-SODとは、同一の分子量とアミノ酸組成をもち、そのアポSODは鉄とマンガンの双方に結合して酵素活性を示すことが報告されており^{22,23)}、また、Bacteroides thetaiotaomicronでも同様な結果が得られている²⁴⁾。従って、これらの細菌では、鉄とマンガンの両方に結合特異性をもつ同一のアポSODタンパク質により、Fe-SODとMn-SODが生成されるという仮説が提唱され、E. coliの産生する酵素に代表されるSODとは異なった性質をもつSODの存在が示された。

Bacteroides gingivalisは成人性歯周炎の

患者から高頻度に分離され、また歯周疾患を引き起こす様々な病原性因子を備えていることから、本疾患の有力な原因菌として注目されている¹⁷⁾。B. gingivalisなどの歯周病原性菌が、歯周ポケット内に定着し、その病原性を発揮するためには、ポケット内の酸素や白血球、マクロファージにより放出される活性酸素に対して抵抗性を示すことが考えられ、これらの細菌のもつ酸素毒性に対する防御機構とその病原性の発現との間には、密接な関係があることが推測される。しかし、歯周病原性菌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、殆んど知見が得られていない。本研究では、歯周病原性菌として注目されている偏性嫌気性菌の一種である黒色色素産生性 Bacteroides 種（以下、Bacteroides と記載）の酸素代謝に関連するいくつかの酵素活性と酸素に対する抵抗性との関係を明らかにするとともに、酸素耐性に強く係わっていると考えられる SOD を、

嫌気培養および曝気された B. gingivalis 381
株菌体より分離精製し，精製酵素の生化学的
諸性質を比較検討し，本菌のもつ SOD の誘導
機構の一端を明らかにすることを目的として，
以下の実験を行った．

実験材料ならびに方法

1. 供試菌株

供試した菌株, Bacteroides gingivalis 381, SU-3, ATCC 33277, I-2-1株, Bacteroides loescheii ATCC 15930株, Bacteroides melaninogenicus ATCC 25845株, Bacteroides intermedius ATCC 25261, ESO-4, ESS-1株, Bacteroides denticola ATCC 33185, 4A-3-11株, Bacteroides levii ATCC 14015, JP-2-77 株はサンスター株式会社基礎研究所より分与を受けた。

これらの菌株を, 40 mg/mlのトリプチケースソイアガー (Baltimore Biological Laboratory; BBL, Cockeysville, Md., U.S.A.), 1mg/mlの酵母エキス末 (BBL), 5 μ g/mlのヘミン, 1 μ g/mlのメナジオン, 5% ヒツジ脱繊維血を含む血液寒天培地に接種し, 嫌気培養装置 (Forma Scientific Anaerobic System Model 1024; Morietta, Oh., U.S.A.)を用い, 嫌气的条件下 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂)に

て、35℃で培養を行い、1週間ごとに、新たな培地に継代培養して保存した。

2. 酵素標品

上記 Bacteroides 菌株を 1 mg/ml の酵母エキス末 (BBL), 5 μ g/ml のヘミン, 1 μ g/ml のメナジオンを含むトリプチケースソイブロス 10 ml に接種した。なお、以後、特に断わらない限り、同培養液は予め嫌氣的条件下に 48 時間以上、静置しておいたものを用いた。接種した培養液を嫌氣的条件下 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) で、約 30 時間培養を行い、この培養液を同培養液 290 ml に移し、同一条件下で対数的増殖期 ($A_{660} = 1.0$) まで培養した。培養液を 4℃ に冷却した後、8,000 x g, 30 分間の遠心操作により得られた菌体を、0.1 mM エチレンジアミン 4 酢酸ナトリウム (EDTA) を含む 50 mM リン酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.8) で、3 回洗浄した後、同緩衝液に懸濁し、超音波破碎装置 (Model UR-200P; トミー精工 (株), 東京) にて、氷冷下で、1 分間、5 回繰り返して処

理した。菌破砕液を $25,000 \times g$, 60 分間遠心し, 得られた上清を同緩衝液で, 24時間透析し, そのタンパク質濃度を $A_{280} \approx 0.100$ に調整したものを酵素標品とした。

3. 酵素活性の測定

SOD活性の測定は, McCordとFridovichの方法⁴⁾に準じて行った。反応液は 0.1mM EDTA, 0.05mM NaCN, 0.01mMチトクロームC(Grade III, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) および 0.1mM キサンチン(Sigma)を含む50mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH7.8)に, キサンチンオキシダーゼ溶液(Sigma)および酵素溶液を加え, 全量3mlとして反応を開始させた。なお, キサンチンオキシダーゼ溶液は, 550nmにおけるチトクロームCの還元による吸光度の増加が, $0.025 \pm 0.001/\text{min}$ (平均値 $\pm$ 標準偏差)となるように量を調整した。反応は 25℃で行い, 550nmにおけるチトクロームCの還元による吸光度変化を経時的に測定した。SOD活性はチトクロームCの還元速度を50%阻害す

る酵素活性を1ユニットと規定した。

NADH-オキシダーゼ活性の測定は、Higuchiの方法²⁵⁾により行った。反応液は0.1mM NADHを含む50mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH 7.0)に、適量の酵素溶液を加え、全量を3mlとし、反応を開始させた。反応は25℃で行い、340nmにおけるNADHの酸化による吸光度変化を経時的に測定した。酵素単位は1分間に1nmolのNADHを酸化する酵素活性を1ユニットとした。

4. タンパク質の定量

タンパク質の定量は、Lowryらの方法を改良したHartreeの方法²⁶⁾とBradfordの色素結合法²⁷⁾によって測定し、標準タンパク質として、ウシ血清アルブミン(Sigma)を用いた。

5. 酸素耐性の評価

供試菌の曝気は、Rolfeらの方法¹³⁾に準じて行った。Bacteroides 13株を保存培地より1mg/mlの酵母エキス末(BBL), 5μg/mlのヘミン, 1μg/mlのメナジオンを含む, トリプ

チケースソイブロス 10 mlに接種し，嫌氣的条件下（10% CO₂，10% H₂，80% N₂）にて，35℃，約30時間培養を行い，この培養液を同培養液 40 mlに移し，同一条件で対数的増殖期（Ass₈ ≒ 1.0）まで培養した．培養液を4℃に冷却した後，4,000 x g，20分間の遠心操作により得られた菌体を，寒天を含まないCary and Blair移送培養液（CBT培養液）²⁸⁾で，3回洗浄した後，同培養液にて懸濁し，10⁸ colony forming units (CFU)/mlとなるように濁度を調整した．曝気による酸素耐性を評価するために，調製した菌懸濁液 5mlを嫌氣的条件下で，滅菌シャーレ（90 x 20 mm）に移した後，懸濁液を攪拌しながら，35℃にて空気中で曝気を行った．また，対照として，嫌氣的条件下で同様の操作を行った．曝気開始後，0.5，1，2，4，8，12時間後およびその後12時間間隔で7日間，その都度，曝気，対照双方のシャーレより，それぞれ 0.1mlの懸濁液を採取し，還元したCBT培養液で連続10倍希釈を行った．

0.1 ml の希釈懸濁液を 40 mg/ml のトリプチケースソイアガー (BBL), 4 mg/ml の寒天, 1 mg/ml のグルコース, 0.5 mg/ml の硝酸カリウム, 0.5 mg/ml のギ酸ナトリウム, 1 mg/ml のフマル酸ナトリウム, 1 mg/ml の酵母エキス末 (BBL), 5 μ g/ml のヘミン, 1 μ g/ml のメナジオンおよび 5% ヒツジ脱繊維血を含む血液寒天培地表面に均一に接種し, 嫌気的条件下で 35°C, 5 日間, 培養を行い, 形成されたコロニー数より生菌数を求めた. 対照とした菌懸濁液でも経時的に生菌数が減少したため, 曝気した菌懸濁液の生菌数を, 曝気後, 同時点での対照の生菌数で除した値より, 曝気による生菌数の経時的な減少曲線を求めた. 1 菌株につき同実験を 3 回行った. 酸素耐性の評価は Moats の方法²⁹⁾に準じ, 生菌数が対数的に半減する曝気時間 (T_{50}) を指標とした.

6. 曝気による酵素活性の誘導

供試菌株を嫌気的条件下で, トリプチケースソイブロス 500 ml にて, 35°C, 48 時間,

対数的増殖期まで培養した。その培養液を、100 ml づつ5つに分けた後、それぞれ遠心して得られた菌体を、100mlの新しい培養液で、500mlのナス型フラスコに懸濁した。この5つに分けられた菌懸濁液のひとつを嫌氣的条件下にて、35℃、2時間培養した。残りの4つの菌懸濁液は、好氣的条件下で保存しておいた培養液に懸濁し、酵素誘導を抑えるために氷冷下に静置したものと、空気中で震盪しながら、35℃での培養を、それぞれ30、60および120分間行ったものとに分けた。培養後、それぞれの培養液より、先述したと同じ方法で、酵素標品を調製した。

7. 電気泳動および分子量の測定

1) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)はPhast System (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) を用い、通法に従って行った。酵素標品を2.5%ドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate;

SDS), 1mM EDTA, 0.01% ブロムフェノールブルー および 5% β -メルカプトエタノールを含む 10mM トリス塩酸塩緩衝液 (pH 8.0) 30 μ l に溶解した後, 100°C, 5 分間熱処理した. また, 還元処理を行わない場合は, メルカプトエタノールを含まない同緩衝液に精製標品を溶解し, 室温にて, 30 分間放置した. 0.0112M 酢酸 および 0.11M トリスアミノメタンを含む Phast Gel Gradient 10-15 (Pharmacia LKB) を支持体として, 緩衝液は 0.20M トリシン, 0.20M トリス および 0.55% SDS を含む PhastGel SDS Buffer Strips (Pharmacia LKB) を用い, 15°C, 10mA で 30 分間泳動した. 泳動後, タンパク質をクマシー・ブリリアントブルーを用いて染色した. 分子量測定用標準タンパク質標品 (Pharmacia LKB) として, フォスフォリラーゼ b (94K), ウシ血清アルブミン (67K), 卵白アルブミン (45K), 炭酸脱水酵素 (30K), 大豆トリプシンインヒビター (20K) および α -ラクトアルブミン (14K) を用いた.

2) ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動

ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動 (Native-PAGE) は, Davisの方法³⁶⁾に従い, 7.5%のゲルを支持体として精製標品の泳動を行った. ゲル(0.4x12cm)をガラスカラムに調製し, 2mA/tubeの条件下で, 3時間泳動した. タンパク質はクマシー・ブリリアントブルーで染色した. また, SOD活性の検出は, ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)法³¹⁾に準じて行った. 即ち, 電気泳動終了後, 2.45mM NBT 50 ml中にゲルを20分間浸し, 続いて28mM N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミンと28μMリボフラビンを含む36mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH7.8)50ml中に15分間浸した. その後, 約15分間蛍光灯(30W)を照射し, SOD活性が存在する部分は, 白色帯として色がぬけることで判定した.

Fe-SODとMn-SODの判別³²⁾は, 電気泳動終了後, ゲルを1mMNaCN, 2mMH₂O₂を含む50mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH7.8)50ml中に1時

間浸した後，NBT法によりSOD活性を検出した．
活性バンドの位置は直線密度走査計（Model
CS 910；島津製作所，京都）を用いて決定した．

3) 等電点電気泳動

等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動
（IEF-PAGE）はPhast System（Pharmacia LKB）
を用い，精製標品の泳動を通法に従って行っ
た．支持体として，両性担体 Pharmalyte
（Pharmacia LKB）を含む，均一な濃度のポリ
アクリルアミドゲルであるIEF PhastGel 3-9
（Pharmacia LKB）を用い，等電点測定用標準
タンパク質標品（Pharmacia LKB）により，精
製標品の等電点を測定した．

4) 生体高分子用高速液体クロマトグラフィー （Fast Protein Liquid Chromatography ; FPLC）

精製した酵素の均一性と分子量を確認する
ため，Superose 12（Pharmacia LKB）カラムに
よるゲルろ過を行った³³⁾．既知タンパク質
として，アルドラーゼ（158K），ウシ血清アル

ブミン (67K), 卵白アルブミン (43K) および チトクローム C (12K) を用いた. 精製標品 (約 100 μ g) ならびに既知タンパク質を 50mM リン酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.8) で平衡化した同カラムに展開し, 流速 0.4 ml/min で, 0.5 ml ごとに分取した. 280 nm における吸光度にてタンパク質を検出し, 分画後ただちにその画分中の SOD 活性を測定した.

5) 高速液体クロマトグラフィー

精製した酵素の均一性を確認するために, 635 型 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) システム (日立製作所、東京) を用いた Waters C4-300A (0.39 x 15 cm, Millipore Co., Milford, Mass., U.S.A.) 逆相カラムに精製酵素を展開し, 0.1% トリフルオロ酢酸溶液と 0.06% トリフルオロ酢酸を含むイソプロパノール-アセトニトリル (7/3 容量比) 溶液による直線的濃度勾配法によりタンパク質を溶出させた. 215 nm における吸光度にてタンパク質を検出

し、その均一性を確認した。

8. 吸収スペクトルの測定

適量の精製酵素標品を50mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH7.8)3mlに溶かし、タンパク質濃度が0.24mg/mlになるように調整し、光路1cmのシリカセルを用いて、710nmから240nmの吸収スペクトルを、島津UV-265FW型分光光度計(島津製作所)で測定した。

9. 含有金属量の測定

精製酵素の含有金属量の測定は、30mM酢酸アンモニウム塩緩衝液(pH6.0)5mlに溶解した標品約2mgを、同緩衝液にて平衡化したChelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Calif., U.S.A.)中を流速2ml/minで、数回通過させ、溶液中の金属イオンを除去した後、標品を凍結乾燥し、タンパク質濃度を1mg/mlになるよう調整した後、原子吸光度計(AA-8500; Nippon Jarrell-Ash, 京都)により行った。

10. SODのアポタンパク質の調製およびSODへの金属の再配位

酵素のアポ化および金属の再配位は, GregoryとDapperの方法²²⁾に準じて行った. SODのアポ化は, 精製標品を20mM 8-ヒドロキシキノリンを含む5M塩酸グアニジン (pH3.2) 溶液中で, 18時間透析を行った後, 5M塩酸グアニジン (pH3.2) 溶液中で, 再度8時間透析を行った. さらに, 20mMトリス塩酸塩緩衝液 (pH7.0) 中で, 12時間透析を行い, 塩酸グアニジンを除去した.

SODへの金属の再配位は, アポ化SOD 0.5mgを20mMトリス塩酸塩緩衝液 (pH7.0) 2mlに溶かし, 1mM MnCl_2 または 1mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ を含む同緩衝液 (pH7.0) 中にて12時間透析した後, さらに, 1mM EDTAを含む同緩衝液に対して12時間透析を行い, 余剰の金属イオンを除去した.

11. アミノ酸分析

精製酵素3nmolを100 μ lの0.2%フェノールを含む5.7M共沸塩酸に溶解し, 減圧封管した試験管中で, 110 $^{\circ}\text{C}$, 24時間の加水分解を行っ

た後、アミノ酸分析装置 (835 S Amino Acid Analyzer; 日立製作所) で分析した³⁴⁾。システインの分析³⁵⁾は、精製酵素を過ギ酸で酸化した後、上記の方法で定量し、トリプトファンの分析³⁴⁾は、0.2%トリプタミン存在下、共沸塩酸の代わりに、4Mメタンスルホン酸を用いて加水分解した後、分析を行った。

12. アミノ酸配列の決定

嫌氣的条件下で培養した *B. gingivalis* 381 株菌体から精製・調製されたアポ化 SOD 20 nmol を 120 μ l の 10mM トリス塩酸塩緩衝液 (pH 9.5) に溶解し、*Achrombacter* プロテアーゼ I (和光純薬㈱, 大阪) を酵素 / 基質 = 1/200 (モル比) の割合で加え 35℃, 6時間の消化を行い、SODタンパク質をリジル残基のC末端側で切断した。プロテアーゼ消化により生成した断片ペプチドを Waters C4-300A (0.39x15cm, Millipore Co.) 逆相カラムを用いた HPLC により分離精製した。各断片ペプチドを凍結乾燥した後、アミノ酸分析を上記の方法により行

い、各ペプチドのアミノ酸組成を決定した。アミノ酸配列の決定は、477A気相式シーケンサー (Applied Biosystems, Inc., Foster-city, Calif., U.S.A.) を用い、自動エドマン法により、3-フェニル-2-チオヒダントイン誘導体 (PTH-AA) を生成させ、PTH-AAを単一溶媒溶出法により同定し、各断片化ペプチドのアミノ酸配列を決定した³⁶⁾。さらに、各断片化ペプチド間の相互配列を決定するために、酵素/基質 = 1/500 (重量比) の割合で、*Pseudomonas fragi* 由来のエンドプロテイナーゼ Asp-N (Boehringer Mannheim GmbH, West Germany) を添加し、アポ化 SOD をアスパラギン酸残基の N-末端側で切断した。また、無水酢酸を用いて、全リジル基の ϵ -アミノ基をアセチル化したアポ化 SOD に、酵素/基質 = 1/100 (モル比) の割合で L-1-(p-トリルアミノ)-2-フェニルエチルクロロメチルケトン処理したウシトリプシン (Type III, 和光純薬株) を添加し、アルギニン残基の C-末端側で

の切断を行い，上記と同様にして，各切断ペプチドの構造解析を行い，SODの全一次構造を決定した³⁶⁾。

曝気を行った B. gingivalis 381株より精製されたSODのN-末端分析は，700 pmolのアポ化SODをN-末端から直接477A気相式シーケンサーで分析した。

実験結果

1. 供試した Bacteroides 13株の酸素代謝に係わる酵素活性

供試した Bacteroides 13株の菌体のもつ酸素代謝に係わる酵素活性を表1に示した。供試菌の全てが、SODおよびNADH-オキシダーゼ活性を有し、B. gingivalisは供試した Bacteroidesの中で、両酵素ともに最も高い活性を示した。B. denticolaでは、SOD活性は低かったが、NADH-オキシダーゼ活性は中等度であった。B. intermediusでは、両酵素活性とも低い値を示した。

2. 供試した Bacteroidesの酸素耐性

Bacteroides13株の酸素耐性の結果を表1に示した。全ての供試菌株の生菌数は、曝気により、経時的に放物線状の減少を示し、 T_{50} 値が78から104時間を示すB. gingivalisが、最も高い酸素耐性を有しており、また、B. denticolaは T_{50} 値が8から11時間となり、供試菌株の中で、最も低い酸素耐性を示した。

図 1 に各供試菌株の酸素耐性と SOD および NADH-オキシダーゼの酵素活性との相関性を示した。両酵素活性とも酸素耐性との間に正の相関性が認められ、SOD 活性と酸素耐性との相関係数は、0.814であり、NADH-オキシダーゼの酸素耐性との関係 ($r = 0.683$) よりも強い相関性が認められた。

3. 曝気による酵素の誘導

供試菌株の中で、最も高い酸素耐性を示した B. gingivalis 381株と、酸素に対する耐性が最も低い B. denticola ATCC 33185株を用いて、曝気による SODと NADH-オキシダーゼの誘導性を調べた。図 2に示すように、酸素耐性菌株である B. gingivalis 381株では、2時間の曝気により SOD活性は約 2倍、NADH-オキシダーゼ活性は約 1.5倍の増加が認められたが、B. denticola ATCC 33185株では、両酵素活性ともに、活性の上昇は全く認められなかった。

4. B. gingivalis 381株の SODの精製

Bacteroides の酸素耐性に強く係わってい

ると考えられる SOD を、嫌氣的培養および曝氣された B. gingivalis 381 株より分離精製した。

1) 嫌氣的に培養された菌体から精製した SOD
(anaero-SOD)

嫌氣的条件下で、35℃、30 時間培養した合計 20 g の同菌株培養液より得られた菌体約 100 g (湿重量) を 50 mM リン酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.0) で、3 回洗浄した後、同緩衝液に懸濁し、超音波処理を加えた菌破砕液を遠心し、その上清画分 180 ml を粗標品として用いた。

得られた上清を硫酸 50% 飽和で塩析し、3 時間攪拌後、25,000 x g、30 分間の遠心を行った。その沈渣には、SOD 活性はほとんど認められず、SOD 活性を示す上清画分 197 ml を精製操作に用いた。

50% 飽和の硫酸を含む 50 mM リン酸カリウム塩緩衝液 (pH 7.8) にて平衡化した Phenyl-Sepharose CL-4B カラム (1.8 x 10 cm; Pharmacia LKB) に、硫酸塩析によって得られた上清画分

40 ml を吸着させ，50% 飽和の硫安を含む同緩衝液で洗浄した後，直線的濃度勾配法により，硫安を30%飽和から0%まで変化させて，吸着画分を溶出させた．流速は15 ml/hで，4 ml ごとに分取した．SOD活性は約10%飽和の硫安で溶出される画分にのみ認められ，その他のタンパク質画分には，SOD活性はみられなかった．

Phenyl-Sepharoseクロマトグラフィーにより得られたSOD活性画分を，5 mMリン酸カリウム塩緩衝液（pH 8.5）で透析した後，この画分40 ml を同緩衝液で平衡化したQ-Sepharose Fast Flow（Pharmacia LKB）を充填したカラム（3.2 x 10 cm）に吸着させ，直線的濃度勾配法により，0.3 Mまで塩化ナトリウム濃度をあげて試料を溶出させ，最後に，1 M塩化ナトリウムを含む同緩衝液によって，強くカラムに吸着した画分を溶出させた．流速は1 ml/minで，2 ml ごとに分取した．SOD活性は塩化ナトリウムの濃度0.1 M付近に溶出したタンパク質画分にのみ認められた．

Q-Sepharose クロマトグラフィーで得られた SOD 活性画分を、UK-20 のフィルター（東洋ろ紙（株），東京）を用いて限外ろ過を行い，分子量 20K 以上のタンパク質を濃縮後，50mM リン酸カリウム塩緩衝液（pH7.8）で透析した．この画分 0.5 ml を同緩衝液で平衡化した Superose 12 カラム（1x27cm; Pharmacia LKB）に FPLC System を用いて，ゲルろ過を行った．流速は 0.4 ml/min で，0.5 ml ごとに分取した．溶出容量が 14.2 ml のところに，左右対称のタンパク質ピークが認められ，このピークに一致して SOD 活性がみられた．他のタンパク質画分は SOD 活性を示さなかった．以上の精製の各段階における結果を表 2 にまとめた．精製酵素標品の比活性は 931 ユニット/mg タンパク質であり，粗標品の 272 倍に精製され，その回収率は 49% であった．

2) 曝気された菌体から精製した SOD (aero-SOD)

嫌氣的条件下で，35℃，26 時間培養した合

計 20g の同菌株培養液より得られた菌体約 95g (湿重量) を好氣的条件下で保存した 30g の同培養液に再懸濁し、振盪しながら、空气中で 35℃、6時間の曝気を行った。遠心後、得られた菌体約 100g (湿重量) を 50mMリン酸カリウム塩緩衝液 (pH7.0) で 3回洗浄した後、同緩衝液にて懸濁し、超音波処理を加えた菌破碎液を遠心し、その上清画分 178ml を粗標品として用いた。

嫌氣的培養を行った場合と同様に、硫安処理を行い、SOD活性を示す上清画分 183ml を Phenyl-Sepharose CL-4B による疎水性クロマトグラフィーによって分画し、約 10%飽和の硫安で溶出される画分にのみ SOD活性を認めた。

Phenyl-Sepharoseクロマトグラフィーにより得られた SOD活性画分を、20mMリン酸カリウム塩緩衝液 (pH8.5) で透析した後、この画分 20ml を同緩衝液で平衡化した Mono-Qカラム (0.5x5cm; Pharmacia LKB) に吸着させた。流

速は 1ml/minで、2mlごとに分取した。SOD活性は非吸着画分にのみ認められた。

Mono-Qカラムクロマトグラフィーにより得られたSOD活性画分を、5mMリン酸カリウム塩緩衝液 (pH8.5)で透析した後、この画分40mlを同緩衝液で平衡化したQ-Sepharose Fast Flowに吸着させ、直線的濃度勾配法により、0.3Mまで塩化ナトリウム濃度をあげ、試料を溶出させた。流速は1ml/minで、2mlごとに分取した。SOD活性は嫌氣的培養の場合と同じく、塩化ナトリウムの濃度0.1M付近に溶出したタンパク質画分にのみ認められた。以上の精製の各段階における結果を表3にまとめた。精製酵素標品の比活性は1,438ユニット/mg タンパク質であり、粗標品の240倍に精製され、その回収率は36%であった。

5. 精製した anaero-SODと aero-SODの一般的性質

1) 両精製酵素の均一性および分子量

図 3に示したように、Superose 12 カラム

によるゲルろ過法によって測定した両精製酵素標品の分子量は、約46,000と推定された。図4は両精製酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、クマシー・ブリリアントブルーでタンパク質の染色を行ったものである。両精製酵素は推定分子量約23,000に相当するところに、単一のバンドとして検出された。また、 β -メルカプトエタノールによる還元処理を行わなかった場合でも、同様の結果が得られた。上記の結果から、両精製酵素は分子量約46,000で、ジスルフィド結合をもたない2つの同じ分子量をもつサブユニットからなることが示唆された。

2) 両精製酵素の含有金属量

anaero-SODは1分子あたり Fe:1.79 g原子, Mn:0.28 g原子, Cu:0.08 g原子, Zn:0.17 g原子の金属を含有しており, aero-SODは1分子あたり Fe:0.36 g原子, Mn:1.08 g原子, Cu:0.09 g原子, Zn:0.23 g原子の金属を含有していた。

3) 吸収スペクトル

図5は両精製酵素の240nmから710nmまでの吸収スペクトルを示しており、両酵素ともに、280nmで極大吸収を示し、292nmで肩をもつ吸収スペクトルがみられた。260nmに対する280nmでの吸光度の比率は1.8であり、精製標品には核酸がほとんど存在しないと考えられた。280nmでの分子吸光係数は $8.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。また、anaero-SODはFe-SODの吸収スペクトルの特徴である350nmに特有な吸収を示し、aero-SODは475nmにMn-SODの特有な吸収を示した。

6. 電気泳動

1) 精製SODのNative-PAGE

図6に精製したanaero-SODとaero-SODを用いて、Native-PAGEを行った後、NBT法により、SOD活性を検出したゲル(a; anaero-SOD, c; aero-SOD)とタンパク質を染色したゲル(b; anaero-SOD, d; aero-SOD)を示した。タンパク質を染色したゲルでは、両精製標品には、

2本の明瞭なタンパク質バンドと、より陽極側に認められる1本の染色の弱いタンパク質バンドがみられた。SOD活性を示すゲルでは、これら3本のタンパク質バンドに一致して、白くぬけた染色されない3本のバンドが認められた。この結果より、両SODはそれぞれ3つのアイソザイムをもつことが示された。これらのアイソザイムが、Fe-SODかMn-SODかのどちらに属するかを判別するために、anaero-SODとaero-SODを上記の条件で、Native-PAGEを行った後、ゲルを $2\text{mMH}_2\text{O}_2$ 存在下で、SOD活性の検出を試みた。その結果、図7に示したように、anaero-SODの3つのアイソザイムは、完全に不活性化されたが、aero-SODでは陽極側への易動度の大きい2本のバンドは不活性化されたが、陰極側の最も活性の強いバンドは、僅かに活性の減少を示したのみであった。この結果より、anaero-SODは3つのFe-SODのアイソザイムからなるのに対して、aero-SODは活性の最も強い1つのMn-SODと、活性の弱い

2つのFe-SODを含んでいることが示唆された。

2) 精製SODおよびアポSODのIEF-PAGE

両精製SODを用いて、IEF-PAGEを行った結果、図8に示すように、両SODともに、pIが5.25, 5.10, 5.00の3つのタンパク質バンドに分かれた。一方、アポ化した両SODは、ともに、pIが5.30の均一なタンパク質バンドを示した。

3) 金属を再配位した両SODのNative-PAGE

Fe^{2+} または Mn^{2+} を再配位させた両SODを、Native-PAGE上に展開し、タンパク質とSOD活性を染色した。図9に示すように、金属を再配位したSODは、全てタンパク質または活性バンドは単一であり、このバンドの位置は、精製SODの最も陰極側のバンドに一致していた。

7. 再構築したSODの活性の阻害および不活性化

両精製SODのアポ化と再構築したSOD活性の NaN_3 による阻害および H_2O_2 による不活性化の

結果を表 4 に示した。anaero-SOD は活性測定系に添加した 5 mM NaN_3 により、80% の活性阻害を受け、また、1 mM H_2O_2 に 25℃、20 分間の浸漬により 68% 不活性化された。一方、aero-SOD に対しては 5 mM NaN_3 による活性阻害は 26% と弱く、1 mM H_2O_2 による不活性化も 30% であった。しかし、両酵素ともに、アポ SOD は活性を全く示さなかった。

両アポ SOD の金属特異性を調べるために、実験方法で述べたようにして、 Fe^{2+} または Mn^{2+} を再配位させた。表 4 に示すように、anaero-SOD の Mn^{2+} による再構築では、未処理の活性の 69% の活性を示し、 Fe^{2+} でも 25% の活性の回復を示した。また、aero-SOD においても、 Mn^{2+} により 58%、 Fe^{2+} により 36% の活性の回復を示した。両アポ SOD において、 Fe^{2+} による再構築をした酵素は、5 mM NaN_3 による活性阻害が 70 から 80% みられ、1 mM H_2O_2 による不活性化も 60 から 80% の値を示した。一方、 Mn^{2+} により再構築した場合は、両アポ SOD と

もに, 5mM NaN_3 による活性阻害は約15%, 1mM H_2O_2 による不活性化も約25%と低い値であった。

8. 両精製 SODのアミノ酸分析およびアミノ酸配列

両精製 SODのアミノ酸分析の結果を表5に示した。各アミノ酸組成の差は, 約10%以内であり, 両 SODのアミノ酸組成の相同性は非常に高いものであった。anaero-SODのタンパク質一次構造を図10に示した。一次構造は191個のアミノ酸残基よりなる1本鎖ポリペプチドであり, 一次構造解析より得られたアミノ酸組成は, アミノ酸分析より求めた値とほぼ一致した。図10に示すように, Achrombacter プロテアーゼ消化で得られた断片化ペプチドとエンドプロテイナーゼ Asp-N消化およびウシトリプシン消化により得られたペプチドのアミノ酸配列を決定し, これらペプチドを重ね合わせることにより, 各ペプチドの相互配列を解析した。また, aero-SODをプロテアー

ぜ処理を行わず，気相シーケンサーを用いて，N-末端分析を行った結果，N-末端のメチオニン残基から36番目のチロシン残基までを同定することができ，そのアミノ酸配列は，図10に示す anaero-SOD のそれと完全に一致した。

考 察

本研究では、供試した Bacteroides の全ての菌株から SOD 活性と NADH-オキシダーゼ活性が認められた。しかし、結果には示さなかったが、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ヨード-ペルオキシダーゼ、 NAD^+ -ペルオキシダーゼおよび NADP^+ -ペルオキシダーゼの酵素活性は、いずれの菌株においても、検出されなかった。また、供試菌株の酸素耐性と SOD 活性の間には高い相関性がみられ、酸素耐性と NADH-オキシダーゼとの間にもやや高い相関性が認められた。これら結果は、Bacteroides のいくつかの株に SOD 活性が認められ⁹⁻¹²⁾、しかも、その酸素耐性は、主として SOD 活性に依存しているという報告^{5-7, 37)}や、細菌の酸素耐性を決定する重要な因子のひとつとして、NADH-オキシダーゼ活性を指摘している報告²⁵⁾と一致する。細菌を曝気することによってこれら酵素が誘導されることは、SOD については、E. coli^{18, 37)}、B. fragilis

22.23), B. thetaiotaomicron²⁴⁾, Streptococcus sanguis²⁾, S. mutans³⁸⁾などで, また, NADH-オキシダーゼはS. mutans²⁵⁾で起こることが報告されている. 本研究でも, 酸素耐性の高いB. gingivalis 381株では, SODとNADH-オキシダーゼ両活性ともに, 曝気により酵素活性が誘導された. 一方, 酸素耐性の低いB. denticola ATCC 33185株では誘導はみられなかった. これらの結果より, B. gingivalisなどの歯周病原性菌が, 歯周ポケット内に定着し生息する際には, この菌のもつSODやNADH-オキシダーゼが重要な役割を担っている可能性が示唆される.

上述の如く, 本研究により, B. gingivalisの酸素耐性にはSOD活性が強く係わっており, また, 曝気により本酵素が誘導されることが明らかとなった. そこで, 嫌氣的条件下で培養されたB. gingivalis 381株菌体および曝気された同菌体に存在するSODの酵素学的性質について, 詳細に比較検討した. B. gingi-

valis 381株を 6時間曝気すれば, 比活性は 3.4 ユニット/mg タンパク質 から 6.0 ユニット/mg タンパク質 と増加した. 比活性の増加は, 約 2倍程度にすぎなかったが, 粗標品を得るために行った超音波による菌体の破碎処理において, 嫌氣的培養の場合は, 菌 1g (湿重量)あたりから約 6mg, 曝気を行った場合は, 約 3倍の 16mg が抽出され, 菌 1g (湿重量)あたりから得られた SOD活性としては, 嫌氣的培養の場合は約 20ユニット, 曝気を行うと約 96ユニットであり, 活性の増加は約 5倍となった. 嫌氣的培養に比べ, 曝気を行った場合の粗標品中のタンパク質濃度の増加は, 曝気により細菌の細胞表層構造に異常をきたしたり, 細胞質膜や細胞質が傷害を受け³⁷⁾, 菌体自身が脆弱となり, 超音波により破碎されやすくなったためと思われる.

anaero-SODとaero-SODの均一性については, FPLCシステムを用いた Superose 12 ゲルろ過カラム, SDS-PAGEおよび HPLCを用いた逆相ク

ロマトグラフィーによって両酵素標品が単一物質であることを確認した，両酵素ともに，推定分子量約23,000の2つのサブユニットよりなると推定された．他の菌株由来のSODの推定分子量は，S. mutansでは約43,000³⁸⁾，B. fragilisでは約42,000^{22,23)}およびB. thetaiotaomicronでは約46,000²⁴⁾であり，いずれも2つの等しい分子量をもつサブユニットからなっており，本研究の結果とよく類似している．

anaero-SOD, aero-SODの吸収スペクトルは，anaero-SODはFe-SODの特徴³⁹⁾を，aero-SODはMn-SODの特徴⁴⁰⁾を示した．金属含有量の測定結果から，anaero-SODの含有金属の77%はFeで，aero-SODのそれは61%がMnであった．また，含有金属の合計量は，anaero-SODが2.32 g原子/mol SOD, aero-SODが1.76 g原子/mol SODであり，この結果から，両SODは1つのサブユニットあたり，1つの金属結合部位をもつと考えられる．SODの一般的性質とし

て、Fe-SOD は NaN_3 により活性が阻害され、 H_2O_2 により不活性化されるのに対して、Mn-SOD ではそれらの影響は非常に弱いものであることが知られている³²⁾。両精製SODの NaN_3 および H_2O_2 による阻害実験の結果は、anaero-SODは NaN_3 での活性阻害や、 H_2O_2 による不活性化を受けやすく、aero-SODはそれらの影響をあまり受けなかった。以上の結果から、anaero-SODは主としてFe-SODからなり、aero-SODは主としてMn-SODからなると考えられた。

しかしながら、精製したanaero-SODおよびaero-SODのNative-PAGEならびにIEF-PAGEの結果、それぞれの精製酵素標品には3つのアイソザイムが存在することが分かった。また、確認実験として、精製したanaero-SODとaero-SODを混合して同様の実験を行っても、同じく3本のバンドがみられ、anaero-SOD、aero-SODともに等電点が相応し、分子量も同じである3つのアイソザイムをもつことが明

らかとなった。なお、anaero-SOD, aero-SODの粗標品をnative-PAGEで展開し、活性染色を行っても、同じ位置に3本の活性バンドが確認された。H₂O₂による不活性化実験により、anaero-SODは3つのアイソザイムすべてがFe-SODであるのに対して、aero-SODは主たる活性を示す1つのMn-SODと2つのFe-SODからなることが示された。これらの3つのアイソザイムの活性の比は、anaero-SOD, aero-SODともに同程度であった。さらに、結果には示していないが、嫌氣的培養後、タンパク質合成阻害剤であるピューロマイシン(20 μg/ml)を培地に加えて曝気を行うと、曝気後のSODの誘導は3つのアイソザイム全てにおいてみられず、また、分離したSOD活性はanaero-SODと同じFe-SODの特徴を示した。これらの結果を考え合わせると、B. gingivalis 381株では曝気により、Mn-SODだけではなく、Fe-SODも新たに誘導されることが示唆された。嫌氣的条件下で培養されたE. coli^{18,37)}, B. fragilis

22, 23) および *B. thetaiotaomicron*²⁴⁾ より分離・精製された SOD では、いずれもアイソザイムの存在は示されていない。曝気による SOD の誘導は、*B. fragilis* では嫌氣的条件下で得られた Fe-SOD と等しい等電点をもつ Mn-SOD のみが誘導され、Fe-SOD は認められなかったという²³⁾。曝気を行った *E. coli* では、分子量、等電点の異なる 3 つのアイソザイム、Mn-SOD、Fe-SOD およびハイブリッド SOD が認められたが、曝気により Mn-SOD とハイブリッド SOD の誘導が起こるけれども、Fe-SOD の誘導は、みられなかったと報告されている³⁷⁾。従って、本研究でみられた曝気による Fe-SOD の誘導は、非常に興味ある現象とすることができよう。

anaero-SOD と aero-SOD を、塩酸グアニジンおよび 8-ヒドロキシキノリンの処理により、金属イオンを除去しアポ化すると、アポ anaero-SOD、アポ aero-SOD とともに IEF-PAGE において、1 つのタンパク質バンドのみしか示

さなかった。これらのアポ SOD を $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または MnCl_2 を含むトリス塩酸緩衝液で透析し、それぞれの金属イオンと結合させると、SOD 活性が再び発現されたが、Native-PAGE 上においては、1つの活性およびタンパク質バンドしかみられなかった。このことは、anaero-SOD, aero-SOD それぞれに含まれている3つのアイソザイムは、1つのコアタンパク質であるアポタンパク質よりなることを強く示唆している。また、 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ でアポ anaero-SOD とアポ aero-SOD への金属の再配位を行った場合、それらの SOD 活性は Fe-SOD の特性を示し、 MnCl_2 による再配位の場合には、Mn-SOD の特性がみられた。anaero-SOD, aero-SOD とともに、鉄やマンガンといった結合金属に対しての特異性は強くないと考えられる。また、結果には示していないが、本精製 SOD の場合、 Fe^{2+} または Mn^{2+} と一緒に Cu^{2+} , Zn^{2+} の金属塩を添加し、再配位を行ったところ、添加しなかった場合と比べ、 Cu^{2+} , Zn^{2+}

の添加量に比例してSOD活性の回復率は減少した。この結果より、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} は酵素活性の発現には寄与しないが、 Fe^{2+} または Mn^{2+} に競合的にアポSODの金属結合部位に配位すると考えられ、SODの金属結合部位は、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 以外の2価金属イオンでも配位が可能であると思われる。

Fe-SODの全一次構造が明らかにされているのは、現在まで E. coli⁴¹⁾、Photobacterium leiognathi⁴²⁾および Pseudomonas ovalis⁴³⁾由来の3つのFe-SODのみである。また、鉄とマンガンの両方を配位できるSODの一次構造解析については、まだ報告をみない。表6に一次構造の明らかにされている代表的なSOD間のアミノ酸配列⁴¹⁻⁴⁶⁾の相同性についてまとめてみた。本anaero-SODは他のFe-SODとは47.6-51.3%と高いアミノ酸配列の相同性を示したものの、E. coli、Ph. leiognathiおよび Ps. ovalisのFe-SOD間の相同性は65.1-74.0%であることを考えると、本anaero-SODは、こ

れまでに明かとなっている Fe-SOD 間にみられるような高い相同性は認められなかった。本 anaero-SOD と他の SOD との全一次構造⁴¹⁻⁴⁶⁾の相同性の詳細な比較を図 11 に示した。本 anaero-SOD を含む全ての SOD について一致するアミノ酸残基は 41ヶ所と多くみられ、また、ポリペプチド鎖の構造の維持に特異的な役割を果たすと考えられているグリシン⁴²⁾の配列位置もよく類似しており、Fe-SOD と Mn-SOD には、構造的に高い相同性が存在するという過去の報告に合致した結果が得られた。また、E. coli⁴⁷⁾ と Ps. ovalis⁴⁸⁾ の Fe-SOD および Thermus thermophilus⁴⁹⁾ の Mn-SOD 酵素タンパク質の X 線構造解析により、SOD の金属との結合部位が明かにされており、この結合部位は Fe-SOD と Mn-SOD とともに図 15 に ★ 印で示した、His²⁷, His⁸², Asp¹⁷¹, His¹⁷⁵ である。この金属結合部位のアミノ酸残基は、本 anaero-SOD もその他の SOD も一致しており、本 anaero-SOD の金属結合部位も同位置にある

と推測される。

しかし、本 anaero-SOD と他の Fe-SOD が一致し、かつ、他の Mn-SOD と一致しないアミノ酸残基は、18 部位であったが、逆に、本 Fe-SOD と他の Mn-SOD が一致し、かつ他の Fe-SOD と一致しないアミノ酸残基は 14 部位もみられた。なお、他の全ての Fe-および Mn-SOD が一致したアミノ酸残基をもつ部位で、本 anaero-SOD のみが異なる残基をもつ部位は 5ヶ所であった。これらの結果から、本 anaero-SOD の一次構造の特徴として、Fe-SOD と Mn-SOD の双方にある程度高い相同性を示し、構造的に Fe-SOD と Mn-SOD の中間的な位置にあると考えられ、このことは本 Fe-SOD のように鉄とマンガンの両方を配位できる SOD の構造的特徴を示しているのかもしれない。aero-SOD のアミノ酸配列は、anaero-SOD のそれと 36 残基目までは全く等しい配列をもつものであり、aero-SOD の一次構造も anaero-SOD と同様な特徴を示すものであると推測されるが、aero-SOD の一次構

造については、今後も継続して解明していく予定である。

緒言でも述べたように、多くの菌株では、同一菌株が有する Fe-SOD と Mn-SOD とは異なる酵素タンパク質から構成されと考えられている。そして、それらの例外として B. fragilis, B. thetaiotaomicron, P. shermanii および S. mutans などの細菌は、同一の酵素タンパク質から Fe-SOD, Mn-SOD を構築することが報告されている^{20-24, 38}。 B. gingivalis 381株のもつ 2つの SOD は、ともに分子量約 46,000, サブユニットは約 23,000 であった。また、Native-PAGE および IEF-PAGE においてみられた本酵素の 3つのアイソザイムは、ともに等しい易動度および等電点を示した。さらに、ホロ SOD より金属イオンを取り去ったアポ SOD は、ともに pI が 5.30 の均一なタンパク質であった。そして、アポ SOD は再配位させた金属により、それぞれ Fe-SOD または Mn-SOD としての酵素的特性を示した。以上の結果と、

アミノ酸分析およびN-末端アミノ酸配列の分析の結果を合わせて勘案すると、anaero-SODとaero-SODは、同一の酵素タンパク質であると考えられる。しかしながら、anaero-SODおよびaero-SODは同一の酵素タンパク質から構成されていると考えられるにもかかわらず、それぞれのSODには3つのアイソザイムが存在していた。本研究から、これら3つのアイソザイムの生成機構を説明することは困難ではあるが、いくつかの可能性は考えられる。種々の酵素タンパク質が、リン酸化⁵⁰⁾、グリコシル化⁵¹⁾、アセチル化⁵²⁾、アミド化⁵³⁾、脱アミド化⁵⁴⁾、メチオニン残基の酸化⁵⁵⁾などといった、いわゆる翻訳後修飾を受け、タンパク質の化学的な性質に変化をきたすことはよく知られている。本SODにおいても、このような翻訳後修飾をうけ、立体構造の変化や電気的なチャージの変化を伴ない、アイソザイムが発現したとも推測される。アポ化により、アイソザイムがひとつになったことや、

金属を再配位してもアイソザイムが存在しないことは、翻訳後修飾を受け立体構造の変化をきたしたものが、塩酸グアニジンや8-ヒドロキシキノリンによる金属の離脱とともに、酵素タンパク質がなんらかの構造的修飾を受け、電氣的に均一になったためと説明できるかもしれない。

本研究で得られた諸結果は、B. gingivalisのもつ SODが酸素毒性から菌体を保護する機能を果たすことを示しており、今後、白血球などの貪食細胞から放出される O_2^- に対する本菌のもつ SODの役割などが解明されれば、歯周ポケットでの本菌の定着、生息における SOD の重要性がさらに明らかになると思われる。また、B. gingivalisの SODは、いままで報告された SODとは異なった酵素学的性質をもつことから非常に興味深く、本菌のもつ SODの誘導機構の研究を進展させる上で、本研究は、1つの手掛りを与えるものと言えるであろう。

結 論

本研究では、偏性嫌気性菌の一種である黒色色素産生性 Bacteroides 種の酸素代謝に関連するいくつかの酵素活性と酸素耐性との関係を明らかにするとともに、酸素耐性に強く係わっていると考えられる SOD を、嫌氣的培養および曝気された Bacteroides gingivalis 381 株菌体より分離精製し、両精製酵素の生化学的諸性質を比較検討した結果、以下の結論を得た。

1. 供試した Bacteroides 種の全てに、SOD および NADH-オキシダーゼ活性が認められ、特に、B. gingivalis に最も高い SOD 活性がみられた。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。

2. Bacteroides 種の SOD 活性と T_{50} で示された酸素耐性時間との相関性は $\gamma = 0.814$ と非常に高く、NADH-オキシダーゼと酸素耐性との相関性も $\gamma = 0.683$ とやや高いものであった。

3. 高い酸素耐性を示した B. gingivalis 381株は、曝気により SOD, NADH-オキシダーゼともに酵素誘導がみられたが、酸素耐性の低い B. denticola ATCC 33185株では曝気によって、酵素の誘導はみられなかった。

4. 嫌氣的培養または曝気を行った B. gingivalis 381株の菌体破砕液より精製された SODは、ともに分子量約 46,000で、分子量約 23,000の2つのサブユニットよりなると推定された。

5. 両精製 SODの吸光特性は、280nmに極大吸収を示し、分子吸光係数は $8.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。また、anaero-SODは 350nmに、Fe-SODに特有な吸収を示し、aero-SODは 475nmに、Mn-SODに特有な吸収を示した。精製酵素の金属含量は、anaero-SODが1分子あたり Fe:1.79 g原子, Mn:0.28 g原子, Cu:0.08 g原子, Zn:0.17 g原子であり、aero-SODは1分子あたり Fe:0.36 g原子, Mn:1.08 g原子, Cu:0.09 g原子, Zn:0.23 g原子であった。これらの結

果より, anaero-SODは主として Fe-SODより, aero-SODは主として Mn-SODよりなると考えられた。

6. 両精製酵素は 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, また Native-PAGE法によっても, 3つの酵素活性をもつバンドがみられ, おのおの3つのアイソザイムをもっていた。

7. Native-PAGE法を用いた H_2O_2 による Fe-SODの不活性化により, anaero-SODの3つの酵素活性を示すバンドは全て, 不活性化されたが, aero-SODは 2つの活性を示すバンドのみが不活性化され, 前者は全て Fe-SODであり, 後者は 1つの Mn-SODと 2つの Fe-SODから構成されていた。

8. 両精製酵素のアポ SODは, とともに pIが 5.30の均一なタンパク質であり, 酵素活性を示さなかった。

9. 両精製酵素のアポ SODは, とともに Fe^{2+} または Mn^{2+} を再配位させることにより酵素活性

を再び示すようになり、再構築した SOD は、Native-PAGE 法により、単一の酵素活性をもつタンパク質として示された。

10. H_2O_2 と NaN_3 による Fe-SOD の活性阻害態度より、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した。

11. anaero-SOD のタンパク質一次構造は、総残基数 191 個の一本鎖ポリペプチドよりなり、その一次構造は鉄とマンガンの双方を配位できる SOD に特徴的なものであると考えられた。

また、anaero-SOD と aero-SOD のアミノ酸組成は酷似しており、aero-SOD のアミノ酸配列は、調べられた 36 番目までは anaero-SOD のそれと完全に一致した。

12. 以上の結果から、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。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部予防歯科学講座 常光 旭教授ならびに雫石 聰助教授に深甚なる謝意を表します。また、タンパク質一次構造の決定に御協力いただきました大阪大学蛋白質研究所蛋白質化学構造部門 崎山文夫教授ならびに綱沢 進助教授に深謝致します。そして、精製酵素の含有金属量の測定にご協力頂きました大阪大学工学部発酵工学科発酵工学第二講座 山田靖宙教授に厚く御礼申し上げますとともに、予防歯科学講座の諸先生方に謝意を表します。

Purification, Characterization and Induction by Oxygen
of Superoxide Dismutase from Bacteroides gingivalis 381

Atsuo Amano

Department of Preventive Dentistry
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: Superoxide dismutase • Bacteroides gingivalis • Oxygen induction

Several strains of Bacteroides gingivalis had strong activities of superoxide dismutase (SOD) and were markedly tolerant in the presence of oxygen in 13 strains of black-pigmented Bacteroides species tested. Thus, the strains were maintained and incubated in the either anaerobic or aerobic system. It was found that the SOD activity was significantly induced by oxygen, especially in B. gingivalis 381. The SODs, anaero-SOD and aero-SOD from the extracts of B. gingivalis 381 cells, each was purified by hydrophobic chromatography followed by anion exchange chromatography, and then by gel filtration, respectively. Both the purified enzymes having molecular weight of about 46,000 consisted of two subunits of equal sizes. Spectral analysis revealed that anaero-SOD had the characteristic A_{350} of Fe-SOD, but aero-SOD exhibited A_{475} of Mn-SOD. Both samples contained three isozymes with identical isoelectric points of 5.25, 5.10 and 5.00. On the basis of inactivation of SOD by H_2O_2 , it was shown that aero-SOD consisted of one Mn-SOD and a small quantity of two Fe-SODs, whereas anaero-SOD contained only Fe-SOD. To ascertain whether or not the apoprotein of aero-SOD is the same as that of anaero-SOD, each apoprotein was prepared by dialysis in guanidinium chloride plus 8-hydroxyquinoline. Only one protein band

with the same isoelectric point of 5.30 on an isoelectric focusing gel was obtained in each purified SOD sample. Subsequent reconstitution of both apoenzymes with either $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ or MnCl_2 significantly restored their activity. These reconstituted SODs showed only one protein band with SOD activity on Native-PAGE. The complete amino acid sequence of anaero-SOD was determined by automated Edman degradation of the protein, Achrombacter protease I, endoproteinase Asp-N and tryptic digestion. The sequence consisted of 191 residues corresponding to a molecular weight of 21,500 per subunit. Furthermore, the first 36 amino acid sequence of aero-SOD was determined following N-terminal analysis. The two enzymes had similar amino acid compositions, and their amino-terminal sequences were identical through the first 36 amino acids in which methionine residue was present at N-terminal. These results suggest that the three isozymes of either anaero-SOD or aero-SOD in B. gingivalis 381 may be formed from the same apoprotein.

文献

- 1) Fridovich, I. (1976) : Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity.; in Free radicals in biology, (Alexander, M., editor). ed. 1, Academic Press, New York, 239-277.
- 2) DiGuseppi, J. and Fridovich, I. (1982) : Oxygen toxicity in Streptococcus sanguis. The relative importance of superoxide and hydroxyl radicals. J. Biol. Chem., **257**, 4046-4051.
- 3) Fridovich, I. (1986) : Superoxide dismutases. Adv. Enzymol., **58**, 61-97.
- 4) McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem., **244**, 6049-6055.
- 5) Privalle, C. T. and Gregory, E. M. (1979) : Superoxide dismutase and O₂ lethality in Bacteroides fragilis. J. Bacteriol., **138**, 139-145.

6) Schwartz, C. E., Krall, J., Norton, L., McKay, K., Kay, D. and Lynch, R. E. (1983) : Catalase and superoxide dismutase in Escherichia coli. J. Biol. Chem., **258**, 6277-6281.

7) Schellhorn, H. E. and Hassan, H. M. (1988) : Response of hydroperoxidase and superoxide dismutase deficient mutants of Escherichia coli K-12 to oxidative stress. Can. J. Microbiol., **34**, 1171-1176.

8) MacCord, J. M., Keele, B. B. and Fridovich, I. (1971) : An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis : The physiological function of superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **68**, 1024-1027.

9) Carlsson, J., Wrethen, J. and Beckmann, G. (1977) : Superoxide dismutase in Bacteroides species. J. Clin. Microbiol., **6**, 280-284.

10) Tally, F. P., Goldin, B. R., Jacovus, N. V. and Gorbach, S. L. (1977) : Superoxide dismutase in anaerobic bacteria of

clinical significance. Infect. Immun., **16**, 20-25.

11) Gregory, E. M., Moore, W. E. and Holdemann, L. V. (1978)
: Superoxide dismutase in anaerobes : Survey. Appl. Environ.
Microbiol., **35**, 988-991.

12) Gregory, E. M., Kowalski, J. B. and Holdemann, L. V. (19
77) : Production and some properties of catalase and super-
oxide dismutase from the anaerobe Bacteroides distasonis. J.
Bacteriol., **129**, 1298-1302.

13) Rolfe, R. D., Hentges, D. J., Campbell, B. L. and Barre-
tt, J. T. (1978) : Factors related to oxygen tolerance of
anaerobic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 306-313.

14) Beaman, B. L., Scates, S. M., Morning, S. E., Deem, R.
and Misra, H. P. (1983) : Purification and properties of
a unique superoxide dismutase from Nocardia asteroides. J.
Biol. Chem., **258**, 91-96.

15) Kusunose, E., Ichihara, K., Noda, Y., and Kusunose, M.

(1976) : Superoxide dismutase from Mycobacterium tuberculo-
sis. J. Biochem. (Tokyo), **80**, 1343-1352.

16) Slots, J. and Jenco, R. J. (1984) : Black-pigmented
Bacteroides species, Capnocytophaga species, and Actino-
bacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease :
virulence factors in colonization, survival, and tissue de-
struction. J. Dent. Res., **63**, 412-421.

17) Mayland, D. and Holt, S. C. (1988) : Biology of
asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species.
Microbiol. Rev., **52**, 134-152.

18) Dougherty, H. W., Sadowski, S. J. and Baker, E. E. (1978)
: A new iron containing superoxide dismutase from Escherichia
coli. J. Biol. Chem., **253**, 5220-5223.

19) Ose, D. E. and Fridovich, I. (1979) : Manganese-contain-
ing superoxide dismutase from Escherichia coli : Reversible
resolution and metal replacement. Arch. Biochem. Biophys.,

194, 360-364.

20) Meier, B., Barra, D., Bossa, I. F., Caiabrese and Rotilio, G. (1982) : Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied. J. Biol. Chem., **257**, 13977-13980.

21) Martin, M. E., Strachan, R. C., Aranha, H., Evans, S. L., Salin, M. L., Welch, B., Arceneaux, J. E. L. and Byers, B. R. (1984) : Oxygen toxicity in Streptococcus mutans : manganese, iron and superoxide dismutase. J. Bacteriol., **159**, 745-749.

22) Gregory, E. M. and Dapper, C. H. (1983) : Isolation of iron-containing superoxide dismutase from Bacteroides fragilis : Reconstitution as a Mn-containing enzyme. Arch. Biochem. Biophys., **220**, 293-300.

23) Gregory, E. M. (1985) : Characterization of the O₂-induced manganese-containing superoxide dismutase from Bacte-

roides fragilis. Arch. Biochem. Biophys., **238**, 83-89.

24) Pennington, C. D. and Gregory, E. M. (1986) : Isolation and reconstitution of iron- and manganese-containing superoxide dismutases from Bacteroides thetaiotaomicron. J. Bacteriol., **166**, 528-532.

25) Higuchi, M. (1984) : The effect of oxygen on the growth and mannitol fermentation of Streptococcus mutans. J. Gen. Microbiol., **130**, 1819-1826.

26) Hartree, E. F. (1972) : Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem., **48**, 422-427.

27) Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254.

- 28) Cary, S. G. and Blair, E. B. (1964) : New transport medium for shipment of clinical specimens. J. Bacteriol., 88, 96-98.
- 29) Moats, W. A. (1971) : Kinetics of thermal death of bacteria. J. Bacteriol., 105, 165-171.
- 30) Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 31) Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) : Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem., 44, 276-287.
- 32) Kirby, T., Blum, J., Kahane, I. and Fridovich, I. (1980): Distinguishing between Mn-containing and Fe-containing superoxide dismutases in crude extracts of cells. Arch. Biochem. Biophys., 201, 551-555.

33) Andrews, P. (1965) : The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide range. J. Biochem., **96**, 595-606.

34) Simpson, R. J., Neuberger, M. R. and Liu, T. Y. (1976) : Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. J. Biol. Chem., **251**, 1936-1940.

35) Hirs, C. H. W. (1967) : Performic acid oxidation. ; in Methods in Enzymology 11, (Hirs, C. H. W., editor). ed. 1, Academic Press, New York, 197-199.

36) Tsunasawa, S., Kondo, J. and Sakiyama, F. (1985) : Isocratic separation of PTH-amino acids at picomole level by reverse-phase HPLC in the presence of sodium dodecyl sulfate. J. Biochem., **97**, 701-704.

37) Hassan, H. M. and Fridovich, I. (1977) : Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in Escherichia coli. J. Bacteriol., **129**, 1574-1583.

38) Martin, M. E., Byers, B. R., Olson, M. O. J., Salin, M. L., Arceneaux, J. E. L. and Tolbert, C. (1986) : A streptococcus mutans superoxide dismutase that is active with manganese or iron as a cofactor. J. Biol. Chem., **261**, 9361-9367.

39) Slykhouse, T. O. and Fee, J. A. (1976) : Physical and chemical studies on bacterial superoxide dismutases. J. Biol. Chem., **251**, 5472-5477.

40) Fee, J. A., Shapiro, E. D. and Moss, T. H. (1976) : Direct evidence for mangano superoxide dismutase of Escherichia coli B. J. Biol. Chem., **251**, 6157-6159.

41) Carlloz, A., Ludwig, M. L., Stallings, W. C., Fee, J. A., Steinmann, H. M. and Touati, D. (1988) : Iron superoxide dismutase ; nucleotide sequence of the gene from Escherichia coli K12 and correlations with crystal structures. J. Biol. Chem., **263**, 1555-1562.

42) Barra, D., Schinina, M. E., Bannister, W. H., Bannister, J. V. and Bossa, F. (1987) : The primary structure of iron-superoxide dismutase from Photobacterium leignathi. J. Biol. Chem., **262**, 1001-1009.

43) Isobe, T., Fang, Y., Muno, D., Okuyama, T., Ohmori, D. and Yamakura, F. (1987) : Amino acid sequence of iron-superoxide dismutase from Pseudomonas ovalis. FEBS Lett., **223**, 92-96.

44) Steinman, H. M. (1978) : The amino acid sequence of mangano superoxide dismutase from Escherichia coli B. J. Biol. Chem., **253**, 8708-8720.

45) Barra, D., Schinina, M. E., Simmaco, M., Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G. and Bossa, F. (1984) : The primary structure of human liver manganese superoxide dismutase. J. Biol. Chem., **259**, 12595-12601.

46) Brock, C. J. and Walker, J. E. (1980) : Superoxide dis-

mutase from Bacillus stearothermophilus. Complete amino acid sequence of a manganese enzyme. Biochemistry, **19**, 2873-2882.

47) Stallings, W. C., Powers, T. B., Parttridge, K. A., Fee, J. A. and Ludwig, M. L. (1983) : Iron superoxide dismutase from Escherichia coli at 3.1-Å resolution : A structure unlike that of copper / zinc protein at both monomer and dimer levels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **80**, 3884-3888.

48) Ringe, D., Petsko, G. A., Yamakura, F., Suzuki, K. and Ohmori, D. (1983) : Structure of iron superoxide dismutase from Pseudomonas ovalis at 2.9-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **80**, 3879-3883.

49) Stallings, W. C., Parttridge, K. A., Strong, R. K. and Ludwig, M. L. (1985) : The structure of manganese superoxide dismutase from Thermus thermophilus HB 8 at 2.4-Å resolution. J. Biol. Chem., **260**, 16424-16432.

50) Fujita, M., Taniguchi, N., Makita, A., Ono, M. and

Oikawa, K. (1985) : Protein phosphorylation of β -glucuronidase in human lung cancer-identification of saline- and threonine-phosphates. Biochem. Biophys. Res. Commun., **126**, 818-824.

51) Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H., Oikawa, K. and Taniguchi, N. (1987) : Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. J. Biol. Chem., **262**, 16969-16972.

52) Benovic, J., Tillman, T., Cudd, A. and Fridovich, I. (1983) : Electrostatic facilitation of the reaction catalyzed by the manganese-containing and iron-containing superoxide dismutase. Arch. Biochem. Biophys., **221**, 329-332.

53) Lin, T. Y. and Koshland, D. E. Jr. (1969) : Carboxyl group modification and the activity of lysozyme. J. Biol. Chem., **244**, 505-508.

54) Dixon, J. W. and Hofmann, T. (1970) : The reaction with

nitrous acid of the active site N-terminal isoleucine in
chymotrypsin acid derivatives. Can. J. Biochem., **48**, 671-681.

55) 林 力丸 (1988) : 生体内におけるメチオニン残基の酸化と修
復. 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 3080-3086, 昭和63.

脚 注

大 阪 大 学 歯 学 部 予 防 歯 科 学 講 座 (主 任 : 常 光
旭 教 授)

図の説明

図 1 黒色色素産生性 Bacteroides のもつ SOD
および NADH-オキシダーゼの酵素活性と
酸素耐性 (T₅₀) との相関性

図 2 曝気された B. gingivalis 381 株と B.
denticola ATCC 33185 株の SOD と NADH-
オキシダーゼの誘導

● : B. gingivalis 381 株

○ : B. denticola ATCC 33185 株

図 3 Superose 12 カラムによる両精製酵素標
品の分子量の測定

図 4 両精製酵素標品の SDS-ポリアクリルアミ
ドゲル電気泳動パターン

a, d: 分子量測定用標準タンパク質標品

b: anaero-SOD

(タンパク質量; 1.1 μ g)

c: a e r o - S O D

(タ ン パ ク 質 量 ; $1.3 \mu g$)

図 5 両 精 製 標 品 の 吸 収 曲 線

標 品 は タ ン パ ク 質 濃 度 が $0.24 mg/ml$ と な
る よ う に $50 mM$ リ ン 酸 カ リ ウ ム 塩 緩 衝 液
($pH 7.8$) に て 溶 解 し た

図 6 両 精 製 酵 素 の 酵 素 活 性 お よ び タ ン パ ク
質 を 染 色 し た ポ リ ア ク リ ル ア ミ ド ゲ ル 電
気 泳 動 パ タ ー ン

a: 酵 素 活 性 を 染 色 し た a n a e r o - S O D

(酵 素 活 性 量 ; 6.5 ユ ニ ッ ト)

b: タ ン パ ク 質 を 染 色 し た a n a e r o - S O D

(タ ン パ ク 質 量 ; $40 \mu g$)

c: 酵 素 活 性 を 染 色 し た a e r o - S O D

(酵 素 活 性 量 ; 6.5 ユ ニ ッ ト)

d: タ ン パ ク 質 を 染 色 し た a e r o - S O D

(タ ン パ ク 質 量 ; $40 \mu g$)

図 7 anaero-SODとaero-SODのアイソザイムの
酵素活性に及ぼす H_2O_2 の影響

a: H_2O_2 処理を行ったanaero-SOD

b: 未処理のanaero-SOD

c: H_2O_2 処理を行ったaero-SOD

d: 未処理のaero-SOD

ゲル1本あたり酵素活性量5.51ニットの標
品を用いて泳動を行った

図 8 両精製酵素のホロ酵素およびアポ酵素の
等電点電気泳動パターン

a: anaero-SOD(タンパク質量; $2\mu g$)

b: アポ anaero-SOD

(タンパク質量; $1.7\mu g$)

c: aero-SOD (タンパク質量; $2\mu g$)

d: アポ aero-SOD

(タンパク質量; $1.7\mu g$)

St: 等電点測定用標準タンパク質標品

図 9 再配位した anaero-SOD と aero-SOD の酵素活性およびタンパク質を染色したポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動パターン

1 : アポ anaero-SOD を MnCl_2 により再配位した SOD (タンパク質量 ; $12 \mu\text{g}$)

2 : アポ aero-SOD を MnCl_2 により再配位した SOD (タンパク質量 ; $12 \mu\text{g}$)

3 : アポ anaero-SOD を $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ により再配位した SOD

(タンパク質量 ; $10 \mu\text{g}$)

4 : アポ aero-SOD を $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ により再配位した SOD

(タンパク質量 ; $10 \mu\text{g}$)

a : 酵素活性を染色

b : タンパク質を染色

図 10 anaero-SOD の全一次構造

A : Achrombacter プロテアーゼ I 消化に

より得られたペプチド

N: エンドプロテイナーゼ Asp-N 消化に

より得られたペプチド

Ac-T: ϵ -リジル基をアセチル化した

anaero-SODのウシトリプシン消化

により得られたペプチド

→: 自動エドマン法により決定したアミ

ノ酸配列

図 11 anaero-SOD と 種々の Fe-SOD および
Mn-SODのタンパク質全一次構造における
相同性の比較

★: 金属結合部位と推測されるアミノ酸
残基

Ba. stearoth: Bacillus stearothermo-
philus

Fe: Fe-SOD, Mn: Mn-SOD

各 S O D の ア ミ ノ 酸 配 列 の 共 通 す る ア ミ
ノ 酸 残 基 を 四 角 で 囲 ん で あ る

表 の 説 明

- 表 1 黒 色 色 素 産 生 性 Bacteroides の SOD 活 性 ,
NADH-オ キ シ ダ ー ゼ 活 性 お よ び 酸 素 耐 性
・ 生 菌 数 が 対 数 的 に 半 減 す る 曝 気 時 間 を
示 す
- 表 2 嫌 気 的 条 件 下 に て 培 養 し た B. gingiva-
lis 381 株 よ り 分 離 し た SOD の 精 製
- 表 3 曝 気 さ れ た B. gingivalis 381 株 よ り 分 離
し た SOD の 精 製
- 表 4 未 処 理 , ア ポ 化 お よ び 再 配 位 し た anaero-
-SOD な ら び に aero-SOD の 酵 素 活 性 に 及 ぼ
す H_2O_2 と NaN_3 の 影 響
- 表 5 anaero-SOD と aero-SOD の ア ミ ノ 酸 組 成

表 6 anaero-SOD と 種 々 の Fe-SOD お よ び Mn-SOD と の タ ン パ ク 質 全 一 次 構 造 の 相 同 性

Ba. stearothermophilus:

Bacillus stearothermophilus

Mn: Mn-SOD, Fe: Fe-SOD

そ れ ぞ れ の 数 値 は 各 SOD の タ ン パ ク 質 一
次 構 造 の 共 通 す る ア ミ ノ 酸 残 基 の 割 合
(%) を 表 す

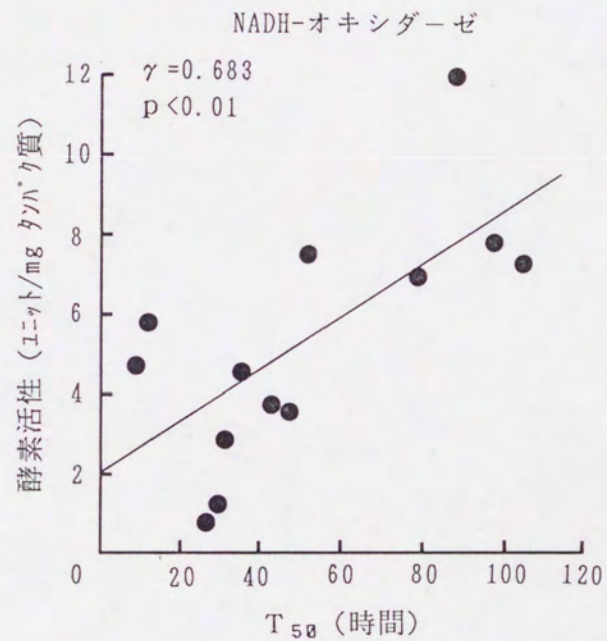
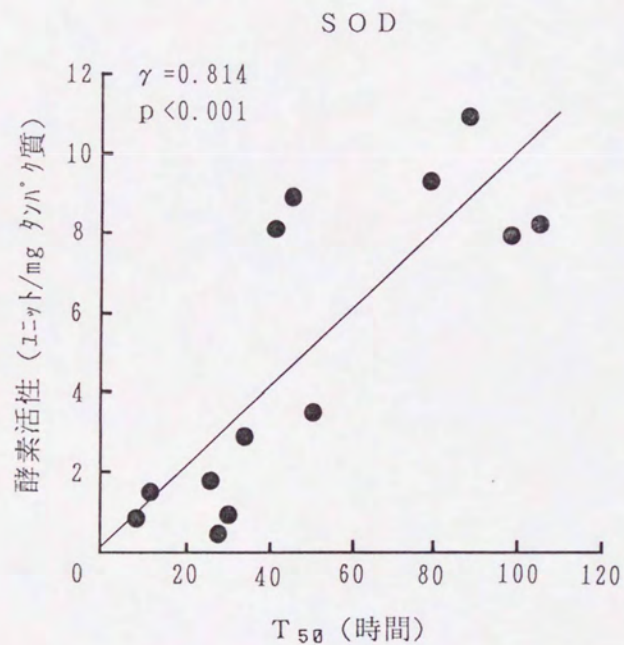


図1 黒色色素産生性 *Bacteroides* のもつ S O D および NADH-オキシダーゼの酵素活性と酸素耐性 (T_{50}) との相関性

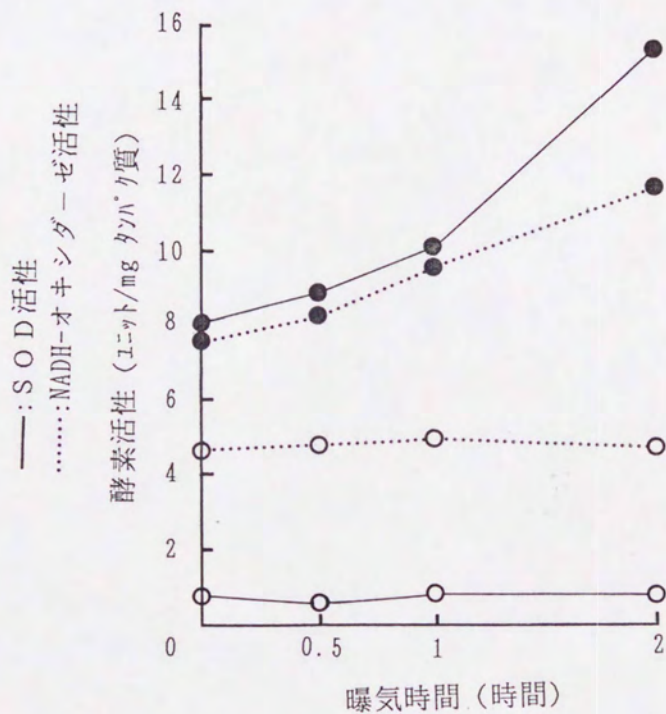


図2 曝気された*B. gingivalis* 381株と*B. denticola* ATCC 33185株のSODとNADH-オキシダーゼの誘導

●: *B. gingivalis* 381株

○: *B. denticola* ATCC 33185株

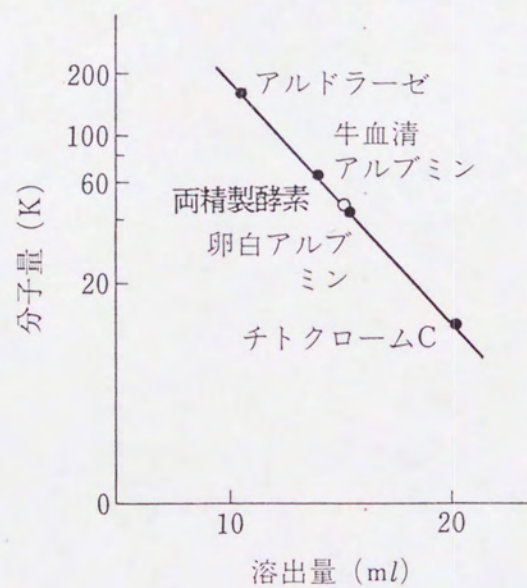


図3 Superose 12 カラムによる両精製酵素標品の分子量の測定

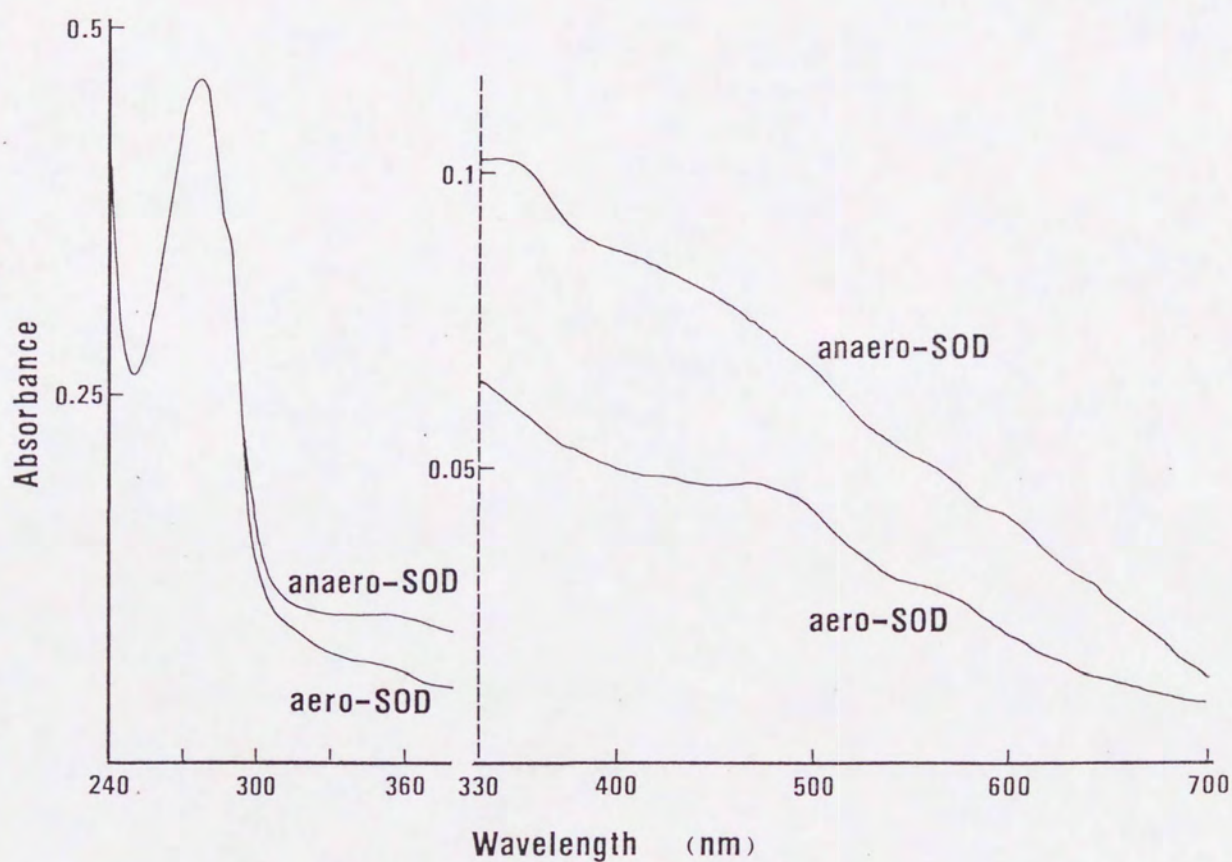


図5 両精製標品の吸収曲線

標品はタンパク質濃度が0.24mg/mlとなるように
50mMリン酸カリウム塩緩衝液(pH7.8)に溶解した

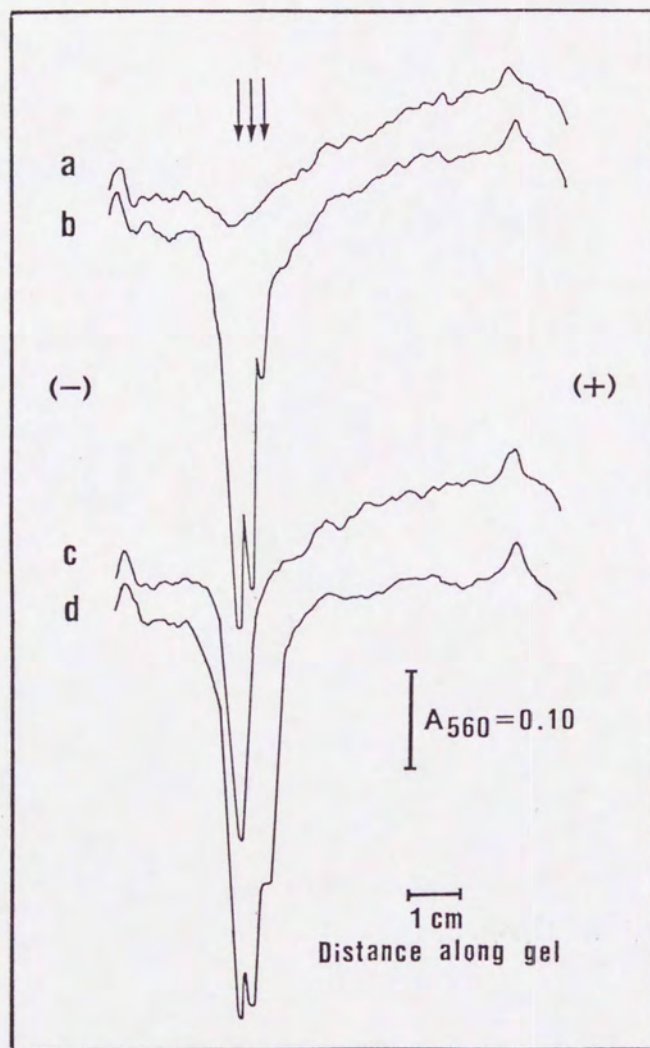


図7 anaero-SODとaero-SODのアイソザイムの酵素活性に及ぼす H_2O_2 の影響

a: H_2O_2 処理を行ったanaero-SOD

b: 未処理のanaero-SOD

c: H_2O_2 処理を行ったaero-SOD

d: 未処理のaero-SOD

ゲル1本あたり酵素活性量5.5ユニットの標品を用いて泳動を行った

[illegible]

A: *Achrombacter* フロテラゼ I 消化により得られたベツチク, N: エンドフロテラチナーゼ Asp-N 消化により得られたベツチク, Ac-T: e-リジル基をアセチル化した *A. baumannii* SOD のフシトリアミン消化により得られたベツチク, →: 自動エドマン法により決定したアミノ酸配列

図11 anaero-SODと種々のFe-SODおよびMn-SODのタンパク質全一次構造における相同性の比較

	1	5	10	15	20	25	30	35	40																																
<i>E. coli</i> (Mn)	S	Y	T	[L]	P	S	[L]	P	Y	A	Y	D	[A]	L	E	[P]	H	F	D	K	Q	T	M	[E]	I	[H]	[H]	T	[K]	H	H	Q	T	[Y]	V	N	N	A	[N]		
Human liver (Mn)	K	H	S	[L]	P	D	[L]	P	Y	D	Y	G	[A]	L	E	[P]	H	I	N	A	Q	I	M	[Q]	L	[H]	[H]	S	[K]	H	H	A	A	[Y]	V	N	N	L	[N]		
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)	P	F	[E]	[L]	P	A	[L]	P	Y	P	Y	D	[A]	L	E	[P]	H	I	D	K	[E]	T	M	N	I	[H]	[H]	T	[K]	H	H	N	T	[Y]	V	T	N	L	[N]		
<i>B. gingivalis</i>	M	T	H	[E]	[L]	I	S	[L]	P	Y	A	V	D	[A]	L	A	[P]	V	I	[S]	K	[E]	T	V	[E]	F	[H]	[H]	G	[K]	H	L	K	T	[Y]	V	D	N	L	[N]	
<i>E. coli</i> (Fe)	S	F	[E]	[L]	P	A	[L]	P	Y	A	K	D	[A]	L	E	[P]	H	I	[S]	A	[E]	T	I	[E]	Y	[H]	Y	G	[K]	H	H	Q	T	[Y]	V	T	N	L	[N]		
<i>P. leiognathi</i> (Fe)	A	F	[E]	[L]	P	A	[L]	P	F	A	M	N	[A]	L	E	[P]	H	I	[S]	Q	[E]	T	L	[E]	Y	[H]	Y	G	[K]	H	H	N	T	[Y]	V	V	K	L	[N]		
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)	A	F	[E]	[L]	P	P	[L]	P	Y	A	H	D	[A]	L	Q	[P]	H	I	[S]	K	[E]	Y	L	[E]	Y	[H]	[H]	D	[K]	H	H	N	T	[Y]	V	V	N	L	[N]		
	45	50	55	60	65	70	75	80																																	
<i>E. coli</i> (Mn)	A	A	L	E	S	L	P	E	F	A	[N]	L	P	V	E	E	L	I	T	K	L	D	Q	L	P	A	D	K	K	T	V	L	R	N	[N]	[A]	[G]	G	H	A	
Human liver (Mn)	V	T	Q	E	K	Y	Q	E	A	L	A	K	G	D	V	T								A	Q	I	A	L	Q	P	A	L	K	F	[N]	[G]	[G]	G	H	I	
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)	A	A	L	E	[G]	H	P	D	L	Q	[N]	K	S	[L]	E	E	L	L	S	N	L	E	A	L	P	E	[S]	I	R	T	A	V	R	N	[N]	[G]	[G]	G	H	A	
<i>B. gingivalis</i>	K	[L]	I	I	[G]	[T]	E	F	[E]	[N]	A	D	[L]	N	T								[I]	V	Q	K	[S]	E		[G]	[G]	I	[F]	N	[N]	[A]	[G]	[Q]	T	L	
<i>E. coli</i> (Fe)	N	[L]	I	K	[G]	[T]	A	F	[E]	G	K	S	[L]	E	E								[I]	I	R	S	[S]	E		[G]	[G]	V	[F]	N	[N]	[A]	A	[Q]	V	W	
<i>P. leiognathi</i> (Fe)	G	[L]	V	E	[G]	[T]	E	L	A	[E]	K	S	[L]	E	E								[I]	I	K	T	[S]	T		[G]	[G]	V	[F]	N	[N]	[A]	A	[Q]	V	W	
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)	N	[L]	V	P	[G]	[T]	P	E	F	[E]	G	K	T	[L]	E	E							[I]	V	K	S	[S]	S		[G]	[G]	I	[F]	N	[N]	[A]	A	[Q]	V	W	
	85	90	95	100	105	110	115	120																																	
<i>E. coli</i> (Mn)	[N]	[H]	S	[L]	F	W	K	G	L	K	K	[G]	T	T	L	Q	[G]	D	[L]	K	A	[A]	I	E	R	D	[F]	G	S	[F]	G	S	V	D	N	[F]	K	A	E	F	E
Human liver (Mn)	[N]	[H]	S	I	F	W	[T]	N	L	S	P	N	G	[G]	G	Q	P	K	[G]	E	[L]	L	E	A	I	K	R	D	[F]	G	S	[F]	D	K	F	K	Q	K	L	T	
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)	[N]	[H]	S	[L]	F	W	[T]	I	L	S	P	N	G	[G]	G	Q	P	T	[G]	E	[L]	A	I	N	K	K	F	G	S	[F]	T	A	[F]	K	D	E	F	S			
<i>B. gingivalis</i>	[N]	[H]	N	[L]	[Y]	F	[T]	Q	F	R	P	G	K	[G]	G	A	P	K	[G]	K	[L]	G	E	A	I	D	K	Q	[F]	G	S	[F]	E	K	F	K	E	E	F	N	
<i>E. coli</i> (Fe)	[N]	[H]	W	F	[Y]	W	N	C	L	A	P	N	A	[G]	G	E	P	T	[G]	K	V	A	E	A	I	A	A	S	[F]	G	S	[F]	A	D	[F]	K	A	Q	F	T	
<i>P. leiognathi</i> (Fe)	[N]	[H]	T	F	[Y]	W	N	G	L	A	P	N	A	[G]	G	E	P	T	[G]	E	V	A	E	A	I	E	K	A	[F]	G	S	[F]	A	E	F	K	A	K	F	T	
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)	[N]	[H]	T	F	[Y]	W	N	K	L	S	P	D	G	[G]	G	Q	P	T	[G]	A	[L]	A	D	[A]	I	N	A	A	[F]	G	S	[F]	D	K	[F]	K	E	E	F	T	
	125	130	135	140	145	150	155	160																																	
<i>E. coli</i> (Mn)	K	A	A	A	S	R	F	[G]	S	[G]	[W]	A	W	L	V	L	K	G	D	K	[L]	A	V	V	S	T	A	N	Q	D	S	[P]	L	M	G	E	A	I	S		
Human liver (Mn)	A	A	S	V	G	V	Q	[G]	S	[G]	[W]	L	G	F	N	K	Q		R	G	H	[L]	Q	I	A	A	C	[P]	N	Q	D	[P]	L	Q	G	T	T	G	L		
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)	K	A	A	A	G	R	F	[G]	S	[G]	[W]	A	W	L	V	V	N		N	G	E	[L]	E	I	T	S	T	[P]	N	Q	D	[P]	I	M	E		G	K			
<i>B. gingivalis</i>	T	A	G	T	L	F	[G]	S	[G]	[W]	V	W	L	A	S	D	A	N	G	K	[L]	S	I	E	K	E	[P]	N	A	G	N	[P]	V	R	K		G	L			
<i>E. coli</i> (Fe)	D	A	A	I	K	N	F	[G]	S	[G]	[W]	T	W	L	V	K	N	S	D	G	K	[L]	A	I	V	S	T	S	N	[A]	G	T	[P]	L	T	T		D	A		
<i>P. leiognathi</i> (Fe)	D	S	A	I	N	N	F	[G]	S	[S]	[W]	T	W	L	V	K	N	A	N	G	S	[L]	A	I	V	N	T	S	N	[A]	G	[P]	I	T	E		G	V			
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)	K	T	S	V	G	T	F	[G]	S	[G]	[W]	A	W	L	V	K		A	D	G	S	[L]	A	L	C	S	T	I	G	[A]	G	[P]	L	T	S		G	D			
	165	170	175	180	185	190	195	200																																	
<i>E. coli</i> (Mn)	G	A	S	G	F	[P]	I	M	[G]	L	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	K	F	[Q]	[N]	[R]	[R]	P	[D]	Y	I	K	E	F	[W]	N	V	V	N	[W]	D	E	
Human liver (Mn)		I	[P]	[L]	L	[G]	I	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	Q	Y	K	[N]	V	[R]	P	[D]	Y	L	K	A	I	[W]	N	V	I	N	[W]	E	N				
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)		T	[P]	[L]	L	[G]	L	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	K	Y	[Q]	[N]	[R]	[R]	P	[D]	Y	I	A	A	F	[W]	N	V	V	N	[W]	D	E				
<i>B. gingivalis</i>		N	[P]	[L]	L	[G]	F	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	T	Y	[Q]	[N]	[R]	[R]	A	[D]	H	L	K	D	L	[W]	S	I	V	D	[W]	D	I				
<i>E. coli</i> (Fe)		T	[P]	[L]	L	T	V	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	I	D	Y	R	[N]	A	[R]	P	G	Y	L	E	H	F	[W]	A	L	V	N	[W]	E	F			
<i>P. leiognathi</i> (Fe)		T	[P]	[L]	L	T	V	[D]	L	W	E	H	A	Y	Y	[L]	I	D	Y	R	[N]	L	[R]	P	S	Y	M	D	G	F	[W]	A	L	V	N	[W]	D	F			
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)		T	[P]	[L]	L	T	C	[D]	V	W	E	H	A	Y	Y	[L]	I	D	Y	R	[N]	L	[R]	P	K	Y	V	E	A	F	[W]	N	L	V	N	[W]	A	F			
	205	210	215																																						
<i>E. coli</i> (Mn)	A	A	A	[R]	F	A	A	K	K																																
Human liver (Mn)	V	T	E	[R]	[Y]	M	A	C	K	K																															
<i>Ba. stearoth.</i> (Mn)	V	A	K	[R]	[Y]	S	E	A	K	A	K																														
<i>B. gingivalis</i>	V	E	S	[R]	[Y]																																				
<i>E. coli</i> (Fe)	V	A	K	N	L	A	A																																		
<i>P. leiognathi</i> (Fe)	V	S	K	N	L	A																																			
<i>Ps. ovalis</i> (Fe)	V	A	E	E	G	K	T	F	K	A																															

★：金属結合部位と推測されるアミノ酸残基

Ba. stearoth. : *Bacillus stearothermophilus*, Mn:Mn-SOD, Fe:Fe-SOD
各SODのアミノ酸配列の共通するアミノ酸残基を四角で囲んである

表1 黒色色素産生性 *Bacteroides* の SOD 活性, NADH-オキシダーゼ活性および酸素耐性

菌	株	酵素比活性(ユニット/mg タンパク質)		酸素耐性
		S O D	NADH- オキシダーゼ	T ₅₀ * (時間)
<u>Bacteroides</u>				
<u>gingivalis</u>	381	8. 0	7. 8	9 7
	SU-3	1 0. 9	1 1. 9	8 7
	ATCC 33277	9. 3	6. 9	7 8
	I-2-1	8. 3	7. 3	1 0 4
<u>Bacteroides</u>				
<u>loescheii</u>	ATCC 15930	3. 5	7. 5	5 0
<u>Bacteroides</u>				
<u>melaninogenicus</u>	ATCC 25845	2. 9	4. 6	3 4
<u>Bacteroides</u>				
<u>intermedius</u>	ATCC 25261	1. 0	2. 9	3 0
	ESO-4	1. 8	0. 8	2 6
	ESS-1	0. 5	1. 2	2 8
<u>Bacteroides</u>				
<u>denticola</u>	ATCC 33185	0. 7	4. 7	8
	4A-3-11	1. 5	5. 8	1 1
<u>Bacteroides</u>				
<u>levii</u>	ATCC 14015	8. 1	3. 7	4 2
	JP2-77	8. 9	3. 5	4 5

* 生菌数が対数的に半減する曝気時間を示す

表 2 嫌気的条件下にて培養した *B. gingivalis* 381株菌体からの S O D (anaero-S O D) の分離・精製

精 製 操 作	容量 (ml)	タンパク質濃度 (μ g/ml)	総活性量 (ユニット)	比活性 (ユニット/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
菌破碎抽出物	180	3190	1950	3.4		1
硫安処理 (50%飽和)	197	2300	3270	7.2	100	2
Phenyl Sepharose CL-4B	303	46.0	3210	229	98	68
Q-Sepharose Fast Flow	12.8	188	2450	1020	75	300
Superose 12	71.0	24.5	1610	931	49	272

表3 曝気された*B. gingivalis* 381株菌体からのSOD (aero-SOD) の分離・精製

精 製 操 作	容量 (ml)	タンパク質濃度 (μ g/ml)	総活性量 (ユニット)	比活性 (ユニット/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
菌破碎抽出物	178	8360	8970	6.0		1
硫安処理 (50%飽和)	183	3290	9600	15.9	100	2
Phenyl Sepharose CL-4B	340	65.0	7100	321	74	54
Mono-Q	355	14.0	5850	1177	61	196
Q-Sepharose	15.0	160	3450	1438	36	240

表4 未処理, アポ化および再配位したanaero-SODならびにaero-SODの酵素活性に及ぼす H_2O_2 と NaN_3 の影響

添加金属塩	処理前の総活性	処理後の総活性	活性回収率	H_2O_2 による不活性化 (%)				NaN_3 による活性阻害 (%)			
	(ユニット)	(ユニット)	(%)	1	5	10	20(min)	0.1	0.2	1.0	5.0(mM)
<Anaero-SOD>											
未処理 SOD	400	—	—	10	24	60	68	35	60	71	80
アポ SOD	300	<10	<3	—	—	—	—	—	—	—	—
$MnCl_2$	300	207	69	4	10	20	22	3	4	8	18
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	300	75	25	5	30	55	60	32	52	66	70
<Aero-SOD>											
未処理 SOD	400	—	—	5	19	27	30	5	7	18	26
アポ SOD	400	<10	<3	—	—	—	—	—	—	—	—
$MnCl_2$	400	230	58	9	15	24	27	3	3	10	12
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	400	144	36	15	33	55	75	30	57	70	82

表5 anaero-SODとaero-SODのアミノ酸組成

アミノ酸	SOD 1molあたりのアミノ酸残基数	
	anaero-SOD	aero-SOD
リジン	22.0	24.4
ヒスチジン	11.8	11.6
トリプトファン	6.0	6.1
アルギニン	9.5	10.3
アスパラギン酸	45.2	43.4
スレオニン	19.7	20.0
セリン	15.5	15.9
グルタミン酸	40.7	40.6
プロリン	15.5	15.0
グリシン	31.3	32.8
アラニン	23.1	25.5
シスチン	<0.5	<0.5
バリン	17.5	16.0
メチオニン	1.9	2.0
イソロイシン	16.0	15.7
ロイシン	35.5	34.7
チロシン	14.2	12.7
フェニルアラニン	21.2	20.4

表6 anaero-SODと種々のFe-SODおよびMn-SODとのタンパク質全一次構造の相同性

	<u>B. gingivalis</u>	<u>E. coli</u> (Fe)	<u>Ph.</u> <u>leiognathi</u>	<u>Ps.</u> <u>ovalis</u>	<u>Ba. stearo-</u> <u>thermophilus</u>	<u>E. coli</u> (Mn)	Human liver
<u>B. gingivalis</u> (Fe)	----	51.3	43.5	47.6	45.0	40.3	39.8
<u>E. coli</u> (Fe)	51.3	----	74.0	67.2	52.6	45.3	39.6
<u>Ph. leiognathi</u> (Fe)	43.5	74.0	----	65.1	49.8	39.3	35.0
<u>Ps. ovalis</u> (Fe)	47.6	67.2	65.1	----	52.7	42.2	39.4
<u>Ba. stearothermophilus</u> (Mn)	45.0	52.6	49.8	52.7	----	59.9	47.8
<u>E. coli</u> (Mn)	40.3	45.3	39.3	42.2	59.9	----	42.2
Human liver(Mn)	39.8	39.6	35.0	39.4	47.8	42.4	----

Ba. stearothermophilus : Bacillus stearothermophilus

Mn : Mn-SOD, Fe : Fe-SOD

それぞれの数値は各SODのタンパク質一次構造の共通するアミノ酸残基数の割合(%)を表わす。

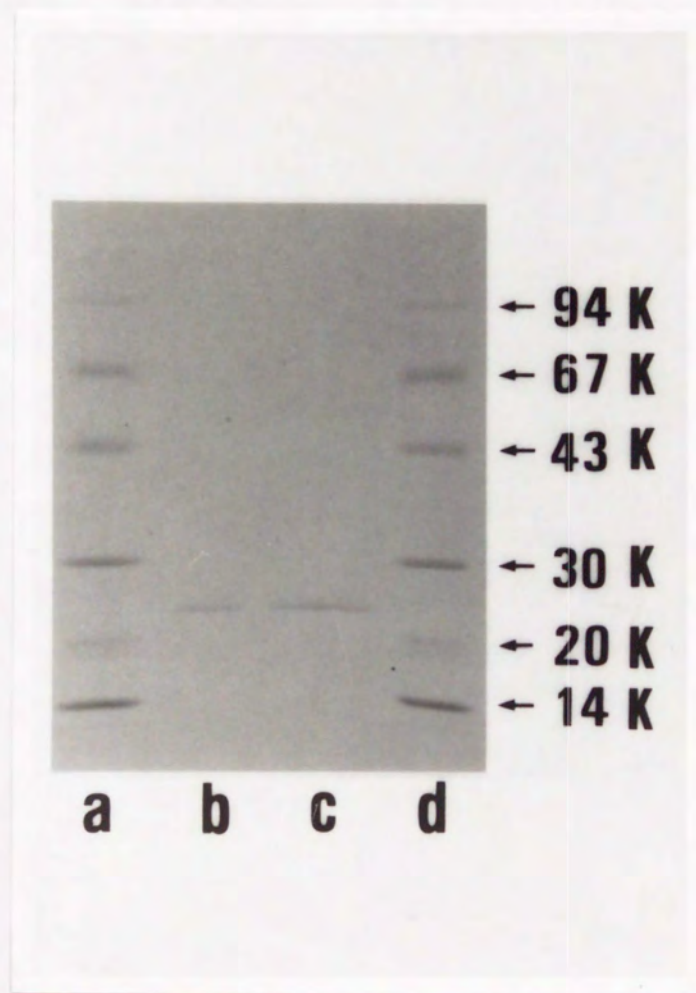


図4 両精製酵素標品のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

a, d: 分子量測定用標準タンパク質標品
 b: anaero-SOD (タンパク質量; $1.1 \mu\text{g}$)
 c: aéro-SOD (タンパク質量; $1.3 \mu\text{g}$)

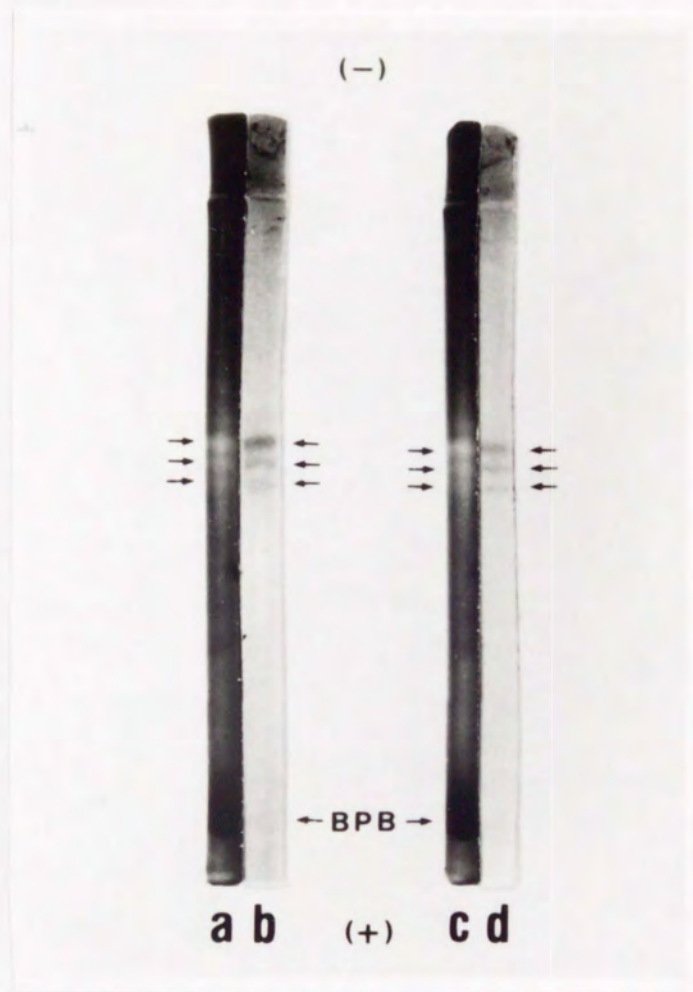


図6 両精製酵素の酵素活性およびタンパク質を染色した
ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン

- a : 酵素活性を染色した anaero-SOD
(酵素活性量 ; 6.51ユニット)
- b : タンパク質を染色した anaero-SOD
(タンパク質量 ; 40 μ g)
- c : 酵素活性を染色した aéro-SOD
(酵素活性量 ; 6.51ユニット)
- d : タンパク質を染色した aéro-SOD
(タンパク質量 ; 40 μ g)

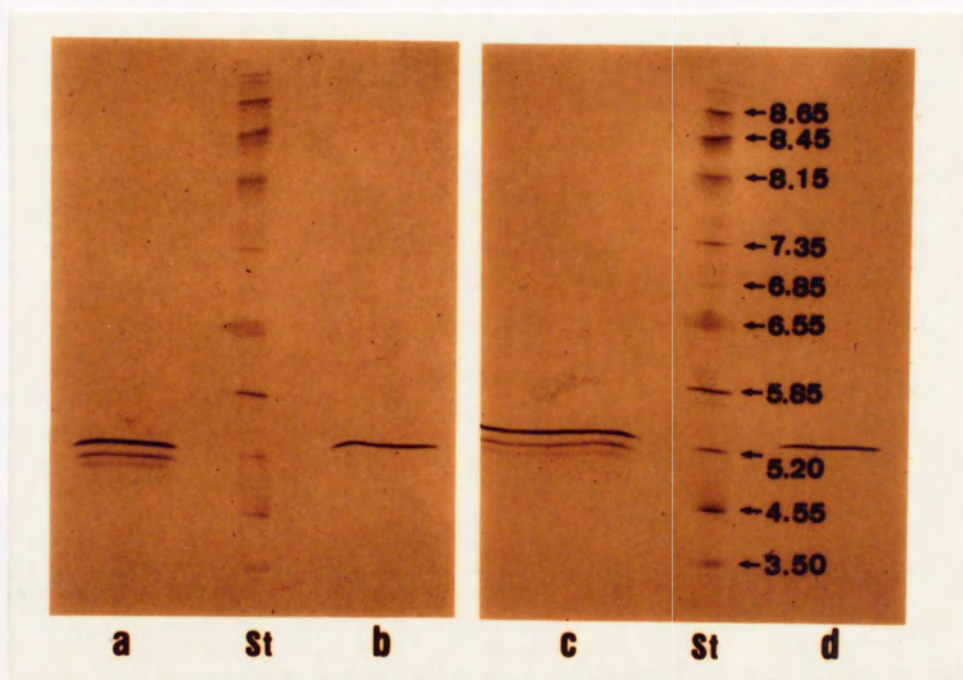


図8 両精製酵素のホロ酵素およびアポ酵素の等電点電気泳動パターン

- a : anaero-SOD (タンパク質量 ; $2\mu\text{g}$)
b : アポ anaero-SOD (タンパク質量 ; $1.7\mu\text{g}$)
c : aéro-SOD (タンパク質量 ; $2\mu\text{g}$)
d : アポ aéro-SOD (タンパク質量 ; $2\mu\text{g}$)
St : 等電点測定用標準タンパク質標品

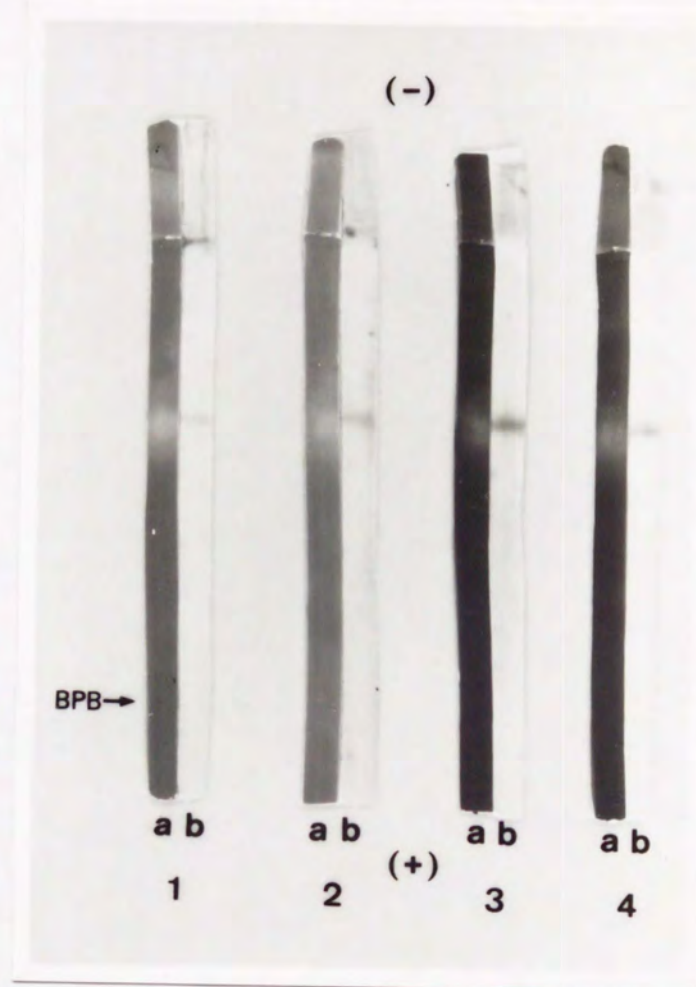


図9 再配位したanaero-SODとaero-SODの酵素活性およびタンパク質を染色したポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動パターン

- 1 : アポanaero-SODを MnCl_2 により再配位したSOD
(タンパク質量 ; $12 \mu\text{g}$)
 - 2 : アポaero-SODを MnCl_2 により再配位したSOD
(タンパク質量 ; $12 \mu\text{g}$)
 - 3 : アポanaero-SODを $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ により再配位したSOD
(タンパク質量 ; $10 \mu\text{g}$)
 - 4 : アポaero-SODを $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ により再配位したSOD
(タンパク質量 ; $10 \mu\text{g}$)
- a : 酵素活性を染色
b : タンパク質を染色