

Title	大腸菌および好熱菌のスーパーオキシドジスムターゼに関する研究
Author(s)	松村, 吉信
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3094158">https://doi.org/10.11501/3094158</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	まつ 松	むら 村	よし 吉	のぶ 信
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)			
学位記番号	第 1 1 3 5 2 号			
学位授与年月日	平成 6 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科醗酵工学専攻			
学位論文名	大腸菌および好熱菌のスーパーオキシドジスムターゼに関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授 今中 忠行			
	教授 大嶋 泰治	教授 山田 靖宙	教授 高野 光男	
	教授 菅 健一	教授 新名 惇彦	教授 卜部 格	
	教授 塩谷 捨明	教授 吉田 敏臣	教授 二井 将光	

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、大腸菌および好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* SIC1 株における酸素障害とスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の諸性質について検討したものである。

第 1 章では、化学的変異処理法によって好気条件下で生育不能となった変異株を多数取得し、このうち 2 株 (no.34 株と no.58 株) が Mn-SOD 欠損株であることを明らかにしている。No.34 株は Mn-SOD 構造遺伝子に異変が生じた変異株、no.58 株は Mn-SOD リプレッサーの過剰生産株であると考察している。これら 2 株は好気条件下で栄養要求性を示し、no.34 株の形質を相補する遺伝子をクローニングし、イソロイシン、ロイシン、バリン生合成酵素で、 $O_2^-$  感受性酵素である  $\alpha$ 、 $\beta$ -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼがコードされていることを明らかにしている。

第 2 章では、no.34 株由来変異型 Mn-SOD (M') の解析を行っている。M' を精製し、分子量を測定し、M' は 2 量体酵素であることを明らかにしている。また M' の変異は Glu24Lys および Asp105Asn であることを M' 構造遺伝子の塩基配列決定により明らかにしている。

第 3 章では、部位特異的変異操作法を用いて  $O_2^-$  耐性変異  $\alpha$ 、 $\beta$ -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの取得を試みている。Cys189Ser 変異酵素および Cys192Ser 変異酵素ともに活性が低下し、これらシステイン残基が [4 Fe-4 S] クラスターに関与していることを明らかにしている。さらに  $O_2^-$  耐性変異酵素の取得に成功している。

第 4 章では、大腸菌 SOD 遺伝子 (*sodA*, *sodB*) の発現制御機構の解析とこれらを用いた人為的発現制御可能なベクターへの応用を試みている。*sodB* の発現が酸素および鉄特異的キレート剤によって転写段階で制御されることを明らかにしている。また *sodA* の発現が酸素によって転写段階で誘導されることを明らかにし、また翻訳段階でも制御されていることを考察している。*sodA* プロモーターを用いて外来タンパク質の大量生産に成功している。

第 5 章では、*B. stearothermophilus* SIC1 由来の SOD を精製し、本菌には 1 種類の SOD しか存在せず、本酵素が 2 量体 Mn-SOD であることを明らかにしている。さらに本酵素の構造遺伝子 (*sodS*) の塩基配列を決定している。本菌の Mn-SOD アミノ酸配列はすでに報告されている *B. stearothermophilus* ATCC12980 由来 Mn-SOD のアミノ酸配列と 97.5% の相同性を有していることを明らかにしている。

第 6 章では、*B. stearothermophilus* SIC1 の染色体 DNA から、原核生物由来 SOD アミノ酸配列と相同性の高いタンパク質をコードしている DNA 領域 (*znbT*) をクローニングしている。ZnbT を大腸菌で大量発現させて精製し、微弱 SOD 活性が存在していることを明らかにしている。さらに Mn-SOD および Fe-SOD では有しない多量の Zn と

結合する活性が ZnbT で検出され、ZnbT が SOD の起源にあたるタンパク質である可能性について論じている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、大腸菌および好熱菌におけるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の役割を解析するために、大腸菌酸素感受性変異株の取得および大腸菌ならびに好熱菌由来の SOD 構造遺伝子のクローニングを行っている。宿主として大腸菌、枯草菌および好熱菌を用いて SOD の大量生産に成功している。また、新規 SOD 様タンパク質構造遺伝子 (*znbT*) を取得すると共に、ZnbT を精製し、本タンパク質が亜鉛結合タンパク質であることを明らかにしている。さらに、タンパク質工学的手法を用いて酸素耐性変異酵素の取得ならびに酸素による人為的発現制御可能なベクターの開発に成功している。これらの成果を要約すると以下ようになる。

- (1) 大腸菌において SOD 活性の減少は好気条件下での生育に障害を生じさせることを明らかにしている。この障害は  $O_2^-$  による障害であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼが  $O_2^-$  で不活化されていることを考察している。
- (2) 変異型酵素の諸性質および野生型酵素との違いを検討する手法として、その構造遺伝子をクローニングして塩基配列を決定し、変異酵素のアミノ酸配列を推定することが有効であることを示している。実際に変異 Mn-SOD の変異部位を同定し、変異酵素の性質の変化について論じている。
- (3)  $O_2^-$  感受性酵素の酸化部位である活性中心をタンパク質工学的手法によりアミノ酸置換し、酵素活性の低下をともなうが、 $O_2^-$  耐性酵素に変化させることが可能であることを示している。
- (4) *sodB* の発現が酸素および鉄キレート剤によって抑制されていることを示している。また *sodA* の発現が酸素によって転写段階で誘導されることを確認し、この発現制御系を用いて酸素による人為的発現制御可能なベクターとして応用できることを示している。
- (5) SOD の大量発現は微生物に障害を与えることを示し、細胞内の SOD 活性は微妙に制御される必要があることを考察している。
- (6) 微弱な SOD 活性しか有しない SOD 様タンパク質をコードしている *znbT* をクローニングしている。ZnbT は多量の亜鉛と結合する金属結合タンパク質であることを明らかにし、微弱な SOD 活性は本タンパク質にマンガンあるいは鉄が結合しているためであることを明らかにしている。さらに本タンパク質が SOD の起源に相当するタンパク質であると考察している。

以上のように、本論文は生物が酸素存在下で生育する上で必要な SOD の役割や新規 SOD 様タンパク質について論じると共に、*sodA* 発現制御系を用いた人為的発現制御可能なベクターの開発に成功しており、醗酵工学に貢献するところが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。