

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	https://doi.org/10.11501/3094158
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

1994年12月

松村吉信

目次

序論	1
第1章 大腸菌における酸素感受性変異株の取得と解析	6
第1節 緒言	6
第2節 実験材料および方法	7
第3節 結果	12
1.3.1. 酸素感受性大腸菌の取得	12
1.3.2. 変異株に及ぼす酸化剤および熱ショックの影響	13
1.3.3. 変異株のSOD活性に及ぼすパラコートの影響	14
1.3.4. 変異株のSOD活性に及ぼす α -フェナンスロリンの影響	15
1.3.5. 変異株の好気条件下での栄養要求性	16
1.3.6. 変異株の形質を相補する遺伝子の取得	16
1.3.7. SOD構造遺伝子 (<i>sodA</i> および <i>sodB</i>) のクローニング	17
第4節 考察	19
第5節 要約	21
第2章 <i>Escherichia coli</i> no. 34由来Mn-SOD変異酵素 (M') の解析	22
第1節 緒言	22
第2節 実験材料および方法	22
第3節 結果	26
2.3.1. 大腸菌SOD欠損株の取得	26
2.3.2. <i>sodA34</i> の取得	28
2.3.3. <i>sodA34</i> 塩基配列の決定	28
2.3.4. <i>sodAE24K sodAD105K</i> の構築と変異タンパク質の解析	30
2.3.5. M'の精製	30
2.3.6. M'と野生型Mn-SODの耐熱性の比較	33
第4節 考察	33
第5節 要約	35
第3章 タンパク質工学的手法を用いた酸素耐性 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの取得	36
第1節 緒言	36
第2節 実験材料および方法	36
第3節 結果	39
3.3.1. <i>E. coli</i> IM303の性格付け	39
3.3.2. α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸素感受性	40

3.3.3.	部位特異的変異操作法による α, β -ジヒドロキシイソバ リレートデヒドラターゼの取得	41
3.3.4.	変異酵素の活性の変化と酸素に対する影響	43
第4節	考察	44
第5節	要約	47
第4章	大腸菌SOD構造遺伝子 (<i>sodA</i> と <i>sodB</i>) の酸素による発現制御機構 の解析とこれらを用いた発現ベクターの開発	48
第1節	緒言	48
第2節	実験材料および方法	49
第3節	結果	51
4.3.1.	<i>sodA-lacZ</i> の発現に及ぼす酸素の影響	51
4.3.2.	<i>sodB</i> の発現制御機構	53
4.3.3.	<i>sodA</i> プロモーターを用いた外来タンパク質発現システム の開発	55
第4節	考察	56
第5節	要約	57
第5章	好熱菌 <i>B. stearothermophilus</i> SIC1由来Mn-SODの精製と 構造遺伝子 (<i>sodS</i>) のクローニング	58
第1節	緒言	58
第2節	実験材料および方法	58
第3節	結果	64
5.3.1.	<i>B. stearothermophilus</i> SIC1由来SODの精製	64
5.3.2.	配位金属の同定	66
5.3.3.	<i>B. stearothermophilus</i> SIC1由来Mn-SODの N末端アミノ酸配列の決定	67
5.3.4.	<i>B. stearothermophilus</i> SIC1由来Mn-SOD 構造遺伝子 (<i>sodS</i>) の塩基配列決定	67
5.3.5.	<i>sodS</i> のクローニング	69
5.3.6.	<i>sodS</i> 遺伝子増幅効果による <i>B. stearothermophilus</i> SIC1 由来Mn-SODの大量発現	71
第4節	考察	72
第5節	要約	75
第6章	好熱菌 <i>B. stearothermophilus</i> SIC1由来SOD様タンパク質構造 遺伝子 (<i>znbT</i>) のクローニングとZnbTタンパク質の精製	76
第1節	緒言	76
第2節	実験材料および方法	76

第3節	結果	80
6.3.1.	SOD様タンパク質構造遺伝子のクローニング	80
6.3.2.	SOD様タンパク質構造遺伝子 (<i>znbT</i>) 塩基配列の決定	81
6.3.3.	プライマー伸長法を用いた転写産物の確認	83
6.3.4.	ZnbTの精製	85
6.3.5.	ZnbTに結合した金属原子の同定	89
第4節	考察	90
第5節	要約	93
総括と展望		94
参考文献		99
本論文に関連する報告		110
謝辞		111

序論

地球が銀河系惑星の1つとして誕生して46億年、原始生命体が地球上に出現して約36億年が経過していると言われており、この間に地球上の環境はさまざまに変化してきた。地球が誕生した当時の大気は、 N_2 、 CO_2 、 H_2 、メタン、アンモニア、硫化水素や水蒸気からなり、初期に生育していた生物は嫌気性細菌のみであった。酸素が地球上で発生し始めたのはラン藻が出現した約30億年前であると考えられている。この時代には酸素はまだ大気中に放出されずに海中の鉄イオンと結合し、赤茶けた酸化鉄となり沈殿していたと考えられている。その後、各種光合成生物の出現により大気中に酸素が蓄積されるようになり、この酸素の蓄積によって、生物種および個体数が減少していった。このような環境変化によって、まずその環境に耐える生物種のみ種の保存が許され、さらにその環境を利用しうる生物種が進化過程で有利な位置を占めてきたと考えられる(1)。

現在、酸素は最も効率良くATPを生産する電子伝達系の最終電子受容体として、またホルモンや生理活性物質の生合成として欠くことのできない物質である。ATPは生体内での高エネルギー物質で、物質代謝や細胞構成成分の生合成のエネルギー源であり、生命維持にとって欠かすことのできない物質である。酸素を用いないATP生合成系として例えば嫌気状態でATP生合成が可能な解糖系や硫黄還元菌に存在する硫黄を最終電子受容体として用いる電子伝達系などが挙げられるが、これらのATP生産は酸素を用いた電子伝達系に比べて非常に効率が悪い。このことから酸素を利用する好気性生物は進化上有利な位置を占めることができ、また酸素が進化の大きな原動力になったと考えられる。

このような酸素の有益性から、酸素による障害を軽視する傾向があった。しかし、この有益性を裏返すと、酸素は反応性が高く、ヒトが40%酸素に曝されると肺や脳に一時的な障害を惹起する。また通性嫌気性菌である大腸菌は高濃度酸素下で増殖速度が低下し、栄養要求性を示すことが知られるようになった(2,3)。このように酸素を利用する細菌から高等動物に至る好気性生物全般にわたって、有用物質である酸素によって障害が引き起こされることが明らかになっている。最近、これら障害の原因が、生物が酸素を利用する際に副産物として生成される活性酸素と呼ばれる反応性の非常に高い物質に因ることが明らかになってきた(1,4-6)。この活性酸素は現代病と呼ばれている癌、心筋梗塞、糖尿病、リウマチをはじめ脳浮腫、白内障、種々の虚血および自己免疫疾患の引き金となっているだけでなく、老化の一要因であると考えられるようになった。

活性酸素は酸素種の中で非常に反応性に富んだ物質の総称であり、狭義では 3O_2 (分子状酸素) の1電子還元種であるスーパーオキシド (O_2^-)、2電子還元種である過酸化水素 (H_2O_2)、電子励起状態の酸素分子である1重項酸素 (1O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、金属-酸素錯体 (金属オキソ種も含む) などとその主

なものである。広義では生体成分である不飽和脂肪酸 (L) と上記活性酸素種との反応から生じるペルオキシラジカル ($\text{LOO}\cdot$)、アルコキシラジカル ($\text{LO}\cdot$)、ヒドロペルオキシド (LOOH) なども挙げられている。現在、これら活性酸素の中で、生体内で初期段階に合成される活性酸素が O_2^- であると考えられている。 O_2^- は活性酸素種の中でも酸素障害の非常に重要な原因物質であると考えられている(1)。

酸素による障害は1770年代にシェーレとプーストリによって酸素が発見された当時から予測されてきた。しかしながらその実態についてはスーパーオキシドジスムターゼの発見まで捕えられなかった。1969年、McCordとFridorich は初めて牛の赤血球から単離されていた抗炎症作用をもつタンパク質が O_2^- を H_2O_2 と分子状 O_2 に変化させる不均化反応を触媒することを発見した(7)。彼等はこのタンパク質をスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と名付けた。その後、酵母、糸状菌、小麦の胚、ヒト赤血球などからも見出され、構造解析から銅と亜鉛を含むCu,Zn-SODであることが明らかとなった。原核生物では主に大腸菌で研究され、Cu,Zn-SODと構造上の類似点がないMn-SOD(8) およびFe-SOD(9)が存在していた。SODは好気性生物全般に分布し、現在ではある種の嫌気性菌にもSODの存在が明らかとなっている(10,11)。また活性酸素の存在が明らかとなり、これらの測定法についても精力的に研究されている。現在、種々の活性酸素を特異的に測定する方法は確立していないが、科学的、酵素学的測定法やスピントラップ法を用いたESRスペクトロメトリーによってある程度成果があげられている(1,4,5)。さらに遺伝子工学などの生物工学の進歩によって生体内で発生した活性酸素の影響を評価することが可能となり、活性酸素の発生メカニズムや活性酸素に対する耐性機構についての研究が盛んに行われるようになってきた。

生体内での活性酸素に対する耐性機構として、1) 活性酸素の発生を低下させる、2) 発生した活性酸素を細胞構成成分と反応する前に消去する、3) 活性酸素によって酸化された細胞構成成分を速やかに修復または除去する、などが考えられる。活性酸素の発生は酸素を利用する際に避けられないもので、1) については進化の過程でタンパク質に備わった機能である。3) についてはDNA修復機構であるSOS応答などや(12,13)、酸化メチオニン残基の還元酵素であるメチオニンスルホキサイドレダクターゼによるタンパク質の修復機構(14,15)が関与していると考えられている。また酸化され不活化されたタンパク質を認識して分解除去するプロテアーゼが存在していることが知られている(16-19)。さらに他のストレス(熱ストレスやアルキル化剤に対するストレスなど)で誘導されるタンパク質の中にも酸素ストレスで誘導されるタンパク質があることから、これらのタンパク質の中には酸化障害を受けた物質に対する修復や除去に関与しているものもあると考えられる(20)。しかしながら、1)、3)については生物にとって積極的な活性酸素耐性機構とはなりえない。これに対して2)については酸素ストレスに対して積極的に作用することから最も重要な酸素耐性機構であると考えられる。この機構の主役とな

るものとして、活性酸素除去酵素やアスコルビン酸、グルタチオン、トコフェノールなどの低分子化合物が知られている。低分子化合物は寿命の短い活性酸素種である $^1\text{O}_2$ 、 $\cdot\text{OH}$ の消去に関与し、活性酸素除去酵素は主に比較的寿命の長い活性酸素種である O_2^- 、 H_2O_2 、 LOOH の消去に関与していると考えられている。 O_2^- はSODによって、 H_2O_2 はカタラーゼによって、 LOOH はペルオキシダーゼによって分解、消去される。特にSODは O_2^- を除去することから酸素ストレスにとって最も重要な酵素であると考えられている(21)。

最もよく研究されているSODは大腸菌由来と好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来の酵素である。大腸菌では遺伝子工学的手法などの生物工学的手法が確立されており、遺伝的な背景も生物の中で最もよく解析され、酸素耐性機構の解析に適している。これに対して、好熱菌 *B. stearothermophilus* 由来のタンパク質は非常に安定であることが知られており、タンパク質の構造解析などに適している。

大腸菌のSODはMn-SOD(8)とFe-SOD(9)の2種類が知られている。それぞれ共にホモダイマーでモノマー当たり1原子の金属を含んでいる。Mn-SODは酸素分圧の上昇(22)やパラコートなどの O_2^- 増産剤(23-25)によって誘導されることが知られている。これらの誘導は転写レベルや翻訳後のレベルで調節されていることが示唆されており、非常に複雑に調節されていることが明らかとなっている(26-34) (図1)。転写レベルの調節には、Fur(鉄イオンの取り込みに関与する蛋白質量を調節している制御因子)による負の制御や(28,31)、SoxR(29,30)、SoxS(36,37)、SoxQ(35)による正の制御の存在が示唆されている。また、これら以外の制御因子が関与している可能性も示唆されている(31-32)。Mn-SOD活性が発現していない嫌気状態でSOD活性を有しないapoMn-SODが確認され、Mnを添加し塩酸グアニジン処理によって活性化されることから、翻訳後レベルの調節機構が存在することも示唆されている(33,34,38)。これに対してFe-SODは嫌気条件下でも発現していることから構成性であると考えられていたが(23)、最近になってFurにより転写レベルで正に制御されていることが示唆されている(28)。このような複雑な制御機構が存在する原因として、SODが活性酸素である O_2^- から新たな活性酸素である H_2O_2 を生み出す反応を触媒するためであると考えられる。

一方、好熱菌 *B. stearothermophilus* 由来Mn-SODは主に構造解析に用いられてきた。これは好熱菌由来のタンパク質が常温菌由来のタンパク質に比べて安定性が高いためである。X線構造解析の結果から、大きな2本の α -ヘリックスを含むドメインと α -ヘリックスと β -シートの両方を含むドメインとからなることが明らかとなった。さらに活性中心には金属の配位部位である3つのヒスチジン残基とアスパラギン酸残基が存在し、2量体形成に関与しているアミノ残基も同定されている(39)。

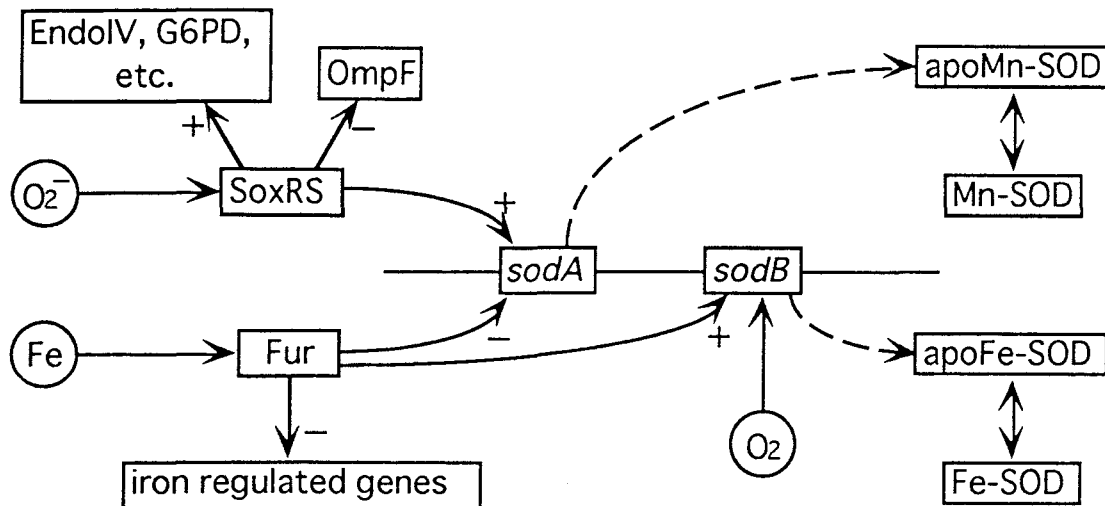


図1 大腸菌におけるSOD発現制御機構。+は誘導を、-は抑制を示している。*sodA*はMn-SOD構造遺伝子、*sodB*はFe-SOD構造遺伝子である。

今まで酸素が生物にとって非常に重要かつ有用な物質であるため、その毒性については軽視される傾向にあった。しかし、最近になって活性酸素が発見され、老人病や現代病に活性酸素が関与していることが明らかとなり、酸素障害が注目を集めるようになった。SODが”万能薬”や”不老不死の薬”になりうるのではないかという人も現われるほどになり、応用面として医薬品や食品（酸化による商品の劣化が問題となっている）への利用が期待されるようになってきた。実際にはパラコート中毒患者にリポソームSOD（人工的な脂質にSODを巻き込んだもの）として静脈内に投与する方法がとられている(40)。SODの安定性を上げるためにポリエチレングリコールと結合させ、酵素の半減期を6分から35時間に延ばすことに成功している(41)。これ以外にも修飾SODやSOD様銅錯体など応用面に利用可能なSODの開発が行われている(1,5)。

本研究では、遺伝子操作技術が確立し、遺伝的な背景が比較的解明されている大腸菌を用いて、酸素障害を評価すると共にSODの役割やSOD発現制御機構の解析を行った。さらに熱安定性が高く、工業的利用価値が高いと考えられる好熱菌*B. stearothermophilus* SIC 1由来のSODについて遺伝子のクローニングとその塩基配列決定およびアミノ酸配列の解析を行った。さらに*B. stearothermophilus* SIC 1からSOD様タンパク質構造遺伝子のクローニングにも成功し、そのタンパク質の機能解析も試みた。

第1章では、大腸菌の酸素感受性変異株を取得し、これらの活性酸素除去酵素活性を検討した。Mn-SOD欠損株の性質について詳細に検討すると共に、Mn-SOD構造遺伝子(*sodA*)およびFe-SOD構造遺伝子(*sodB*)をクローニングした。さ

らにMn-SOD欠損株について、*sodA*組換えプラスミドによるSOD活性増幅効果を評価し、大腸菌におけるSODの役割を検討した。O₂⁻感受性タンパク質を取得するためにMn-SOD欠損株の形質を相補する遺伝子領域を取得した結果、この領域にはO₂⁻感受性タンパク質 α , β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼがコードされていることが明らかとなった。

第2章では、Mn-SOD欠損株である大腸菌no.34株の変異型Mn-SODタンパク質であるM'の構造遺伝子を取得し、M'の性質について検討した。

第3章では、第1章で取得したO₂⁻感受性タンパク質である α , β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼをO₂⁻耐性に改変することを試みた。 α , β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの活性中心が酸化されやすい構造であると考えられていたため、活性中心残基をアミノ酸配列から予想し、部位特異的変異操作法を用いて、本酵素をO₂⁻耐性タンパク質に改変することに成功した。

第4章では、*sodA*, *sodB*にレポーター遺伝子 (*lacZ*と*cat*) を連結し、酸素による転写量の違いを検討し、それぞれの転写レベルでの制御機構の解析を試みた。さらに、これらプロモーターが工業的に応用できる人為的発現制御可能なプロモーターとして利用できるかどうかについて考察した。

第5章では、好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1由来SODを精製した。このタンパク質は単一サブユニットからなる2量体タンパク質で、単量体当り1原子のMnが配位していた。このMn-SOD構造遺伝子 (*sodS*) のクローニングをコロニーハイブリダイゼーション法を用いて試みたが、目的の遺伝子を取得することができなかった。そこで染色体DNAから直接*sodS*の塩基配列を決定した後、PCR法を用いて当該遺伝子をクローニングした。また宿主として大腸菌、枯草菌、*B. stearothermophilus* SIC1を用いることにより、その大量発現を行うことができた。

第6章では、好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1からSOD様タンパク質構造遺伝子 (*znbT*) の取得に成功し、塩基配列を決定した。*ZnbT*アミノ酸配列は既知のSODアミノ酸配列と非常に相同性が高いが、SOD比活性は非常に低下していた。大腸菌を用いて*ZnbT*を大量発現させ、精製を行った結果、4量体タンパク質であることが明らかとなった。*ZnbT*は通常のSODと異なり亜鉛が多量に結合したタンパク質であることが明らかとなり、微弱なSOD活性は微量に結合していたMnあるいはFeに因ると考えられた。

最後に本研究で明らかとなった結果を総括し、今後の研究の展望についてまとめた。

第1章 大腸菌における酸素感受性変異株の取得と解析

第1節 緒言

大腸菌をはじめ好気下で生育可能な生物にとって、酸素はエネルギー源であるATPを効率良く生産する上で必要不可欠な物質である。しかしながら酸素を利用する際、必ず副産物として反応性の高い O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 等の種々の活性酸素が発生する(1,42)。特に生体内では、 O_2^- が活性酸素生成の初期段階に産生されると考えられている。細胞内の活性酸素の影響には、DNAの障害、酸化によるタンパク質の不活化や不飽和脂肪酸の酸化による膜構造の損傷など細胞構成成分の酸化が知られており(1,4)、活性酸素が高濃度で発生する環境下では生物が生育できなくなる。このような活性酸素による障害から細胞を守る上で活性酸素除去酵素であるSOD、カタラーゼやペルオキシダーゼが存在している(図1-1)。

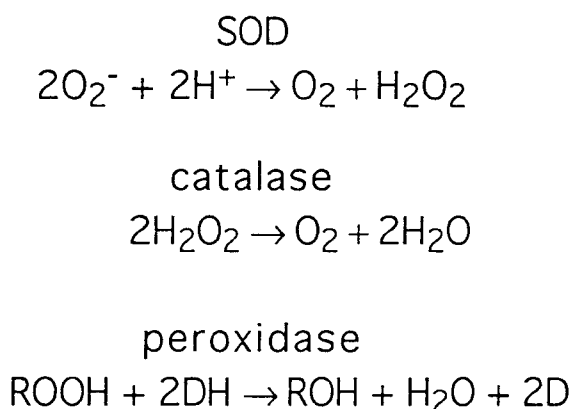


図1-1. 活性酸素除去酵素による活性酸素除去機構。

生物における活性酸素の障害は高等生物で精力的に研究されている。しかしながらこれらの研究は、生体全体としての最終的な障害を評価するものであり、細胞レベルでの活性酸素による影響、分子レベルにおける酸化機構や個々の活性酸素による酸化機構の特徴に関する研究は立ち遅れている。この原因は、高等生物では細胞を培養する技術や、細胞内で特定の活性酸素を発生させる技術が確立されていないことなどが挙げられる。大腸菌では細胞を多量に培養することができだけでなく、遺伝子工学的手法を用いて、種々の変異株の取得および解析が可能で、特に活性酸素除去酵素欠損株を用いて特定の活性酸素における影響を研究することができるなど利点が多い(43,44)。さらに活性酸素耐性機構の一端である活性酸素除去酵

素の発現制御機構の解明も遺伝子工学的手法を用いて行うことが可能である。このような研究の成果を基にして、酸素感受性菌を酸素耐性菌へ育種することが可能となると考えられる。そこで我々は大腸菌をモデルとして特定の活性酸素（特にO₂⁻）の細胞に与える影響を解明することを目的とした。

この章では、大腸菌に化学的変異処理を行い、酸素感受性変異株の取得を試みた。取得された変異株の活性酸素除去酵素活性を検定し、Mn-SOD欠損株の性質について詳細に検討した。さらに、O₂⁻感受性タンパク質の構造遺伝子を取得した。また*sodA*および*sodB*のクローニングも同時に行い、遺伝子増幅効果によるSOD活性増幅効果についても検討した。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

使用した菌株とプラスミドを表1-1に示した。

表1-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
HB101	<i>hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44</i>	(45)
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
MM294	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi</i>	(45)
no. 34	the same as MM294 except SodA ⁻	本章
no. 58	the same as MM294 except SodA ⁻	本章
Plasmids	Characteristics	References
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	(46)
pBSA-1	Ap ^r , <i>sodA</i>	本章
pBSB-1	Tc ^r , <i>sodB</i>	本章
pBSA-R	Ap ^r , <i>ilvD</i>	本章

E. coli MM294を本実験の野生株として用いた。この野生株をN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 処理して多数の酸素感受性変異株を得た。組換えプラスミドの構築における宿主として*E. coli* JM109および*E. coli* HB101を、ベクターとしてpBR322を用いた。

培地および培養条件

栄養培地としてL培地 (10 g/l バクトトリプトン、5 g/l 酵母エキス、5 g/l NaCl、NaOHでpH 7.3に調整) を用い、粗酵素液を調製する時は 0.1 mM MnSO₄ または0.1 mM FeSO₄を添加した。最少培地としてM9培地 (0.8 % NaHPO₄, 0.3 % KH₂PO₄, 0.05 % NaCl, 1 mM MgSO₄7H₂O, 1 mM CaCl₂, 0.2 % グルコース) にチアミン (1 mg/l)、0.1 mM MnSO₄、0.1 mM FeSO₄を添加した培地を用いた。また要求アミノ酸として 10 mg/l の各種アミノ酸または100 mg/l のカザミノ酸を添加した。

液体培養は前培養液 (1夜培養液) を1 %植菌し、37 °Cにて8時間培養した。o-フェナンスロリンやパラコート添加効果の実験では、菌株を対数増殖期中期 (OD₆₆₀が約0.3) まで培養後、それぞれの試薬を添加し、その後4時間培養した。

プラスミド保持株の培養には、アンピシリン (Ap) (50 μg/ml) またはテトラサイクリン (Tc) (20 μg/ml) を添加して培養した。

酸素感受性変異株の取得

E. coli MM294をL培地にて37 °Cで対数増殖期中期 (OD₆₆₀が約0.3) まで振盪培養し、終濃度100 mg/l のNTG溶液を添加した。約15分間振盪培養後、集菌し、L培地で洗浄した。新鮮なL培地を添加して37 °Cで4時間培養した。この菌体をNTG処理菌体とした(47)。

SOD活性とカタラーゼ活性の検定法

1. 粗酵素液の調製

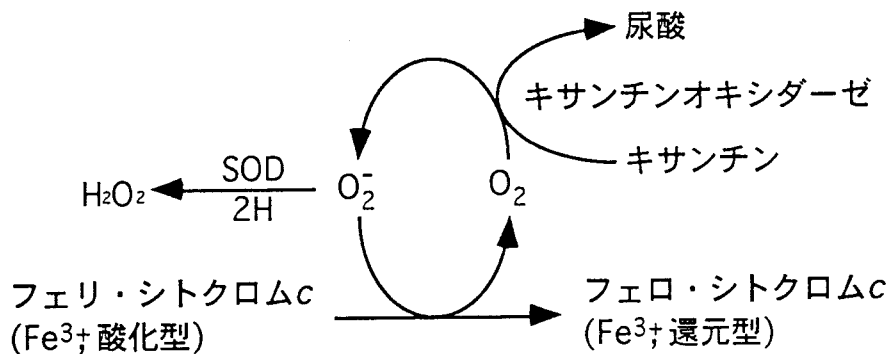
菌体を培養液から遠心分離 (8000xg、5分間) で集菌後、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で洗浄し、0.1 mM EDTAを含む50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) に懸濁した。菌体懸濁液を20秒間4回の超音波処理を行い、遠心後の上澄み液を菌体内粗酵素液として用いた。

2. native-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (native-PAGE) による活性染色

Davisの方法に従った(48)。分離ゲルとして7.5 %ポリアクリルアミドゲルを、濃縮ゲルとして4 %ポリアクリルアミドゲルを用いた。SOD活性染色法(49)としてニトロブルーテトラゾリウム法を用いた。カタラーゼ活性染色法(50)としてジアミノベンジジン法を用いた。

3. SOD活性測定法

SOD活性測定法はMcCordとFridovichのシトクロムc法(7)に従った。0.1 mM シトクロムc 0.3ml、0.5 mM キサンチン 0.3 ml、試料 2.4 ml (試薬はすべて50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8), 0.1 mM EDTA に溶解した) をキューベット中で混合し25 °Cに保温した後、キサンチンオキシダーゼ10 μ lを加え、A₅₅₀を記録した。試料タンパク質濃度を種々変化させて実験を行い、シトクロムcの還元を50%阻害する反応液中のタンパク質濃度を測定した。シトクロムcの還元を50%阻害するタンパク質量が1 mgの時1 U/mgとした。



シトクロムc法の原理

酸化剤および熱に対する感受性の検定

1. 酸化剤に対する感受性の検定(51)

L培地でOD₆₆₀が1.0まで培養した菌体液0.1mlをL培地 (0.7% 寒天) に懸濁し、これをL寒天培地に重層した。酸化剤を含んだペーパーディスクを重層寒天上に置き、この状態で37°Cにて24時間培養した。その後、致死円の直径を測定することで評価した。

2. 熱に対する感受性の検定(51)

L培地でOD₆₆₀が1.0まで培養後、L培地で1/10倍に培養液を希釈し、50 °Cで1分間処理した。処理菌体懸濁液をL寒天培地に広げ、生菌数を測定した。対照として加熱処理していない菌体懸濁液をL寒天培地に広げ、生菌数を測定した。生菌数の割合で熱感受性を評価した。

大腸菌の形質転換

大腸菌の形質転換は、今中らの方法(52)に従った。塩化カルシウムで処理したコンピテント細胞にグリセロール (終濃度15 %(v/v)) を加え、-80 °Cで保存したものを使用した。

DNAの調製

DNAはTE緩衝液（10 mMトリス塩酸塩（pH7.6）、0.1 mM エチレンジアミン4酢酸2ナトリウム（EDTA））に溶解した。

大腸菌からの染色体DNAの調製はWarrickとLederbergの方法(53)を一部改良して行った。1晩培養した培養液（100 ml）から菌体を集菌し、緩衝液（10 mMトリス塩酸塩（pH8.0）、1 mM EDTA）で洗浄した。次に50 mMトリス塩酸塩（pH 8.0）、50 mM EDTA、15 %スクロース溶液 3 mlに懸濁し、30分間室温で放置した。その後、50 mMトリス塩酸塩（pH 8.0）、50 mM EDTA、1 %ザルコシル溶液 3 mlを加え、塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配超遠心により染色体DNAを精製した。

大腸菌からのプラスミドDNAの調製はBirnboimとDolyのアルカリ抽出法(54)を一部改良して行った。薬剤を含むL培地で1晩培養した培養液 1 mlをエッペンドルフ遠心管に移して遠心で集菌した。得られた菌体を100 μ lの溶液1（25 mMトリス塩酸塩（pH 7.4）、10 mM EDTA、50 mM グルコース）に懸濁し、5分間放置した。次に200 μ l 溶液2（0.1 N NaCl、1 %ドデシル硫酸ナトリウム（SDS））を加えて混合した。氷中で5分間放置した後、3 M酢酸カリウム（pH 4.8）を150 μ l加えて混合した。氷中で15分以上放置した後、遠心で沈殿を除去した。上澄液にフェノール/クロロホルム（1:1）溶液を等量加え混合し、水層を抽出した。2倍量のエタノールを添加混合して室温にて2分間放置し、遠心によりDNA沈殿を回収した。さらにDNA沈殿を70 %エタノールでリンスし、真空乾燥した。プラスミドDNAを大量調製する場合には、アルカリ変性法をスケールアップし、得られたDNA画分を塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配超遠心にて精製した。

DNA分析のためのアガロースゲル電気泳動とアガロースゲルからのDNAの抽出

DNAの分析のために、アガロースゲル電気泳動を標準的な条件（45）で行った。アガロースゲルからのDNAの抽出にはGENECLEAN II kit（BIO101社製）を用いた。

³²P標識オリゴヌクレオチドの作製

T4 polynucleotide kinaseを用いて、オリゴヌクレオチドの5'末端を³²Pで標識した(55)。50 pmolオリゴヌクレオチドに50 pmolの $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP と20 UのT4 polynucleotide kinaseを混合し、10 mM MgCl₂を含む50 mM Tris-HCl（pH 7.6）緩衝液中で1時間反応させた。

コロニーハイブリダイゼーション法

常法(55)にしたがった。コロニーを適当な薬剤を含んだL寒天培地上で培養し

た。コロニーが適当な大きさになった時点で培養を終了し、ニトロセルロース膜上にレプリカした。このニトロセルロース膜を10 %ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で湿らせたろ紙上で3分間放置する。その後、変性溶液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) で湿らせたろ紙上で5分間放置した。さらに中和溶液 (1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)) で湿らせたろ紙上に移し5分間放置した。ニトロセルロース膜を乾燥させ、80℃にて2時間保温しDNAを固定化した。

DNAを固定化したニトロセルロース膜を6XSSC (20XSSC : 175.3 g/l NaCl、88.2 g/l Na-citrate、pH 7.0 NaOHで調整) に5分間浸した後、前洗浄液 (1 M NaCl、1 mM EDTA、0.1 % SDS、Tris-HCl (pH 7.0)) 中に移して42 °Cで2時間振盪した。ニトロセルロース膜をプレハイブリダイゼーション液 (50 %ホルミアミド、5XDenhard't solution (1 g/l フィコール、1 g/l ポリビニルピロリドン、1 g/l BSA)、5XSSPE(43.5 g/l NaCl、6.9 g/l NaH₂PO₄ H₂O、1.85 g/l EDTA pH 7.4 NaOH で調整)、0.1 % SDS) 中に移し、42 °Cで5時間以上保温した。その後³²Pで末端標識したプローブを適当量添加し、42 °Cで振盪した。プローブとハイブリダイズさせたニトロセルロース膜を洗浄液A (2XSSC、0.1 % SDS) で洗浄後、洗浄液B (1XSSC、0.1 %SDS) で再度洗浄した。ニトロセルロース膜を乾燥させ、X線フィルムに感光させた。

SOD構造遺伝子の取得

E. coli MM294染色体を*sodA*の場合は*EcoRI*と*BamHI*(56)で、*sodB*(57)の場合は*PstI*で切断後、pBR322と連結した。これらのDNA溶液で*E. coli* JM109を形質転換した。形質転換体の中から*sodA*組換えプラスミドpBSA-1と*sodB*組換えプラスミドpBSB-1をコロニーハイブリダイゼーション法で選択した。プローブに用いたオリゴヌクレオチドを図1-2に示す。これらのプローブはすでに報告されているそれぞれの塩基配列(60,61)を基に合成した。

*sodA*プローブ : 5' GATTTCCATGGTCTGCTTATCGAA 3'
*sodB*プローブ : 5' GTTGAATACGCCACCTTCAGAGCTGCG 3'

図1-2 コロニーハイブリダイゼーション法のプローブに用いた合成オリゴヌクレオチド。

変異株の形質を相補する遺伝子の取得

ショットガンクローニング法を用いた。*E. coli* MM294染色体を*BamHI*、*EcoRI*、*HindIII*、または*PstI* で消化後、pBR322と連結した。これらDNA溶液で変異株 (no. 34株およびno. 58株) を形質転換した。好気条件下にてアンピシリンまたはテトラサイクリンを含むM9最少培地で生育する形質転換体を選択した。

試薬

アンピシリンは明治製菓（株）より、アガロース、各種制限酵素、T4 polynucleotide kinase、T4 DNA ligase は宝酒造（株）より購入した。テトラサイクリン、トリス、N-メチルN'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジンはSigma Chemicalsより、ニトロセルロースフィルターはSchleicher & Scuellよりそれぞれ購入した。その他の試薬はすべて和光純薬（株）より購入した。

第3節 結果

1.3.1. 酸素感受性大腸菌の取得

E. coli MM294をNTGにより変異処理し、好気条件下にてL培地または最少培地で生育不能となった変異大腸菌の取得を試みた。5000コロニー中55コロニーが目的の形質を示し、その形質の違いから4種類に分類することができた（表1-2）。グループAに属する変異株は嫌気条件下にて栄養源の豊富なL培地のみで生育した。グループBに属する変異株は好気条件下で生育不能であった。グループCに属する変異株は好気条件下で栄養要求性を示し、この形質は大腸菌 *sodA sodB* 2重変異株の示した形質と同じであった(43)。グループDに属する変異株は好気条件下にて最少培地で増殖するが、L培地で増殖不能となっていた。グループDに属する変異株は好気条件下での生育に過剰な鉄あるいはマンガンが必要であったと考えられた。

表1-2 取得した変異株の分類

Group	Aerobiosis		Anaerobiosis		No. of strains
	L	MM	L	MM	
A	-	-	+	-	14
B	-	-	+	+	10
C	+	-	+	+	19
D	-	+	+	+	12

(+) は好気条件下にて37℃ 1日で、また嫌気条件下にて37℃ 2日で生育したことを示した。(-) は生育不能を示した。LはL培地、MMはM9最少培地を示した。

これら変異株のSOD活性およびカタラーゼ活性を検定した。11株の変異株でSOD活性またはカタラーゼ活性の増加あるいは減少が認められた。この内2株はグループAに属し、残りの9株はすべてグループCに属していた。これら11株は細胞内活性酸素の増加によって好気条件下で生育できなくなったと考えられた。我々は細胞内の O_2^- の影響を調べるためにグループCに属したMn-SOD欠損株またはMn-SOD低下株であるno. 34株とno. 58株について詳細な検討を加えた。

1.3.2. 変異株に及ぼす酸化剤および熱ショックの影響

Mn-SOD欠損株に対する酸化剤（パラコート、 H_2O_2 、クメンヒドロパーオキシド）と熱の影響を調べた（表1-3）。No. 58株は野生株より酸化剤に対する感受性は増大していたが、熱に対する感受性に影響はなかった。これに対して no. 34株は酸化剤に対して野生株と同等の感受性であったが、熱に対して非常に感受性を示した。これらの結果から、2種類の変異株は違った領域に変異が生じていると考えられた。

表1-3 野生株と変異株における酸化剤および熱に対する感受性

Oxidant	Diameter of killing zone (mm)		
	<u>E. coli</u> MM294	No.34	No.58
Paraquat (80 μ g)	13.3	13.8	20.0
Hydrogen peroxide (200 μ g)	14.5	15.2	18.8
Cumene hydroperoxide ^a (200 μ g)	15.6	16.5	17.7
Heating at 50°C for 1 min (% Survival)	100%	25%	100%

a クメンヒドロペルオキシドをジメチルスルホキシドに溶解して使用した。

1.3.3. 変異株のSOD活性に及ぼすパラコートの影響

野生株では酸化剤であるパラコートによってMn-SOD活性が誘導されることが知られている(22-25)。そこで変異株のSOD活性に及ぼすパラコート添加効果を調べた(図1-3)。No. 34株ではMn-SODやHy-SDO (Mn-SODとFe-SODの各サブユニットからなるハイブリッド2量体酵素)の代わりに新たなSODタンパク質である(M', H')が出現した。M'はMn-SODよりnative-PAGE上で移動度が遅かった。しかしながら、パラコートによる活性の誘導が認められた。このことからM'がMn-SODの変異型酵素であり、H'はM'とFe-SODとのハイブリッドタンパク質である可能性が高いと考えられた。No. 58株では50 μ M パラコートの添加でMn-SOD活性が誘導発現された。

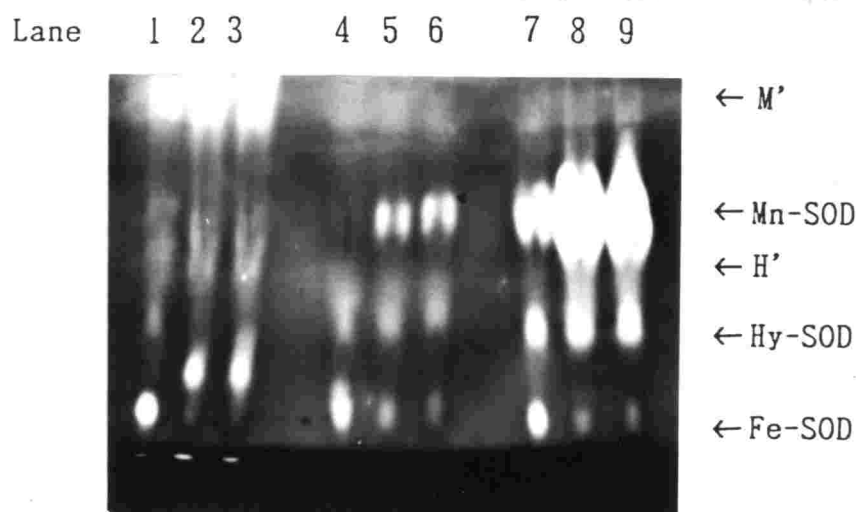


図1-3 パラコート添加による野生株および変異株のSOD活性への影響。粗酵素液(200 μ g蛋白質)をnative-PAGEにかけ、SOD活性染色を行った。Lane 1, 2, 3はno. 34株、lane 4, 5, 6はno. 58株、lane 7, 8, 9は*E. coli* MM294で、それぞれ培養菌体から調製した粗酵素液を試料として用いた。Lane 1, 4, 7ではパラコート無添加、lane 2, 5, 8では50 μ Mパラコート添加、lane 3, 6, 9では100 μ Mパラコート添加した培養液から調製した試料である。

1.3.4. 変異株のSOD活性に及ぼすo-フェナンスロリンの影響

Mn-SOD活性が鉄を特異的にキレートする試薬によって脱抑制されることから、鉄含有リプレッサーによって抑制されているという考察がなされていた(58)。最近、Niedorhofferらは鉄の取り込みに関与するタンパク質の発現を抑制する鉄含有リプレッサーFurがMn-SODの発現を抑制していることを報告している(28)。そこで鉄を特異的にキレートするo-フェナンスロリンの添加効果を調べた(図1-4)。o-フェナンスロリンの添加により野生株でMn-SODの誘導が認められた。No. 34株ではM'のSOD活性の誘導が認められ、M'がMn-SODの変異型酵素であることが示唆された。No. 58株ではo-フェナンスロリンの添加によりMn-SOD活性が出現した。このことからno. 58株は鉄含有リプレッサーFurの過剰生産株である可能性が考えられた。

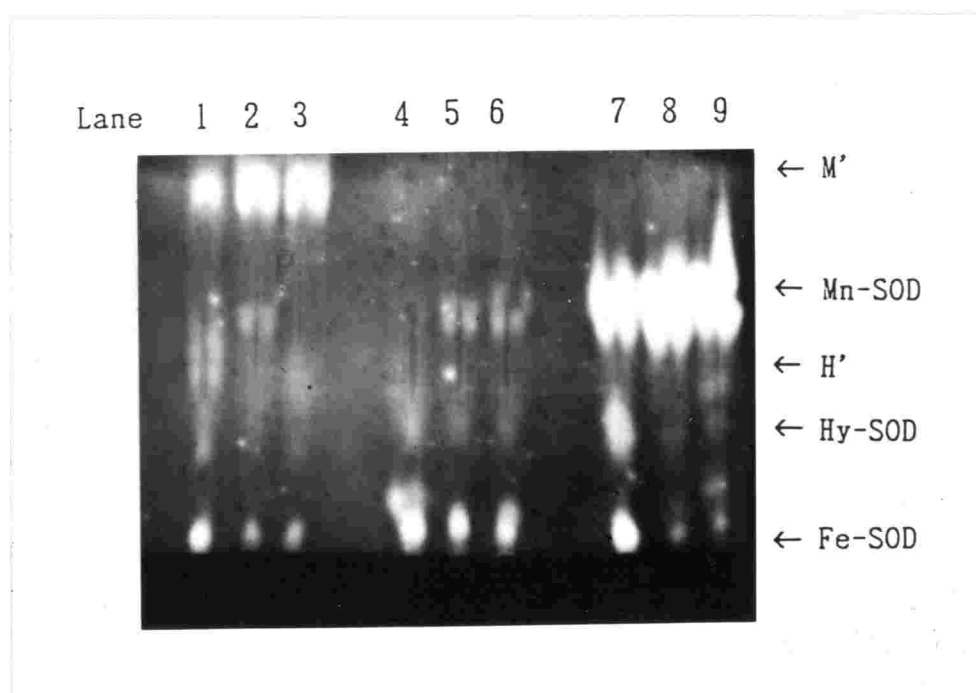


図1-4 o-フェナンスロリン添加による野生株および変異株のSOD活性の誘導

粗酵素液(200 μ g蛋白質)をnative-PAGEにかけ、SOD活性染色を行った。Lane 1, 2, 3ではno. 34株、lane 4, 5, 6ではno. 58株、lane 7, 8, 9では*E. coli* MM294の培養菌体から調製した粗酵素液である。Lane 1, 4, 7ではo-フェナンスロリン無添加、lane 2, 5, 8では0.1 mM o-フェナンスロリン添加、lane 3, 6, 9では0.5 mM o-フェナンスロリン添加した培養液から調製した試料を用いた。

1.3.5. 変異株の好気条件下での栄養要求性

変異株は好気条件下でのみ栄養要求性を示した。これはアミノ酸生合成系あるいはビタミン生合成系などの酵素が O_2^- によって不活化されたためであると考えられた。高圧酸素下で大腸菌の増殖が阻害され、バリンの添加で増殖阻害が軽減されることや(2)、アミノ酸生合成系酵素が不活化されることが知られている(3)。そこで変異株のアミノ酸要求性を調べた。No. 34株では少なくともイソロイシンとバリンあるいはイソロイシンとロイシンを添加した最少培地にて好気条件下でも生育した。この結果からイソロイシン、バリン、ロイシン生合成系の酵素が O_2^- によって不活化されていると考えられた。これに対してno. 58株はカザミノ酸を最少培地に添加しても好気条件下で生育せず、アミノ酸生合成系以外の酵素(例えばビタミン生合成系の酵素)も同時に不活化されていると考えられた。

1.3.6. 変異株の形質を相補する遺伝子の取得

ショットガンクローニング法を用いて no. 34 株の好気条件下での栄養要求性を相補する組換えプラスミド pBSA-R を取得した (図 1-5)。しかしながら、no. 58 株では同様の組換えプラスミドを取得することはできなかった。pBSA-R を保持した変異株および野生株における SOD 活性を native-PAGE による SOD 活性染色法で調べたが、変異株での Mn-SOD の回復は認められず、また野生株においても SOD 活性に影響はなかった。pBSA-R の挿入 DNA 断片の制限酵素地図を作製したところ、HindIII 約 1.5 kb と約 7 kb 断片の挿入が認められ、 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼをコードする *ilvD* 領域の制限酵素地図と一致していた。また塩基配列より決定されたアミノ酸配列 (第 3 章で詳細に述べる) から、挿入 DNA 断片にコードされている酵素が上述のものであることが明らかとなった。さら *ilvD* 領域にフレームシフト変異を導入した場合、no. 34 株の好気条件下での栄養要求性は相補されなかった。最近になって Kuo らによって α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼが O_2^- で特異的に不活化され、 O_2^- に非常に感受性の高い酵素であることが *in vitro* の実験系で示された(59)。no. 34 株では Mn-SOD の欠損により細胞内 O_2^- が増加し、 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼが不活化され、好気条件下で栄養要求性を示したと考えられた。pBSA-R を保持した no. 58 株は好気条件下での最少培地で生育せず、この株では他の酵素も同時に O_2^- によって不活化されていると考えられた。

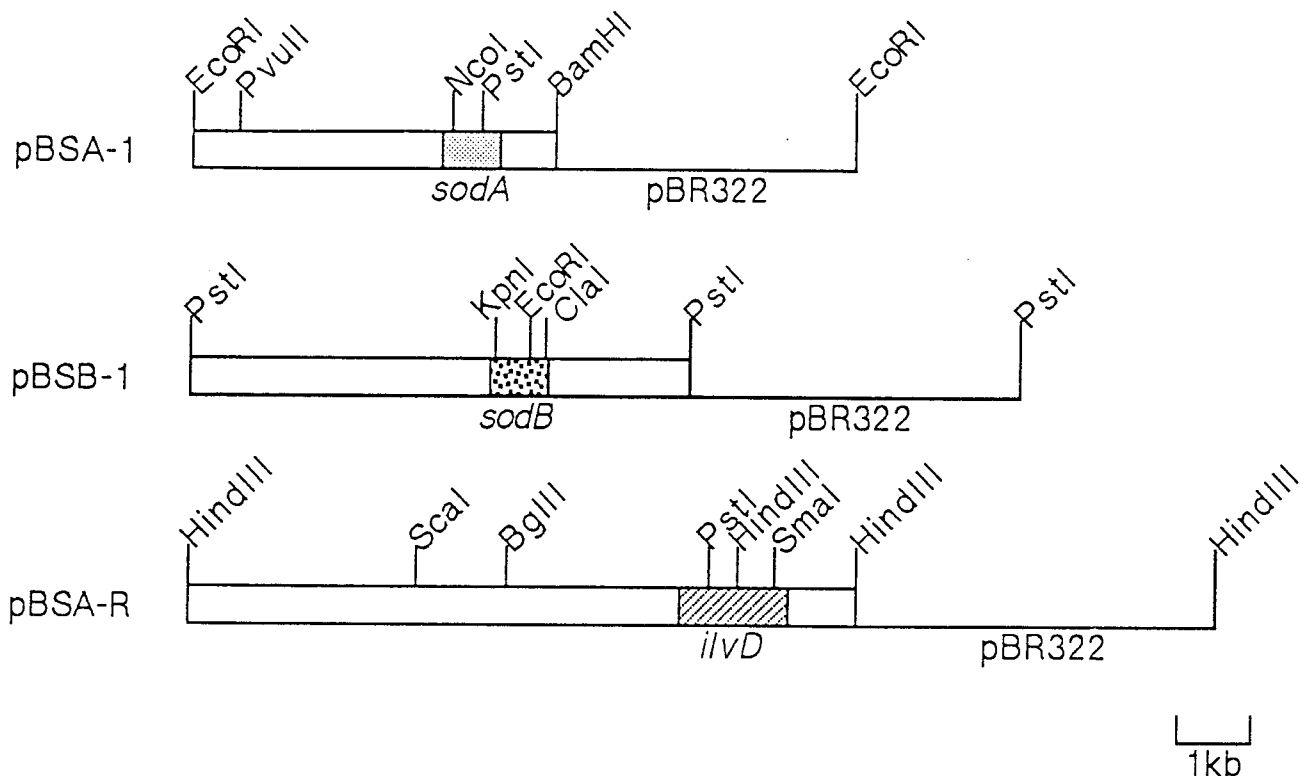


図1-5 pBSA-1、pBSB-1およびpBSA-Rの制限酵素地図

□ は染色体DNA由来の断片である。▨ は *sodA*、▩ は *sodB*、▧ は *ilvD* を示した。

1.3.7. SOD構造遺伝子 (*sodA*および*sodB*) のクローニング

遺伝子増幅効果によるSOD活性増幅効果を野生株およびMn-SOD欠損株で調べるために、大腸菌SOD遺伝子 (*sodA*, *sodB*) のクローニングを試みた。これらの遺伝子はすでにクローニングされ(56,57)、塩基配列も決定されている(60,61)。そこでこれらの塩基配列を基にオリゴヌクレオチドを合成し(図1-2)、コロニーハイブリダイゼーション法でそれぞれの遺伝子のクローニングを試みた。*EcoRI*-*BamHI*約 4.8 kbDNA断片を含む*sodA*組換えプラスミドpBSA-1と*PstI*約 6.6 kbDNA断片を含む*sodB*組換えプラスミドが取得された(図1-5)。これらのDNA断片の制限酵素地図を作製した結果、すでに報告されている*sodA*または*sodB*を含むDNA断片の制限酵素地図と同一であった。さらにそれぞれの組換えプラスミドを保持した大腸菌でSOD活性を測定した結果、遺伝子増幅効果によるSOD活性の増大が確認された(表1-4)。対照として用いた*E. coli* HB101 (pBR322) 株の比活性にばらつきが生じたのは培養条件の違い(用いた薬剤の違い)によると考えられた。

pBSA-1またはpBSB-1で no. 34 株、no. 58 株および*E. coli* MM294を形質転換した。変異株では細胞内 O_2^- の増加で好気条件下で栄養要求性を示したと考えられたため、SOD活性の増加によりこの形質が回復されることが期待できた。しかしながら、これら組換えプラスミドを保持した変異株において好気条件下での栄養要

求性は回復されなかった。SOD活性の増加により、細胞内H₂O₂濃度の増加を招き、新たな活性酸素障害が生じたと考えられた。

pBSA-1を保持した変異株および野生株のSOD活性をnative-PAGEによるSOD活性染色法で検定した(図1-6)。No. 34(pBSA-1)では顕著にSOD活性が増大していた。一方、no. 58(pBSA-1)および野生株(pBSA-1)ではMn-SOD活性の増大が認められたが、これと同時に、Fe-SODとHy-SODの活性が消失していた。このことからFe-SODも構成性酵素ではなく誘導性の酵素であることが示唆された。pBSB-1を保持した変異株ではFe-SOD活性の増加のみが認められ、その他のSOD活性にはほとんど影響がなかった。

表1-4 組換えプラスミド保持株におけるSOD活性

菌株	OD ₆₆₀	タンパク質濃度(mg/ml)	比活性(U/mg)
<i>E. coli</i> HB101			
pBR322	3.87	18.9	5.83
pBSA-1	2.27	22.7	10.1
<i>E. coli</i> HB101			
pBR322	1.71	18.5	75.1
pBSB-1	1.16	20.0	305

pBSA-1および対照として用いたpBR322を保持した*E. coli* HB101の培養には50 µg/mlアンピシリンを含むL培地を用いた。pBSB-1およびpBR322を保持した*E. coli* HB101の培養には20 µg/mlテトラサイクリンを含むL培地を用いた。

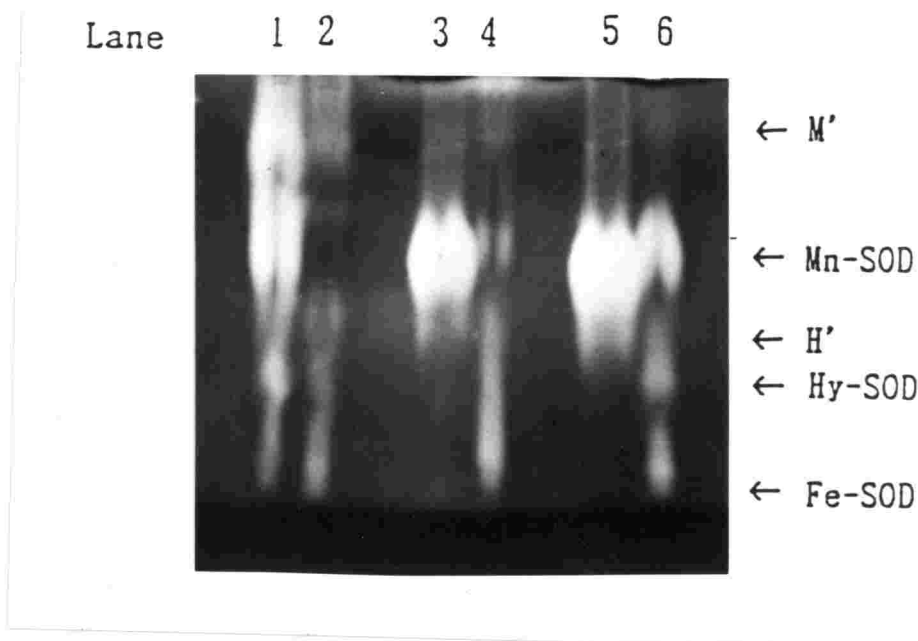


図1-6 pBSA-1およびpBR322を保持した変異株および野生株のSOD活性。粗酵
素液 (200 μ g蛋白質) をnative-PAGEにかけ、SOD活性染色を行った。Lane 1
は no. 34株 (pBSA-1)、lane 2はno. 34株 (pBR322)、lane 3はno. 58株
(pBSA-1)、lane 4はno. 58株(pBR322)、lane 5は*E. coli* MM294 (pBSA-
1)、lane 6は*E. coli* MM294(pBR322)である。

第4節 考察

細胞における酸素耐性機構を解明する方法として種々の方法が考えられる。高濃度酸素下での影響(2,3)や酸化剤存在下における影響を調べる方法(22-25)、酸素耐性に関与している酵素例えばSODなどの遺伝子をクローニング(56,57)し、これらの欠損株における酸素の影響(43)や遺伝子増幅効果による影響(62,63)を調べる方法などが挙げられる。前者は特殊環境下での研究になり、本来の酸素耐性機構以外の機構が作用している場合が考えられる。欠損株を用いた実験では個々の活性酸素に対する影響を調べることができるが、活性酸素除去酵素以外の活性酸素除去機構に関する研究や活性酸素除去酵素の発現制御機構に関与する制御因子の取得が困難となる。そこで本研究では酸素感受性変異株の取得を試みた。この実験の場合、取得される変異株に生じた変異として次の2種類が考えられた。

- (i) 細胞内活性酸素が増大し、好気条件下で生育不能となる変異
- (ii) 酸素が利用できなくなり、好気条件下で生育不能となる変異

SchellhornとHassanは好気条件下の栄養培地で生育不能となった変異株の取得を試みている(64)。彼等の取得した変異株はヘム合成能欠損株であった。ヘムはカタラーゼやシトクロムなどの補因子であり、(i)と(ii)の両方が原因となり好気条

件下で生育不能となったと考えられた。高圧酸素下での増殖阻害がバリンの添加で軽減されること(2)や*sodA sodB* 2重変異株は好気条件下で栄養要求性を示す(43)ことがすでに明らかである。そこで本研究では栄養培地と最少培地を用いて好気条件下で生育不能となった変異株を取得し、活性酸素除去酵素の中でも重要なSODとカタラーゼ活性について調べた。これらの酵素活性が増大あるいは減少した変異株は(i)が原因で好気条件下で生育できなくなったと考えられた。我々は目的の変異株をグループAから2株、グループCから9株取得することができた。これらのグループの特徴は栄養要求性を示すことである。このことから活性酸素は主に細胞を構成する物質の生合成系酵素に影響を及ぼすと考えられた。グループB、Dに属する変異株は活性酸素除去酵素活性に影響がなく、酸素存在下の栄養培地で生育することができなくなっていることから、ほとんどの変異株に(ii)あるいは(i)と(ii)の両方に属する変異が生じていると考えられた。

本研究で詳細に調べたMn-SOD欠損株no. 34株とno. 58株は好気条件下で栄養要求性を示す変異株であった。No. 58株はパラコートやo-フェナンスロリンによってMn-SODが発現したことから、Mn-SODリプレッサーであるFurの増産株であると考えられた。このことを証明するには、Furが鉄の取り込みに関与するタンパク質のリプレッサーでもあることから、鉄の取り込みに関与するタンパク質の発現を調べる必要があり、今後の課題である。No. 34株は*sodA*に変異が生じていると考えられた。M'のnative-PAGE上での移動度がMn-SODより遅いことから、変異型Mn-SOD(M')の性質として次に示した2種類の可能性が考えられた。

(1) *Thermus thermophilus* に存在するような4量体Mn-SOD(65)である。
(2) タンパク質表面の正電荷の増加あるいは負電荷の減少が生じている。(1)の場合M'の耐熱性が高くなっている可能性も考えられる。これについては次章で詳しく検討した。

Fe-SODは嫌気条件下でも認められることから構成性タンパク質であると考えられていた(23)。しかしながらMn-SODを大量に発現させた場合、Fe-SODの発現が抑制された。このことからFe-SODも誘導性タンパク質であることが結論できた。Fe-SOD発現機構は細胞内活性酸素濃度によって制御されている、或いはMn-SODの発現と正反対の制御を受けているという2種類の可能性が考えられたが、Mn-SODが酸素によって制御されていること、また嫌気条件下ではFe-SODのみが発現していることから、Mn-SODの発現と正反対の制御を受けている可能性が高いと考えられた。詳しくは第3章でMn-SODおよびFe-SODの転写量の測定を行い考察した。

Mn-SOD欠損株であるno. 34株の好気条件下における栄養要求性を相補する遺伝子として*ilvD*が取得された。*In vitro*で確認されていた α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの O_2^- 感受性(59)が*in vivo*でも確認することができた。さらに大腸菌細胞内で O_2^- によって素早く不活化される酵素が α, β -ジヒドロキ

シイソバリレートデヒドラターゼであることが証明された。

第5節 要約

大腸菌に化学的変異処理を行い、55株の酸素感受性変異株を取得した。このうち11株で活性酸素除去酵素活性に変化が生じていた。これら変異株は細胞内活性酸素の増加により酸素感受性に変化したと考えられた。これらの変異株からMn-SOD欠損株（または低下株）であるno. 34株とno. 58株を選択し、詳細に解析した。これら2株は好気条件下で栄養要求性を示した。No. 34株は*sodA*に変異が生じていた。変異型Mn-SOD (M')は native-PAGEで移動度が野生型に比べて非常に遅く、さらにM'のSOD比活性も低下していると考えられた。No. 58株はMn-SODリプレッサーであると予想されているFurの過剰生産株であると推測された。我々はno. 34株の形質を相補する α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ構造遺伝子 (*ilvD*) を取得した。この酵素が O_2^- 感受性タンパク質であり、大腸菌の細胞内で素早く O_2^- によって不活化されるために栄養要求性を示す原因となることが確認された。*sodA*増幅効果によってFe-SODが抑制され、Fe-SODが構成性タンパク質ではなく誘導性タンパク質であることが明らかになった。

第2章 *Escherichia coli* no. 34由来Mn-SOD変異酵素 (M') の解析

第1節 緒言

変異型酵素の解析にその構造遺伝子を取得することは基本的に重要である。構造遺伝子の塩基配列を決定することで変異部位を同定することができ、アミノ酸配列の違いが明らかとなり、変異酵素の諸特性をアミノ酸配列の変化と対応させることができる。他の同様の活性を有するタンパク質のアミノ酸配列との相同性を解析することで、変異酵素の構造上の変化を総合的に解析することが容易となる。また立体構造がX線構造解析から明らかになっているタンパク質の場合では、さらに多くの知見を得ることができる。また遺伝子増幅効果によって変異型酵素の大量生産が可能となりタンパク質精製が簡便となるため、そのタンパク質の性質を知るうえで非常に重要である。

Escherichia coli no. 34由来Mn-SOD変異酵素 (M') はnative-PAGEでの移動度がMn-SODより非常に遅くなっていた。このことからM'は4量体に変化した変異型Mn-SODであると予想された。このような4量体Mn-SODは高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8から単離されており(65)、この4量体構造が耐熱性に寄与していると考えられている。この4量体Mn-SODや*B. stearothermophilus* 由来2量体Mn-SODの立体構造がX線結晶解析により決定されており、活性中心に存在しているMnの配位部位である4箇所のアミノ酸残基(3箇所Hisチジン残基と1箇所のアスパラギン酸残基)、4量体形成部位および2量体形成部位のアミノ酸残基が同時に明らかにされている(39,65)。そこで本章ではM'の精製、M'構造遺伝子(*sodA34*)のクローニングと塩基配列の決定を行い、M'の性格付けを行うとともに、アミノ酸置換による影響などを解析した。また野生型Mn-SOD、Fe-SODの存在がM'の大量生産に支障を及ぼすことが予想されることから、*sodA sodB* 2重変異株の取得も試みた。

第2節 実験材料および方法

使用菌株、プラスミドおよびファージ

実験に使用した菌株、プラスミドおよびファージを表2-1に示した。

E. coli JM109は組換えプラスミドの構築に用いた。*E. coli* TG1はファージ1本鎖DNAの調製に用いた。pBR322は*sodA*、*sodA34*、*sodAE24K*と*sodAD105N*の組換えプラスミドのベクターとして用いた。pMAK705は複製が温度感受性と

なったプラスミドであり、遺伝子欠損株の作製に用いた。pMSA-5lacおよびpMSB-4CATはpMAK705に由来し、それぞれ*sodA::lacZ*組換えプラスミドおよび*sodB::cat*組換えプラスミドであり（図2-1）、*E. coli* IM303 (*sodA sodB*)の作製に用いた。

表2-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
TG1	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB) / F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
MM294	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi</i>	(45)
IM303	the same as MM294 except <i>sodA sodB</i>	本章
no. 34	the same as MM294 except <i>SodA⁻</i>	前章
Plasmids/phages	Characteristics	References
pBR322	<i>Ap^r, Tc^r</i>	(46)
pMAK705	<i>Cm^r, rep^{Ts}</i>	(66)
pBSA-1	<i>Ap^r, sodA</i>	前章
pBSA34	<i>Ap^r, sodA34</i>	本章
pBSA-1E24K	<i>Ap^r, sodAE24K</i>	本章
pBSA-1D105N	<i>Ap^r, sodAD105E</i>	本章
pMSA-5lac	<i>Cm^r, rep^{Ts}, sodA::lacZ</i>	本章
pMSB-4CAT	<i>Cm^r, rep^{Ts}, sodB::cat</i>	本章
phageM13mp18		(67)
phageM13mp19		(67)

使用した培地は、第1章、第2節で示したL培地を用いた。プラスミド保持株培養時にはアンピシリン（50 μg/ml）またはクロラムフェニコール（30 μg/ml）を添加した。ファージの形質導入にはYT培地（8 g/l バクトトリプトン、5 g/l 酵母エキス、5 g/l NaCl）を用い、基底用培地には1.5%寒天を、重層用培地には0.7%寒天を添加した。ファージ保持株からの1本鎖DNA調製には2xYT培地（16 g/l バクトトリプトン、10 g/l 酵母エキス、5 g/l NaCl）を用いた。

1 本鎖DNAの調製

常法にしたがった(67)。2xYT培地で1晩培養した宿主菌*E. coli* TG1を新鮮な2xYT培地に植菌し、ファージプラークを懸濁した。37 °Cで5時間振盪培養した後、この培養液を遠心分離し、上澄液を回収した。上澄液1.2 mlに250 μ l PEG溶液(20%ポリエチレングリコール6000、2.5 M NaCl)を添加し、室温で15分間放置した。遠心によってファージ粒子の沈殿を回収し、TE緩衝液(10 mM トリス塩酸塩 pH 7.6、0.1 mM EDTA)に懸濁した後、等量のフェノール溶液を加え、10分間混合した。遠心によって水層とフェノール層を分離し、水層のみを回収し、さらに等量のクロロホルム溶液を添加して、フェノール処理と同様の操作を行った。回収した水層に1/10量の酢酸ナトリウム溶液(3.0 M 酢酸ナトリウム(pH 6.0))と2.5倍量のエタノールを添加した後、-80 °Cで30分間放置し、遠心によって沈殿を回収した。この沈殿を冷エタノールで洗浄し、減圧乾燥した。乾固した沈殿をTE緩衝液に溶解し、この溶液を塩基配列決定用の1本鎖DNA溶液として使用した。

DNA塩基配列の決定

DNA塩基配列決定はdideoxy法(68)を利用した sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB社製)あるいは³²P sequencing kit (ファルマシア社製)を用い、方法はそれらのプロトコールに従った。1本鎖DNAの2次構造形成により塩基配列が解読できなかった領域については、dGTPとdATPの代わりに7-deaza dGTPと7-deaza dATPを使用した。

SOD欠損株の取得

複製が温度感受性であるプラスミドpMAK705を用い、大腸菌の相同組換え能を利用したHamiltonらの方法(66)に従った。

pBSA-1のEcoRI-BamHI断片をpUC19にサブクローニングした。この組換えプラスミドに存在するNcoIおよびBamHI切断部位をT4 polymerase処理で破壊した。NcoI切断部位には新たにBamHI切断部位を挿入した。この組換えプラスミドをpUSA-5と名付けた。pUSA-5のBamHI切断部位に*lacZ*カートリッジを挿入した組換えプラスミドpUSA-5*lac*を構築した。*lacZ*は*sodA*と翻訳融合している。pUSA-5*lac*のScaI-SphI断片をpMAK705にサブクローニングし、pMSA-5*lac*と名付けた(図2-1a)。

pBSB-1のPstI断片をpUC19にサブクローニングし、*sodB*領域内に存在したKpnI切断部位を破壊し、新たにBamHI切断部位を導入した。この組換えプラスミドをpUSB-4と名付けた。pUSB-4のBamHI切断部位に*cat*カートリッジを挿入した組換えプラスミドpUSB-4CATを作製した。*cat*は*sodB*と転写融合している。pUSB-4CATのPstI断片をpMAK705にサブクローニングした組換えプラスミドpMSB-4CATを作製した。(図2-1b)

pMSA-5lacまたはpMSB-4CATで*E. coli* MM294を形質転換した。これらの組換えプラスミドを保持した形質転換体をクロラムフェニコールを含むL液体培地にて44 °Cで1晩培養した。この培養では組換えプラスミドが染色体DNAに融合した菌株のみが生育することになる。その後、菌体をクロラムフェニコールを含まないL液体培地で30 °C 2日間培養する。この処理で染色体内に融合したプラスミドの脱落株が出現し、同時に*sodA*あるいは*sodB*領域も脱落することが期待できる。SOD活性測定およびnative-PAGEによるSOD活性検定を行い確認した。同様の方法によって*sodA sodB* 2重変異株*E. coli* IM303を構築した。

***sodA34*のクローニング**

E. coli no. 34の染色体DNAを*EcoRI*と*BamHI*で切断し、pBR322に連結した。このDNA溶液（染色体遺伝子ライブラリー）で*E. coli* IM303を形質転換し、好気条件下の最少培地で生育可能となった形質転換体を選択した。これらの形質転換体からプラスミドDNAを調製した後、挿入断片の制限酵素地図を作製し、組換えプラスミド（pBSA34）の確認を行った。

M'の精製

E. coli no. 34をL培地で1晩前培養する。前培養液を0.1 mM Mn-SO₄を含む1 l L培地に1%植菌した。培養には2.5 l ジャーファーマンターMD250（丸菱社製）を用いた。37 °Cで6時間培養後集菌し、超音波処理によって粗酵素液を調製した（調製方法は第1章、第2節に記した）。粗酵素液を50 %飽和から80 %飽和の硫酸分画を行い、50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.8）で透析した。この試料を50 mMリン酸カリウム緩衝液で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィーにかけ、0から0.5 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。M'画分を20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.8）で透析し、20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.8）で平衡化したFPLC Mono Sイオン交換クロマトグラフィーにかけ、0から0.4 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。このSOD活性画分をM'の精製試料とした。

M'の分子量決定

ゲルろ過によって分子量を決定した。M'精製試料をFPLC Superose 12ゲルろ過クロマトグラフィーで溶出時間を測定し、分子量マーカーとして用いたゲルろ過スタンダード（バイオラッド社製）の溶出時間から算出した。

SODの熱安定性測定

pBSA-1またはpBSA34を保持した*E. coli* IM303を薬剤を含むL培地で37 °C 6時間培養した。この培養菌体から粗酵素液を調製し、50から80 %飽和の硫酸分

画を行った。これらの試料を50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で透析した。透析後の試料を熱安定性測定の試料に用いた。熱処理は20 °C、30 °C、37 °C、45 °C、50 °Cおよび60 °Cで30分間行い、残存活性を測定した。熱処理していない試料の活性を100 %とした。

SDS-PAGE

精製蛋白質の純度検定および単量体タンパク質の分子量決定に用いた。Laemmliの不連続系の方法(69)に従った。分離用ゲル濃度は12.5 %(w/v)、濃縮用ゲル濃度は4 %(w/v)とした。電気泳動後、0.5 %クマシーブリリアントブルーR 250で染色し、脱色液 (10 %メタノール、10% 酢酸) で脱色した。分子量マーカーとして、electrophoresis calibration kit (ファルマシア社製) を用いた。

タンパク質濃度の定量

BCA protein assay reagent (ピアス社製) を用い、方法はプロトコールに従った。タンパク質標準試料として牛血清アルブミンを用いた。

その他の方法

SOD活性測定法、native-PAGE上でのSOD活性検出法や染色体DNAの調製法は前章で述べた方法に従った。

試薬

制限酵素およびT4 polymeraseは宝酒造 (株) から購入した。前章で述べた試薬および本文中で試薬購入先を記載した試薬以外は和光純薬工業 (株) から購入した。

第3節 結果

2.3.1. 大腸菌SOD欠損株の取得

*sodA sodB*欠損株取得用組換えプラスミドpMSA-5lacおよびpMSB-4CATをそれぞれ作製した (図2-1)。これら組換えプラスミドで*E. coli* MM294を形質転換し、*sodA*または*sodB*の欠損株および*sodA sodB* 2重変異株 (*E. coli* IM303) を作製した。方法については第2節実験材料と方法で述べた。

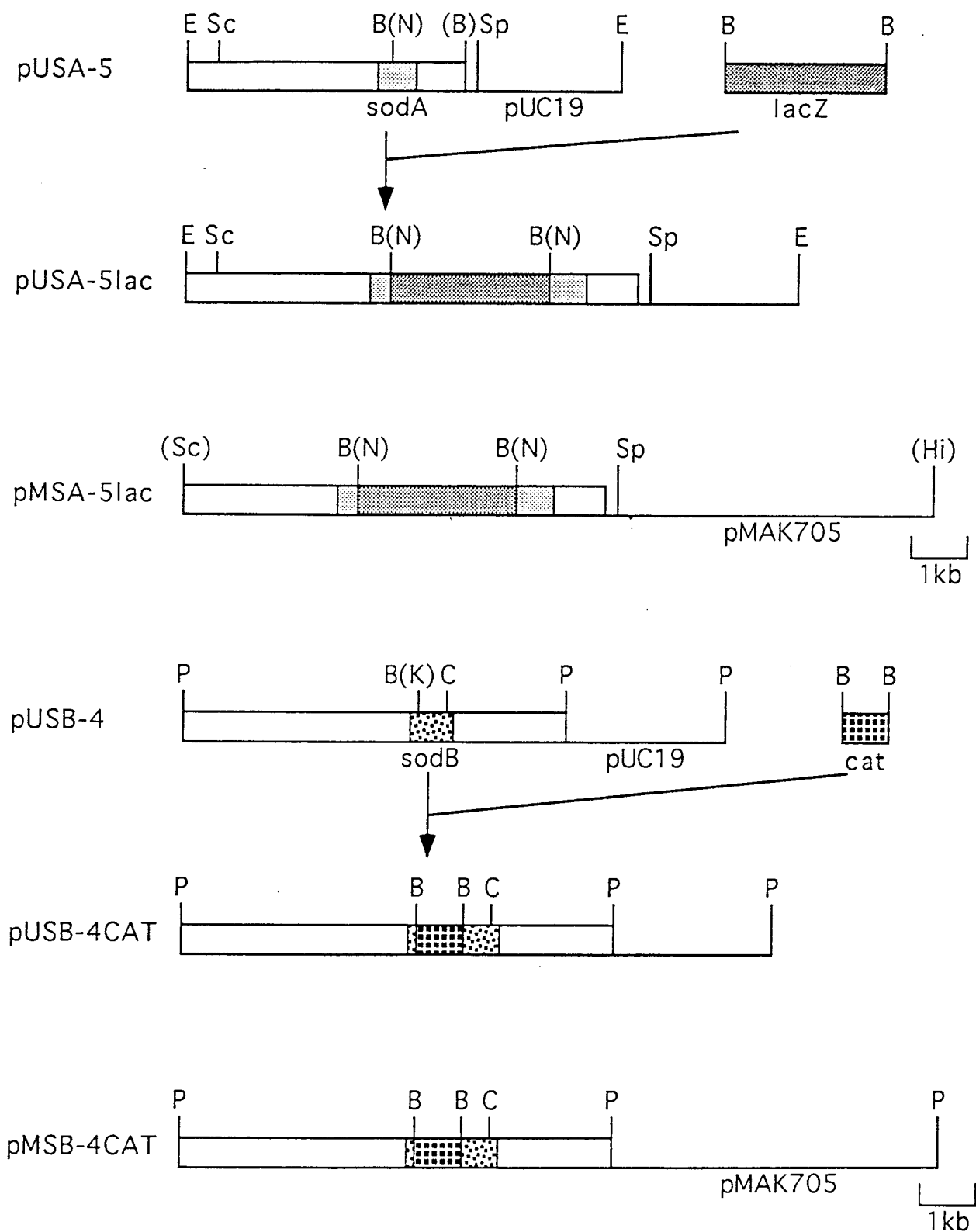


図2-1 pMSA-5 lac およびpMSB4-CATの作製。挿入断片を□で示した。B, *Bam*HI; C, *Cl*ai; E, *Eco*RI; Hi, *Hin*clI; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; Sc, *Scal*; Sp, *Sph*I.

2.3.2 *sodA34*の取得

E. coli IM303は好気条件下で栄養要求性を示した。この栄養要求性はSOD欠損によって細胞内 O_2^- 濃度が上昇したためである。この形質はSOD活性の適当な上昇によって回復されると考えられた。No. 34株染色体遺伝子ライブラリーを作製し、*E. coli* IM303を形質転換した。好気条件下にて薬剤を含む最少培地で生育した形質転換体が数株取得できた。これら形質転換体からプラスミドDNAを調製し、制限酵素地図を作製した結果、すべてに*sodA34*領域を含む約4.8 kbの *EcoRI BamHI* 断片が挿入されていた (図2-2)。この組換えプラスミドをpBSA34と名付けた。*sodA34*では*sodA*に存在していた*NcoI*部位が消失していた。

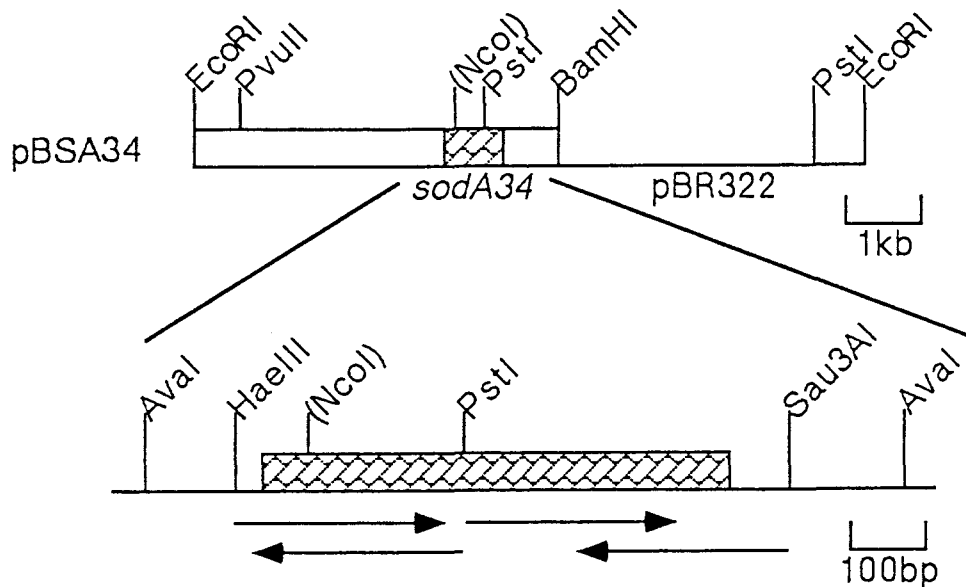


図2-2 pBSA34の制限酵素地図と*sodA34*領域の塩基配列決定。矢印で示した領域の塩基配列を決定した。

2.3.3. *sodA34*塩基配列の決定

pBSA34の*sodA34*領域の塩基配列を決定した。決定領域を図2-2に示し、その配列を図2-3に示した。*sodA*と*sodA34*の塩基配列を比較したところ、*sodA34*には98番目塩基のGがA、341番目塩基のGがAに変化した2カ所のトランジション変異が生じていた。これらの変異は構造遺伝子内に生じており、それぞれ24番目のアミノ酸残基がGluからLysに (E24K)、105番目のアミノ酸残基がAspからAsnに変化していた (D105N)。さらにすでに報告されている*sodA*塩基配列 (60)と比較すると、199番目塩基がTからCに変化していたが、我々が取得していた*E. coli* MM294由来*sodA*とは同じであり、この部位に変異が生じたのではなかった。この変異はアミノ酸配列に影響を与えない変異であった。

```

1      CCGCCCCACAATACTGGAGATGAAT ATG AGC TAT ACC CTG CCA TCC CTG CCG TAT GCT      58
      (M) S Y T L P S L P Y A      10

      (G)
59 TAC GAT GCC CTG GAA CCG CAC TTC GAT AAG CAG ACC ATG AAA ATC CAC CAC ACC AAA CAC      118
11  Y D A L E P H F D K Q T M K I H H T K H      30
      (E) * ‡ †

119 CAT CAG ACC TAC GTA AAC AAC GCC AAC GCG GCG CTG GAA AGC CTG CCA GAA TTT GCC AAC      178
31  H Q T Y V N N A N A A L E S L P E F A N      50
      ‡

179 CTG CCG GTT GAA GAG CTG ATC ACC AAA CTG GAC CAG CTG CCA GCA GAC AAG AAA ACC GTA      238
51  L P V E E L I T K L D Q L P A D K K T V      70

239 CTG CCG AAC AAC GCT GGC GGT CAC GCT AAC CAC AGC CTG TTC TGG AAA GGT CTG AAA AAA      298
71  L R N N A G G H A N H S L F W K G L K K      90
      *

      (G)
299 GGC ACC ACC CTG CAG GGT GAC CTG AAA GCG GCT ATC GAA CGT AAC TTC GGC TCC GTT GAT      358
91  G T T L Q G D L K A A I E R N F G S V D      110
      (C)

359 AAC TTC AAA GCA GAA TTT GAA AAA GCG GCA GCT TCC CGC TTT GGT TCC GGC TGG GCA TGG      418
111 N F K A E F E K A A A S R F G S G W A W      130
      2 3

419 CTG GTG CTG AAA GGC GAT AAA CTG GCG GTG GTT TCT ACT GCT AAC CAG GAT TCT CCG CTG      478
131 L V L K G D K L A V V S T A N Q D S P L      150

479 ATG GGT GAA GCT ATT TCT GGC GCT TCC GGC TTC CCG ATT ATG GGC CTG GAT GTG TGG GAA      538
151 M G E A I S G A S G F P I M G L D V W E      170
      * 2 4

539 CAT GCT TAC TAC CTG AAA TTC CAG AAC GCG CGT CCG GAC TAC ATT AAA GAG TTC TGG AAC      598
171 H A Y Y L K F Q N R R P D Y I K E F W N      190
      †4 †

599 GTG GTG AAC TGG GAC GAA GCA GCG GCA CGT TTT GCG GCG AAA AAA TAA TCATTTGCCGCTGC      661
191 V V N W D E A A A R F A A K K *      205

662 TGCAATGAGGCGTATAGGCCGCATATCAGCTTAAAAAATGAACCATCGCCAACGGCGGTGTTTTTTTT      723

719 GTGGTTTTTTTT

```

図 2-3 *sodA34* の塩基配列。野生型の配列を括弧で示した。* は Mn 原子が配位しているアミノ酸残基 (His26, His81, His171, Asp167) である。# は基質を活性中心に導くアミノ酸残基 (Lys29, Tyr34) と予想されている。下線で示したアミノ酸残基が 2 量体形成に関与しているアミノ酸残基である。His30-Tyr174, Phe124-Trp169, Ser126-Ser126, Glu170-His171 の結合で 2 量体を形成している(39)。N 末端のメチオニン残基は翻訳後に切断されている(60)。

2.3.4. *sodAE24K*および*sodAD105N*の構築と変異タンパク質の解析

*sodA34*には2ヵ所に変異 (E24K, D105N) が生じていた。そこでどちらの変異がnative-PAGEでの移動度に影響を及ぼすかを検討した。まずE24K変異をもつ*sodAE24K*とD105N変異をもつ*sodAD105N*を導入した組換えプラスミドpBSA-1E24KとpBSA-1D105Nを構築した (図2-4)。pBSA-1およびpBSA34には2ヵ所の*Pst*I部位があり、2ヵ所の変異部位は*sodA*内に存在する*Pst*I部位を挟む位置に存在していた。そこでpBSA-1とpBSA34のそれぞれの*Pst*I断片を断片交換し、pBSA-1E24KとpBSA-1D105Nの構築した。

pBSA-1E24K、pBSA-1D105N、pBSA34またはpBSA-1で*E. coli* IM303 (*sodA sodB*) を形質転換した。組換えプラスミド保持株を薬剤を含むL培地で培養し、粗酵素液を調製し、SOD活性を検定した (図2-5)。SodAE24KおよびSodAD105Nは野生型Mn-SODとM'との中間の移動度を示した。

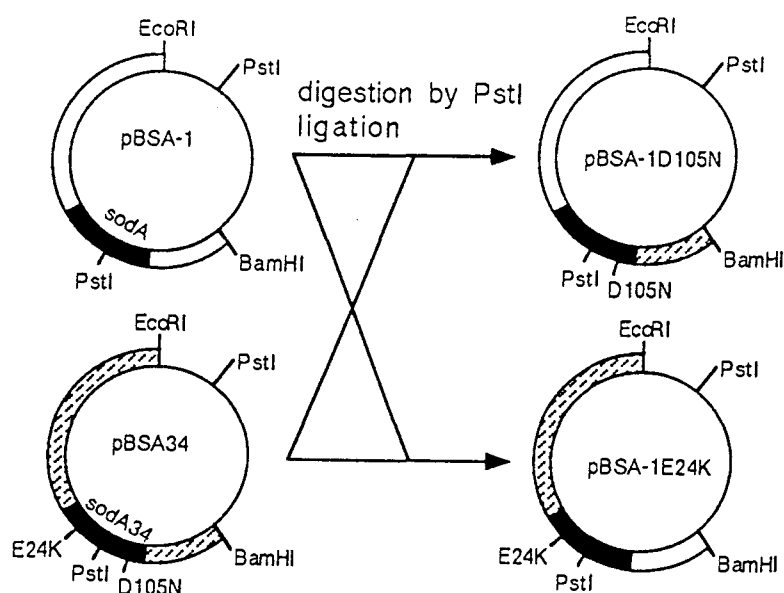


図2-4 pBSA-1E24KとpBSA-1D105Nの構築。実線部分はpBR322を表わしている。B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I

2.3.5. M'の精製

精製方法は第2節実験材料および方法で記した。この手法によりSDS-PAGEで単一バンドにまで精製することができた (図2-6)。Native-PAGE上での精製M'の移動度は粗酵素液での移動度と同じであった。M'の比活性は 3.8×10^3 U/mg

で、野生型Mn-SODの比活性とほぼ同等であった（表2-2）。またゲルろ過クロマトグラフィーでM'の分子量を測定したところ、M'はゲルろ過クロマトグラフィーでも単一ピークであった。M'の溶出時間は42.7分で、野生型Mn-SODの42.4分とほぼ同一であり、M'および野生型Mn-SODの分子量は約42 kDaで2量体酵素であることが明らかとなった（図2-7）。

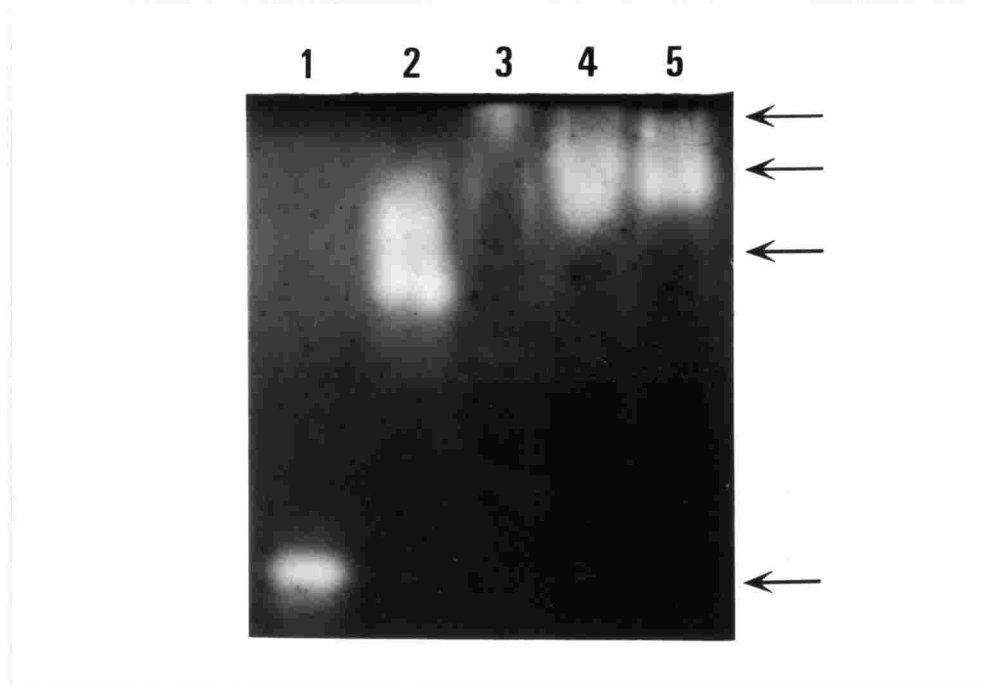


図2-5 変異型および野生型Mn-SODのnative-PAGE。SOD活性染色を行った。Lane 1, 大腸菌由来Fe-SOD; lane 2, 大腸菌由来Mn-SOD; lane 3, M'; lane 4, SodAE24K; lane 5, SodAD105N。

表2-2 粗酵素液と精製タンパク質のSOD活性

a) 粗酵素液	
	SOD比活性 (U/mg)
no. 34株	4.8
<i>E. coli</i> MM294	40
b) 精製タンパク質	
	SOD比活性 (U/mg)
M'	3.8×10^3
Mn-SOD (大腸菌由来)	3.5×10^3

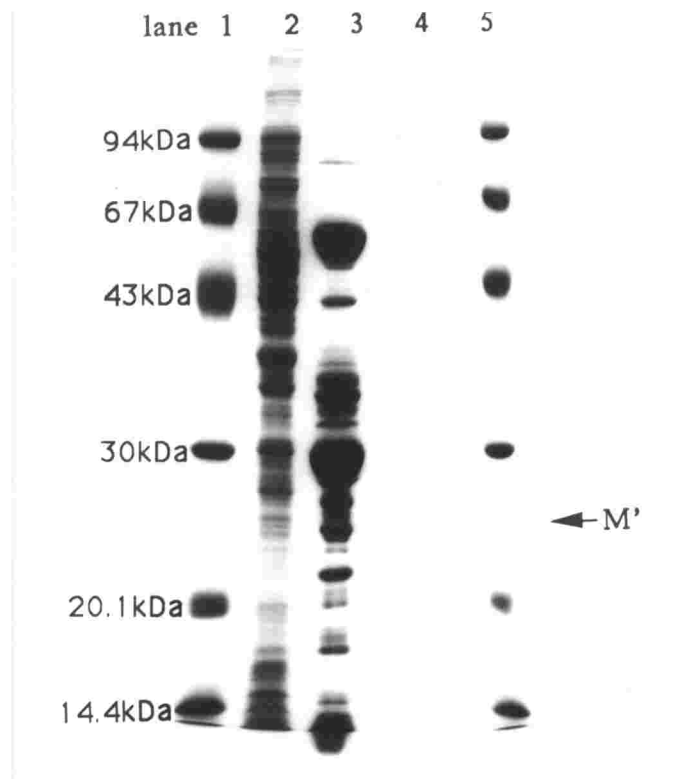


図 2-6 M'の各精製過程でのSDS-PAGE。タンパク質をクマシーブリリアントブルーR250で染色した。Lane 2は粗酵素液 (20 μ g)、lane 3 はDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィー後の試料 (5 μ g)、lane 4はFPLC Mono-S イオン交換クロマトグラフィー後の試料 (0.2 μ g) である。Lane 1, 5はタンパク質分子量マーカーである。

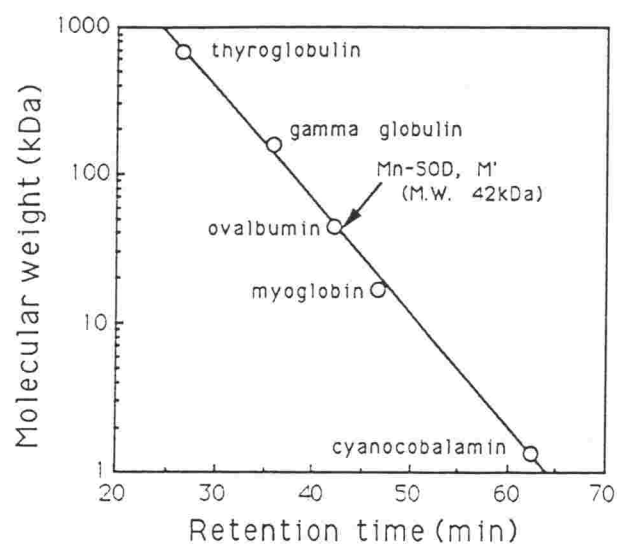


図 2-7 M'の分子量測定。各タンパク質の分子量は、thyroglobulinが670 kDa、gamma globulinが158 kDa、ovalbuminが44 kDa、myoglobinが17 kDa、cyanocobalaminが1.35 kDaである。

2.3.6. M'と野生型Mn-SODの耐熱性の比較

M'の耐熱性を野生型Mn-SODと比較した。粗酵素液を硫酸分画まで精製した試料を用いた。しかしながらM'と野生型Mn-SODとの耐熱性の違いは認められなかった。(図2-8)。

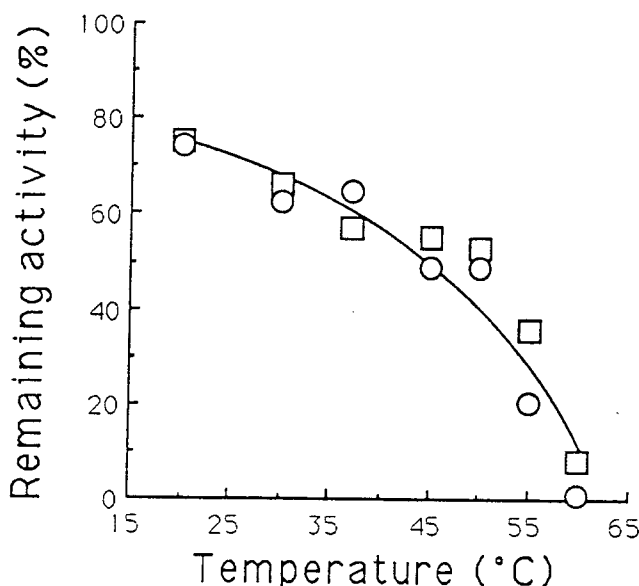


図2-8 M'と野生型Mn-SODとの耐熱性の比較。○はM'、□は野生型Mn-SODである。各温度で30分間処理した後の残存活性で評価した。

第4節 考察

M'のnative-PAGEでの移動度が野生型Mn-SODより遅くなることから、M'が4量体酵素であると考られ、本研究を始めた。4量体Mn-SODは高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8から単離されており(65)、4量体形成が耐熱性を高くする要因であると考えられた。この4量体Mn-SODはすでに塩基配列が決定されており(70)、X線構造解析によって立体構造も決定されている(65)。

大腸菌Mn-SODの立体構造は決定されていないが、同様の *Bacillus stearothermophilus* ATCC12980由来の2量体Mn-SODの立体構造がすでに決定されている(59)。これをもとに大腸菌Mn-SODの立体構造を予測した。活性に関与するMn原子の配位部位はHis26、His81、Asp167およびHis171である。基質であるO₂⁻を活性中心に導くアミノ酸残基はLys29およびTyr34であると考えられている。2量体形成に関与する単量体同士の結合として、His30-Tyr174、Glu170-His171、Ser126-Ser126の3ヵ所の水素結合とPhe124-Trp169の疎水結合が予想されている(図2-4)。また *T. thermophilus* HB8由来4量体Mn-SODの2量体同士の結合にN末端に存在する大きな2つのα-ヘリックスに挟まれた55-62

アミノ酸残基付近と140アミノ酸残基付近および156アミノ酸残基付近に存在するβ-シートが関与していると考えられている(図2-9)(65)。本研究で決定したM'の変異部位はLys24とAsp105部位であった。これらの変異部位は4量体Mn-SODの4量体形成部位付近ではなかった。またM'が2量体酵素であることがゲルろ過クロマトグラフィーによる分子量決定によって証明され、さらに1重変異酵素のSOD活性の結果から、M'のnative-PAGEでの泳動の遅れはタンパク質の表面電荷の変化が原因であると結論することができた。これらの変異はM'の耐熱性にもほとんど影響を与えなかった。

	10	20	(E)*	30	40	50	60
M'	SYTLPSLPYAYDALEPHFDKQTMKIHHTKHHQTYVNNANAALLESLEPEFANLPVEELITKL						
						
<i>T. thermophilus</i>	<u>PFKLPDLGYPYEALPHIDAKTMEIHQKHHGAYVTNLNAALEKYPYLHGVEVEVLLRHL</u>						
	10	20	30	40	50	60	
	70	80*	90	100	(D)	110	
	DQLPADKKTVLRNAGGHANHSLEFWKGLKGGTTLQ--GDLKAAIERNFGSVDNFKAEFEK						
						
	AALPQDIQTAVRNNGGHLNHSLEFWRLTTPGGAKEPVGELKKAIDEQFGGFQALKEKLTQ						
	70	80	90	100	110	120	
	120	130	140	150	160	*170*	
	AAASRFSGGWAWLVKGD-KLAVVSTANQDSPLMGEAISGASGF-PIMGLDVWEHAYYLK						
	:::.....						
	AAMGRFSGGWAWLVKDP <u>EGKLHVLSTPNQDN</u> PVM-----EGFTPIVIGIDVWEHAYYLK						
	130	140	150	160	170		
	180	190	200				
	FQNRDPDYIKEFWNVVNWDEAAARFAAK						
						
	YQNRADYLQAIWNVLNWDVAEEFFKKA						
	180	190	200				

図2-9 M'と*T. thermophilus* HB8由来4量体Mn-SODとのアミノ酸配列の比較。下線で示した領域が4量体Mn-SODの4量体形成に関与している部位である。*はMn原子の配位部位である。大腸菌由来野生型Mn-SODの配列を括弧で示した。53.2%の相同性を有していた。

No. 34株のMn-SOD活性はわずかしら検出されず、これが原因で好気条件下で栄養要求性を示したと考えられた。またsodA34組換えプラスミドを保持する大腸菌から調製した粗酵素液の活性が同じベクターを用いたsodA組換えプラスミドを保持する大腸菌から調製した粗酵素液の活性に比べ非常に低い値であった。このこと

から、M'の比活性が野生型Mn-SODの比活性に比べ非常に低いと予想された。しかしながら、精製M'の比活性が野生型Mn-SODの比活性とほぼ同等の値であった。したがって、M'に生じている2ヵ所の変異がMn-SODの2量体形成に関与するアミノ酸残基付近に存在するため、M'の2量体形成能が低下し、粗酵素液でのMn-SOD活性が低下していたのか、タンパク質の折りたたみが効率的に進行しなかった可能性が考えられた。或いは、*sodA34*の制御領域にも変異が生じ、タンパク質合成能が低下している可能性も考えられた。この原因の解明にはさらに研究を続ける必要がある。

第5節 要約

前章で取得したno. 34株は変異Mn-SOD (M') を生産していることが認められていた。M'はnative-PAGEの移動度から4量体Mn-SODである可能性があったので、*sodA34*のクローニングと塩基配列の決定を行った。その結果、2ヵ所に変異が生じていた。すなわち、これらの変異はアミノ酸配列上でGlu24がLysに、Asp105がAsnに変化していた。さらにM'を精製し、分子量をゲルろ過クロマトグラフィーによって決定した結果、M'は2量体酵素であった。M'のnative-PAGE上での移動度の変化はタンパク質表面の電荷が変化したためであると結論することができた。M'の比活性を測定した結果、 3.8×10^3 U/mgで野生型Mn-SODとほぼ同等であった。またM'保持株より得た粗酵素液の活性が低かったのは、M'の2量体形成能が低下していたものと予想された。

第3章 タンパク質工学的手法を用いた酸素耐性 α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの取得

第1節 緒言

好気性生物にとって酸素耐性機構が非常に重要なことは序論および第1章で述べてきた。その中でも特に活性酸素除去酵素を初めとした活性酸素除去機構がその中心的な役割を果たしていると考えられている。これと同時に活性酸素によって攻撃される細胞構成成分自身の酸素耐性機構も生物が好気条件下で生育する上で重要な酸素耐性機構である。それぞれの酸素耐性機構は嫌気性生物から好気性生物への進化の過程で生まれてきたと考えられる。このような酸化防止機構の解明は生物の酸素耐性機構や進化を探る上でも興味を持たれ、さらに細胞構成成分を工業的に扱う上で重要であると考えられる。

酵素の特性である反応を触媒するという機能は酵素自身が他の細胞構成成分より反応性が高いことを意味し、活性酸素による攻撃を受けやすいと考えられる。しかしながら、好気性生物が生産する酵素は一般的に比較的酸素耐性である。これは酵素が進化の過程で酸素耐性な立体構造に変化した、或いは酸素耐性機構を取り入れたためであると考えられる。酵素自身の酸素耐性機構を研究する上で酵素の酸化機構は重要であり、酸素感受性酵素がその研究材料として適していると考えられた。この酸素感受性酵素を改変し、酸素耐性酵素を取得することが酵素の酸素耐性機構の解明を一つの手段であると考えられた。我々は第1章で O_2^- に非常に感受性の高い酵素である α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼをクローニングすることができた。またこの酵素が*in vitro*で O_2^- に特異的に感受性を示すことがすでに知られている(59)。さらにこの感受性は活性中心に位置する[4Fe-4S]クラスターが O_2^- によって酸化され、不活性型に不可逆的に変化するためであるという仮説が提唱されている(71)。そこでタンパク質工学的手法を用いてこのクラスターを形成するシステイン残基の同定と O_2^- 耐性酵素の取得を試みた。

第2節 実験材料および方法

使用菌株およびプラスミド

使用菌株とプラスミドを表3-1に示した。

E. coli MM294を大腸菌野生株として用いた。*E. coli* TG1は部位特異的変異遺伝子の作製時に宿主として用いた。*E. coli* JM109、IM303、IM401は α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの大量発現用の宿主として用いた。

表3-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
TG1	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB)/F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
MM294	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi</i>	(45)
IM303	the same as MM294 except <i>sodA sodB</i>	第2章
IM401	the same as MM294 except <i>ilvD</i>	本章
Plasmids/phages	Characteristics	References
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	(46)
pBSA-R	Ap ^r , <i>ilvD</i>	第1章
pUC19	Ap ^r	(72)
pUID19	Ap ^r , <i>ilvD</i>	本章
pMAK705	Cm ^r , rep ^{Ts}	(66)
pMID705D	Cm ^r , <i>ΔilvD</i> , rep ^{Ts}	本章
pHSG396	Cm ^r	(73)
pHID396	Cm ^r , <i>lvD</i>	本章
pHID189	Cm ^r , <i>ilvDC189S</i>	本章
pHID192	Cm ^r , <i>lvDC192S</i>	本章

培地

*E. coli*の培養には培地としてL培地を使用した。プラスミド保持株の培養時に添加した薬剤についても前章までと同様である。ただし、*E. coli* IM303の培養には30 μg/mlクロラムフェニコールを培地に添加した。

*ilvD*組換えプラスミドpUID19およびpHID396の作製

α, β-ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼを大量発現させるために、*ilvD*組換えプラスミドpUID19を作製した。pUC19のSall-HindIII部位にpBSA-RのSall-HindIII断片を連結した。さらにこのHindIII部位にpBSA-Rの約1.5 kb HindIII断片を挿入した。この*ilvD*組換えプラスミドpUID19と名付けた(図3-

1)。各断片の挿入方向を制限酵素処理によって確認した。pHID396はpHSG396にpUID19の挿入断片と同じ断片を連結した組換えプラスミドである。方法はpUIDと同様である(図3-1)。

*ilvD*欠損株*E. coli* IM401の構築

第2章、第2節実験材料と方法で記した遺伝子欠損株の取得方法と同様に複製が温度感受性となったpMAK705を用いた。pUID19の*ilvD*領域内に存在する48 bp *EcoRV*断片を欠失させた組換えプラスミドpUID19Dを作製した(図3-1)。pUID19Dの挿入断片をpMAK705に導入した(図3-1)。この $\Delta ilvD$ 組換えプラスミドpMID705Dを用いた*ilvD*欠損株*E. coli* IM401を構築した。栄養要求性および活性測定で*ilvD*欠損株を確認した。

α, β -ジヒドロキシイソバリレート合成

α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ基質である α, β -ジヒドロキシイソバリレートをCioffiとBergの方法(74)で合成した。290ml蒸留水に溶解させた13.84 g 3,3-dimethylacrylic acidに15 ml蒸留水に溶解させた69.2 mg osmium tetroxideを添加し攪拌した。275 ml蒸留水に溶解させた8.8 g塩素酸銀を48時間以上かけて十分攪拌しながら滴下した。ろ過後さらに12時間攪拌した。ろ過後、硫化水素を吹き込み、活性炭1 gを加えた。活性炭をろ過で除去し、ろ液をエバポレーターで250 mlまで濃縮した。濃縮液を25 mlジメチルエーテルで3回洗浄した。濃縮液がpH 8.3になるまで炭酸水素ナトリウムを添加した。その後凍結乾燥し、結晶を95%熱エタノールで溶解させ、ろ過により沈殿物を除去した。ろ液をエバポレーターで乾燥させ、 α, β -ジヒドロキシイソバリレートの結晶を取得した。合成した α, β -ジヒドロキシイソバリレートの純度を融点測定と $^1\text{H-NMR}$ による構造分析で確認した。この方法により2.8 gの α, β -ジヒドロキシイソバリレート結晶を取得した。

塩素酸銀はNicholsonとHolleyの方法(75)に従って合成した。20 ml蒸留水に溶解させた34 g硝酸銀と20 ml蒸留水に溶解させた21.2 g塩素酸ナトリウムをそれぞれ85 °Cまで加熱し、混合した。この混合液をゆっくり0 °Cまで冷却し、沈殿物を回収した。沈殿物を10 ml蒸留水で洗浄し、吸引ろ過で再度沈殿物を回収した。沈殿物を90 °C蒸留水(25 ml)で溶解させ、0 °Cまでゆっくりと冷却した。再結晶物を吸引ろ過で回収し、乾燥後使用した。

粗酵素液の調製

α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ活性測定に用いた粗酵素液の調製は第1章、第2節実験材料と方法で記した方法と同様の方法を用いた。緩衝液には10 mM MgCl_2 を含む100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)を用いた。

α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ活性測定法

活性測定法はDesaiとPolglaseの方法(76)に従った。酵素試料2.7 mlに100 mM α, β -ジヒドロキシイソバリレート0.3 mlを加え、37 °Cで反応させた。10分ごとに1 ml採集し、50 %トリクロロ酢酸0.1 mlを添加した。さらに0.5 N HClに溶解させた0.025 %2,4-ジニトロフェニルヒドラジン1.5 mlを添加し、25 °Cで20分間保温した。40 %水酸化カリウム0.5 mlを添加し、室温で10分間静置後、 A_{540} を測定し、 α -ケトイソバリレート濃度を求めた。15分間で1 mMの α -ケトイソバリレートを生成する酵素量を1 unitとした。酵素の酸素による失活を検定する場合は好気条件下で、酵素試料2.7 mlを37 °Cで適当時間保温後活性測定し、残存活性を求めた。

部位特異的変異操作方法

部位特異的変異操作は oligonucleotide-directed *in vitro* mutagenesis system (アマシャム社製) と化学合成したオリゴヌクレオチドを用い、そのプロトコールに従って行った。C189Sの変異導入には5'GGTCGGAGACGCGGAACG3'を、C192Sには5'GCAGGAACCGGAGGAACC3'を用いた。下線部は変異導入部位を示している。これらの変異導入部位は*ilvD*の*SmaI-PstI*断片内に存在していた。そこでこの断片をM13mp18にサブクローニングし、1本鎖DNAを調製した。その後、変異を導入した。変異の導入は塩基配列決定により確認した。変異導入が確認された断片をpHID396の*SmaI-PstI*断片と断片交換した。*ilvDC189S*組換えプラスミドをpHID189と、*ilvDC192S*組換えプラスミドをpHID192と名付けた。

その他の方法

その他の方法については前章までに記したとおりである。

試薬

3,3-dimethylacrylic acidおよびosmium tetroxideはSigma Chemicalsより購入した。本文中で試薬購入先を記載した試薬および前章までに記載した試薬以外はすべて和光純薬工業(株)より購入した。

第3節 結果

3.3.1. *E. coli* IM303の性格付け

sodA sodB2 重変異株は好気条件下で栄養要求性を示すことが知られていた(43)。我々が取得したMn-SOD欠損株は好気条件下でイソロイシン ロイシン或いは

イソロイシン バリン要求性であり、イソロイシン ロイシン バリン生合成系酵素の1つである α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの構造遺伝子増幅効果でその形質が回復した。さらに α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼが*in vitro*で O_2^- 感受性であることが確認されていた(59)。そこで、まず*E. coli* IM303の形質を確かめた。本菌株は固体培地では好気条件下で栄養要求性を示し、20種すべてのアミノ酸を薬剤を含む最少固体培地に添加すると好気条件下で生育可能となった。液体培地では好気条件下の薬剤を含むL液体培地で前培養後、イソロイシン ロイシン 或いはイソロイシン バリンを薬剤を含む最少液体培地に添加することで好気条件下で生育可能となった。この現象は固体培地では認められず、液体培地より固体培地での培養で酸素の影響が大きいと考えられた。これらのことよりアミノ酸合成系の酵素の幾種類かに O_2^- 感受性酵素が存在し、特に α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼが細胞内で最も O_2^- 感受性であると考えられた。

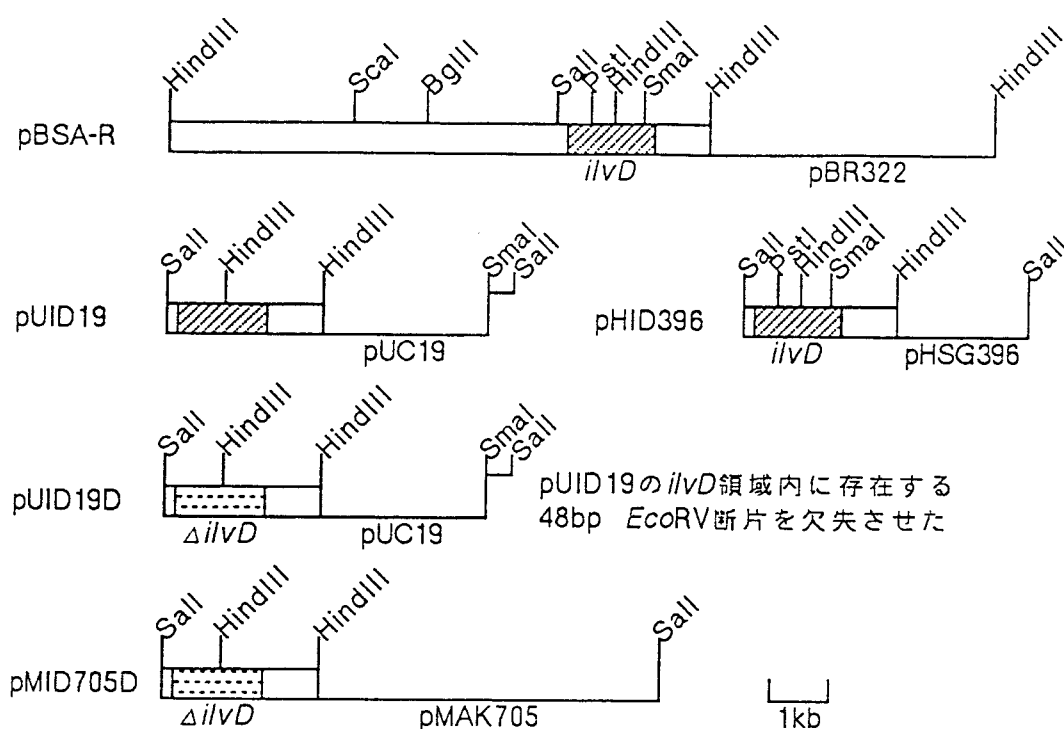


図3-1 組換えプラスミドの制限酵素地図。挿入断片を□で示した。

3.3.2. α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸素感受性

α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸素による影響を粗酵素液を用いて調べた。pUID19を保持した*E. coli* IM303 (*sodA sodB*)と*E. coli* IM401 (*ilvD*)を好気条件下で薬剤を含むL培地で培養し、酵素を大量発現させた。これらの培養菌体から粗酵素液を調製し、活性を測定した(表3-1)。*sodA*

*sodB*株では非常に低レベルの活性 (*ilvD*株の1/10) であった。pUID19を保持した*ilvD*株から調製した粗酵素液を嫌気条件下および好気条件下で37 °Cで静置した後に活性を測定した(図3-2)。嫌気条件下にて60分間の静置ではほとんど失活しなかった。これに対して好気条件下では60分間の静置で残存活性が約15%になった。この酵素が酸素に感受性であることが確かめられた。

表3-1 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ活性

	比活性 (U/mg)
<i>E. coli</i> IM401(pUID19)	2.4
<i>E. coli</i> IM303(pUID19)	0.23

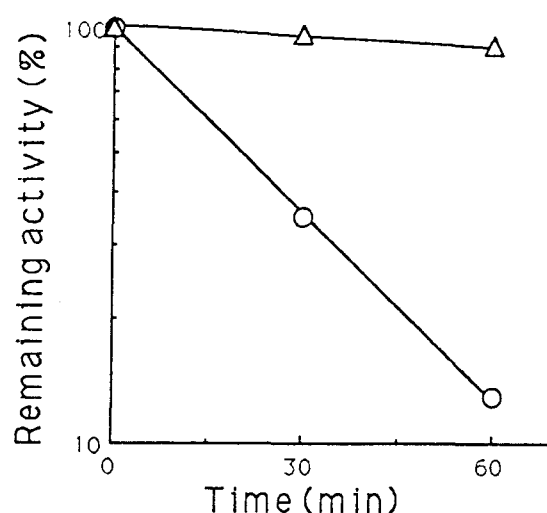


図3-2 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸素による影響。酵素液として*E. coli* IM401 (pUID19) 培養菌体から調製した粗酵素液を用いた。○は好気条件下での処理、△は嫌気条件下での処理を示した。

3.3.3. 部位特異的変異操作法による変異 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの取得

FlintとEmptageによって α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの精製が試みられた(71)。この酵素は非常に酸素感受性であるために嫌気条件下で精製が試みられた。ほぼ単一にまで精製されたにもかかわらず、精製中に大部分の酵素が失活し、酵素の正確な諸性質を調べることができなかった。しかしながら、この酵素に[4Fe-4S]クラスターが存在することが予想された。さらに彼等はこのクラスターが酸素によって攻撃され、酵素が不活化されるという仮説を発表した。最近になって、[4Fe-4S]クラスターを活性中心に持つ大腸菌由来の6-phosphogluconate dehydratase (77)やaconitase (78)が O_2 感受性であること

が明らかとなり、これらの報告はFlintとEmptageの仮説を示唆するものである。そこで部位特異的変異操作法を用いて α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの[4Fe-4S]クラスター形成に参与しているシステイン残基の同定と酸素耐性酵素の取得を試みた。

Fe-Sクラスターを含有したタンパク質のアミノ酸配列の特徴としてC-X-X-C配列が、また[4Fe-4S]クラスターを含有したタンパク質のアミノ酸配列の特徴としてC-X-X-C-X-X-C配列が挙げられた(Xはシステイン以外のアミノ酸残基を示している)(79)。これらの配列のシステイン残基がクラスターに参与していると考えられている。これらの配列を α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼのアミノ酸配列内で検索した。C189からC195にかけてC-X-X-C-X-X-C配列(80)が存在していた(図3-3)。そこで189番目および192番目のシステイン残基をセリン残基に置換した変異型 α , β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼを部位特異的変異操作法を用いて取得した。セリン残基への置換はOH基がシステイン残基のSH基の代わりとなり、Fe-Sクラスターを部分的に維持し、酵素が酸素耐性へ改変される可能性があると考えられた。

	10	20	30	40	50	60
N-	MPKYRSATTT	HGRNMAGARA	LWRATGMTDA	DFGKPIIAVV	NSFTQFVPGH	VHLRDLGKLV
	70	80	90	100	110	120
	AEQIEAAGGV	AKEFNITAVD	DGIAMGHGGM	LYSLPSRELI	ADSVEYMVNA	HCADAMVCIS
	130	140	150	160	170	180
	NCDKITPGML	MASLRLNIPV	IFVSGGPMEA	GKTKLSQII	KLDLVDAMIQ	GADPKVSDSQ
	190	200	210	220	230	240
	SDQVERSACP	<u>T</u> CGSC <u>S</u> GMFT	ANSMNCLTEA	LGLSQPNGS	LLATHADRKO	LFLNAGKRIV
	250	260	270	280	290	300
	ELTKRYEQN	DESALPRNIA	SKAAFENAMT	LDIAMGGSTN	TVLHLLAAAO	EAEIDFTMSD
	310	320	330	340	350	360
	IDKLSRKVPQ	LCKVAPSTQK	YHMEDVHRAG	GVIGILGELD	RAGLLNRDVK	NVLGLTLPQT
	370	380	390	400	410	420
	LEQYDVMLTQ	DDAVKNMFRA	GPAGIRTTQA	FSQDCRWDTL	DDDRANGCIR	SLEHAYSKDG
	430	440	450	460	470	480
	GLAVLYGNFA	ENGCIKVTAG	VDDSILKFTG	PAKVYESQDD	AVEAILGGKV	VAGDVVVIRY
	490	500	510	520	530	540
	EGPKGGPGMQ	EMLYPTSFLK	SMGLGKACAL	ITDGRFSGGT	SGLSIGHVSP	EAASGGSIGL
	550	560	570	580	590	600
	I EDGDLIAID	IPNRGIQLQV	SDAELAARRE	AQDARGDKAW	TPKNRERQVS	FALRAYASLA
	610					
	TSADKGAVRD	KSKLGG	-C			

図3-3 α , β -デヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼのアミノ酸配列(80)。下線で示したシステイン残基が[4Fe-4S]クラスターに参与していると予想された(Cys189, Cys192, Cys195)(71)。

3.3.4. 変異酵素の活性の変化と酸素に対する影響

pHID396 (*ilvD*組換えプラスミド)、pHID189 (*ilvDC189S*組換えプラスミド)、pHID192 (*ilvDC192S*組換えプラスミド)で*E. coli* JM109を形質転換し、野生型および変異型酵素を大量発現させた。粗酵素液を調製し、活性測定した結果、変異型酵素の比活性は顕著に低下していた(表3-3)。この結果から、Cys189とCys192が[4Fe-4S]クラスターに関与していることが明らかとなった。好気条件下での60分間静置後の残存活性は、野生型で約10%に対して、変異型酵素ではC192Sで約20%、C189Sでは約75%であり、C189S変異型酵素が酸素耐性へ改変されていた(図3-4)。

表3-3 変異型酵素および野生型酵素の活性

	比活性 (U/mg)	相対活性 (%)
野生型	1.16×10^1	100
C189S	1.64×10^{-1}	1.4
C192S	2.48	21.4

試料としてpHID396、pHID189、pHID192を保持した*E. coli* JM109から調製した粗酵素液を用いた。

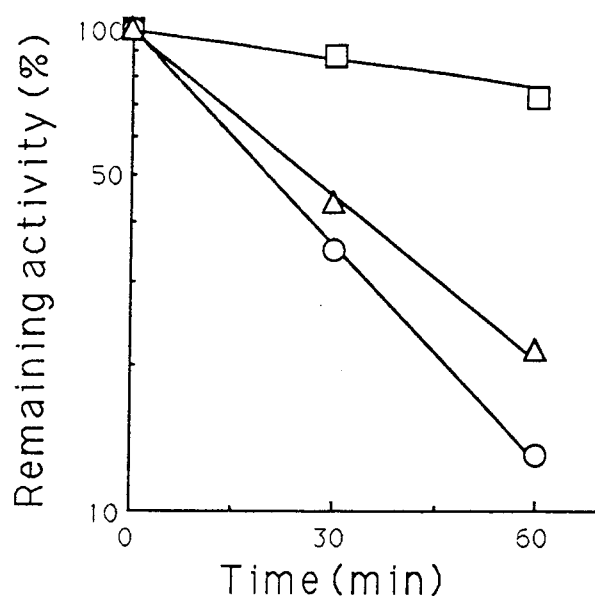


図3-4 好気条件下における変異型酵素および野生型酵素の失活。組換えプラスミドを保持した*ilvD*株から調製した粗酵素液を用いた。○は野生型酵素、△はC192S変異型酵素、□はC189S変異型酵素を示した。好気条件下にて37℃で処理した後の残存活性で評価した。

第4節 考察

我々は部位特異的操作法を用いた酸素耐性変異型 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの取得を試みる前に、次に示す2種類の方法で同様の変異酵素の取得を試みた。*sodA sodB*株は好気条件下の液体培養で栄養要求性を示し、その原因は α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼが O_2^- によって不活化されるためであると考えられた。そこで、自然突然変異法またはNTGによる化学的変異法によって好気条件下での栄養要求性を回復する抑圧変異が生じた変異株の取得を試みた。これらの変異処理によって数株の抑圧変異が生じたと考えられた変異株が取得できた。これらの変異株中から酵素活性が確認された変異株の*ilvD*をクローニングし、変異酵素の性格づけを行った。しかし、酸素耐性に变化した α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼを取得することはできず、酵素の合成量が上昇あるいは比活性が増大した酵素であった。また活性がほとんど検出されなかった変異株は、最近になってImlayとFridovichらによって取得された抑圧変異株と同様の変異株かもしれない(81,82)。この抑圧変異の領域については染色体上で領域限定されているが、その機能については明らかではない。

[4Fe-4S]クラスター形成部位と予想されたCys189とCys192は、セリン残基への置換変異で比活性が低下したことからクラスター形成部位であることが確認された。 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの反応機構(71)は、[4Fe-4S]クラスターに基質が結合し、反応が開始されると考えられている(図3-5)。特にC189S変異酵素の比活性が顕著に低下していることから、Cys189が基質結合部位であるFeと結合しているアミノ酸残基であると考えられた。これに対して、Cys192は基質結合部位であるFeと結合していないアミノ酸残基であると考えられた。 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの O_2^- による不活化機構はFlintとEmptageによって図3-6に示したように予想されている(71)。まず O_2^- が活性中心に結合し、活性中心が酸化される。その後、プロトンが O_2^- と反応し、 H_2O_2 に変化する。続いて、基質が結合するFeと H_2O_2 とがフェントン反応を起こし、酵素が不可逆的に不活化される。これに対して、 H_2O_2 とFeが速やかに酵素から解離すると酵素は可逆的な不活化状態になると予想されている。我々が導入したC189Sの置換変異は酵素を可逆状態な不活性型へ[4Fe-4S]クラスターが変化し、酸素耐性へ改変されたと考えられた。これに対してC192S置換変異では、Cys192が基質結合に関与しているFeと結合していないために比活性は低下し、酸素感受性は野生型酵素と同等であると考えられた。

ホウレンソウ由来 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼは酸素耐性であることが知られている(83)。この酵素は大腸菌由来酵素と同様に同一サブユニットからなる2量体酵素であり、分子量もほとんど同じである。しかしながら、ホウレンソウ由来酵素には[4Fe-4S]クラスターは存在せず、[2Fe-2S]クラスターを活性中心で形成している。このことから大腸菌由来酵素を[2Fe-2S]クラスターを

持つタンパク質に改変することで活性を低下させずに酸素耐性へ改変することが可能であると考えられる。現在までに、ホウレンソウ由来 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼのアミノ酸配列および構造遺伝子の塩基配列が決定されていない。ホウレンソウ由来 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ構造遺伝子の取得と塩基配列の決定は非常に興味を持たれる。

最少培地で生育する好熱菌はほとんど知られていない。この原因の1つに本酵素の酸素による不活化が考えられる。一般的に温度が上昇するにつれて反応性が高くなると考えられる。このためほとんどの好熱菌は、 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸化速度が上昇し、この酵素が機能する前に不可逆的な不活化が起こり、最少培地で生育できないと考えられる。最少培地で生育可能な好熱菌 *B. stearothermophilus* SIC1(84)由来 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼを解析することで大腸菌由来酵素を酸素耐性酵素に改変させる糸口が見つかるかもしれない。

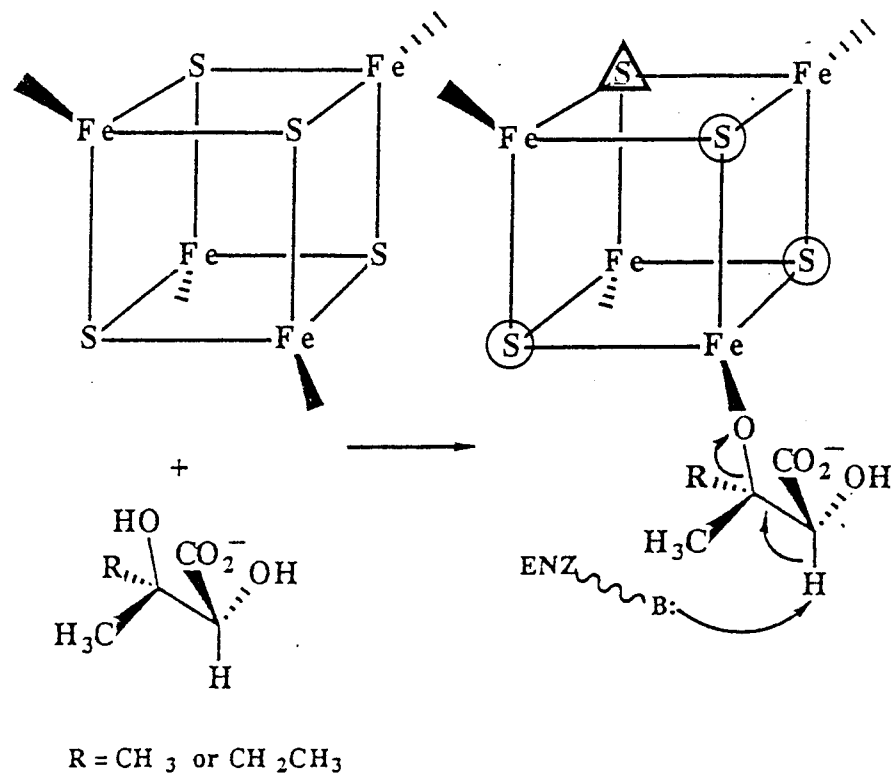


図3-5 大腸菌由来 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの反応機構。○がCys189のS原子、△がCys192のS原子と予想された。FlintとEmptageの報文(71)から引用した。

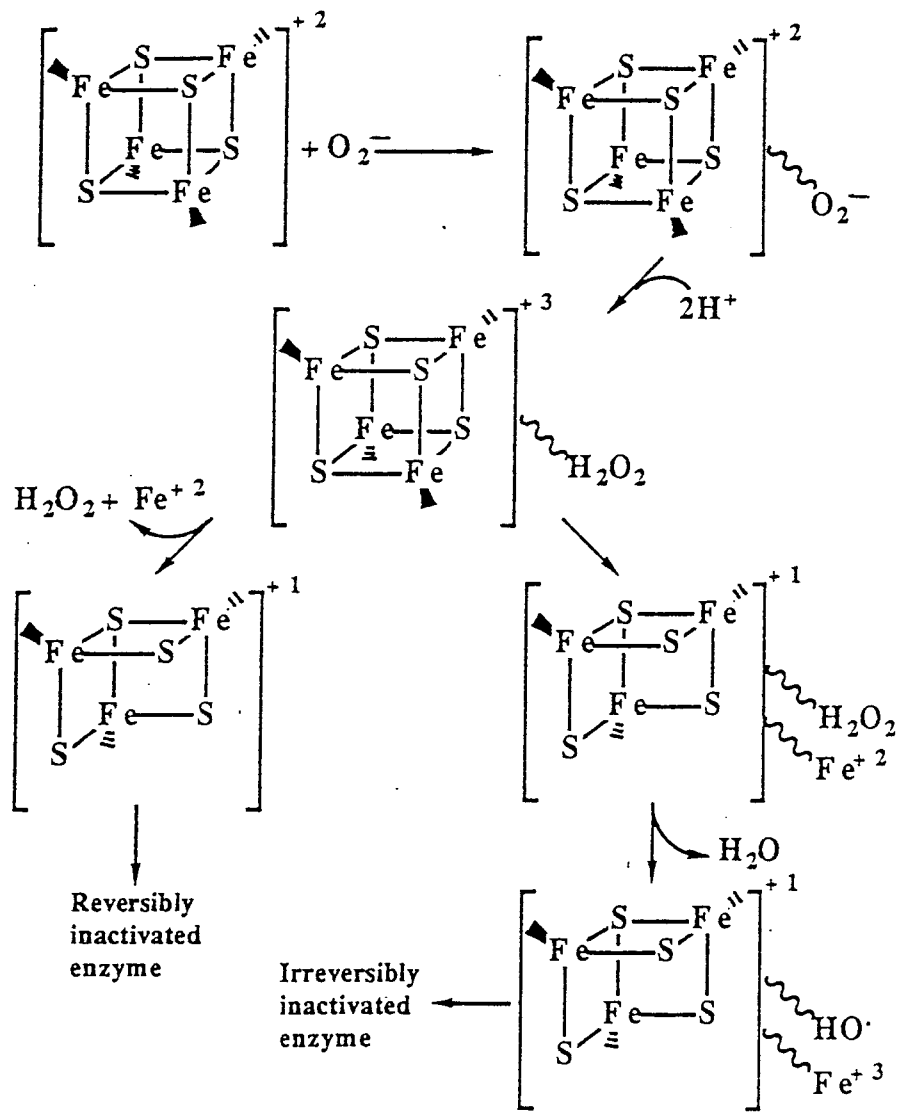


図3-6 大腸菌由来 α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼ[4Fe-4S]クラスタの予想された O_2^- による酸化機構。FlintとEmptageの報文(71)から引用した。

第5節 要約

大腸菌由来 O_2^- 感受性酵素である α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの酸素耐性変異酵素の取得を部位特異的変異操作法を用いて試みた。本酵素は[4Fe-4S]クラスターを持ちこのクラスターが酸素感受性であると考えられた。そこでクラスター形成部位であると予想されたCys189とCys192をセリン残基に置換する置換変異酵素を取得した。その結果、両変異酵素とも比活性は低下していたが、Cys189Ser変異酵素が酸素耐性に改変されていた。Cys189とCys192とが[4Fe-4S]クラスターに関与していることが変異酵素の比活性の低下から同時に明らかとなった。

第4章 大腸菌SOD構造遺伝子 (*sodA*と*sodB*) の酸素による発現制御機構の解析とこれらを用いた発現ベクターの開発

第1節 緒言

大腸菌では2種類のSOD (Mn-SOD(8)およびFe-SOD(9)) が発現している (Mn-SODとFe-SODとのハイブリッドSODも存在する)。Mn-SODは*sodA* (56)にコードされており、Fe-SODは*sodB* (57)にコードされている。近年活性酸素が呼吸などの生体反応の過程で常に発生していることがわかり(42)、生体および細胞内で重大な障害を与えることが明らかになってきた。このようなことからSODの重要性が認められるようになり、その発現制御機構に関する研究が盛んに行われるようになってきた。SODは O_2^- の不均化反応を触媒し、新たな活性酸素である H_2O_2 を発生させる。このようなことから2種類のSODの発現制御機構や他の活性酸素除去酵素の発現制御機構との間にきわめてエレガントなバランスが成立していると考えられる。

Mn-SOD活性は嫌気条件下から好気条件下への移行や酸素分圧の上昇(23)によって増加することがかなり以前から明らかで、Mn-SODが O_2^- による誘導性タンパク質であると考えられている。またMn-SODがパラコートなどの O_2^- 増産剤(22-25)、鉄イオン特異的キレート剤(58)で誘導されることも明らかとなっている。Mn-SODの誘導はリファンピシンやクロラムフェニコールによって阻害されることから*de novo*のタンパク質合成が必要で(23)、Mn-SODの発現は転写レベルで調節されていることが明らかとなった(27)。最近になってMn-SODの発現調節因子が次々と発見されている。 O_2^- による誘導が確認されているタンパク質を正に調節するSoxRSがMn-SODの発現を誘導し(29,30)、鉄イオンの取り込みに関与するタンパク質を制御しているFurがMn-SOD発現を負に調節していることが明らかとなった(28)。これ以外にも、ArcA (好気条件下での代謝に関与するタンパク質の調節因子) (31)、Fnr(85)、IHF (integration host factor) (86)やsoxQ領域(87)がMn-SODの発現を転写レベルで直接的にあるいは間接的に調節していると考えられている。さらに、Fridovichらは嫌気条件下でSOD活性がないアポMn-SODを発見し、翻訳後の段階でも制御されていると考察している(33,34,38)。このようにMn-SODの発現制御機構は非常に複雑なものとなっているが、この複雑な制御機構の存在はSODの活性すなわち O_2^- から新たな活性酸素である H_2O_2 を生み出すためであると考えられる。これに対し Fe-SODは嫌気条件下でも発現していることから構成性タンパク質であると考えられていた(23)。しかしながら我々の第1章の研究結果によって、誘導性タンパク質であることが見い出され、最近になってFurがその

制御因子であると考察されている(28,31)。またMn-SODと同様に翻訳後のFe-SODの活性調節機構も存在すると予想される。

そこで本章では好気条件下あるいは嫌気条件下の転写レベルでのMn-SODおよびFe-SODの発現量を測定し、酸素によるそれぞれの発現制御機構の解明を試みた。それぞれの構造遺伝子と*lacZ*との翻訳融合遺伝子を作製し、転写量をβ-ガラクトシダーゼ活性によって定量的に測定した。さらに*sodA*プロモーターを用いて、酸素による人為的発現制御可能なタンパク質大量発現ベクターへの応用についても検討した。

第2節 実験材料と方法

使用菌株およびプラスミド

使用菌株およびプラスミドを表4-1に示した。

表4-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB) /F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
MM294	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi</i>	(45)
Plasmids/phages	Characteristics	References
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	(46)
pMC1871	Ap ^r , <i>lacZ</i>	(88)
pCM4	Ap ^r , <i>cat</i>	(89)
pBSA-1	Ap ^r , <i>sodA</i>	第1章
pBSA-2lac	Ap ^r , <i>sodA::lacZ</i>	本章
pBSA-2CAT	Ap ^r , <i>sodA::cat</i>	本章
pBSB-1	Tc ^r , <i>sodB</i>	第1章
pBSB-4lac	Tc ^r , <i>sodB::lacZ</i>	本章

E. coli JM109は組換えプラスミドの構築に使用した。*E. coli* MM294は*sodA*および*sodB*の転写量の測定に用いた。

培地および培養条件

大腸菌の培養は37 °CでL培地に0.1 mM MnSO₄と0.1 mM FeSO₄を添加して行った。ただし、o-フェナンスロリン添加効果を調べる実験では金属イオンは添加しなかった。嫌気条件下での培養は混合ガス (N₂:CO₂:H₂=90:5:5) を通気して行った。嫌気条件下から好気条件下への培養条件の変更はOD₆₆₀が約0.3の時点で、好気条件下から嫌気条件下への培養条件の変更はOD₆₆₀が約0.5の時にいった。各種酸素分圧下での培養は混合ガスに酸素ガスを混合していった。o-フェナンスロリン添加効果では終濃度0.1 mMになるように対数増殖期中期 (OD₆₆₀が約0.5) に添加した。組換えプラスミド保持株の培養はアンピシリン (35 μg/ml) またはテトラサイクリン (20 μg/ml) を添加していった。

組換えプラスミドの作製

*sodA*の転写量を測定するために*sodA*プロモーターの下流に、翻訳融合型に*lacZ*を連結した組換えプラスミドpBSA-2*lac*と転写融合型に*cat*を連結したpBSA-2CATを作製した (図4-1)。pBSA-2*lac*から発現される蛋白質はMn-SODとβ-ガラクトシダーゼとの融合タンパク質であり、pBSA-2CATから発現されるタンパク質はクロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼである。また*sodB*の転写量を測定するために*sodB*プロモーターの下流に翻訳融合型に*lacZ*を連結した組換えプラスミドpBSB-4'*lac*を作製した (図4-1)。

pBSA-1を*Bam*HIと*Nco*Iで切断し、T4 DNA polymeraseで平滑下し、自己連結した (pBSA-2)。新たに出現した*Bam*HI部位にpMC1871 (ファルマシア社製) 由来の*lacZ*カートリッジ (*Bam*HI断片) を挿入した (図4-1)。この組換えプラスミドをpBSA-2*lac*と名付けた。pBSA-2の*Bam*HI部位にpCM4 (ファルマシア社製) の*cat* カートリッジを挿入し、pBSA-2CATを作製した。pBSB-1の*Kpn*I部位に*Kpn*I-*Bam*HIアダプター (5'GGATCCGTAC3') を挿入した組換えプラスミドpBSB-4を作製した。pBSB-4の*sodB*内に新たに導入した*Bam*HI部位にpMC1871由来の*lacZ*カートリッジ (*Bam*HI断片) を挿入した。この組換えプラスミドをpBSB-4*lac*と名付けた (図4-1)。

β-ガラクトシダーゼの活性測定法

β-ガラクトシダーゼは o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトシド (ONPG) を基質として用いると、o-ニトロフェロールとガラクトースに加水分解する反応を触媒する。このo-ニトロフェロールはA₄₂₀を測定することで定量することができる (47)。

培養液をZ緩衝液 (60 mM Na₂HPO₄7H₂O、40 mM NaH₂PO₄H₂O、10 mM KCl、1 mM MgSO₄ 7H₂O、pH 7.0) で、総量が2 mlになるように希釈した。トルエンを1滴加え、激しく攪拌した。37 °Cで40分間保温し、トルエンを除去し

た。28 °Cの恒温槽に移し、0.4 ml ONPG溶液（4 mg/ml ONPG、0.1M リン酸緩衝液（pH 7.0））を加え、反応を開始した。発色が認められたら、1 M Na₂CO₃を1 ml添加し、反応を停止した。生成したo-ニトロフェノールをA₄₂₀で測定する。対照としてNa₂CO₃溶液を添加後、ONPG溶液を加えた。28 °C pH 7.0で1分間に1 nmoleのo-ニトロフェノールを生じさせる酵素量を1 unitと定義した。

クロラムフェニコール アセチルトランスフェラーゼ（CATase）の活性測定法

CATaseは補因子としてアセチル-CoAを用い、クロラムフェニコールをアセチル化する反応を触媒する。このとき遊離したCoAと5',5'-di thiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を反応させると、反応生成物の1つとして5-thio-2-nitrobenzoateを得ることができる。この5-thio-2-nitrobenzoateはA₄₁₂を測定することで定量することができる(90)。

大腸菌からの粗酵素液の調製は第1章 第2節実験方法と材料に記した方法を用いた。700 μlのCATase反作用緩衝液（100 mM Tris-HCl (pH 7.8)、0.1 mM アセチル-CoA、4 mg/ml DTNB）に7 μlの粗酵素液を添加した。この時のA₄₁₂の1分間あたりの変化量（Aa）を測定した。その後、10 mM クロラムフェニコールを7 μl添加し、反応を開始した。A₄₁₂を測定し、1分間あたりの変化量（Ab）を算出した。すべての反応を37 °Cで行った。タンパク質濃度を第2章 第2節実験方法と材料で記した BCA protein assay reagentを用いて測定した。CATaseの比活性は次に示した計算式から算出した。

$$\text{CATase比活性 [U/mg]} = (\text{Ab}-\text{Aa}) / (13.6 \times \text{タンパク質濃度 [mg/ml]})$$

37 °Cで1分間に1 nmoleのCoAを生じさせる酵素量を1 unitと定義した。

試薬

本文中で試薬購入先を記載した試薬および前章までに記載した試薬以外はすべて和光純薬工業（株）より購入した。

第3節 結果

4.3.1. *sodA-lacZ*の発現に及ぼす酸素の影響

*sodA-lacZ*融合遺伝子組換えプラスミドpBSA-2'lacを保持する*E. coli* MM2 94を用いて、*sodA*プロモーターからの転写量をβ-ガラクトシダーゼ活性で評価した。嫌気条件下では*sodA*プロモーターから発現したβ-ガラクトシダーゼ活性は

低レベルではあるが、検出することができた (0.2×10^3 U/OD₆₆₀) (図4-2)。 *E. coli* MM294染色体から発現しているβ-ガラクトシダーゼ活性は検出限界以下であった。*sodA*プロモーターから発現したβ-ガラクトシダーゼ活性は好気条件下で誘導された。β-ガラクトシダーゼ活性は、酸素分圧0.21気圧(空気)、0.4気圧、0.6気圧、0.8気圧、1.0気圧でそれぞれ 7.0×10^3 、 6.5×10^3 、 9.4×10^3 、 6.3×10^3 、 4.0×10^3 U/OD₆₆₀であった(図4-2)。*sodA*プロモーターの最高の転写量は酸素分圧が0.6気圧の時であった。酸素分圧が0.6気圧以上になると酸素による障害によって増殖も顕著に阻害された。これらの結果から*sodA*の発現は転写レベルで酸素により厳密に制御されていることが明らかとなった。

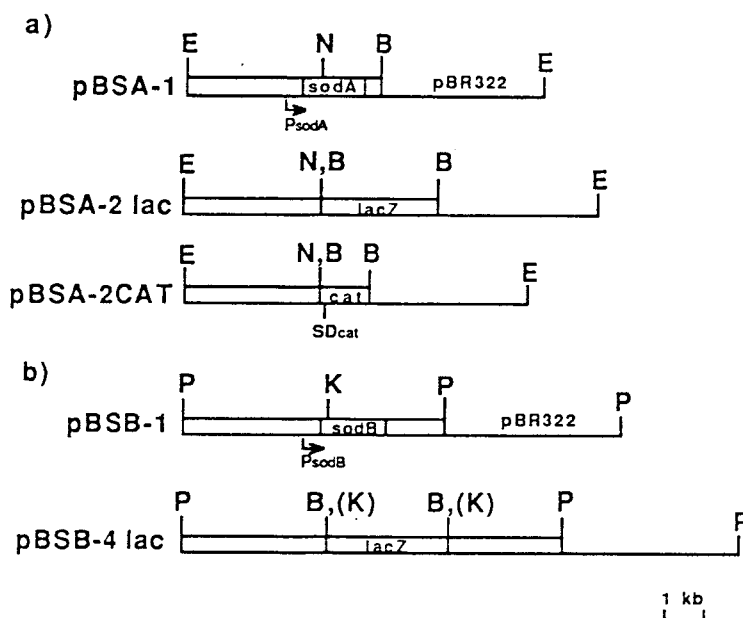


図4-1 用いた組換えプラスミドの制限酵素地図。B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; N, *Nco*I; P, *Pst*Iである。□は挿入断片を示した。

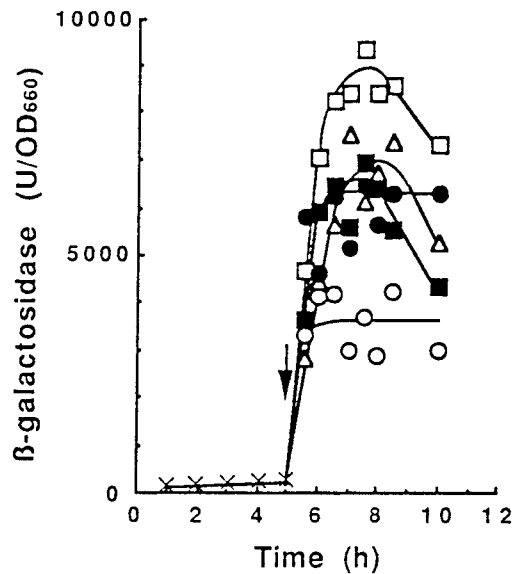


図4-2 *sodA*プロモーター制御下の β -ガラクトシダーゼ活性発現に及ぼす酸素の影響。矢印は嫌気状態から好気状態にシフトした時間を示している。×は嫌気条件下、△は0.21 気圧酸素分圧（空気）、■は0.4 気圧酸素分圧、□は0.6 気圧酸素分圧、●は0.8 気圧酸素分圧、○は1.0 気圧酸素分圧での培養である。

4.3.2. *sodB*の発現制御機構

*sodB-lacZ*融合遺伝子組換えプラスミドpBSB-4lacを保持した*E. coli* MM29 4を用いて、*sodB*プロモーターの転写量を β -ガラクトシダーゼ活性で評価した。まず、好気条件下および嫌気条件下での*sodB*の発現を調べた（図4-3）。嫌気条件下では 2.5×10^3 U/OD₆₆₀で、好気条件下（ 1.4×10^3 U/OD₆₆₀）の約2倍の発現量があった。さらに培養条件を好気条件下から嫌気条件下へ変更することによって、*sodB*の発現量が徐々に増加した。*sodB*の発現は構成性であると考えられていたが、これらの結果から、厳密な制御ではないが、酸素存在下で転写レベルで抑制されていることが明らかとなった。

鉄イオンの取り込みに関与するタンパク質を制御するFurによって*sodA*および*sodB*が転写レベルで制御されていることが推測されている(28)。そこで、鉄イオンを特異的にキレートし、Furの機能を阻害するo-フェナンスロリンの添加による*sodB*の転写量に及ぼす影響を調べた（図4-4）。o-フェナンスロリンの添加直後に、*sodB*の転写量が抑制された。この結果は*sodB*の発現がFurによって正に制御されていることを示唆するものであった。

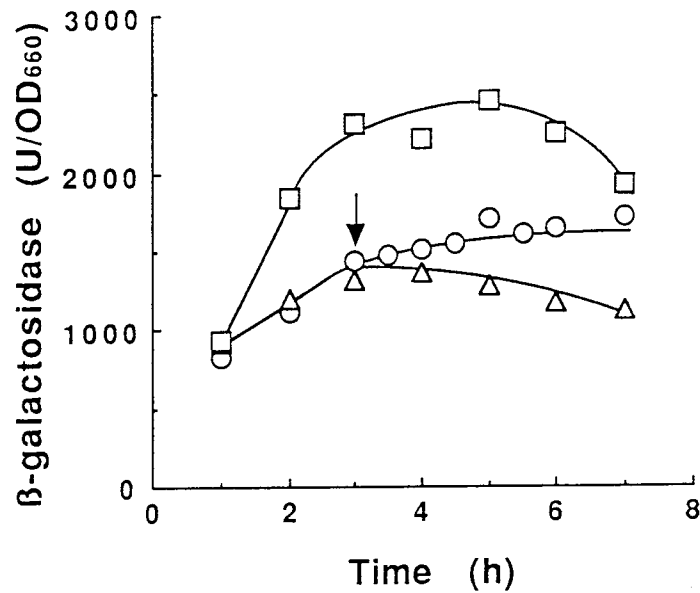


図4-3 *sodB*プロモーター制御下の β -ガラクトシダーゼ活性発現に及ぼす酸素の影響。矢印の時点で好気条件下から嫌気条件下へシフトした。△は好気培養、□は嫌気培養、○は好気条件下から嫌気条件下へ変更した培養を示した。

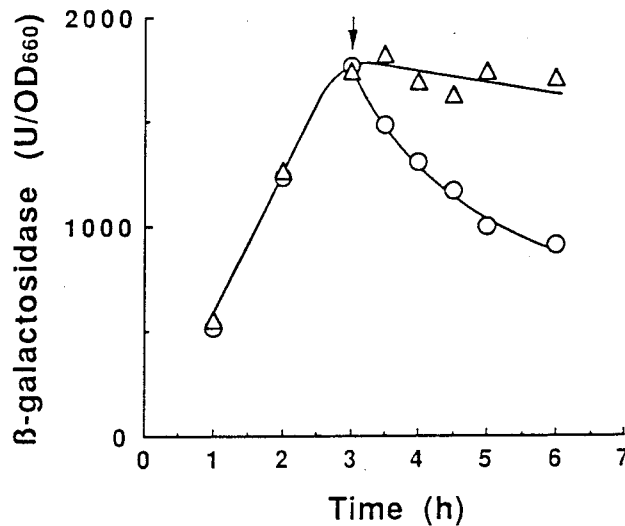


図4-4 鉄キレート剤 (o-フェナンスロリン) による*sodB*の発現に及ぼす影響。矢印は o-フェナンスロリンの添加時期を示した。○は0.1mM o-フェナンスロリンを添加して培養した。△はo-フェナンスロリン無添加で培養した。

4.3.3. *sodA*プロモーターを用いた外来タンパク質発現システムの開発

*sodA*の発現が転写レベルで酸素によって誘導されること、さらに*sodA*の発現制御システムを外来蛋白質の人為的発現制御システムとして実用できることを確かめるために、*sodA-cat*融合遺伝子組換えプラスミドpBSA-2CATを構築した(図

4-1)。この実験で用いたpBSA-2CATに挿入されている*cat*カートリッジには構造遺伝子とその上流にSD配列を含むため、pBSA-2CATから発現するタンパク質は融合タンパク質としてではなく、*cat*の開始コドンから翻訳される。pBSA-2CATを保持した*E. coli* MM294を*E. coli* MM294 (pBSA-2'*lac*) の培養実験と同様の条件で培養した。CATaseは酸素によって誘導されることが確認され、その活性は0.6気圧酸素分圧条件下で 3.0×10^3 U/OD₆₆₀、0.21気圧酸素分圧(空気)条件下で 1.4×10^3 U/OD₆₆₀であった(図4-5)。

嫌気条件下で*sodA-lacZ*融合遺伝子から発現したβ-ガラクトシダーゼ活性は検出することができたが、*sodA-cat*融合遺伝子から発現したCATase活性は検出限界以下であった。さらに、翻訳融合型(*sodA-lacZ*)での0.6気圧酸素分圧条件における発現量と0.21気圧酸素分圧(空気)条件における発現量の割合は1.24(0.6気圧酸素分圧/0.21気圧酸素分圧)であるのに対して、転写融合型(*sodA-cat*)では2.16(0.6気圧酸素分圧/0.21気圧酸素分圧)と翻訳融合型に比べて高かった。これらの発現量や誘導率の違いは、それぞれの翻訳効率の違いが原因であると考えられた。この翻訳効率の違いはSD配列およびその周辺の領域の違いが原因であり、Mn-SODの発現が翻訳段階でも微妙に制御されていると考えられた。また*sodA*の発現制御システムを外来タンパク質の人為的発現制御システムとして利用する場合、SD配列およびその周辺領域は*sodA*以外のシステム(たとえば*cat*のSD配列およびその周辺領域)を用いたほうが良いと考えられた。

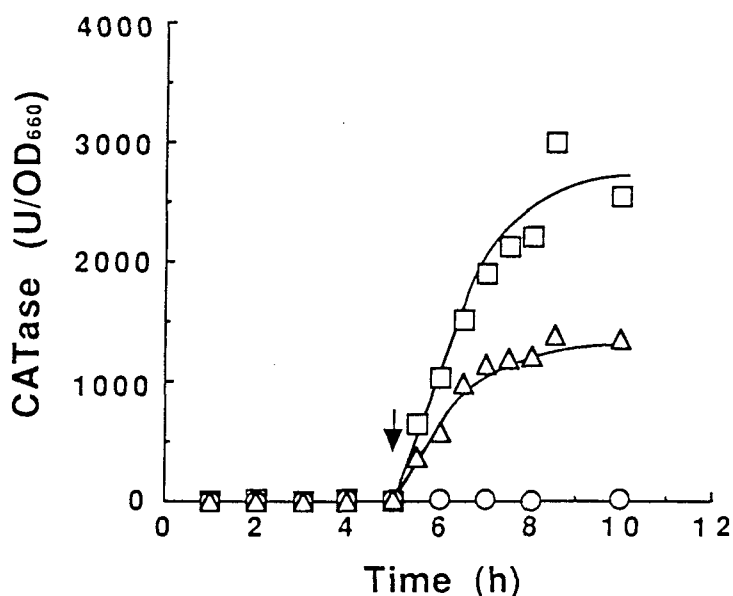


図4-5 *sodA-cat*融合遺伝子を用いたCATaseの発現。矢印は嫌気条件下から嫌気条件下に培養条件を変更した時期を示した。○は嫌気培養、△は嫌気培養から0.21気圧酸素分圧(空気)にシフトした培養、□は嫌気培養から0.6気圧酸素分圧にシフトした培養。

第4節 考察

我々は*sodA*と*sodB*の転写レベルでの発現を、*lacZ*との融合遺伝子を作製し、SODとβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質のβ-ガラクトシダーゼ活性で定量を試みた。またMn-SODの発現が転写レベル以降にも制御されていると予測されていることから、転写融合型である*sodA-cat*融合遺伝子を作製し、CATase活性でも転写レベルでの発現の定量を試みた。

*sodA*の発現は転写レベルで酸素によって誘導されることが*sodA-lacZ*融合遺伝子と*sodA-cat*融合遺伝子の実験から明らかとなった。しかしながらこれら2種類の融合遺伝子から発現されるタンパク質量に微妙な違いがあった。嫌気条件下では、転写融合型(*sodA-cat*)から発現するCATase活性は検出されなかった。しかしながら、翻訳融合型(*sodA-lacZ*)から発現するβ-ガラクトシダーゼ活性を十分検出することができた。さらに好気条件下では、翻訳融合型(誘導率: [0.6 気圧酸素分圧/0.21 気圧酸素分圧] = 1.24)より転写融合型(誘導率: [0.6 気圧酸素分圧/0.21 気圧酸素分圧] = 2.16)がより顕著な誘導発現が認められた。これら融合遺伝子の違いはSD配列とその周辺の領域であることから、それぞれの発現量の違いは翻訳段階に原因があると考えられた。つまり、Mn-SODの発現は嫌気条件下で翻訳効率が上昇し、好気条件下では翻訳効率が低下し、翻訳段階で細胞内SOD活性の微妙な制御を行っていると考えられた。最近になって、*sodA*の転写レベルでの調節因子として、SoxRS、Furなど少なくとも5種類が明らかとなり(32)、その制御機構が非常に複雑である。特に、SoxRSによってC末端グルタミン酸の修飾されたりボゾームタンパク質S6が増加することが報告されている(29)。このS6タンパク質の修飾がMn-SODの翻訳レベルの発現制御機構に関与しているのかもしれない。

Fridovichらは、Mn-SOD活性の代りにアポMn-SODが存在し、翻訳後レベルでSOD活性を調節する機構が存在することを示唆している(33,34,38)。SOD活性は毒性の高いO₂⁻から毒性のあるH₂O₂に変換する活性を触媒する酵素であり、このことからその活性は厳密に制御されていると考えられている。

*sodB-lacZ*融合遺伝子を用いた実験結果から、転写レベルで酸素によって抑制されていること、鉄キレート剤(o-フェナンスロリン)によって抑制されることが明らかとなった。Niederhofferらは鉄含有制御因子Fur(鉄イオンの取り込みに関与するタンパク質の制御因子として取得されている)によって*sodB*の発現が転写レベルで正に制御されていること、*sodA*の発現が転写レベルで負に制御されていることを示唆する結果を報告している(28)。Furが鉄キレート剤によってその機能が阻害されることから、鉄キレート剤添加効果は彼等の結果を支持するものであった。我々は*sodA*増幅効果によってFe-SOD活性が抑制されること(第1章で報告している)、また*sodB*プロモーター領域増幅効果によってMn-SOD活性が誘導されることを別途確認している。これらの結果は*sodA*および*sodB*両方に働く制御因子の存在を示唆し、Furがその制御因子として働いていると考えられた。我々は*sodB*が酸素

によって抑制されることを同時に確認した。この抑制にFurが関与しているか否かについては不明であり、またFurが酸素を認識するという報告はなく、酸素による抑制には別の制御因子が関与しているのかもしれない。

*sodA*の制御機構は非常に複雑であるが、酸素による誘導発現は単純で非常に敏感であり、誘導発現量も非常に多い。この*sodA*の制御機構を用いて、人為的発現制御可能なタンパク質大量発現系に応用できると考えられた。現在すでに報告されている人為的発現制御可能なタンパク質大量発現系には、*lac*(91)や*trp*(92)の発現制御システムやT7 polymeraseを用いた発現システム(93)がある。これらのシステムではその誘導発現が高価な薬剤添加によって行われている。また*lac*や*trp*の発現制御システムでは抑制が不完全であるために、大腸菌にストレスとなるタンパク質を大量生産させることはできなかった。しかしながら、*sodA*の制御機構システムでは酸素により誘導発現させるために生産コストを低減させられる。また嫌気条件下ではほとんど発現しないため(*cat*のSD配列を用いた場合)、大腸菌にストレスとなるタンパク質の生産も効率良く発現させることができると考えられた。このようなことから*sodA*発現制御システムが外来蛋白質の大量生産に適したシステムであると考えられた。

第5節 要約

*sodA*および*sodB*の転写レベルの発現量を定量するために β -ガラクトシダーゼ構造遺伝子(*lacZ*)との融合遺伝子を作製した。*sodA-lacZ*融合遺伝子から発現された β -ガラクトシダーゼは酸素によって誘導され、0.6気圧酸素分圧で最高の誘導(9.4×10^3 U/OD₆₆₀)を示した。これに対して、*sodB-lacZ*融合遺伝子から発現された β -ガラクトシダーゼは酸素によって部分抑制され、嫌気条件下での発現量は好気条件下の約2倍であった。さらに*sodB-lacZ*融合遺伝子から発現された β -ガラクトシダーゼは鉄キレート剤(o-フェナンスロリン)によって抑制された。この結果はNiederhofferらが報告しているMn-SOD転写抑制因子FurがFe-SODの転写誘導因子として作用しているという仮説を支持するものであった。*sodA*プロモーターと*cat*のSD配列を用いた場合、嫌気条件下で発現量が完全に抑制され、酸素の通気により発現が敏速に誘導された。この結果から、Mn-SODの発現が翻訳レベルで制御されていることが示唆された。また*sodA*発現制御システムを有用な人為的発現制御システムとして利用できると考えられ、その発現ベクターを構築した。

第5章 好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1由来 Mn-SODの精製と構造遺伝子 (*sodS*) のクローニング

第1節 緒言

生物はそれぞれの棲息する環境に適した代謝系や構造をもっている。温泉や堆肥などの高温環境に棲息する好熱菌では、一般的な常温菌由来のタンパク質より熱に対して安定なタンパク質を生産している(94)。このような耐熱性タンパク質は古くから興味の対象となっており、アミノ酸配列の決定やX線結晶構造解析による立体構造決定などの酵素化学的アプローチや、塩基配列決定や部位特異的変異操作などの分子生物学的アプローチが試みられ、タンパク質構造と熱安定性との関係を説明する努力がなされている。また耐熱性酵素はこれまで述べた基礎的な面に対してのみ興味が持たれてきたのではなく、応用面においても非常に興味が持たれている。工業的に用いるためには生産コストが重要なファクターである。つまり、酵素自身に安定性と高い反応性が要求される。常温菌由来の酵素ではこの2つの相反する条件を克服することはできなかった。しかしながら耐熱性酵素は至適温度が高いことから常温菌由来酵素に比べて反応性が高く、また安定性も高い。最近では好熱菌*B. stearothermophilus*よりもさらに高温環境下で生育する超高度好熱性始原菌(古細菌)が分離され(94)、さらに耐熱性の高い酵素が要求されるようになっている。特にポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)(95)に用いられる耐熱性DNAポリメラーゼとして超高度好熱性始原菌*Pyrococcus*属由来(96)のものが実用化されている。

好熱性細菌の中には高温環境下で生育するためにその比増殖速度が常温菌に比べて高いものが存在する。この理由は高温条件では反応速度が常温に比べて早いからであると考えられる。しかしながら、このことを裏返すと常温菌に比べて酸素による障害を受けやすいと考えられる。そこで、我々は高温条件下で常温菌である大腸菌より比増殖速度が高い好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1(世代時間は60℃で11分である)(84)における酸素耐性機構の解明を試みた。本章では好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1由来SODを精製し、その酵素の諸性質を決定した。さらに、その構造遺伝子のクローニングと塩基配列を決定し、他のSODのアミノ酸配列と比較した。

第2節 実験材料と方法

使用菌株およびプラスミド

使用した菌株とプラスミドを表5-1に示した。

表5-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB) /F'[traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15]</i>	(45)
IM303	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi, sodA, sodB</i>	第2章
<i>Bacillus subtilis</i>		
MI113	<i>arg-15, trpC2, hsrM, hsmM</i>	(97)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>		
SIC1		(84)
Plasmids/phages	Characteristics	References
大腸菌プラスミドおよびファージ		
pUC19	Ap ^r	(72)
pUSODS12	Ap ^r , <i>sodS12</i>	本章
pUSODS32	Ap ^r , <i>sodS32</i>	本章
phage M13mp18		(67)
phage M13mp19		(67)
<i>Bacillus</i> 属プラスミド		
pTB522	Tc ^r	(98)
pTSODS12	Tc ^r , <i>sodS12</i>	本章

E. coli JM109はファージ一本鎖DNAの調製に使用した。*E. coli* MM294および*B. subtilis* MI113 は好熱菌由来 SOD の大量発現に使用した。*B. stearothermophilus* SIC1は染色体DNAの供与株として用いた。

培地と培養条件

すべての菌株の培地としてL培地を使用した。ただしファージ一本鎖DNA調製にはYTおよび2xYT培地を用いた。それぞれの培地組成については前章までに記した。

B. stearothermophilus SIC1の形質転換を行う場合、LSG培地としてL培地に終濃度0.25 %グルコースと終濃度0.15 Mスクロースを添加した培地を用いた。0.33 Mスクロース、0.02 Mマレイン酸、0.02 M MgCl₂ (別殺菌) 溶液 (pH 6.5)

をSMM緩衝液とした。SMMLGは2倍濃度のSMM緩衝液に等量の2倍濃度のL培地と終濃度0.25%グルコースを添加することにより調製した。プロトプラスト再生培地としてL培地に0.2 Mスクロース、リン酸溶液(100 ml中に3 g KH_2PO_4 、7 g K_2HPO_4) 5%、0.5%グルコース、0.01% カザミノ酸、20 mM MgCl_2 、0.02% 牛血清アルブミン(BSA)になるように添加した培地を用いた。基底培地には寒天を終濃度2%、重層培地には寒天を終濃度0.03%になるように添加した。

プラスミド保持株の培養には薬剤を添加して行った。大腸菌を宿主とするプラスミドでは50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリンを、枯草菌を宿主とするプラスミドでは25 $\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリンを、*B. stearothermophilus*を宿主とするプラスミドでは5 $\mu\text{g/ml}$ テトラサイクリンを添加した。SOD活性測定を行うための培養には0.1 mM MnSO_4 を添加し、対数増殖期後期(培養時間は、大腸菌および枯草菌で6~8時間、*B. stearothermophilus* では4~6時間)まで培養した細胞を用いた。

SOD活性測定に用いた粗酵素液の調製

大腸菌からの粗酵素液の調製については第1章で記した。枯草菌および好熱菌*B. stearothermophilus*からの粗酵素液の調製では、培養菌体を50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.8)で洗浄し、リゾチーム(枯草菌では5 mg/ml、*B. stearothermophilus*では1 mg/ml)、10 U/ml DNase Iと0.1 mM EDTAを含んだ50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)に懸濁した。37 °Cで30分間保温し、菌体を破壊した後、遠心分離によって上澄液を粗酵素液として回収した。

B. stearothermophilus SIC1由来SODの精製

B. stearothermophilus SIC1を1.3 l L培地、55 °Cで培養した。この培養菌体から粗酵素液を調製した。リゾチーム濃度は通常の濃度から0.2 mg/mlに変更して行った。粗酵素液について50%飽和から80%飽和の硫酸分画を行い、50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)で透析した。この試料を50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.8)で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィーにかけ、0から0.5 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。SOD活性画分を20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)で透析した。20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)で平衡化したFPLC Mono Qイオン交換クロマトグラフィーに加え、0から0.3 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。活性画分を回収後、0.15 M NaClを含む50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.8)で透析した。その後、FPLC Superose 12ゲルろ過クロマトグラフィーを行い活性画分を回収し、精製試料とした。さらに、同じゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分子量決定も行った。分子量マーカーとしてゲルろ過スタンダード(バイオラッド社製)を用いた。

SOD活性に対する阻害剤の影響

活性測定時に1 mM シアン化ナトリウムまたは10 mM アジ化ナトリウムを添加して測定した(99)。過酸化水素の影響を調べるときは活性測定の前に0.5 mM 過酸化水素で25 °C 5分間処理してから活性測定を行った(99)。

配位金属イオンの同定

SOD配位金属の同定とその配位数を日本ジャーレルアシュ社製2チャンネル原子吸光分光分析装置を用い、フレイムレス法（フレイムレスアトマイザFLA-1000型、日本ジャーレルアシュ社製）で行った。

N末端アミノ酸配列の決定

エドマン分解法によってSOD N末端アミノ酸配列を決定した。アプライドバイオシステム社製モデル470A気相式アミノ酸シーケンサーを用いた。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法

Mullisらの方法(95)に従い、一部改良して行った。2本鎖DNAの増幅では、鑄型DNA（染色体の場合は1 μg、プラスミドDNAの場合は0.1 μg）、2種類の100 pmolプライマー、200 μM dNTP、酵素反応緩衝液（酵素購入時に付随していた緩衝液を用いた。使用濃度はそのプロトコールに従った。）と5 U 耐熱性DNAポリメラーゼを混合した。この混合液にミネラルオイルを重層した。94 °C 2分間（第1サイクルでは5分間行った。）、55 °C 2分間、72 °C 3分間（最終サイクルは10分間行った。）のサイクルを25回繰り返し行った。耐熱性DNAポリメラーゼにはVent DNA polymerase（New England Biolob社製）を用いた。1本鎖DNAの増幅(100)には、取得したい1本鎖DNAと相補するプライマー量を1~10 pmoleに限定し、耐熱性DNAポリメラーゼをVent DNA polymerase *exo*⁻（New England Biolob社製）に変更して、その他の方法は2本鎖DNAの増幅と同様に行った。

染色体DNAからの直接塩基配列決定

図5-1に染色体DNAからの直接塩基配列決定法(101)の概略を示した。染色体DNAを適当な制限酵素によって切断し、リガーゼ反応によって自己環状化する。すでに塩基配列が決定されている領域内に存在する制限酵素を用いて切断し、線状DNAを取得した。この線状DNAは塩基配列の未知の領域が塩基配列の既知領域に挟まれた構造に変化している。そこで、塩基配列の既知領域を基に合成した2種類のオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCR法を行い、未知領域の2本鎖DNAを増幅させた。この2本鎖PCR増幅DNAから1本鎖DNAをPCR法で増幅させた。プライマーには2本鎖DNAを増幅させるときに用いたプライマーを再度使用した。PCR法で増幅させた1本鎖DNAをGENE CLEAN II kitを用い、そのプロトコールに従って

精製した。この1本鎖DNAを用いて、第2章、第2節実験方法と材料で記した塩基配列決定法で塩基配列を決定した。

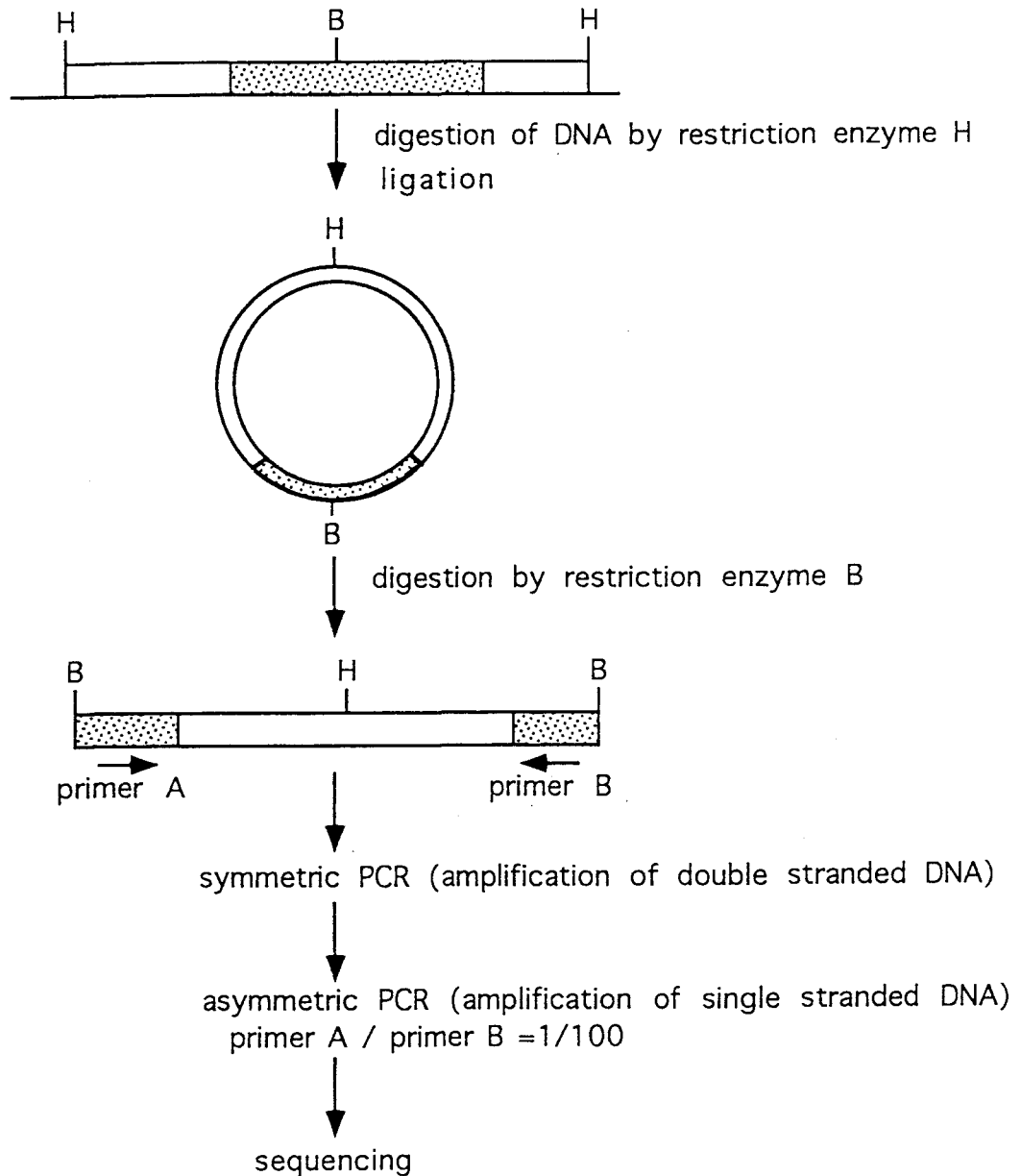


図5-1 染色体DNAからの直接塩基配列決定法。[点線]は既知領域、[空白]は未知領域を示した。

B. stearothermophilus SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子 (*sodS*) のクローニング

精製した*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列から予想された塩基配列 (5' ATGCCNTT(T/C)GAGCTCCCNGCNCTNCCNTA(T/C)G 3') とすでに報告されている大腸菌および*B. stearothermophilus*のMn-SODアミノ酸配列との相同領域から予想された塩基配列 (5'AG(A/G)TA(A/G)TATGCAITG(T/C)TCCCANAC(A/G)TCNAGNCC 3')をプライマーとして用いて、PCR法で増幅断片を得た。それぞれのプライマーに制限酵素切断部位、*SacI*と*EcoT22I*を導入した。この制限酵素切断部位を用いてファージM13のマルチクローニング部位に増幅断片をクローニングし、塩基配列を決定した。この塩基配列を基に染色体DNAから直接*sodS*全領域の塩基配列を決定した。決定された塩基配列を基にプライマーを作製し、*sodS*全領域のPCR増幅2本鎖DNA断片を取得した。この増幅断片をpUC19にクローニングした。

枯草菌の形質転換

枯草菌の形質転換はAnagnostopoulosとSpizizenのコンピテントセル法(102)により行った。5 mlのL培地中で、37℃一晩培養した培養液1 mlをTFI培地(1 l中に、K₂HPO₄ 14 g、KH₂PO₄ 6 g、(NH₄)₂SO₄ 2 g、クエン酸ナトリウム 1 g、グルコース 5 g、MgSO₄7H₂O 0.2 g、要求アミノ酸各 50 mg、カザミノ酸 0.2 g) 20 mlに植菌して、37℃で振盪培養した。対数増殖期をはずれてから1時間後(植菌後約3.5時間後)に、培養液4 mlをTFII培地(1 l中に、要求アミノ酸 5 mg、カザミノ酸 0.1 g、その他はTFIと同じ) 36 mlに植菌し、1.5時間培養することでコンピテント細胞を得た。コンピテント細胞 1 mlとDNA(約 1 μg)を混合し、30分間振盪培養する。5000xgで5分間遠心し集菌した。これに 3 mlのL培地を添加し、37℃で2時間培養した。この培養液を 25 μg/mlテトラサイクリンを含むL固形培地に塗布し、形質転換体を選択した。

B. stearothermophilus の形質転換

プラスミドによる*B. stearothermophilus*の形質転換は、Imanakaらのプロトプラスト法(103)により行った。

1. プロトプラストの調製

B. stearothermophilus SIC1をL培地で55℃で一晩培養した。その培養液0.5 mlを50 mlのLSG培地に植菌し55℃で振盪培養した。OD₆₆₀が約0.4付近になった時点で遠心集菌し(8000xg、5分間、4℃)、2.5 mlのSMMLG培地に懸濁した。リゾチームを終濃度 6 μg/mlになるように添加し、48℃で約10分間穏やかに振盪し、プロトプラスト化させた。プロトプラスト化の進境状況を顕微鏡で観察し、約95%以上プロトプラスト化が確認された時点で、遠心(4000xg、7分

間、4℃、以降の遠心はすべてスウィング型ローターを使用した。)によりプロトプラスト細胞を回収した。2.5 mlのSMMLG培地で洗浄後、再度遠心分離でプロトプラスト細胞を回収した。これに2.5 mlのSMMLG培地を加えて懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

2. ポリエチレングリコール (PEG) 処理

約1 μgプラスミドDNA溶液に等量の2倍濃度SMM緩衝液を加えた。これに0.5 mlプロトプラスト懸濁液を添加し、48℃で保温した。40% PEG 6000を含むSMM緩衝液(48℃で保温)を加えて、正確に2分間ゆっくりと振盪した。5 ml SMMLG培地(48℃で保温)を加えてPEGを希釈し、遠心(4000xg、10分間、4℃)によりプロトプラストを回収した。0.01% BSAを含むSMMLGを1 ml添加し、48℃で1.5時間の緩やかな振盪培養を行った。

3. プロトプラストの再生

プロトプラスト試料0.1 mlをプロトプラスト再生用重層培地1 mlに懸濁して、プロトプラスト再生用基底培地に重層した。プロトプラストの再生に48℃で1~3日間培養した。形質転換体を選択する場合はプロトプラスト再生用培地に5 μg/mlのテトラサイクリンを添加した。

その他の方法

その他の方法については前章までに記した。

試薬

前章までに記載した試薬および本文中で購入先を記載した試薬以外はすべて和光純薬工業(株)より購入した。

第3節 結果

5.3.1. *B. stearothermophilus* SIC1由来SODの精製

B. stearothermophilus SIC1には1種類のSODのみが発現していた(図5-2)。このSOD活性は大腸菌Mn-SODで見られたようなパラコートによる誘導は認められず、また嫌気条件下でも好気条件下と同等に発現していた。そこで、第2節実験方法と材料に記した方法で、SDS-PAGEで単一バンドまで精製した(図5-3)。精製過程を表5-2に示した。精製試料の比活性は 2.8×10^3 U/mgであった。分子量をSDS-PAGEとゲルろ過クロマトグラフィーで測定した。SDS-PAGEで約25 kDa、ゲルろ過クロマトグラフィーで約40 kDaであった。このことから*B. stearothermophilus* SIC1由来SODは単一サブユニットからなる2量体タンパク質であることが明らかとなった。

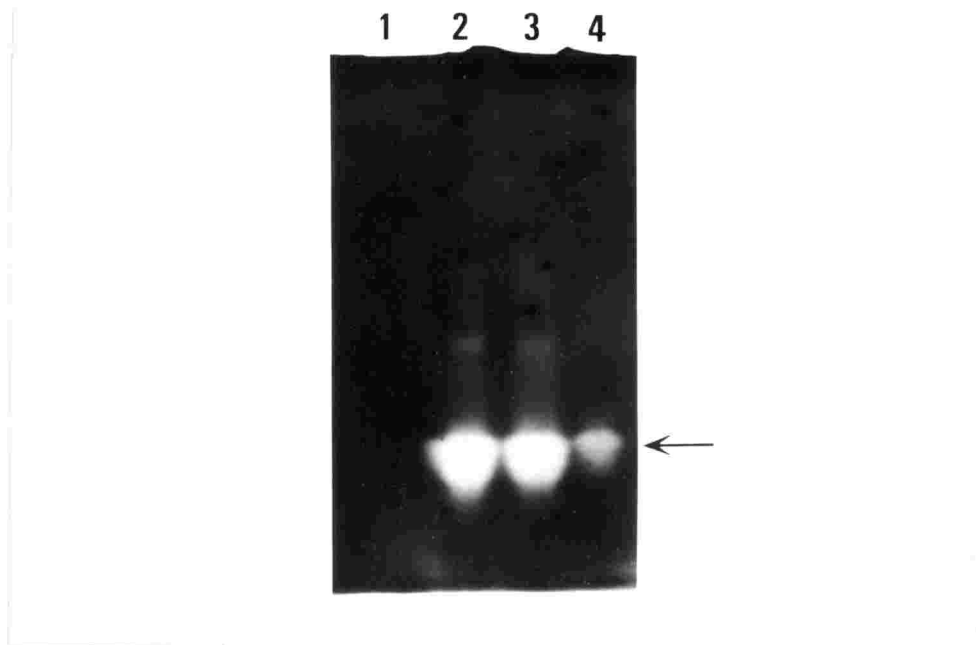


図5-2 *B. stearothermophilus* SIC1の培養菌体および組換えプラスミドを保持した*E. coli* IM303から調製した粗酵素液のnative-PAGE後のSOD活性染色。Lane 1; *E. coli* IM303(pUC19); lane 2; *E. coli* IM303(pUSODS32); lane 3, *E. coli* IM303(pUSODS12); lane 4, *B. stearothermophilus* SIC1。

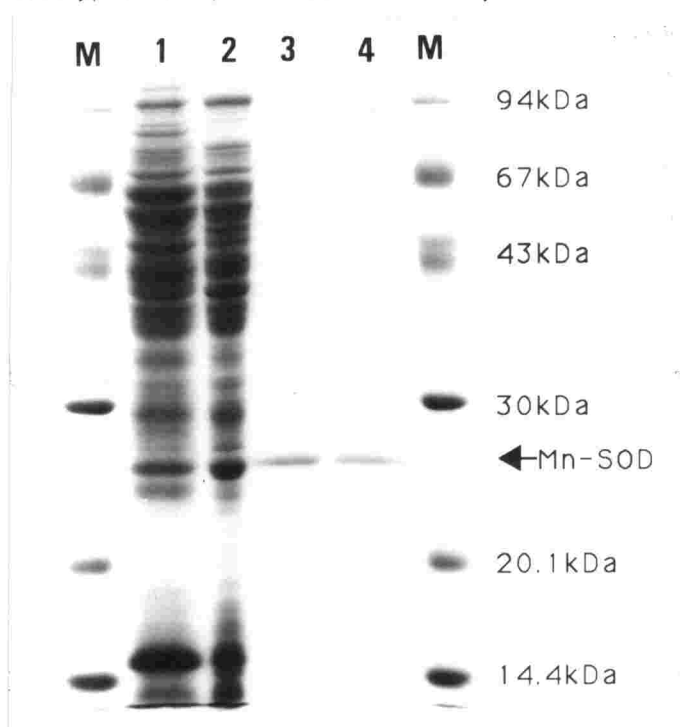


図5-3 *B. stearothermophilus* SIC1由来SODの各精製ステップでのSDS-PAGE。クマシーブリリアントブルーR250で染色した。Lane 1, 粗酵素液 (20 μ g); lane 2, 硫酸分画 (20 μ g); lane 3, DEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィ (2 μ g); lane 4, FPLC (1 μ g)。

表5-2 *B. stearothermophilus* SIC1由来SODの精製

精製段階	液量 (ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	活性 (U/ml)	比活性 (U/mg)	精製度 (倍)
粗酵素液	104	4.72	154	32.6	1
硫酸分画(50~80%飽和)	15	11.5	820	71.3	2.2
DEAE-Sepharose CL-6B	33	0.26	247	942	29
FPLC	50	0.027	73.4	2760	84.7

5.3.2. 配位金属の同定

SODは、配位している金属の違いから主に3種類に分類されている。原核生物や真核生物のミトコンドリアなどに存在しているMn-SOD、原核生物に存在するFe-SOD、真核生物の細胞質内に存在するCu,Zn-SODである。これらSODは阻害剤に対する影響に違いがある。Mn-SODはアジ化ナトリウムによって阻害され(104)、Fe-SODはアジ化ナトリウムおよびH₂O₂によって阻害される(104)。Cu,Zn-SODはシアン化ナトリウムおよびH₂O₂によって阻害される(105,106)。これら阻害剤の影響を精製タンパク質試料を用いて調べた(表5-3)。*B. stearothermophilus* SIC1由来SODは10mMアジ化ナトリウムによってのみ活性が64%まで阻害された。さらに原子吸光分析装置を用いて、Mn、Fe、Cu、Zn濃度を定量した。その結果、Mnが単量体タンパク質当たり1原子配位していることが明らかとなった(表5-4)。これらの結果から、*B. stearothermophilus* SIC1に存在するSODは同一サブユニットからなる2量体Mn-SODであることが明らかとなった。

表5-3 SOD活性に対する阻害剤の影響

	SOD活性(相対値(%))		
	精製試料	大腸菌Mn-SOD	大腸菌Fe-SOD
1mM NaCN	117	105	94
10mM NaN ₃	64	59	28
0.5mM H ₂ O ₂	103	105	56

それぞれの値は残存活性(%)である。NaCNとNaN₃については活性測定時に添加して測定した。H₂O₂については活性測定前に5分間処理し、活性測定した。

表5-4 SODに結合している金属原子の定量

	Mn	Fe	Cu	Zn
金属原子数/単量体タンパク質	0.59	0.045	0.024	0.071

5.3.3 *B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列の決定

アプライド バイオシステム社製モデル470A気相式アミノ酸シーケンサーを用いて、*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列を決定した(図5-4)。10番目のアミノ酸残基を除いて、すでに報告されている*B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列(107,108)と一致していた。10番目のアミノ酸残基はSIC1株ではアラニンで、ATCC12980株ではプロリンであった。

	1	10
SIC1	Pro-Phe-Glu-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Tyr- <u>Ala</u> -Tyr-Asp-	
ATCC12980	Pro-Phe-Glu-Leu-Pro-Ala-Leu-Pro-Tyr- <u>Pro</u> -Tyr-Asp-	

図5-4 *B. stearothermophilus* 由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列の比較。

5.3.4. *B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子 (*sodS*)の塩基配列決定

B. stearothermophilus SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列から推測される塩基配列と、大腸菌Mn-SOD(60)およびすでに報告されている *B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SOD(108)との相同領域(Mn配位部位を含む領域)から予想され塩基配列(図5-8)を基にオリゴヌクレオチドを合成し(5'AT(A/C/T)CA(C/T)CA(C/T)ACNA(A/G)CA(C/T)CA3'および5'A(C/T)TTNA(A/G)(A/G)TA(A/G)TANGC(A/G)TG(C/T)TCCCANAC(A/G)TCNA(A/G)NCC、*B. stearothermophilus* SIC染色体DNAを鋳型としてPCR法を行った。この増幅断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を予測した。すでに報告されているMn-SODのアミノ酸配列と高い相同性を有していた。そこで増幅断片をプローブに用いて、コロニーハイブリダイゼーション法で*sodS*全領域のクローニングを試みた。しかしながら目的の断片をクローニングすることができなかった。そこで染色体DNAから直接塩基配列を決定した(図5-5)。開始コドンATGから始まる612 bp(204アミノ酸)からなるORFが1種類存在していた。開始コドンの上流には16SリボソームRNA結合部位であるShine-Dalgarno配列(SD配列)(109)と考えられる配列が存在していた。その上流に*Bacillus*属の σ^A 因子が認識すると考えられたプロモーター領域(110)が存在していた。このプロモーター領域は第6章の転写開始点決定の結果からも確認された。終止コドンの下流に転写終結に機能すると考えられるパリンδροーム構造を形成する領域が認められ、*B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SOD構造遺伝子の下流には存在して

1 GATCGTTTCGGCTTGGCT GCTGACTGAAGCTCCCCGTTTTCAATCGAAAAGGGTGGGAGGTCGTTACGCAGCAAAGCGCT 79
CL1

80 CGTTGTGCGAATGCTCTCGGCTAGTGACGTCGAAGCATAGTAAAAAGTCGGAAGAACGGATAAAAGCGTCAGTAAAAACA 159

160 AATAGCCAATTGTTTTTCCAATCCCTTGAATCGAAAACGAGCGATATCTTTTGGGAATACAGACTTTTCCATAATTGG 239

240 ACAAATACGTTTCATCATGGCCACACCTTTCCTTTTCTCCATTTTCCATTGTATATGTTGAGAAAAGGGAATCAACTGTG 319
EcoRI
CL3

320 AGTGCTTTCGGCCATCAGCAGACAAGCAAATTCATTTGAAACATTGTGGTAATTTTGGTAAGCTAATTTTACATGGACGGC 399
(C)
-35 -10 +1

400 ACTACGTCCGCATTACATAACAAAAGGAGGAGATTTGC ATG CCA TTT GAA CTCCG GCA TTG CCG TAT 467
1 SD (M) P F E L P A L P Y 9

PsodS binding site
468 GCG TAC GAT GCG CTC GAG CCG CAT ATC GAC AAA GAA ACG ATG ACC ATT CAC CAC ACG AAG 527
10 A Y D A L E P H I D K E T M T I H H T K 29

528 CAT CAT AAC ACG TAC GTG ACG AAC TTA AAT GCA GCG CTT GAA GGA CAC GCT GAT TTG CAA 587
30 H H N T Y V T N L N A A L E G H A D L Q 49

588 AAC AAA TCG CTT GAA GAA TTG CTC AGC AAT TTG GAA GCC CTT CCT GAA AGC ATT CGC ACT 647
50 N K S L E E L L S N L E A L P E S I R T 69

648 GCG GTG CGC AAC AAC GGC GGC GGC CAT GCG AAC CAT TCG CTG TTC TGG ACG ATT TTG TCT 707
70 A V R N N G G G H A N H S L F W T I L S 89

708 CCA AAC GGC GGT GGT GAG CCG ACA GGC GAA CTG GCT GAA GCC ATC AAC AAA AAA TTC GGT 767
90 P N G G G E P T G E L A E A I N K K F G 109

768 AGC TTT GCG GCG TTT AAA GAC GAG TTT TCG AAA GCA GCC GCT GGC CGT TTT GGT TCC GGC 827
110 S F A A F K D E F S K A A A G R F G S G 129

828 TGG GCA TGG CTT GTC GTC AAC AAC GGC GAG CTG GAA ATT ACG AGC ACG CCA AAC CAA GAC 887
130 W A W L V V N N G E L E I T S T P N Q D 149

888 TCG CCG ATC ATG GAA GGC AAA ACG CCG ATC CTC GGT TTG GAC GTT TGG GAG CAT GCT TAC 947
150 S P I M E G K T P I L G L D V W E H A Y 169

948 TAC CTG AAA TAT CAA AAC CGT CGT CCG GAA TAC ATC GCG GCG TTC TGG AAC GTC GTC AAC 1007
170 Y L K Y Q N R R P E Y I A A F W N V V V 189

008 TGG GAC GAA GTA GCA AAA CGA TAC AGC GAA GCG AAA GCA AAA TAA GTAGATCCACGATGAAAAA 1072
190 W D E V A K R Y S E A K A K * 203

073 GCGGGCGAATGAGTC CCCCGTTTTTTT CAT TAAC TAAAAGTGCATAGCAGCAGCGGAAATGGTCACTACTACGGATA 1152

1153 GATGAAAAGGGGAGTTTGCATGTCATTATTTGAAAAATTGACTGGCCAAGAACGGGTGGACCGTGATTTGCTGCTGCTT 1232

1233 CTTTTATCGGTGGGTTTTATTCGCTTGCTGTATCGCTGTCAA
CL2 1276

図5-5 *B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子 (*sodS*) の塩基配列。翻訳開始点のメチオニン残基は翻訳後に切断される。翻訳開始点の上流にはSD配列が存在していた。プライマーエクステンション法で用いたプライマーPsodSと結合する領域をボックスで示した。+1は転写開始点を示した。転写開始点上流にはプロモーター領域 (-35領域、-10領域) と考えられる配列が存在していた。終止コドン下流には転写終結に機能すると考えられるパリンドローム構造が存在し、矢印で示した。*sodS*クローニングに用いた3種類のプライマーCL1、CL2とCL3を示した。*sodS12*の変異部位はプロモーター-10領域に存在し、()で示した。

いなかった(図5-9)。さらに*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列とまったく同一の配列が*sodS*から決定されたアミノ酸配列(2番目から13番目)に存在していた。翻訳開始部位のメチオニンは翻訳後のプロセッシングにより切断されると考えられた。この現象は大腸菌由来Mn-SOD(60)やFe-SOD(61)でも認められている。

5.3.5. *sodS*のクローニング

PCR法によるクローニングを試みた。PCR法のプライマーとして、*sodS*の5'上流に2種類のプライマー(CL1とCL3)と3'下流に1種類のプライマー(CL2)を作製した(図5-5、図5-6)。これらのプライマーにはクローニングするための制限酵素切断部位が含まれている。プライマーとしてCL1とCL2およびCL3とCL2のPCR法の増幅断片をpUC19のマルチクローニング部位に導入した(宿主として*E. coli* IM303 (*sodA sodB*))。それぞれの*sodS*組換えプラスミドをpUSODS12およびpUSODS32と名付けた(図5-7)。それぞれのクローニング断片には*sodS*プロモーターが含まれているため、宿主でSOD活性が増大し、宿主がストレスを受けると考えられた。そこでpUC19の*lacZ*プロモーターの転写方向と逆向きに*sodS*プロモーターが働くようにPCR増幅断片を挿入した。

2種類の*sodS*組換えプラスミド(pUSODS12とpUSODS32)の挿入断片の塩基配列を決定した。pUSODS32の挿入断片の塩基配列は染色体DNAから直接解読した塩基配列とまったく同一であった。これに対して、pUSODS12の挿入断片の塩基配列では*sodS*プロモーターの-10領域に1塩基置換変異(377番目のTがCに置換)が生じていた(図5-5)。この変異遺伝子を*sodS12*と名付けた。

sodS 5' 上流領域にアニーリングするプライマー

CL1 : 5' ATCTGCAGATCGGTTCCGGCTTGCTG 3'
PstI

CL3 : 5' AAAGGGAATTCAACTGTGA 3'
EcoRI

sodS 3' 下流領域にアニーリングするプライマー

CL2 : 5' ATCAAGCTTTGACAGCGATACAGCAAG 3'
HindIII

図5-6 *sodS*のクローニングに用いたPCR用プライマー。

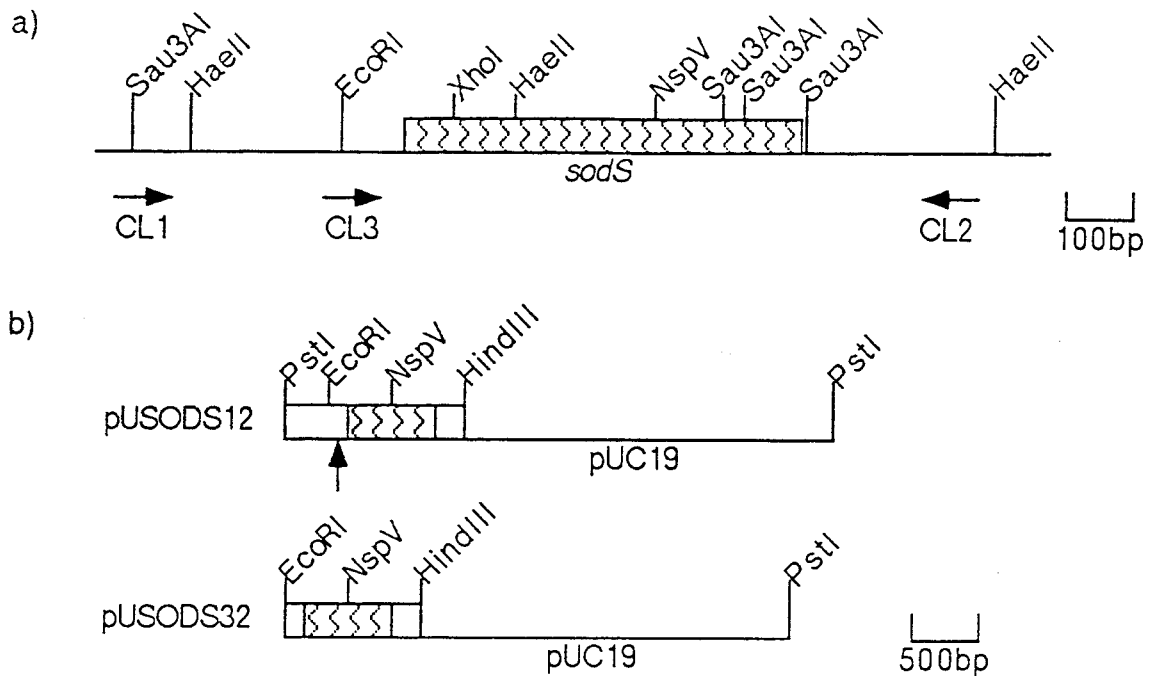


図5-7 染色体DNAの制限酵素地図とpUSODS12およびpUSODS32の制限酵素地図。a) 染色体DNAの制限酵素地図、b) pUSODS12とpUSODS32の制限酵素地図。組換えプラスミドの挿入断片を□で示した。矢印で*sodS12*の変異部位を示した。

5.3.6. *sodS*遺伝子増幅効果による*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODの大量発現

*sodS*が*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODの構造遺伝子であることを確かめるために、宿主として*E. coli* IM303 (*sodA sodB*) を用いて*sodS*遺伝子増幅効果による*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODの大量発現を行った。pUSODS12およびpUSODS32を保持した *E. coli* IM303 を培養して粗酵素液を調製し、SOD活性測定（表5-5）およびnative-PAGE後のSOD活性染色（図5-2）を行った。2種類の組換えプラスミド保持株ともにSOD活性が検出された。また*sodS*プロモーターに変異が生じている*sodS12*組換えプラスミドpUSODS12保持株のSOD活性は*sodS*組換えプラスミドpUSODS32保持株のSOD活性の1/3であった。この原因はプロモーター変異による転写量の低下であると考えられた。Native-PAGE後のSOD活性染色の結果から、組換えプラスミドを保持した大腸菌で発現させたSodSと*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODとの移動度が同一であることが明らかとなり、さらにN末端アミノ酸配列の結果とも合わせて、*B. stearothermophilus* SIC1 由来Mn-SOD構造遺伝子が*sodS*であることが確認された。

B. subtilis MI113と*B. stearothermophilus* SIC1 を宿主として*sodS*増幅効果によるSOD活性の変化を確かめた。pUSODS12 (*sodS12*) およびpUSODS32 (*sodS*) の挿入断片を*Bacillus*属用プラスミドpTB522にサブクローニングし、*B. subtilis* MI113を形質転換した。pTSODS12 (*sodS12*) を保持した形質転換体は取得できたが、*sodS*組換えプラスミドを保持した形質転換体は取得されなかった。*sodS*が*sodS12*より転写量が多く、SOD活性が大量発現したために形質転換体にストレスが生じ、生育できなくなったと考えられた。さらに*B. stearothermophilus* SIC1をpTSODS12 (*sodS12*) で形質転換し、pTSODS12を保持した*B. stearothermophilus* SIC1を取得した。これら形質転換体でSOD活性を測定した（表5-5）。宿主として*B. subtilis* MI113を用いた場合で約9倍、宿主として*B. stearothermophilus* SIC1を用いた場合で約20倍のSOD活性の増加が認められた。

表5-5 遺伝子増幅効果による*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODの大量発現

宿主 : <i>E. coli</i> IM303			
	pUSODS12	pUSODS32	pUC19
SOD比活性 (U/mg)	4.85	15.6	ND

宿主 : *B. subtilis* MI113

	pTSODS12	pTB522
SOD比活性 (U/mg)	24.3	2.72

宿主 : *B. stearothermophilus* SIC1

	pTSODS12	pTB522
SOD比活性 (U/mg)	114	5.69

粗酵素液でSOD活性を測定した。NDは検出限界以下を示す。

第4節 考察

我々が取得した*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD精製タンパク質およびその構造遺伝子 (*sodS*) について大腸菌由来Mn-SODやFe-SODおよび*B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SODですでに報告されている情報と比較して考察した。*B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SODはすでにその構造遺伝子が取得され(108)、X線結晶構造解析の結果から立体構造も決定されている(39)。SIC1株由来Mn-SODは配位金属の種類やその配位金属数さらに阻害剤の効果など酵素の一般的な諸特性はATCC12980由来Mn-SODとほとんど同一であった。さらに塩基配列から決定されたアミノ酸配列もATCC12980由来Mn-SODと97.5%の相同性(203アミノ酸残基中5アミノ酸残基が置換されていた)を有し(図5-8)、大腸菌由来Mn-SOD(60)とは59.4%大腸菌由来Fe-SOD(61)とは53.1%の相同性を有していた。さらに金属配位部位である3個のヒスチジン残基と1個のアスパラギン酸残基はすべて保存されていた。

*sodS*の5'上流領域および3'下流領域の塩基配列とすでに報告されているATCC12980株由来Mn-SOD構造遺伝子の5'上流領域および3'下流領域の塩基配列(108)と比較した。*B. stearothermophilus* ATCC12980由来Mn-SODとアミノ酸配列上は非常に高い相同性を有していたが、塩基配列レベルではそれほど高い相同性は有していなかった。構造遺伝子内では90.1%であるのに対して、*sodS*上流領域では56.8%、*sodS*下流領域では63.3%であった(図5-9)。5'上流領域ではプロモーター領域やSD配列近傍で非常に高い相同性を有していたが、その他の領域で相同領域は存在しなかった。さらに*sodS*下流領域には転写終結に機能するパルンドローム構造を形成すると考えられた領域が存在していたが、ATCC12980由来Mn-SOD構造遺伝子下流領域にはこのような領域は見い出せなかった。我々は大腸菌を宿主としたコロニーハイブリダイゼーション法で*sodS*をクローニングすることができなかった。しかしながら同様の手法でATCC12980株由来Mn-SOD構造遺伝子が取得されている。この原因としてmRNAの安定性の違いによる発現量の違いが

```

          P1  10      20      30      40      50      60
SIC1      PFELPALPYAYDALEPHIDKETMTIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHADLQNKSLLELLSNL
          .....
ATCC12980  PFELPALPYPYDALEPHIDKTMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELLSNL
          10      20      * 30      40      50      60
          70      80      90      100     110     120
EALPESIRTAVRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGEPTGELAEAINKKKFGSFAAFKDEFSK
          .....
EALPESIRTAVRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGEPTGELADAINKKKFGSFAAFKDEFSK
          70      80*    90      100     110     120
          130     140     150     160     P2 170     180
AAAGRFGSGWAWLVVNGELEITSTPNQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYLKYQNRPEY
          .....
AAAGRFGSGWAWLVVNGELEITSTPNQDSPIMEGKTPILGLDVWEHAYYLYKYQNRPEY
          130     140     150     160     *  *170     180
          190     200
IAAFWVNVNWDEVAKRYSEAKAK
          .....
IAAFWVNVNWDEVAKRYSEAKAK
          190     200

```

図5-8 SIC1株由来Mn-SODとATCC12980株由来Mn-SODのアミノ酸配列の比較。*で示したアミノ酸残基は金属原子の配位部位である。下線で示したアミノ酸残基で基質を活性中心に導入していると考えられている。P1とP2はコロニーハイブリダイゼーション法でプローブとして用いたPCR増幅断片を取得するためのプライマー領域である。

生じたためであると考えられた。ORF領域の下流でmRNAが2次構造を形成することで安定性が増大し、発現量が増加することが報告されている(111,112)。sodSのmRNAは転写終結に機能すると考えられたパ lindローム構造を形成し、この構造を形成しないATCC12980株由来Mn-SOD構造遺伝子のmRNAより安定になり、宿主菌でMn-SODがより大量発現したと考えられた。その結果、宿主菌により大きなストレスが生じて、sodSがクローニングされなかったと考えられた。またsodS12はプロモーター領域に変異が生じ、その発現量が低下しているため、枯草菌でクローニング可能であったが、sodSの場合組換えプラスミドを保持した枯草菌形質転換体を取得することができなかった。これらの結果もこの仮説を支持すると考えられた。SOD大量発現によるストレスとは、SOD活性に起因するものであると考えられた。SODは活性酸素であるO₂⁻を別の活性酸素であるH₂O₂に変換する活性を触媒する酵素である。SOD大量発現はH₂O₂を大量に生じさせ、宿主にH₂O₂ストレスを与えると考えられた。このようなストレスはScottらによっても報告されている(62)。

我々は本章で好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子sodSのクローニングに成功した。今後、*B. stearothermophilus* SIC1の酸素耐性機構の解明にはsodS欠損株の取得や、酸素ストレスとSOD発現量との関係に関する研究などが必要であると考えられる。

a) 上流領域

```

SIC1      5' -AAAAAGTCGGAAGAACGGATAAAAGCGTCAGTAAAAACAAATAGCCAATTGTTTTTCCAA
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
ATCC12980 5' -TTGTAGCCGGGAAAGAGGAAGAATTCAAC--TTGAGACAAAGA-AAAAGCGGGCATCTTC

           TCCCTTGAATCGAAAACGAGCGATATCTTTTGGGAATACAGACTTTTCCATAATTGGA
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           CCGCTTTAGTCAGAAGGCAAATGAAAGTTTCAAGCAAGGCGGCCATTGCAACACCCGT

           CAAATACGTTTCATCATGGCCACACCTTTCCTTTTCTCCATTTTCCAT----TGTATATGT
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           TCATTTAGTGCATC--GGCTTCGGAACGAATGGCAGCCATATACTATAGCTTGTCTATT

           TGAGAAAAGGGAATTCAACTG-TG-AGTGCTTTCGGCCATCAGC--AGACAAGCAAATTC
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           GAAGAAACGGTCAACGGTGTGTTGAAAATATGTAACAAAAGCGAGGACAAGCAAGTCC

           -35          -10          +1
           ATTGAAACATTGTGGTAATTTTGGTAAGCTAATTTTACATGGACGGCACTACGTCCGCAT
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           ATTGAAACATTGTGCCAACTTTGGTAAGCTAATCTCAAGCGAACGCTTTGGCGTTCGTGT

           SD          Met
           -TACATAAC-AAAAGGAGGAGATTTGCATGCCATTTGAACTGCCGGCATTGCCGTATGCG-3'
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           ACATAAATCAAAAAGGAGGAGATCGGTATGCCATTTGAATTGCCAGCATTGCCGTATCCG-3'
    
```

b) 下流領域

```

SIC1      5' -CAAAACGATACAGCGAAGCGAAAGCAAATAAGTAGATCCACGATGAAAAAAGCGGGGCG
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
ATCC12980 5' -CGAAACGGTACAGCGAAGCGAAAGCAAATAA-----TGAACAAAGCGGGGCG

           AATGAGTCGCCCCGTTTTTTTCATTAACCTAAAAGTGCA--TAGCAGCAGCGGAAATGGT-3'
           : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           AAACAAAACCTCCGCTTTTTT--TTCGACGAAGGGGGCAGGCAAAGGGAGCGGTTTTTCGT-3'
    
```

図5-9 *sodS*の上流領域および下流領域の塩基配列とATCC12980株由来Mn-SOD構造遺伝子上流領域および下流領域の塩基配列の比較。* (TAA)は*sodS*の終始コドンである。

第5節 要約

B. stearothermophilus SIC1由来SODをSDS-PAGEで単一バンドまで精製した。分子量はSDS-PAGEの結果から約25kDa、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から約40kDaであり、単一サブユニットからなる2量体タンパク質であった。さらに、原子吸光を測定した結果、サブユニットあたりMn原子が1原子配位したMn-SODであることが明らかとなった。PCR法を用いて染色体から直接Mn-SOD構造遺伝子 (*sodS*) の塩基配列を解読し、その遺伝子領域をクローニングした。大腸菌、枯草菌および*B. stearothermophilus* SIC1を宿主として、遺伝子増幅効果によるMn-SODの大量発現を試みた。その結果から、本遺伝子が*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODであることを確認した。*sodS*遺伝子増幅効果により宿主菌にストレスが生じることも同時に認められた。

第6章 好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1由来SOD様タンパク質構造遺伝子 (*znbT*) のクローニングとZnbTタンパク質の精製

第1節 緒言

SOD活性を有するタンパク質として、配位している金属の違いから3種類に分類されている。原核生物や真核生物のミトコンドリアなどに存在するMn-SOD、原核生物に存在するFe-SOD、真核生物の細胞質内に存在するCu,Zn-SODである。Mn-SODとFe-SODのアミノ酸配列や立体構造が非常に類似していることから(61,113)、これらは同一の起源から進化したタンパク質であると考えられている。これに対して、Cu,Zn-SODはMn-SODやFe-SODとアミノ酸レベルで相同性がなく、立体構造上も類似点がない。このことから、Cu,Zn-SODはMn-SODやFe-SODと違う起源を持ち、SOD活性の必要性から進化の過程で同様の活性を有するタンパク質へと変化したものであると考えられている。最近になって始原菌*Halobacterium*属のSODが精製され(99,114)、その構造遺伝子もクローニングされている(115-117)。*Halobacterium cutirubrum*には1種類のMn-SODが存在していた。しかしながら、この構造遺伝子をクローニングする際に2種類の遺伝子が取得された。一方はSOD構造遺伝子 (*sod*) であったが、もう一方*slg*は*sod*とアミノ酸配列レベルおよび塩基配列レベルで非常に高い相同性(それぞれ約83%、約87%)を有していたが、SOD活性を有するタンパク質は発現されず、mRNAの存在のみが確認された。*sod*と*slg*は進化の過程で分離し、*sod*はSOD構造遺伝子として進化したと考えられた。*slg*の生産物にSODとは違う活性があるのか、またはSODへの進化が途中で中断した疑似遺伝子であるのか現在不明である(117-119)。これらの遺伝子レベルの解析は生物の進化を探る上で非常に興味もたれる。

我々は、第5章で述べた*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子*sodS*をクローニングする際に、Mn-SODとアミノ酸レベルで非常に相同性の高い構造遺伝子 (*znbT*) をコロニーハイブリダイゼーション法でクローニングすることができた。この遺伝子の塩基配列を決定し、*sodS*と比較した。またZnbTを大腸菌で大量発現させ、ZnbTを精製し、その諸特性を調べた。

第2節 実験材料と方法

使用菌株およびプラスミド

使用した菌株とプラスミドを表6-1に示した。

E. coli JM109および*B. subtilis* MI113を組換えプラスミド構築の宿主菌として用いた。*E. coli* IM303、*B. subtilis* MI113、*B. stearothermophilus* SIC1を*znbT*組換えプラスミドの宿主菌として用い、遺伝子増幅効果によりZnbTの大量発現を試みた。*B. stearothermophilus* SIC1を染色体DNA供与菌株として用いた。

表6-1 使用菌株およびプラスミド

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, Δ(lac-proAB) /F'[traD36, proAB⁺, lac^r, lacZΔM15]</i>	(45)
IM303	<i>endA1, hsdR17, supE44, thi, sodA, sodB</i>	第2章
<i>Bacillus subtilis</i>		
MI113	<i>arg-15, trpC2, hsrM, hemM</i>	(97)
<i>Bacillus stearothermophilus</i>		
SIC1		(84)
Plasmids/phages	Characteristics	References
大腸菌プラスミドおよびファージ		
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	(46)
pBZNB38	Tc ^r , <i>znbT</i>	本章
pUC19	Ap ^r	(72)
pUZNB11	Ap ^r , <i>znbT</i>	本章
phage M13mp18		(67)
phage M13mp19		(67)
<i>Bacillus</i> 属プラスミド		
pTB522	Tc ^r	(98)
pTZNB22	Tc ^r , <i>znbT</i>	本章

培地と培養条件

すべての菌株の培地としてL培地を用いた。ZnbTを大量発現させる時および*B. stearothermophilus* SIC1 培養菌体からのRNAの調製時には0.1 mM MnSO₄

と0.1 mM FeSO₄を添加した。*lacZ*プロモーターを用いたZnbtの大量発現では、対数増殖期中期 (OD₆₆₀が約0.3) の培養液に終濃度 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、その後3時間培養した。

サザンハイブリダイゼーション法

1. DNAの固定化

DNAを適当な制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動した。アガロースゲルを変性溶液 (第1章第2節実験材料と方法に示した) 中に30分間浸し、さらに中和溶液中に30分間浸した。その後、ニュートランスファー・プロテイング装置 (バイオラッド社製) を用いて、アガロースゲルからHybondTM-N⁺ナイロントランスファー膜 (アマシャム社製) にDNAをトランスファーし、ナイロントランスファー膜上にDNAを固定化した。DNAの固定化方法についてはナイロントランスファー膜に付随していたプロトコールに従い、アルカリ固定法で行った。

2. ハイブリダイゼーション法

ノンラジオシステムDNA標識および検出キット (ベーリンガー・マンハイム山之内社製) を用い、そのプロトコールに従った。このキットの原理は、ジゴキシゲニン標識されたデオキシウリジン3リン酸をランダムプライム標識システム(120)でプローブDNAに導入する。目的のDNAに結合したプローブDNAをアルカリ性ホスファターゼ標識された抗ジゴキシゲニンと結合させ、酵素免疫測定法 (ELISA法) により検出する。アルカリ性ホスファターゼの基質として5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphateとnitroblue tetrazolium塩を用いた。

コロニーハイブリダイゼーション法

DNAの固定化までの方法は第1章第2節実験材料と方法で示した方法を一部改良して行った。ニトロセルロース膜の代わりにHybondTM-N⁺ナイロントランスファー膜 (アマシャム社製) を使用し、アルカリ固定法でDNAを固定化した。その後の方法は前述したハイブリダイゼーション法に従った。

培養菌体からの全RNAの調製

RNA Extraction kit (ファルマシア社製) を用い、そのプロトコールに従った。セシウムトリフルオロアセテイト平衡密度勾配超遠心により精製した。セシウムトリフルオロアセテイトはRNase阻害剤としての効果が知られている(121)。

プライマー伸長法

McKnightとKingsburyの方法(122)に従い、一部改良して行った。50 μg RNAと³²Pで5'末端ラベルされた合成オリゴヌクレオチドプライマー (0.2 pmol)

を混合し、液量を12 μ lにした後、70°Cで10分間保温し、室温に放置する。10 mM dNTP 1 μ l、0.1 M ジチオスレイトール (DTT) 2 μ l、濃縮反応緩衝液 (0.25 M Tris-HCl (pH 8.3)、0.375 mM KCl、15 mM MgCl₂) 4 μ lをそれぞれ添加し、37 °Cで2分間保温した後、逆転写酵素であるSuperScript RNase H⁻ reverse transcriptase (GIBCO BRL社製) 200 Uを添加し、37 °Cで1時間反応させた。反応後、5 ng DNase free RNase Aを添加して37 °Cで30分間反応させ、鋳型RNAを分解させた。その後フェノール/クロロホルム処理し、合成されたDNAをエタノール沈殿させた。この沈殿物を4 μ lのTE緩衝液に懸濁し、さらに6 μ lホルムアミド染色溶液 (97.5 % 脱イオン化ホルムアミド、10 mM EDTA(pH 7.5)、0.3 % プロモフェノールブルー、0.3 % キシレンシアノールFF) を添加した。この試料の3 μ lを使用して、DNAの塩基配列決定と同様のポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。転写開始点を決定するために、同じプライマーを用いた*sodS*または*znbT*の塩基配列ラダーを同時に泳動した。

*znbT*のmRNAに特異的に結合するプライマーP*znbT* (5'-TGTCATGTCTGCATTGTGCCGCGCCATTCTTCGTC-3', 図5-5)と、*sodS*のmRNAに特異的に結合するプライマーP*sodS* (5'-TCGAGCGCATCGTACGCATACG GCAATGCCGGC-3', 図6-3)を用いた。

大腸菌で大量発現させたZnbTの精製

pUZNB11を保持した*E. coli* IM303を1.3 l L培地にて37 °Cで培養した。対数増殖期中期に終濃度1 mM IPTGを添加し、ZnbTを大量発現させた。ZnbTには微弱なSOD活性が存在するため、SOD活性を指標として精製した。培養後の菌体から粗酵素液を調製した。粗酵素液の調製方法は第1章、第2節実験材料と方法で述べた。粗酵素液について20から80 %飽和の硫酸分画を行い、50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で透析した。この試料を50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で平衡化したDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィ (ファルマシア社製) に加え、0から0.5 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。SOD活性画分を20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で透析し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で平衡化したFPLC Mono Qイオン交換クロマトグラフィ (ファルマシア社製) に加え、0から0.3 M NaCl直線的濃度勾配で溶出させた。活性画分を回収後、0.15 M NaClを含む50 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で透析した。その後、FPLC Superdex 200ゲルろ過クロマトグラフィ (ファルマシア社製) を行い活性画分を回収し、精製試料とした。さらに、同じゲルろ過クロマトグラフィを用いて分子量決定も行った。分子量マーカーとしてゲルろ過スタンダード (バイオラッド社製) を用いた。N末端アミノ酸配列決定用試料としてゲルろ過クロマトグラフィ後の試料をHPLC octadecyl 4PW逆相クロマトグラフィ (TOSO社製) で精製した試料を用いた。この場合0から80 %アセトニトリル直線濃度勾配で溶出

させた。

その他の方法

その他の方法については前章までに記載した。

試薬

前章までに記載した試薬および本文中で購入先を記載した試薬以外はすべて和光純薬（株）より購入した。

第3節 結果

6.3.1. SOD様タンパク質構造遺伝子のクローニング

我々はすでに前章でMn-SOD構造遺伝子 (*sodS*) をクローニングしたことを示した。しかしながら、別のプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法により *sodS* とは異なるSOD様遺伝子 (*znbT*) を取得することができた。このとき用いた方法を以下に示した。まず、Mn-SODアミノ酸相同配列 (Mn-SODの金属配位部位を含んでいる) から予想された2種類のオリゴヌクレオチドをプライマー (P1' と P2', 図6-1) として、SIC1株の染色体DNAを鋳型に用いたPCR法で、SOD様構造遺伝子の一部を増幅させた。この結果、約450bp DNA断片の増幅が認められた。このPCR増幅断片をプローブとして用いて、染色体DNAを鋳型として用いたサザンハイブリダイゼーション法を行った結果、約3.8kbの *Pst*I染色体DNA断片がプローブとハイブリダイズすることが確認された。そこで宿主として *E. coli* JM109を、ベクターとしてpBR322を用いて、約3.8kbの *Pst*I断片をクローニングした。この組換えプラスミドをpBZNT38と名付けた (図6-2)。

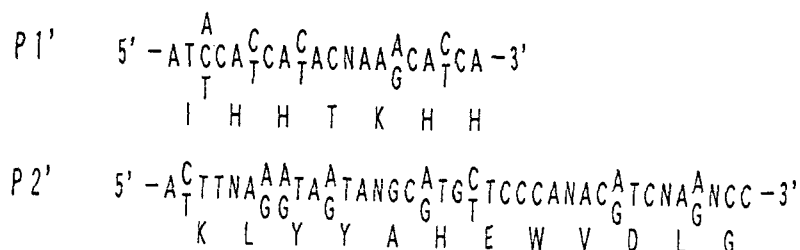


図6-1 PCR法で用いた2種類のプライマー。プライマーの塩基配列の下段に対応するアミノ酸配列を示した。

6.3.2. SOD様タンパク質構造遺伝子 (*znbT*) 塩基配列の決定

SOD様遺伝子 (*znbT*) 領域の限定を行った結果、約2.2kb *Pst*I-*Hind*III断片にまで限定された。そこでこの領域の塩基配列を決定した (図6-2、図6-3)。決定された塩基配列から3種類のORF (*znbT*、ORF1、ORF2) が存在し、*znbT*から予想されたアミノ酸配列は現在までに報告されているMn-SODアミノ酸配列と非常に相溶性が高かった (表6-5、図6-8)。特に、*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODとは約49%の相同性を示した。ORF1およびORF2の予想されたアミノ酸配列と相同性を示すタンパク質は現在までに報告されていなかった。ORF1およびORF2の機能については不明であった。

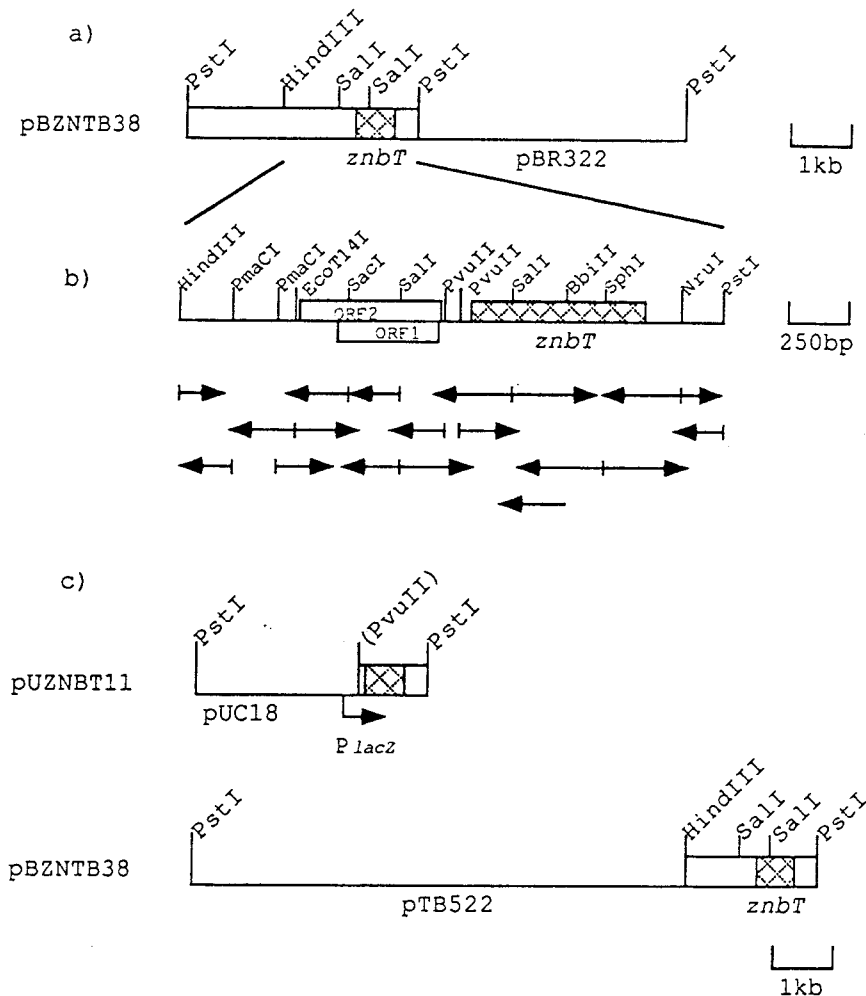


図6-2 a) pBZNTB38の制限酵素地図。□は染色体由来の挿入断片、▨は *znbT*領域である。b) *znbT*を含む領域の塩基配列決定の戦略。pBZNTB38の挿入断片の一部 (*Hind*III-*Pst*I断片)の詳細な制限酵素地図を示した。塩基配列決定領域を矢印で示した。□は*znbT*以外の2種類のORFである。*znbT*とORF2とは同じDNA鎖上に、ORF1は逆鎖上に存在していた。c) *znbT*組換えプラスミドの制限酵素地図。*P_{lacZ}*は*lacZ*プロモーターを示し、矢印で転写方向を示した。

1 AAGCTTTGGAAAACAGCCATTTCCTCAACTCGATTTGAGGAAGGAAGCGATAAAACCTTGTAAGGTTGGTCTGCAAGCA 73
 HindIII
 79 GCTGGCCATTTTCATTGCTTTTCACTAAATGTGGCTTCCCGTTTTTTTCGTAACGTGCGATTTTGGACTTCAGCTGCT 153
 159 TTTCAAGATGGTCGAGCCGATTATGAATGGCTCGGGGGGTGGCGAGCCCAAGCAGCCAAAGCAAGTCGGGGGGATC 233
 239 GGATGGACACGTGGCGGTTTCCACTTGGCGCATTTACGCGAACGCTTCAACAATGAACCGGCAATGGCCGTAAGAATGT 313
 319 TGCATTCAAAAAGCGGAGTTCAACAAGCGCTTTTGTCTCAAGTGGTCCAACCGTTCTGTTTTTGCAGAAATGCTCCCGTGA 393
 399 AGGAATGCGCGGATTTTACACGTGTTGGGCGCCTCGCTCCTATATGTATGTGGCGCTGGGAATTTAGGTGAATGCGGACA 473
 479 AGAACGATTTTCTAGGCTGGCATACGATATGGCGAAAAAGCGCAGGAGGAGGTTTTTACCAATGGACGACCAACGT 553
 559 TGTTGCCAGTATCGCGCTGAAGTGAACGAATGGGAGAACAGTCAAGCAGGTGCTGGAAGTGGCGGGGCAAGCATT 633
 639 GATGGCGCTTCTACACTGTTGCAGTTTATCGCCGAACATGACGGGGAGTGGACGGAAGAGGCAGTCCGTGAGCTCACGG 713
 719 CCTTGTGATGACGTGTACGCTGCTGGCTTCGCTCACTATGCCATCGAAGCGGCTGAGTGGGGAAACAAGTAGAACCG 793
 799 CTCTATCCATCGCGGAGCAGCGGAGGATATCGGGCTTTCTCTTTATTGGCGGCATTGAAGAACACGGCGACGAGTGG 873
 879 ACGGAGGAAGAAATTCATGAACTGCAACTCCTTGTGCGACGACGTGACGCTCGAGCCATCCGCCTTGTGCAACCGTTATC 953
 959 CGACGGGCAGGAGGAAGACTTGACCGGGCAGGAAGAAGTCTCGGCTTTGCCTGAACAGGAGGGCGGCAACAGAGAGCAAA 1033
 1039 TGACCGAGGGAAGTGAACGGTCAGGTGAACACAAGGGGATAGCGAACAAGAGCCGGTCTTGCAGCTGAACGGCGGAGC 1113
 1119 CGTTCATAGCCTCATCAACGGATCTCCTGATGGCGAACAGCTGCATGAGGGAGATACG ATG GAC GAA GAA TGG 1192
 1 -35 -10 +1 PvuII SD M D E E W 5
Pznt binding site
 1193 CGG CAC AAT GCA GAC ATG ACA GAT AAG GAG CGG CTG ACG GAG GAA GGT GTG ACC GAT GGT 1252
 6 R H N A D M T D K E R L T E E G V T D G 25
 1253 GAG CGG CAA CGG GCG GTT TCG CCT GGC AAG CAT GTG CTG CCG CCG CTG CCG TAC AGC TAT 1312
 26 E R Q R A V S P G K H V L P P L P Y S Y 45
 1313 GAC GCG CTT GAG CCC CAT ATT TCC GAA GAA ATT ATG CGT CTC CAT CAT ACG AAG CAT CAT 1372
 46 D A L E P H I S E E I M R L H H T K H H 65
 1373 CAA AGC TAT GTC GAC GGT CTG AAC AAG GCG GAG CGC ATG ATG GCA GAG GCG CGC CGT ACG 1432
 66 Q S Y V D G L N K A E R M M A E A R R T 85
 1433 AAC AAT TTT GAA CTG CTG AAA CAT TGG GAG CGA GAG GCG GCG TTC AAC GGT TCA GGC CAC 1492
 86 N N F E L L K H W E R E A A F N G S G H 105
 1493 TAT TTG CAT ACA ATT TTT TGG CAT AAC ATG CAT CCG CAA GCG GGC GGC GAG CCG CGC GGG 1552
 106 Y L H T I F W H N M H P Q G G G E P R G 125

 1553 GAG CTG CGG GCG CAA ATT GAA CGC GAC TTC GGC AGC TTT GCT GCA TTC CGA CGC CAC TTT 1612
 126 E L R A Q I E R D F G S F A A F R R H F 145
 1613 ACC GAA GCG GCG AAA AGC GTC GAA GGG GTT GGC TGG GCG TTG CTC GTT TGG GTG CCG CGG 1672
 146 T E A A K S V E G V G W A L L V W V P R 165
 1673 GCT CAT CGG CTT GAA ATT TTG CAG ACG GAA AAG CAC CAG CTC ATG ACG CAA TGG GAT ACG 1732
 166 A H R L E I L Q T E K H Q L M T Q W D T 185
 1733 ATT CCA CTT CTT GTG CTT GAT GTG TGG GAG CAT GCG TAC TAC TTG CAA TAT AAA AAC GAT 1792
 186 I P L L V L D V W E H A Y Y L Q Y K N D 205
 1793 CGG GGA GCG TAT ATC GAA CAT TGG TGG AAC GTC GTC AAC TGG CCG AAC GTC GAA GCG CGC 1852
 206 R G A Y I E H W W N V V N W R N V E A R 225

```

1853 TTC GCC GAG GCA CGA AAG CTG CGT TGG CAA CCA TTT TAA ACAGGCAGGGGTCTCCCGCCTGTTTT 1919
226 F A E A R K L R W Q P F *
1920 TTTGAGCGGGCAAAAAGCCGCTCCCTTGCCCTAGAGAGGTTTCGCTGAAAACATGATGCAATTGATAGGGGTGCCTATGCT 1999
2000 AGCTTCTGTAGCCATATTTTTTCATCATATTTGTCCGATCGGCGCATACACTTGTACAAAAGCATGGCCTCCATGTCCAGCC 2079
2080 TGTTCCTGTCGGATGTTCCCTCTGTTGCGCTCATTTCAGCCTAATTGGAAAAGGAGGAACAGGGGATTCCCTCCCTGCTTA 2159
2160 CGGAAGGAGGGGGATCCTCGCGATATCGGATGAAGAGGTGGAAGCGACTCGTTTGGCTCATTGCGCTCACTGCAG 2235
PstI

```

図6-3 *znbT*領域の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。下線で示したアミノ酸配列が精製ZnbTのN末端アミノ酸配列である。終止コドンを*で示した。逆方向反復配列を矢印で示し、この領域が転写終結に機能していると考えられた。プライマーP*znbT*と結合する領域をボックスで示した。+1はプライマーエクステンション法で決定した転写開始点を示した。-35および-10で示した領域は転写開始点から予想されたプロモーター領域である。

*znbT*の上流領域に16SリボゾームRNA結合部位であるSD配列(109)が存在していた。終止コドンを含む下流領域に逆方向反復配列とそれに続くポリT配列が存在し、 ρ 非依存性転写終結領域として機能していると考えられた。これらのことから*znbT*が翻訳され、タンパク質が合成されていると考えられた。しかしながら、我々が精製した*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODのN末端アミノ酸配列は*znbT*の塩基配列から予想されるアミノ酸配列中に存在しなかった。このことから、*B. stearothermophilus* SIC1でZnbTがSODとして機能していないと考えられた。この段階ではZnbTの機能は不明であり、偽遺伝子の可能性も考えられた。

6.3.3. プライマー伸長法を用いた転写産物の確認

SOD活性を有するタンパク質を合成しないSOD様遺伝子が好塩性始原菌*Halobacterium*属でクローニングされている(117)。この遺伝子は*slg*と名付けられている。*slg*から合成されるタンパク質の機能については不明であるが、転写産物であるmRNAは確認されている(117)。そこで*B. stearothermophilus* SIC1株から全RNAを調製し、*znbT*および*sodS* (Mn-SOD構造遺伝子)の転写産物であるmRNAの確認と転写開始点の同定をプライマーエクステンション法で行った。プライマーは第2節実験材料と方法で記したものをを用いた。さらに、RNA試料を、2時間(対数増殖期中期)、4時間(対数増殖期後期)、6時間(定常期初期)、9時間(定常期)培養した菌体から調製した。図6-4にその結果を示した。*znbT*の発

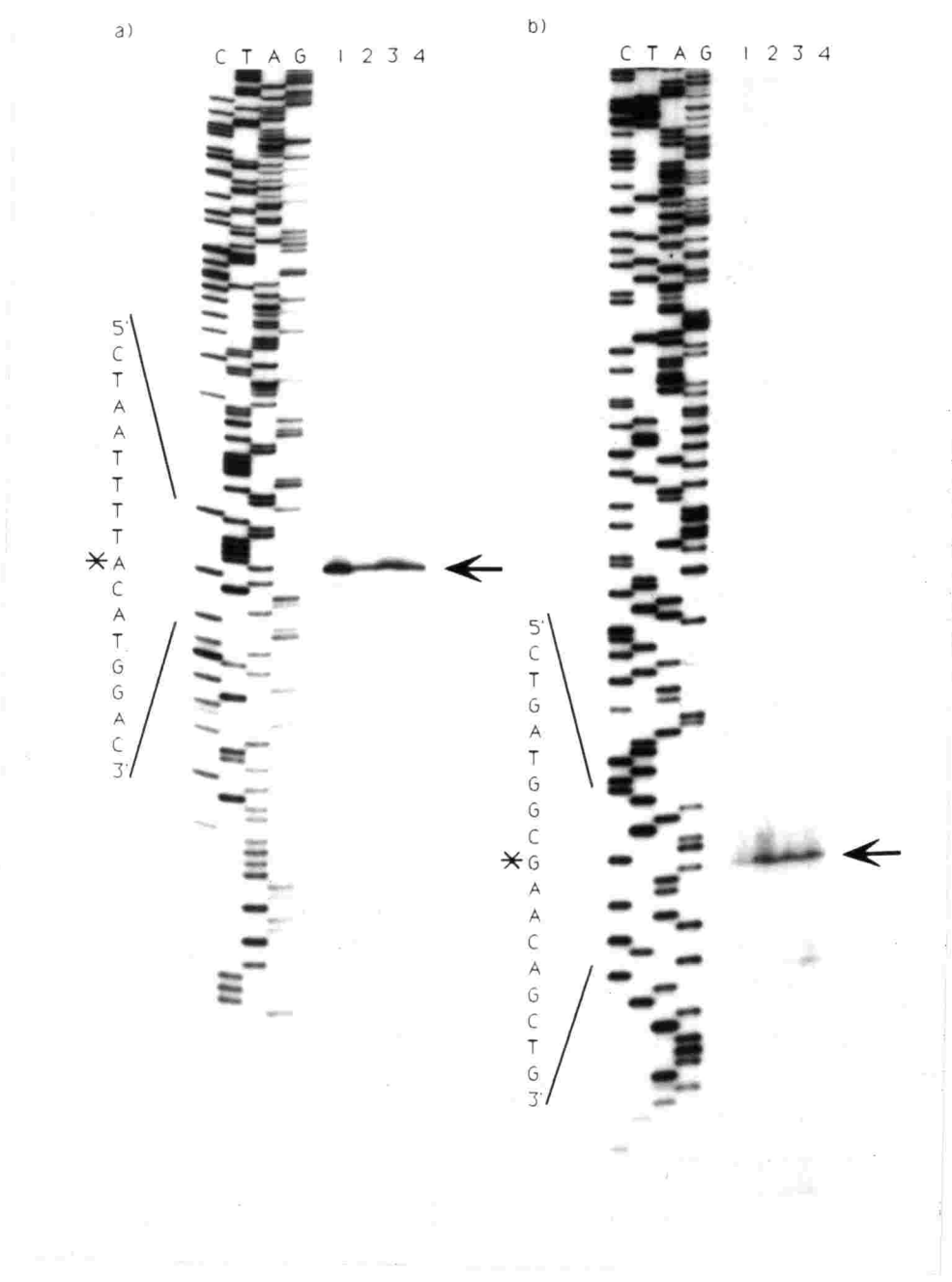


図6-4 プライマー伸長法による*sodS*および*znbT*の転写産物の確認と転写開始点の同定。各時間の培養菌体から調製した50 μ g RNAと0.2pmol プライマーを用いた。Lane 1, 2時間培養の菌体; lane 2, 4時間培養の菌体; lane 3, 6時間培養の菌体; lane 4, 9時間培養の菌体から調製した。矢印は転写開始点のバンドを、*は転写開始点の塩基を示した。a)ではプライマーP*sodS*を、b)ではプライマーP*znbT*を用いた。

現は転写レベルで確認され、対数増殖期後期から定常期にかけて高発現していた。これに対して*sodS*は対数増殖期中期に高発現していた。それぞれの転写開始点を決定することができ、その上流に存在するプロモーター領域も予想することができた（図5-5、図6-3）。*sodS*プロモーター配列は*B. subtilis*の対数増殖期中で発現している σ^A 因子によって認識されるプロモーターコンセンサス配列(110)と相同性を有し、 σ^A 因子によって転写されていると考えられた。この推測は*sodS*が対数増殖期中期に高発現していた結果からも示唆された。*znbT*プロモーター配列も σ^A 因子によって認識されるプロモーター配列と相同性が高かったが、*znbT*の発現は対数増殖期後期であった。この原因については不明である。何らかの制御因子が関与しているのかもしれない。

6.3.4. ZnbTの精製

ZnbTがMn-SODと高い相同性を有していることから、微弱なSOD活性を有していると考えられた。まず、枯草菌用ベクターpTB522の*PstI*-*HindIII*部位に*znbT*の*PstI*-*HindIII*断片をサブクローニングした組換えプラスミドpTZNB22を構築した（図6-1, c）。*E. coli* IM303 (pBZNB38)、*B. subtilis* MI13 (pTZNB22)、*B. stearothermophilus* SIC1 (pTZNB22) を培養し、遺伝子増幅効果によるZnbTの大量発現を試みた。さらに、挿入断片を小型化して同様の実験を行った。しかしながらZnbTに由来するSOD活性を検出することができなかった。そこで、*znbT*の*PvuII*-*PstI*断片をpUC18の*HincII*-*PstI*部位にサブクローニングし（pUZNB11、図6-1, c）、*lacZ*プロモーターによるZnbTの大量発現を試みた。pUZNB11を保持した*E. coli* IM303を培養して粗酵素液を調製し、SOD活性を測定した。その結果ZnbTに由来する微弱なSOD活性が検出された（表6-2）。

表6-2 ZnbTの大量発現

	pUZNB11	pUC18
SOD活性 (U/mg)	3.40	ND

宿主菌として*E. coli* IM303を用いた。培養条件は第2節実験材料と方法で示した。1 mM IPTGを添加し、大量発現を試みた。NDは検出限界以下であったことを示す。

この粗酵素液を用いてZnbTの精製を試みた（表6-3、図6-5、6）。精製方法は第2節実験材料と方法で示した。DEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィーで活性画分が4種類に分離された（図6-5）。この4種類の活性画分（A~D）にそれぞれnative-PAGE上で明らかに移動度の違うSODタンパク質が含まれ、SOD活性を有するタンパク質として4種類以上存在していた（図6-7）。これらすべてのSODタンパク質が*znbT*から発現したものであると考えられ

た。そこでこれら活性画分について別々に精製を進めた。FPLC Mono Q および Superdex 200ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製で、A、B、C画分が単一タンパク質ピークとなった。D画分ではタンパク質ピークが重なっており、精製は不十分であった。この段階でSDS-PAGEによるタンパク質の純度確認を行った（図6-6）。A、B、C画分すべてに約31 kDaと約29 kDaのタンパク質が含まれていた。D画分には約31 kDaタンパク質とそれよりも分子量の大きなタンパク質が数種類存在していた。ZnbTの予想される分子量は塩基配列の結果から28207 Daであることから、約31 kDaと約29 kDaのどちらかあるいは両方のタンパク質がZnbTであると考えられた。HPLC Octadecyl 4PW 逆相クロマトグラフィーを行い、A画分およびD画分から約29 kDaタンパク質および約31 kDaタンパク質を精製した。この精製試料を用いて、N末端アミノ酸配列を決定した。約31 kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列はMDEEWRHNADで、約29 kDaタンパク質のN末端アミノ酸配列はT??ERLTEEGであった。これらのアミノ酸配列はZnbTの予想されたアミノ酸配列に存在し、それぞれ1番目から10番目のアミノ酸残基と12番目のアミノ酸残基から21番目のアミノ酸残基と一致した。このことから約29 kDaおよび約31 kDaのタンパク質ともにZnbTであり、約31 kDaのタンパク質がプロセッシングあるいはプロテアーゼによる分解によって約29 kDaタンパク質になったと考えられた。ZnbTのSOD比活性はB画分で145 U/mgであった。他の画分についてはSOD活性は認められたが、非常に低い値であった。とくにAおよびD画分では活性値を算出することができなかった。FPLC Superdex HR200ゲルろ過クロマトグラフィーによりタンパク質の分子量を測定した結果、すべての画分で約80から90 kDaで、ZnbTは3量体あるいは4量体であると考えられた。さらにSOD活性画分が4種類に分離され、native-PAGEによるSOD活性バンドが4本以上存在した。またZnbT精製画分AからDで約31 kDaタンパク質と約29 kDaタンパク質とのタンパク質量比がすべて異なっていた。これらのことからZnbTは4量体タンパク質であると結論付けられた。

表6-3 ZnbTの精製

a) DEAE-Sepharose CL-6Bクロマトグラフィーまでの精製過程

精製段階	液量 (ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	SOD活性 (U/ml)	SOD比活性 (U/mg)	精製度 (倍)
粗酵素液	165	4.58	11.8	2.57	1
熱処理(60℃ 15分間)	160	3.42	14.9	4.36	1.68
硫安分画(20%~80%飽和)	31	11.0	169	15.4	5.99
DEAE-Sepharose CL-6B					
画分A	5	7.02	86.3	12.3	4.79
画分B	3	4.13	245	59.3	23.1
画分C	3	8.88	242	27.2	10.6
画分D	3	11.4	145	12.7	4.94

b) FPLC Superdex 200クロマトグラフィーによる精製

	タンパク質濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	SOD比活性 (U/mg)	分子量 (kDa)
画分A	86.4	算出不能	78
画分B	24.3	145	83
画分C	349	29.1	90
画分D	250	算出不能	91

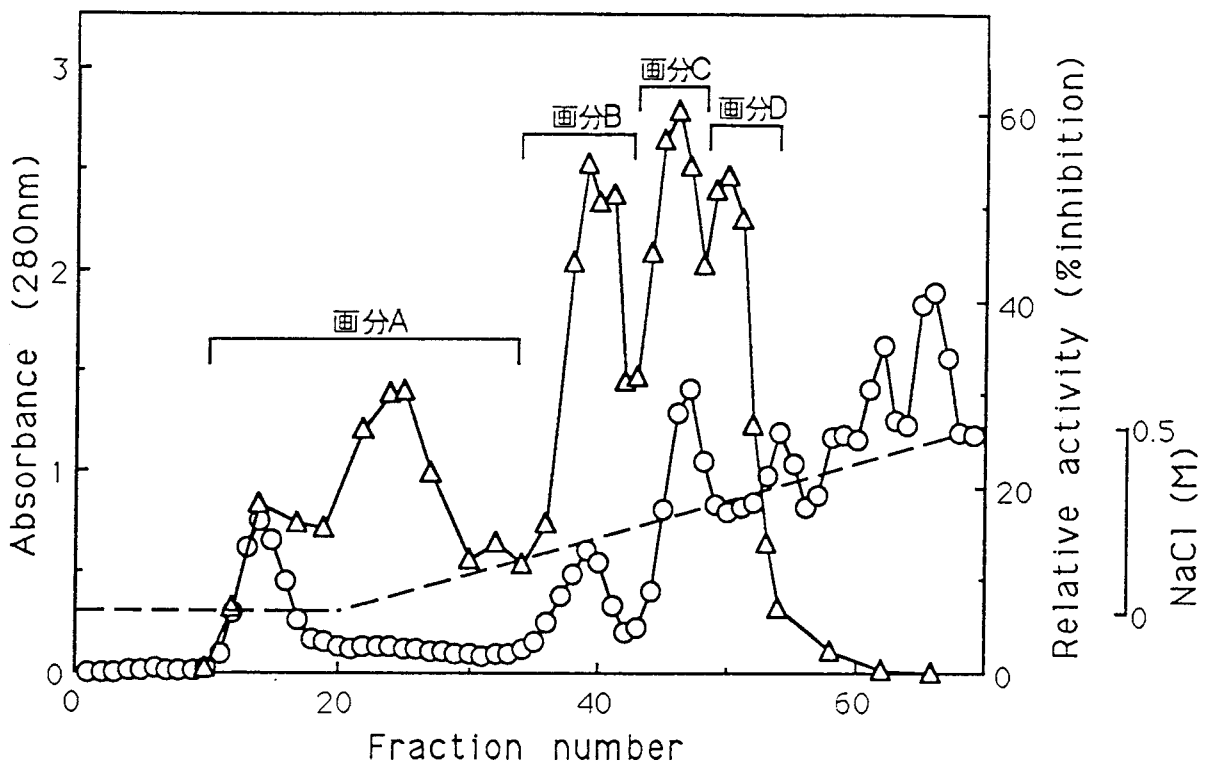


図6-5 DEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィー。SODをNaClの直線的濃度勾配で溶出した。NaClの直線的濃度勾配を点線で示した。A₂₈₀を○で示した。SOD活性をキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生したO₂⁻で還元されるシトクロムcが100 μl の試料で阻害される割合で相対的に表わした(△)。SOD活性画分をA~Dの4種類に分画し、以後の精製に用いた。

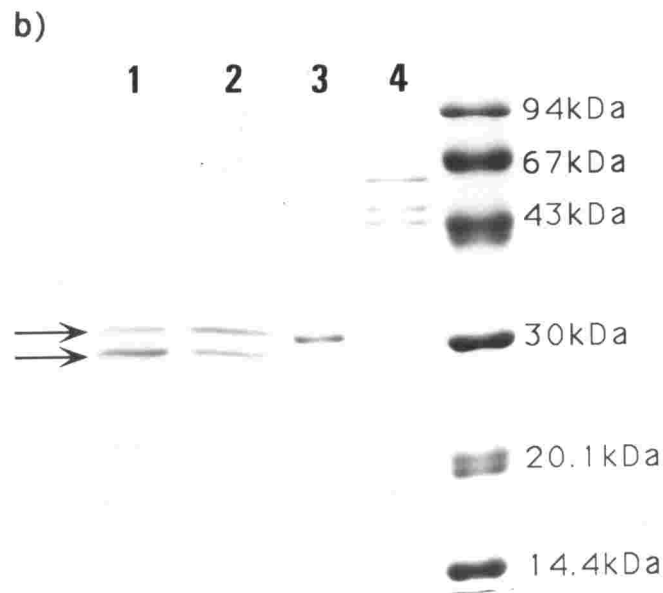
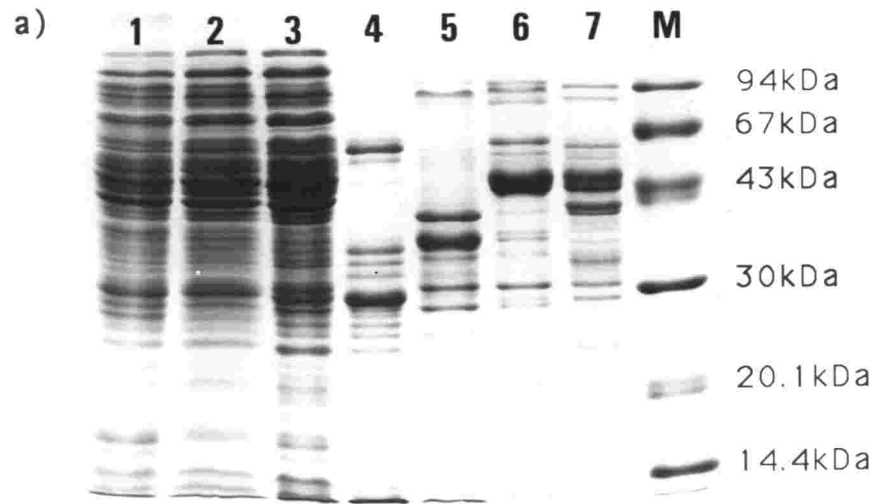


図6-6 精製ステップでのSDS-PAGEパターン。クマシーブリリアントブルーR250でタンパク質を染色した。Lane M は分子量マーカーである。a) Lane 1, 粗酵素液 (50 μg) ; lane 2, 熱処理後の試料 (50 μg) ; lane 3, 20から80%飽和の硫酸分画後の試料 (50 μg) ; lane 4~7はDEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィー後の試料である。Lane 4, 画分A (10 μg) ; lane 5, 画分B (10 μg) ; lane 6, 画分C (10 μg) ; lane 7, 画分D (10 μg) ; b) FPLC Superdex 200ゲルろ過クロマトグラフィー後の試料である。Lane 1, 画分A (1 μg) ; lane 2 画分B (1 μg) ; lane 3, 画分C (1 μg) ; lane 4, 画分D (1 μg) 。

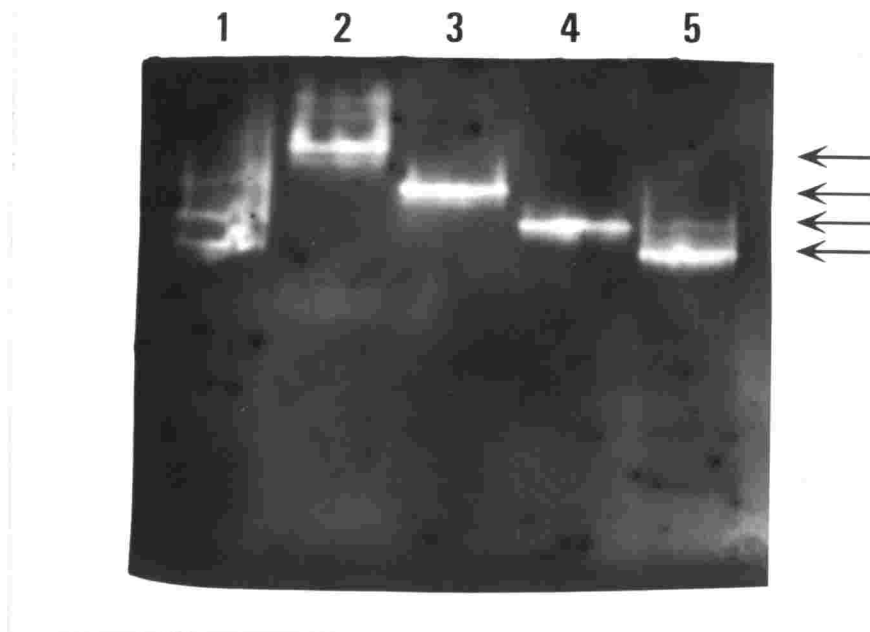


図6-7 DEAE-Sepharose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィー後の試料のSOD活性の検出。Native-PAGE後にニトロブルーテトラゾリウム法でSOD活性を検出した。主なSOD活性バンドを矢印で示した。Lane 1, 20から80%飽和の硫酸分画後の試料(5 U); lane 2, 画分A(3 U); lane 3, 画分B(3 U); lane 4, 画分C(3 U); lane 5, 画分D(3 U)。

6.3.5. ZnbTに結合した金属原子の同定

ZnbTにSOD活性が存在することから金属が結合していると考えられた。そこで、原子吸光分析装置を用いて、精製ZnbT(B画分)に含まれるMn、Fe、Cu、Zn濃度を定量した(表6-4)。Mn、Fe、Cuが単量体タンパク質あたり約0.5~1原子含まれていた。特にMnおよびFeの存在によりSOD活性を微弱ながら有していると考えられた。さらに興味深いことはZnを非常に多量(タンパク質あたり約20原子)に含んでいることであった。この結果からZnbTはZnとの結合特異性の高い金属結合タンパク質であると考えられた。

表6-4 単量体ZnbTあたりの配位金属原子数

	Mn	Fe	Cu	Zn
精製画分B	0.53	0.61	0.36	18.9

精製画分BとしてFPLC Superdex 200 クロマトグラフィー後の画分Bを用いた。単量体ZnbTの分子量を27,500とした(2種類のZnbT分子量の平均値である)。

第4節 考察

我々は*B. stearothermophilus* SIC1染色体DNAからMn-SODのアミノ酸配列と非常に相同性の高いアミノ酸配列をコードしている2種類の遺伝子 (*sodS*と*znbT*) をクローニングすることができた (表6-5)。*sodS*は本菌に唯一存在している2量体Mn-SODの構造遺伝子であった。これに対して、*ZnbT*は4量体タンパク質で、微弱なSOD活性しか有しておらず、代わりにZnと特異的に結合する金属結合タンパク質であると結論付けられた。

我々は*ZnbT*の精製を今回示した方法と同じ方法で数回試みた。これらの精製の過程でSOD活性が非常に低下した精製画分Bも取得した。また、他の精製画分でも非常にSOD活性が低下していた。そこで活性の低下していた精製画分Bを用いて、*ZnbT*に含まれている金属量を測定した結果、Cuの含量に変化はなかったが、Mn、Fe、Znの含量が1/6以下にまで低下していた。このことから*ZnbT*はMnあるいはFeが結合していたためにSOD活性を示し、これら金属が結合していない*ZnbT*はSOD活性を有しないと考えられた。

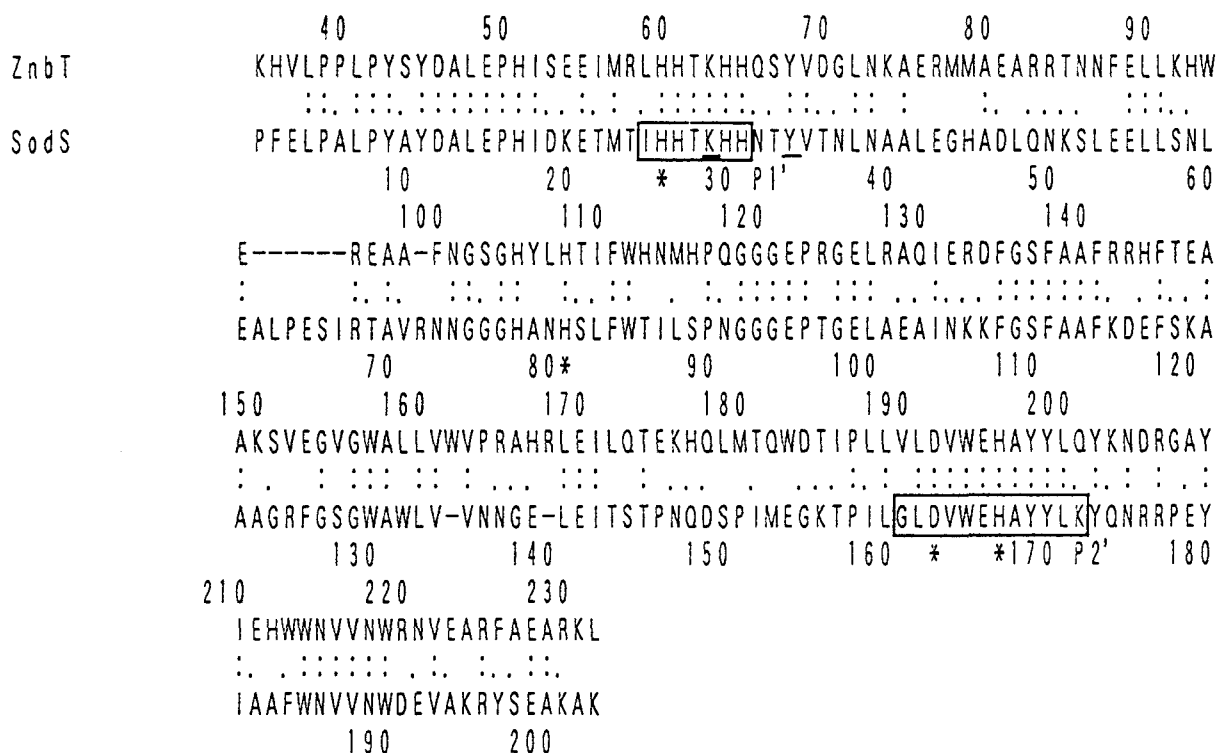


図6-8 *ZnbT*とSIC1株由来Mn-SODとのアミノ酸配列の比較。*で示したアミノ酸残基がMnの配位部位である。下線で示したリジン残基とチロシン残基が基質であるO₂を活性中心に導くアミノ酸残基である。P1'およびP2'領域から予想された塩基配列がPCR法で用いたプライマー配列である。

表 6-5 原核生物由来SODアミノ酸配列の比較

strains	<i>B. stearothermophilus</i> SIC1		<i>E. coli</i>		<i>T. thermophilus</i> HB8	<i>H. cutirubrum</i>
	ZnbT	Mn-SOD	Mn-SOD	Fe-SOD	Mn-SOD	Mn-SOD
<i>B. stearothermophilus</i> SIC1 Mn-SOD	49.0					
<i>E. coli</i> Mn-SOD	40.8	59.4				
<i>E. coli</i> Fe-SOD	40.8	53.1	42.2			
<i>T. thermophilus</i> HB8 Mn-SOD	40.2	62.2	53.7	42.7		
<i>H. cutirubrum</i> Mn-SOD	45.3	42.6	39.6	36.2	35.8	
<i>H. cutirubrum</i> Slg	45.1	43.7	37.5	36.0	36.7	32.9

%で表示した。

ZnbTとすでに知られている原核生物由来Mn-SODおよびFe-SODとのアミノ酸配列の比較を行った(表6-5、図6-8)。ZnbTはMn-SODおよびFe-SODともに約40%以上の相同性を有していた。さらに活性に重要な役割を果たす金属と配位する3カ所のヒスチジン残基と1カ所のアスパラギン酸残基はZnbTで保存されていた(図6-8)。またO₂⁻を活性中心に導くリジン残基やチロシン残基も保存されていた。これらが存在するためにSOD活性を有していたと考えられた。しかしながら原核生物由来SODとの違いは長いN末端部分が存在することであった。この約40アミノ酸残基からなるN末端部分が存在するためにSOD活性が微弱であったと考えられた。

SOD活性が確認されていないSOD様構造遺伝子(*slg*)が好塩性始原菌 *Halobacterium cutirubrum* で取得されている。*znbT*同様に*slg*の転写産物であるmRNAは確認され、タンパク質にまで翻訳されていると考えられている。*Halobacterium*属のMn-SOD構造遺伝子*sod*と*slg*とは塩基配列レベルで85%以上、アミノ酸配列レベルで80%以上の高い相同性を示していることから、*sod*と*slg*が進化の途中段階で分離したものであると考えられている(117-119)。しかしながら*Slg*に機能が存在していないとは考えられないことから、*Slg*もZnbT同様に金属結合タンパク質である可能性が高いと考えられる。そしてこのような金属結合タンパク質からSODに進化した可能性が考えられる。*B. stearothermophilus* SIC1由来のMn-SOD構造遺伝子(*sodS*)と*znbT*との相同性は塩基配列レベルで57.1%、アミノ酸配列レベルで49%で、これらの相同性は*Halobacterium*属の*sod*と*slg*との相同性に比べて低い。*Halobacterium*属のMn-SODのSOD比活性が約300 U/mgであり(99)、*B. stearothermophilus* SIC1由来のMn-SODのSOD比活性(約2700 U/mg)に比べて低く、*sodS*がより進化したために*sodS*と*znbT*との相同性が低下したと思われる。

金属、特にZnは生物にとって必須な物質である。しかし、培地中に金属が多量

に存在すると微生物に障害が起こることが知られている。現在までにZn結合タンパク質としてmetallothioneinが知られている(123-125)。このタンパク質はタンパク質あたり7原子のZnと結合することが知られている。またその結合にシステイン残基が関与していると考えられている。これに対して、ZnbTは4量体タンパク質あたり70原子以上のZnと結合することができ、高い金属結合能を有していた。しかし、ZnbTはmetallothioneinと相同性が低く、システイン残基も有していない。このほかにもZn結合タンパク質として転写制御因子やCRP (cystein-rich protein) が知られているが、これらのタンパク質とZnとの結合もシステイン残基およびヒスチジン残基やシステイン残基からなるLIM motifが関与していると考えられている(126,127)。これらシステイン残基が関与しているZnとの結合は配位結合である。最近になって、高濃度金属存在下でも生育可能な*Alcaligenes eutrophus* CH34からZn結合タンパク質が精製されている。このタンパク質の特徴は酸性アミノ酸残基含有量(約37%)が高いことである。この酸性アミノ酸残基がZnとの結合に関与していると予想されている。ZnbTも酸性アミノ酸残基が約15%(グルタミン酸25残基とアスパラギン酸10残基)存在していることから、この酸性アミノ酸残基がZnとの結合に関与しているのかもしれない。もし酸性アミノ酸残基がZnとの結合に関与しているならば、酸性アミノ酸残基とZnとの結合はイオン結合であり、配位結合に比べ多量の金属原子と結合することができると考えられる。しかし、イオン結合でZnとタンパク質とが結合している場合、ZnbTの金属特異性を説明することは難しく、別の結合様式が存在するのかもしれない。

大腸菌において高濃度Zn培地で培養した細胞からZn含有量の高いタンパク質が3種類存在することが報告されている(129)。これらの部分精製試料からそれぞれの分子量が測定されており、約80 kDa、約40 kDa、約10 kDaタンパク質であった。約80 kDaタンパク質がZnbT様タンパク質であると予想できた。今後、大腸菌におけるこれらタンパク質の構造遺伝子の取得およびアミノ酸配列の解析はZnbTの機能を解析する上で重要であると考えられる。

Mn-SODやFe-SODとCu, Zn-SODとのアミノ酸配列の違いからそれぞれの起源は別のタンパク質であり、それぞれが進化の過程でO₂⁻の不均化反応を触媒するようになったと考えられている。本研究で取得したZnbTがMn-SODやFe-SODと非常に高い相同性を有しているが、SOD活性は微弱であった。このことからZnbTがMn-SODやFe-SODの起源であり、Mn-SODやFe-SODがSOD活性を有する以前の活性は金属結合タンパク質である可能性が考えられた。しかし、現在のところZnbTは細胞内でZn濃度の調節因子として機能していると考えられるが、不明な点も多く、今後ZnbTの金属特異性や細胞内での役割について研究する必要があるだろう。さらにこのようなタンパク質が他の生物にも存在すると考えられることから、他生物由来のZnbT構造遺伝子やタンパク質の取得も必要であると思われる。

第5節 要約

B. stearothermophilus SIC1染色体DNAからSODとアミノ酸配列上非常に相同性の高い遺伝子*znbT*をクローニングした。*ZnbT*は*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SODとアミノ酸配列で約49%の相同性を示した。しかしながら、元株で*ZnbT*由来のSOD活性は検出できなかった。また*znbT*をpBR322およびpTB522にサブクローニングし、大腸菌や枯草菌および*B. stearothermophilus* SIC1を形質転換し、遺伝子増幅効果によってSOD活性を検出しようとしたが、*ZnbT*由来のSODは検出されなかった。そこで*znbT*をpUC18の*lacZ*プロモーターの下流に連結し、*E. coli* IM303 (*sodA sodB*) で*ZnbT*の大量発現を試みた結果、微弱なSOD活性を検出することができたので、*ZnbT*の精製を試みた。その結果、*ZnbT*は4量体タンパク質であった。さらに*ZnbT*は単量体タンパク質あたり18原子のZnと特異的に結合していた。*ZnbT*の微弱なSOD活性はMnあるいはFeが微量に結合していたためであると考えられた。*ZnbT*はMn-SODあるいはFe-SODの祖先にあたるタンパク質であると予想された。

総括と展望

好気性生物にとって酸素は生命を維持する上で、あるいは効率良くATPを生産する上で非常に重要な物質である。この反面、副産物として発生される活性酸素は細胞構成成分を酸化させ、活性酸素が多量に発生すると生命維持に支障をきたすことが知られている(1-6)。これがいわゆる酸素ストレスである。この酸素ストレスから細胞を守るために活性酸素除去酵素が存在している。活性酸素除去酵素にはSOD、カタラーゼやペルオキシダーゼが存在している。カタラーゼは古くから知られ、 H_2O_2 の不均化反応によって分子状酸素と水に変換する反応を触媒する酵素である。ペルオキシダーゼは1957年にMillsによって見いだされ、過酸化脂質を除去する働きが知られている。これに対してSODは1969年にMcCordとFridovichによって見いだされた(7)。SODは O_2^- の不均化反応を触媒し、除去する働きが知られている。また細胞内で初期に生産される活性酸素は O_2^- であると考えられていることから、SODが最も重要な活性酸素除去酵素であると考えられるようになった。さらに、SODにはMn型、Fe型およびCu,Zn型の3種類が知られ、これら3種類のSODのアミノ酸配列や立体構造の違いから、Mn型およびFe型とCu,Zn型との起源が異なっていると考えられている。このようなことからSODは進化を研究する上でも非常に興味もたれている。SOD以外の活性酸素除去酵素は比較的古くから知られていたため、その研究は多岐にわたり活発になされてきた。これらに対して、SODに関する研究は立ち遅れている。そこで、大腸菌における酸素障害とSODの役割に関する研究、酸素によるSOD発現制御機構の解明、 O_2^- 感受性タンパク質の取得と酸素耐性蛋白質への改変を試みた。さらに常温菌より高い酸素ストレスを受けると考えられる好熱菌*B. stearothermophilus* SIC1における酸素耐性機構を解明するためにSODタンパク質および構造遺伝子の取得を試みた。本章ではこれまでに行った研究成果を総括し、今後の展望を述べた。

第1章では、大腸菌の酸素感受性変異株の取得を化学的変異処理法によって試みた。55コロニーが好気条件下で生育不能となっていた。このうち11コロニーの変異株については細胞内活性酸素の増加によって好気条件下で生育不能になったと考えられた。これら11コロニーの特徴として栄養要求性を示すようになっていることから、生育に必要なアミノ酸やビタミンの生合成系酵素が活性酸素に感受性が高いと考えられた。酸素障害とSODの役割を調べるためにMn-SOD欠損株であるno. 34株とno. 58株について詳細に研究を行った。これら2株の変異株は好気条件下でのみ栄養要求性を示し、すでに取得されている大腸菌の*sodA sodB* 2重変異株の形質と同じであった。No. 34株の形質を相補する遺伝子をショットガンクローニング法によって取得し、 O_2^- 感受性酵素である α, β -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た。細胞における O_2^- の影響は α, β -ジヒドロキシイソバリレートデヒドラターゼの不活化で、好気条件下で栄養要求性を

示すことが示唆された。No. 34株はMn-SOD構造遺伝子 (*sodA*) に変異が生じていることが明らかとなった。No. 58株ではo-フェナンスロリン (鉄特異的キレート剤) の添加により、Mn-SODが発現したことから、Mn-SOD発現制御因子に変異が生じていることが示唆され、Furの過剰生産株の可能性が高かった。しかしながら、結論付けることはできなかった。最近になって、転写制御因子に金属が配位している場合が多いことが報告されている(126)。No. 58株の変異部位の限定は新たなMn-SOD制御因子の発見につながるかもしれない。

第2章では、no. 34株の変異型Mn-SOD (M') の解析を試みた。Native-PAGEによる移動度から、M'が4量体蛋白質である可能性が考えられた。4量体Mn-SODは*T. thermophilus* HB8で確認されており、4量体形成が耐熱性の向上に関与していると考えられていた。そこでM'構造遺伝子 (*sodA34*) のクローニングおよびM'の精製を行った。*sodA34*には2ヵ所の塩基置換変異 (Glu24lys, Asp105Asn) が生じていた。精製M'の分子量をゲルろ過クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEから算出した結果、2量体タンパク質であった。これらのことからM'のnative-PAGE上での移動度の変化は2ヵ所の変異による表面電荷の変化 (正電荷への変化) が原因であると結論付けられた。*T. thermophilus* HB8由来4量体Mn-SODの立体構造がすでに決定され、4量体形成に関与しているアミノ酸残基も同定されている。この情報を基に部位特異的塩基置換操作法を用いて、アミノ酸置換による変異Mn-SODを構築すれば、耐熱性の高い4量体Mn-SODに改変できると考えられた。

第3章では、O₂⁻感受性酵素である α , β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼを部位特異的塩基置によりO₂⁻耐性酵素に改変することを試みた。 α , β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼのO₂⁻感受性は活性中心存在する[4Fe-4S]クラスターがO₂⁻によって特異的に酸化されるためと考えられていた。そこでこのクラスター形成部位であると予想された2ヵ所のシステイン残基をそれぞれセリン残基に置換した。セリン残基への置換は[4Fe-4S]クラスターを部分的に破壊する変異である。このため、変異酵素の比活性の低下が予想されたが、同時に酸化部位も消失し、O₂⁻耐性蛋白質に変化すると考えられた。またセリン残基の水酸基の酸素原子がシステイン残基の硫黄原子の替りとして部分的に機能すると考えられたことから、活性も微弱ではあるが残存すると予想された。Cys189Ser変異酵素およびCys192Ser変異酵素ともに顕著に活性が低下したことから、Cys189およびCys192は[4Fe-4S]クラスターに関与しているシステイン残基であることが確認された。さらに、Cys189Ser変異酵素活性が好気条件下で野生型酵素に比べてはるかに安定に保持され、目的の酸素耐性酵素の取得に成功した。酸化されやすい部位に存在するアミノ酸残基を酸化されにくいアミノ酸残基に置換することは酸素耐性酵素の取得にあたって有用な方法であると考えられた。しかしながら、このような変異は酵素活性を低下させる場合が多いと考えられる。このため、酸素耐性酵素の取得は立体構

造も念頭において酸化されやすい部位全体を変化させる必要があると思われた。例えば、ほうれん草由来 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼが酸素耐性であることが報告され、活性中心は[2Fe-2S]クラスターを形成していることが明らかにされている。大腸菌由来 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼを[4Fe-4S]クラスター酵素から[2Fe-2S]クラスター酵素へ改変することによって活性を維持したままより酸素耐性酵素に変換することが可能であると考えられた。また[4Fe-4S]クラスター付近に酸性アミノ酸残基を導入し、 O_2^- がクラスターに接近しにくいように改変する手段も考えられる。これらを行うには大腸菌由来 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼの立体構造やほうれん草由来 α, β -ジヒドロキシソバリレートデヒドラターゼのアミノ酸配列や立体構造に関する情報が必要であると考えられ、今後の課題である。

第4章では、*sodA*および*sodB*の酸素による発現制御機構を解明するため、それぞれの転写量を*lacZ*または*cat*との融合遺伝子を用いて β -ガラクトシダーゼ活性またはCATase活性で測定した。*sodA*は転写レベルで酸素によって直ちに誘導されることが明らかとなった。この*sodA*の発現制御系を用いて人為的発現制御可能な発現ベクターの開発に応用できることを示した。さらに*sodA*の発現が翻訳段階でも制御されている可能性を示唆する結果も得られ、Mn-SODが転写、翻訳および翻訳後のすべての段階で複雑に制御されていることが明らかとなった。Fe-SODが嫌気条件下でも発現していることから、構成性タンパク質であると考えられていたが、本研究の結果から*sodB*が酸素によって転写レベルで制御されていることが明らかとなった。さらに鉄含有タンパク質が*sodB*の発現を制御していると考えられ、*sodA*と*sodB*が同一の制御タンパク質によって制御されていることが示唆された。*sodB*の酸素による発現制御機構と鉄含有制御タンパク質との関係については不明であった。

第5章では、*B. stearothermophilus* SIC1由来SODの精製と構造遺伝子の取得を試みた。SIC1株には1種類の2量体Mn-SODが存在していた。コロニーハイブリダイゼーション法でMn-SOD構造遺伝子(*sodS*)の取得を試みたが、目的の断片は取得できなかった。そこで染色体DNAから直接*sodS*領域の塩基配列を決定し、その後、PCR法を用いて*sodS*領域を増幅させ、*sodS*をクローニングした。*sodS*領域がコロニーハイブリダイゼーション法で取得されなかったのはSOD活性の増加により宿主にストレスが生じたためであると考えられた。クローニング断片の塩基配列決定の結果および遺伝子増幅効果によるSOD活性の増加が確認されたことから*B. stearothermophilus* SIC1由来Mn-SOD構造遺伝子であることが証明された。

第6章では、*B. stearothermophilus* SIC1染色体DNAに*sodS*以外にもう1種類の原核生物由来Mn-SODと相溶性が高いアミノ酸配列をコードしているORFが見い出された。この遺伝子を*znbT*と名付けた。*znbT*から発現したmRNAが確認され、タンパク質にまで翻訳されていることが示唆された。しかしながら*znbT*遺伝子

増幅効果によるZnbTに由来するSOD活性は検出されず、ZnbTのSOD活性は非常に微弱であると考えられた。そこで*znbT*を*lacZ*プロモーターの下流に連結し、ZnbTを大量発現させた。この結果、SOD活性が検出され、ZnbTの精製に成功した。ZnbTにMnあるいはFeが結合していたためにSOD活性を示したことが明らかとなり、本来の機能はZnを特異的に結合させる金属結合タンパク質であると考えられた。ZnbTがMn-SODあるいはFe-SODの起源であり、地球上の環境変化（嫌気状態から好気状態への変化）により金属結合タンパク質からSODに進化していたと予想された。

最後に本研究に関連して今後の展望と問題点について以下に述べる。

酸素耐性機構に関しては、特に重要なものは活性酸素除去酵素の発現制御機構である。序論および第4章で述べたようにSODの制御因子については次々と発見されている。これらの制御因子は転写レベルで制御していることが明らかとなっている。しかしながらこれらの制御因子が細胞内あるいは細胞外の何をシグナルとして認識しているかについてはまったく明らかにされていない。SODの発現に酸素あるいは活性酸素が第1のシグナルであると予想されているが、これらのシグナルをどのように制御因子が認識しているのかについても不明である。また何種類も存在する制御因子がすべて酸素あるいは活性酸素を認識するとは考えられず、別のシグナルを認識する制御因子も存在すると考えられる。このようなシグナルの発見とその伝達機構の研究は酸素耐性機構を解明する上で非常に重要なテーマであると考えられる。このような研究は試行錯誤を繰り返しながらある一つの仮説を示し、実験によって証明するという地道な努力の蓄積が必要である。シグナルの認識が明らかにされている系としてカタラーゼの正の制御因子であるOxyR系が挙げられる。OxyRは細胞内の酸化状態を自身が酸化されることで認識し、活性化される。さらに細胞が還元状態に戻るとOxyR自身も還元され、不活性型に変化することが明らかとなっている(130)。これと同様のシステムがSOD発現制御系にも存在することが予想される。またストレスを受けている細胞で特殊な核酸(ApppA)が合成されていることも明らかとなっている(131)。このような核酸が酸素ストレスのシグナルとなっている可能性が考えられる。

生物を研究する研究者にとって、生物の進化を解明することは永遠のテーマの1つである。進化のシステムを解明することができれば、我々がより利用しやすい有用な菌株を、現在行われているような地球環境から菌株を分離し、変異処理や遺伝子工学的あるいはタンパク質工学的手法を駆使して取得するような困難で時間を要する作業を行わずに、現在取得されている菌株を元に比較的容易に取得できるようになると考えられる。そのためには酵素の起源となったタンパク質あるいはDNA領域を取得し、それを基に進化を再現させ、その過程を解析する必要があると考えられる。第6章で取得したZnbTはMn-SODやFe-SODの起源に相当するタンパク質であると予想された。ZnbTを金属結合タンパク質からSODに進化させ、その過程を

解析することが可能であれば生物の進化のシステムを解明することができると考えられる。しかしながら、生物が進化した過程における地球環境の変化を我々が推測することは容易ではなく、現在我々が利用できる手法のみでSODへの進化が再現される可能性は高いとは言えない。そこで、ZnbTとSODとの立体構造上の違いを明らかにし、どのアミノ酸配列がSODに必要なかを解析する必要がある。また他生物由来のZnbTを取得し、種々のZnbTとSODの相同性を調べることも進化を知る上で有効な手段であると考えられる。

絶対嫌気性菌には付加価値の高い有用物質を生産する細菌が多数存在している。現在、これらの細菌を用いて有用物質を工業的に安定に大量生産させることは困難である。その一つの原因として酸素による障害が挙げられる。スーパーオキシドジスムターゼを含む酸素耐性機構の研究成果は絶対嫌気性菌を好気性細菌に育種する糸口になり、応用面としても利用されることが考えられる。しかしながら、原核生物由来のスーパーオキシドジスムターゼを直接的に応用面に生かすことは現時点では困難であり、今後のさらなる研究の進展に期待するところである。

参考文献

1. 中野 稔, 浅田浩二, 大柳善彦 編集. 1988. 活性酸素, 生物での生成・消去・作用の分子機構. 共立出版株式会社.
2. Boehme, D. E., K. Vincent, and O. R. Brown. 1976. Oxygen and toxicity inhibition of amino acid biosynthesis. *Nature* **263**:418-420.
3. Brown, O. R. and F. Yein. 1978. Dihydroxyacid dehydratase: the site of hyperbaric oxygen poisoning in branch-chain amino acid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**:1219-1224.
4. 大柳善彦. 1981. スーパーオキサイドと医学. 共立出版株式会社.
5. 大柳善彦. 1989. Biocience Series: 活性酸素と病気. 株式会社化学同人.
6. Watson, K. 1990. Microbial stress protein. *Advances in Microbial Physiology.* **31**:183-223.
7. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**:6049-6055.
8. Keele, B. B. Jr., J. M. McCord, and I. Fridovich. 1970. Superoxide dismutase from *Eshcherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**:6176-6181.
9. Yost, F. J. Jr. and I. Fridovich. 1973. An iron-containing superoxide dismutase from *Eshcherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **248**:4905-4908.
10. Takao, M., A. Oikawa, and A. Yasui. 1990. Characterization of superoxide dismutase gene from the archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**:210-216.
11. Takao, M., A. Yasui, and A. Oikawa. 1991. Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.* **266**:14151-14154.
12. Goerlich, O., P. Quillardet, and M. Hofnung. 1989. Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Eshcherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **171**:6141-6147.
13. Hagendee, M. E. and R. E. Moses. 1989. Multiple pathways for repair of hydrogen peroxide-induced DNA damage in *Eshcherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:991-995.
14. Ejiri, S., H. Weissbach, and N. Brot. 1979. Reduction of methionine

- sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 139:161-164.
15. Brot, N., L. Weissbach, J. werth, and H. Weissbach. 1981. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2155-2158.
 16. Davies, K. J. A. and A. L. Goldberg. 1987. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. J. Biol. Chem. 262:8227-8234.
 17. Marcillat, O., Y. Zhang, S. W. Lin, and K. J. A. Davies. 1988. Prostaglandin F_{2α} and the thromboxane A₂ analogue ONO-11113 stimulate Ca²⁺ fluxes and other physiological responses in rat liver. Biochem. J. 254:677-683.
 18. Levine, R. L., C. N. Oliver, R. M. Fulks, and E. R. Stadtman. 1981. Turnover of bacterial glutamine synthetase: Oxidative inactivation precedes proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2120-2124.
 19. Rivett, A. J. 1985. Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. J. Biol. Chem. 260:300-305.
 20. Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz, and B. N. Ames. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8059-8063.
 21. Fridovich, I. 1989. Superoxide dismutase. An adaptation to paramagnetic gas. J. Biol. Chem. 264:7761-7764.
 22. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1976. Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 129:1574-1583.
 23. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1977. Regulation of the synthesis of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen. J. Biol. Chem. 252:7667-7672.
 24. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1978. Superoxide radical and the oxygen enhancement of the toxicity of paraquat in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 253:8143-8148.
 25. Hassan, H. M. and I. Fridovich. 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen of peroxide by redox active compounds. Arch. Biochem. Biophys. 196:385-395.
 26. Fee, J. A. 1991. Regularion of *sod* genes in *Escherichia coli*:

- relevance to superoxide dismutase function. *Mol. Microbiol.* **5**:2599-2610.
27. Touati, D. 1988. Transcriptional and posttranscriptional regulation of manganese superoxide dismutase biosynthesis in *Escherichia coli*, studied with operon and protein fusions. *J. Bacteriol.* **170**:2511-2520.
 28. Niederhoffer, E. C., C. M. Naranjo, K. L. Bradley, and J. A. Fee. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* **172**:1930-1938.
 29. Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy, and B. Dimple. 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:6181-6185.
 30. Tsaneva, I. R. and B. Weiss. 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**:4197-4205.
 31. Tardat, B. and D. Touati. 1991. Two global regulators repress the anaerobic expression of MnSOD in *Escherichia coli*: *Fur* (ferric uptake regulation) and *Arc* (aerobic respiration control). *Mol. Microbiol.* **5**:455-465.
 32. Compan, I. and D. Touati. 1993. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**:1687-1696.
 33. Privalle, C. T., W. F. Beyer, Jr., and I. Fridovich. 1989. Anaerobic induction of proMn-superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **264**:2758-2763.
 34. Privalle, C. T. and I. Fridovich. 1992. Transcriptional and maturational effects of manganese and iron on the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**:9140-9145.
 35. Greenberg, J. T., J. H. Chou, P. P. A. Monach, and B. Dimple. 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations at the *soxQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**:4433-4439.
 36. Wu, J. and B. Weiss. 1992. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*

- 174:3915-3920.
37. Nunoshiba, T., E. Hidalgo, C. F. A. Cuevas, and B. Dimple. 1992. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Esheria coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. *J. Bacteriol.* **174**:6054-6060.
 38. Beyer, W. F., Jr. and I. Fridovich. 1991. In vivo competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Esheria coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:303-308.
 39. Parker, M. W. and C. C. F. Blake. 1988. Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **199**:649-661.
 40. Michelson, A. M. and K. Puget. 1980. Cell penetration by exogenous superoxide dismutase. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* **492**:67-80.
 41. Petrone, W. F., D. K. English, K. Wong, and J. M. McCord. 1980. Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:1159-1163.
 42. Imlay, J. A. and I. Fridovich. 1991. Assay of metabolic superoxide production in *Esheria coli*. *J. Biol. Chem.* **266**:6957-6965.
 43. Carlioz, A. and D. Touati. 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Esheria coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *EMBO J.* **5**:623-630.
 44. Loewen, P. C. 1984. Isolation of catalase-deficient *Esheria coli* mutants and genetic mapping of *katE*, a locus that affects catalase activity. *J. Bacteriol.* **157**:622-626.
 45. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 46. Sutcliffe, J. G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Esheria coli* plasmid pBR322. Cold Spring harbor Symp. Quant. Biol. **43**:77.
 47. Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring harbor Laboratory, New York.
 48. Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**:404-427
 49. Beachamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase improved

- assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**:276-287.
50. Gregory, E. M. and I. Fridovich. 1974 Visualization of catalase on acrylamide gel. *Anal. Biochem.* **58**:57-62.
 51. Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson, and B. N. Ames. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**:753-762.
 52. Imanaka, T., T. Tanaka, H. Tsunekawa, and S. Aiba. 1981. Cloning of the genes for penicillinase, *penP* and *penI*, of *Bacillus licheniformis* in some vector plasmids and their expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **147**:776-786.
 53. Harris-Warrick, R. M., Y. ElKana, S. D. Ehrlich, and J. Lederberg. 1975. Electrophoretic separation of *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:2207-2211.
 54. Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**:1513-1523.
 55. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 56. Touati, D. 1983. Cloning and mapping of the manganese superoxide dismutase gene (*sodA*) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **155**:1078-1087.
 57. Sakamoto, H. and D. Touati. 1984. Cloning of the iron superoxide dismutase gene (*sodB*) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **159**:418-420.
 58. Pugh, S. Y. and I. Fridovich. 1985. Induction of superoxide dismutases in *Escherichia coli* B by metal chelators. *J. Bacteriol.* **162**:196-202.
 59. Kuo, C. F., T. Mashino, and I. Fridovich. 1987. α,β -Dihydroxyisovalerate dehydratase: a superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**:4724-4727.
 60. Takeda, Y. and H. Avila. 1986. Structure and gene expression of the *E. coli* Mn-superoxide dismutase gene. *Nucleic Acids Res.* **14**:4577-4589.
 61. Carlioz, A., M. L. Ludwig, W. C. Stallings, J. A. Fee, H. M. Steinman,

- and D. Touati. 1988 Iron superoxide dismutase: nucleotide sequence of the gene from *Escherichia coli* K12 and correlations with crystal structures. *J. Biol. Chem.* **263**:1555-1562.
62. Scott, M. D., S. R. Meshnick, and J. W. Eaton. 1987. Superoxide dismutase-rich bacteria: paradoxical increase in oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* **262**:3640-3645.
 63. Scott, M. D., S. R. Meshnick, and J. W. Eaton. 1989. Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **264**:2498-2501.
 64. Schellhorn, H. E. and H. M. Hassan. 1988. Isolation and characterization of respiratory-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**:78-83.
 65. Stallings, W. C., K. A. Pattridge, R. K. Strong, and M. L. Ludwig. 1985. The structure of manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.4-Å resolution. *J. Biol. Chem.* **260**:16424-16432.
 66. Hamilton, C. M., M. Aldea, B. K. Washburn, P. Babitzke, and S. R. Kushner. 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4617-4622.
 67. Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**:20-78.
 68. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
 69. Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
 70. Sato, S., Y. Nakada, and K. Nakazawa-Tomizawa. 1987. Amino-acid sequence of a tetrameric, manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB8. *Biochim. Biophys. Acta* **912**:178-184.
 71. Flint, D. H. and M. H. Emptage. 1990. Dihydroxyacid dehydratase - Isolation, characterization as Fe-S proteins, and sensitivity to inactivation by oxygen radicals. In *Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids* (D. Chipman, Z. Barak, and J. V. Schloss, eds) pp285-314. V. C. H. Publishers, Inc., New York.
 72. Yanisch, P. C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

73. Takeshita, S., M. Sato, M. Toba, W. Masahashi, and T. H. Gotoh. 1987. High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for LacZ α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* **61**:63-74.
74. Cioffi, E. A., K. J. Shaw, W. F. Bailey, and C. M. Berg. 1980. Improved synthesis of the sodium salt of DL- α,β -dihydroxyisovaleric acid. *Anal. Biochem.* **104**:485-488.
75. Nicholson, D. G. and C. E. Holley. 1946. Silver chlorate. *Inorg. Syn.* **2**:4-6.
76. Desai, I. D. and W. J. Polglase. 1965. Characterization and properties of acetohydroxy acid synthetase of streptomycin-dependent *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **110**:181-188.
77. Gardner, P. R. and I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* **266**:1478-1483.
78. Gardner, P. R. and I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Biol. Chem.* **266**:19328-19333.
79. Stout, C. D. 1982. Iron-sulfur protein crystallography, p97-146. *In* T. G. Spiro (ed.), *Iron-Sulfur Proteins*. Wiley-Interscience, New York.
80. Lawther, R. P., R. C. Wek, J. M. Lopes, R. Pereira, B. E. Taillon, and G. W. Hatfield. 1987. The complete nucleotide sequence of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acid Res.* **15**:2137-2155.
81. Imlay, J. A. and I. Fridovich. 1991. Isolation and genetic analysis of a mutant that suppresses the auxotrophies of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **228**:410-416.
82. Imlay, J. A. and I. Fridovich. 1992. Suppression of oxidative envelope damage by pseudoreversion of a superoxide dismutase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:953-961.
83. Flint, D. H. and M. H. Emptage. 1988. dihydroxyacid dehydratase from *Spinach* contains a [2Fe-2S] cluster. *J. Biol. Chem.* **263**:3558-3564.
84. Zhang, M., H. Nakai, and T. Imanaka. 1988. Useful host-vector systems in *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3162-3164.
85. Spiro, S. and J. R. Guest. 1991. Adaptive responses to oxygen

- limitation in *Escherichia coli*. Trends Biochem. Sci. 16:310-314.
86. Friedman, D. I. 1988. Integration host factor, a protein for all reasons. Cell 55:545-554.
 87. Greenberg, J. T., J. H. Chou, P. A. Monach, and B. Demple. 1991. Activation of oxidative stress genes by mutations at *sodQ/cfxB/marA* locus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:4433-4439.
 88. Shapira, S. K., J. Chou, F. V. Richaud, and M. J. Casadaban. 1983. New versatile plasmid vectors for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. Gene 25:71-82.
 89. Close, T. J. and R. L. Rodriguez. 1982. Construction and characterization of the chloramphenicol-resistance gene cartridge: A new approach to the transcriptional mapping of extrachromosomal elements. Gene 20:305-316.
 90. Shaw, W. V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. Methods Enzymol. 43:737-755.
 91. Beckwith, J. 1987. The lactose operon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger, eds. p1444-1452, American Society for Microbiology Washington, D. C.
 92. Bogosian, G. and R. L. Somerville. 1984. Analysis *in vivo* of factors affecting the control of transcription initiation at promoters containing target sites for Trp repressor. Mol. Gen. Genet. 193:110-118.
 93. Rosenberg, A. H., B. N. Lade, D. S. Chui, A. W. Lin, J. J. Dunn, and F. W. Studier. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. Gene 56:125-135.
 94. 堀越弘毅. 1988. 極限微生物, 新しい遺伝子資源. 株式会社講談社
 95. Mullis, K. B. and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350.
 96. Lundberg, K. S., D. D. Shoemaker, M. W. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, and E. J. Mathur. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*.

Gene 108:1-6.

97. Imanaka, T., M. Fujii, and S. Aiba. 1981. Isolation and characterization of antibiotic resistance plasmids from thermophilic bacilli and construction of deletion plasmids. *J. Bacteriol.* **146**:1091-1097.
98. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba. 1985. Effect of *in vitro* DNA rearrangement in the NH₂-terminal region of the penicillinase gene from *Bacillus licheniformis* on the mode of expression in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **131**:1753-1763.
99. May, B. P. and P. P. Dennis. 1987. Superoxide dismutase from the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *J. Bacteriol.* **169**:1417-1422.
100. Gyllensten, U. B. and H. A. Erlich. 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the *HLA-DQA* locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7652-7656.
101. Ochman, H., A. S. Gerber, and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**:621-623.
102. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**:741-746.
103. Imanaka, T., M. Fujii, I. Aramori, and S. Aiba. 1982. Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector plasmids between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **149**:824-830.
104. Misra, H. P. and I. Fridovich. 1978. Inhibition of superoxide dismutases by azide. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**:317-322.
105. Hordgson, E. K. and I. Fridovich. 1975. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* **14**:5294-5299.
106. Weisiger, R. A. and I. Fridovich. 1973. Superoxide dismutase: organelle specificity. *J. Biol. Chem.* **248**:371-375.
107. Brock, C. J. and J. E. Walker. 1980. Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. Complete amino-acid sequence of a manganese enzyme. *Biochemistry* **19**:2873-2882.
108. Bowler, C., L. V. Kaer, W. V. Camp, M. V. Montagu, D. Inzé, and P. Dhaese. 1990. Characterization of the *Bacillus stearothermophilus*

- manganese superoxide dismutase gene and its ability to complement copper/zinc superoxide dismutase deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **172**:1539-1546.
- 109.Kozok, M. Comparison of initiation of protein sythesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. **47**:1-45.
- 110.Helmann, J. D. and M. J. Chamberlin. 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. Ann. Rev. Biochem. **57**:839-872.
- 111.Merino, E., B. Becerril, F. Valle, and F. Bolivar. 1987. Deletion of repetitiextragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* gultamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. Gene **58**:305-309.
- 112.Newbury, S. F., N. H. Smith, E. C. Robinson, I. D. Hiles, and C. F. Higgins. 1987. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. Cell **48**:297-310.
- 113.Stallings, W. C., K. A. Pattridge, R. K. Strong, and M. L. Ludwig. 1984. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. J. Biol. Chem. **259**:10695-10699.
- 114.Salin M. L. and D. Oesterhelt. 1988 Purification of manganese-containing superoxide dismutase from *Halobacterium halobium*. Arch. Biochem. Biophys. **260**:806-810.
- 115.Salin M. L., M. V. Duke, D. Oesterhelt, and Din-Pow Ma. 1988. Cloning and detemination of the nucleotide sequence of the Mn-containing superoxide dismutase gene from *Halobacterium halobium*. Gene **70**:153-159.
- 116.May, B. P. and P. P. Dennis. 1989. Evolution and regulation of the gene encoding superoxide dismutase from the archaebacterium *Halobacterium cutirubrum*. J. Biol. Chem. **264**:12253-12258.
- 117.May, B. P. and P. P. Dennis. 1990. Unusual evolution of superoxide dismutase-like gene from the extremely halophilic Archaebacterium *Halobacterium cutirubrum*. J. Bacteriol. **172**:3725-3729.
- 118.Joshi, P. and P. P. Dennis. 1993. Characterization of paralogous and orthologous members of the superoxide dismutase gene family from genera of halophilic archaebacteria. **175**:1561-1571.
- 119.Joshi, P. and P. P. Dennis. 1993. Structure, function, and evolution of family of superoxide dismutase proteins from halophilic archaebacteria. **175**:1572-1579.

120. Dooley, S., J. Radtke, N. Blin, and G. Unteregger. 1988. Rapid detection of DNA-binding factors using protein blotting and digoxigenin-dUTP marked probes. *Nucleic Acid Res.* **16**:11839.
121. Okayama, H., M. Kawaichi, M. Brownstein, F. Lee, T. Yokota, and K. Arai. 1987. High-efficiency cloning of full-length cDNA; construction and screening of cDNA expression libraries for mammalian cells. *Methods Enzymol.* **154**:3-28.
122. McKnight, S. L. and R. Kingsbury. 1982. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217**:316-324.
123. Weser, U., H. Rupp, F. Donay, F. Linneman, W. Voelter, W. Voetsch, and G. Yung. 1973. Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. *Eur. J. Biochem.* **39**:127-140.
124. Olafson, R. W., K. Abel, and R. G. Sim. 1979. Prokaryotic metallothionein: preliminary characterization of a blue-green alga heavy metal-binding protein. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **89**:36-43.
125. Higman, D. P. and P. J. Sadler. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science* **225**:1043-1046.
126. O'Halloran, T. V. 1993. Transition metals in control of gene expression. *Science* **261**:715-725.
127. Michelsen, J. W., K. L. Schmeichel, M. C. Beckerle, and D. R. Winge. 1993. The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4404-4408.
128. Remacle, J. and C. Vercheval. 1991. A zinc-binding protein in a metal-resistant strain, *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Can. J. Microbiol.* **37**:875-877.
129. Cohen, I., R. Bitan, and Y. Nitzan. 1991. The effect of zinc and cadmium ions on *Escherichia coli* B. *Microbios* **68**:157-168.
130. Storz, G., L. A. Tartagila, and B. N. Ames. 1990. Transcriptional regulation of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**:189-194
131. Lévêque, F., S. Blanchin-Roland, G. Fayat, P. Plateau, and S. Blanquet. 1990. Design and Characterization of *Escherichia coli* mutants devoid of Ap₄N-hydrolase activity. *J. Mol. Biol.* **212**:319-329.

本論文に関連する報告

1. Isolation and characterization of oxygen sensitive mutants of *Escherichia coli*.
J. Ferment. Bioeng. 74:262-266. (1992)
2. Regulation of *Escherichia coli* superoxide dismutases genes (*sodA* and *sodB*) by oxygen.
Biotechnol. lett. 15:229-234. (1993)
3. Design and characterization of oxygen-resistant mutant enzymes from α,β -dihydroxyisovalerate dehydratase by site directed mutagenesis.
"manuscript in preparation"
4. Purification and characterization of the superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* SIC1 and molecular cloning of the gene.
"manuscript in preparation"
5. Molecular cloning of superoxide dismutase like gene (*znbT*) from *Bacillus stearothermophilus* SIC1 and expression of the gene product in *Escherichia coli*.
"manuscript in preparation"

謝辞

本研究は大阪大学工学部応用生物工学科教授 今中忠行先生の下で遂行されたものであり、先生より終始懇篤なるご指導と激励を賜りましたことを心から感謝致します。

本論文をまとめるにあたり、有益なご助言を頂きました大阪大学工学部応用生物工学科 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、ト部格教授、塩谷捨明教授、大阪大学工学部生物工学国際交流センター 吉田敏臣教授並びに大阪大学産業科学研究所 二井将光教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり実ある討論や数々の実験方法をご指導して頂きました元大阪大学助手（現熊本工業大学講師）松岡正佳先生、大阪大学工学部応用生物工学科助手高木昌宏先生、森川正章先生に感謝いたします。また本研究に際して、様々な便宜を図って頂きました大阪大学工学部応用生物工学科技官 西田佐知子氏に感謝いたします。

最後に本研究に御協力下さいました山口 徹氏、津田 学氏、上田 真氏、幸田勝典氏、加藤智久氏、並びに前田拓也氏を始めとする大阪大学応用生物工学科今中研究室の皆様心から感謝致します。