



好熱菌由来Mn型スーパーオキシドディスムターゼの アミノ酸置換による変性剤耐性への影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2014-06-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡辺, 健太 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/00005115

博 士 学 位 論 文

好熱菌由来 Mn 型スーパーオキシドディスムターゼのアミノ酸置換
による変性剤耐性への影響

渡 辺 健 太

提出年月日 平成 26 年 2 月 21 日

目次

総合緒言	3
参考文献	5
第 1 部 MnSOD の変性剤耐性への影響 JM109 (pUC18) 発現系による実験	6
第 2 部 SOD 活性測定法の検討	51
第 3 部 MnSOD の変性剤耐性への影響 BL21 (pCold I) 発現系による実験	60
第 4 部 活性部位付近におけるアミノ酸置換 BL21 (pCold I) 発現系による実験	87
結言	106
謝辞	107

総合諸言

活性酸素は大気中に存在する分子状酸素（三重項酸素）に比べて活性化された酸素分子であり、ROS（Reactive oxygen species）あるいはROI（Reactive oxygen intermediates）などと呼ばれている。その中には、いわゆるフリーラジカルと非フリーラジカルがあり、これらの分子種を総称して活性酸素フリーラジカルとよぶこともある。この中でフリーラジカルはスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカルなどで、非ラジカルはオゾン、過酸化水素などである。最近では NO などをもとめて RNS（Reactive nitrogen species）と呼ぶこともある。

活性酸素の生成のメカニズムは以下のとおりである。まず、スーパーオキシドはキサンチン酸化酵素やミトコンドリアや小胞体などの電子伝達系によって生成する。とくにミトコンドリアの電子伝達系では、シトクロム c 酸化酵素が酸素に強い親和性を持ち、細胞内の酸素の 90%以上を有効活用し、活性酸素の発生を抑えているが、1-2%の酸素は活性酸素になりミトコンドリアより漏出している。さらに、老化によりミトコンドリアに異常があるとさらなる漏出を生み、自己の損傷を引き起こす悪循環を生む。また、NADPH 酸化酵素の活性化により、血小板、白血球粘着反応によってもスーパーオキシドが生じる。さらに、シトクロム P450、シクロオキシゲナーゼ、リボキシナーゼなどからも生成する³⁾。

このほかスーパーオキシドはメナジオン、パラコートなどの農薬、アドリアマシ、ブレオマイシンなどの抗ガン作用のある抗生物質などからも生成し、ヒドロキシラジカルはガンマ線、X 線、紫外線などの水への放射によって生じる。

活性酸素種は DNA やタンパク質を切断したり、脂質を酸化したりする作用があり、生体に悪影響を与える。タンパク質の Lys, Pro, Arg, Thr などの側鎖やペプチド結合の切断、Glu の酸化などが生じる。また、切断ばかりでなく不飽和脂肪酸のマイケル付加反応からタンパク質の架橋も起こる。さらに、NO や過酸化水素により細胞のアポトーシスが見られる。

このような酸化ストレスに対して、生物は様々な防御機構をもっており、ビタミン C やビタミン E、βカロテンなどの抗酸化物質、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素があげられる。この中でもスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）は、活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化することができる^{5,6,7)}。

また、SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn 型、Mn 型、Fe 型などがあり、同じサブユニットからなるホモ二量体（FeSOD や MnSOD では時に四量体）である。Mn 型は哺乳類ではミトコンドリアのマトリックスに存在し、Cu/Zn 型は細胞質に存在する構成的な酵素である。

通常の生育環境よりも高温で生育する生物が見出されて以来、その耐熱システムがどのように獲得されたかが大きな科学的関心となった。工業製品の場合、熱ばかりでなく、酸、アルカリ、圧力、強度などに対する耐性の獲得は、いずれも素材の組成を変化させて対応している。しかしながら、生物は DNA を構成する 4 種のヌクレオチド、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸は、通常の生物も高温で生育する生物でも変わらない。そのため、いかなる組み合わせ、順番が耐性の獲得に有利であるかが研究された。

Brock は、様々な高温環境から得られた生物を比較し、いかなる要素が高温環境では有効かについて議論した。たとえば、密度、粘度、表面張力、酸素溶解度などの物理学定数、化学的性質は高温では低下し不利であった。そうした中で温度にともなって数値が増加するものは、体積、蒸気圧、拡散係数、イオン化、溶解度であり、それらがどのように生物に有利であるかは検討しなければならない。また、好熱性生物に対して、紫外線、放射線などの照射によって変異を起こさせると、高温で生育できなくなったという結果は多く報告されたが、その逆は見られなかった。すなわち、高温環境での生育には多くの要素が整わなくては可能にならないことを示した⁴⁾。

今堀は、好熱菌の耐熱性を生物が持ちうる成分について検討をした。酵素の活性と温度の関係をアレニウスプロットすると、転位点が 50-60°C にあることが特徴つけられた。これは、この温度領域において構造変化が生じたことを示した。しかし、この場合の酵素の状態は一律ではなく、ある酵素は転位点以上の高温でエントロピー差が大きくなり基質がゆるくしか結合できない。またある酵素は転位点以下ではエントロピー差が小さく、基質が結合しにくかった。このように転位点がある以上のことは明確にはならなかった。リボゾームの安定性においては、スペルミンのようなポリアミンが高温時において有効であり、アミラーゼに対してはカルシウムイオンが有効であったように、タンパク質の構造安定化に補助的に疎水結合の増大によるものが議論された¹⁾。

大島は、好熱菌の酵素と常温菌を比較しても、分子量、サブユニット構造、活性中心のアミノ酸、アミノ酸組成、基質特異性、Km 値、補酵素要求性のいずれもが大きな差を有していないことを認めた。そのため、耐性はタンパク質の立体構造全体から比較すると、ごくわずかな構造変化を導くだけで安定化されるのだらうと述べた。さらに、物理学的研究から、変性時の速度論的解析を行うと、内部相互作用の増加によって安定化が達成できていることが示された²⁾。

つまり、酵素の耐性を制御する要素は単純ではなく多様なアプローチが存在するが、それらはごく微小な構造変化をタンパク質にもたらすに過ぎない。しかしながら、その微小な変化を導き出すアプローチを本論文では試み、タンパク質構造の改変法に指標を示し、ここに報告する。

参考文献

- 1) 今堀 和友 (1975), 好熱性と熱安定性の機構を求めて, 蛋白質核酸酵素 ; 20(3) : 213-225
- 2) 大島 泰郎 (1984), 好熱性細菌の探索と耐熱酵素の応用開発, BIO INDUSTRY ; 1(2) : 29-34
- 3) 谷口 直之 (1996), 活性酸素研究へのプレリユード, 細胞工学 ; 15(10) : 1370-1378
- 4) Brock T.D. 1970. High Temperature System. Annu. Rev. Ecol. Syst.; 1: 191-220
- 5) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp.; 65: 77-93
- 6) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem.; 64: 97-112
- 7) McCord J.M and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem.; 244: 6049-6055

第 1 部

MnSOD の変性剤耐性への影響

JM109 (pUC18) 発現系による実験

目次

緒言.....	9
材料.....	11
試薬.....	11
培地.....	18
装置.....	19
細菌.....	20
実験方法.....	21
ゲノム抽出.....	21
プラスミドベクター (pUC18) の調製.....	22
JM109 コンピテントセルの作製.....	22
PCR.....	23
アガロースゲル電気泳動.....	23
アガロースゲルからの目的 DNA の回収.....	23
アガロースゲルからの目的 DNA の回収 (DNA Gel Extraction Kit).....	24
エタノール沈殿.....	24
塩基置換.....	25
塩基配列決定.....	28
制限酵素末端の組込み.....	28
制限酵素処理.....	28
Ligation.....	29
Transformation とブルーホワイトカラーセクション.....	29
菌体内タンパク質の抽出.....	29
タンパク質定量.....	30
タンパク質電気泳動.....	30
SDS-PAGE.....	30
Native-PAGE.....	30
CBB 染色.....	30
活性測定.....	31
NBT 法による SOD 活性染色.....	31

結果.....	32
好熱菌 MnSOD 粗酵素における SDS 耐性の比較.....	32
好熱菌 MnSOD の塩基配列とアミノ酸配列の比較.....	34
一次 PCR 産物および二次 PCR 産物の作製.....	37
1塩基置換 sod および 2塩基置換 sod の部分塩基配列.....	40
制限酵素末端の組込み.....	43
形質転換株のブルーホワイトカラーセクション.....	44
JM109(pUC18)系による recombinant MnSOD の発現.....	45
考察.....	48
参考文献.....	49

緒言

極限環境微生物には、好熱菌、好アルカリ菌、好塩菌など様々な種類が存在する¹⁾。Brockによると、一般的にその生物種が生育できる最高またはそれに近い温度で生きるものを好熱性菌と定義されている。したがって好熱性のカビの生育温度上限は 60℃付近であり、藻類は 70℃くらいとなる。この定義は分類上の違いをはっきりさせるにはよいが、生物の本質なものをいえない。

細菌では、好熱菌は通常 55℃以上で生育できる菌を指し、このうち、90℃以上でも生育できる菌を超好熱菌、75℃以上でも生育できる菌を高度好熱菌、それ以下のものは中度好熱菌とよぶ。中度好熱菌には、*Bacillus* 属をはじめ各種の属に所属するものが知られている。好熱性菌と最適温度を見ると、*Bacillus thermophiles* は 55℃、*Bacillus stearothermophilus* は 60~65℃、*Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* は 70℃であり、もっとも代表的なものは、*Bacillus stearothermophilus* である。好熱菌が生産する酵素は、熱や変性剤に対する耐性が高いことから工業的利用がなされ、さらなる研究開発がすすめられている²⁾。

酵素の耐熱性に関する規則性は明確ではないながらも、Argos らは既知のアミノ酸配列の比較から好ましい置換の傾向を統計的に示した³⁾。また、Yutani らは大腸菌のトリプトファン合成酵素の α サブユニットの特定のアミノ酸の置換によって、1 アミノ酸置換だけでも酵素活性の低下が見られることを実験的に示し、タンパクの構造変異が活性に影響すると提唱した⁴⁾。

生物は呼吸により酸素を体内に取り入れると、活性酸素が副産物として発生する。活性酸素には、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどがある。これらには、DNA やタンパク質を切断したり、脂質を酸化したりする作用があり、生体に悪影響を与える。このような酸化ストレスに対して、生物は様々な防御機構をもっており、ビタミン C やビタミン E、 β カロテンなどの抗酸化物質、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素がそれである。この中でもスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化することができる^{5,6,7)}。

また、SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn 型、Mn 型、Fe 型などがあり、同じサブユニットからなるホモ二量体 (FeSOD や MnSOD では時に四量体) である。とくに、MnSOD は単量体、二量体、四量体のどの高次構造にも活性があることが知られており、真核生物と原核生物の両方に存在していることから、生物共通の SOD であると考えられることができる。

本研究室の安部，草薙，鶴の研究により，*Bacillus stearothermophilus* (C36 株) は標準的な中度好熱菌である *Bacillus stearothermophilus* (IFO12550 株) と近縁であるが，生産された MnSOD は変性剤に対する耐性が高いことや，102 番目のアミノ酸であるアスパラギン酸がグルタミン酸に，187 番目のアミノ酸であるバリンがイソロイシンに置換されていることが明らかになった．また，187 番目のイソロイシンは C 末端領域に含まれており，二量体構造に影響を与えていると報告した^{8,9,10)}．

C36 株 MnSOD における高次構造の安定性の理由を解明することで，大腸菌などが生産する酵素の安定化に応用することが可能ではないかと考えられた．そこでまず本研究では，102 番目や 187 番目のアミノ酸をコードする塩基を別の塩基に換えることで，102 番目のアミノ酸を Glu→Asp に，また，187 番目のアミノ酸を Ile→Val に置換した recombinant MnSOD を JM109 (pUC18) 系で発現させ，C36 株 MnSOD が IFO12550 株 MnSOD より高い変性剤耐性を獲得できた原因を調べた．

材料

試薬

アンピ° シリンナトリウム	$C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$	生化学用	和光純薬
イソamilアルコール	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	特級	和光純薬
エタノール	C_2H_5OH	特級	関東化学
エチレンジ°アミン四酢酸二ナトリウム	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$	試験研究用	和光純薬
塩化ナトリウム	$NaCl$	特級	関東化学
塩化マグ°ネシウム	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	特級	和光純薬
塩酸	HCl	特級	和光純薬
寒天		1 級	関東化学
クーマシーブ° リリアントブ° ルー R350	$C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$		ファルマシア
グ° リシン	H_2NCH_2COOH	電気泳動用	関東化学
グ° リセリン	$CH_2(OH)CH(OH)CH_2(OH)$	1 級	関東化学
グ° ルコース	$C_6H_{12}O_6$	特級	和光純薬
クロロホルム	$CHCl_3$	特級	ナカライテスク
酢酸	CH_3COOH	特級	和光純薬
酢酸カリウム	CH_3COOK	特級	和光純薬
酢酸ナトリウム・3 水和物	$CH_3COONa \cdot 3 H_2O$	特級	ナカライテスク
ジ° メチルスルホキシト°			
N N,-ジ° メチルホルムアミト°	$HCON(CH_3)_2$	特級	ナカライテスク
臭化エチジ° ウム	$C_{21}H_{20}BrN_3$	生化学用	ナカライテスク
水酸化ナトリウム	$NaOH$	特級	和光純薬
スクロース	$C_{12}H_{22}O_{11}$	特級	キシタ° 化学
N,N,N',N'-テトラメチルジ° エチレンジ°アミン	$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$	電気泳動用	和光純薬
ト° テ° シル硫酸ナトリウム	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	生化学用	和光純薬
ニトロブ° ルーテトラゾ° リウム	$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$		ナカライテスク
フェニルメチルスルホニルフルオライト°	$C_3H_3O_2SF$	Boehringer Mannheim GmbH	
フェノール	C_6H_5OH	特級	ナカライテスク
2-ブ° ロハ° ノール	$(CH_3)_2CHOH$	特級	キシタ° 化学
ブ° ロモフェノールブ° ルー	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	特級	ナカライテスク
ホ° リハ° プ° トン			和光純薬
メタノール	CH_3OH	特級	ナカライテスク
2-メルカプ° トエタノール	$HSCH_2CH_2OH$	鹿特級	関東化学

リボフラビン	$C_{17}H_{20}N_4O_6$		ナカライテスク
硫酸マグネシウム	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	特級	和光純薬
硫酸マンガン・5水和物	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$		シグマ化学
Agarose S		電気泳動用	和光純薬
Agarose SFR		電気泳動用	amresco
Formamide			
イソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシド (IPTG)			
	$C_9H_{18}O_5$	生化学用	和光純薬
RNase G.S.			和光純薬
Tryptone			和光純薬
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパノール (Tris)			
	$(HOCH_2)_3CNH_2$	生化学用	関東化学
Yeast Extract			関東化学

エタノール沈殿試薬 (TaKaRa)

Dr.GenTLE Precipitation Carrier

PCR 試薬 (BiO NEER)

10×Reaction buffer, with MgCl₂

dNTPs mixture, Each dNTP 2.5 mM

Top DNA polymerase

Sequencing 試薬 (Applied Biosystems)

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100

Big Dye Terminator v1.1 , v3.1 5×Sequencing Buffer

制限酵素処理試薬 (和光純薬 ニッポンジーン)

Nde I

*Eco*R I

10×H buffer

Ligation 試薬 (TaKaRa)

DNA Ligation Kit Ver.2.1

分子量マーカー

100 bp DNA Ladder (1500 1000 900 800 700 600 **500** 400 300 200 100) (Promega)

1kb DNA Ladder (10000 8000 6000 5000 4000 **3000**

2500 2000 1500 **1000** 750 **500** 250) (SibEnzyme)

Ez Standard AE-1440 (97.2 66.4 45.0 29.0 20.1 14.3) (ATTO)

プライマー

以下のプライマーは北海道システムサイエンスに合成を依頼した。

C36 株 sod 領域を含む DNA 断片や IFO12550 株 sod 領域を含む DNA 断片を増幅させるためのプライマー。

sod279b20	5'-AAACCGAGGACAAGCAAGTC-3'	Tm 56.3°C
sodr1214b20	5'-GCCGATGCAAAGCAAAAGCA-3'	Tm 56.3°C

sod (G309T) を含む DNA 断片を増幅させるためのプライマー。

C36sodG309T	5'-GAGCTGGCTGATGCGATCAAC-3'	Tm 60.4°C
C36sodrG309T	5'-GATCGCATCAGCCAGCTCACC-3'	Tm 62.4°C

sod (A562G) を含む DNA 断片を増幅させるためのプライマー。

C36sodA562G	5'-TTCTGGAACGTTGTCAACTGG-3'	Tm 56.5°C
C36sodrA562G	5'-CCAGTTGACAACGTTCCAGAA-3'	Tm 56.5°C

sod の部分塩基配列を確認するためのプライマー。

MnSOD シークエンス	5'-CACGGCGGTGCGCAACAACG-3'	Tm 64.5°C
--------------	----------------------------	-----------

制限酵素末端を組み込むためのプライマー。(フレームシフト対策済み)

sodEcoR I (old model)	5'-AAGGAGGAGAATTCTATGCC-3'	Tm 54.3°C
sodrHindIII(old model)	5'-CCCAAGCTTTTACTTCGCTT-3'	Tm 54.3°C

また、Tm の計算は次の式によっておこなった。

$$Tm = 60.8 + 0.41 \times GC\% - 500 / n$$

$GC\% = (G \text{ と } C \text{ の塩基数} / n) \times 100$, $n = \text{プライマーの全塩基数}$

コンピテントセルとプラスミドベクター¹⁴⁾

E. coli JM109 コンピテントセルと pUC18 プラスミドベクターは, TaKaRa co., JAPAN より購入した.

α -相補性選択宿主 *E. coli* JM109

E. coli JM109 は, pUC 系プラスミドベクターDNA による形質転換や M13 ファージベクターDNA による形質導入等を行う際に, ベクターDNA より生成する *lacZ* α ペプチドと JM109F' にコードされる *lacZ* Δ M15 とによる β -ガラクトシダーゼの活性回復 (α -相補性) を利用することにより, 組換え体の選別を容易にする菌株である.

F'プラスミドを有するため, 遺伝子ライブラリーの作製やサブクローニングの他に, M13 ベクターDNA の宿主として一本鎖 DNA の調製にも利用できる.

pUC18 プラスミドベクター

pUC18 は, dideoxy 法による DNA シーケンシングに適したプラスミドベクターで, 選択マーカーとしてアンピシリン耐性をもち, M13 ファージベクターに比べて大きな DNA 断片をクローニングすることができる. *lacZ'* 領域にマルチクローニングサイトを持っており, IPTG と X-Gal を含むプレートで, 外来 DNA の挿入の有無を容易に判別できる. さらに, *lac* プロモーターを利用した外来遺伝子の発現も可能である.

DNA シーケンシングには, M13 Primers を利用するのが便利である.

pUC18/pUC19のクローニングサイト☒



Figure 1 pUC18 プラスミドベクター

タカラバイオ株式会社

(http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?catcd=B1000345&subcatcd=B1000351&unitid=U100003448) より転写.

本文中で用いた略語は下記の通りである.

Amp	アンピシリン
BPB	ブロモフェノールブルー
CBB	クーマシーブリリアントブルー
DMSO	ジメチルスルホキシド
EB	臭化エチジウム
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
IPTG	イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム
PMSF	フェニルメチルスルホニルフルオライド
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ
TAE	Tris-acetate-EDTA
TB	Transformation Buffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	テトラメチルエチレンジアミン
Tris	2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリス)

培地

L'培地

Polypeptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶解させ、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地とする場合は 2% となるように寒天を添加した。主に好熱菌の培養に用いた。

LB 培地

Tryptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶解させ、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地とする場合は 2% となるように寒天を添加した。主に大腸菌の培養に用いた。

LB (ampicillin) 培地

Tryptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶解させ、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地とする場合は 2% となるように寒天を添加した。滅菌後、60°C 以下に冷めてからアンピシリンを終濃度 50 µg/ml で滅菌的にシリンジフィルターを通して添加した。

SOB 培地

Tryptone 5 g, Yeast extract 1.25 g, NaCl 0.1461 g, KCl 0.0466 g を脱イオン水 245 ml に溶解させ、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。使用直前に 1 M MgSO₄, 1 M MgCl₂ をそれぞれ 10 mM になるように (1/100 倍量) 添加した。

LB (ampicillin, IPTG, X-gal) プレート培地

Tryptone 2.0 g, Yeast extract 1.0 g, NaCl 1.0 g, 1 M NaOH 0.2 ml, 寒天 4.0 g を脱イオン水 200 ml に溶解させ、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。滅菌後、60°C 以下に冷めてから、50 mg/ml アンピシリン 200 µl, 100 mM IPTG 200 µl を滅菌的にシリンジフィルターを通して添加し、さらに 20 mg/ml X-gal 400 µl を添加した。作製した培地は冷暗所で保管した。

装置

遠心器 (Centrifuge Micro 6.HG CFM-200 IWAKI 製)
遠心分離機 (Kubota3700 KUBOTA 製)
遠心分離機 (Kubota5200 KUBOTA 製)
遠心分離機 (himac SCR 20B HITACHI 製)
オートクレーブ (MLS-3000 型 SANYO 電機製)
恒温器 (Dry Thermo Unit DTU-18 TAITEC 製)
恒温振盪器 (Micro Incubator M-36 TAITEC 製)
恒温振盪槽 (Personal-11 型 TAITEC 製)
真空遠心乾燥器 (Halogen Vacuum Concentrator HVC-500 IWAKI 製)
サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice TaKaRa 製)
振盪器 (MildMixer SI-36 TAITEC 製)
振盪器 (Shaking Mixer SHM-100 IWAKI 製)
超音波破碎 (SONIFIER250 型 BRANSON 製)
電気泳動槽 (GelMate TOYOBO 製)
電気泳動装置 (AE-6400 型 ATTO 製)
電源装置 (Electrophoresis Power Supply EPS-600 Pharmacia Biotech 製)
デンストグラフ (AB1500 型 ATTO 製)
LED トランスイルミネーター (ゲルみえーる, Wako pure chemical industries 製)
ハイブリダイゼーションオープン (MHS-301 EYELA 製)
分光光度計 (Smart Spec 3000 BIO RAD 製)
分光光度計 (Nanovue Plus, GE Helthcare 製)
保冷槽 (e-Cooling Bucket ECB TAITEC 製)
ボルテックスミキサー (Micro Tube Mixer TMW-4836 IWAKI 製)
ルミノメーター (AccuFLEX Lumi 400 ALOKA 製)
DNA シークエンサー (Prism310 Genetic Analyzer ABI 製)

細菌

好熱菌は、有珠山墳気孔付近から採取した試料土壌より、南部らが分離した細菌、C36株を用いた。この菌の増殖温度範囲は35～75℃、形状は桿菌、グラム染色性は陽性であり、増殖温度よりこの菌は中度好熱菌とされ、*Bacillus stearothermophilus* と分類され、C36株と呼ぶ (Table 1)。

Table 1 C36 株の生理学的, 生化学的諸性質

形状	棒状	ガス生成	
サイズ		グルコース	—
幅(μm)	0.7-0.8	加水分解	
長さ(μm)	2.5-5.0	デンプン	+
孢子	楕円体	ゼラチン	—
カタラーゼ	+	カゼイン	—
VP 反応	—	Tween80	+
VP 培養 pH	5.9	アセキュリン	—
ウレアーゼ	—	下記の使用	
培養条件		クエン酸エステル	—
Medium pH5.7	—	プロピオン酸エステル	—
NaCl 2%	—	チロシンの分解	—
5%	—	NO ₃ から NO ₂ の生成	—
7%	—	インドール	+
10%	—	フェニルアラニンアミナーゼ	—
酸生成		アルギニンジヒドロラーゼ	—
D-グルコース	+		
D-アラビノース	+		
D-キシロース	—		
D-マルトース	+		
D-フルクトース	+		

好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* IFO12550 株は、Institute Fermentation OSAKA (IFO)から購入した。

実験方法

ゲノム抽出

5 ml L'培地に白金耳を用いて好熱菌 C36 株を植菌し, 60°C 100 rpm 16 h 恒温振盪器を用いて前培養をおこなった. その後, 前培養で培養した培養液 1 ml を滅菌済みのピペットを用いて 100 ml L'培地に植菌し, 60°C 120 rpm 6 h 恒温振盪器を用いて本培養をおこなった. 本培養にて培養した培養液全量を 50 ml コーニングチューブに移し, 遠心分離 (himac SCR 20B ローター: R18A, 4°C 3,000 rpm 15 min) により集菌した. 菌体を TNE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA) 5 ml に懸濁し, 遠心分離 (4°C 3,000 rpm 15 min) により集菌した. 菌体に TNE 4.5 ml を加えて懸濁後, 10 mg/ml リゾチーム 0.5 ml を加え, 60°C で 30 min 激しく振盪した. 溶菌液に 10% SDS 0.5 ml を加えて, 穏やかに 15 min 混合した. 等量の TE 飽和フェノールを加えて, 穏やかに 30 min 混合した後, 遠心分離 (4°C 3,000 rpm 10 min) した. 水層に等量の PCIAA を加え, 穏やかに 30 min 混合した後, 遠心分離 (4°C 3,000 rpm 10 min) した. 水層に 2.5 倍量の冷 100% エタノールを加え, 穏やかに混合した後, 遠心分離 (4°C 3,000 rpm 15 min) した. 析出した核酸を, 冷 70% エタノールで 2 回洗浄 (4°C 3,000 rpm 15 min) し, 乾燥後, 適量の TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶かした.

DNA 濃度は分光光度計を用いて測定した. 260 nm において, 2 本鎖 DNA 濃度が 50 ng/ μ l のとき吸光度が 1 になる. また, 260 nm と 280 nm における吸光度の比によって DNA の純度が求められる.

1.5 ml エッペンドルフチューブに DNA 溶液 10 μ l, TE buffer 990 μ l を加えて 100 倍希釈し, 分光光度計で 260 nm および 280 nm における吸光度を測定した.

プラスミドベクター (pUC18) の調製

5 ml LB (ampicillin) 培地に白金耳を用いて大腸菌 JM109 (pUC18) 株を植菌し、37°C 100 rpm 16 h 恒温振盪器を用いて前培養した。その培養液を 100 ml LB (ampicillin) 培地に、滅菌済みピペットを用いて植菌し、37°C 120 rpm 6 h 恒温振盪器を用いて本培養した。培養後、培養液を 50 ml コーニングチューブに分注し、4°C 5,000 rpm 10 min 遠心分離し、上清を除去した。集菌後、冷えた solution I を適量加えて懸濁した。懸濁液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに 100 μ l ずつ分注し、氷上で静置している間に、solution II を調製した。懸濁液に solution II を 200 μ l ずつ加え、静かに転倒混和した後、氷上で 5 min 静置した。これに、冷えた solution III を 150 μ l ずつ加えて混合した後、氷上で 10 min 静置した。4°C 15,000 rpm 6 min 遠心分離し、上清を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これに、1/100 倍量の 10 mg/ml RNase を加え混合し、37°C 45 min インキュベーションした。その後、等量の PCIAA を加え、4°C 15,000 rpm 10 min 遠心分離し、上層を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。これに、2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加え、穏やかに混合し、4°C 15,000 rpm 10 min 遠心分離し、上清を除去した。70% 冷エタノール 1 ml で沈殿を 2 回洗浄後、上清を除去し、真空遠心乾燥器で 5 min 乾燥させた。抽出した DNA を TE buffer に溶解させ、-20°C で保存した。これをクローニング用プラスミドベクター pUC18 (ベクター DNA) 溶液とし、精製して用いた。

JM109 コンピテントセルの作製

大腸菌 JM109 (コンピテントセル用) を 5 ml LB 培地で前培養 (37°C 100 rpm 16~18 h) した後、滅菌済みピペットで 5 ml LB 培地に植菌し、本培養 (37°C 120 rpm 6 h) した。LB プレート培地に本培養液をまき、37°C に一晚静置して単一コロニーを形成させた。単一コロニーを 5 ml LB 培地で前培養 (37°C 100 rpm 16~18 h) した後、5 ml LB 培地に植菌し、本培養 (37°C 120 rpm 4 h) した。培養液を 250 ml SOB 培地に 1 ml 植菌し、培養 (18°C 178 rpm 30 h) した。培養開始から 30 h 経過後より、分光光度計で OD₆₀₀ の測定をした。OD₆₀₀=0.714 となったところで培養を停止し、(これ以降クリーンベンチ内で操作) 培養液を 50 ml コーニングチューブに分注した。その後、すぐに氷水中で 10 min 静置した。遠心分離 (4°C 3,000 rpm 15 min) により集菌し、上清を除去した。菌体を培養液 (250 ml) の 1/3 倍量の氷冷 TB に緩やかに懸濁し、氷水中で 10 min 静置した。遠心分離 (4°C 3,000 rpm 15 min) により集菌し、上清を除去した。菌体を培養液 (250 ml) の 1/12.5 倍量の氷冷 TB に緩やかに懸濁した。終濃度が 7% となるように DMSO を加えて緩やかに混ぜ、氷水中で 10 min 静置した。1.5 ml エッペンドルフチューブに 200 μ l ずつ分注し、液体窒素で急速冷凍するため、液体窒素中に 30 min 静置した。完成したコンピテントセルは、-80°C で保存した。

PCR

200 μ l PCR チューブに、テンプレート DNA 約 100 ng, プライマー 10 pmol, 10 $\times$ Reaction buffer, with $MgCl_2$ 5 μ l, dNTPs mixture, each dNTP 2.5 mM 4 μ l, *Taq* DNA polymerase 0.25 μ l を加え、滅菌超純水で全量を 50 μ l にした。サーマルサイクラーのプログラムは、94°C 5 min, (94°C 30 sec, T_m -5°C 1 min, 72°C 1 min) を 30 サイクル, 72°C 7 min, 4°C ∞ に設定し増幅反応をおこなった。

アガロースゲル電気泳動

1 $\times$ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) に適量のアガロースを溶解させ、ゲルを作製した。ゲルを泳動槽にセットし、電気泳動 buffer として 1 $\times$ TAE をゲルが十分浸るまで注ぎ、ウェルをマイクロピペットで洗浄した。また、DNA サンプルに対して 1/5 倍量の BPB サンプル処理液を加えた。ウェルに分子量マーカーを 6 μ l, サンプルを適量入れ、100 V で 50 min 電気泳動した。泳動後、ゲルを染色用容器に移し、1 $\times$ TAE をゲルが浸るまで注ぎ、0.1 mg/ml EB 染色液を数滴添加して、遮光しながら 1 h 振盪した。染色後、デンシトグラフを用いてゲルに 312 nm の紫外線を照射し、DNA バンドの位置を確認した。

アガロースゲルからの目的 DNA の回収

未精製 DNA 溶液を、アガロース SFR で作製したゲルによる電気泳動および EB 染色した後、紫外線を照射 (312 nm) して目的 DNA のバンドをスパーテルで切り出し、1.5 ml エッペンドルフチューブに入れた。恒温器 (ヒートブロック) を用いて TE buffer と TE 飽和フェノールを 70°C に適量温めておき、1.5 ml エッペンドルフチューブに入れたゲルを 70°C で 10 min 温めて融解させた。融解したゲルの体積を目測し、1.5 倍量の温 TE buffer を加えて混合した。再び、70°C で 10 min 温めた後に等量の温 TE 飽和フェノールを加えてよく混合した。20°C 15,000 rpm 5 min 遠心分離をし、上層を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。等量の TE 飽和フェノールを加えて混合し、20°C 15,000 rpm 5 min 遠心分離をし、上層を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。等量の PCIAA を加えて混合し、20°C 15,000 rpm 5 min 遠心分離をし、上層を 1.5 ml エッペンドルフチューブに移した。その後、エタノール沈殿をおこなった。

アガロースゲルからの目的 DNA の回収 (DNA Gel Extraction Kit)

未精製インサート DNA (制限酵素末端組み込み済み) を電気泳動 (アガロース SFR で作製したゲルを使用) および EB 染色後, 紫外線を照射して目的 DNA のバンドをスパーテルで切り出し, DNA Gel Extraction Kit (Millipore) に入れた. DNA Gel extraction kit には回収率を上げるため, 事前に $1\times$ TAE を $20\ \mu\text{l}$ 加えた. ゲルを入れた DNA Gel extraction kit を 4°C $15,000\ \text{rpm}$ $30\ \text{min}$ 遠心分離した. これにより得られた溶液を DNA 溶液とした.

エタノール沈殿

得られた DNA 溶液に, $1/10$ 倍量の $3\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム, $1/100$ 倍量の Dr.GenTLE precipitation carrier, 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加えて緩やかに混合した. 4°C $15,000\ \text{rpm}$ $10\ \text{min}$ 遠心分離し, 上清を除去した. 70% 冷エタノール $1\ \text{ml}$ で沈殿を 2 回洗浄し, 真空遠心乾燥器を用いて乾燥後, TE buffer に溶解させ, -20°C に保存した.

塩基置換

メガプライマー法により、C36 株 sod の 309 番目の G を T に置換することで、合成されるアミノ酸がグルタミン酸からアスパラギン酸になるように設計した。また同じ方法で、C36 株 sod の 562 番目の A を G に置換することで、合成されるアミノ酸がイソロイシンからバリンになるように設計した。さらに同様に、2 塩基置換 sod を設計した。

一次 PCR において、テンプレートは C36 株ゲノム DNA (約 100 ng) を用い、プライマーは sod279b20 と C36sodrG309T (10 pmol ずつ)、C36sodG309T と sodr1214b20 (10 pmol ずつ) を組み合わせ、それぞれ増幅反応をおこなった。増幅された DNA を front メガプライマー (G309T)、reverse メガプライマー (G309T) とした。目的 DNA を電気泳動により分離し、回収後、精製をおこなった。二次 PCR ではテンプレートを用いず、一次 PCR で得られた DNA をメガプライマーとした。309 番目の G が T に置換した sod を含む DNA 断片である sod (G309T) を作製した。目的 DNA を電気泳動により分離し、回収後、精製をおこなった。方法の概要は figure 2 に示した。同様な方法により、sod (A562G) も作製した。さらに、2 塩基置換 front メガプライマーと reverse メガプライマー (A562G) で二次 PCR をおこなうことで、2 塩基置換 sod を作製した。方法の概要は figure 3 に示した。

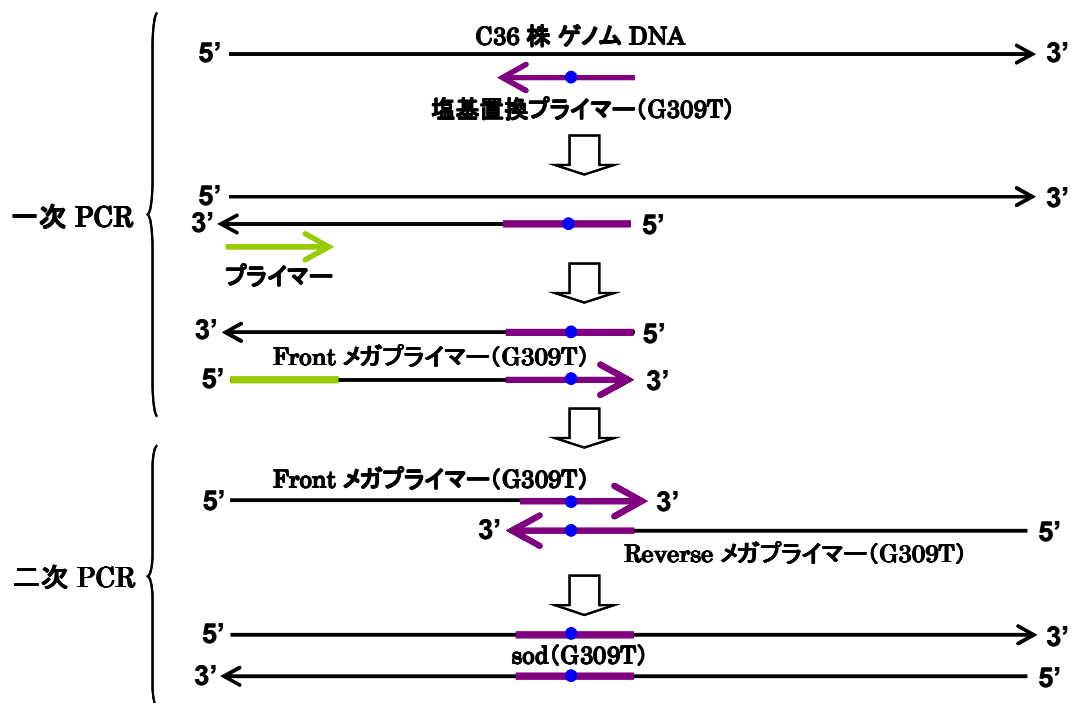


Figure 2 メガプライマー法による 1 塩基置換 *sod* の作製

C36 株ゲノム DNA をテンプレート、*sod279b20* と C36*sodrG309T* をプライマーとして一次 PCR をおこない、front メガプライマー (G309T) を作製した。同様に、C36 株ゲノム DNA をテンプレート、C36*sodG309T* と *sodr1214b20* をプライマーとして一次 PCR をおこない、reverse メガプライマー (G309T) を作製した。

次にテンプレートは用いず、一次 PCR で作製した両メガプライマーだけで二次 PCR をおこない、*sod* (G309T) を含む DNA 断片を作製した。二次 PCR におけるメガプライマーの T_m は、相補領域の部分であるプライマーの T_m を用いた。

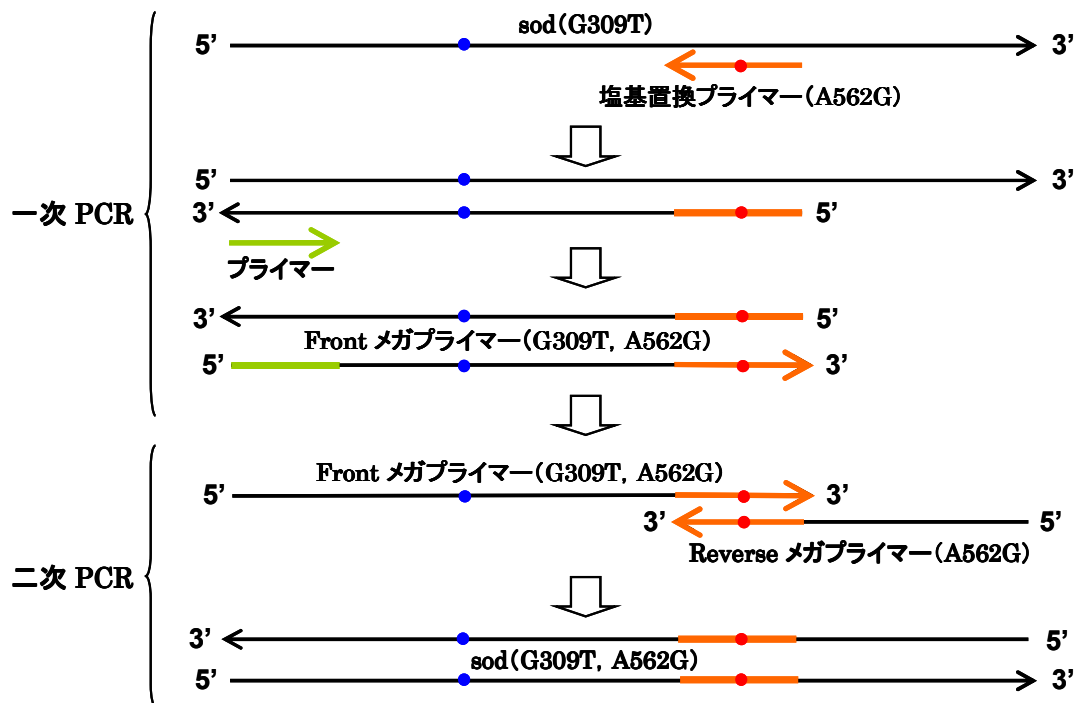


Figure 3 メガプライマー法による 2 塩基置換 *sod* の作製

sod (G309T) を含む DNA 断片をテンプレート、*sod*279b20 と C36*sodr*A562G をプライマーとして一次 PCR をおこない、2 塩基置換 front メガプライマーを作製した。同様に、*sod* (G309T) を含む DNA 断片をテンプレート、C36*sod*A562G と *sodr*1214b20 をプライマーとして一次 PCR をおこない、reverse メガプライマー (A562G) を作製した。

次に、テンプレートは用いず、一次 PCR で作製した両メガプライマーだけで二次 PCR をおこない、2 塩基置換 *sod* (G309T, A562G) を含む DNA 断片を作製した。

塩基配列決定

200 μ l PCR チューブにテンプレート DNA 100~200 ng, プライマー 3.2 pmol, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 2 μ l, Big Dye Terminator v1.1,v3.1 5 $\times$ Sequencing Buffer 1 μ l を加え, 滅菌超純水で全量を 10 μ l にした. サーマルサイクラーのプログラムは, 96°C 1 min, (96°C 10 sec, 55°C 5 sec, 60°C 4 min) を 25 サイクル, 4°C ∞ で増幅反応をおこなった.

0.5 ml エッペンドルフチューブに PCR 産物を全量, 3 M 酢酸ナトリウム 1 μ l, 100% 冷エタノール 33 μ l を加えて混合し, 2°C で 15 min 静置した. 4°C 15,000 rpm 15 min 遠心分離し, 上清を除去した. 70% 冷エタノール 250 μ l を加えて洗浄し, 4°C 15,000 rpm 15 min 遠心分離して上清を除去した後, 真空遠心乾燥器で 5 min 乾燥させた. Formamide 15 μ l を加えてよく混合し, 完全に溶解させた. シークエンス装置にセットし, 塩基配列の解析をおこなった.

制限酵素末端の組込み

塩基置換を含む DNA 断片に制限酵素末端を組込むため, 二次 PCR 後に精製した DNA をテンプレート DNA とし, *sodEcoR I* (old model) と *sodrHindIII* (old model) をプライマーとして使用した. サーマルサイクラーのプログラムは, 94°C 5 min, (94°C 30 sec, 49.3°C 1 min, 72°C 1 min) を 30 サイクル, 72°C 7 min, 4°C ∞ で増幅反応をおこなった. 目的 DNA を電気泳動により分離し, 回収後, 精製をおこなった. 精製した DNA を塩基置換が組込まれ, 制限酵素 *EcoR I* と *HindIII* 認識配列が導入された SOD 遺伝子領域 (インサート DNA) として用いた.

制限酵素処理

1~2 μ g 相当のインサート DNA 溶液およびベクター DNA 溶液を 1.5 ml エッペンドルフチューブにそれぞれ入れ, 同様に制限酵素処理をした. 10 $\times$ B buffer 2 μ l, *HindIII* 1 μ l, *EcoR I* 1 μ l を加え, 全量が 20 μ l となるように滅菌超純水を加えた. 恒温器を用いて 37°C 5 h インキュベーションした後, 67°C 10 min 処理をして酵素を失活させた. エタノール沈殿をおこない, 乾燥後, TE buffer 20 μ l に溶解させた.

Ligation

1.5 ml エッペンドルフチューブに制限酵素処理済みのインサート DNA 117.2 ng, ベクターDNA 100 ng 相当の DNA 溶液を入れて混合し, 全量が 10 μ l となるように TE buffer を加えた. そこに, DNA Ligation kit ver.2.1 solution I 液を 10 μ l 加えてよく混合し, 16°C 2 h インキュベーションした. その後, DNA Ligation kit ver.2.1 solution III 液を 2 μ l 加え, 軽く混合した.

Transformation とブルーホワイトカラーセクション

冷凍保存 (−84°C) している大腸菌 JM109 コンピテントセルを事前に氷中で融かし, 1.5 ml エッペンドルフチューブに 100 μ l 分注した. Ligation 産物を 20 μ l 加え, マイクロピペットで穏やかに混和し, 氷上で 30 min, 42°C 90 sec, 氷上で 2.5 min 静置した. 20% グルコースを 20 μ l, 使用直前に調製した SOB を 1 ml 加え, 37°C 1.5 h インキュベーションした. LB (ampicillin, IPTG, X-gal) プレート培地にマイクロピペットで 100 μ l 塗布し, 37°C で 1~2 晩培養した.

白色コロニーが出来ているのを確認し, 複数の白色コロニーをそれぞれ白金耳で 5 ml LB (ampicillin) 培地に植菌した. これらを 37°C 100 rpm 12 h 培養し, プラスミド抽出をした. 抽出したプラスミドを電気泳動することで, インサートが組み込まれていないプラスミドと比較して約 600 bp 分だけ長いプラスミドを選別し, その菌株を培養した.

菌体内タンパク質の抽出

5 ml LB (ampicillin) 培地に白金耳を用いて形質転換株を植菌し, 37°C 100 rpm 16 h 恒温振盪器を用いて前培養した. 培養後, 培養液を 100 ml LB (ampicillin) 培地に滅菌済みピペットで植菌し, 37°C 120 rpm 6 h (OD_{600} =0.9 以上になるまで) 恒温振盪器を用いて本培養し, 終濃度が 1 mM になるように IPTG をフィルター滅菌して添加した. その後, 4 h 培養を続けた. 培養後, 培養液全量を 100 ml 遠心管に移し, 4°C 5,000 rpm 10 min 遠心分離して上清を除去した. 0.9% NaCl 10 ml を加えてよく懸濁し, 4°C 5,000 rpm 10 min 遠心分離し, 上清を除去した. 同様の操作をもう 1 度おこなった後, PMSF 緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 10 mM 2-メルカプトエタノール (使用直前に添加)) 10 ml を加えて, 泡立たないようにスパーテルでよく懸濁した. 懸濁液を 15 ml のコーニングチューブに移し換え, 懸濁液に透明感が出るまで超音波破碎した (出力 3.5 で 30 sec の破碎を数回). 超音波破碎後の溶液を 50 ml コーニングチューブに移し換え, 4°C 10,000 rpm 10 min 遠心分離して, 上清を 1.5 ml エッペンドルフチューブおよび 15 ml コーニングチューブに分注した. これを菌体内タンパク質とした.

タンパク質定量

タンパク質の定量には、Bradford 法を用いた。BSA (500 μ g/ml) を超純水により段階希釈し、200, 160, 120, 80, 40 μ g/ml の各 BSA 溶液を作成した。CBB solution 2.5 ml に対して、BSA 溶液および試料タンパク質溶液を 50 μ l ずつ加え混合後、5 min 静置した。分光光度計で OD₅₉₅ を測定し、BSA 溶液の検量線より試料中のタンパク質濃度を求めた。

タンパク質電気泳動

SDS-PAGE

SDS 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml, 10% SDS 10 ml, 2-メルカプトエタノール 2 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈し、100℃で 1 min 加熱処理した。Laemmli 法により SDS-PAGE (SDS 用 buffer : Tris 3 g, グリシン 11 g, SDS 1 g を加え、超純水で 1 l にメスアップ) をおこなった。ゲルは既製ゲル (e-パジエル 10-20% ATTO 製) を用い、20 mA で電気泳動をした。

Native-PAGE

Native 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈した。その後、Native 用 buffer (Tris 6 g, グリシン 28 g を加え、超純水で 2 l にメスアップ) を用いて、電気泳動をおこなった。ゲルは既製ゲルを用い、20 mA で電気泳動をした。

CBB 染色

SDS-PAGE をおこなったゲルを、CBB 染色液 (CBB-R 0.5 g, メタノール 250 ml, 酢酸 100 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸し、室温で 1 h 振盪した。染色液を捨て、脱イオン水で洗浄後、脱色液 (メタノール 50 ml, 酢酸 70 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸してキムワイプを入れ、途中でキムワイプを交換しながら、室温で一晩振盪した。脱色後、デンストグラフでゲルの撮影をおこなった。

活性測定

NBT 法による SOD 活性染色 ¹³⁾

Native-PAGE をおこなったゲルを、2.45 mM NBT 溶液（NBT 0.5 g を超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、ハイブリダイゼーションオープンを用い、アルミホイルで遮光しながら 37℃で 15 min 振盪させた。NBT 溶液を捨て、脱イオン水で洗浄後、Immersion 液（リボフラビン 0.011 g を 100 ml にメスアップしたものを 25 ml, TEMED 1.06 ml, 1 M K-Pi buffer (pH 7.8) 9 ml を加え、超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、ハイブリダイゼーションオープンを用い、アルミホイルで遮光しながら 37℃で 20 min 振盪させた。Immersion 液を捨て、脱イオン水で洗浄後、ゲルをガラス板の上に置き、蛍光灯で 5～15 min 照らした。SOD 活性がある部分以外が青く染色されたところで活性バンドを確認し、デンシトグラフでゲルの撮影をおこなった。活性はデンシトグラフで相対的に比較した。

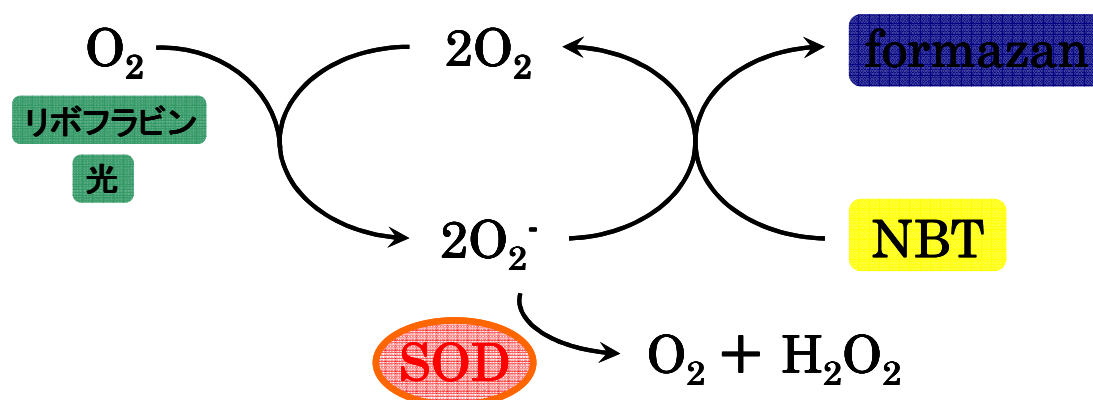


Figure 4 NBT 法による SOD 活性染色

結果

好熱菌 MnSOD 粗酵素における SDS 耐性の比較

SDS はタンパク質変性剤としてよく知られており，タンパク質の高次構造に作用して多量体を解離させ酵素活性を失わせる．そこで，2 種類の好熱菌 *B. stearothermophilus* (C36 株と IFO12550 株) から得た MnSOD 粗酵素を，SDS 終濃度 0, 0.1, 0.2 あるいは 0.3% となるように混合し，Native-PAGE および NBT 法による SOD 活性染色によって残存活性を比較した (figure 5)．

B. stearothermophilus (IFO12550 株) 由来の MnSOD は 0.2% SDS で活性が減少し，0.3% SDS では活性がほとんど消失した．しかし，*B. stearothermophilus* (C36 株) 由来の MnSOD はいずれの SDS 濃度においても活性が保持され，C36 株由来の MnSOD はより高い変性剤耐性を持つことが示唆された．

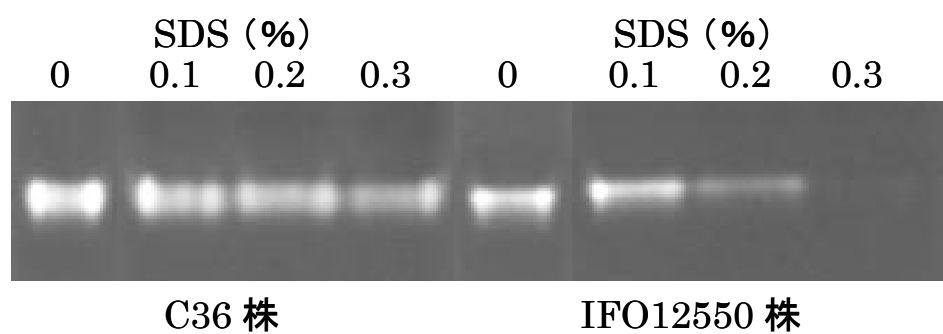


Figure 5 MnSOD 活性に対する SDS の阻害効果

12%未変性ポリアクリルアミドゲルを用いた Native-PAGE (30 mA) をおこなった後、NBT 法による SOD 活性染色をおこなった。

好熱菌 MnSOD の塩基配列とアミノ酸配列の比較

両株から得た MnSOD の変性剤耐性とアミノ酸配列の関連性を明らかにするために、MnSOD をコードする DNA 領域の塩基配列を求め、アミノ酸配列を比較した。

それぞれの塩基配列を比較すると、*B. stearothermophilus* (C36 株) 由来 Mnsod は 615 塩基（開始コドンおよび終止コドンを含む）より構成されており、*B. stearothermophilus* (IFO12550 株) と同長であり、約 95% の相同性が示された⁸⁾ (figure 6)。

一方、アミノ酸配列では、C36 株 MnSOD は 203 残基のアミノ酸より構成されており、MnSOD 特有の共通保存領域を有し、Mn 原子の保持に関わる His26, His81, Asp163, His167 および DXWEHXXY 領域が認められた^{11, 12)}。また、C36 株 MnSOD は、2 ヶ所のアミノ酸 (Asp102Glu, Val187Ile) だけに相違が見られた⁸⁾。この 2 ヶ所のアミノ酸残基はいずれも保存されておらず、102 と 187 の位置はいずれも非保存性アミノ酸であり、活性部位から離れていた (figure 7)。

C36 株	ATGCCATTTGAATTGCCAGCATTGCCGTATCCGTATGATG CGCTT GAGCCGCACATCGACAAAGAAACGATGAACATTCACCACACGAAGCACCATAACA	100
IFO12550 株	ATGCCATTTGAATTGCCAGCATTGCCGTATCCGTATGATGCTCT G GAGCCGCACATCGACAAAGAAACGATGAACATTCACCACACGAAGCACCATAACA	
	CATACGTTACAAATTTGAATGCGGCGCTTGAAGGG C ATCCGGATTTGCAAAACAAATCGCTCGAAGAATTGCTCAGCAATTTGGAAGCCCTTCCGGAAAG	200
	CATACGTTACAAATTTGAATGCGGCGCTTGAAGGACATCCGGATTTGCAAAACAAATCGCTCGAAGAACTGCTCAGCAATTTGGAAGCCCTTCCGGAAAG	
	CATT C GCACGGCGGTGCGCAACAACGGCGGGCGGTCATGCA A ACCACTCGCTTTTCTGGACGATTTTGT C GCCAAATGGCGGCGGTGAGCCGACGGGTGAG	300
	CATCCGCACGGCGGTGCGCAACAACGGCGGGCGGCCATGCG A ACCACTCGCTTTTCTGGACGATTTTGT C GCCAAATGGCGGCGGCGAGCCGACGGGTGAG	
	CTGGCTGAGGG C GATCAACAAAAAATTCGGCAGCTTCACCGCGTTTAAAGACGAGTTTTCGAAAGCAGCGGCCGGCCGTTTCGGTTCTGGCTGGGCATGGC	400
	CTGGCTGACGCCATCAACAAAAAATTCGGCAGCTTCACCGCGTTCAAAGACGAGTTTTCGAAAGCAGCGGCCGGCCGTTTCGGTTCCGGTTGGGCATGGC	
	TTGT C GTGAACAACGGCGAGCTGGAAATTAC G AGCACGCCGAACCAAGACTCGCCGATCATGGAAGGCAAAACGCCGATTCTCGGCTTGGACGTTTGGGA	500
	TTGTTGTGAACAACGGCGAGCTGGAAATCACAAGCACGCCGAACCAAGATT C GCCGATTATGGAAGGCAAAACGCCGATTCTCGGCTTGGACGTTTGGGA	
	GCATGCGTACTACTTGAAATACCAAAACCGCCGTCCGGAATACATTGCCGCATTCTGGAACATTGTCAACTGGGACGAAGTGGCGAAACGGTACAGCGAA	600
	GCATGCGTACTACTTGAAATACCAAAACCGCCGTCCGGAATACATTGCCGCATTCTGGAACGT C GTCAACTGGGACGAAGTGGCGAAACGGTACAGCGAA	
	GCGAAAGC G AAGTAA	615
	GCGAAAGCAAAATAA	

Figure 6 好熱菌 MnSOD の塩基配列の比較

太字は塩基相違部位

C36 株	PFELPALPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQN	50
IFO12550 株	PFELPALPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQN	50
	KSLEELLSNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGGEPTGEL	100
	KSLEELLSNLEALPESIRTA VRNNGGGHANHSLFWTILSPNGGGGEPTGEL	100
	※ AEA INKKFGSFTAFKDEF SKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTPNQDS	150
	ADA INKKFGSFTAFKDEF SKAAAGRFGSGWAWLVVNNGELEITSTPNQDS	150
	PIMEGKTPILGLDVWEHAYY LKYQNR RPEYIAAFWNIVNWDEVAKRYSEA	200
	PIMEGKTPILGLDVWEHAYY LKYQNR RPEYIAAFWNVNVNWDEVAKRYSEA	200
	KAK	
	KAK	

Figure 7 好熱菌 MnSOD のアミノ酸配列の比較

※, C36 株と IFO12550 株の相違アミノ酸 ; ○, MnSOD の保存性領域 ; ●, Mn 保持に関わるアミノ酸

一次 PCR 産物および二次 PCR 産物の作製

塩基置換 sod を作製するために、一次 PCR および二次 PCR をおこなった。

一次 PCR によって作製されるメガプライマーの塩基数は, front メガプライマー (G309T) が 423 bp, reverse メガプライマー (G309T) が 531 bp であり, front メガプライマー (A562G) が 681 bp, reverse メガプライマー (A562G) が 276 bp である。また, 2 塩基置換を作製する場合に用いられる 2 塩基置換 front メガプライマー (G309T A562G) が 681 bp である。

ゲルは 1.5% アガロース S, 泳動 buffer は TAE を使用し, 100 V で一次 PCR 産物を電気泳動した。その結果, それぞれの塩基数の位置に一次 PCR 産物のバンドが確認できた (figure 8)。よって, 設計どおりのメガプライマーが作製できたと考えられた。

相補領域が存在するメガプライマーを使って二次 PCR をおこない, ゲルは 1.5% アガロース S, 泳動 buffer は TAE を使用し, 100 V で電気泳動をおこなった。その結果, テンプレート無のほうに, はっきりとした二次 PCR 産物のバンドが確認できた (figure 9)。このことから, テンプレート無のほうが効率良く, sod (G309T) や sod (A562G), 2 塩基置換 sod (G309T A562G) を作製できることが示された。

また, 二次 PCR によって作製される 1 塩基置換 sod や 2 塩基置換 sod の塩基数は, 935 bp である。二次 PCR 産物を電気泳動した結果, 935 bp の位置に二次 PCR 産物のバンドを確認できた (figure 9)。よって, 設計どおりの sod (G309T) や sod (A562G), 2 塩基置換 sod が作製できたと考えられた。

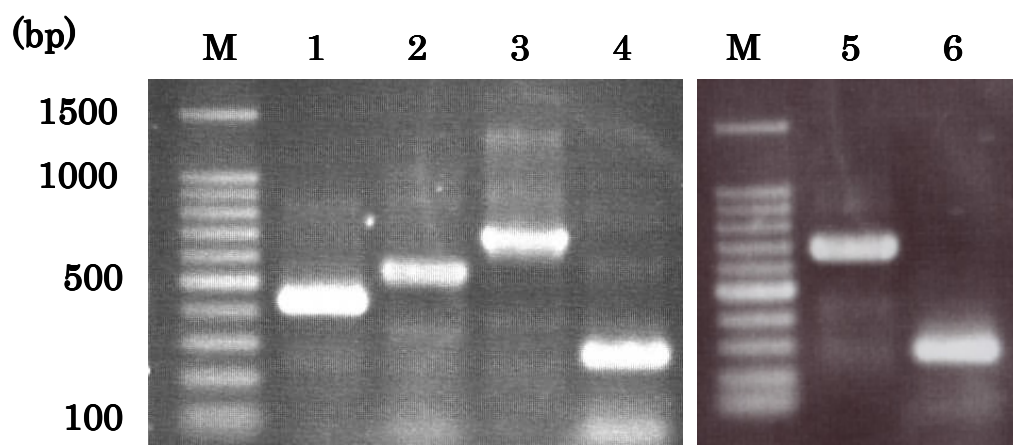


Figure 8 一次 PCR 産物

Lane M	分子量マーカー (100 bp DNA Ladder)	
Lane 1	Front メガプライマー (G309T)	423 bp
Lane 2	Reverse メガプライマー (G309T)	531 bp
Lane 3	Front メガプライマー (A562G)	681 bp
Lane 4	Reverse メガプライマー (A562G)	276 bp
Lane 5	2 塩基置換 Front メガプライマー (G309T A562G)	681 bp
Lane 6	Reverse メガプライマー (A562G)	276 bp

ゲルは 1.5% アガロース S, 泳動 buffer は TAE を使用し, 100 V で電気泳動をおこなった.

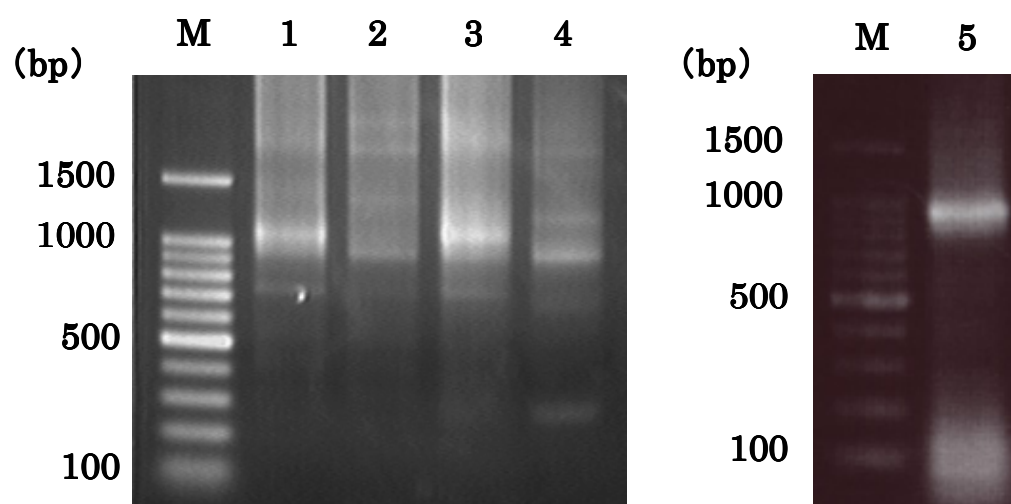


Figure 9 テンプレートの有無における二次 PCR 産物

Lane M	分子量マーカー (100 bp DNA Ladder)
Lane 1	sod (G309T) テンプレート有
Lane 2	sod (G309T) テンプレート無
Lane 3	sod (A562G) テンプレート有
Lane 4	sod (A562G) テンプレート無
Lane 5	2 塩基置換 sod (G309T A562G)

ゲルは 1.5% アガロース S, 泳動 buffer は TAE を使用し, 100 V で電気泳動をおこなった.

1 塩基置換 sod および 2 塩基置換 sod の部分塩基配列

塩基置換 sod の塩基置換部位が，設計どおり置換されているかを確認するため，塩基配列決定をおこなった．

B. stearothermophilus (C36 株) MnSOD の 102 番目のアミノ酸を，グルタミン酸からアスパラギン酸に換えるため，C36 株 sod の 309 番目の塩基を G から T に置換し，塩基配列決定をおこなった．その結果，C36 株 sod の 309 番目の塩基が G から T に置換していた (figure 10)．よって，設計どおりの sod (G309T) が作製できたと塩基配列からでも確認できた．

また，*B. stearothermophilus* (C36 株) MnSOD の 187 番目のアミノ酸を，イソロイシンからバリンに換えるため，C36 株 sod の 562 番目の塩基を A から G に置換し，塩基配列決定をおこなった．その結果，C36 株 sod の 562 番目の塩基が A から G に置換していた (figure 11)．よって，設計どおりの sod (A562G) が作製できたと塩基配列からでも確認できた．

さらに，*B. stearothermophilus* (C36 株) MnSOD の 103 番目と 188 番目のアミノ酸を両方とも換えるため，C36 株 sod の 309 番目の塩基を G から T に置換し，562 番目の塩基を A から G に置換した．塩基配列決定をした結果，C36 株 sod の 309 番目の塩基が G から T に置換し，562 番目の塩基が A から G に置換していた (figure 12)．よって，設計どおりの 2 塩基置換 sod が作製できたと塩基配列からでも確認できた．

5'— 241 AACCACTCGC TTTTCTGGAC GATTTTGTCTG
 271 CCAAATGGCG GCGGTGAGCC GACGGGTGAG
 301 CTGGCTGATG CGATCAACAA AAAATTCTGGC
 331 AGCTTCACCG CGTTTAAAGA CGAGTTTTTCG —3'

Figure 10 sod (G309T) の部分塩基配列

配列は MnSOD シークエンスをプライマーにして求めた.

5'— 500 GAAACAATA ATGAAGCGAA AGCGAAGCGA
 530 CATGGCAAAG CCGTGAAGCA GGGTCAACTG
 560 TTGCAAGGTC TTACGCCGTT ACATAAGGCC
 590 TGCCGCCAAA ACCATAAAGT TCATCATGCG —3'

Figure 11 sod (A562G) の部分塩基配列

配列は MnSOD シークエンスをプライマーにして求めた.

5'— 230 GCGGTCTGCA ACCACTCGCT TTTCTGTCCN NTCTTTGTCTG
 270 GAAATGGCGN TCCCNTGAGC CGACGGGTGA GCTGGCTGA**T**
 310 GCGATCAACA AAAAATTCGG CAGCTTCACC GCGTTTAAAG
 350 ACGAGTTTTTC GAAAGCAGCG GCCGGCCGTT TCGGTTCTGG
 390 CTGGGCATGG CTTGTCTGTGA ACAACGGCGA GCTGGAAATT
 430 ACGAGCACGC CGAACCAAGA CTCGCCGATC ATGGAAGGCA
 470 AAACGCCGAT TCTCGGCTTG GACGTTTGGG AGCATGCGTA
 510 CTACTTGAAA TACCAAAACC GCCGTCCGGA ATACATTGCC
 550 GCATTCTGGA AC**G**TTGTCAA CTGGAANCAA TTNNCGAAA —3'

Figure 12 2 塩基置換 sod の部分塩基配列

配列は MnSOD シークエンスをプライマーにして求めた.

制限酵素末端の組み込み

インサート DNA をベクター DNA に Ligation するため、塩基置換 sod に制限酵素末端を組み込んだ。

sod を含む DNA 断片に制限酵素末端を組み込む場合に、当初使用していたプライマーを figure 13 に示した。

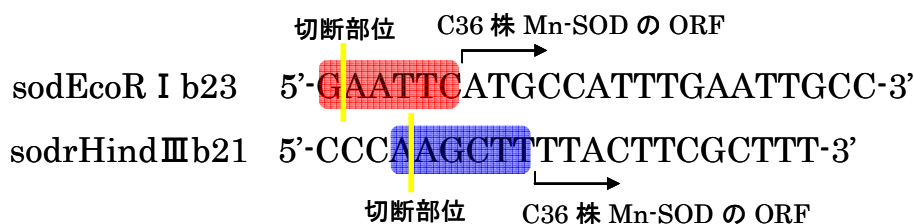


Figure 13 フレームシフト有

しかし、figure 13 の制限酵素末端プライマーを用いたインサート DNA (621 bp) で Transformation をおこなった結果、全く形質転換株を得ることができなかった。

そこで、本研究室の安部が使用していた制限酵素末端プライマー (figure 14) を用いてみることにした。

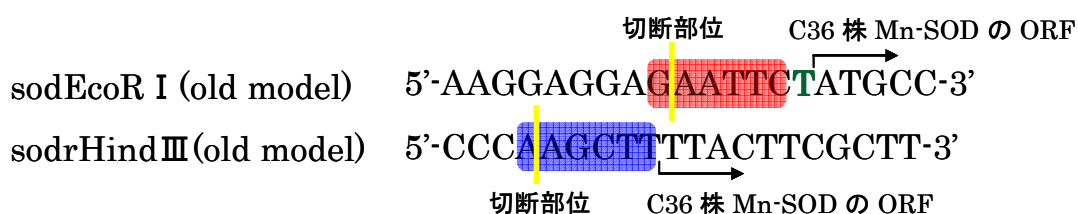


Figure 14 フレームシフト無

figure 14 の制限酵素末端プライマーを用いたインサート DNA (622 bp) で Transformation をおこなった結果、形質転換株を得ることに成功した。

figure 13 と figure 14 の制限酵素末端プライマーを見比べてみると、figure 14 は EcoR I プライマーの制限酵素末端領域と sod の開始コドン (ATG) の前に **T** が挿入されていた。この **T** の挿入によって、フレームシフトを起こすことなく MnSOD を発現させることができたと考えられた。

形質転換株のブルーホワイトカラーセレクション

形質転換株を選別するために、ブルーホワイトカラーセレクションをおこなった。

インサート DNA を組込んだベクターDNA (pUC18) を、*E. coli* JM109 コンピテントセルに Transformation し、LB (ampicillin, IPTG, X-gal) プレート培地で形質転換株のブルーホワイトカラーセレクションをおこなった (figure 15)。このシャーレより、白色コロニーを選別した。

選別した白色コロニーを培養し、プラスミド抽出をおこなって電気泳動により確認することで、確実にインサート DNA が組込まれているものを選び出した。

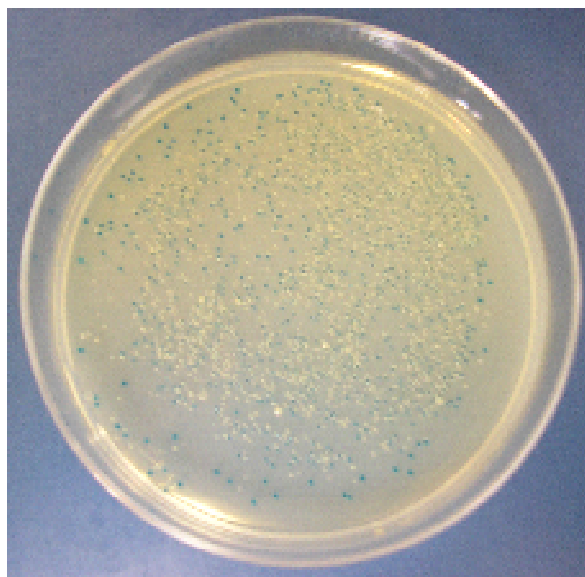


Figure 15 形質転換株のブルーホワイトカラーセレクション

JM109 (pUC18) 系による recombinant MnSOD の発現

選別した形質転換株について、recombinant MnSOD の発現およびその活性を確認するために、SDS-PAGE および native-PAGE をおこなった。

recombinant MnSOD について、ゲルは 10-20% e-パジエルを用い、20 mA で SDS-PAGE をした後、CBB 染色をおこなった (figure 16)。

すべての recombinant MnSOD において、MnSOD 標準サンプルと同じ位置 (約 25 kDa) にバンドを確認することができた。

次に、recombinant MnSOD について、ゲルは 10-20% e-パジエルを用い、20 mA で native-PAGE をした後、NBT 法による SOD 活性染色をした。また、それとは別に CBB 染色もおこなった (figure 17)。

すべての recombinant MnSOD において、SOD 活性染色で四量体の活性を確認することができた。また、recombinant MnSOD (187 Ile→Val) においてだけ、SOD 活性染色で二量体の活性を確認することができなかった。しかし、CBB 染色では二量体の部分にタンパク質を確認することができた。

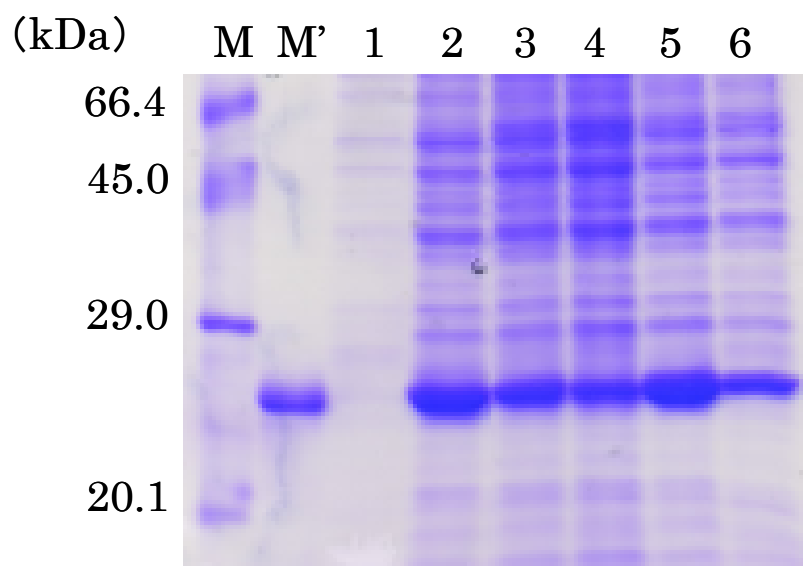


Figure 16 recombinant MnSOD の SDS-PAGE

- Lane M 分子量マーカー
- Lane M' MnSOD 標準サンプル
- Lane 1 *E. coli* JM109
- Lane 2 recombinant MnSOD (C36)
- Lane 3 recombinant MnSOD (102 Glu→Asp)
- Lane 4 recombinant MnSOD (187 Ile→Val)
- Lane 5 recombinant MnSOD (102 Glu→Asp, 187 Ile→Val)
- Lane 6 recombinant MnSOD (IFO12550)

ゲルは 10-20% e-パジエルを用い、20 mA で SDS-PAGE をした後、CBB 染色をおこなった。

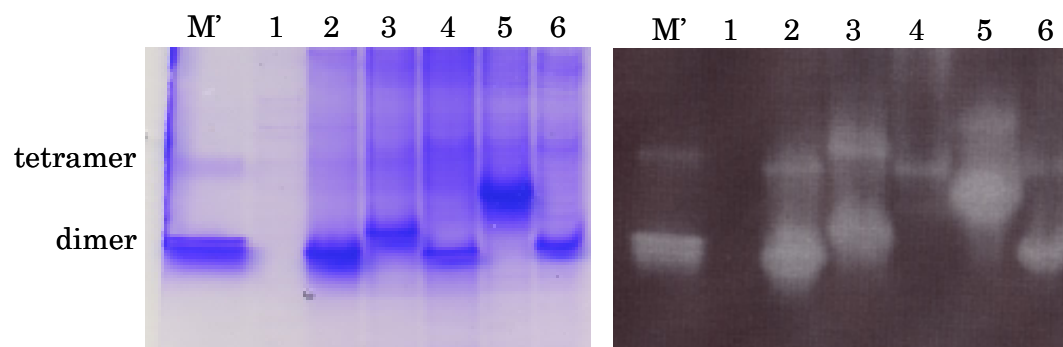


Figure 17 recombinant MnSOD の native-PAGE

Lane M'	MnSOD 標準サンプル
Lane 1	<i>E. coli</i> JM109
Lane 2	recombinant MnSOD (C36)
Lane 3	recombinant MnSOD (102 Glu→Asp)
Lane 4	recombinant MnSOD (187 Ile→Val)
Lane 5	recombinant MnSOD (102 Glu→Asp, 187 Ile→Val)
Lane 6	recombinant MnSOD (IFO12550)

左が CBB 染色, 右が NBT 法による SOD 活性染色

ゲルは 10-20% e-パジエルを用い, 20 mA で native-PAGE をした後, NBT 法による SOD 活性染色をおこなった. また, それとは別に CBB 染色もおこなった.

考察

E. coli JM109 (pUC18) 系によって、recombinant MnSOD を発現させることは可能ではあったが、SOD 活性が失われてしまっている recombinant MnSOD が確認された。また、活性が確認できた recombinant MnSOD についても、native-PAGE でのゲル上における recombinant MnSOD の位置がそれぞれで異なっていた (figure 17)。

これは、荷電アミノ酸が偶発的に置換されてしまったことによって、タンパク質全体の荷電が変化してしまったことが原因だと考えられ、本来の目的以外の場所で塩基置換が起こっているのではないかと考えられる。また、recombinant MnSOD を恒常的に発現させることも困難であった。

以上のことから、より高率に recombinant MnSOD を発現させることが可能な発現系にすることが必要となり、そのために *E. coli* BL21 (pCold I) 系における recombinant MnSOD の発現を次に検討した。

参考文献

- 1) 堀越 弘毅 (1988), 極限環境微生物, 講談社サイエンティフィック
- 2) Brock T.D. ed. 1986. Thermophiles. Wiley-Interscience
- 3) Argos P, Rossman MG, Grau UM, Zuber H, Frank G. and Tratschin JD. 1979. Thermal stability and protein structure. Biochemistry.; 18(25): 5698-5703
- 4) Yutani K, Ogasawara K, Sugino Y, Matsushiro A. 1977. Nature; 267: 274-275
- 5) McCord J.M and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem.; 244: 6049-6055
- 6) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp.; 65: 77-93
- 7) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem.; 64: 97-112
- 8) 安部 芳郎 (2004), 修士論文, 室蘭工業大学
- 9) 草薨 潤栄 (2007), 修士論文, 室蘭工業大学
- 10) 鶴 純人 (2007), 修士論文, 室蘭工業大学
- 11) Brock C.J and Walker J.E. 1980. Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. Complete amino acid sequence of a manganese enzyme. Biochemistry; 19: 2873-2882
- 12) Ludwig M.L, Metzger A.L, Patridge K.A and Stallings “. C. 1991. Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*, A Structural model refined at 1.8A resolution. J. Mol. Bio.; 219: 335-358
- 13) Beauchamp C and Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and as

assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*; 44: 276-287

14) タカラバイオ株式会社 ホームページ

第 2 部

SOD 活性測定法の検討

目次

緒言.....	53
SOD 活性測定法の種類.....	55
Cytochrome C 還元法.....	55
ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法.....	55
亜硝酸法.....	56
ORAC 法.....	56
SOD 活性測定法の検討.....	58
参考文献.....	59

緒言

活性酸素は大気中に存在する分子状酸素（三重項酸素）に比べて活性化された酸素分子であり、ROS（Reactive oxygen species）あるいはROI（Reactive oxygen intermediates）などと呼ばれている。その中には、いわゆるフリーラジカルと非フリーラジカルがあり、これらの分子種を総称して活性酸素フリーラジカルとよぶこともある。この中でフリーラジカルはスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカルなどで、非ラジカルはオゾン、過酸化水素などである。

これらにはDNAやタンパク質を切断したり、脂質を酸化したりする作用があり、生体に悪影響を与える。このような酸化ストレスに対して、生物は様々な防御機構をもっており、ビタミンCやビタミンE、βカロテンなどの抗酸化物質、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素がそれである。この中でもスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）は、活性酸素であるスーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化することができる^{1,2,3,4}。

活性酸素は過酸化水素を除いて不安定なため、直接定量することは極めて難しい。スーパーオキシドは無極性溶媒中の方が極性溶媒よりも寿命が長い⁵が、生体反応では後者にならない。

SODの活性すなわちスーパーオキシドの定量法は、従来から様々な方法が報告されている。チトクロムc還元法、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）法、エピネフリン酸化法、テトラニトロメタン法、乳酸脱水素酵素法などがある。

チトクロムc還元法は、チトクロムcが1電子を受け取ると550 nmに強い吸収を持つ還元型に変化する反応を用いるため、測定が容易である。しかし、反応速度が遅く、連鎖反応もないことから半定量にとどまる⁴。また、チトクロムc濃度のモニターが必要であり、連続測定しなければならず、多検体には不利である。しかしながら、SODの発見以来、SODの活性測定法のもっとも標準的な方法として認知されている。

ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）法は、スーパーオキシドによりNBTが還元されると不溶性のフォルマザンが生じることを利用したものである。反応速度はチトクロムc還元法と同等のため、半定量にとどまるが、500 nmの吸光度測定による簡便さのほか、電気泳動法と併用した活性染色法（ザイモグラム）が可能⁶なため、複数の試料を簡便に比較できる。NBT法の最も大きな欠点は、SODの阻害曲線においてSOD濃度を高くしても100%の阻害が得られないことである⁵。同仁などから改良を加えて、水溶性のテトラゾリウムXTTを利用し、テトラゾリウムの欠点を克服した測定キットが市販されているように、広く活用されている測定法である。

エピネフリン酸化法はエピネフリンがスーパーオキシドにより酸化されると、赤色のアドレノクロームを生じ480 nmでの定量が可能になる。しかし、中性pH付近では反応速度

が低いうえ、鉄イオンによる副反応が生じることがある。

最近、ルシフェリンを用いた化学発光法が注目されている。生理的 pH における安定な発光をえるため、プローブはウミホタルルシフェリン類縁体 (MCLA) が利用されている、また、ルミノールと金属のフェントン反応を利用し、高感度測定を可能にしたキットがアロカから販売されている。

さらに、抗酸化能は食品科学で重要な指標となっており、抗酸化能を有する物質の標準化のために、他の方法とも相関が取れており、公的機関では ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity : 活性酸素吸収能力) 試験が決められた。この単位は $\mu\text{mol TE/l}$ (または $\mu\text{mol TE/kg}$)。TE は、トロロックス当量 (trolox equivalent) である。標準物質は、水溶性ビタミン E の 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid。

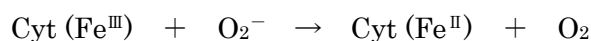
以上のことから本研究では、様々な SOD 活性測定法の中から、目的に合った最適な測定法の検討をおこなった。

SOD 活性測定法の種類⁴⁾

SOD の活性測定は基質である O_2^- が不安定であるため、 O_2^- を產生させる系で SOD が存在すると反応が阻害されることを利用した間接法が一般的である。すなわち、 O_2^- による発色を SOD が阻害する割合により活性を定義している。代表的な測定法として次のものがあげられる。

Cytochrome C 還元法

Cytochrome C は 1 電子を受けると 550 nm に強い吸収を持つ還元型に変化する。



この方法は測定が容易であることと、Cyt (Fe^{II}) の自動酸化が遅いこと、連鎖反応がないことから O_2^- の半定量法として広く用いられている。しかし、反応プローブそのものを直接還元する系が試料に存在する場合の O_2^- 検出には適さない。

ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法

NBT は O_2^- により還元されると formazan (吸収極大 560 nm) を生じる。 O_2^- と NBT の反応速度定数は cytochrome C のそれとほぼ同等である。しかし、NBT は適当な基質の存在下で酵素により還元を受ける (基質は酸化される) ため、反応産物量が O_2^- 生成量として評価できない場合がある。また、本法の利点は、NBT 還元により生じる formazan が不溶性で、 O_2^- の生成部位に沈着し光透過を防げることでもある。

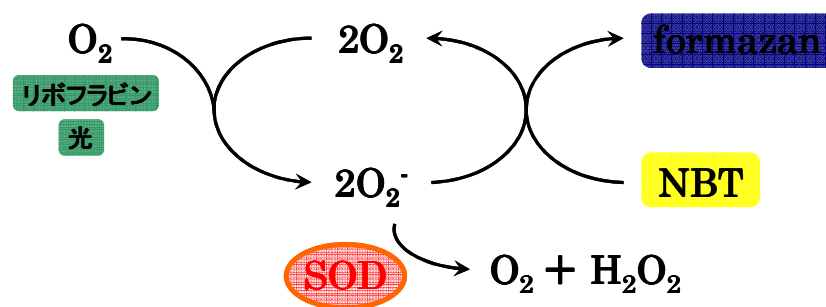


Figure 1 NBT 法による SOD 活性染色

亜硝酸法⁶⁾

O_2^- によりヒドロキシルアミンを亜硝酸に酸化し、生成した亜硝酸をスルファニル酸、 α -ナフチルアミンと反応させ、生じる紅色の呈色物質を 553 nm で測定する。本法は感度が高く、夾雑タンパク質による影響が少ない。

ORAC 法⁷⁾

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity : 活性酸素吸収能力) は、蛍光物質である Fluorescein を蛍光プローブとして使用し、一定の活性酸素の存在下で分解される Fluorescein の蛍光強度を経時的に測定し、その変化を指標として抗酸化力を測定する方法である。この反応系に抗酸化物質が共存すると、Fluorescein の蛍光強度の減少速度が遅延するため、標準物質である Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 存在下の Fluorescein の減少速度の遅延度合いと比較して、標準物質に換算したサンプルの抗酸化力を算出する。

サンプル溶液、または標準物質溶液 (Trolox) に蛍光プローブ (Fluorescein) を添加し、ラジカル発生剤として AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) を用いて活性酸素を発生させると、活性酸素により Fluorescein が酸化される。Fluorescein の酸化物は蛍光を有しないため、蛍光強度が経時的に減少する。サンプルが抗酸化力を有する場合、抗酸化物質により活性酸素が消去され Fluorescein の酸化が抑制されるため、抗酸化物質が存在しない場合 (ブランク) に対して Fluorescein の蛍光強度が持続し、減少速度が遅延する。

サンプル、または Trolox とブランクの蛍光強度を縦軸、測定時間を横軸にプロットし、サンプル、または Trolox の蛍光強度の曲線下面積 (Area Under the Curve ; AUCsample, または AUCTrolox) とブランクの曲線下面積 (AUCblank) の差、つまり斜線部分の面積を算出し、それぞれを netAUCsample, netAUCTrolox という (figure 2)。標準物質の netAUCTrolox からサンプルの netAUCsample に相当する Trolox 濃度を検量線によって求め、サンプル 1 g 当りの Trolox のマイクロモル数として ORAC 値を算出する。単位として $\mu\text{mole TE} / \text{g}$ (TE : Trolox Equivalent) が使用される。

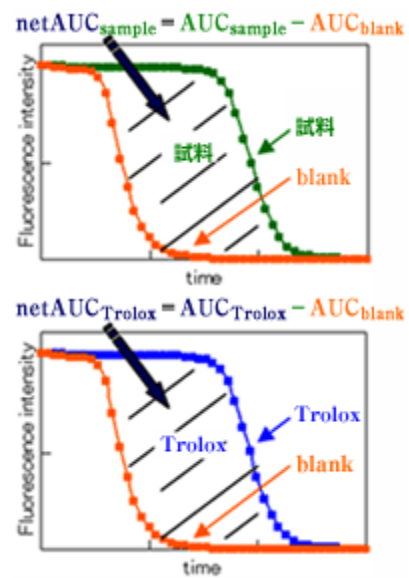


Figure 2 netAUC の算出法

財団法人 食品分析開発センター SUNATEC

(<http://www.mac.or.jp/mail/080801/02.shtml>) より転写.

SOD 活性測定法の検討

SOD 活性測定法には先ほど述べたように様々な種類が存在する．しかし，それらにはそれぞれ長所や短所があり，状況に応じて測定方法を使い分けることが必要となる．

本研究では，native-PAGE 後のゲル上における SOD 活性測定では，広く一般的に使われている NBT 還元法による SOD 活性染色を選択した．これは，NBT が還元されて生じる不溶性の formazan が光透過を妨げることで，ゲル上における染色方法としては有効であるからだと考えたからである．

また，溶液系における SOD 活性測定については，これまで，活性酸素をルミノール発光で捕らえることで活性酸素量を測定する，抗酸化能測定キット ラジカルキャッチ（ALOKA）を使用してきたが，本研究では，近年スタンダードになりつつある ORAC 法を利用した，抗酸化能測定キット ラジカルキャッチ II（ALOKA）を選択した．ORAC 法を使うことで，SOD 活性値を標準物質である Trolox 換算で示すことができるからである．

参考文献

- 1) McCord J.M and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem.; 244: 6049-6055
- 2) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp.; 65: 77-93
- 3) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem.; 64: 97-112
- 4) 谷口 直哉 監修 (1994), 活性酸素実験プロトコール, 秀潤社
- 5) Beauchamp C and Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and as assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry; 44: 276-287
- 6) 佐野 満昭, 富田 勲 (1992), 抗酸化酵素の測定, 化学と生物 ; Vol.30, No.11 : 743-747
- 7) 一般財団法人食品分析開発センター SUNATEC ホームページ

第 3 部

MnSOD の変性剤耐性への影響

BL21 (pCold I) 発現系による実験

目次

緒言.....	63
材料.....	65
試薬.....	65
培地.....	69
実験方法.....	70
ゲノム抽出.....	70
プラスミドベクター(pCold I)の調製.....	70
PCR.....	71
アガロースゲル電気泳動.....	71
アガロースゲルからの目的 DNA の回収.....	71
エタノール沈殿.....	72
塩基置換.....	72
塩基配列決定.....	73
制限酵素処理.....	73
Ligation.....	73
Transformation.....	74
菌体内タンパク質の抽出.....	74
タンパク質定量.....	75
タンパク質電気泳動.....	75
SDS-PAGE.....	75
Native-PAGE.....	75
CBB 染色.....	75
活性測定.....	76
NBT 法による SOD 活性染色.....	76
ORAC 法による SOD 活性測定.....	77

結果.....	78
recombinant MnSOD における SDS 耐性の比較.....	78
1 残基置換 recombinant MnSOD における SDS 耐性の比較.....	81
考察.....	84
参考文献.....	85

緒言

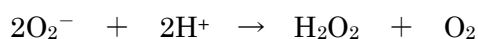
自然界には様々な環境があり、熱的な環境でいえば酷寒から酷熱までの環境がある。通常、生物はあまり極端な環境下では生育しないものであるが、下等生物になると酷寒、酷熱下といった環境下で生育するものもある。そのような酷熱環境下でも生育できる好熱菌とは、通常 55℃以上で生育できる菌を指し、このうち、90℃以上でも生育できる菌を超好熱菌、75℃以上でも生育できる菌を高度好熱菌、それ以下のものは中度好熱菌とよぶ。中度好熱菌には、*Bacillus* 属をはじめ各種の属に所属するものが知られているが、代表的なものは *Bacillus stearothermophilus* である。

好熱菌が生産する酵素は一般的に次のような特徴を有している。

- ① 熱に対して安定であり、その安定性は細胞から取り出しても失われないものが多い。
- ② 熱だけでなく変性剤（界面活性剤や尿素）にも耐性が高い。
- ③ アミノ酸組成や一次配列も、相当する常温生物のものに類似している。すなわち、ごくわずかな変化が好熱菌の生産する酵素の安定性に関係している。

このような観点から、好熱菌が生産する酵素はその高い安定性により、発酵工業、化学工業、医療分野などで現在広く利用されている^{1, 14)}。

生物は呼吸により酸素を体内に取り入れると、活性酸素が副産物として発生する。活性酸素には、スーパーオキシドアニオンラジカル、過酸化水素、ヒドロキシラジカルなどがある。これらには、DNA やタンパク質、脂質を酸化したりする作用があり、生体に悪影響を与える。このような酸化ストレスに対して、生物は様々な防御機構を有しており、ビタミン C やビタミン E、βカロテンなどの抗酸化物質、スーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素がそれである。これらの抗酸化物質および抗酸化酵素は、好気性生物にとって非常に重要な役割を演じている。その中でもスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は、スーパーオキシドアニオンラジカルを酸素と過酸化水素に不均化することができる^{2, 9, 10)}。



SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn 型、Mn 型、Fe 型などがあり、同じサブユニットからなるホモ二量体 (MnSOD や FeSOD では時に四量体) である。さらに、MnSOD は単量体、二量体、四量体のどの高次構造においても活性があることが知られており、真核生物と原核生物の両方に存在していることから、生物共通の SOD であると考えられる^{2, 9, 10)}。

本研究室の佐藤、安部の研究により、*Bacillus stearothermophilus* (C36 株) は標準的な中度好熱菌である *Bacillus stearothermophilus* (IFO12550 株) と近縁であるが、変性

剤に対する耐性が高いことや、102 番目のアミノ酸であるアスパラギン酸がグルタミン酸に、187 番目のアミノ酸であるバリンがイソロイシンに置換されていることが明らかになった。また、187 番目の Ile は C 末端領域に含まれており、二量体構造の安定性に影響を与えていると報告した^{3,4)}。

本研究では、中度好熱菌の C36 株と IFO12550 株から得られた MnSOD の活性を比較し、変性剤に対する耐性の違いが非保存性領域のアミノ酸置換によるものであることを示した。このことは、SOD のさらなる医療や臨床検査などへの利用を広げるものとする。

材料

試薬

プライマー

以下のプライマーは北海道システムサイエンスに合成を依頼した。

sodNde I	5'-GGCTCGAGCATATGCCATTTGAATTGCC-3'	Tm 63.4°C
----------	------------------------------------	-----------

C36sodrEcoR I	5'-CCGGAATTCTTACTTCGCTTTCGCTTC-3'	Tm 62.0°C
---------------	-----------------------------------	-----------

制限酵素末端を組み込んだ C36 株 sod を増幅させるためのプライマー。

C36sodG309T	5'-GAGCTGGCTGATGCGATCAAC-3'	Tm 60.4°C
-------------	-----------------------------	-----------

C36sodrG309T	5'-GATCGCATCAGCCAGCTCACC-3'	Tm 62.4°C
--------------	-----------------------------	-----------

sod (G309T) を増幅させるためのプライマー。

C36sodA562G	5'-TTCTGGAACGTTGTCAACTGG-3'	Tm 56.5°C
-------------	-----------------------------	-----------

C36sodrA562G	5'-CCAGTTGACAACGTTCCAGAA-3'	Tm 56.5°C
--------------	-----------------------------	-----------

sod (A562G) を増幅させるためのプライマー。

コンピテントセルとプラスミドベクター¹⁷⁾

E. coli BL21 コンピテントセルと pCold I プラスミドベクターは、TaKaRa co., JAPAN より購入した。

E. coli BL21

E. coli BL21 株は、*lon* プロテアーゼ、*ompT* 外膜プロテアーゼを欠損した B 株由来の菌株である。

発現タンパク質の安定性の向上が期待できるため、組換えタンパク質の発現に広く用いられている。

pCold I プラスミドベクター

大腸菌コールドショック遺伝子 *cspA* のプロモーター配列と 5' 非翻訳領域を利用した新しいタンパク質発現システムである。*cspA* プロモーターの下流には発現を厳密に制御するための *lac operator* が挿入されている。本ベクターを用いて低温で発現誘導することにより、宿主大腸菌由来タンパク質の合成が抑制され、目的タンパク質のみを高効率に得ることができる。従来の大腸菌発現系と比較して発現量や可溶性度の向上が期待できる。

また TEE 配列、His タグ配列、Factor Xa 切断配列を持つため発現後のタンパク精製が簡便である。

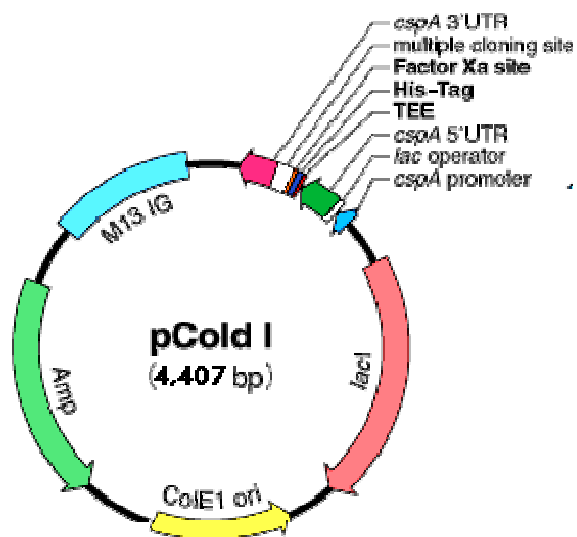


Figure 1 pCold I プラスミドベクター

タカラバイオ株式会社

(http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?catcd=B1000420&subcatcd=B1000421&unitid=U100004327) より転写.

本文中で用いた略語は下記の通りである.

Amp	アンピシリン
BPB	ブロモフェノールブルー
CBB	クーマシーブリリアントブルー
DMSO	ジメチルスルホキシド
EB	臭化エチジウム
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
IPTG	イソプロピル- β -D(-)-チオガラクトピラノシド
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム
PMSF	フェニルメチルスルホニルフルオライド
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ
TAE	Tris-acetate-EDTA
TB	Transformation Buffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	テトラメチルエチレンジアミン
Tris	2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリス)

培地

L'培地

Polypeptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶かし、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地の場合は、2%となるように寒天を添加した。

LB (chloramphenicol) 培地

Tryptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶かし、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地の場合は、2%となるように寒天を添加した。滅菌後、60°C以下に冷めてから chloramphenicol を終濃度 20 µg/ml で滅菌的に添加した。

LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地

Tryptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶かし、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。また、固体培地の場合は、2%となるように寒天を添加した。滅菌後、60°C以下に冷めてから chloramphenicol を終濃度 20 µg/ml, ampicillin を終濃度 50 µg/ml で滅菌的に添加した。

LB (chloramphenicol, ampicillin, tetracycline) 培地

Tryptone 1.0 g, Yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g を脱イオン水 100 ml に溶かし、オートクレーブ (121°C 20 min) で滅菌した。滅菌後、60°C以下に冷めてから chloramphenicol を終濃度 20 µg/ml, ampicillin を終濃度 50 µg/ml, tetracycline を終濃度 5 ng/ml で滅菌的に添加した。

実験方法

ゲノム抽出

5 ml L'培地に好熱菌を植菌し、60℃ 100 rpm 16 h 前培養した。前培養液を 100 ml L'培地に植菌し、60℃ 120 rpm 6 h 本培養した。本培養液を 50 ml コーニングチューブに移し、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) により集菌した。菌体を TNE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA) 5 ml に懸濁し、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) により集菌した。菌体に TNE 4.5 ml を加えて懸濁後、10 mg/ml リゾチーム 0.5 ml を加え、60℃で 30 min 激しく振盪した。溶菌液に 10% SDS 0.5 ml を加えて、穏やかに 15 min 混合した。等量の Tris 飽和フェノールを加えて、穏やかに 30 min 混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 10 min) した。水層に半等量ずつ Tris 飽和フェノールと CIA を加え、穏やかに 30 min 混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 10 min) した。水層に 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加え、穏やかに混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) した。析出した核酸を 70% 冷エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶かした。

プラスミドベクター (pCold I) の調製

5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に大腸菌 BL21 (pG-Tf2, pCold I) 株を植菌し、37℃ 100 rpm で培養した。培養液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 1 min) し、上清を除去した。菌体に冷えた solution I を 100 µl 加えて懸濁し、氷上で静置した。懸濁液に solution II を 200 µl 加え、静かに転倒混和した後、氷上で 5 min 静置した。これに、冷えた solution III を 150 µl 加えて混合した後、氷上で 10 min 静置し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 6 min) した。上清に 1/100 倍量の 10 mg/ml RNase を加えて混合し、37℃で 45 min インキュベーションした。その後、半等量ずつ Tris 飽和フェノールと CIA を加え、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 10 min) した。水層に 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加え、穏やかに混合し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 10 min) した。析出した核酸を 70% 冷エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の TE buffer に溶かした。その後、精製をおこないプラスミドベクター (pCold I) とした。

PCR

200 μ l PCR チューブに、テンプレート DNA 約 100 ng, プライマー 10 pmol, 10 $\times$ Reaction buffer with MgCl₂ 5 μ l, dNTPs mixture each dNTP 2.5 mM 4 μ l, *T_{bp}* DNA polymerase 0.25 μ l を加え、滅菌超純水で全量を 50 μ l にした。サーマルサイクラーのプログラムは、94 $^{\circ}$ C 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 sec, T_m-5 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min) を 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C ∞ に設定し増幅反応をおこなった。

アガロースゲル電気泳動

1 $\times$ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) に適量のアガロースを溶解させ、ゲルを作製した。ゲルを泳動槽にセットし、電気泳動 buffer として 1 $\times$ TAE をゲルが十分浸るまで注ぎ、ウェルをマイクロピペットで洗浄した。また、DNA サンプルに対して 1/5 倍量の BPB サンプル処理液を加えた。ウェルに分子量マーカーやサンプルを適量入れ、100 V で 50 min 電気泳動した。泳動後、ゲルを染色用容器に移し、1 $\times$ TAE をゲルが浸るまで注ぎ、1 mg/ml EB 染色液を数滴添加して、遮光しながら 1 h 振盪した。染色後、デンストグラフを用いてゲルに 312 nm の紫外線を照射し、DNA バンドの位置を確認した。

アガロースゲルからの目的 DNA の回収

未精製 DNA 溶液を、アガロース SFR で作製したゲルによる電気泳動および EB 染色をした後、LED を照射して目的 DNA のバンドをスパーテルで切り出し、エッペンドルフチューブに入れた。ヒートブロックを用いて TE buffer と Tris 飽和フェノールを 70 $^{\circ}$ C に適量温めておき、エッペンドルフチューブに入れたゲルを 70 $^{\circ}$ C で 10 min 温めて融解させた。融解したゲルの体積を目測し、1.5 倍量の温 TE buffer を加えて混合した。再び、70 $^{\circ}$ C で 10 min 温めた後に等量の温 Tris 飽和フェノールを加えてよく混合した。遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。等量の Tris 飽和フェノールを加えて混合し、遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。半等量ずつの Tris 飽和フェノールと CIA を加えて混合し、遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。その後、エタノール沈殿をおこなった。

エタノール沈殿

得られた DNA 溶液に, 1/10 倍量の 3 M Sodium acetate (pH 5.2), 1/100 倍量の Dr.GenTLE Precipitation Carrier, 2.5 倍量の 100%冷エタノールを加えて緩やかに混合した. 遠心分離 (4°C 15,000 rpm 10 min) をおこない, 上清を除去した. 70%冷エタノールで沈殿を洗浄し, 乾燥後, 適量の TE buffer に溶解させた.

塩基置換

メガプライマー法により, *B.stearothermophilus* (C36 株) sod の 309 番目の G を T に置換することで, 合成されるアミノ酸がグルタミン酸からアスパラギン酸になるように設計した. また同じ方法で, *B.stearothermophilus* (C36 株) sod の 562 番目の A を G に置換することで, 合成されるアミノ酸がイソロイシンからバリンになるように設計した.

一次 PCR において, テンプレートには *B.stearothermophilus* (C36 株) ゲノム DNA を用い, プライマーには sodNde I と C36sodrG309T, C36sodG309T と C36sodrEcoR I を組み合わせ, それぞれ増幅反応をおこない, 精製した. 増幅された DNA を front メガプライマー (G309T), reverse メガプライマー (G309T) とした. 二次 PCR ではテンプレートをを用いず, 一次 PCR で得られた DNA をメガプライマーとし, 309 番目の G が T に置換した sod (G309T) の作製をおこない, 精製した. 同様の方法により, sod (A562G) も作製した. また, 二次 PCR におけるメガプライマーの T_m は, 相補領域の部分であるプライマーの T_m を用いた. T_m の計算は以下の式によっておこなった.

$$T_m = 60.8 + 0.41 \times GC\% - 500 / n$$

$$GC\% = (G \text{ と } C \text{ の塩基数} / n) \times 100, \quad n = \text{プライマーの全塩基数}$$

塩基配列決定

200 μ l PCR チューブにテンプレート 約 100 ng, プライマー 3.2 pmol, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 2 μ l, Big Dye Terminator v1.1,v3.1 5 $\times$ Sequencing Buffer 1 μ l を加え, 滅菌超純水で全量を 10 μ l にした. サーマルサイクラーのプログラムは, 96 $^{\circ}$ C 1 min, (96 $^{\circ}$ C 10 sec, 50 $^{\circ}$ C 5 sec, 60 $^{\circ}$ C 4 min) を 25 サイクル, 4 $^{\circ}$ C ∞ で増幅反応をおこなった.

0.5 ml エッペンドルフチューブに PCR 溶液を全量, 3 M Sodium acetate (pH 5.2) 1 μ l, 100%冷エタノール 33 μ l を加えて混合し, 2 $^{\circ}$ C で 15 min 静置した. 遠心分離 (4 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 15 min) し, 上清を除去した. 70%冷エタノール 250 μ l を加えて洗浄し, 遠心分離 (4 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 15 min) をして上清を除去した後, 乾燥させた. Formamide 15 μ l を加えてよく混合し, 完全に溶解させた. シークエンス装置にセットし, 塩基配列の解析をおこなった.

制限酵素処理

3~4 μ g 相当のインサート DNA 溶液および 1~2 μ g 相当のベクターDNA 溶液を 1.5 ml エッペンドルフチューブにそれぞれ入れ, 同様に制限酵素処理をおこなった. 10 $\times$ H buffer 4 μ l, *Nde* I 1 μ l, *Eco*R I 1 μ l を加え, 全量が 40 μ l となるように滅菌超純水を加え, 37 $^{\circ}$ C でオーバーナイト反応させた. 精製をおこない, 乾燥後, 適量の TE buffer に溶解させた.

Ligation

1.5 ml エッペンドルフチューブに 50 ng 相当の制限酵素処理済みインサート DNA と, 60 ng 相当の制限酵素処理済みベクターDNA を入れ, そこに DNA Ligation kit ver.2.1 solution I 液を当量加えて混合し, 16 $^{\circ}$ C で 30 min 反応させた.

Transformation

冷凍保存（－80℃）している大腸菌 BL21（pG-Tf2）コンピテントセルを使用直前に氷中で融かし，1.5 ml エッペンドルフチューブに 100 μ l 分注した．Ligation 溶液を 10 μ l 加えてマイクロピペットで穏やかに混和し，氷上で 30 min，42℃ 60 sec，氷上で 2.5 min 静置した．SOC 培地を全量 1 ml になるように加え，37℃で 1.5 h インキュベーションした．LB (chloramphenicol, ampicillin) プレート培地にマイクロピペットで 100 μ l 塗布し，37℃で一晩培養した．

増殖した複数のコロニーをそれぞれ白金耳で 5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に植菌した．これらを 37℃ 100 rpm で培養し，プラスミド抽出をおこなった．その後，抽出したプラスミドを制限酵素処理し，電気泳動によってインサートが組み込まれているプラスミドを選別し，その菌株を培養した．

菌体内タンパク質の抽出

5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に白金耳を用いて形質転換株を植菌し，37℃ 100 rpm 16 h 前培養した．前培養液を 50 ml LB (chloramphenicol, ampicillin, tetracycline) 培地に滅菌済みホールピペットで植菌し，37℃ 140 rpm ($OD_{600}=0.4\sim0.6$ になるまで) 本培養し，すぐに氷水で冷やす．15℃で 30 min 放置し，終濃度が 0.5 mM になるように IPTG をフィルター滅菌して添加した．その後，15℃ 120 rpm 24 h 培養をおこなった．

培養後，培養液を 50 ml コーニングチューブに移し，遠心分離（4℃ 5,000 rpm 10 min）して上清を除去した．0.9% NaCl 10 ml を加えて懸濁し，遠心分離（4℃ 5,000 rpm 10 min）して上清を除去した．同様の操作をもう 1 度おこなった後，PMSF 緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 10 mM 2-メルカプトエタノール（使用直前に添加））10 ml を加えて，泡立たないように懸濁した．その後，懸濁液に透明感が出るまで超音波破碎した（出力 2.5 で 60 sec の破碎を数回）．超音波破碎後の溶液を遠心分離（4℃ 10,000 rpm 10 min）して，上清を菌体内タンパク質とした．

タンパク質定量

タンパク質の定量には、Bradford 法を用いた。BSA (500 μ g/ml) を超純水により段階希釈し、200, 160, 120, 80, 40 μ g/ml の各 BSA 溶液を作成した。CBB solution 2.5 ml に対して、BSA 溶液および試料タンパク質溶液を 50 μ l ずつ加え混合後、5 min 静置した。分光光度計で OD₅₉₅ を測定し、BSA 溶液の検量線より試料中のタンパク質濃度を求めた。

タンパク電気泳動

SDS-PAGE

SDS-PAGE 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml, 10%SDS 10 ml, 2-メルカプトエタノール 2 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈し、100℃で 1 min 加熱処理した。Laemmli 法により SDS-PAGE (SDS-PAGE 用 buffer : Tris 3 g, グリシン 11 g, SDS 1 g を加え、超純水で 1 l にメスアップ) をおこなった。ゲルは既製ゲル (e-パジェル 10-20% ATTO 製) を用い、20 mA で電気泳動をした。

Native-PAGE

Native-PAGE 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈した。その後、Native-PAGE 用 buffer (Tris 6 g, グリシン 28 g を加え、超純水で 2 l にメスアップ) を用いて、電気泳動をおこなった。ゲルは既製ゲルを用い、20 mA で電気泳動をした。

CBB 染色

電気泳動をおこなったゲルを、CBB 染色液 (CBB-R 0.5 g, メタノール 250 ml, 酢酸 100 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸し、室温で 1 h 振盪した。染色液を捨て、脱イオン水で洗浄後、脱色液 (メタノール 50 ml, 酢酸 70 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸してキムワイプをかぶせ、途中でキムワイプを交換しながら、室温で一晩振盪した。脱色後、デンストグラフでゲルの撮影をおこなった。

活性測定

NBT 法による SOD 活性染色 ⁷⁾

Native-PAGE をおこなったゲルを、2.45 mM NBT 溶液（NBT 0.5 g を超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、遮光しながら 37°C で 15 min 振盪させた。NBT 溶液を捨て、脱イオン水で洗浄後、Immersion 液（リボフラビン 0.011 g を 100 ml にメスアップしたものを 25 ml, TEMED 1.06 ml, 1 M K-Pi buffer (pH 7.8) 9 ml を加え、超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、遮光しながら 37°C で 20 min 振盪させた。Immersion 液を捨て、脱イオン水で洗浄後、ゲルを蛍光灯で 10 min 照らした。SOD 活性がある部分以外が青く染色されたところで活性バンドを確認し、デンストグラフで相対的に比較した。

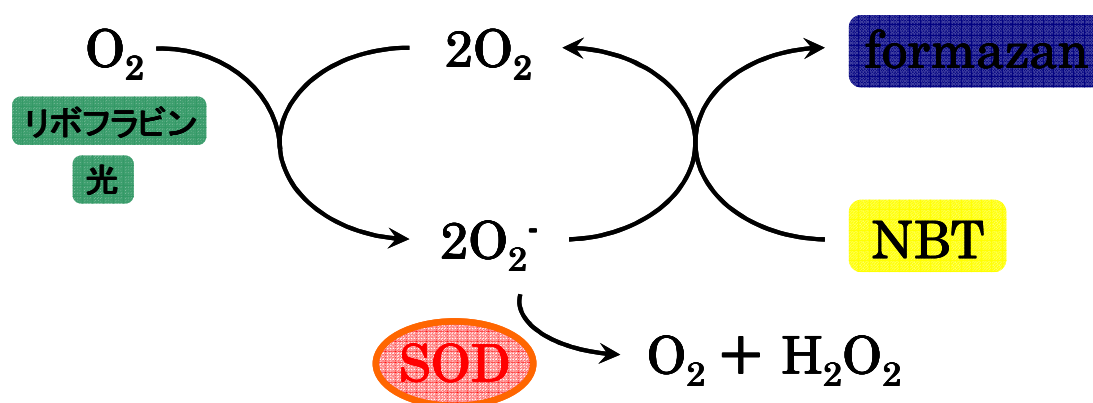


Figure 2 NBT 法による SOD 活性染色

ORAC 法による SOD 活性測定

タンパク質サンプルの SOD 活性測定を、ALOKA 製 AccuFLEX Lumi400 を用いた ORAC 法によりおこなった。抗酸化能測定キット ラジカルキャッチ II (ALOKA) に含まれている発光試薬 (L-O12) は、活性酸素と反応することで発光する試薬である。1.5 ml エッペンドルフチューブに発光試薬 (L-O12) とタンパク質サンプルを 60 μ l ずつ加え、測定器内において 37°C で 3 min インキュベートした。その後、AAPH (ラジカル発生剤) を 60 μ l 加えて発光量を測定した。タンパク質サンプルの代わりに 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 60 μ l 加えて測定した値をコントロール発光量とし、コントロール発光量からサンプル発光量を引いた値を補正発光量とした。また、標準物質 (トロロックス) で検量線を作成し、サンプルの補正発光量からトロロックス当量を算出して活性値とした。

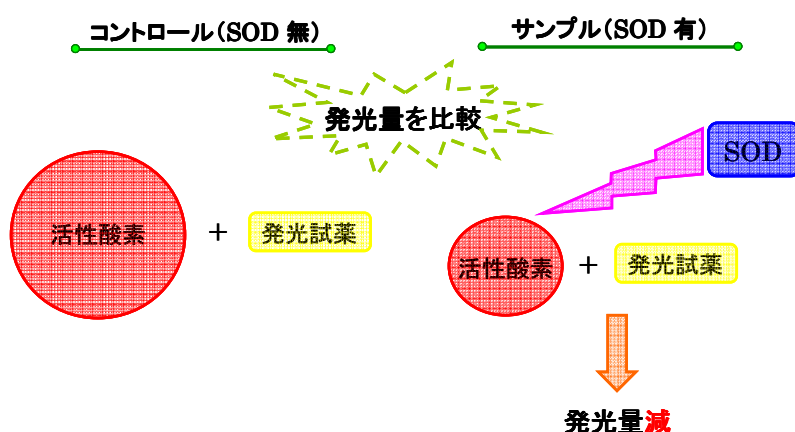


Figure 3 ORAC 法による SOD 活性測定

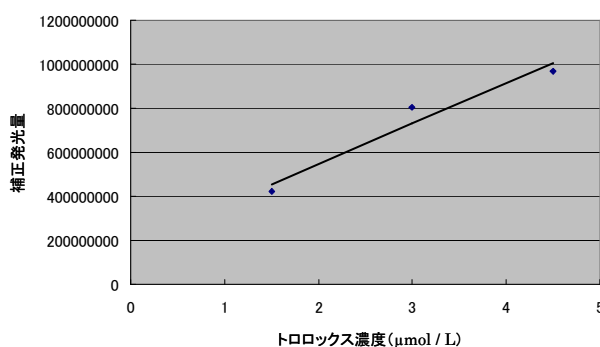


Figure 4 検量線の例

結果

recombinant MnSOD における SDS 耐性の比較

C36株MnSOD由来のSDS耐性は、2ヶ所のアミノ酸の違いによるものと考えられたが、粗酵素に共存するタンパク質の影響を除外するため、*B. stearothermophilus* (IFO12550株) および *B. stearothermophilus* (C36株) の *sod* をクローニングし、それぞれを大腸菌系で発現させた (figure 5).

2種類 (C36株MnSOD, IFO12550株MnSOD) の形質転換株から得た lysate を用いて、SDS 終濃度 0, 0.5 あるいは 1%となるように混合し、SOD 活性を ORAC 法で測定して残存活性を比較した (figure 6).

B. stearothermophilus (IFO12550株) 由来の MnSOD は、1%SDS でほとんど活性を失ったが、*B. stearothermophilus* (C36株) 由来の MnSOD は、1%SDS 存在下でも 50%以上の活性を保持していた。つまり、共存好熱性タンパク質が存在しない状態でも、C36株由来の MnSOD がより高い耐性を示し、それは2ヶ所のアミノ酸配列の違いによるものであることが示された。

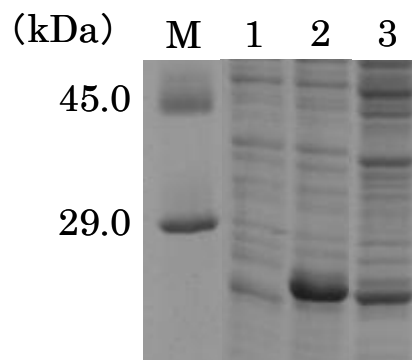


Figure 5 BL21 (pCold I) 発現系による recombinant MnSOD の確認

Lane M 分子量マーカー
 Lane 1 *E. coli* BL21
 Lane 2 recombinant MnSOD (C36)
 Lane 3 recombinant MnSOD (IFO12550)

SDS-PAGE の後，CBB 染色をおこなった．

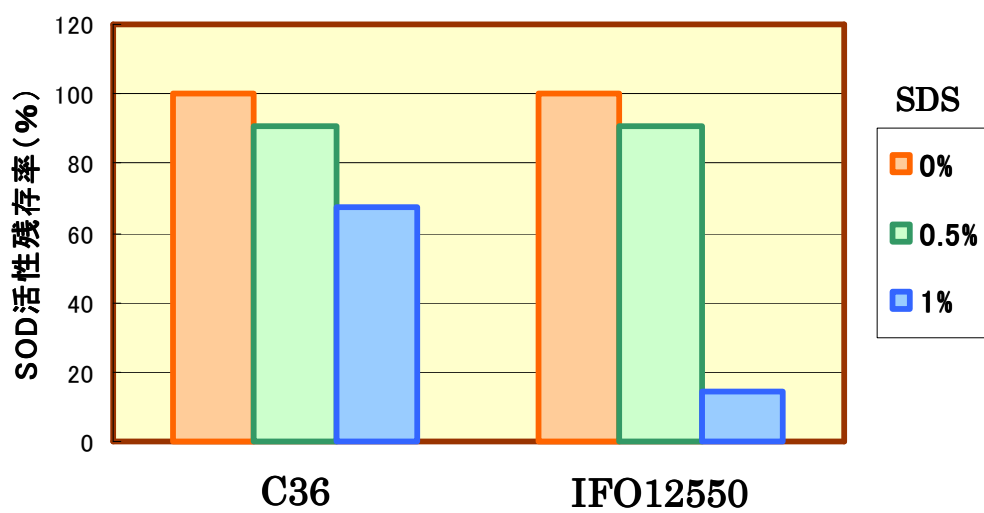


Figure 6 recombinant MnSOD の活性に対する SDS の阻害効果

MnSOD の活性は ORAC 法で求め、SDS 未処理を 100% として比活性で示した。

1 残基置換 recombinant MnSOD における SDS 耐性の比較

Glu102Asp, Ile187Val の 2 ヶ所の違いのうち、いずれが活性を保持するために機能しているのかを知るため、C36 株由来 MnSOD のアミノ酸配列のうちどちらか一方のアミノ酸だけを置換した。その後、クローニングをおこない、大腸菌系で発現させた (figure 7)。

2 種類 (102 Glu→Asp MnSOD, 187 Ile→Val MnSOD) の形質転換株から得た lysate を用いて、SDS 終濃度 0, 0.5 あるいは 1% となるように混合し、SOD 活性を ORAC 法で測定して残存活性を比較した (figure 8)。

102 Glu→Asp の単一置換では 0.5%SDS での活性低下が見られたが、1%SDS では約 50%が残存した。同様に、187 Ile→Val の単一置換でも、1%SDS では約 50%が残存した。これは、2 ヶ所のアミノ酸の違いがともに SDS 耐性に寄与しており、協同的に機能していることを示唆していた。

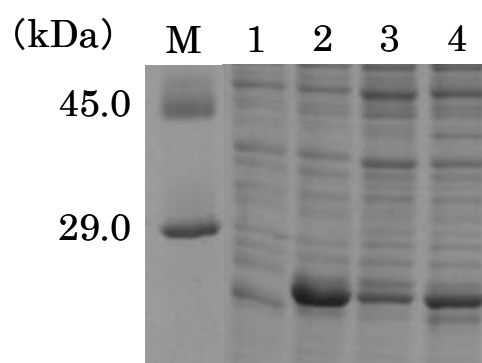


Figure 7 BL21 (pCold I) 発現系による 1 残基置換 recombinant MnSOD の確認

Lane M 分子量マーカー
 Lane 1 *E. coli* BL21
 Lane 2 recombinant MnSOD (C36)
 Lane 3 recombinant MnSOD (102 Glu→Asp)
 Lane 4 recombinant MnSOD (187 Ile→Val)

SDS-PAGE の後, CBB 染色をおこなった.

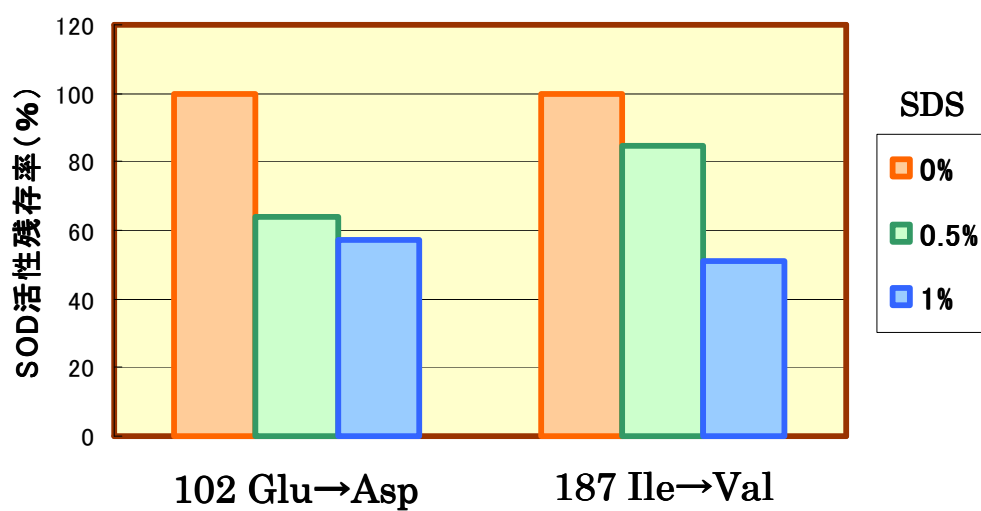


Figure 8 1 残基置換 recombinant MnSOD の活性に対する SDS の阻害効果

左は 102 Glu→Asp, 右は 187 Ile→Val への 1 残基置換を示し, MnSOD の活性は ORAC 法で求め, SDS 未処理を 100% として比活性で示した.

考察

B. stearrowthermophilus (C36 株) 由来 MnSOD のアミノ酸配列の特徴は、MnSOD に特有の共通配列, Mn 原子の保持に関わるアミノ酸である 3 つのヒスチジンとアスパラギン酸 (His26, His81, His167, Asp163), そして, MnSOD に特徴的なモチーフ (Glu166, His167) を保存しつつ IFO12550 株との違い (102 Asp→Glu, 187 Val→Ile) を持つことである. また, いくつかの MnSOD の三次構造が X 線解析によって明らかになっており, 2 つの SOD の相違点である 102 残基, 187 残基は, いずれも保存性領域でも活性部位でもなく, 内部に位置することが推定できる^{6, 12, 16}. 102Asp および 102Glu は二次構造の α 4 領域内にあり, グルタミン酸もアスパラギン酸も酸性アミノ酸であり, 電荷に変化は生じていない. また, 187Val および 187Ile は α 6 領域と α 7 領域の間にあり, イソロイシン, バリンのいずれもが疎水アミノ酸である¹³. すなわち, 2 ヶ所の置換はアミノ酸の電荷を変えることなくアミノ酸側鎖の炭素数だけが変化したものであった.

Argos らによると, タンパク質の安定性とは内部の疎水性を高め, 外周部の疎水性を下げ, これらの小さな変化を積算させることによるものであると傾向が示された^{5, 15}. また, タンパク質内部のアスパラギン酸からグルタミン酸への置換は, 熱力学的に安定化を生み出すことがチオレドキシンで示され⁸, バリンからイソロイシンへの置換は, 疎水的な結合を高めることがリゾチームでも示された¹¹.

よって, 本研究で示されたアミノ酸変異は, いずれもがタンパク質の構造安定化に働いたものであり, 酵素を高次利用に適するように改変する方法論を示したものと言える.

参考文献

- 1) 大島 泰朗 (1978), UP BIOLOGY 好熱性細菌, 東京大学出版会
- 2) 大坂 武男, 井上 正康, 大澤 俊彦, 荒金 久美 共著 (1999), 活性酸素, 丸善株式会社
- 3) 佐藤 悠介 (2003), 修士論文, 室蘭工業大学
- 4) 安部 芳郎 (2004), 修士論文, 室蘭工業大学
- 5) Amo T, Atomi H. and Imanaka T. 2003. Biochemical properties and regulated gene expression of the superoxide dismutase from the facultatively aerobic hyperthermophile *Pyrobaculum calidifontis*. J. Bacteriol.; 185: 6340-6347
- 6) Atzenhofer W, Regelsberger G, Jacob U, Peschek G. A, Furtmüller P. G, Huber R. and Obinger C. 2002. The 2.0 Å Resolution Structure of the Catalytic Portion of a Cyanobacterial Membrane-bound Manganese Superoxide Dismutase. J. Mol. Biol.; 321: 479-489
- 7) Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and as assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry.; 44: 276-287
- 8) Duck Y.L, Kyeong-Ae K, Yeon G.Y. and Key-Sun K. 2004. Substitution of aspartic acid with glutamic acid increases the unfolding transition temperature of a protein. Biochem. Biophys. Res. Commun.; 320: 900-906
- 9) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp.; 65: 77-93
- 10) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem.; 64: 97-112

- 11) Kawamura S, Chijiima T, Torikata T. and Araki T. 2013. The mutational effect of Ile58 at subsite C in hen egg-white lysozyme on substrate binding, enzymatic activity, and protein stability. *Biosci Biotechnol Biochem.*; 77(3): 560-565
- 12) Parker M.W. and Blake C.C. 1988. Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*; 199: 646-661
- 13) Parker M.W. and Blake C.C. 1988. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases can be distinguished by analysis of their primary structures. *FEBS Lett.*; 229: 377-382
- 14) Petkau A, Chelack W.S, Pleskach S.D, Meeker B.E. and Brady C.M. 1975. Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 65: 886-893
- 15) Scandurra R, Consalvi V, Chiaraluce R, Politi L. and Engel P.C. 1998. Protein thermostability in extremophiles. *Biochimie*; 80: 933-941
- 16) Umasuthan N, Bathige S.D, Revathy K.S, Lee Y, Whang I, Choi C.Y, Park H.C. and Lee J. 2012. A manganese superoxide dismutase (MnSOD) from *Ruditapes philippinarum*: comparative structural- and expressional-analysis with copper/zinc superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) and biochemical analysis of its antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol.*; 33(4): 753-765
- 17) タカラバイオ株式会社 ホームページ

第 4 部

活性部位付近におけるアミノ酸置換

BL21 (pCold I) 発現系による実験

目次

緒言.....	89
実験方法.....	90
ゲノム抽出.....	90
プラスミドベクター(pCold I)の調製.....	90
PCR.....	91
アガロースゲル電気泳動.....	91
アガロースゲルからの目的 DNA の回収.....	91
エタノール沈殿.....	92
塩基配列決定.....	92
制限酵素処理.....	92
Ligation.....	92
Transformation.....	93
菌体内タンパク質の抽出.....	93
タンパク質定量.....	94
タンパク質電気泳動.....	94
SDS-PAGE.....	94
Native-PAGE.....	94
CBB 染色.....	94
活性測定.....	95
NBT 法による SOD 活性染色.....	95
ORAC 法による SOD 活性測定.....	95
結果.....	96
活性部位付近のアミノ酸置換による影響.....	96
1 残基置換 recombinant MnSOD (164 Val→His) の活性比較.....	100
考察.....	103
参考文献.....	104

緒言

スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) は活性酸素 (O_2^-) を H_2O_2 や O_2 に不均化する酵素であり、生体中の有毒な活性酸素種を無毒化し酸素ストレスに対する重要な酵素でもある^{1,2)}。また SOD は保持する金属種により、Cu/Zn 型、Fe 型そして Mn 型の 3 種があり、Mn 型が原核生物および真核生物に共通する基本的なストレス応答酵素として着目されている。

ヒト、シアノバクテリア、*Thermus* 属、*Bacillus stearothermophilus*、大腸菌などの MnSOD を結晶化し、MnSOD の 3 次構造が解像度 2 Å 程度で決定されている^{3,4,5,6,7,8)}。これらから、生物種が異なっても基本的な構造、すなわち Mn を保持するアミノ酸 (His, His, His, Asp) は共通しており、ダイマー接触面も同様に明らかになった。また、Brock and Walker によると *Bacillus stearothermophilus* のアミノ酸配列は、45,487 の分子量の単量体がホモメリックになる二量体を構成し、203 残基のアミノ酸からなる。また、*E. coli* とは 60% の相同性があり、Cu/ZnSOD とのホモロジーはない⁹⁾。

一方で、金属を保持する酵素は多く知られており、そのもっとも代表的なミオグロビンでは、Fe 原子を 2 つの His で保持している。カタラーゼでは His, Asn が配位している、このように、酵素の活性部位にある金属を配位するには、His が標準的であるばかりか、その立体的な位置関係が保存されている。

本研究では、保存されている配位アミノ酸近傍に配位アミノ酸と同等のアミノ酸を導入し、金属を保持するアミノ酸に不安定な関係をつくり出す。すなわち「ゆらぎ」環境をつくり出し、活性への影響を見ようとするものである。

実験方法

ゲノム抽出

5 ml L'培地に好熱菌を植菌し、60℃ 100 rpm 16 h 前培養した。前培養液を 100 ml L'培地に植菌し、60℃ 120 rpm 6 h 本培養した。本培養液を 50 ml コーニングチューブに移し、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) により集菌した。菌体を TNE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA) 5 ml に懸濁し、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) により集菌した。菌体に TNE 4.5 ml を加えて懸濁後、10 mg/ml リゾチーム 0.5 ml を加え、60℃で 30 min 激しく振盪した。溶菌液に 10% SDS 0.5 ml を加えて、穏やかに 15 min 混合した。等量の Tris 飽和フェノールを加えて、穏やかに 30 min 混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 10 min) した。水層に半等量ずつ Tris 飽和フェノールと CIA を加え、穏やかに 30 min 混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 10 min) した。水層に 2.5 倍量の 100% 冷エタノールを加え、穏やかに混合した後、遠心分離 (4℃ 3,000 rpm 15 min) した。析出した核酸を 70%冷エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶かした。

プラスミドベクター (pCold I) の調製

5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に大腸菌 BL21 (pG-Tf2, pCold I) 株を植菌し、37℃ 100 rpm で培養した。培養液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 1 min) し、上清を除去した。菌体に冷えた solution I を 100 μ l 加えて懸濁し、氷上で静置した。懸濁液に solution II を 200 μ l 加え、静かに転倒混和した後、氷上で 5 min 静置した。これに、冷えた solution III を 150 μ l 加えて混合した後、氷上で 10 min 静置し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 6 min) した。上清に 1/100 倍量の 10 mg/ml RNase を加えて混合し、37℃で 45 min インキュベーションした。その後、半等量ずつ Tris 飽和フェノールと CIA を加え、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 10 min) した。水層に 2.5 倍量の 100%冷エタノールを加え、穏やかに混合し、遠心分離 (4℃ 15,000 rpm 10 min) した。析出した核酸を 70%冷エタノールで洗浄し、乾燥後、適量の TE buffer に溶かした。その後、精製をおこないプラスミドベクター (pCold I) とした。

PCR

200 μ l PCR チューブに、テンプレート DNA 約 100 ng, プライマー 10 pmol, 10 $\times$ Reaction buffer with MgCl₂ 5 μ l, dNTPs mixture each dNTP 2.5 mM 4 μ l, *T_{bp}* DNA polymerase 0.25 μ l を加え、滅菌超純水で全量を 50 μ l にした。サーマルサイクラーのプログラムは、94 $^{\circ}$ C 5 min, (94 $^{\circ}$ C 30 sec, T_m-5 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min) を 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C ∞ に設定し増幅反応をおこなった。

アガロースゲル電気泳動

1 $\times$ TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) に適量のアガロースを溶解させ、ゲルを作製した。ゲルを泳動槽にセットし、電気泳動 buffer として 1 $\times$ TAE をゲルが十分浸るまで注ぎ、ウェルをマイクロピペットで洗浄した。また、DNA サンプルに対して 1/5 倍量の BPB サンプル処理液を加えた。ウェルに分子量マーカーやサンプルを適量入れ、100 V で 50 min 電気泳動した。泳動後、ゲルを染色用容器に移し、1 $\times$ TAE をゲルが浸るまで注ぎ、1 mg/ml EB 染色液を数滴添加して、遮光しながら 1 h 振盪した。染色後、デンストグラフを用いてゲルに 312 nm の紫外線を照射し、DNA バンドの位置を確認した。

アガロースゲルからの目的 DNA の回収

未精製 DNA 溶液を、アガロース SFR で作製したゲルによる電気泳動および EB 染色をした後、LED を照射して目的 DNA のバンドをスパーテルで切り出し、エッペンドルフチューブに入れた。ヒートブロックを用いて TE buffer と Tris 飽和フェノールを 70 $^{\circ}$ C に適量温めておき、エッペンドルフチューブに入れたゲルを 70 $^{\circ}$ C で 10 min 温めて融解させた。融解したゲルの体積を目測し、1.5 倍量の温 TE buffer を加えて混合した。再び、70 $^{\circ}$ C で 10 min 温めた後に等量の温 Tris 飽和フェノールを加えてよく混合した。遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。等量の Tris 飽和フェノールを加えて混合し、遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。半等量ずつの Tris 飽和フェノールと CIA を加えて混合し、遠心分離 (20 $^{\circ}$ C 15,000 rpm 5 min) をおこない、水層をエッペンドルフチューブに移した。その後、エタノール沈殿をおこなった。

エタノール沈殿

得られた DNA 溶液に, 1/10 倍量の 3 M Sodium acetate (pH 5.2), 1/100 倍量の Dr.GenTLE Precipitation Carrier, 2.5 倍量の 100%冷エタノールを加えて緩やかに混合した. 遠心分離 (4°C 15,000 rpm 10 min) をおこない, 上清を除去した. 70%冷エタノールで沈殿を洗浄し, 乾燥後, 適量の TE buffer に溶解させた.

塩基配列決定

200 µl PCR チューブにテンプレート 約 100 ng, プライマー 3.2 pmol, Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 2 µl, Big Dye Terminator v1.1,v3.1 5× Sequencing Buffer 1 µl を加え, 滅菌超純水で全量を 10 µl にした. サーマルサイクラーのプログラムは, 96°C 1 min, (96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min) を 25 サイクル, 4°C ∞ で増幅反応をおこなった.

0.5 ml エッペンドルフチューブに PCR 溶液を全量, 3 M Sodium acetate (pH 5.2) 1 µl, 100%冷エタノール 33 µl を加えて混合し, 2°C で 15 min 静置した. 遠心分離 (4°C 15,000 rpm 15 min) し, 上清を除去した. 70%冷エタノール 250 µl を加えて洗浄し, 遠心分離 (4°C 15,000 rpm 15 min) をして上清を除去した後, 乾燥させた. Formamide 15 µl を加えてよく混合し, 完全に溶解させた. シークエンス装置にセットし, 塩基配列の解析をおこなった.

制限酵素処理

3~4 µg 相当のインサート DNA 溶液および 1~2 µg 相当のベクターDNA 溶液を 1.5 ml エッペンドルフチューブにそれぞれ入れ, 同様に制限酵素処理をおこなった. 10×H buffer 4 µl, *Nde*I 1 µl, *Eco*R I 1 µl を加え, 全量が 40 µl となるように滅菌超純水を加え, 37°C でオーバーナイト反応させた. 精製をおこない, 乾燥後, 適量の TE buffer に溶解させた.

Ligation

1.5 ml エッペンドルフチューブに 50 ng 相当の制限酵素処理済みインサート DNA と, 60 ng 相当の制限酵素処理済みベクターDNA を入れ, そこに DNA Ligation kit ver.2.1 solution I 液を当量加えて混合し, 16°C で 30 min 反応させた.

Transformation

冷凍保存（－80℃）している大腸菌 BL21（pG-Tf2）コンピテントセルを使用直前に氷中で融かし，1.5 ml エッペンドルフチューブに 100 µl 分注した．Ligation 溶液を 10 µl 加えてマイクロピペットで穏やかに混和し，氷上で 30 min，42℃ 60 sec，氷上で 2.5 min 静置した．SOC 培地を全量 1 ml になるように加え，37℃で 1.5 h インキュベーションした．LB (chloramphenicol, ampicillin) プレート培地にマイクロピペットで 100 µl 塗布し，37℃で一晩培養した．

増殖した複数のコロニーをそれぞれ白金耳で 5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に植菌した．これらを 37℃ 100 rpm で培養し，プラスミド抽出をおこなった．その後，抽出したプラスミドを制限酵素処理し，電気泳動によってインサートが組み込まれているプラスミドを選別し，その菌株を培養した．

菌体内タンパク質の抽出

5 ml LB (chloramphenicol, ampicillin) 培地に白金耳を用いて形質転換株を植菌し，37℃ 100 rpm 16 h 前培養した．前培養液を 50 ml LB (chloramphenicol, ampicillin, tetracycline) 培地に滅菌済みホールピペットで植菌し，37℃ 140 rpm (OD₆₀₀=0.4～0.6 になるまで) 本培養し，すぐに氷水で冷やす．15℃で 30 min 放置し，終濃度が 0.5 mM になるように IPTG をフィルター滅菌して添加した．その後，15℃ 120 rpm 24 h 培養をおこなった．

培養後，培養液を 50 ml コーニングチューブに移し，遠心分離（4℃ 5,000 rpm 10 min）して上清を除去した．0.9% NaCl 10 ml を加えて懸濁し，遠心分離（4℃ 5,000 rpm 10 min）して上清を除去した．同様の操作をもう 1 度おこなった後，PMSF 緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1 mM PMSF, 10 mM 2-メルカプトエタノール（使用直前に添加））10 ml を加えて，泡立たないように懸濁した．その後，懸濁液に透明感が出るまで超音波破碎した（出力 2.5 で 60 sec の破碎を数回）．超音波破碎後の溶液を遠心分離（4℃ 10,000 rpm 10 min）して，上清を菌体内タンパク質とした．

タンパク質定量

タンパク質の定量には、Bradford 法を用いた。BSA (500 μ g/ml) を超純水により段階希釈し、200, 160, 120, 80, 40 μ g/ml の各 BSA 溶液を作成した。CBB solution 2.5 ml に対して、BSA 溶液および試料タンパク質溶液を 50 μ l ずつ加え混合後、5 min 静置した。分光光度計で OD₅₉₅ を測定し、BSA 溶液の検量線より試料中のタンパク質濃度を求めた。

タンパク質電気泳動

SDS-PAGE

SDS-PAGE 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml, 10%SDS 10 ml, 2-メルカプトエタノール 2 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈し、100°C で 1 min 加熱処理した。Laemmli 法により SDS-PAGE (SDS-PAGE 用 buffer : Tris 3 g, グリシン 11 g, SDS 1 g を加え、超純水で 1 l にメスアップ) をおこなった。ゲルは既製ゲル (e-パジェル 10-20% ATTO 製) を用い、20 mA で電気泳動をした。

Native-PAGE

Native-PAGE 用サンプル処理液 (BPB 25 mg, グリセリン 20 ml, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml を加え、超純水で 50 ml にメスアップ) を、タンパク質サンプルで 5 倍希釈した。その後、Native-PAGE 用 buffer (Tris 6 g, グリシン 28 g を加え、超純水で 2 l にメスアップ) を用いて、電気泳動をおこなった。ゲルは既製ゲルを用い、20 mA で電気泳動をした。

CBB 染色

電気泳動をおこなったゲルを、CBB 染色液 (CBB-R 0.5 g, メタノール 250 ml, 酢酸 100 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸し、室温で 1 h 振盪した。染色液を捨て、脱イオン水で洗浄後、脱色液 (メタノール 50 ml, 酢酸 70 ml を加え、超純水で 1 l にメスアップ) に浸してキムワイプをかぶせ、途中でキムワイプを交換しながら、室温で一晩振盪した。脱色後、デンストグラフでゲルの撮影をおこなった。

活性測定

NBT 法による SOD 活性染色¹⁰⁾

Native-PAGE をおこなったゲルを、2.45 mM NBT 溶液（NBT 0.5 g を超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、遮光しながら 37°C で 15 min 振盪させた。NBT 溶液を捨て、脱イオン水で洗浄後、Immersion 液（リボフラビン 0.011 g を 100 ml にメスアップしたものを 25 ml, TEMED 1.06 ml, 1 M K-Pi buffer (pH 7.8) 9 ml を加え、超純水で 250 ml にメスアップ）に浸し、遮光しながら 37°C で 20 min 振盪させた。Immersion 液を捨て、脱イオン水で洗浄後、ゲルを蛍光灯で 10 min 照らした。SOD 活性がある部分以外が青く染色されたところで活性バンドを確認し、デンストグラフで相対的に比較した。

ORAC 法による SOD 活性測定

タンパク質サンプルの SOD 活性測定を、ALOKA 製 AccuFLEX Lumi400 を用いた ORAC 法によりおこなった。抗酸化能測定キット ラジカルキャッチ II (ALOKA) に含まれている発光試薬 (L-O12) は、活性酸素と反応することで発光する試薬である。1.5 ml エッペンドルフチューブに発光試薬 (L-O12) とタンパク質サンプルを 60 μ l ずつ加え、測定器内において 37°C で 3 min インキュベートした。その後、AAPH (ラジカル発生剤) を 60 μ l 加えて発光量を測定した。タンパク質サンプルの代わりに 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を 60 μ l 加えて測定した値をコントロール発光量とし、コントロール発光量からサンプル発光量を引いた値を補正発光量とした。また、標準物質 (トロロックス) で検量線を作成し、サンプルの補正発光量からトロロックス当量を算出して活性値とした。

活性部位付近のアミノ酸置換による影響

MnSOD には 7 つの α ヘリックスと 3 つの β シートが存在し, *B. stearothermophilus* (C36 株) 由来 MnSOD のアミノ酸配列では, His26, His81, Asp163, His167 によって活性中心の Mn 原子を保持している. この 4 つのアミノ酸は, His26 が α 1, His81 が α 3, Asp163 が β 3, His167 が 164-176 番間のランダムコイルに存在しており, これらの二次構造の中で最も MnSOD の共通保存領域の割合が高いのは, 164-176 番間のランダムコイルであり, 54%となっていた (figure 1, 2 and table 1).

立体構造に大きな変化をもたらす可能性のある α ヘリックスや β シート内のアミノ酸は避け, ランダムコイルのアミノ酸に注目した. MnSOD の共通保存領域は, MnSOD として活性を示すために必要不可欠な配列であると考えられるため, その割合が最も高かった 164-176 番間のランダムコイル内のアミノ酸で, なおかつ, Mn 原子を保持している Asp163 に隣接している Val164 を本研究のアミノ酸置換部位とした. また, 置換アミノ酸の種類には, Mn 原子を保持するために使われている His を選択した. このアミノ酸置換により, C36 株 MnSOD よりも活性が増加した MnSOD の獲得を試みた.

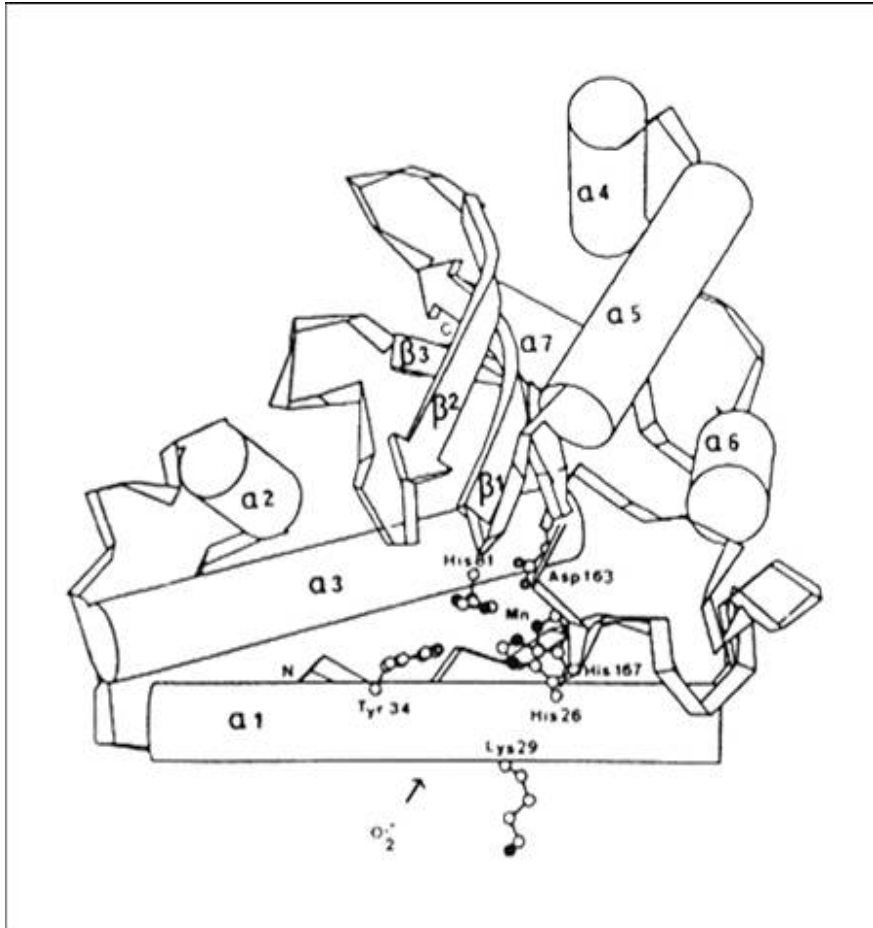


Figure 2 MnSOD の三次構造

M. W. Parker and C. C. Blake J. Mol. Biol. 199, 646-661 (1988)より転写.

Table 1 MnSOD の共通保存領域の割合

No.	二次構造	共通保存割合[%]
1-18	random	39
19-41	α 1	30
42-52	random	0
53-58	α 2	0
59-64	random	0
65-86	α 3	14
87-97	random	20
98-108	α 4	27
109-110	random	50
111-120	α 5	0
121-128	random	25
129-135	β 1	14
136-139	random	20
140-146	β 2	14
147-156	random	10
157-163	β 3	29
164-176	random	54
177-182	α 6	17
183-189	random	29
190-197	α 7	0
198-203	random	0

M. W. Parker and C. C. Blake J. Mol. Biol. 199, 646-661 (1988)より転写し改善した.

1 残基置換 recombinant MnSOD (164 Val→His) の活性比較

B. stearrowthermophilus (C36 株) MnSOD の 164 番目のアミノ酸であるバリンを、ヒスチジンに置換させ (164 Val→His), BL21 (pCold I) 系で発現させた (figure 3) ¹¹⁾.

また、発現した MnSOD (164 Val→His) の活性を recombinant MnSOD (C36) と比較した。その結果、約 1.7 倍の比活性の上昇が確認されたが (figure 4), 熱耐性は低下してしまった。 ¹¹⁾

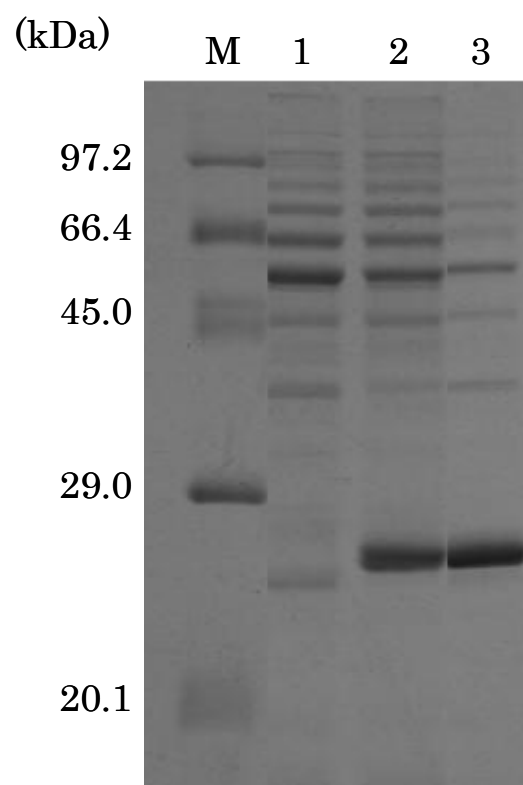


Figure 3 1 残基置換 recombinant MnSOD (164 Val→His) の発現確認

Lane M 分子量マーカー
 Lane 1 *E. coli* BL21
 Lane 2 recombinant MnSOD (C36)
 Lane 3 recombinant MnSOD (164 Val→His)

SDS-PAGE をした後、CBB 染色をおこなった。

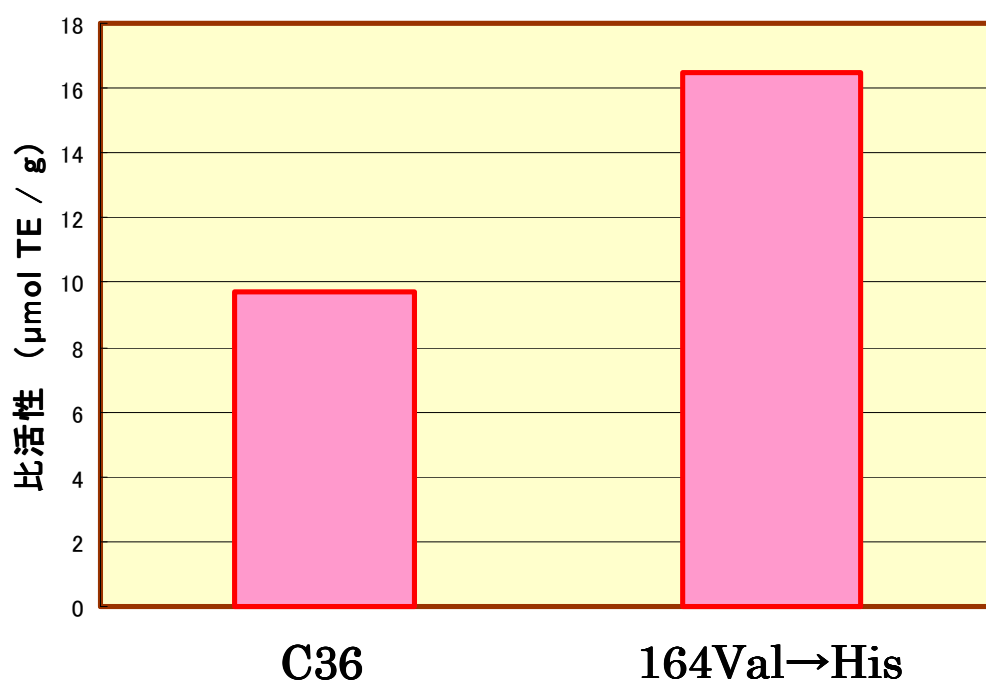


Figure 4 1 残基置換 recombinant MnSOD (164 Val→His) の活性比較

MnSOD の活性は ORAC 法で求めた.

考察

Figure 4 で比活性が増加した理由として、Mn 保持アミノ酸 (Asp163) に隣接するアミノ酸を、Mn 保持に働くアミノ酸の 1 つであるヒスチジンに置換することで、Mn 保持力が高まり、活性中心である Mn に活性酸素をより取り込みやすくなったという可能性が考えられる。また、高い割合の共通保存領域が存在する構造内のアミノ酸を置換したことで、Mn の保持力が高まったという可能性もある。

熱耐性が低下してしまった原因としては、活性部位付近のアミノ酸を置換したことによって活性が増加し、SOD の立体構造に柔軟性があらわれた結果、熱による物理的なストレスに対して耐性が低下してしまったのではないかと考えられた。

参考文献

- 1) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. *Ciba Found. Symp.*; 65: 77-93
- 2) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*; 64: 97-112
- 3) Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA. 1996. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*; 35(14): 4287-4297
- 4) Atzenhofer W, Regelsberger G, Jacob U, Peschek G.A, Furtmuller P.G, Huber R and Obinger C. 2002. The 2.0 Å Resolution Structure of the Catalytic Portion of a Cyanobacterial Membrane-bound Manganese Superoxide Dismutase. *J. Mol. Biol.*; 321: 479-489
- 5) Ludwig M.L., Metzger A.L., Patridge K.A. and Stallings W.C. 1991. Manganese superoxide dismutase from *Thermus thermophilus*. A structural model refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*; 219: 335-358
- 6) Parker M.W. and Blake C.C. 1988. Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*; 199: 649-661
- 7) Edwards R.A., Baker H.M., Whittaker M.M., Whittaker J.W., Jameson G.B. and Baker E.N. 1998. Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1 Å. *J. Biol. Inorg. Chem.*; 3161-3171
- 8) Borgstahl G.E.O., Parge H.E., Hickey M.J., Beyer W.F., Hallewell R.A. and Tainer J.A. 1992. The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. *Cell*; 71: 107-118.

9) Brock C.J., Walker J.E. 1980. Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*. Complete amino acid sequence of a manganese enzyme. *Biochemistry*; 19(13): 2873-2882

10) Beauchamp C. and Fridovich I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and as assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*.; 44: 276-287

11) 楠美 恵太 (2013), 修士論文, 室蘭工業大学

結言

本研究では、第 1 部において、*B. stearothermophilus* (C36 株) 由来 MnSOD が *B. stearothermophilus* (IFO12550 株) 由来 MnSOD よりも SDS に対する耐性が高いことを示し、アミノ酸配列における 2 ヶ所のアミノ酸の違いを示した。

第 2 部では、SOD の活性測定法を検討し、本研究において最適な測定方法を選択した。

また、第 3 部において、Glu102Asp と Ile187Val の 2 ヶ所のアミノ酸の違いが、*B. stearothermophilus* (C36 株) 由来 MnSOD の変性剤 SDS に対する耐性向上に作用していることを明らかにした。これは、102 および 187 の両方において、アミノ酸の側鎖の炭素数が 1 つ長くなることで疎水的な結合力が強まり、その結果、SDS 耐性が向上したと考えられる。

さらに、第 4 部では、活性部位付近のアミノ酸を置換することによって、耐性ではなく活性の向上を目指した。MnSOD の共通保存領域の割合が高い場所であり、Mn 原子を保持しているアミノ酸と隣接している Val164 を His に置換した結果、活性の向上を確認することができた。

以上のことから、MnSOD の SDS 耐性を高めるためには、疎水的な結合力を強めるなどによって、タンパク質の構造を硬くすることが必要であり、また、MnSOD の活性を高めるためには、Mn 原子を取り込みやすくするようにして、タンパク質の構造を柔らかくする必要があるのではないかと考えられる。

このように、タンパク質の構造の柔軟性を変化させることによって、そのタンパク質の性質を変化させることができるということは、今後、様々なタンパク質においても応用が可能ではないかと思われる。

謝辞

これまで七年間の長きに渡り、研究面において多くのご指導ご鞭撻を戴いた安居光國准教授に、深甚なる感謝の意を表します。また、博士課程において主査としてご指導戴いた金木則明教授にもこの場を借りてお礼申し上げます。さらに、博士論文を完成させるための実験において、力強いサポートをしてくれた楠美恵太にも心より感謝します。皆様本当にありがとうございました。