

好熱菌由来SODの精製および、その活性と構造に関する研究

著者	丁 凌云
学位名	博士（工学）
学位の種類	課程博士
報告番号	甲第375号
学位授与年月日	2015-03-23
URL	http://doi.org/10.15118/00005131

氏名	ディン リン ユン DING LING YUN
学位論文題目	好熱菌由来 SOD の精製および, その活性と構造に関する研究
論文審査委員	主査 教授 中野博人 准教授 安居光圀 教授 長谷川 靖

論文内容の要旨

ほとんどの生物は酸素を用いた呼吸代謝をおこなうため、 $O_2 \cdot$ (スーパーオキシドアニオン) などの活性酸素種が副産物として発生する。スーパーオキシドディスムターゼ(以下, SOD)は, 活性酸素スーパーオキシドアニオンラジカルの不均化反応を触媒し, 速やかに消去することができるため, DNA や酵素を酸素障害から防御するのに重要な役割を担っている。SOD は, 下等生物の微生物から高等動物, 植物に至るまで広範囲の生物に含有されている抗酸化酵素である。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, Mn 型の SOD (MnSOD) は真核生物と原核生物の両方に存在している。

好熱菌は高温 (55°C 以上) 環境下で増殖能をもつ微生物であり, 好熱菌が生産するタンパク質は高い耐熱性とともにもその他の耐性もあることが知られており, 本研究では好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* C36 株から得られる MnSOD は工学的有用利用のために, SOD の精製と性質を研究した。

しかしながら, MnSOD は他のタンパク質との相互作用が強いため, 界面活性剤 SDS を存在下でのクロマトグラフィー法により精製した。その新精製方法は他の好熱菌 SOD も適用できた。この新法の大きな特徴は, SOD が約 33%もの高い回収率で得られたことである。これより, 高い熱耐性持ち工業利用上有用である SOD を大量に供給することが可能になる。

MnSOD は二量体構造を持つが, SOD の単量体の機能は明らかにされていない。そこで, 二量体 SOD をグルタルアルデヒド等の二価試薬で化学架橋し, 二量体を固定して, その機能と単量体との違いを明らかにした。架橋された SOD 二量体と天然型の SOD を比較すると, 架橋によって高次構造が固定されたため活性が大幅に低下した。これより, SOD のサブユニット間の柔軟性は SOD 活性に重要であることが示された。

ABSTRACT

Reactive oxygen species such as super oxide anion was produced as a by-product from aerobic respiration metabolism. Because superoxide dismutase (SOD) extinguishes the active oxygen or oxide anion radical, it plays a role in DNA and enzymes protecting against oxygen damage. SOD is a universal antioxidant enzyme in a microbe, a higher animal, a plant. The SOD has a Cu/Zn type, a Mn type, and a Fe type by the species that there is in the active center, and the MnSOD exists both in eukaryote and prokaryote.

Thermophilic bacteria can grow under high temperature (more than 55 degrees Celsius). This paper has described purification of MnSOD which is derived from thermophilic bacteria C36 strain by gel chromatography under the presence of surfactant SDS. This new method was achieved the high recovery of SOD to be approximately 33%. It would be able to get a SOD with tolerance (SDS tolerance, heat resistance, pH tolerance) to be the industrial usage. And this new isolation method can apply the other thermophilic bacteria, too.

MnSOD has dimeric structure. However, the function of the monomer-dimer conversion of the SOD is not clarified. SODs were chemistry cross linked with divalent reagents such as glutaraldehyde to fix a dimer conformation. The activity of cross-linked SOD largely decreased because molecular structure was fixed. The inter-subunit flexibility of the SOD was shown to be important to present SOD activity.

論文審査結果の要旨

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。スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）は、活性酸素の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させる。この SOD は活性中心に Mn を持ち、SOD (MnSOD) は真核生物と原核生物の両方に存在している。

好熱菌は高温 (55°C 以上) 環境下で増殖能をもつ微生物であり、好熱菌が生産するタンパク質は高い耐熱性とともにもその他の耐性もあることが知られており、好熱菌から得られる MnSOD は工学的有用利用が期待できる抗酸化酵素である。しかし、好熱菌由来の SOD を産業用として利用するには、効率よく大量に獲得することが必要である。そこで、本研究では好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* C36 株から得られる MnSOD の精製と性質を研究した。

これまで多くの研究者が好熱菌から MnSOD の分離精製を行っているが、多段階なうえ複雑なため少量にとどまっている。その最大の理由は MnSOD が他のタンパク質との相互作用が強いためである。本論文では、界面活性剤 SDS を加えたクロマトグラフィー法により精製し、精製の最適条件を見出した。この新精製法により、SOD が約 33% もの高い回収率で得られた。この方法は他の好熱菌 SOD も適用できる。さらに、好熱菌由来 SOD と大腸菌が異なるアミノ酸配列を持ち、これが三次元構造のおよび酵素活性に及ぼす影響を議論し、SDS を用いた分離の理論的解明も行っている。

第 2 部では、MnSOD の二量体構造の必要性を構造的アプローチから検証している。MnSOD は通常、ホモ二量体で存在する。しかしながら、単量体単独でも活性を持つため、二量体の意義についてはほとんど知見がない。そこで、二量体 SOD をグルタルアルデヒド等の二価試薬で化学架橋し、二量体状態を固定し、単量体と二量体の機能の違いを明らかにした。架橋された SOD 二量体と天然型の SOD を比較すると、高次構造が固定されたため活性が大幅に低下しており、SOD のサブユニット間の柔軟性は SOD 活性に重要であることが示された。これらのことは、酵素の耐性向上や活性向上において指標を示し、今後の SOD の利用を広げるものである。

以上、本論文は SOD の応用を視野に置いた研究であり、その応用面における問題点、課題を明らかにし、応用が期待されている好熱菌 SOD の高度な精製方法を開発し、その性質を明らかにした。

よって、本論文は本学及び専攻が定める審査基準を満たしており、博士論文に値すると認められる。