



室蘭工業大学

学術資源アーカイブ

Muroran Institute of Technology Academic Resources Archive



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

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2015-06-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 丁, 凌云 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.15118/00005131

博 士 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

英語 題目 Purification of the SOD from Thermophilic Bacteria and study on Relationship of the Activity and the Structure

氏 名 丁凌云 (DING LING YUN)

提出年月日 平成 26 年 12 月 19 日

目次

総合緒言	3
参考文献	5
第一部 SOD の精製	6
第二部 活性と構造の関係	73
謝辞	100

本論文の主要な部分は以下に公開されている。

Ding LY, Watanabe K and Yasui M

Purification of thermophilic superoxide dismutase by utilizing the surfactant

Journal of Japanese Society for Extremophiles (2014) Vol.13, 53-58

総合緒言

私たちが呼吸している空気の中には 21%の酸素が含まれている。酸素はラジカルの一様だが、特殊な分子構造をしているため他の物質と反応することほとんどなかった。呼吸で肺から取り込まれて組織に運ばれた酸素は、生体内の穏やかな条件下で反応し易い不安定な形に変わることがある。代表的な活性酸素にスーパーオキシドラジカルは生体内では主にミトコンドリアや種々の酵素反応で産生される。ミトコンドリアは、活性酸素の産生源として特に注目されている。私たちが呼吸で取り込んだ酸素の 90%以上はミトコンドリアで使われる。この不安定な酸素種を活性酸素種 (ROS)は他の物質と反応して安定になるうとする性質がある 1,2)。

活性酸素 (Reactive Oxygen Species、ROS) は、大気中に含まれる酸素分子がより反応性の高い化合物に変化したものの総称である。一般的にスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素の 4 種類とされる。活性酸素は、酸素分子が不対電子を捕獲することによってスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、という順に生成する。スーパーオキシドアニオンラジカルは酸素分子から生成される最初の還元体であり、他の活性酸素の前駆体であり、生体にとって重要な役割を持つ一酸化窒素と反応してその作用を消滅させる。活性酸素はタンパク質・脂質・核酸などと反応し、酸化して変性してしまうことがある (酸化傷害)。活性酸素は 1 日に細胞あたり約 10 億個発生し、これにり一日数万から数 10 万個になるがこの DNA 損傷はすぐに修復される (DNA 修復) 1,2,3,7,8)。

細胞内の酵素で分解しきれない余分な活性酸素は癌や生活習慣病、老化等、さまざまな病気の原因であるといわれており、遺伝子操作によって活性酸素を生じやすくした筋萎縮性側索硬化症のモデル動物も存在するが、因果関係がはっきりとしていないものも多い。それを防ぐために各組織には抗酸化酵素と呼ばれる。活性酸素・フリーラジカルを消去あるいは除去する酵素が存在する。その抗酸化酵素としてカタラーゼ対して生体の活性酸素消去能力 (抗酸化機能) が働くものの活性酸素は細胞内の DNA を損傷し、平常の生活でも DNA 損傷の数は細胞あたやスーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、ペルオキシダーゼなど、活性酸素を無害化する酵素がある 1,2,3,5,7,8)。

スーパーオキシドディスムターゼ (Superoxide dismutase, SOD) は、細胞内に発生した活性酸素を分解する酵素であり、スーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素へ不均化する酸化還元酵素である。SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn, Fe, Mn 型といった様々な金属型が存在し、Cu/Zn 型は真核細胞の細胞質に存在し、Mn 型の SOD は真核細胞、原核細胞の両方に存在である。ヒトでは 3 種の SOD が存在する。Cu-ZnSOD は細胞質、MnSOD はミトコンドリア、NiSOD は細胞外空間に存在する。SOD は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 1,2)。

ガン遺伝子を目覚めさせるイニシエーターや異常化したガン細胞をガン化させるプロ

モーターと言われる発ガン促進物は、活性酸素を発生させ、SOD は重要な抗ガン物質として、ますます注目にすることが分かってきている。また、ストレスも活性酸素をつくりやすいことで、ガンの大きな要因となることも明らかにされてきている^{4,5,9,10}。また、活性酸素の害で発生する生活習慣病、ガンを始め各種の疾患、シミ、シワ等の皮膚障害が増えてくる。よって、SOD は医療、化粧品産業、実験的研究など多方面への利用が進められている。これは SOD が工業化を生産することが必要である。

活性酸素は体に害を与えるものと思われがちだ？本来はウイルスや病原体から体を守ったり、体内で発生した毒素を排出したりする働きをもつため、健康を維持するために必要な物質である。活性酸素が体の中で増えすぎてしまう原因は、ストレス、紫外線、喫煙、不規則な生活や、加工食品の添加物など、私たちの身近に数多く存在しており、現代人は活性酸素が体内に増えすぎている傾向にある。増えすぎた活性酸素は、老化の促進や体の不調だけでなく、生活習慣病である動脈硬化やガンなど、あらゆる病気の原因となるため、SOD 酵素や、ビタミンCなどの抗酸化物質を摂取することが必要である。例えば、活性酸素の増えすぎを防止して美肌を実現するためには抗酸化作用のある化粧品や食品を摂取することが提唱されている⁶。

タンパク質、特に生育に必須であるタンパク質の変性温度は、生物の生育温度の上限と密接に関わっている。異なる至適生育温度を持つ生物種に由来する相同タンパク質の安定性は、多くの場合、生育温度付近と同じ程度になる。好熱菌タンパク質の多くは、高い耐熱性とともにもその他の耐性も有する。たとえばタンパク質分解酵素に対する耐性、タンパク質を変性させるような条件（酸、アルカリ、変性剤など）に対する耐性も高い。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。

常温菌由来 SOD と比較して、好熱菌由来 SOD による、酵素生産系は高温のため、雑菌汚染を防ぐことができ、好熱菌の増殖速度が高くて、培養時間が短くて、単位時間当たりの SOD の生産量は大幅に増加することができる。好熱菌由来の SOD は、精製から安定性が高く、変性させるような条件（酸、アルカリ、変性剤など）に対する耐性も高くて、長時間の利用が可能である。よって、好熱菌由来 SOD は工業利用上からも期待され、利用が進められている。

本研究では好熱菌 *B. stearothermophilus* C36 株から得られる MnSOD は工学的有用利用を目的に、SOD の精製と性質を研究し、ここに報告する。

参考文献

- 1) McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzyme function for erythrocyte, J Bio Chem, 1969, 244:6049-6055
- 2) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp. ; 65: 77-93
- 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) Oberley, L.W., Buettner, G.R Role of superoxide dismutase in cancer: A review. Cancer Research Volume 39, Issue 4, 1979, Pages 1141-1149
- 5) Christine J. Weydert , Trent A. Waugh Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. Free Radical Biology & Medicine 41 (2006) 226-237
- 6) 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
- 7) Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. ; 64: 97-112
- 8) Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59:1609-1623
- 9) Dhar S. K., St Clair D. K. 2012. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. Free Radic Biol Med. 52: 2209-2222
- 10) Dhar S. K., St Clair D. K. 2012. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. Free Radic Biol Med. 52: 2209-2222

第一部 SOD の精製

目次

緒言	9
材料	11
試薬	12
装置	14
細菌	15
培地	16
実験方法.	17
菌体内タンパク質の抽出	17
硫酸アンモニウム分画法	17
透析	17
陰イオン交換クロマトグラフィー	17
ゲルろ過クロマトグラフィー	18
タンパク質定量	18
タンパク質電気泳動と染色法	19
SDS-PAGE	19
Native-PAGE	19
CBB 染色	19
活性染色	19
活性測定	20
ルミノール発光法	20
第一章 SDS 非存在下における SOD の精製	21
結果	21
陰イオン交換クロマトグラフィーの最適条件	22
ゲル過クロマトグラフィーの精製	27
考察	31
第二章 SDS 存在下における SOD の精製	34
結果	35

SDS に用いたゲル過クロマトグラフィーの精製結果	35
NaCl の SOD 精製への効果	38
SDS 濃度の検討	41
SDS 存在下、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、SOD の最適精製条件	43
SDS 存在下の SOD の活性	46
最適条件における SOD 精製のまとめ	48
結論	51
第三章 SOD の耐性	52
緒言	53
結果	54
SOD の SDS 耐性	54
好熱菌 C36 株由来 SOD の耐熱性	56
好熱菌 C36 株由来 SOD の pH 耐性	59
第四章 新精製法の適用範囲	61
結果	62
新精製方法下で好熱菌 IF012550 株由来 SOD の精製	62
新精製方法下で大腸菌由来 SOD の精製	66
考察	69
まとめ	70
参考文献	71

緒言

細菌では、好熱菌は通常 55°C以上で生育できる菌を指し、このうち、90°C以上でも生育できる菌を超好熱菌、75°C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°C、*Bacillus stearothermophilus* は 60~65°C、*Bacillus megaterium*、*Bacillus coagulans*、*Bacillus circulans*、*Thermus aquaticus*、*Thermus thermophilus* は 70°Cであり、もっとも代表的なものは、*Bacillus stearothermophilus* である (9, 19, 20)。好熱菌タンパク質の多くは、高い耐熱性とともにもその他の耐性も有する。たとえば、タンパク質分解酵素に対する耐性、タンパク質を変性させるような条件（酸、アルカリ、変性剤など）に対する耐性も高い。好熱菌は、その生産する物質は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。また、熱だけでなく、化学変性剤（尿素や界面活性剤など）にも耐性が高いことが知られている。好熱菌が生産する酵素はその安定性から、現在、いろいろな分野で広く利用されている。例えば、製紙業では、従来の方法は、強力な酸または塩基を使用し、リグニンを約 90%まで加水分解処理するが、環境汚染を引き起こすことがある。好熱菌 *Thermotoga* から精製された Xylanase は、この酵素最適処理温度は 105°C、効果的にパルプリグニンを除去し、化学漂白剤の量を減らすことにより、環境汚染を減らすことができる。好熱菌 *Thermoactinomyces* 由来の酵素 Thermoviridin は抗生物質として工業化生産が行われ、医療分野で応用されている。産業利用のために、好熱菌生産する SOD は、熱安定性であり、熱変性、酵素不活性化の一般的な原因である。好熱菌が生産する酵素を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 (1, 4, 5, 11)。

タンパク質特に生育に必須であるタンパク質の変性温度は、生物の生育温度の上限と密接に関わっている。異なる最適生育温度を持つ生物種に由来する相同タンパク質の安定性は、多くの場合、生育温度付近で同じ程度になる。すなわち、種々の塩や糖類、分子シャペロンの関与はあるが、基本的にはタンパク質の耐熱性が生物の生育上限温度を決めている。耐熱性とアミノ酸配列に関係があることを述べる。例えば、常温菌の大腸菌、枯草菌と高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来 IPMDH は、いずれもホモ二量体を形成する。サブユニット接合面には、各サブユニットの 2 本の平行 α ヘリックスが接近して会合し、サブユニット間相互作用を疎水性相互作用で安定化している。好熱菌由来 IPMDH のサブユニット接合面の疎水性残基 Leu と Val を、それぞれ常温菌型の Glu と Met に置き換えると耐熱性が著しく低下し、逆に大腸菌 IPMDH、あるいは枯草菌 IPMDH のこれらの部位に好熱菌型の Leu と Val を導入すると耐熱性が上昇した。しかしながら、酵素の耐熱性の獲得には多くの説がある (19, 20)。

好熱菌 C36 株は土壌から分離した中等度好熱菌、最適生育温度は 60°C、標準的な中度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* IF012550 (以下、IF012550 株と略称) と近縁である。C36 株は SOD の大量生産系であり、C36 株生産する SOD は IF012550 株の生産量の 3 倍以上である。本研究室の安部、草薙、鶴の研究により、C36 生産する SOD は Mn 型のホモ二量体 (ダイマー) であり、一つサブユニットの分子量は 22.5 kDa である。C36 株生産する SOD は変性させるような条件 (温度、酸、アルカリ) に対する耐性が高いほか、界面活性剤 (SDS) に対する耐性も高いが、C36 株生産するタンパク質は相互作用が強く、それよりそのように界面活性剤 SDS を用いて新精製方法により、C36 株由来 SOD を精製した。本研究では好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* C36 株 (以下、C36 株と略称) から得られる MnSOD の工学的有用利用を目的に、SOD の精製と性質を研究した 2,3)。

一般的に、SOD の精製手順は、以下のステップに分けることができる：硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー。例えば、常温菌大腸菌 (*E. coli* B) から SOD の精製方法は、クロマトグラフィーの 2 種類の方法を使用し、CM-52 及び DE-32 13)。ヒト肝細胞 Mn-SOD の精製方法はクロマトグラフィーの 2 種類の方法を使用し、CM-52、DE-52 及び Biogel A 5)。しかし、好熱菌が生産 SOD は常温菌より、精製が難しい、好熱菌 *Bacillus licheniformis* M20 生産する SOD の精製がクロマトグラフィーの 4 種類の方法を使用し：Phenyl-Sepharose, DEAE-Sepharose, Sephadex G-100, Sephadex G-50。しかし、その SOD の回収率は約 11% であり、工業生産には不十分である 7)。この好熱菌由来 SOD の精製が他と比べて特徴的なことは Phenyl-sepharose クロマトグラフィーを用いたことである。これは先に述べた酵素の耐熱性の獲得に疎水性を高めたことに関係のあると考えられた。すなわち、好熱菌の酵素は疎水性が高いためタンパク質間相互作用が強くなり、このため疎水クロマトグラフィーが必要になったと考えられた。工業生産ために、次のような特徴を持っている必要がある：SOD を大量生産が可能、SOD の耐性が高い、SOD を大量回収が可能である。

このため、工業化生産によって、SOD の効率的な新規精製方法を開発することが必要であり、本論文は新規の精製法を示した。

材料

試薬

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
クマーシーブルーリアントブルー 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
酢酸ナトリウム・3水和物	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	特級	ナカライテスク
N,N-ジメチルホルムアミド	$HCON(CH_3)_2$	特級	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	キタ化学
N,N,N',N'-テトラメチレン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
トリスル硫酸ナトリウム	$CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$	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リド	$C_3H_3O_2SF$	Boehringer Mannheim GmbH	
2-プロパノール	$(CH_3)_2CHOH$	特級	キタ化学
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
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	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$		キタ化学
Tryptone			和光純薬
Polypepton			和光純薬
Yeast Extract			関東化学

Ding LingYun 2015

分子量マーカー

Ez Standard(Lot No. A3I0202) (ATTO AE-1440)

Standard SOD

Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* (生化学工業株式会社)

使用した略語は以下のとおりである.

BSA	ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin)
BPB	ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)
CBB	クーマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム (nitro blue tetrazolium)
PMSF	フェニルメチルスルホニルフルオライド (phenylmethylsulfonyl fluoride)
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム (sodium lauryl sulfate)
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)
TEMED	テトラメチルエチレンジアミン (NNN' N' -tetramethylethylene diamine)
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) (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)
C36 株	<i>Bacillus stearothermophilus</i> strain C36
IFO12550	<i>Bacillus stearothermophilus</i> strain IFO12550
<i>E. coli</i> JM109	<i>Escherichia coli</i> JM109

装置

本研究では以下に示す装置を使用した。

- 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)
- 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)
- 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)

使用細菌

好熱菌は、有珠山墳気孔付近から採取した資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°C、形状は桿菌で、グラム染色性は陽性であり、増殖温度によりこの菌は中等度好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* とされた^{14, 16)}。

Table 1 新規好熱菌 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 ^a アミン ^a	-
酸生成	+	アルギニン ^a ヒドロラーゼ ^a	-
D-グルコース	+		
L-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	+		

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℃ 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。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℃ 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。大腸菌の培養に用いた。

実験方法

菌体内タンパク質の抽出

5 ml L' 培地に白金耳を用いて C36 株を植菌し、60°C 100 rpm 18 h 恒温振盪器を用いて前培養した。培養後、培養液を 100 ml L' 培地に滅菌済みピペットで植菌し、60°C、150 rpm、6 h 恒温振盪器を用いて本培養である。培養後、培養液全量を 100 ml 遠心管に移し、4°C、5000 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、5000 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、buffer (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)) 15 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 50 ml のコーニングチューブに移し代え、懸濁液に透明感が出るまで超音波破碎した (出力 2 で 30 sec の破碎を 4 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変え。4°C 10000 rpm 10 min 遠心分離して、上清は菌体内タンパク質とした。

硫酸アンモニウム分画法

菌体より得られた菌体内合成タンパクを 80 % 硫酸アンモニウム塩析による濃縮を行った。4°C 下において硫酸アンモニウムが完全に溶解後、20 分間静置し、その後遠心分離 (4°C, 10,000 rpm, 20min) を行いえられた、沈殿を 20mM Tris-HCl (pH 8.0) Buffer に溶解し、その後 20mM Tris-HCl (pH 8.0) Buffer における透析による脱塩をおこなった。

透析

試料内の硫酸アンモニウムを除去する目的として、セロハン膜チューブを用いた透析をおこなった。透析膜を脱イオン水で洗浄後、一端はクリップに対してクローズし、蛋白質を入れ、他の側をクリップで閉めた。そしてチューブを透析 buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1mM PMSF、0.1mM MnSO₄、1L) に入れ、4°C 6 時間攪拌で置いた。6 時間後、新透析 buffer を替え、4°C 6~10 時間攪拌した。

陰イオン交換クロマトグラフィー

陰イオン交換クロマトグラフィーは、電荷の違いを利用してタンパク質分子を分離す

る方法である。タンパク質では、弱酸性や弱塩基性など多種類のイオン性のアミノ酸を含み、正の電荷と負の電荷の両方を分子表面に持っている。イオン交換基とイオン性のアミノ酸の可逆的な相互作用の他にも、主にファンデルワールス力や非極性相互作用により結合する可能性がある、その影響はイオン結合に比べればごく弱いため、有効表面電荷をコントロールするだけでイオン交換クロマトグラフィーによる精製が成り立つ。

陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離は次のようなステップでおこなった。

1. 担体 (DEAE-Sepharose fast flow) はカラムへの 5ml を充填した。
2. 担体ゲルの活性化 : 0.5M NaOH、0.5M NaCl を 15 ml 担体ゲルにとおし、担体ゲルを洗浄した。
3. 担体ゲルの平衡化 : buffer 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) により、pH 8.0 になるまで流し平衡化でした。
4. タンパク質の分離 : タンパク質溶液を担体に流し、ゲルと結合させて、その後、buffer のイオン強度により、三段階の stepwise (0.05M NaCl、0.1M NaCl、0.5M NaCl) で分離した。
5. 分離したタンパク質を収集し、分光光度計を用いて総タンパク質量を吸収波長 280nm で測定した。

ゲルろ過クロマトグラフィー

ゲルろ過クロマトグラフィーは、簡単でしかも信頼性の高いクロマトグラフィーであり、カラムにつめた担体にサンプルを通して、大きさの違いによって分子を分離する手法である。担体の間をすり抜けて分子は溶出される。担体には小さな孔が開いており、小さい分子はその孔に入り込むため、大きい分子より遅く溶出される。

本実験は担体ゲル Sephacryl S-200 High Resolution により、好熱菌 C36 株由来の Mn-SOD の精製は精製条件の最適化を検討した。

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と染色法

SDS-PAGE ¹⁵⁾

タンパク質標品に、同量の SDS 用サンプル処理液 (BPB 25 mg、グリセリン 20 mM、0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 10 ml、10 % SDS 10ml、2-メルカプトエタノール 2 ml を加え、超純水で 50ml にメスアップ) を加えて 2 倍量にした後、100°C で 1 分間加熱処理し、急冷した。電気泳動を Laemmli 法でおこなった。ゲルは分離用ゲル (濃度 12.5 % : 30 % アクリルアミド 3.75ml、1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 2.25ml、10 % SDS 0.09ml、超純水 2.85ml、TEMED 0.01 ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.05ml) 及び濃縮用ゲル (濃度 4.5 % : 30% アクリルアミド 0.9 ml、0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.5ml、10 % SDS 0.06ml、超純水 3.6 ml、TEMED 0.01ml、10% 過硫酸アンモニウム 0.018 ml) を合わせて固めたものを用いて、30 mA で電気泳動をした。

Native-PAGE

上記の Laemmli 法を改変した。加熱操作をおこなっていないタンパク質標品に、同量の 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) 10ml を加え、超純水で 50ml にメスアップ) を加えて 2 倍量にした。native 用 buffer (Tris 6 g、グリシン 28 g を加えて、超純水で 2l にメスアップ) を用いて、電気泳動をおこなった。ゲルは分離用ゲル (濃度 12.5 % : 30 % アクリルアミド 3.75ml、1.5M Tris-HCl (pH8.8) 2.25ml、超純水 2.94ml、TEMED 0.01ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.05ml) 及び濃縮用ゲル (濃度 4.5 % : 30 % アクリルアミド 0.9ml、0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.5ml、超純水 3.66ml、TEMED 0.01ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.018ml) を合わせて固めたものを用いて、30 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 1l 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。

活性染色⁶⁾

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ブンをうい、アルミホイルで遮光しながら 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、ハイブリダイゼーションオーブンをうい、アルミホイルで遮光しながら 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。

活性測定

ルミノール発光法¹²⁾

AccuFLEX Lumi400 (ALOKA 製) の電源を入れ、ラジカルキャッチ (BLR-ALBI-01) を室温に戻し、転倒混合した。試薬 C 液 (過酸化水素水) 10ul を精製水 10ml (超純水でも可) に加えて転倒混合し、1000 倍希釈液とした。無色透明の 1.5ml エッペン試薬 A 液 (塩化コバルト) と B 液 (ルミノール) を 25ul ずつ分注し、サンプルを 10ul 加えた。(コントロールには 10mM Tris-HCl (pH 8.0) を使用) 測定室内でインキュベーション (37°C 5min) した。試薬 C 希釈液を 25ul 加え、OD₄₃₀ にてルミノール発光量を測定した。発光量として、測定 80 秒から 120 までの積算値を用いて、そして消去率が次式により求めた。

$$\text{消去率 (\%)} = \frac{\text{コントロール発光量} - \text{サンプル発光量}}{\text{コントロール発光量}} \%$$

SOD の活性値はコントロール発光量の 1/2 を与えるサンプル濃度又は消去率 50% のサンプル濃度として求めた。

第一章 SDS 非存在下における SOD の精製

結果

陰イオン交換クロマトグラフィーの最適条件

陰イオン交換クロマトグラフィーは、三つのイオン強度の buffer によるステップ法で、タンパク質を分離した。50ml Buffer ① 20mM Tris-HCl (PH8.0)、0.05M NaCl; 50ml buffer ② 20mM Tris-HCl (PH8.0) 0.1M NaCl; 50ml buffer ③ 20mM Tris-HCl (PH8.0)、0.5M NaCl、100 drops/faction 溶出液を用いておこなった。Buffer ②の条件下で、SOD を溶出して (figure 1) ; buffer ③の条件下で、夾雑タンパクの多くの部分が除去された。C36 株由来 SOD の一つサブユニットの分子量は 22.5 kDa であり、SDS-PAGE (figure 2) に見られるように、硫酸アンモニウム分画したタンパク質から陰イオン交換クロマトグラフィーにより、混雑タンパク質の多くが除去された、SOD の精製程度は大幅に向上された。

陰イオン交換クロマトグラフィー後、精製した SOD は Native-PAGE (figure 3) により、SOD の活性が保持されていることが示された。粗抽出から陰イオン交換クロマトグラフィーまでの段階で、約 42% の SOD が回収された (table 2)。

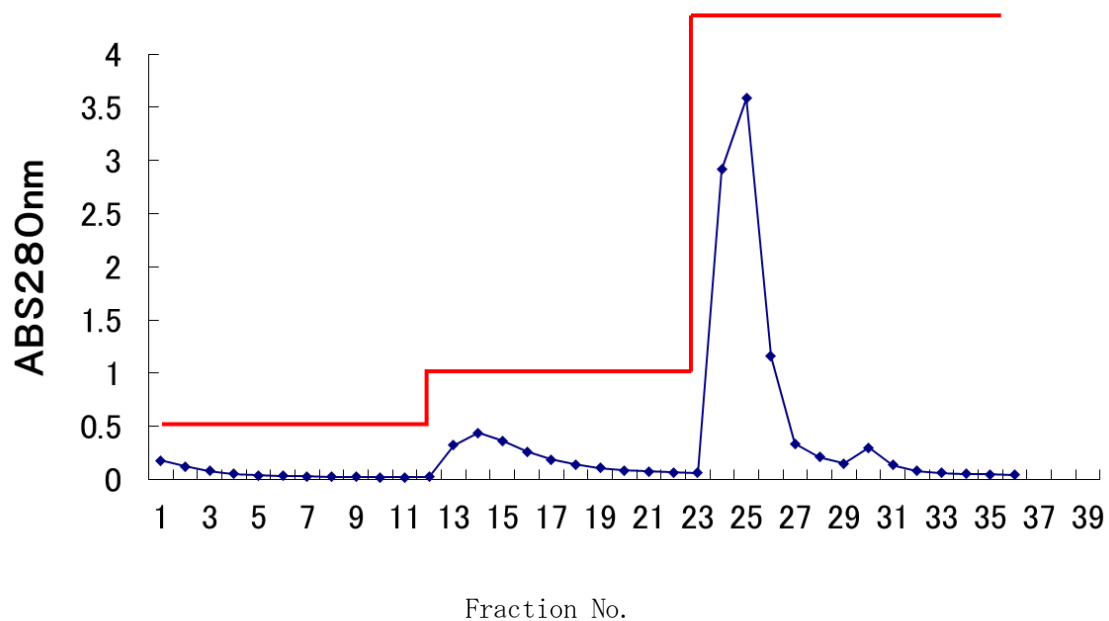


Figure 1 陰イオン交換クロマトグラフィーの最適条件
担体ゲル DEAE-Sepharose Fast Flow 100 drops/faction
カラム ϕ 2.0X10cm

Stepwise	Fraction Range	20mM Tris-HCl (pH 8.0)	NaCl	Volume
	1-11	0.05M	NaCl	50ml
	12-23	0.1M	NaCl	50ml
	24-37	0.5M	NaCl	50ml

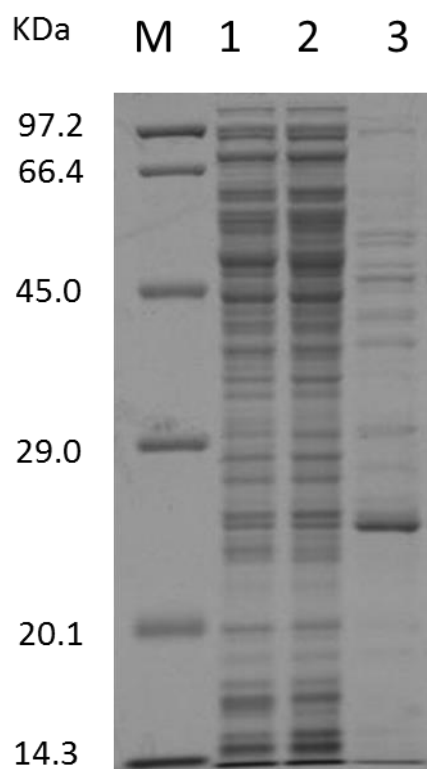


Figure 2 陰イオン交換クロマトグラフィーにより SOD の精製程度
SDS-PAGE, CBB 染色

Lane M 分子量マーカー, Lane 1 粗抽出, Lane 2 硫酸アンモニウム分画

Lane 3 陰イオン交換クロマトグラフィー (Fig.1 の No. 13-No. 18)

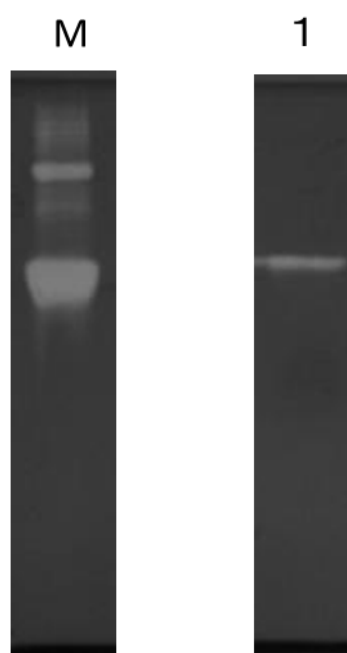


Figure 3 陰イオン交換クロマトグラフィーにより SOD の活性
Native-PAGE、活性染色

Lane M Standard SOD, Lane 1 陰イオン交換クロマトグラフィー

Table 2 精製プロセスの活性回収率

Step	体積(ml)	濃度(mg/ml)	全活性(u)	比活性(u)	fold	回収率%
蛋白質の粗抽出	31.0	6.17	127100	665	1.00	100%
硫酸分画	15.5	9.26	108500	756	1.14	85%
透析	23.0	6.20	104200	731	1.10	82%
陰イオン交換 DEAE-Sepharose	38.5	0.44	53470	3156	4.75	42%

ゲル過クロマトグラフィーの精製

陰イオン交換クロマトグラフィーで SOD を含む分画は硫酸分画を濃縮し、担体 Sephacryl S-200 (buffer 20 mM Tris-HCl(pH 8.0), 0.1 M NaCl) によって分離した。ゲル過クロマトグラフィーの画分を吸光度 280 nm で測光した結果を figure 4 に示した。単一のピークが見られ、タンパク質の分離が完全でないことを示唆していた。さらに各画分を電気泳動 SDS-PAGE したところ、分子量が異なるタンパク質が混在し、SOD と夾雑タンパク質を分離できていないことが明らかであった (figure 5)。

また、Native-PAGE からも SOD がより大きな分子量のタンパク質と挙動を同じにしていたとか示された (figure 6)。

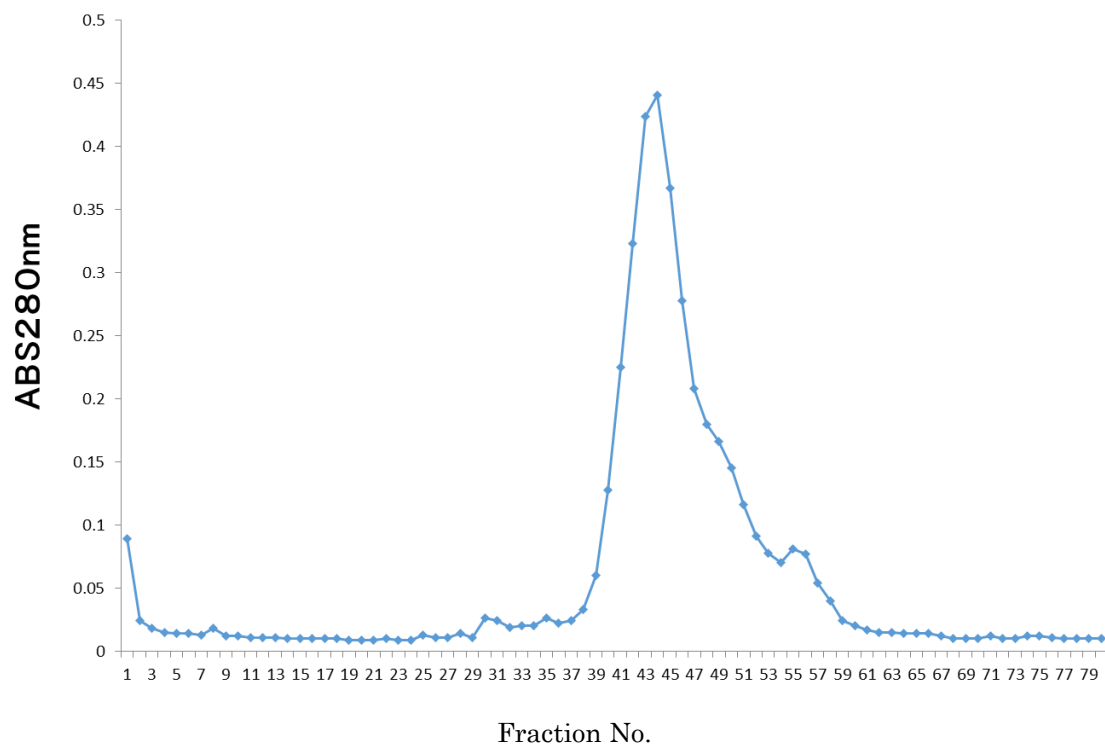


Figure 4 ゲル過クロマトグラフィーにより収集した溶出液グラフ
担体 Sephacryl S-200
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60$ cm
Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M NaCl

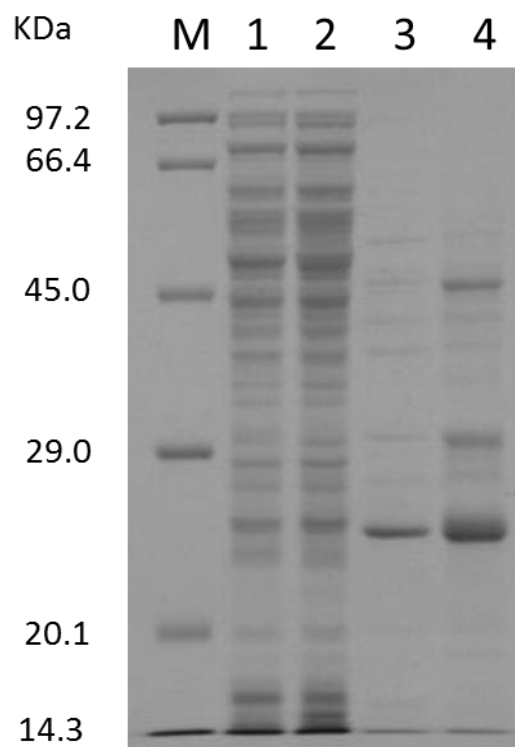


Figure 5 SOD と夾雑タンパク質が分離できない
SDS-PAGE, CBB 染色

- Lane M 分子量マーカー, Lane 1 粗抽出, Lane 2 硫酸アンモニウム分画
Lane 3 陰イオン交換クロマトグラフィー
Lane 4 ゲル過クロマトグラフィー(Fig. 4 の No. 45-No. 49)



Figure 6 **SOD** と大きな分子量のタンパク質挙動を同じ
Native-PAGE, CBB 染色

Lane M Standard SOD, Lane 1 粗抽出, Lane 2 硫酸アンモニウム分画
Lane 3 陰イオン交換クロマトグラフィー, Lane 4 ゲル過クロマトグラフィー

(試料は Fig. 5 と同じ)

考察

通常のゲル過クロマトグラフィーによって、SOD と他のタンパク質が分離的なかった。なぜ、そのような状況があるのでしょうか？以下は、議論の結果である。

タンパク質の構造上の最も一般的な特徴の一つは、タンパク質内部は疎水性が高く表面は親水的であることである。疎水性残基は内部に集まり、親水性残基は表面に見られる。常温菌由来タンパク質と比較して、好熱菌タンパク質は高温における熱安定性を得るために分子内結合が強いことが知られている。

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にあることが特徴づけられた。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。また、好熱菌タンパク質はミャペロニ、カチオンとの相互作用が報告されているように、タンパク質の表面疎水性アミノ残基が多い、表面荷電も多い^{8,9,10}。

好熱菌 C36 株由来 SOD は一次構造のアミノ酸が 203 であり、疎水性アミノ酸が 49.8%含まれている。常温菌の大腸菌 SOD は一次構造のアミノ酸が 205 であり、疎水性アミノ酸が 44.9%含まれている。C36 株と大腸菌 (*E. coli*) SOD 一次構造のアミノ酸配列を比較すると、アミノ酸配列は、83%同一であり、変更された部分は、いくつか親水性アミノ酸から疎水性アミノ酸に変化している。セリン→アラニン、グリシン→イソロイシン、チロシン→イソロイシン、このような変化は、タンパク質表面の疎水性を増加させ、タンパク質の耐熱性を増加し、しかし、疎水性残基の存在がタンパク質の分離することを妨害する。したがって、好熱菌のタンパク質の分離は常温細菌よりも難しい。そのため、好熱菌 C36 由来タンパク質間相互作用が強いのであると推察され、これまでのゲル過クロマトグラフィー条件では、その相互作用のために分離精製ができなかったものと考えられた^{16,21}。

E.coli	--SYT	LPSLP	YAYDA	LEPHF	DKQTMEI	27
C36	PFELP	LPALP	YPYDA	LEPHI	DKETMNI	27
	HHTKH	HQTYV	NNANA	ALESL	PEFANLP	54
	HHTKH	HNTYV	TN LNA	ALEGH	PDLQNKs	54
	VEELI	TKLDQ	LPADK	KTVLR	NNAGGHA	81
	LEELL	SNLEA	LPESI	RTAVR	NNGGGHA	81
	NHSLF	WKGLK	K-G- T	TLQGD	LKAAIER	108
	NHSLF	WT I LS	PNGGG	EPTGE	LAEAINK	108
	DFGSV	DNFKA	EFEKA	AASRF	GSGWAW I	135
	KFGSF	TAFKD	EFSKA	AAGRF	GSGWAWL	135
	VLK--	GDKLW	YYSTA	NQDSP	LMGEA IS	162
	VVN--	NGELE	I TSTP	NQDSP	I MEGKTS	162
	GASGP	PLMGL	DVWEH	AYYLK	FQNRRPD	189
	-----	P I LGL	DVWEH	AYYLK	YQNRRPE	189
	Y I KEF	WNVVN	WDEAA	--ARF	AAKK	213
	-- -AF	WN IVN	WDEVA	KRYSE	AKAK	213

Figure 7 C36 株と大腸菌 (E.coli) SOD 一次構造のアミノ酸配列

好熱菌 *Bacillus licheniformis* M20 生産する SOD の精製がクロマトグラフィーの 4 種類の方法を使用し:Phenyl-Sepharose、DEAE-Sepharose、Sephadex G-100、Sephadex G-50。その中で Phenyl-Sepharose クロマトグラフィーは疎水クロマトグラフィー、好熱菌の場合、タンパク質間相互作用が強いため、分離に用いられなかったと考える。しかし、疎水クロマトグラフィーによって、SOD 活性の回収が大幅に値下した。そのため、新しい精製方法を開発する必要があった。

Sodium dodecyl sulfate (SDS) は陰イオン性界面活性剤の 1 つである。一般的に、SDS は電気泳動(SDS-PAGE)においてタンパク質を変性させるために使用される。SDS はタンパク質の非共有結合を分離させ、分子の高次構造を失わせる。さらに、SDS の陰イオンは、1 つの SDS 陰イオンに対し 2 つのアミノ酸残基の比率で主ペプチド鎖に結び付く。これにより、そのタンパク質の質量に比例した負電荷を効果的に分配する。SDS の結合により生成される

静電気反発作用は、タンパク質の折りたたみ構造を棒状構造へと変化させることにより、ゲル中泳動時におけるタンパク質形状の差による影響を取り去る。言い換えれば、SDS はタンパク質表面張力を弱める作用を持つ、タンパク質間相互作用を減少することができる。常温菌と比較して、好熱菌タンパク質は、変性剤（SDS）に対する耐性が高い、これより、0.1%SDS を buffer においてに添加し、ゲル過クロマトグラフィーにより、SOD の精製を試みた。

第二章 SDS 存在下における SOD の精製

結果

SDS を用いたゲル過クロマトグラフィーの精製

陰イオン交換クロマトグラフィー後、0.1 % SDS 存在下ゲルろ過クロマトグラフィーをおこなって、溶出液 50 drops/fraction を収集した。収集した画分の吸光度 280nm を測定した。ゲルろ過クロマトグラフィーのプロファイルは 2 つのピークを有し、第 2 のピーク (Fig. 8 No. 50-No. 55) に SOD 活性を見ることができた。これより、SDS が存在しないゲルろ過クロマトグラフィーと比較して、SOD 存在下では夾雑タンパクの多くが除去された (figure 8、9)。しかしながら、分子量 20KDa-50KDa にも SOD 以外のタンパクバンドかすかに見られた (Fig. 9 lane 3)。

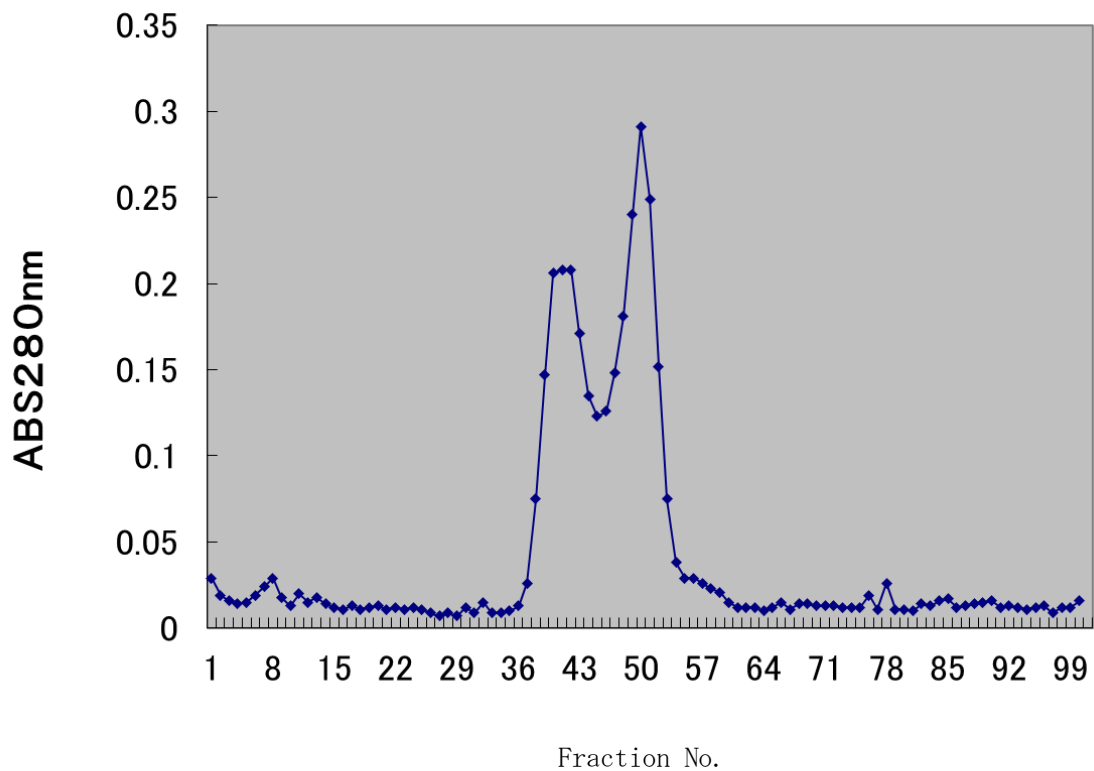


Figure 8 SDS におけるゲル過クロマトグラフィー
担体 Sephacryl S-200
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60 \text{cm}$
Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 0.1 % SDS

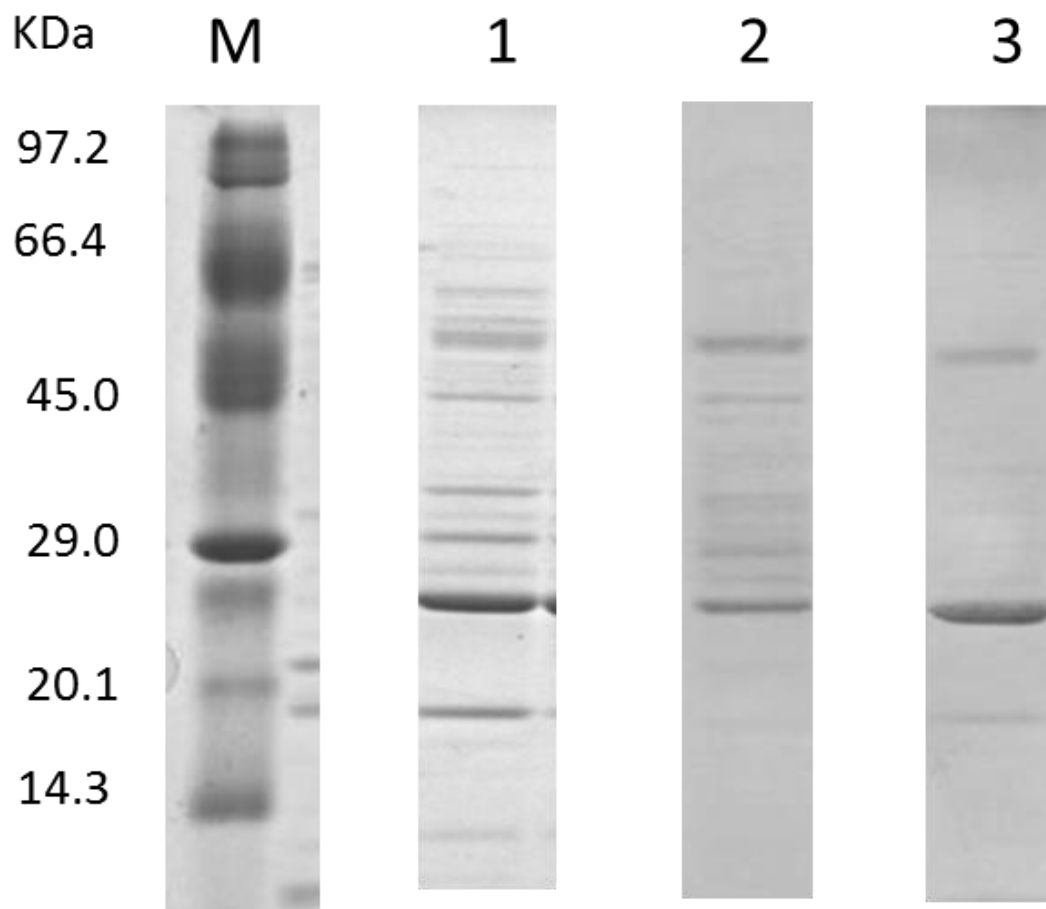


Figure 9 SDS 存在下、SOD の精製を向上
SDS-PAGE, CBB 染色

Lane M 分子量マーカー, Lane 1 陰イオン交換クロマトグラフィー, Lane 2 SDS 非存在下のゲル過クロマトグラフィー, Lane 3 0.1%SDS 存在下ゲル過クロマトグラフィー

NaCl の SOD 精製への効果

SDS 存在しない場合、NaCl 単独の効果を確認した (figure 10、11)。高濃度の NaCl は、タンパク質の分離を促進するかどうかを確認した。0.5M NaCl 存在下でゲル過クロマトグラフィーによって、SOD を精製し、Figure 10 より、単一のピークが見られん、figure 11 より、SOD と夾雑タンパク質が分離できなかった。このより、NaCl のみでは SOD と他のタンパク質との結合を弱めることができなかつた。よつて、NaCl の効果は SDS に対し、補助的であつたと考えられた。

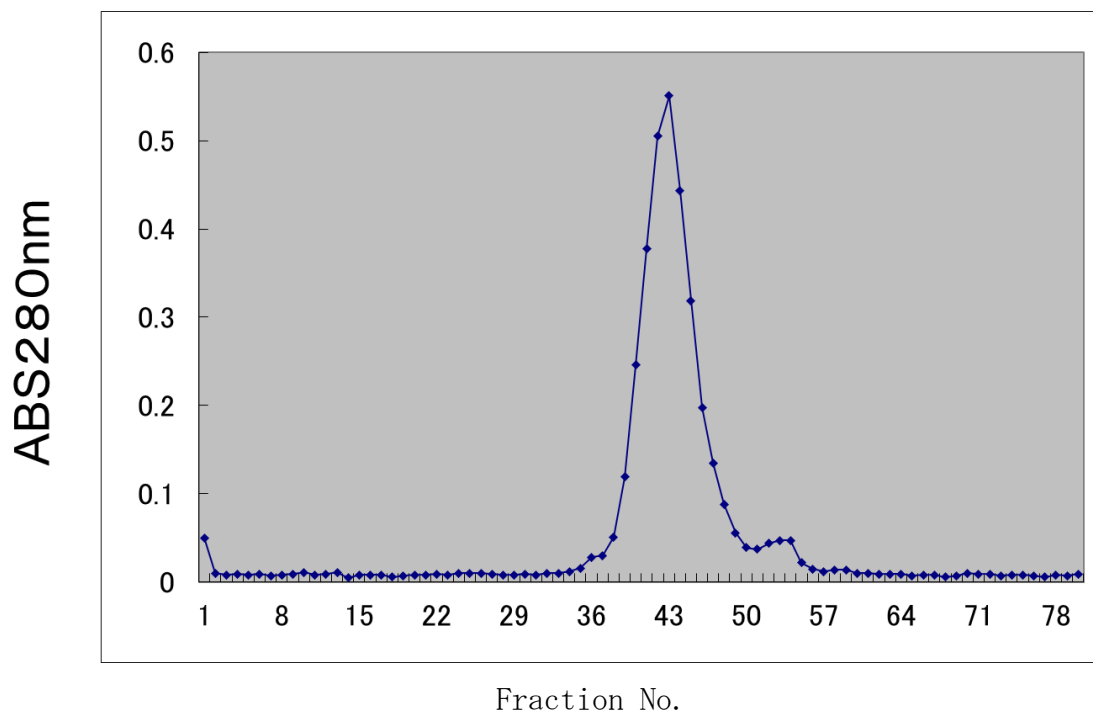


Figure 10 SDS 非存在下、0.5M NaCl におけるゲル過クロマトグラフィー
担体 Sephacryl S-200
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60$ cm
Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl

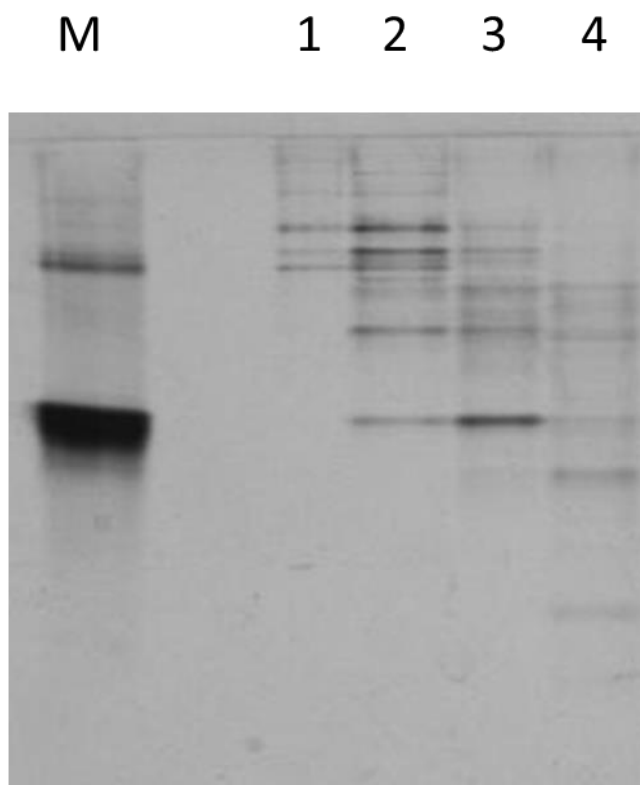


Figure 11 0.5M NaCl ゲル過クロマトグラフィーの Native-PAGE
Native-PAGE、CBB 染色

Lane M Standard SOD

Lane 1 0.5M NaCl ゲル過クロマトグラフィー、fraction No. 41

Lane 2 0.5M NaCl ゲル過クロマトグラフィー、fraction No. 42

Lane 3 0.5M NaCl ゲル過クロマトグラフィー、fraction No. 43

Lane 4 0.5M NaCl ゲル過クロマトグラフィー、fraction No. 44

SDS 濃度の検討

ゲル過クロマトグラフィーにおいて、0.1 % SDS、0.1M NaCl はタンパク質の分離を促進することができるが、SDS 濃度の検討をおこなった。SOD 濃度が増加すると、SOD の精製結果を検討した。他の条件を一定し、SDS に 0.3 % 上昇し、NaCl に 0.5M 上昇したゲル過クロマトグラフィーにより、SOD を精製した。

Figure 12 に見られるように、0.3 % SDS 存在下、タンパク質の分離を促進することができ、でも夾雑タンパク質を残り、0.1 % SDS の結果と比較すると、分離の程度を下げた。SDS の濃度を増加させると、SOD の精製が向上することがなかった。

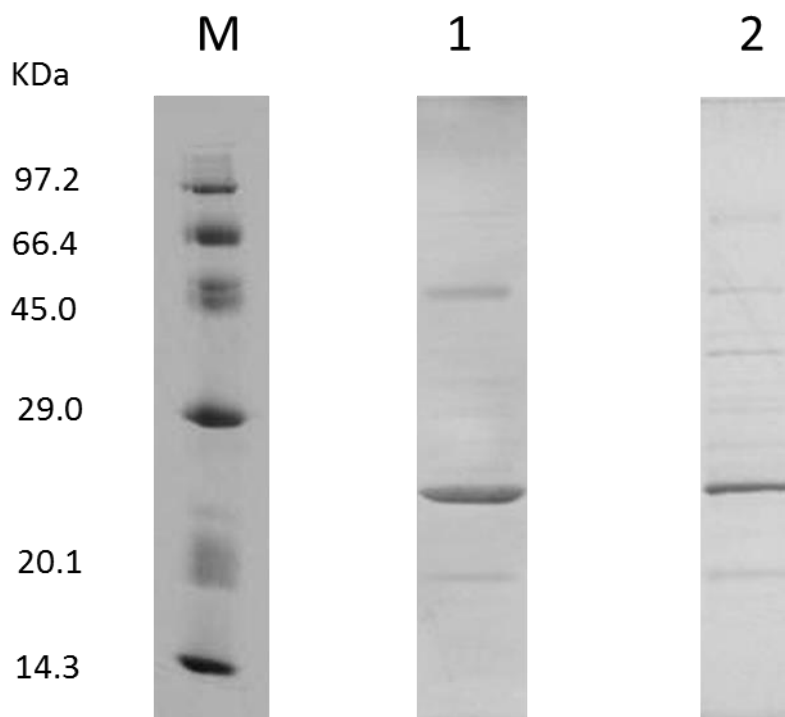


Figure 12 SDS 濃度変化に対して、SOD の精製の影響
SDS-PAGE, CBB 染色

Lane M 分子量マーカー

Lane 1 0.1% SDS, 0.1M NaCl のゲル過クロマトグラフィー

Lane 2 0.3% SDS, 0.5M NaCl のゲル過クロマトグラフィー

SDS 存在下、ゲルろ過クロマトグラフィーによって、SOD の最適精製条件

SDS の添加により SOD の精製純度が高まったが、さらに NaCl によりイオン強度を上げ、タンパク質間相互作用を低減させ精製をおこなった。NaCl の役割は buffer のイオン強度を高いため、タンパク質の分離を助長することができる。異なる NaCl 濃度を用いて buffer、0.1 % SDS 存在下ゲルろ過クロマトグラフィーにより、各画分のクロマトグラムを確認した (figure 13)。

NaCl 濃度を 0.1、0.2、0.3 そして 0.5 M と変化させたところ、SDS-PAGE により、0.1 % SDS と 0.5 M NaCl 下ゲルろ過クロマトグラフィー下で、夾雑タンパク質が完全に除去されて、SOD が単一タンパク質として得ることができた (figure 13、14)。

SOD の最適精製条件を確認された、その条件は 0.1 % SDS、0.5M NaCl であった。

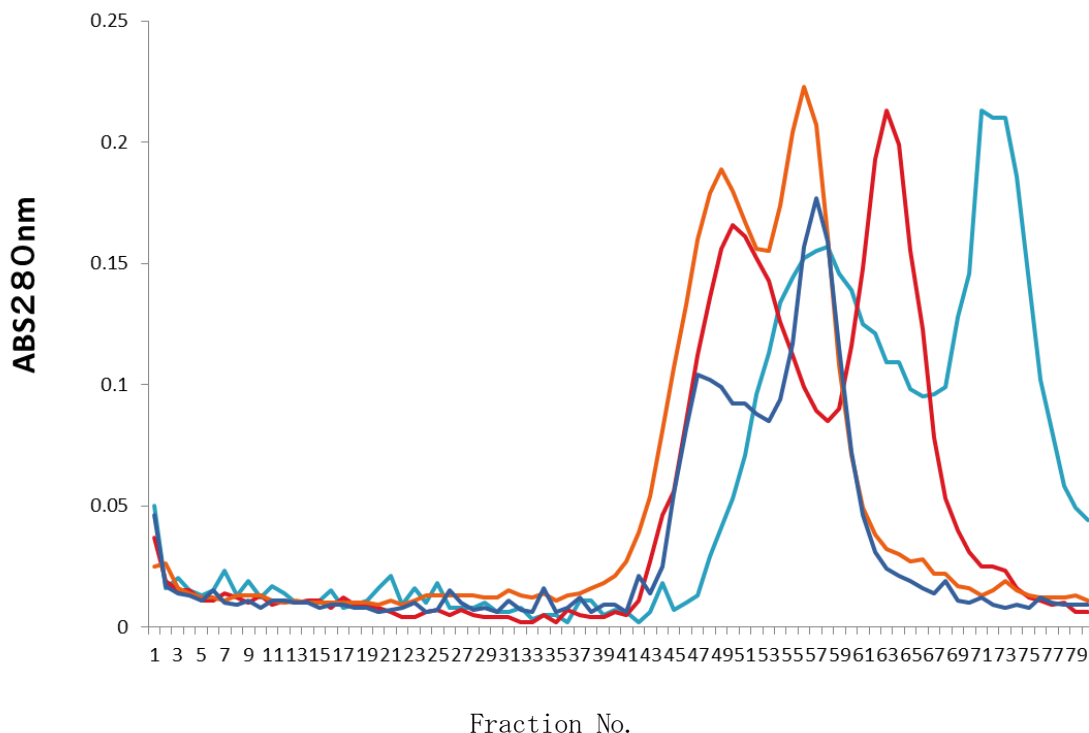


Figure 13 異なる buffer のゲル過クロマトグラフィー
Sephacryl S-200
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60 \text{cm}$

— 0.1 % SDS, 0.5 M NaCl — 0.1 % SDS, 0.3 M NaCl — 0.1 % SDS, 0.2 M NaCl — 0.1 % SDS, 0.1 M NaCl

Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 M NaCl、0.1 % SDS
20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.2 M NaCl、0.1 % SDS
20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.3 M NaCl、0.1 % SDS
20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5 M NaCl、0.1 % SDS

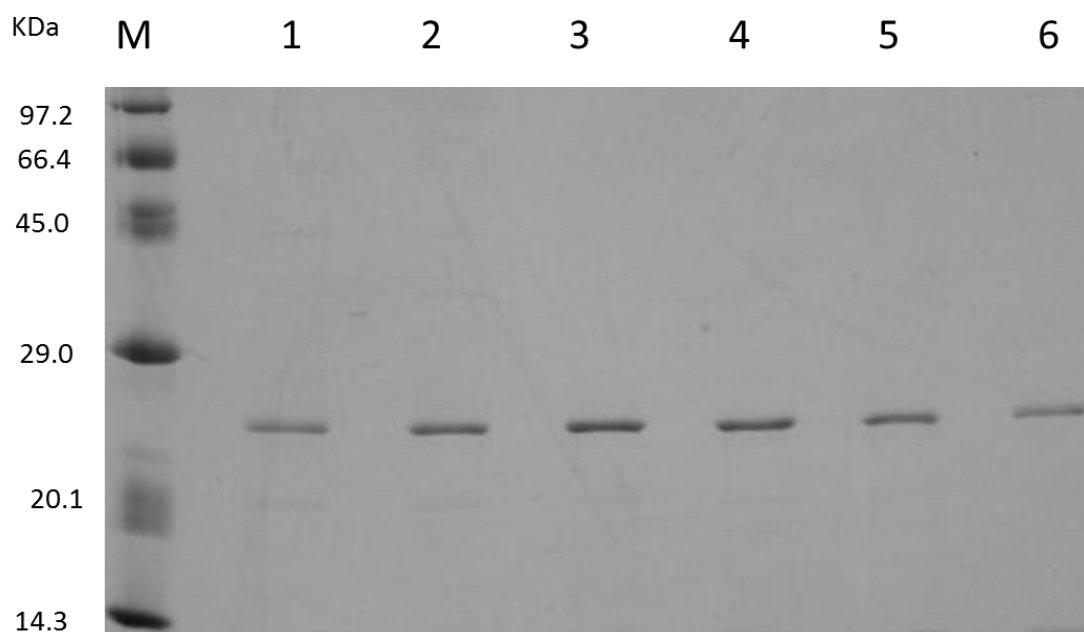


Figure 14 0.1 % SDS、0.5 M NaCl のゲル過クロマトグラフィー
SDS-PAGE, CBB 染色

Lane M 分子量マーカー, Lane 1 Fraction No. 72, Lane 2 Fraction No. 73
Lane 3 Fraction No. 74, Lane 4 Fraction No. 75, Lane 5 Fraction No. 76
Lane 6 Fraction No. 77

SDS 存在下の SOD の活性

SDS はタンパク質の非共有結合を分離させ、分子の高次構造を失わせ、タンパク質を変性するため、SDS の存在下での SOD 活性の残存は、重要な要素である。最適精製条件下で、電気泳動 Native-PAGE、活性染色により、ゲル過クロマトグラフィー後の SOD 活性を測った。その結果、精製した SOD は、その活性を維持していることが示された (figure 15)。

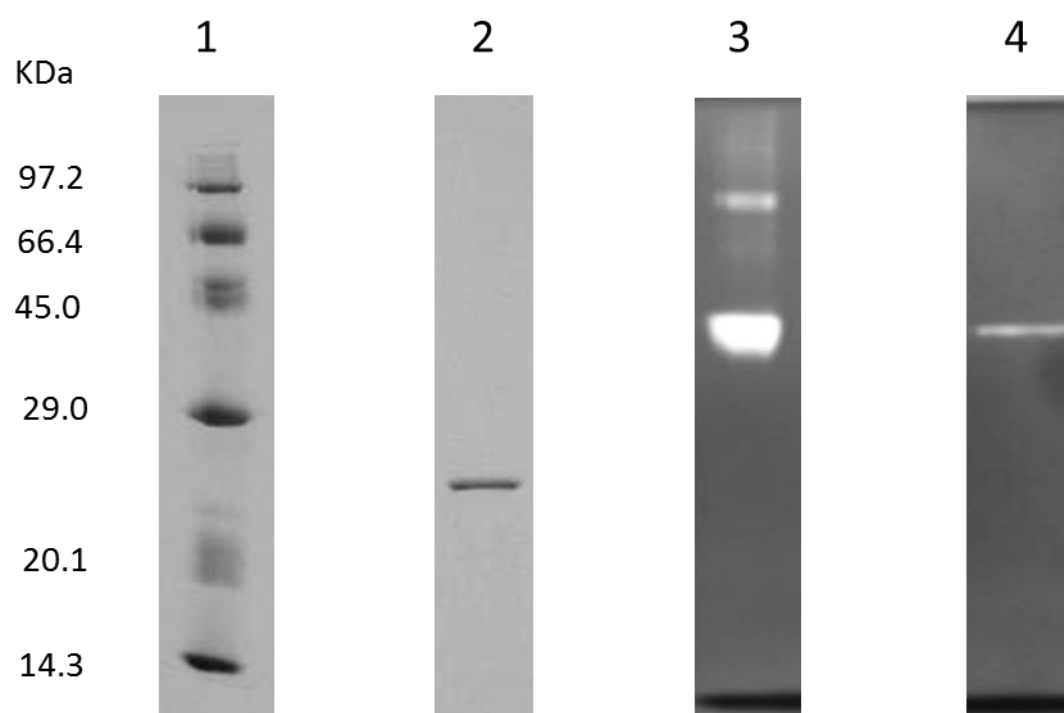


Figure 15 S-200 の最適条件下で、SOD 活性が維持

Lane 1 分子量マーカー, Lane 2 精製した SOD (SDS-PAGE, CBB 染色)

Lane 3 standard SOD, Lane 4 精製した SOD (Native-PAGE, 活性染色)

最適条件における SOD 精製のまとめ

硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーの各精製手順にしたがった SOD 純度を SDS-PAGE で確認した (figure 16)。硫酸アンモニウム沈殿法は濃縮効果だけがあり、精製には寄与しなかった。陰イオン交換クロマトグラフィーで多く夾雑タンパク質が取り除かれ、SDS 存在下のゲルろ過クロマトグラフィーで単一 SOD が獲得できた。各過程の活性、回収率などは Table 3 にまとめた。SOD は 33% が回収され、SDS における新規精製方法を確認した。

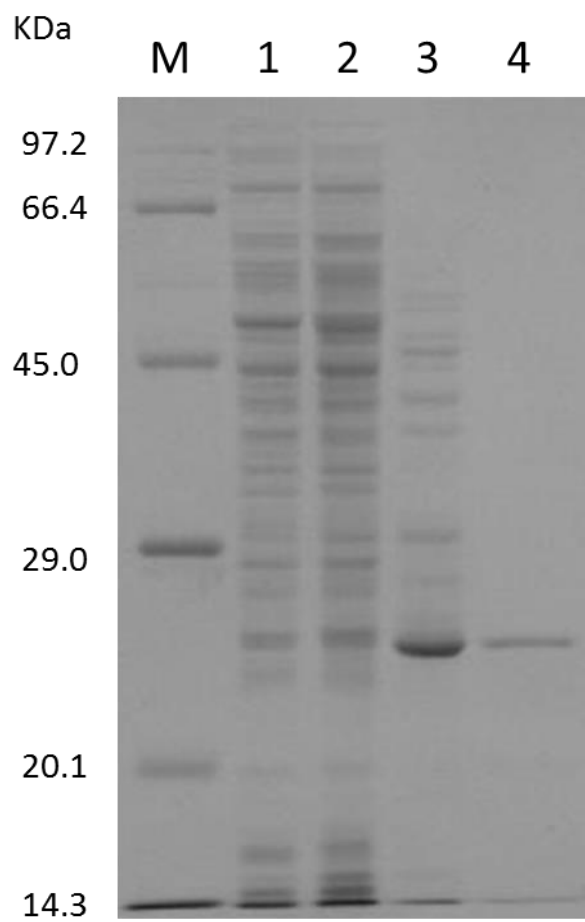


Figure 16 精製プロセスの結果
SDS-PAGE、CBB 染色

Lane M 分子量マーカー, Lane 1 粗抽出, Lane 2 硫酸アンモニウム分画
Lane 3 陰イオン交換クロマトグラフィー, Lane 4 ゲル過クロマトグラフィー

Table 3 SOD の精製段階と活性

Step	体積(ml)	濃度(mg/ml)	全活性(u)	比活性(u)	fold	回収率%
蛋白質の粗抽出	31.0	6.17	127100	665	1.00	100%
硫酸分画	15.5	9.26	108500	756	1.14	85%
透析	23.0	6.20	104200	731	1.10	82%
陰イオン交換 DEAE-Sepharose	38.5	0.44	53470	3156	4.75	42%
ゲルろ過 Sephacryl S-200	10.0	0.75	42410	5655	8.50	33%

結論

これまで、好熱菌由来の SOD の精製には疎水クロマトグラフィーを併用し、精製ステップが多くなり、回収率の低下が問題であった。

本論文の新規精製法はゲルろ過クロマトグラフィーの buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0、0.5 M NaCl) に 0.1 % SDS を加えることで、精製を単純化することができ、33%の高い回収率で SOD を得ることができた。

第三章 SOD の性質

緒言

タンパク質分子の安定性はアミノ酸側鎖間およびタンパク質の三次構造における、1) 共有結合、2) 静電相互作用、3) 水素結合、4) ファンデルワールス力（レナードジョーンズ相互作用）、5) エントロピーなどを考えればよい。タンパク質の構造上の最も一般的な特徴の一つは、タンパク質内部は疎水性が高く表面は親水的であることである。膜タンパク質を除くほとんどのタンパク質で、疎水性残基は内部に集まり、親水性残基は表面に見られる。すなわち、分子内部の疎水性相互作用はタンパク質の立体構造形成に関わる最も重要な力であるといえる。タンパク質の安定性に対する疎水性相互作用の重要性は、多くのタンパク質で ΔG_{NU} が最大となる温度が、疎水性相互作用が最も大きくなる 20°C 付近であることから予想される。これは、常温生物由来タンパク質だけではなく好熱菌由来タンパク質においても成り立っている。超好熱菌由来タンパク質の疎水コアを形成する疎水性残基の耐熱性への寄与が、超好熱菌 *Thermococcus kodakaraensis* 由来リボヌクレアーゼ HII を用いた研究からも確かめられた¹⁷⁾。

好熱菌タンパク質は、常温菌由来相同タンパク質と比較して小さい傾向がある。これはとりわけ表面に露出したループの短鎖化として見られ、高温領域での安定性を高めることができる¹⁸⁾。好熱菌が生産する酵素はその安定性から、現在、いろいろな分野で広く利用されている。好熱菌 C36 株由来のタンパク質は SDS 存在下における、高純度の SOD を獲得することができた。しかし、SDS はタンパク質の非共有結合を分離させ、分子の高次構造を失わせことができる。したがって、SOD の SDS 耐性は非常に重要であり、精製のプロセスで、SOD 活性を損失で知ることが重要である。

本実験では C36 株由来の SOD に対して、SDS 耐性、耐熱性、pH の適用範囲を検討し、SOD の性質についてもっと詳しく知ることが求めた。

結果

SOD の SDS 耐性

好熱菌 C36 株、好熱菌 IF012550 株、常温菌 *E. coli* JM109 株の SOD の SDS 耐性を測った (figure 17)。SDS 非存在下の SOD を 100 % 活性として、0.1 % SDS と 0.3 % SDS 存在下で、SOD は温度 25 度で、1 h を静置し、ルミノール発光法により、残存活性を測定した。

0.1 % および 0.3 % SDS により、大腸菌 SOD の活性はそれぞれ 32 %、25 % まで低下したが、いずれの好熱菌由来 SOD は耐性を示した (figure 17)。好熱菌 IF012550 株は 0.1 % SDS で 82 % に活性が下がり、0.3 % では、57 % まで低下した。しかしながら、C36 株は 0.1 %、0.3 % SDS で、それぞれ 94 %、83 % と高い活性を保持した。

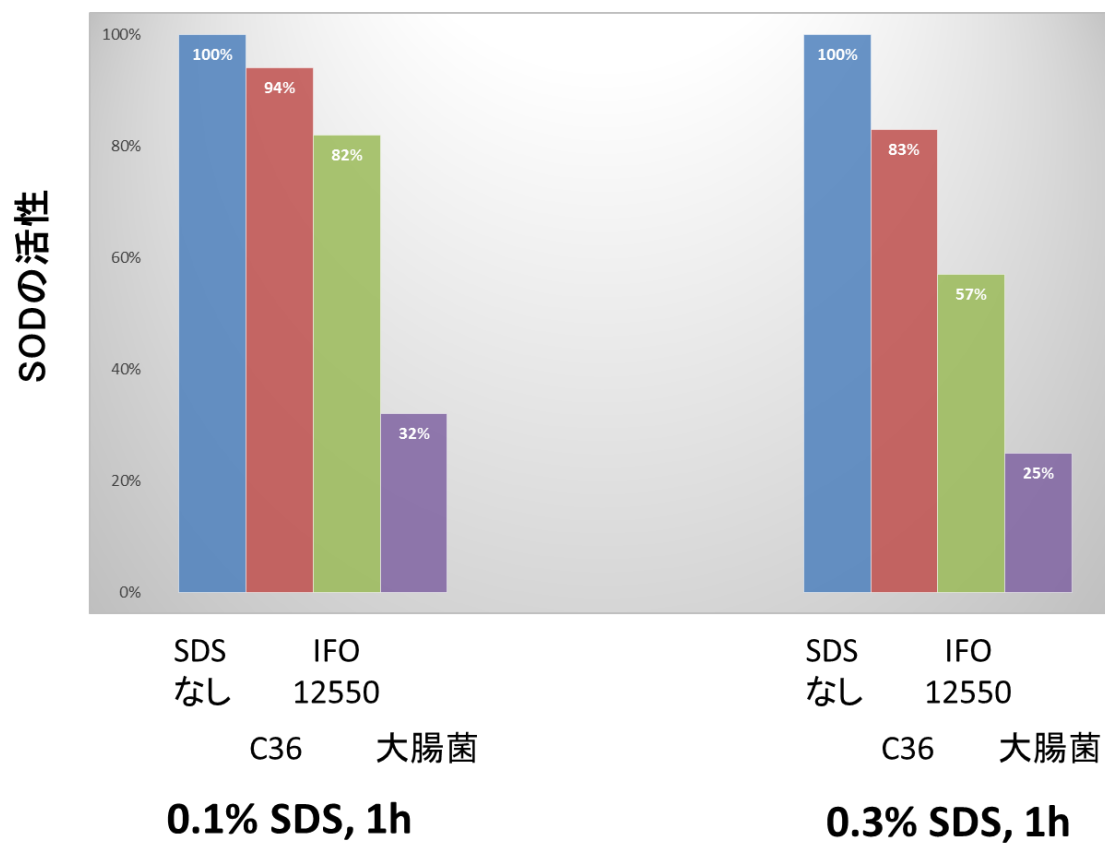


Figure 17 SOD の SDS 耐性

それぞれの菌体において、SDS を添加しないときの活性を 100 % としてあらわした

好熱菌 C36 株由来 SOD の耐熱性

異なる温度条件(25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, および 100°C)に基づいて SOD の活性変化を測定した。各温度に 10 分間を維持して、その後ルミノール発光法によって、SOD の活性を測り、室温(25°C)SOD の活性をコントロール(100%)とした(figure 18)。図より、C36 株由来 SOD の耐熱性は 65°Cまで、ほぼ初期の活性を保持していることが示された。その後、70°C以上で急激に活性が失われたが、100°Cも 50%を温存した。

Figure 19 は SOD の活性は熱処理時間の変化により現した変化を示した。さらに耐熱性の変化を見たところ、60°Cまでは活性の時間低下はゆるやかであったが、70°C以上では、1 時間でほぼ失活した (figure 19)。

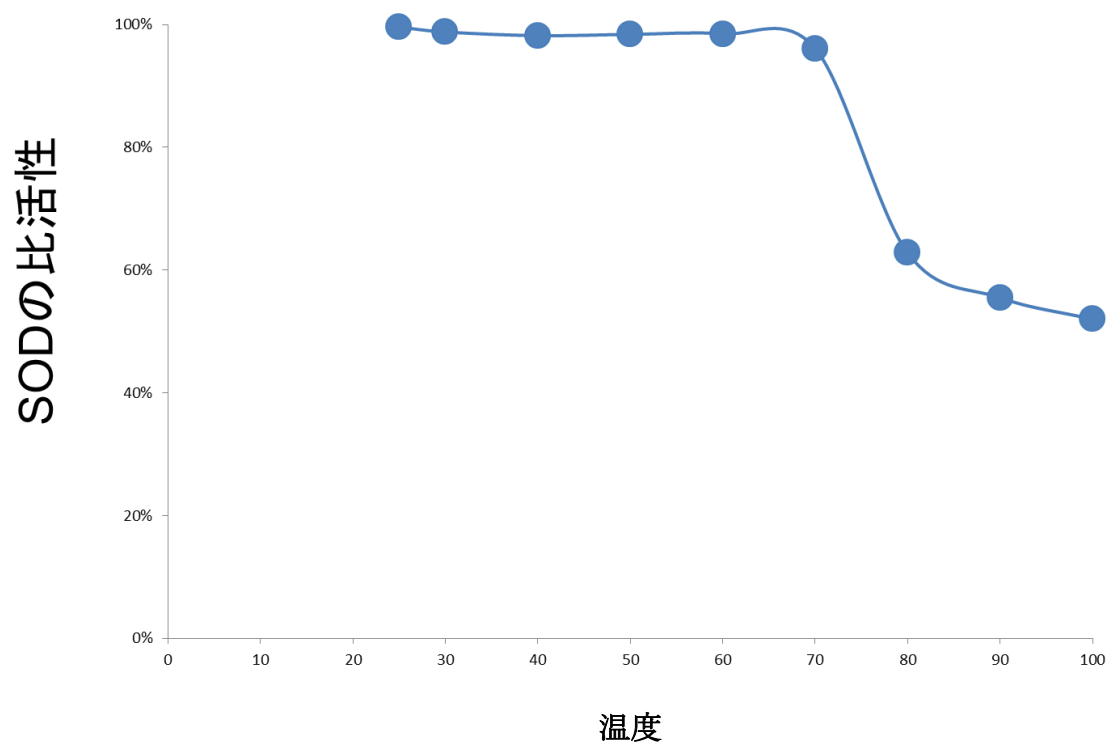


Figure 18 SOD の耐熱性

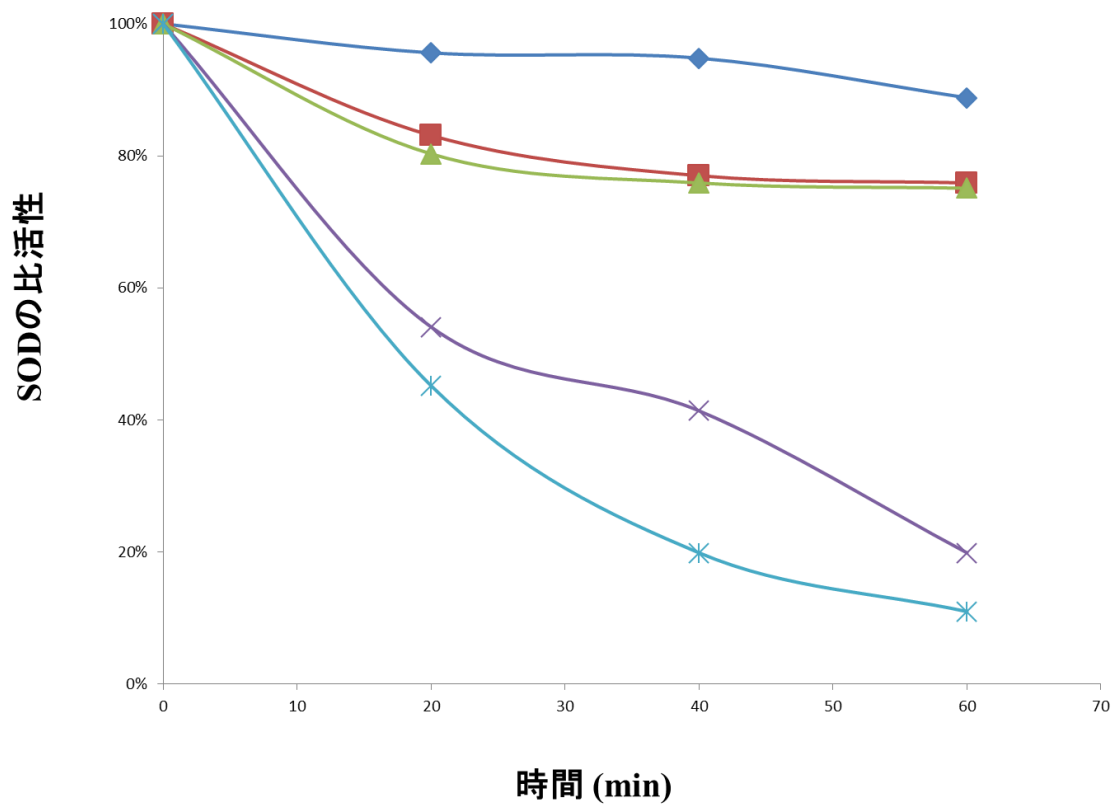


Figure 19 SOD の熱処理時間と耐熱性

◆ 温度 25°C, ■ 温度 40°C, ▲ 温度 60°C, × 温度 70°C, ✱ 温度 80°C

好熱菌 C36 株由来 SOD の pH 耐性

好熱菌 C36 株由来 SOD の示適 pH を求めるために、pH 4–12 において活性を求めた。なお buffer は pH 4.0、5.0、6.0 のとき酢酸 buffer ($\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$)、pH 6.0、7.0、8.0 のときリン酸 buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{NaH}_2\text{PO}_4$)、pH 8.0、9.0、10.0 のときトリス buffer ($\text{Tris}-\text{HCl}$)、そして pH 10.0、11.0、12.0 グリシン buffer ($\text{Glycine}-\text{NaOH}$) を用いた (figure 20)。その結果、SOD の活性は、pH 7.0 から pH 9.0 の範囲で安定に保持していた。特に pH 8.0 のときに、SOD 活性は極めて安定であった。

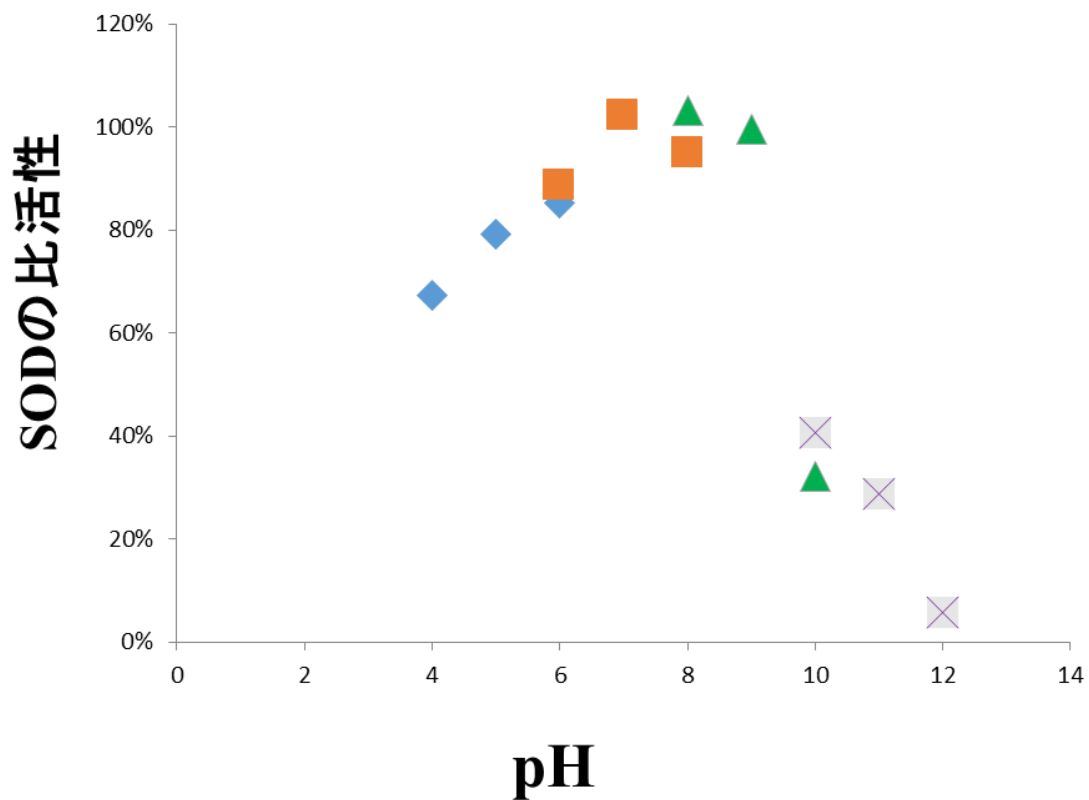


Figure 20 好熱菌由来 SOD の pH 耐性

- CH₃COOH-CH₃COONa buffer, ◆ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ buffer
- ▲ Tris-HCl buffer, × Glycine-NaOH buffer

第四章 新精製法の適用範囲

結果

新精製方法下で好熱菌 IF012550 株由来 SOD の精製

先に報告した SOD の新規精製法を C36 株と同じ *B. stearoothermophilus* であり、もっとも一般的に用いられる IF012550 株に適用した。

好熱菌 IF012550 株の精製は C36 株の精製と同じ条件下で、0.1 % SDS を用いたゲル過クロマトグラフィーをおこなったところ、タンパク質のグラフが二つのピークが見られた (figure 21)。SOD は第二ピークにおり、夾雑タンパクの多くが除去され (figure 22)、活性を保持した SOD が得られた (figure 23)。これは、この方法は、好熱菌 IF012550 にも適用可能であることを示された。

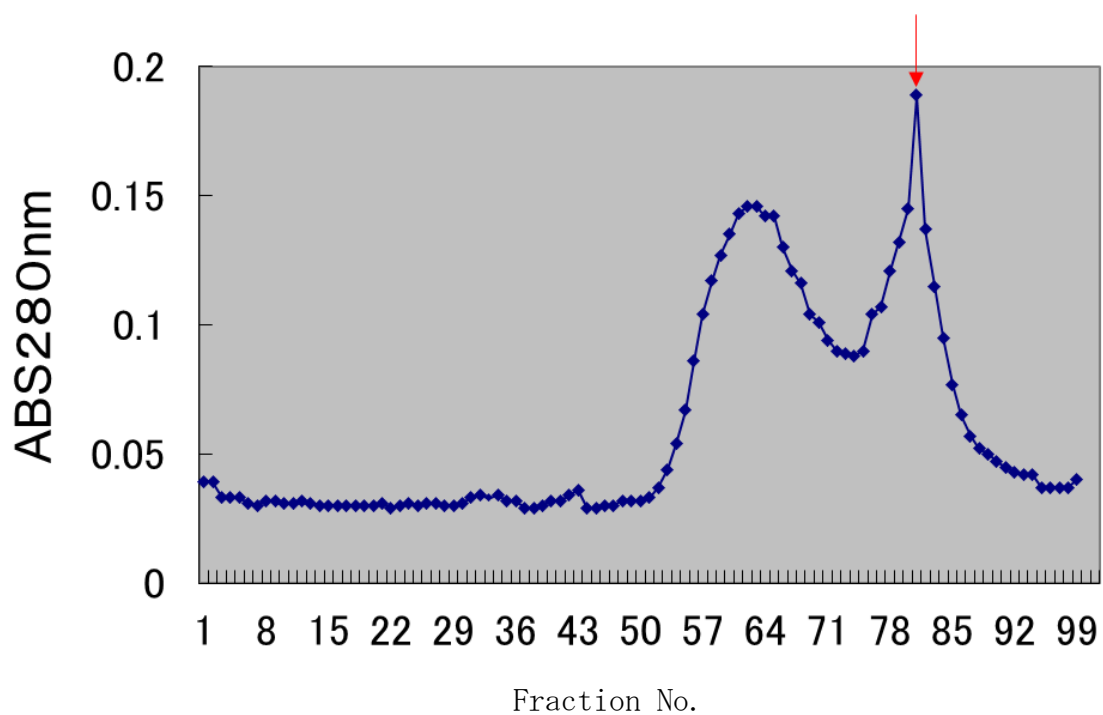


Figure 21 *B. stearothermophilus* IF012550 のゲル過クロマトグラフィー
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60$ cm
Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1% SDS、0.5 M NaCl
矢印は中心に SOD 活性が確認された。

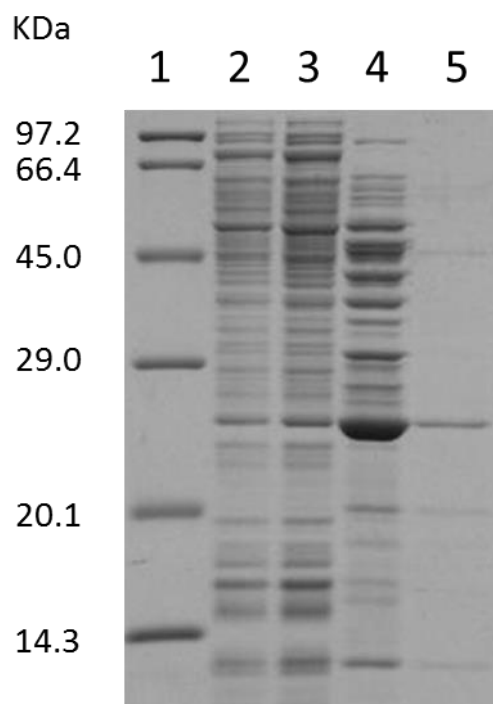


Figure 22 *B. stearrowthermophilus* IF012550 の精製
SDS-PAGE, CBB 染色

Lane 1 分子量マーカー, Lane 2 粗抽出, Lane 3 硫酸アンモニウム分画

Lane 4 陰イオン交換クロマトグラフィー, Lane 5 ゲル過クロマトグラフィー (Fig. 20 の
No. 80-No. 85)

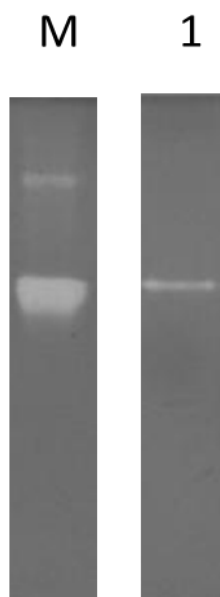


Figure 23 *B. stearothermophilus* IF012550 由来 SOD の活性
Native-PAGE, 活性染色

Lane M standard SOD, Lane 1 精製した SOD

新精製方法下で大腸菌由来 SOD の精製

タンパク質間相互作用の強い好熱菌由来 SOD の精製法を常温菌の大腸菌に適用した。大腸菌 (*E. coli* JM109) 由来 SOD の精製は C36 の精製と同じ条件下で、0.1 % SDS を用いたゲル過クロマトグラフィーをおこなったところ、五つのピークが見られた (figure 24)。SOD は第三つのピークに存在したが、SOD の活性はほぼ失った (figure 25)。ルミノール発光法によって、0.1 % SDS を用いたゲル過クロマトグラフィーは SOD の活性約 90 % を消失した。

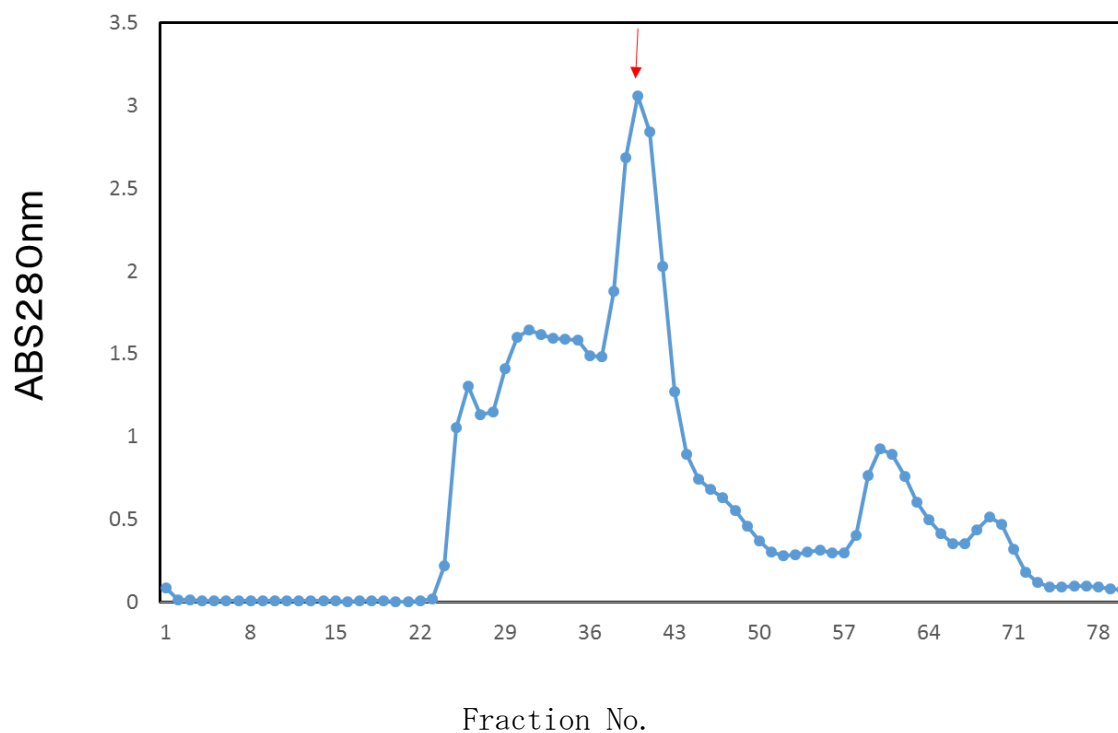


Figure 24 *E. coli* JM109 由来 SOD のゲル過クロマトグラフィー
50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60$ cm
Buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1% SDS、0.5 M NaCl

矢印は中心に SOD 活性が確認された。

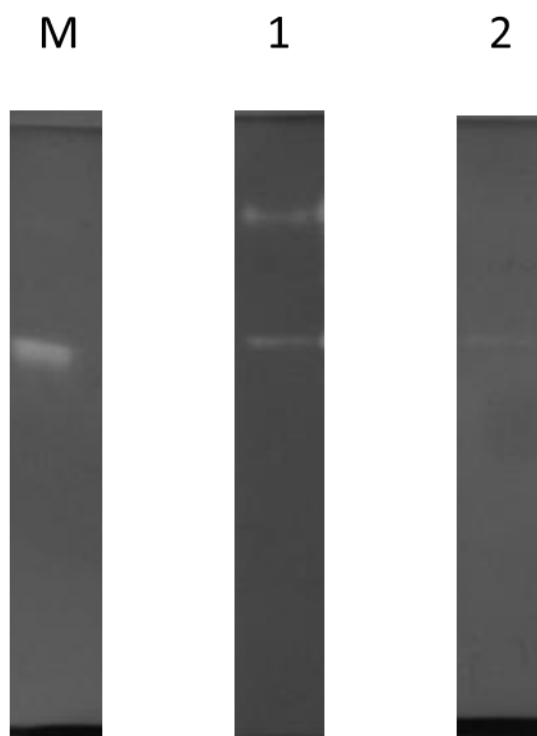


Figure 25 *E. coli*JM109 由来 SOD の活性
Native-PAGE, 活性染色

Lane M standard SOD, Lane 1 硫酸アンモニウム分画, Lane 2 ゲル過クロマトグラフィー (Fig. 24 No. 41)

考察

本研究は C36 由来 SOD について簡便で高効率な精製方法を開発した。しかし、この方法はただ C36 株に適用するだけか、それ以外の生物の SOD にも適用するかについて、さらに検討する必要がある。

このために、同じ精製方法によって、常温菌の代表的な大腸菌 (*E. coli* JM109) と好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* IF012550 株を検証した。実験結果によると、好熱菌 IF012550 由来 SOD は新規精製方法で精製を成功した。大腸菌由来 SOD は SDS の影響により活性を失った。

これにより、本研究で開発した新規精製方法の適用範囲は目的 SOD の SDS 耐性が強い酵素に限定される。

まとめ

本研究により得られた結果を以下にまとめた。

1. 好熱菌由来の SOD は、0.1 % SDS、0.5MNaCl、20mMTrisHcl (pH 8.0) の条件下で、ゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることで、高純度に精製できた。
2. 新規精製法は他の方法に比べ、高い回収率 (33 %) を得た。
3. 好熱菌 C36 株由来 SOD は高い SDS 耐性があり、0.1 % SDS で 94 % の活性を保持した。
4. 好熱菌 C36 株由来 SOD の最適 pH 範囲 (pH7.0-pH9.0) であった。
5. 本精製法は他の好熱菌の SOD にも適用できた。

参考文献

- 1) 大島 泰朗 (1978) 好熱性細菌 東京大学出版会 16-17, 38, 63
- 2) 北畠 宏樹 (2007) 修士論文 室蘭工業大学
- 3) 渡辺 健太 (2013) 博士論文 室蘭工業大学
- 4) 大島 泰朗 (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
- 5) 袁勤生 (2009) Superoxide Dismutase 华东理工大学出版社 ISBN 978-7-5628-2450-3
- 6) Beauchamp C and Fridovich I. 1971. Superoxidedismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry. 44:276-287
- 7) Boyadzhieva I.P., Atanasova M. and Emanuilova E. 2010. A novel, thermostable manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus licheniformis*, Biotechnol Lett. 32:1893-1896
- 8) Bridgen J., Harris J.I. and Kolb E. 1976. Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*: Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies. J. Mol. Biol. 105:333-335
- 9) Brock, C.J. and Harris J.I. 1977. Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus*: reversible removal of manganese and its replacement by other metals. Biochem. Soc. Trans. 5(5):1537-1539
- 10) 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
- 11) Fridovich I. 1978. Superoxide dismutases: Defense against endogenous superoxide radical. Ciba Found. Symp, 65: 77-93
- 12) Huu T.P., Marquetty C., Pasquier C. and Hakim J. 1984. Luminol Assay for Microdetermination of Superoxide Dismutase Activity, Anal. Biochem. 142:467-472

- 13) Keele B.B, McCord J.M. and Fridovich I. 1970. Superoxide Dismutase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 246(9): 6176-6181
- 14) Kikuchi S, Shibayama J, Yasui M, Takeuchi T, Yamamoto I. and Sato M. 1993. Purification of α -amylase by an immobilized thermophilic *Bacillus* strain under nitrate respiration, *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 57(5): 845-846
- 15) Laemmli UK .1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- 16) Watanabe K, Kusumi K, Yun DL, Yasui M. 2013. Amino acid replacements of thermophilic Mn-superoxide dismutase enhanced detergent tolerance. *Journal of Japanese Society for Extremophiles*, 12: 45-49
- 17) Dong, H., Mukaiyama, A., Tadokoro, T., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. 2008 Hydrophobic Effect on the Stability and Folding of a Hyperthermophilic Protein *J. Mol. Biol* Volume 378, Issue 1, 18 April 2008, Pages 264-272
- 18) Zeikus, J.G. 1979. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1 (4):243-252
- 19) Akanuma, S., Yamagishi, A., Tanaka, N., & Oshima, T.1999. Further improvement of the thermal stability of a partially stabilized *Bacillus subtilis* 3-isopropylmalate dehydrogenase variant by random and site-directed mutagenesis; *Eur. J. Biochem.*, 260, 499-504.
- 20) Kirino, H., Aoki, M., Aoshima, M., Hayashi, Y., Ohba, M., Yamagishi, A., Wakagi, T., & Oshima, T. 1994. Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophiles*; *Eur. J. Biochem.*, 220, 275-281
- 21) Ross A. Edwards 7 Heather M. Baker Mei M. Whittaker 7 James W. Whittaker Geoffrey B. Jameson 7 Edward N. Baker Crystal structure of *Escherichia coli* manganese superoxide dismutase at 2.1-Å resolution; *JBIC* (1998) 3:161-171

第二部 活性と構造の関係

目次

緒言	75
材料	76
試薬	77
装置	77
実験方法	80
SOD タンパク質	80
架橋法	80
タンパク質定量	80
タンパク質電気泳動	80
SDS-PAGE	80
Native-PAGE	81
CBB 染色	81
活性染色	81
泳動スポット画像解析法	82
活性測定	82
ルミノール発光法	82
結果	82
SOD の架橋反応	83
架橋反応により、SOD ダイマーの活性	86
架橋反応により、SOD ダイマーとモノマーの活性	90
SOD ダイマーとモノマーの分離	92
架橋後 SOD の耐熱性	95
考察	97
まとめ	98
参考文献	99

緒言

SOD は活性中心に存在する金属の種類によって、Cu/Zn, Fe, Mn 型といった様々な金属型が存在し、Cu/Zn 型は真核細胞の細胞質に存在し、Mn 型の SOD は真核細胞、原核細胞の両方に存在である。とくに Mn 型は原核生物、真核生物に共通にあり、抗酸化システムでもっとも重要である。たんぱく質のサブユニットの数に応じて、Native SOD は二量体、四量体として存在した。Cu/Zn はほとんどすべて二量体の形が存在し、とくに Mn 型は二量体または四量体の形をとり、好熱菌 *B. stearothermophilus* では二量体で、ヒトでは四量体とされている。しかしながら、ほとんど生物内でアミノ酸配列がかわらない Mn 型において二量体、四量体の両方があり、単量体状態の働きが不明である。そこで、化学架橋法を用いて SOD の単量体、二量体、四量体と活性の関係を明らかにするものである 3,4,5)。

化学架橋法は、その目的が不溶化をめざしたものと、もとのタンパク質の溶解度を損なうことなく架橋する場合とが考えられる。架橋反応の目的は、いくつかのサブユニットより成る機能タンパク質において、架橋反応物からそれぞれのサブユニットの空間的な配置 (トポロジー) を明らかにし、非共有結合によるタンパク質集合体の 4 次構造を決定することである。架橋反応はまた、タンパク質の物理的、化学的性状を改変するためにも用いられる。多くの場合、もとのタンパク質より優れた生理的、物理的、あるいは化学的な性状を有するタンパク質を得る目的で架橋が行われる。架橋の形成には分子内と分子間があり、分子内の架橋はサブユニットに固定することができる 6,7)。

SOD 活性は保持金属に依存するだけでなく、また、その分子構造に依存し、架橋により、タンパク質の分子構造を変更することができ、活性はまた、それに応じて変化した。本研究では、分子内のアミノ基相互間に架橋剤グルタルアルデヒドによって、SOD 活性と構造の関係を討論した 2)。

材料

試薬

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
クーマシーブルーリアントブルー 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
酢酸ナトリウム・3水和物	$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	特級	ナカライテスク
N,N'-ジメチルホルムアミド	$HCON(CH_3)_2$	特級	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	キタ化学
N,N,N',N'-テトラメチレンジエチレンアミン	$(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$	電気泳動用	和光純薬
トデ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リド	$C_3H_3O_2SF$	Boehringer Mannheim GmbH	
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
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	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$		キタ化学
Tryptone			和光純薬
Polypepton			和光純薬
Yeast Extract			関東化学
Glutaraldehyde (グルタルアルデヒド)	$OHCCH_2CH_2CH_2CHO$	生化学用	和光純薬
2-Morpholinoethanesulfonic acid	$C_6H_{13}NO_4S_2O$	試験研究用	和光純薬

Ding LingYun 2015

分子量マーカー

Ez Standard(Lot No. A3I0202) (ATTO AE-1440)

Standard SOD

Superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* (生化学工業株式会社)

使用した略語は以下のとおりである.

BSA	ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin)
BPB	ブロモフェノールブルー (bromophenol blue)
CBB	クーマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid)
NBT	ニトロブルーテトラゾリウム (nitro blue tetrazolium)
PMSF	フェニルメチルスルホニルフルオライド (phenylmethylsulfonyl fluoride)
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム (sodium lauryl sulfate)
SOD	スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide dismutase)
TEMED	テトラメチルエチレンジアミン (NNN' N' -tetramethylethylene diamine)
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) (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol)
MES	2-Morpholinoethanesulfonic acid
C36 株	<i>Bacillus stearothermophilus</i> strain C36

装置

本研究では以下に示す装置を使用した。

- 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)
- 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)
- ハイブリダイゼーションオープン (MHS-301 EYELA 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)

実験方法

SOD タンパク質

SOD は本論文の第一部に記された方法にしたがって精製した。

架橋法

架橋は共有結合によって 2 つ以上の分子を化学的に架橋するプロセスであり、架橋試薬は、タンパク質や他の分子の特定の官能基（アミノ基、スルフヒドリル基など）と反応する反応基を末端に持つ。

本実験は架橋剤グルタルアルデヒドにより、50mM MES-NaOH(pH 6.0), 0.1mM MnSO₄ の条件下で、SOD を架橋した。

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と染色法

SDS-PAGE

タンパク質標品に、同量の SDS 用サンプル処理液 (BPB 25 mg、グリセリン 20 mM、0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 10 ml、10 % SDS 10ml、2-メルカプトエタノール 2 ml を加え、超純水で 50ml にメスアップ) を加えて 2 倍量にした後、100°C で 1 分間加熱処理し、急冷した。電気泳動を Laemmli 法でおこなった。ゲルは分離用ゲル (濃度 12.5 % : 30 % アクリルアミド 3.75ml、1.5M Tris-HCl (pH 8.8) 2.25ml、10 % SDS 0.09ml、超純水 2.85ml、TEMED 0.01 ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.05ml) 及び濃縮用ゲル (濃度 4.5 % : 30% アクリルアミド 0.9 ml、0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.5ml、10 % SDS 0.06ml、超純水 3.6 ml、TEMED 0.01 ml、10% 過硫酸アンモニウム 0.018 ml) を合わせて固めたものを用いて、30 mA で電気泳動をした。

Native-PAGE

上記の Laemmli 法を改変した。加熱操作をおこなっていないタンパク質標品に、同量の 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) 10ml を加え、超純水で 50ml にメスアップ) を加えて 2 倍量にした。native 用 buffer (Tris 6 g、グリシン 28 g を加えて、超純水で 2l にメスアップ) を用いて、電気泳動をおこなった。ゲルは分離用ゲル (濃度 12.5 % : 30 % アクリルアミド 3.75ml、1.5M Tris-HCl (pH8.8) 2.25ml、超純水 2.94ml、TEMED 0.01ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.05ml) 及び濃縮用ゲル (濃度 4.5 % : 30 % アクリルアミド 0.9ml、0.5M Tris-HCl (pH6.8) 1.5ml、超純水 3.66ml、TEMED 0.01ml、10 % 過硫酸アンモニウム 0.018ml) を合わせて固めたものを用いて、30 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 1l 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。

活性染色

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°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、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°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、デンストグラフでゲルの撮影をおこなった。活性はデンストグラフで相対的に比較した。

泳動スポット画像解析法

泳動スポット画像解析法電気泳動法には必須のツールである。電気泳動ゲルのバンドの定量値で検量線を描いて、画像解析ソフトウェアによって、電気泳動の画像から十分な情報を得る。本研究は Lane and Spot Analyzer を画像解析ソフトウェアとして、電気泳動ゲル画像を解析した。

活性測定

ルミノール発光法

AccuFLEX Lumi400 (ALOKA 製) の電源を入れ、ラジカルキャッチ (BLR-ALBI-01) を室温に戻し、転倒混合した。試薬 C 液 (過酸化水素水) 10 μ l を精製水 10ml (超純水でも可) に加えて転倒混合し、1000 倍希釈液とした。無色透明の 1.5ml エッペン試薬 A 液 (塩化コバルト) と B 液 (ルミノール) を 25 μ l ずつ分注し、サンプルを 10 μ l 加えた。(コントロールには 10mM Tris-HCl (PH8.0) を使用) 測定室内でインキュベーション (37 $^{\circ}$ C 5min) した。試薬 C 希釈液を 25 μ l 加え、OD430 にてルミノール発光量を測定した。発光量として、測定 80 秒から 120 までの積算値を用いて、そして消去率が次式により求めた。

$$\text{消去率(\%)} = \frac{\text{コントロール発光量} - \text{サンプル発光量}}{\text{コントロール発光量}} \%$$

SOD の活性値はコントロール発光量の 1/2 を与えるサンプル濃度又は消去率 50% のサンプル濃度として求めた。

結果

SOD の架橋反応

SOD を精製し、精製した SOD を架橋剤により架橋反応を用いておこなった。グルタルアルデヒド低濃度 (SOD: グルタルアルデヒド=1:500) で用いた架橋反応は、架橋反応が遅かった。グルタルアルデヒド高濃度 (SOD: グルタルアルデヒド=1:2500) を用いた架橋反応は、架橋反応が早く、SOD のダイマーのほか SOD のホモ四量体も生成された (figure 1)。Figure 1 の 22.5KDa、45KDa のタンパクバンドを泳動スポット画像解析法により、figure 2 を作成した。SOD モノマーは架橋反応時間とともに減し、SOD ダイマーは架橋反応時間とともに増加した (figure 2)。これより架橋反応の最適条件を SOD: グルタルアルデヒド=1:500、1 時間とした。

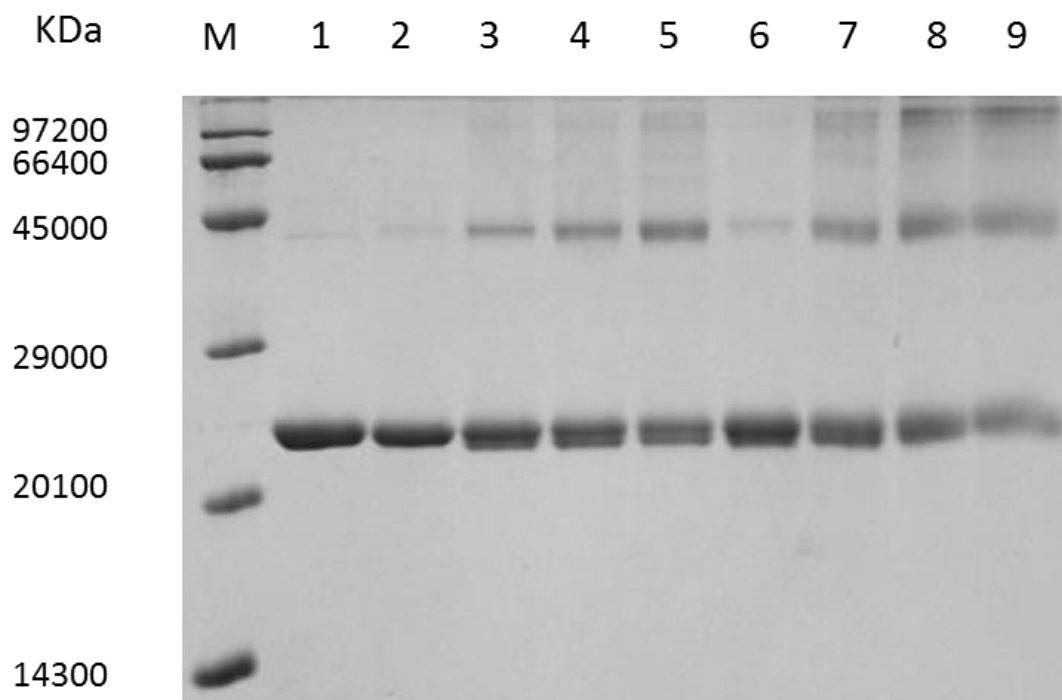


Figure 1 SOD の架橋反応

- Lane M 分子量マーカー
- Lane 1 精製した SOD
- Lane 2 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 500、反応時間 0 分
- Lane 3 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 500、反応時間 30 分
- Lane 4 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 500、反応時間 1 時間
- Lane 5 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 500、反応時間 2 時間
- Lane 6 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 2500、反応時間 0 分
- Lane 7 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 2500、反応時間 30 分
- Lane 8 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 2500、反応時間 1 時間
- Lane 9 SOD: グルタルアルデヒド = 1 : 2500、反応時間 2 時間

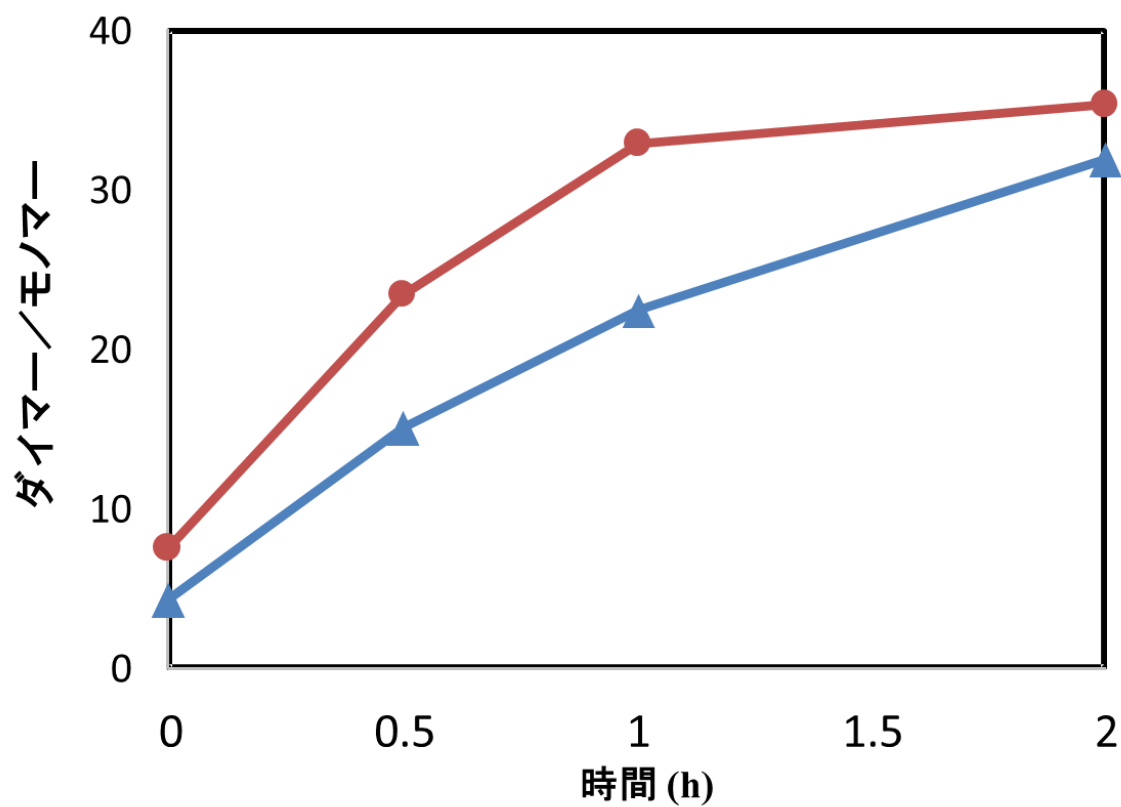


Figure 2 反応時間により、二量体/単量体の比
泳動スポット画像解析法

● SOD : グルタルアルデヒド=1 : 2500 , ▲ SOD : グルタルアルデヒド=1 : 500

架橋反応により、SOD ダイマーの活性

架橋剤グルタルアルデヒドにより、SOD を架橋し、架橋後の SOD ダイマーは活性を求めたところ、モノマーの活性の減少にともなってダイマーの活性が弱いが増加した (Figure3、4、5)。これより、架橋に応じて、ダイマーの形成が増加し、ダイマーも、モノマーも同様に活性を有することが示された。

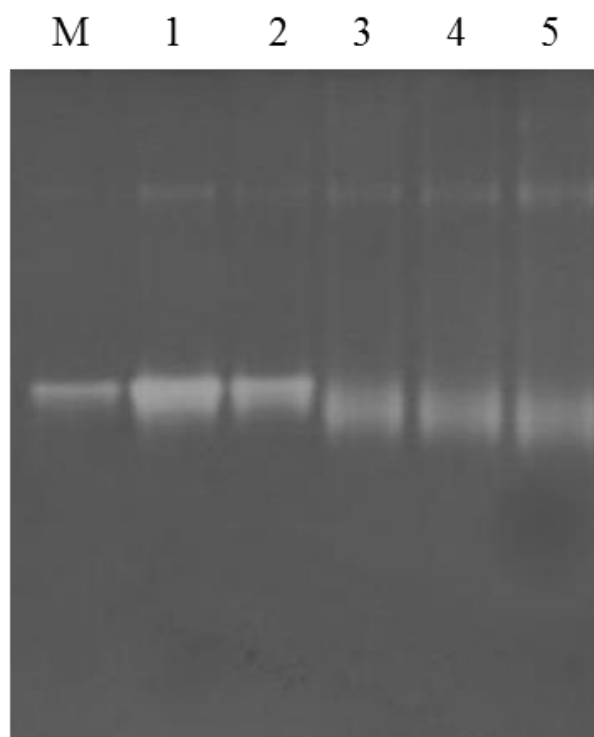


Figure 3 架橋後、SOD のダイマーの活性
Native-PAGE、活性染色

Lane M Standard SOD, Lane 1 架橋剤非存在 SOD, Lane 2 架橋 SOD、0 時間

Lane 3 架橋 SOD、0.5 時間, Lane 4 架橋 SOD, 1 時間, Lane 5 架橋 SOD, 2 時間

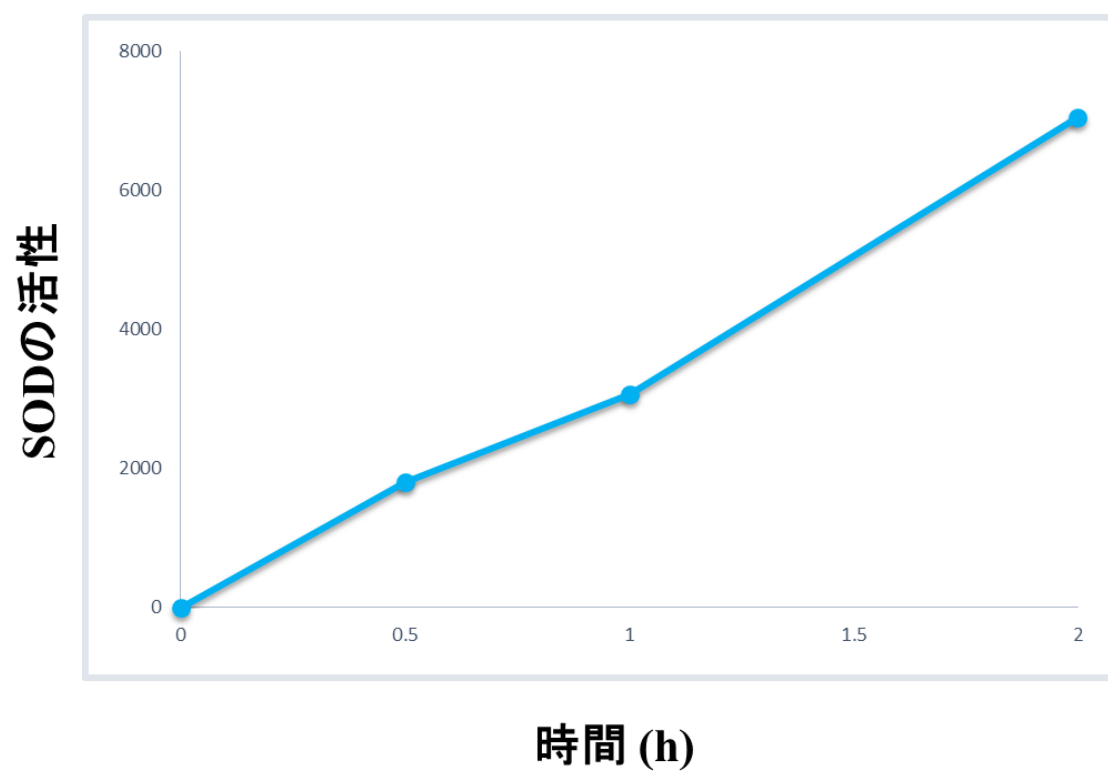


Figure 4 SODダイマーの活性変化
泳動スポット画像解析法
Figure 3 から作成した。

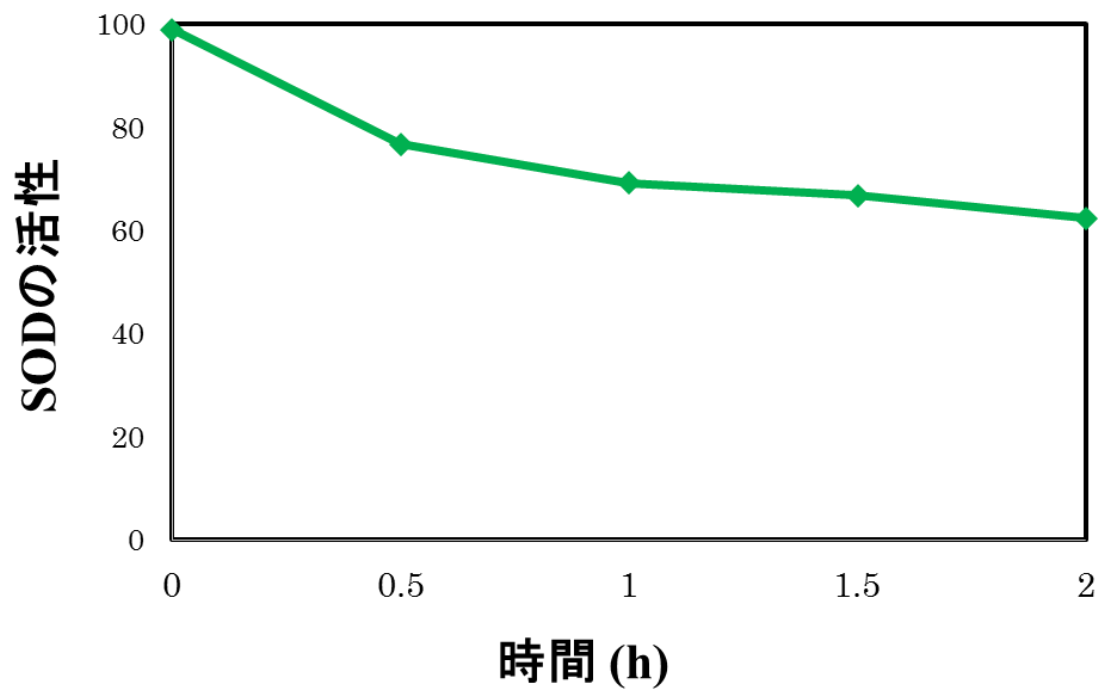


Figure 5 SOD のモノマーの活性
泳動スポット画像解析法
Figure 3 から作成した。

架橋反応による、SOD ダイマーとモノマーの活性

Figure 6 に架橋反応にともなうモノマー、ダイマーおよび総活性をまとめて示したものである。これより、モノマーの活性低下と総活性の低下が類似しており、ダイマーの活性の寄与は小さかった。モノマーの活性を低減することが分かりやすい、架橋反応が進むにつれて、モノマーの量を続けに減少のためである (Figure 4)。ダイマーの活性の増加小さい理由は不明であるが、架橋試薬による失活またはダイマー形成に活性を低下すると考えられた。

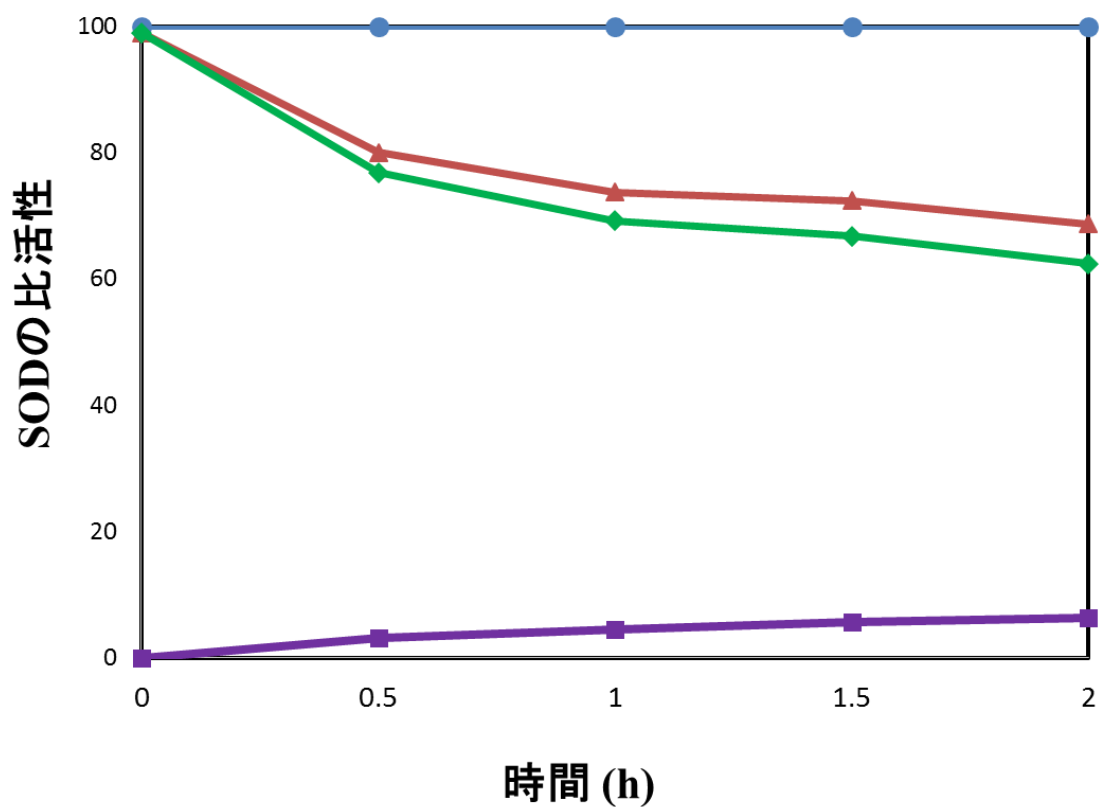


Figure 6 架橋反応により、SODの活性変化
泳動スポット画像解析法

○コントロール, ▲総活性, ◆モノマーの活性, ■ダイマーの活性

SOD ダイマーとモノマーの分離

Nature SOD ダイマーおよび架橋の SOD ダイマーの活性の比を明確にするために、架橋反応後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、SOD ダイマーとモノマーSOD 存在下で、native 型ダイマーを解離させて分離を試みた (Figure7、8)。しかし、完全にこれを分離することはできなかった (Figure 7、8)。

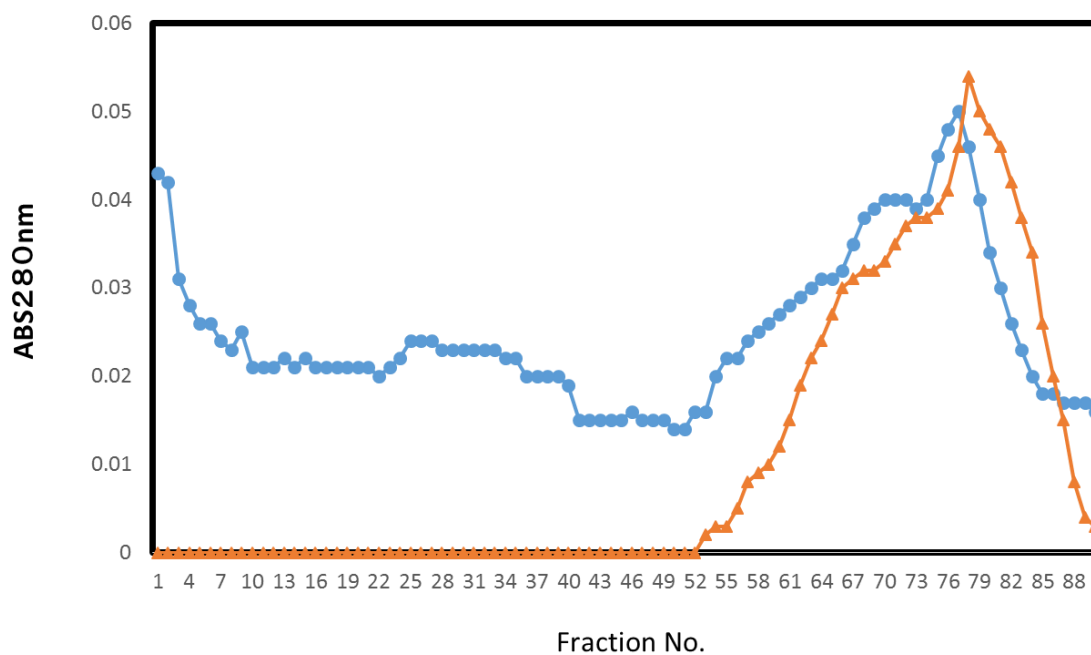


Figure 7 ゲルろ過クロマトグラフィーの fraction により、
SOD モノマーと SOD ダイマーの活性変化
● タンパク質吸光度、▲ SOD 活性

ゲルろ過クロマトグラフィーの条件：

50 drops/fraction, カラム $\phi 1.8 \times 60 \text{cm}$

buffer 20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1% SDS、0.5 M NaCl

活性はルミノール発光法によって、測定した。

56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 ... 76 77 78

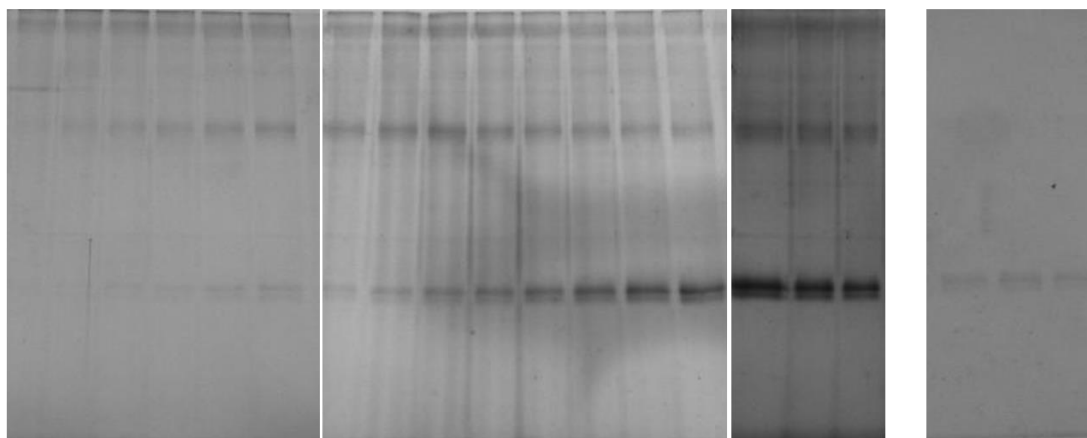


Figure 8 ゲルろ過クロマトグラフィーによるモノマー、ダイマーの分離

数字 56-78 はゲルろ過クロマトグラフィーの fraction No. を示した
SDS-PAGE、CBB 染色

架橋後 SOD の耐熱性

架橋後 SOD の耐熱性を測定した。異なる温度条件 (37, 50, 60, 70, 80 および 90°C) に基づいて SOD の活性変化を測定した。各温度に 10 分間を維持して、その後ルミノール発光法によって、SOD の活性を測り、37°C 下 SOD の活性をコントロールとした。Native SOD も同じ条件下で耐熱性を測定した (figure 9)。

架橋後 SOD の活性は大幅に低減し、native SOD に比べ架橋後 SOD の耐熱性が高温域で大幅に低減された (figure 9)。これは化学架橋により、構造の柔軟性が失われたためと考えられた。

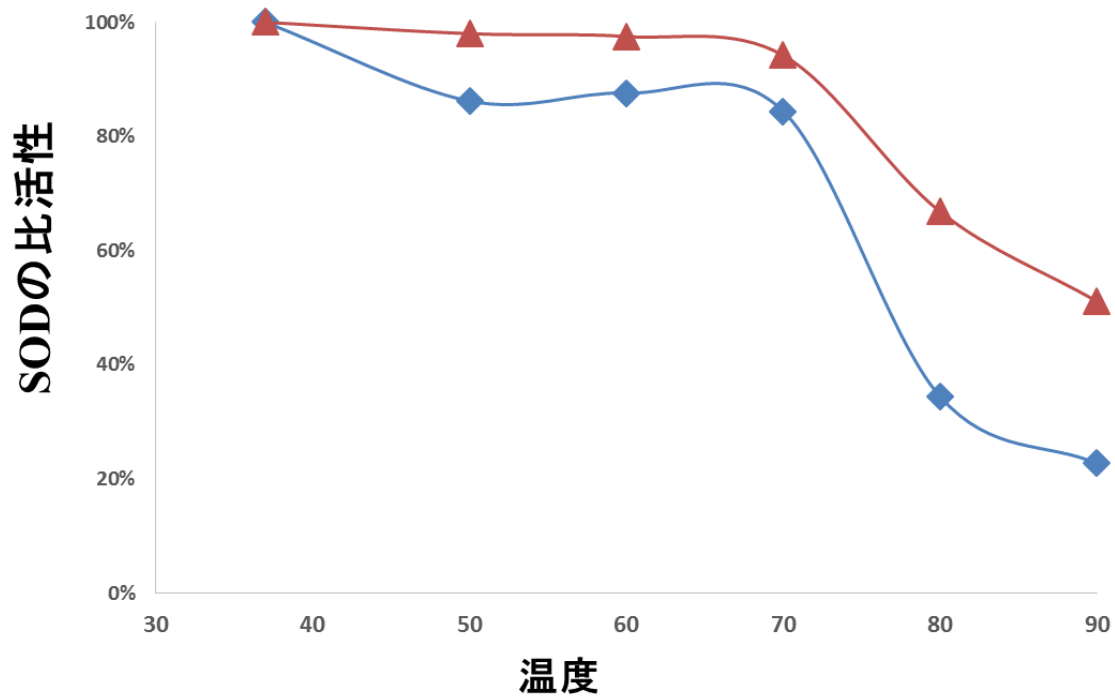


Figure 9 SOD の耐熱性

▲ Native SOD の活性、◆ 架橋 SOD の活性

考察

Watanabe K によると、サブユニット間のアミノ酸置換により高次構造が不安定になることが示され、一つのアミノ酸置換が大きな効果をあらわした¹⁾。Andrea Battistoni の研究により、Cu/ZnSOD 立体構造の安定性はタンパク質の β プリーツシート構造の固有安定性によるものであり、SOD の二量体構造と pH 感受性はサポート役割を果たした。よって、SOD 安定性は単量体の内部構造とダイマー形成によって得られているとされた⁸⁾。

本実験では SOD の分子内のアミノ基相互間に架橋によって、二つのサブユニットを固定し、タンパク質の三立体構造に損傷しなく、サブユニット間の柔軟性のみ変更した。架橋後 SOD ダイマーの活性は native SOD より減少し、架橋後 SOD ダイマーの耐熱性も native SOD より弱い。これは、SOD サブユニット間の柔軟性が、その SOD 活性に影響する条件の一つを示している。本研究で用いたグルタルアルデヒドによって、ユニット内およびユニット間のみの化学架橋による効果を測定することが必要と考えられる。

まとめ

本研究により得られた結果を以下にまとめた。

1. SOD は、架橋剤グルタルアルデヒドにより、二量体の SOD に架橋された。
2. 架橋 SOD ダイマーは活性が維持していた。
3. Nature SOD と比較して、架橋 SOD ダイマーの活性が低く、耐熱性も低かった。
4. 柔軟性は、SOD 活性を維持する上で決定的な要因であると考えられた。

参考文献

- 1) Watanabe K, Kusumi K, Yun DL and Yasui M. 2013. Amino acid replacements of thermophilic Mn-superoxide dismutase enhanced detergent tolerance, Journal of Japanese Society for Extremophiles Vol.12:45-49.
- 2) Carla J.S.M.Silva, Fernanda Sousa 2004. Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde, Food Technol. Biotechnol. 42 (1) :51-56
- 3) 大島 泰朗 (1978) 好熱性細菌 ; 東京大学出版会 16-17, 38, 63
- 4) 渡辺 健太 (2013) 博士論文 室蘭工業大学
- 5) 袁勤生 (2009) Superoxide Dismutase 华东理工大学出版社 ISBN 978-7-5628-2450-3
- 6) 大野 素徳 (1981) 蛋白質の化学修飾 ; 学会出版センター
- 7) 千畑 一郎 (1986) 固定化生体触媒 ; 講談社サイエンティフィク
- 8) Andrea Battistoni, Silvia Folcarelli, 1998 Role of the Dimeric Structure in Cu,Zn Superoxide Dismutase pH-dependent, Reversible denaturation of the monomeric enzyme from *Escherichia Coli* , The Journal of Biological Chemistry Vol. 273, No. 10, Issue of March 6, pp. 5655-5661,

謝辞

本論文執筆に際し、室蘭工業大学の安居光國准教授には実験結果の検討、研究の方法、論文の組み立て方などに多岐にわたる温かなご指導をいただきました。こころから御礼を申し上げます。筆者が博士前期課程と博士後期課程において在籍した安居研究室のメンバーおよび関係者には、研究遂行に当たり日頃より有益な討論ご助言をいただきました。また渡辺さんから、多くのご協力とご支援をいただきました。ここに記して深甚の謝意を表します。