

歯周病原菌の酸化ストレスに対するサバイバル戦略：
Porphyromonas gingivalis スーパーオキシドジスムターゼの
金属選択性を寛容にした歯周ポケットの環境は太古の海を連想させる

平岡 行博

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学部門

Survival strategy of *Porphyromonas gingivalis* for oxidative stress

B. YUKIHIRO HIRAOKA

Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University

Summary

Porphyromonas gingivalis is a major etiological agent implicated in adult periodontitis. The survival of this organism in the periodontal pocket would require an ability to overcome oxidative stress induced by reactive oxygen species generated by neutrophils or exposure to free oxygen from blood. An antioxidant enzyme that may contribute to the survival strategy of this organism is superoxide dismutase (SOD). *P. gingivalis* has a characteristic SOD which is called “cambialistic SOD” from the Latin cambialis, suggesting change and denoting enzymes capable of making a cofactor substitution. We prepared a mutant *P. gingivalis* SOD that possessed a mutation of the amino acids near the active-metal by site-directed mutagenesis, and discussed the structural basis of the metal-specific activity. SODs distribute in three primary domain, *Bacteria*, *Eucarya*, and *Archaea*, then the survival strategy of *P. gingivalis* seems to be an evolutionary strategy of early life in remote ages.

はじめに

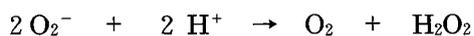
ヒトとして生命維持に酸素が欠かせない事は言うまでも無いが、酸素はその化学的性質から遺伝子や脂質を酸化させるなどの有害性も併せ持っており、これを“酸化ストレス”と呼んでいる。近年、「体がサビる」という表現もポピュラーに使われるようになって、酸素の毒性は認識されるようになった。また、ポリフェノールやカテキン、

ビタミンCやEなど、近年の健康食品ブームで取り上げられる物質は全て抗酸化作用をもつ分子であり、酸素の毒性に対する認識の拡がりが見える。この小稿では、酸素の毒性に対する歯周病原菌のサバイバル機構を、スカベンジャー酵素の性質の面からアプローチしてみる。

1. 活性酸素と SOD；活性酸素は寿命まで縮める

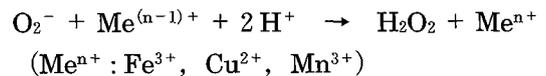
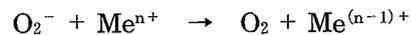
酸素は大気中に21%を占める安定な分子であるが、2原子分子である水素やチッ素と比べると、不対電子をもつために高い反応性を示す。紫外線や放射線の被曝、金属イオンとの接触、また、好氣的エネルギー代謝の副産物として、さらに反応性が高まって生体内の酸化反応に関わる「活性酸素」と呼ばれる分子種になる。即ち、酸素 (O_2) の1電子還元種であるスーパーオキシド (O_2^-)、2電子還元種である過酸化水素 (H_2O_2)、励起状態にある励起一重項酸素 (1O_2)、電子を奪って OH^- になりやすいヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) の4種である。この活性酸素による酸化が、「体をサビさせ」、老化、痴呆症、発癌、メタボリックシンドロームの元凶であることは広く受け入れられている。標的分子は、脂質、糖質、タンパク質、遺伝子と、細胞成分の全てに渡り、また連鎖反応を引き起こすことで上記の障害をもたらしている¹⁾。これらの分子の寿命は、スーパーオキシド (O_2^-) と過酸化水素で秒単位～10分単位である一方、励起一重項酸素とヒドロキシラジカルでは n 秒～ μ 秒の単位と推測されている²⁾。生体で酸素を消費している限り常時発生する活性酸素であるが、後者のような短い寿命であれば生成した瞬間に隣接分子を酸化し、生体には低分子の抗酸化剤を配する以外に細胞障害を防ぐ手立てはない。そのような低分子抗酸化剤として、ビタミン C, E, また、グルタチオン、カロチノイド、フラボノイド、システイン、尿酸などがある。一方、前者のような、ある程度の寿命がある分子に対しては、生体は酵素で処理する態勢をとっている。スーパーオキシドにはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、過酸化水素に対してはペルオキシダーゼやカタラーゼをスカベンジャーとして獲得する事が、生命が地球大気中で生活する必須条件であったといえる。

SOD の触媒する不均化反応 (同一種の2分子から異種の2分子を生成する反応) は、下の式である。



この解毒反応は、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{3+} のような遷移金属イオンによって触媒される。これらの金属イオンが安定に存在するためにタンパク質と結

合し、解毒反応に特異的な分子として進化した物が SOD であろう。進化の過程において、SOD は O_2^- を静電的に誘導するペプチド鎖の路を形成して正電荷の集中する親水性空間へ導き、活性部位に存在する金属へ結合させる構造を獲得してきた³⁾。この結果、活性金属は酸化還元反応のサイクルを繰り返して反応を触媒することができ、現存の酵素となっている。



SOD は、1969年 に McCord と Fridovich によって見出された酵素である⁴⁾。彼らはキサンチンオキシダーゼによるチトクローム c の還元反応時にスーパーオキシドが生成され、それが速やかに消失する現象から存在を予測していた⁵⁾。SOD の反応はスーパーオキシドの存在を確認するためにも用いられ、以来、生体が酸素を利用する際はスーパーオキシドが生じる場合があることが認識されるようになった。さらに、酸素による細胞障害にスーパーオキシドが関与する例が確認され、その障害が SOD によって抑制されることも併せて明らかになった^{1,6)}。それは分子レベルでの解明ばかりでなく、生物の個体、種レベルで検討されている。一例として、霊長類の寿命と SOD の活

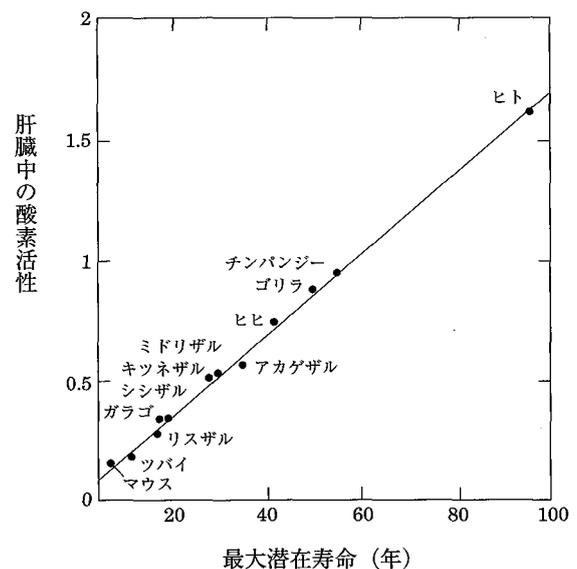


図1：肝臓中のSOD活性と霊長類の潜在寿命

文献7より作成。酵素活性値は、比代謝率あたりの比活性、(units/mg protein) / (cal/g/day) を示す。SODの活性は、細胞質 Cu/Zn-SODと、ミトコンドリアに由来する僅少の Mn-SODの活性を捉えている。グラフの傾向は、脳、心臓においても同様であった。

性が比例関係にある⁷⁾、という考察は興味深い(図1)。寿命の長い生物は、酸化ストレスに対するサバイバル機能の進化を獲得したもの、といえる。歯周ポケットのような高度に嫌気的な条件下にあると考えられる部位においても、*Porphyromonas gingivalis* (以下、ジンジバリス菌と略す)の様な偏性嫌気性菌でさえ、SODを獲得している⁸⁻¹⁰⁾。本菌の酸化ストレス防御機構については、他に菌体表層部に結合させたヘミンも利用しているという報告もあるが未解明の部分が多く¹¹⁻¹⁴⁾、本稿ではSODについて考えてみる。

2. 歯周ポケットの酸素環境は前カンブリア紀の海を連想させる

歯周ポケットの環境について考えてみる。それは無酸素ともいえる一方、歯周病原菌であるジンジバリス菌がSODを獲得せざるを得ない程の無視できない酸化ストレスを与えている環境である。

まずは、我々の体内の酸素環境をみておきたい。

「酸素を体の隅々までに」というのはエアロビクスの謳い文句であるが、体内に酸素がむき出しにある訳ではない。血中ではヘモグロビンに結合した状態で存在し、溶存酸素の状態であるのは0.3%に過ぎない。大気中の酸素分圧は150 mmHg、動脈血酸素分圧はおよそ100 mmHgであるが、組織においては40 mmHg、末端の細胞内はヘモグロビンから遊離して拡散した酸素で1~10 mmHg、エネルギー代謝の中樞を担う酸素消費機関であるミトコンドリアでは0.5 mmHg以下でしかない¹⁾。何れにせよ、我々の体内は、酸素が危険物であるからこそ出来る限り無酸素状態に保っており、微量の酸素は効率よく消費されているといえる。

さて、ヒト歯周ポケット内の酸素は、Mattrauxらの報告では111例の測定結果から、平均13.3 (範囲は5-27) mmHg、ポケットの深さが5-6 mmでは15.0 mmHg、同7-9 mmでは11.6 mmHgであった¹⁵⁾。Tanakaらの報告¹⁶⁾では、32例から平均27.2 (範囲は6.7~52.0) mmHgで、ポケットの深化に伴う酸素分圧の減少も同様に観察している。これらの値は静脈血の分圧(20~40 mmHg)以下であり、また、ポケット内でも酸素はヘモグ

ロビンに結合しており、遊離酸素は体細胞並の濃度であろう。一方、炎症歯肉はヘモグロビン含量が健全歯肉よりも有意に増加しているが、ヘモグロビンの酸素飽和度は明らかに減少しているので、酸素を歯周ポケットの要求に従って供給しているように考えられた^{15,17)}。口腔は呼気の出入り口であり、食餌の入り口でもあるために、唾液はもとより歯肉間隙、歯周ポケット中にエイリアン防御機構として分泌型免疫グロブリン、リゾチーム、白血球などを備えている。実際、口腔内好中球に種々の化学物質刺激を与えると、2分以内に最高値を示すような応答をおこして各種の活性酸素を産生している¹⁸⁾。従って、好中球のNADPH酸化酵素やミエロペルオキシダーゼが歯周ポケットでエイリアン防御のために酸素を消費し、絶えず活性酸素を発生させているのが歯周ポケットの環境であるといえる。好中球の発生する活性酸素は、歯周組織の結合組織成分を破壊して炎症の悪化ももたらし¹⁹⁾、ジンジバリス菌の増殖に環境を整えてしまっている。このような環境において、ジンジバリス菌はSODを持つことが生育・サバイバルの第一戦略であった。そして、この戦略は、ジンジバリス菌も含めた細菌の祖先が太古の地球でとったサバイバル戦略、そのものであった。

図2は地球大気中の酸素濃度と、生命の歴史である^{20,21)}。原始地球の大気は水分子の紫外線分解(Urey反応)による酸素しか含まず、現在の1/1万の濃度でしかなかった。35億年前、紫外線の達しない水深10 m以下の海で化学進化の結果として生命が誕生した²²⁾が、有限である有機物以外にエネルギー源を求め、無限の太陽エネルギーを利用できるラン藻(真正細菌)が誕生したのは32億年前といわれる。生命の系統樹でラン藻よりも古いイオウ細菌^{23,24)}や、古細菌のメタン生成菌がSODをもっている²⁵⁾ことは、真正細菌と古細菌の分岐する時点で既に生物(偏性嫌気性)はSODをもっていたことを示唆している。Urey反応レベルの酸素濃度でさえ、生物にとっては大きな障害であった証拠である。

ラン藻の光合成によって、廃棄物として酸素が発生する($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H} + \text{O}_2 \uparrow$)と、酸素は海水中の鉄イオンを酸化沈殿させ、現在に残る鉄鉱床を形成する。海水中の遊離酸素が徐々に増え、好

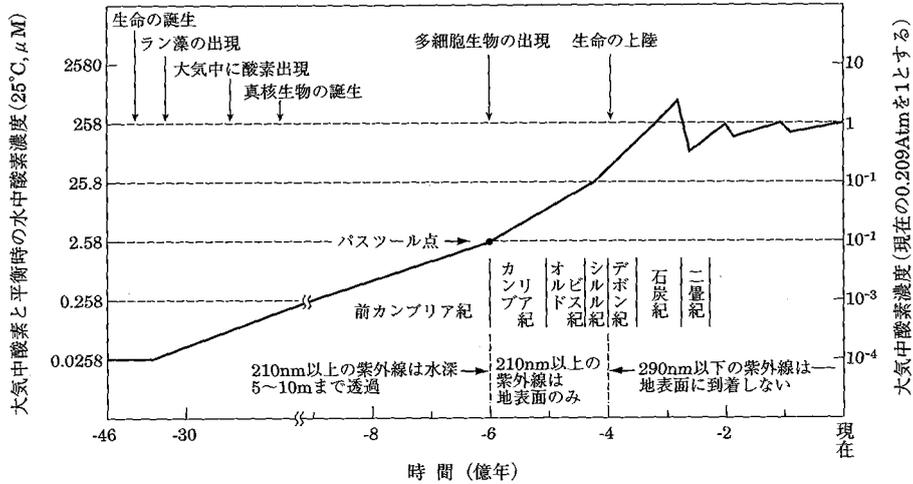


図2：地球大気酸素濃度の変遷と生命の歴史
 文献20の一部を改変。石炭紀の大森林時代は、現在の2倍の酸素が存在していたという。

気性細菌が誕生したのは22億年前といわれる。遊離酸素による酸化ストレスがいかに激烈であり、その抗酸化ストレス進化がいかに困難であったかは、ラン藻誕生から好気性生物誕生まで10億年を要していることから判る（因みに、多細胞生物の出現から現在までが6億年である）。大気中に酸素が出現するのは20億年前であるが、この間に酸化ストレスに対するサバイバル機構を獲得できなかった原始生物は滅亡していったであろう。

6億年前になると、大気中の酸素は現在の1/100に上昇する。この濃度は微生物学上で重要であり、酵母はアルコール発酵から好氣的呼吸に切り替え、ワインが酢になってしまう。通性嫌気性生物で一般的に見られるこの酸素濃度は、発見者の名をとってバスターン点という。偏性嫌気性菌は、この濃度以上では生育できない。多細胞生物の出現はこの酸素濃度の前後と推測され、次いで突如カンブリア爆発と呼ばれる生命の進化上の大事件がおきている。さらに2億年を経て酸素濃度が現在の1/10になると、オゾン層の形成で有害な紫外線が地上に届かなくなり、生命は陸上へ進出して現在の生命圏を築く。歯周ポケット内の酸素濃度（分圧）はバスターン点以下であるが、ジンジバリス菌にとってSOD (P. g. SOD) は生育に必須の酸化ストレス防御機構であった。

3. P. g. SOD が SOD の分子進化を考える材料として適している理由

〈SODの種類〉 SODは、その活性依存の金属

によって以下の4タイプに分けられる⁶⁾。

- i 真核生物細胞に存在する銅・亜鉛を含む酵素 (Cu, Zn-SOD),
- ii 原核生物と植物の葉緑体に存在する鉄を含む酵素 (Fe-SOD),
- iii 原核生物とミトコンドリアのマトリクスに存在するマンガンを含む酵素 (Mn-SOD),
- iv 原核生物で見出されたニッケルを含む酵素 (Ni-SOD)

この内、Mn-SODとFe-SODとはアミノ酸配列で33~53%という高い相同性を示すが、他の-SODとは配列の全領域で共通部分を見いだせない²⁶⁾。従って、原始的酵素タンパク質が結合した金属の種類によって、SODの分子進化には以下の3系統があると考えられる。

- ① Cuを選択してさらにZnを加えた系
- ② Niを選択した系
- ③ 始めは金属選択性に寛容であったが、後にMnあるいはFe依存性を高めて2つに分かれていった系

即ち、Mn-SODとFe-SODとは共通の祖先型タンパク質から進化した酵素であろう。一方、Fe-SODとMn-SODは、立体構造も類似し配位子アミノ酸の種類と配置も同じであるにもかかわらず、活性発現と金属選択性の関係で2つのグループが存在する。即ち、

- i FeおよびMnの各々に非常に高い特異性が現れるグループと、
- ii 特異性が低くFeでもMnでも活性を示す

20 * 40 60

Po (Fe) AFELPPLPYAHDALQPHISKETLEYHHDKHHNTYVNLNGLVPGTPEFEGKTLEEIV-K-----SSSGGIFNNAAQVWN

Pl (Fe) AFELPALPFAMNALEPHISQETLEYHYGKHHNTYVVKLNLGLVEGT-ELAEKSLEEII-K-----TSTGGVFNNAAQVWN

Ec (Fe) SFELPALPYAKDALAPHISAETIEYHYGKHHQTYVTNLLNLIKGTAFEGKSLEEII-R-----SSEGGVFNNAAQVWN

Hp (Fe) MFTLRELPPFAKDSMGDFLSPVAFDFHHGKHHQTYVNNLNLKGTDFEKSSFLDILTK-----SSGGVFNNAAQIYN

Pg (Cam) MTHELISL PYAVDALAPVISKETVEFHGKHLKTYVDNLNKLIGT-EFE-NADLNTIVQ-----KSEGGIFNNAAGQTLN

Ec (Mn) SYTLPSLPYAYDALEPHFDKQTMEIHHTKHHQTYVNNANALESLEPEFANLPVEELITKLDQLPADKKTVLRNNAAGGHAN

Sm (Mn) SYSLPSLPYAYDALEPHFDKQTMEIHHTKHHQTYVNNANTVLEAYPELAKYSVEELIQDLDPADKRTFMRNNAAGGHAN

Bs (Mn) PFELPALPYPYDALEPHIDKETMNIHHTKHHNTYVTNLNAALEGHPDLQNKSLLELLSNLEALPESIRTA VRNNGGGHAN

Tt (Mn) PYPFKLPDLGYPYEALEPHIDAKTMEIHHTKHHGAYVTNLNAALEKYPYLHGVEVEVLLRHLAALPQDIQTAVRNNGGGLN

* 80 100 120 140

Po (Fe) HTFYWNCLSP-DGGG--QPTGALADA INAFGFSDFKKEEFTKTSVGTFGSGWAWLVK-A-DGS-LALCSTIGAGAPLTTG

Pl (Fe) HTFYWNCLAP-NAGG--EPTGEVAAAI EKAFGFSAEFKAKFTDSAINNFGSSWTWLVKNA-NGS-LAIVNTSNAGCPITE

Ec (Fe) HTFYWNCLAP-NAGG--EPTGKVAEAI AASFGFSADFKAQFTDAAIKNFGSGWTWLVKNS--DGKLAIVSTSNAGTPLTT

Hp (Fe) HDFYWDCLSPKATA--LSDELKGALEKDFGSL EKFKEDFIKRATTLFGSGWNWAAYN-LDTQKIEIIQTSNAQTPVTD

Pg (Cam) HNL YFTQFRP-GKGG--APK GKLGEAIDKQFGSFEKFKEEFNTAGTTLFGSGWVWLASDA-NG-KLSIEKEPNAGNPVRK

Ec (Mn) HSLFWKGLKK--GTTL-Q-GDLKAAIERDFGSVDNFKAEFEKAAASRFSGWAWLV--LK-GDKLAVVSTANQDSPLMG

Sm (Mn) HSFFWKNLKT--GTTL--GDLKAAIERDFGSVEKFKQEEFEKAAATRFSGWAWLV--LK-DGKLAIVVSTANQDSPLMG

Bs (Mn) HSLFWTILSP-N-GGGE-PTGELADAINK KFGSFTAFKDEFSKAAAGRFGSGWAWLVVN--NGE-LEITSTPNQDSPIME

Tt (Mn) HSLFWRLLTP--GGAKE-PV GELKKAIDEQFGGFQALKEKLTQAAMGRFGSGWAWLVKDP-FG-KLHVLSTPNQDNPVME

▼ * * 180

Po (Fe) -----GDTPLLLTCDVWEHAYYIDYRNLRPKYVEAFWNLVNWAFVAEEGKTFKA

Pl (Fe) E-----GVTPLLLTVDLWEHAYYIDYRNLR TSYMDGF WALVNWDFVS-KNLAA

Ec (Fe) DA-----TPLLLTVDVWEHAYYIDYRNARPGYLEHFWALVNW E FVA-KNLAA

Hp (Fe) -----KKVPLLVVDVWEHAYYIDHKNARPVYLEKFYGHINWHFNSQCYEWAKKEGLGSVDYY

Pg (Cam) -----GLNPLLGFDVWEHAYYLYTYQNRRADHLKDLWSIVDWDIVESRY

Ec (Mn) EAISGASGFPILGLDVWEHAYYLKFNRRPDYIKEFWNVVNWDEAAARF-AAK-K

Sm (Mn) EAVAGASGFPILGLDVWEHAYYLKYQNKRPDYIKAFWNVVNWDEAAARF-AAK-K

Bs (Mn) -----GKTPIILGLDVWEHAYYLKYQNRRPEYIAAFWNVVNWDEVAKRYSEAKAK

Tt (Mn) GF-----TPIVGI DVWEHAYYLKYQNRRADYLQAIWNVVNWKEASRRFD

図3：各種 SOD のアミノ酸配列の比較
 残基は *P. g.* SOD の番号で示した。黒枠は共通の残基；赤枠は活性金属から 8 Å 以内の残基；* は金属配位残基；赤矢印は Gly 155 を示す。

Po : *Pseudomonas ovalis*, Pl : *Photobacterium leiognathi*, Ec : *Escherichia coli*, Hp : *Helicobacter pylori*, Pg : *P. gingivalis*, Sm : *Serratia mercesens*,
 Bs : *Bacillus stearothermophilus*, Tt : *Thermus thermophilus*

グループ

…の2グループである。後者のグループは、ラテン語の「交換可能」という意味の *cambialis* から *cambialistic enzyme*²⁷⁾ と呼ばれている。金属を置換後も、ほぼ同様な活性を示す酵素として典型的なものが *P. g.* SOD²⁸⁻³⁰⁾ とプロピオン酸菌 *Propionibacterium shermanii* の SOD^{31,32)} であり、金属の依存性は Mn/Fe=1.2~1.5 である。他に、齶蝕原性菌 *Streptococcus mutans*^{27,33)}、好気性超好熱始原菌 *Pyrobaculum calidifontis*³⁴⁾、根粒菌 *Sinorhizobium meliloti*³⁵⁾、非酸素発生型の光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus*³⁶⁾ の SOD も *cambialistic SOD* に属するが、金属の依存性はいずれも Mn に高く、Mn 型酵素の例外ともいえる。従って、*P. g.* SOD と *P. shermanii* の SOD の2種が、上述の祖先型タンパク質に近い構造を保った「進化途上の酵素」であると考えている。

〈*P. g.* SOD の性質〉 *P. g.* SOD の化学的性質は、191個のアミノ酸からなる分子量21,501 Da の酵素であり、アミノ酸配列として Fe-SOD とは44~51%、Mn-SOD とは40~45%の相同性がある(図3)^{8,9)}。しかし、Fe-SOD ファミリーの中では65~74%、Mn-SOD ファミリーの中では42~60%の相同性があるので、この点でも両ファミリーの中間に位置する酵素である。

さて、菌種によっては、大腸菌のように Mn-SOD と Fe-SOD の両方を持つ場合もある⁶⁾が、ジンジバリス菌は1つの遺伝子から作られる1つ

の酵素しかない。最初の報告は Amano A ら²⁸⁾ によるもので、嫌気下で対数増殖期まで培養したジンジバリス菌は Fe-SOD を合成しているのに対し、これを通気下で増殖し続けると、好気下では Mn-SOD に変換していた。また、その両酵素を精製し、酵素化学的性質と一次構造²⁹⁾ を比較した結果、両酵素は同一のタンパク質であり、*P. gingivalis* の SOD は1つの遺伝子に由来する、と結論した。この成果から、

- i *P. g.* SOD の酸化ストレスに対するサバイバル機構は、タンパク質の使い回しという最小限の負担で済ませた。
- ii 使い回しのために、*P. g.* SOD の金属の選択性は寛容になった。

…と考えられる。好気下で酸化還元電位が上昇すると、Fe は酵素タンパク質と結合できなくなり、代わりに Mn が結合するのであろう。次の問題は、金属の寛容性を与えている構造の解明である。

4. *P. g.* SOD の構造の特徴は見出しにくい

私たちは、*P. g.* SOD のタンパク質工学的研究を行うために、SOD 組換え分子を *E. coli* において過剰発現系へ再構築し、精製法の確立に成功した³⁷⁾。次いで結晶解析に成功した結果(図4)²⁶⁾、金属配位環境に存在する個々のアミノ酸残基の役割を推定することが可能になった。この結果を、既に報告されている Mn-SOD、Fe-SOD および *cambialistic SOD* の立体構造と比較すると、3種 SOD は驚くほどポリペプチド鎖の折りたたまれ方が類似していた。

活性金属は水平方向(エクアトリアル位)にある2つの His 27 & 74 と Asp 157 によって配位され、また軸方向(アキシアル位)にある His 161 と溶媒分子(H₂O)が配位している。軸方向の溶媒分子は酸化された酵素中の水酸基であり、還元型では水であると考えられる(図5)。

このように Mn-SOD と Fe-SOD は配位子が同じであり、その構造に高い類似性があることが判明したが、もし、配位環境が全く同じであるならば、Mn-SOD と Fe-SOD の金属を入れ替えても酵素活性を示すはずである。しかし、Mn-SOD と2つの Fe-SOD の金属置換実験の結果は何れの SOD も他方の金属で置換した酵素を得る

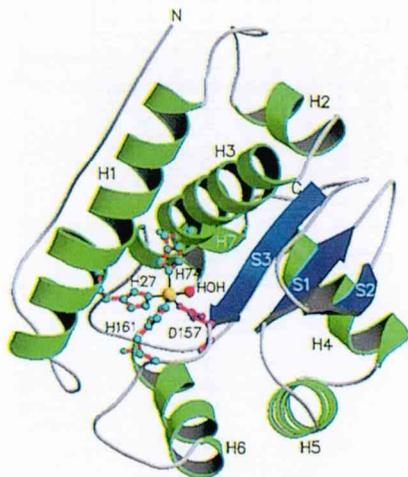
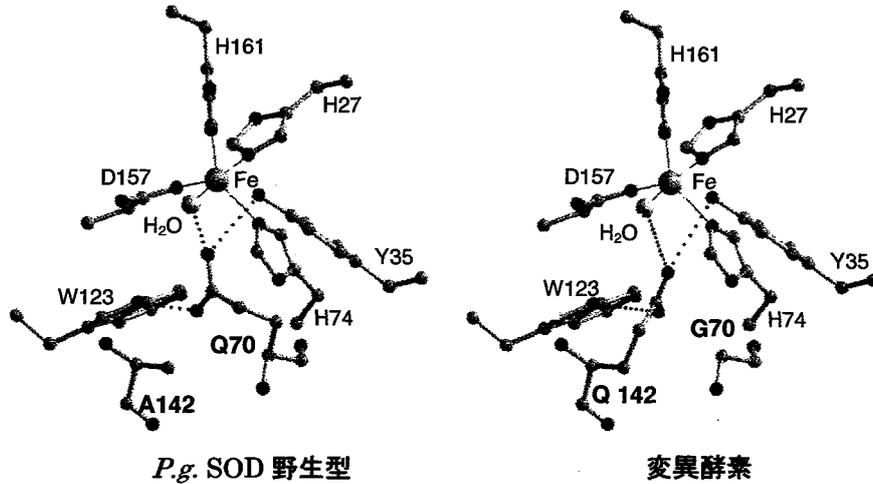


図4: *P. g.* SOD の立体構造

1.8Åの分解能で得たX線結晶解析結果から作図²⁶⁾。7本の α ヘリックスと3本の β シート構造が見られる。実際の酵素は二量体である。



P.g. SOD 野生型

変異酵素

図5：*P.g.* SODの活性中心近傍の構造（左）
右は、Gln 70 Gly, Ala 142 Glnの2残基変異酵素の推定構造。

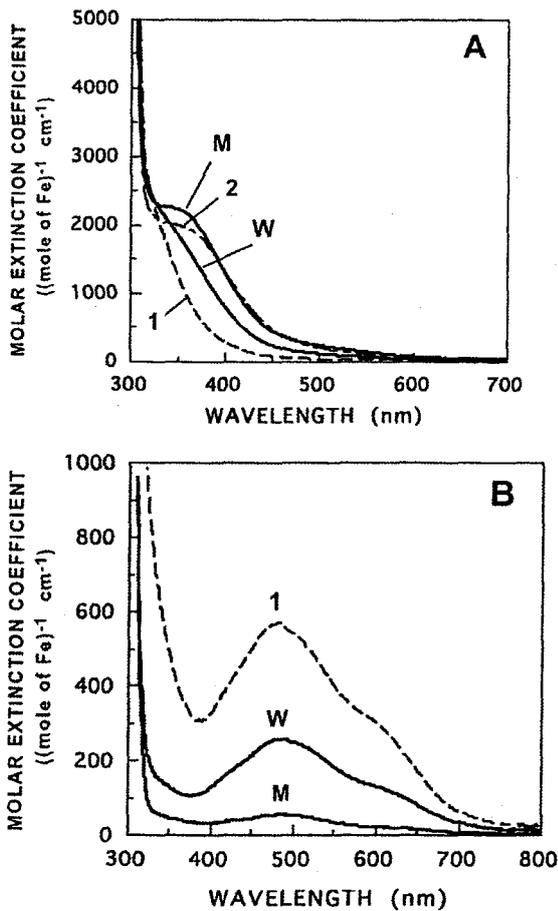


図6：Mn-SODとFe-SODの可視部吸収スペクトルの比較
(A) 1. *Serratia marcescens* 由来の Mn-SOD (Mn 特異的 SOD) を金属除去後 Fe で再構成した酵素；2. *Pseudomonas ovalis* 由来の Fe-SOD (Fe 特異的 SOD)；W. 野生型 *P.g.* SOD を Fe で再構成した酵素；M. Gly 155 Thr 変異 *P.g.* SOD を Fe で再構成した酵素
(B) 1. human Mn-SOD；W. 野生型 *P.g.* SOD を Mn で再構成した酵素；M. Gly 155 Thr 変異 *P.g.* SOD を Mn で再構成した酵素

ことは出来るが酵素活性は示さず、各 SOD の活性発現に必要な金属の特異性は非常に高かった。例外は cambialistic SOD として分類される。図6は、典型的な Mn-SOD (Fe-SOD) から調製した Fe (Mn) 置換酵素の可視部吸収スペクトルであるが、活性金属によって金属の吸収帯が明らかに異なっている³⁸⁾。また、高磁場電子スピン共鳴スペクトルによる検討でも、金属によって明確な相異が認められる^{39,40)}。これらの事実は、Mn-SOD と Fe-SOD で配位環境に何らかの違いがあることを示唆している。

一方、配位する溶媒分子は、配位子 Asp 157 と水素結合を形成し、近傍の Gln 70 のアミド側鎖とも相互作用しているが、興味あることに Fe-SOD ではこの Gln 残基は70位にあるが、Mn-SOD では142位になっており、この傾向は多くの SOD でみられた (残基の番号はいずれも *P.g.* SOD の場合)。Glu 142 は、さらに高度に保存された Tyr 35 と水素結合を形成している。これらの残基間において、活性にとって重要と思われる広範囲における水素結合のネットワークが、酵素活性発現時のプロトンの挙動と活性部位 pK を決定していると考えられる^{26,37-41)}。活性金属から半径 8 Å 以内では、このような相異点しか観察されない。

5. 金属の寛容性を与えている構造；*P.g.* SOD は祖先型で止まった
<*P.g.* SOD を完全な金属特異的酵素へ変化さ

せられるか)「金属酵素はその活性に最も相応しい金属をいかにして選ぶか」という問いは、生物無機化学における最も興味深い課題の一つである。同じ反応を触媒する金属酵素でも、配位子が変わると最も効率良く働く金属が違ってくことは良く知られているが、cambialistic SODにおける金属選択の寛容性は特殊なだけに興味深い。

立体構造の成果は、図3の一次構造から推察する場合とは比較にならない情報を与え、作業仮説の作成にヒントを与える。一方、理論的には妥当な仮説でも、「論より証拠」を出してみないと判らない事が多い。*P. g.* SODをcambialisticにしているアミノ酸残基を決定するには、ターゲットとしたアミノ酸を変異させて完全なMn-SOD(あるいはFe-SOD)に変化させられるかを実証してみることである。私達は、一次構造の相異でMn(Fe)-SODに特徴的なアミノ酸残基を選択し、*P. g.* SODでターゲットのアミノ酸をMn(Fe)-SODに特異的な残基に置換した状態を立体構造でシュミレーションして妥当性を検討後、部位特異的変異(site-directed mutagenesis)によって実際に変異酵素を作製する作業を繰り返した。

まず、*P. g.* SODの一次構造がFe-SODと相同性が高く、相異点を見出すのが困難であったためMn-SODへの変異を試みた。上記のGln 70

とGln 142の問題である。図5にあるように、Gln 70をGlyに置換する(Gln 70 Glyと略記する)一方、Ala 142 Glnの変異を同時に導入し、Mn-SODと同様の一次構造に変異させた³⁷⁾。立体構造でのシュミレーションでは、*P. g.* SODとMn-SODの間でAla 142までの主鎖コンフォメーションはほぼ一致しているが、Ala 142の先ではやや異なっていた。そのため、Ala 142 Glnの変異でGlnのアミド基が占める空間配置が異なることも予想されたが、このような微妙な変化はタンパク質の構造全体で吸収してしまう可能性もあった。実際の結果は、金属の依存性が野生型のMn/Fe=1.4から変異型は3.5に上昇し、作業仮説の正しさが証明できた。完全なMn依存性SODに変異させることはできなかったが、活性金属近傍に存在するアミノ酸残基の個々の役割を同定できたのは、変異酵素を用いた研究で最初の成功例になった。

予想以上の成果を上げたのがGly 155 Thrの変異体である³⁸⁾。

P. g. SODは基本的にFe-SOD型の一次構造をとり、活性金属近傍の構造はFe-SODと一致している。それ故、完全なFe依存性活性をもつ酵素に変異させるために、金属近傍の環境を形成しているアミノ酸残基まで比較検討の対象を広げてみた。この段階では一次構造の比較検討が威力

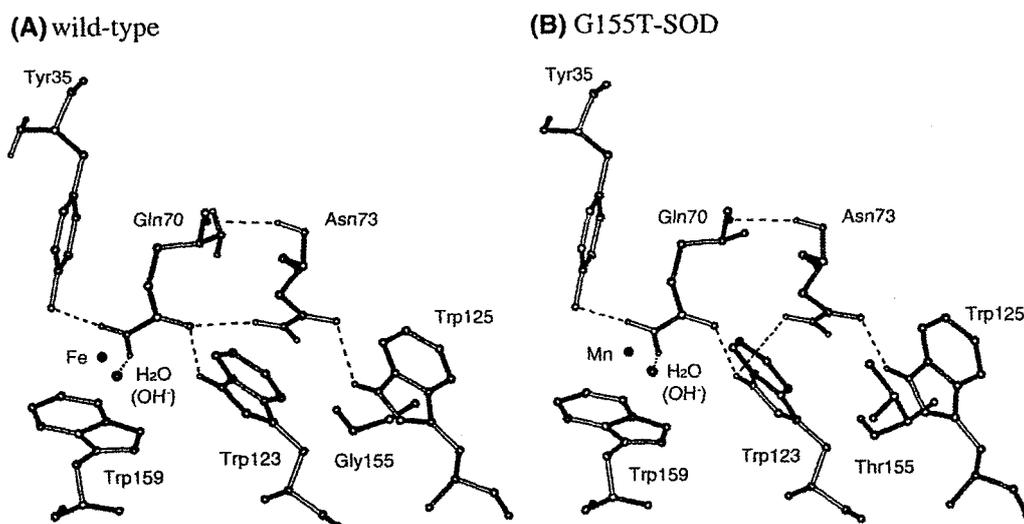


図7：*P. g.* SOD 活性中心近傍の水素結合ネットワーク

(A) Feで再構成した野生型酵素；(B) Mnで再構成したGly 155 Thr変異酵素

P. g. SODをcambialisticにしているのはGly 155である。

Mnで再構成した野生型酵素、Feで再構成したGly 155 Thr変異酵素の結晶化も試みたが、結晶の安定性と質に問題があり、上の2つの結果が得られた。

を發揮し、後から立体構造のシュミレーションで変異の是非を検討した。

理論的には、Gly 155 Thr の変化は保存残基 Trp 123と Trp 125における側鎖のコンフォメーション変化を来し、Leu 72 Trp, Leu 76 Phe の協奏的残基置換を招く、と推定された。Gly 155 Thr の分子進化が選択されると、次いで Trp 123 と Trp 125のコンフォメーション変化に由来する Leu 72 Trp と Leu 76 Phe の残基置換の進化を招く、という意味である。そこで、Gly 155 Thr, Leu 72 Trp, Leu 76 Phe の3残基変異体と、Gly 155 Thr の1残基変異体の2つを作製し、その酵素化学的性質を検討してみると、Gly 155 Thr 変異だけで3残基変異とほぼ同様の結果を得た。Fe に対する活性依存性は、 $Fe/Mn=0.6$ から11.2に上昇し、ほぼ完全な Fe-SOD に変異させることができた。さらに、変異酵素の結晶化にも成功し、Fe-SOD に特異的な活性中心近傍の構造が決定できた³⁸⁾。図7は、側鎖がH1原子である Gly から Thr のかさ高い側鎖になった場合、保存残基 Trp 123と Trp 125の芳香族側鎖の空間配置を変化させ、活性中心近傍の水素結合ネットワークに変化を与えていた構造を示す。その結果、変異酵素は Mn を配位するが酵素活性の発現に支障をきたす典型的な Fe-SOD になったと考えられる。155位の Gly は Mn-SOD において、また、Thr は Fe-SOD において特徴的な残基であり、これは Swiss-Prot データベースで調べる限り、73種の SOD (古細菌7種、真正細菌37種、真核生物29種) で当てはまる。即ち、*P. g.* SOD の155位は、配位子 Asp 157の2残基前に位置し、49種の Mn-SOD の内39種が Gly であり、24種の Fe-SOD の内14種が Thr であった。従って、155位にある Gly が、基本的に Fe-SOD 型の一次構造をとる *P. g.* SOD の中で金属選択性を寛容にしている、と推察した。

ジンジバリス菌にとって、環境に応じて2種の金属を使い分けるため、SOD の分子進化を最小限にとどめたという選択は、炎症惹起後の時間経過で変化する歯周ポケット内酸化ストレスに対応するサバイバル戦略として最適であったのであろう。

最近、Ohara N ら⁴²⁾は、*P. g.* SOD の発現を促進する転写活性化因子が、他の菌に見られるスー

パーオキシド応答性の SoyR ではなく、菌体内の酸化還元電位に応答している OxyR であると結論した。この OxyR は、ジンジバリス菌の近縁種である *Bacteroides fragilis* の SOD 遺伝子に対して作用を示さず、ジンジバリス菌固有の物と考えられた。今後、ジンジバリス菌 OxyR タンパク質の酸化還元状態における構造変化が検討されれば、分子状酸素に反応する偏性嫌気性菌の酸化ストレス機構がより明確になるであろう。

おわりに

歯周組織の炎症最前線は、漏出した血液の栄養を奪おうとする細菌群と防御にあたる宿主側との戦いが行なわれ、好中球の放つ活性酸素が守るべき宿主の組織をも破壊するという荒れた戦場である。ジンジバリス菌が棲息するこの様な環境は、研究が進むにつれて、いよいよ興味深い場になっている。古細菌に属し、水素・ギ酸・酢酸を基質として棲息するメタン生成菌が歯垢から検出されたのは驚きであったが⁴³⁾、最近、歯周疾患部からも検出され口腔スピロヘータと競争関係を指摘される⁴⁴⁾など、口腔疾患における病原体として認識されてきた感がある⁴⁵⁾。歯周ポケット、あるいは口腔バイオフィルムを、太古の海に始まる嫌気性生物と好気性生物の酸素を介したサバイバル競争の場として捉え、競争の歴史を SOD の分子進化に読む視点を理解して戴ければ幸いである。

稿を終えるにあたり、総説執筆の機会を下さった、井上勝博教授を長とする本誌編集委員の方々にお礼を申し上げます。筆者の研究には、本学口腔生化学教室研究補助員、武井智子さんのアシストが常にありました。この機会に感謝申し上げます。また、文献整理と図の作成は、本学化学教室研究補助員、倉田あいさんが助けてくれました。併せて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Halliwell B and C Gutteridge, J M (1999) Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford.
- 2) 小林一雄 (1988) 活性酸素の寿命とその生理的意義. 蛋白質核酸酵素 33 : 2678-83.
- 3) Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman

- PA, Richardson JS and Richardson DC (1983) Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **306** : 287-90.
- 4) McCord JM and Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* **244** : 6049-55.
 - 5) McCord JM and Fridovich I (1968) The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* **243** : 5753-60.
 - 6) Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64** : 97-112.
 - 7) Tolmasoff JM, Ono T and Cutler RG (1980) Superoxide dismutase : correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77** : 2777-81.
 - 8) Amano A, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Maekawa K and Tsunasawa S (1990) The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. *FEBS Lett* **272** : 217-20.
 - 9) Nakayama K (1990) The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Gene* **96** : 149-50.
 - 10) Lynch MC and Kuramitsu HK (1999) Role of superoxide dismutase activity in the physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **67** : 3367-75.
 - 11) Diaz PI and Rogers AH (2004) The effect of oxygen on the growth and physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **19** : 88-94.
 - 12) Smalley JW, Silver J, Marsh PJ and Birss AJ (1998) The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form : an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem J* **331** : 681-5.
 - 13) Johnson NA, McKenzie R, McLean L, Sowers LC and Fletcher HM (2004) 8-oxo-7, 8-dihydroguanine is removed by a nucleotide excision repair-like mechanism in *Porphyromonas gingivalis* W 83. *J Bacteriol* **186** : 7697-703.
 - 14) 藤村節夫 (2002) 歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* と関連菌のタンパク質分解酵素と鉄獲得機構. *松本歯学* **28** : 61-9.
 - 15) Mettraux GR, Gusberti FA and Graf H (1984) Oxygen tension (pO₂) in untreated human periodontal pockets. *J Periodontol* **55** : 516-21.
 - 16) Tanaka M, Hanioka T, Takaya K and Shizukuishi S (1998) Association of oxygen tension in human periodontal pockets with gingival inflammation. *J Periodontol* **69** : 1127-30.
 - 17) Hanioka T, Shizukuishi S and Tsunemitsu A (1990) Hemoglobin concentration and oxygen saturation of clinically healthy and inflamed gingiva in human subjects. *J Periodontol Res* **25** : 93-8.
 - 18) Nakahara H, Sato EF, Ishisaka R, Kanno T, Yoshioka T, Yasuda T, Inoue M and Utsumi K (1998) Biochemical properties of human oral polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Res* **28** : 485-95.
 - 19) Waddington RJ, Moseley R and Embery G (2000) Reactive oxygen species : a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis* **6** : 138-51.
 - 20) 活性酸素-生成の抑制と消去-蛋白質核酸酵素 **23** : 200-13.
 - 21) 近藤宗平 (1986) 危険な酸素と生物の適応的進化. *実験医学* **4** : 1065-6.
 - 22) Allwood AC, Walter MR, Kamber BS, Marshall CP and Burch IW (2006) Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia. *Nature* **441** : 714-8.
 - 23) Ursby T, Adinolfi BS, Al-Karadaghi S, De Vendittis E and Bocchini V (1999) Iron superoxide dismutase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* : analysis of structure and thermostability. *J Mol Biol* **286** : 189-205.
 - 24) Kanematsu S and Asada K (1978) Crystalline ferric superoxide dismutase from an anaerobic green sulfur bacterium, *Chlorobium thiosulfatophilum*. *FEBS Lett* **91** : 94-8.
 - 25) Takao M, Yasui A and Oikawa A (1991) Unique characteristics of superoxide dismutase of a strictly anaerobic archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J Biol Chem* **266** : 14151-4.
 - 26) Sugio S, Hiraoka BY and Yamakura F (2000) Crystal structure of cambialistic superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Biochem* **253** : 49-56.
 - 27) Martin ME, Byers BR, Olson MO, Salin ML, Arceneaux JE and Tolbert C (1986) A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J Biol Chem* **261** : 9361-7.
 - 28) Amano A, Shizukuishi S, Tamagawa H, Iwakura K, Tsunasawa S and Tsunemitsu A

- (1990) Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* **172** : 1457–63.
- 29) Amano A, Shizukuishi S, Tsunemitsu A and Tsunasawa S (1992) Identity of amino acid sequences of superoxide dismutase purified from both anaerobically maintained and aerated *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **7** : 368–71.
- 30) Yamakura F, Taedin RL, Petsko GA, Ringe D, Hiraoka BY, Nakayama K, Fujimura T, Taka H and Murayama K (1998) Inactivation and destruction of conserved Trp 159 of Fe-superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* **253** : 49–56.
- 31) Meier B, Barra D, Bossa F, Calabrese L and Rotilio G (1982) Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied. *J Biol Chem* **257** : 13977–80.
- 32) Gabbianelli R, Battistoni A, Capo C, Polticelli F, Rotilio G, Meier B and Desideri A (1997) Effect of Val 73 → Trp mutation on the reaction of “cambialistic” superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii* with hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* **345** : 156–9.
- 33) Martin ME, Strachan RC, Aranha H, Evans SL, Salin ML, Welch B, Arceneaux JE and Byers BR (1984) Oxygen toxicity in *Streptococcus mutans*: manganese, iron, and superoxide dismutase. *J Bacteriol* **159** : 745–9.
- 34) 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** : 6340–7.
- 35) Santos R, Bocquet S, Puppo A and Touati D (1999) Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **181** : 4509–16.
- 36) Tabares LC, Bittel C, Carrillo N, Bortolotti A and Cortez N (2003) The single superoxide dismutase of *Rhodobacter capsulatus* is a cambialistic, manganese-containing enzyme. *J Bacteriol* **185** : 3223–37.
- 37) Hiraoka BY, Yamakura F, Sugio S and Nakayama K (2000) A change of the metal-specific activity of a cambialistic superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by a double mutation of Gln-70 to Gly and Ala-142 to Gln. *Biochem J* **345** : 345–50.
- 38) Yamakura F, Sugio S, Ohmori D, Hiraoka BY, and Yokota Y (2003) Pronounced conversion of the metal-specific activity of superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by the mutation of a single amino acid (Gly 155 Thr) located apart from the active site. *Biochemistry* **42** : 10790–9.
- 39) Un S, Tabares LC, Cortez N, Hiraoka BY and Yamakura F. (2004) Manganese(II) zero-field interaction in cambialistic and manganese superoxide dismutases and its relationship to the structure of the metal binding site. *J Am Chem Soc* **126** : 2720–6.
- 40) Tabares LC, Cortez N, Hiraoka BY, Yamakura F and Un S. (2006) Effects of substrate analogues and pH on manganese superoxide dismutases. *Biochemistry* **45** : 1919–29.
- 41) Vance CK and Miller AF (1998) A simple proposal that can explain the inactivity of metal-substituted superoxide dismutases. *J Am Chem. Soc* **120**(3) : 461–7.
- 42) Ohara N, Kikuchi Y, Shoji M, Naito M and Nakayama K (2006) Superoxide dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR. *Microbiology* **152** : 955–66.
- 43) Belay N, Johnson R, Rajagopal BS, de Macario EC and Daniels L (1988) Methanogenic bacteria from human dental plaque. *Appl Environ Microbiol* **54** : 600–3.
- 44) Lepp PW, Brinig MM, Ouverney CC, Palm K, Armitage GC and Relman DA (2004) Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** : 6176–81.
- 45) Vianna ME, Conrads G, Gomes BP and Horz HP (2006) Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol* **44** : 1274–82.