

## *Porphyromonas gingivalis* SOD の金属特異性を 寛容にしているアミノ酸側鎖の検討

三原 正志

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Contribution of the amino acid residues to the metal-tolerant  
activity of cambialistic SOD from *Porphyromonas gingivalis*.

MASASHI MIHARA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

### 【緒言】

酸化ストレスから生体を保護するため、生物の生存にとって不可欠な酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) があり、生物界において広範囲に分布している。歯周ポケットのような高度に嫌気的な条件であっても、炎症局所では食細胞が産生する活性酸素にさらされる危険性があり、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) の様な偏性嫌気性菌でさえ SOD を獲得している。*P. g.* SOD の性質を明らかにすることは、本菌のサバイバルを抑制する有効な抗菌剤の開発に道を開くものと考えている。

細菌の SOD は構造上極めて相同性が高い一方、活性は金属依存性が厳格であるために鉄を含む酵素 (Fe-SOD) とマンガンを含む酵素 (Mn-SOD) に分けられるが、*P. g.* SOD はいずれの金属でも活性を示す稀有な特徴を有する。このため、Fe-SOD と Mn-SOD の共通の祖先型タンパク質に近い構造を保っていると考えられ、本酵素で得られた構造上の知見は細菌の SOD に対して普遍性を持つ可能性があると期待される。私たちは、*P. g.* SOD のタンパク質工学的研究を行うために、本酵素の立体構造の解析結果から金属配位近傍および遠位のアミノ酸残基の役割を推測し、部位特異的変異酵素を作製して金属選択性に

関わる構造を検討してきた。その結果、金属特異性を決定しているアミノ酸残基の1つを、活性中心から遠位にある155番目の Gly (Gly 155) と特定できた。また、Gly 155を Thr に置換した酵素 (Thr 変異酵素) は、金属依存活性が変換して完全な Fe-SOD となった。そこで、私は「*P. g.* SOD の Gly 155を Ser および Val へと変異させても Fe 依存活性が増加する」と仮説を立て、変異酵素を作製してアミノ酸側鎖の意義を検討した。

### 【材料と方法】

Gly 155 (GGA) に対し、Ser (⇒AGC) および Val (⇒GTA) の部位特異的変異を Kunkel の方法に基づいた Mutan-K システムを用いて導入した。発現ベクターは pMAL を用いてマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合体として過剰発現させ、トリプシン処理後イオン交換で精製した。キレート剤で配位金属を除いた後 Mn あるいは Fe を配位させた再構成酵素を作製し、酵素化学的性質を検討した。酵素活性は、標準法であるキサンチンオキシダーゼ法 (pH 7.8) を用いて測定した。

### 【結果及び考察】

2種変異酵素の金属依存活性 (Fe/Mn) は、野生型の0.7に対して、Ser 変異酵素で1.9、Val 変

異酵素は1.4と Fe 依存性が増加した。酵素の可視部吸収スペクトルは、両変異酵素とも金属配位環境が僅かに変換された事を示唆したが、Fe 特異的 SOD や Mn 特異的 SOD の顕著な特徴は認められなかった。一方、酵素分子は155位において Ser と Val の側鎖を立体構造の中で吸収でき

ず、全体構造の変化を与えたことが示唆された。以上の結果から、Gly 155は活性中心から11Å離れた遠位にありながら、側鎖のHが隣接残基の自由度を保証し、金属選択を寛容型にしていると考えた。