

学位論文題名

Molecular biological basis and physiological significance of extraordinarily high catalase activity in *Vibrio rumoensis* S-1

(*Vibrio rumoensis* S-1 株の異常に高いカタラーゼ活性の分子生物学的基礎とその生理学的意義)

学位論文内容の要旨

生物は体内の酸化反応において不可避的に発生する活性酸素を除去するためにカタラーゼなどの活性酸素消去酵素を持っている。特に微生物の場合は、これらの酵素は内的な酸化ストレスのみならず、外的な酸化ストレスからの防御の役割も担っていると考えられている。*Vibrio rumoensis* S-1(以下 S-1 株)は、恒常的に数 μM 以上の過酸化水素を含む水産物加工場の廃液から単離された細菌であり、その細胞粗抽出液は大腸菌の 62 倍、枯草菌の 256 倍という高いカタラーゼ活性を示す。本研究は、S-1 株がこのように異常に高いカタラーゼ活性を示す分子生物学的基礎を明らかにするとともに、その生理学的な意義の解明を目的に行われた。

S-1 株を PYS 液体培地で培養し、経時的に無細胞抽出液のカタラーゼ活性を測定したところ、カタラーゼ活性は菌の増殖が定常期初期で最大値を示した。この特徴は大腸菌の HPII 型カタラーゼの場合とよく似ていた。さらに無細胞抽出液を電気泳動に供した後、カタラーゼの活性染色を行ったところ、何れの場合も一種類のみのカタラーゼ陽性バンドが検出された。

S-1 株のカタラーゼ遺伝子をクローニングするため、精製カタラーゼをリシルエンドペプチダーゼで部分消化して、ペプチドマッピングを行った。得られたペプチド断片のアミノ酸配列を基に作成した PCR プライマーと、S-1 株のゲノム DNA をテンプレートとして用いたゲノミック PCR をを行い、カタラーゼ遺伝子の一部(PP-327)を增幅した。PP-327 をプローブに用い、S-1 株から作製した遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって、カタラーゼ遺伝子を単離した。本カタラーゼ遺伝子は 508 個のアミノ酸をコードする 1524 bp の単一の ORF からなっており、推定されるその分子量は 57.7 kDa であった。この値は生化学的に求めた精製カタラーゼの分子量と一致した。本カタラーゼのアミノ酸配列は既知の細菌カタラーゼと相同であり、特に寄生性の生活史を持つ細菌が持つグループ III に分類されるカタラーゼと高い相同意性を示した。また、カタラーゼの触媒部位および活性調節に関わるとされるアミノ酸残基はほぼ完全に保存されていた。この結果は S-1 株から精製したカタラーゼの生化学的諸性質が既知のカタラーゼと高い類似性を示すことと符合する。本遺伝子を大腸菌のカタラーゼ欠損株で発

現させ、無細胞抽出液のカタラーゼ活性を測定したところ、165 U/mg protein の値を示した。しかし、本形質転換株を 10ないし 100 μM の過酸化水素で処理してもカタラーゼ活性の上昇が認められなかつたことから、本遺伝子の発現は過酸化水素に対し非誘導性であることがわかつた。本遺伝子の上流 700 bp の部分を単離し、レポーター遺伝子(グルタチオン S トランスフェラーゼ遺伝子)を連結させプロモーター活性を測定したところ、高発現性プロモーターとして知られる *tac* プロモーターと同程度の高い発現活性を示すことがわかつた。

S-1 株 および S-1 株 のカタラーゼ自然欠損株である S-4 株を 5 mM の過酸化水素を含む培地で培養したところ、前者は活発に増殖したが、後者は全く増殖しなかつた。また、S-1 株の接種後 10 分以内に培地に含まれる中の過酸化水素の大半は分解されており、カタラーゼを含む菌体内タンパク質の大部分が培地中に検出された。一方、S-1 株、S-4 株、大腸菌、枯草菌、および *Vibrio parahaemolyticus* を種々の濃度の過酸化水素を含む寒天平板培地上で培養し、それぞれのコロニー形成能を調べたところ、100 μM の過酸化水素を含む寒天平板上で S-1 株 のコロニー形成率は 35.6% であり、大腸菌の 86.1%、枯草菌の 98.5%、*V. parahaemolyticus* の 86.6% と比べて明らかに低かつた。S-4 株は過酸化水素に対して最も高い感受性を示した。S-1 株のカタラーゼに対する抗血清を用い、免疫電子顕微鏡法でカタラーゼの S-1 株菌体内での局在性を調べたところ、カタラーゼはペリプラズム間隙により多く分布していることが明らかになつた。

S-1 株のカタラーゼ遺伝子の一次構造がグループ III のカタラーゼのそれと高い相同性を示すことと本菌株が分離された環境を考慮すると、S-1 株は魚類寄生性微生物であることが予想される。S-1 株におけるカタラーゼの高活性(大量蓄積)は、カタラーゼ遺伝子上流に高い発現活性を有するプロモーター領域を持つためであると考えられる。細胞の主にペリプラズムに蓄積されているカタラーゼは、細胞集団が部分的に破壊されたときに細胞外に放出され、周りの過酸化水素を極めて迅速に分解すること、その結果、残りの細胞集団が過酸化水素をほとんど含まない環境下で生存することが可能になると考えられる。ペリプラズムにおけるカタラーゼの蓄積は迅速に同酵素を外部に放出するために有用であり、S-1 株においてペリプラズムはカタラーゼの貯蔵タンクの役割をしていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 助教授 奥山英登志

副査 教授 荒木義雄

副査 教授 西則雄

副査 助教授 山崎健一

副査 教授 山本興太朗(理学研究科)

学位論文題名

Molecular biological basis and physiological significance of extraordinarily high catalase activity in *Vibrio rumoienensis* S-1

(*Vibrio rumoienensis* S-1 株の異常に高いカタラーゼ活性の分子生物学的基礎とその生理学的意義)

生物はその呼吸の過程で副次的に生ずるスーパーオキシドや過酸化水素のような活性酸素の毒性から細胞を防御するために、カタラーゼを含む活性酸素消去系の酵素をもっている。カタラーゼはあらゆる生物に存在し、細胞内で生じる過酸化水素の毒性から細胞を保護している。しかし、最近の研究により、細菌においては通常の実験室レベルでの穏和な条件下ではカタラーゼは必須の酵素ではないということが報告されており、細菌におけるカタラーゼの機能は寧ろ細胞外の環境中に存在する過酸化水素ストレス(酸化ストレス)から細胞を防御することであると考えられる。特に病原菌や寄生・共生細菌におけるカタラーゼの機能は、その感染力と密接な関係を持っていることが明らかにされている。一方、細菌が高い過酸化水素濃度環境下で生育する場合、その酸化ストレスを解消するために高レベルのカタラーゼを必要とすることが予想される。申請者らは、過酸化水素廃液槽から比較的高濃度の過酸化水素存在下でも生育が可能であり、非常に高い過酸化水素耐性能をもつと考えられる新種の過酸化水素耐性菌を単離した。この菌はすでに *Vibrio rumoienensis* S-1 株(以下 S-1 株)と命名され、異常に高いカタラーゼ活性を持つことが明らかにされている。本研究はこの S-1 株を材料として、その過酸化水素耐性機構の解明、及び異常に高いカタラーゼ活性を持つことの分子機構と生理学的意義の解明を目的に行われたものである。

S-1 株は菌体内に常に多量のカタラーゼを蓄積しており、細胞抽出液のカタラーゼ比活性は大腸菌などその他の細菌に比べて、2~3 衍高い値を示すが、申請者はこの高いカタラーゼ活性が、S-1 株の過酸化水素耐性の機構と密接に関係していると予想し、その耐性機構を生理学的、生化学的手法で解明することを試みた。その結果、S-1 株は過酸化水素に曝され

ると、菌集団の一部がほぼ瞬時に破壊され、蓄積されていた多量のカタラーゼは細胞外に漏出される。その漏出したカタラーゼが環境中の過酸化水素を短時間で分解し、その後損傷を免れた菌株が増殖するとの結論を得た。酸化ストレスに対するこのような応答は従来知られていないユニークなものである。

S-1 株の精製カタラーゼはこれまでに知られている何れのカタラーゼより高比活性をもつことが明らかになっている。そこで申請者はこの精製酵素がもつ高比活性の分子機構の解明を行うために、S-1 株からカタラーゼ遺伝子の単離を行った。単離されたカタラーゼ遺伝子 (*vktA*) の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を解析した結果、VktA カタラーゼ（以下 VktA）は細菌のグループ III に属するカタラーゼと非常に高い相同意を示したが、高比活性の原因となるような特異的なアミノの一次配列は見いだせなかった。しかし、申請者はコンピューター解析により *VktA* の高次構造の予測を行ない、それが *VktA* と同様に比活性が非常に高いヒトのカタラーゼ A のものと高い相似性を示すを見いだした。従って *VktA* の高比活性はヒトのカタラーゼ A と共に高次構造に起因すると結論している。

申請者は S-1 株の *VktA* の含量を、プロトヘムの量を基に全可溶性タンパクの約 5% と見積もっており、このように多量のカタラーゼを蓄積する要因の一つとして *vktA* 遺伝子の高発現性を予想した。そこで、*vktA* の上流約 600 bp とレポーター遺伝子 (*lacZ*) と繋げることによって、プロモーターの活性を測定した。それにより、*vktA* のプロモーター活性は、高発現性プロモーターとして知られている *tac* プロモーターの約 1000 倍高い値を示すことを明らかにした。一方、プロモーター領域には、従来知られているような高い転写活性も分配列は見つからなかったことから、新規な配列やタンパク質要因の存在を予想している。

近年、低温を含む種々の環境ストレスによって菌体内の活性酸素種のレベルが上昇し、それに応答して活性酸素消去系酵素群等が誘導され、ストレスに適応しているということが明らかになりつつある。申請者は S-1 株がそのカタラーゼ欠損株が生育できない 4°C での生育が可能である点に注目し、*vktA* を大腸菌 DH5α に導入してその形質転換株の生育の温度依存性を調べた。その結果、*vktA* を導入することで、DH5α の生育温度域が低温側、高温側とも拡大し、さらには低温域での生育速度が顕著に増大することを見出した。この形質転換株の低温域での生育はカタラーゼの活性阻害剤によって阻害された。更に、*vktA* の導入により、DH5α の脂肪酸組成が変化し、特にシス-バクセン酸含量が著しく増大したが、このシス-バクセン酸の増大もカタラーゼ活性阻害剤により阻害された。さらに *vktA* の導入により、DH5α のタンパク組成も変化し、少なくとも 6 種類のタンパク質が増量又は新生することがわかった。以上の結果から、高活性型のカタラーゼの発現は細胞内の過酸化水素の消去だけでなく、別種のタンパクの発現や膜脂質の脂肪酸組成に影響を与えることがわかった。

申請者は本研究を次のようにまとめている。1) S-1 株は常に大量の高活性型のカタラーゼを蓄積しており、また菌体の構造そのものは過酸化水素に脆弱であり、これらが S-1 株の過酸化水素環境下での生き残り戦略の要になっている 2) VktA の高比活性の要因は VktA の高次構造にある 3) S-1 株が大量にカタラーゼを合成し、蓄積しているのは、*vktA* が転写活性の強いプロモーターを持っていることによる 4) *vktA* の導入による DH5α の生育温度の拡大、特に低温域での生育速度の増大の原因是、膜脂質中のシス-バクセン酸含量の著しい増加による低温での細胞膜流動性の維持が可能となったことによる 5) シス-バクセン酸の増加は、*vktA* の DH5α への導入により惹起された未同定のタンパク質の関与による間接的な現象である 6) VktA カタラーゼは、単に過酸化水素を分解するという触媒能だけでなく、他のタンパク質の合成や間接的に脂肪酸代謝系に関わるという新規な機能を

持つている。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判断した。