

酵素毒性に対する酵素的防御機構とエネルギー生成系の進化

Evolution of enzymatically defensive mechanism and energy producing system

研究代表者 新潟大学工学部助教授

Assoc. Prof., Faculty of Eng., Niigata Univ.

Masayuki TANIGUCHI

谷口正之

Superoxide dismutase (SOD) is able to be induced in *Streptococcus lactis*, a homefermentative lactic acid bacterium, by hyperbaric oxygen, probably because formation of superoxide radical (O_2^-) as a substrate of SOD might be stimulated in the culture pressurized by oxygen. However, *S. lactis* cannot grow vigorously at high dissolved oxygen (DO) concentrations. Therefore, culture conditions established for inducing SOD in the bacterium are not favorable for its growth. We investigated induction conditions for SOD in *S. lactis* by using hyperbaric oxygen or adding hydrogen peroxide. Moreover, we proposed here a two-stage cultivation for efficient production of SOD in *S. lactis* was carried out by pressurization using oxygen or addition of hydrogen peroxide after achievement of high concentration cultivation by means of an anaerobic fermentation system with filtration.

The SOD content of anaerobically grown cells was 5-6 U/mg-protein. After the changes of sparging-gas to air or oxygen at normal pressure, the SOD content gradually increased with time and reached the maximum value, 7-8 mg-protein within about 2 hr. In addition, the SOD content was further enhanced with increasing the pressure of oxygen. When the culture broth was pressurized by oxygen at 6 atm, the SOD content (12 U/mg-protein) was more than twice as high as that under anaerobic conditions. However, there is little or no significant increase in SOD content by addition of catalase for detoxifying hydrogen peroxide formed and/or controlling the pH of culture broth at 6.8. The SOD in *S. lactis* was also induced by adding hydrogen peroxide to the culture broth. The induction of SOD by hyperbaric oxygen and hydrogen peroxide was possible not only at the late-logarithmic growth phase but also at the initial time for the stationary period of growth. On the basis of the results described above, for improvement of SOD productivity, we tried the induction of SOD by pressurization using hyperbaric oxygen or addition of hydrogen peroxide after high concentration cultivation in an anaerobic fermentation system with a microfiltration module.

研究目的

生命が地球上に誕生した約 38 億年前の大気は、酸素を含まない還元的大気であったと考えられている。その後、藍藻が酸素発生型の光合成系を獲得し、大気中の二酸化炭素は約 1% から 0.0003% まで大幅に減少し、逆に酸素は 0% から 21% まで増加した。この間生物のエネルギー獲得形式は、嫌氣的な代謝である醗酵から、有酸素状態での好氣的な代謝へと進化してきた。生物はこのような酸素を利用する機能を獲得することに

よって、生化学エネルギー生産効率の向上と酸化酵素や酸素添加酵素による代謝産物の多様性を確保することができ、好気性生物は地球上で有利な地位を占めてきた。しかし、各種の障害をもたらす活性酸素の生成は酸素を利用する上で不可避であるため、好気性生物は活性酸素障害に対する巧妙な防御機構を備えている。そこで、偏性嫌気性、耐性嫌気性、通性嫌気性および好気性生物に大別し、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、一重項酸素などの活性酸素に対する防

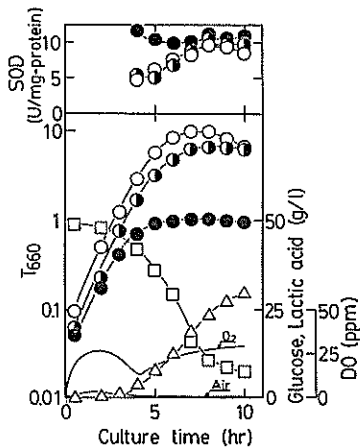


図1. 増殖に対する酸素分圧の影響。
 (□) グルコースと(△) 乳酸は窒素通気培養における結果を示す。
 T_{660} : 660 nm における濁度。(○) 窒素通気; (●) 空気通気; (●) 酸素通気。
 —: 溶存酸素濃度。

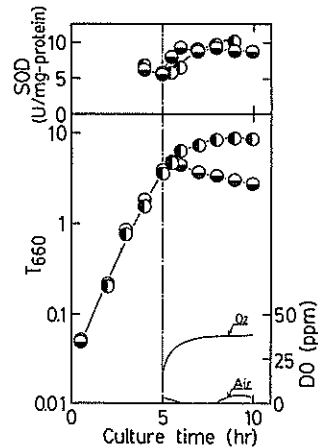


図2. 酸素による SOD の誘導。
 培養 5 時間目に窒素通気から酸素を含むガスに切り換えた。
 T_{660} : 660 nm における濁度。
 (○) 空気通気; (●) 酸素通気。
 —: 溶存酸素濃度。

御機構を比較検討し、さらに防御に関与する酵素群の性質と利用について検討することを本研究の究極の目的とした。

本研究では、第一歩として耐性嫌気性微生物の代表である乳酸菌を高圧酸素条件下および活性酸素としての過酸化水素存在下において培養し、その増殖特性と活性酸素消去酵素の一種であるスーパーオキシドジスムターゼの誘導生産について検討した。

研究経過

乳酸菌は耐性嫌気性嫌気性微生物の代表である。すなわち、嫌氣的な醗酵において ATP, NADH を獲得しているが、酸素が存在する場合には生命を維持するために代謝経路を変えてエネルギーを消費しながら酸素を除去していると考えられる。また、スーパーオキシドは Mn 型のスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) によって消去できるが、過酸化水素はカタラーゼを生産できないため除去されにくいと考えられている。本研究では、ホモ乳酸菌 *Streptococcus lactis* を用いて次の順序で検討を進めた。

1) 溶存酸素濃度による代謝経路の変化を、乳酸などの代謝産物濃度を測定することにより検討

し、細胞増殖に与える酸素の影響を検討した。

2) 酸素を含むガスを通気した培養を行い、酸素濃度と SOD 誘導量および過酸化水素生成量の関係を検討した。

3) 加圧制御型バイオリクターを新規に作製し、酸素によって 1~15 気圧まで加圧した培養を行い、pH を制御した人工的培養環境下で溶存酸素濃度と SOD 誘導量の関係を検討した。

4) SOD による O_2^- の不均化反応によって過酸化水素が生成する。この過酸化水素の SOD 活性および細胞増殖への影響を、カタラーゼの添加によって検討し、乳酸菌の酵素的活性酸素消去反応における律速段階と限界を検討した。

研究成果

1. 酸素の増殖への影響

嫌気性乳酸菌に対する酸素毒性を検討するために、先ず酸素を含むガスを通気しながら回分培養を行った。図 1 は 0.2 vvm の割合で窒素、空気または酸素を通気しながら *S. lactis* を培養した時の増殖曲線を示す。供給ガス中の酸素分圧が高くなるにつれて増殖速度および添加したグルコースに対する増殖収率がともに低下し、増殖に対する酸素毒性が確認できた。空気を通気している間、

溶存酸素濃度は培養初期を除いてほとんど零になっていった。したがって、乳酸菌はある程度酸素を消費する能力を有することがわかった。一方、無細胞抽出液中の蛋白質当たりの SOD 含量は供給ガス中の酸素分圧が高くなるにつれて増加した。

2. 酸素による SOD の誘導条件

嫌気的な培養の後、酸素を含むガスの通気または酸素を用いて加圧することによって SOD を誘

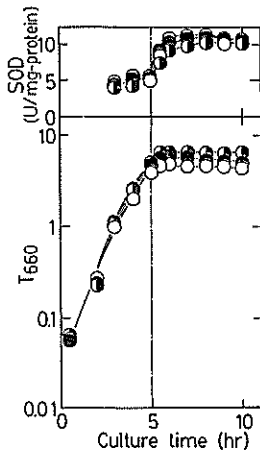


図3. 高圧酸素による SOD の誘導。
培養 5 時間目に培養液を高圧酸素によって加圧した。
 T_{660} : 660 nm における濁度。
(●) 3 atm; (○) 6 atm; (●) 12 atm.

導した時の活性変化について検討した。図 2 は窒素を通気しながら対数増殖後期（培養 5 時間目）まで培養した後、通気ガスを空気または酸素に切り換えた培養結果を示す。SOD 含量は酸素を含むガスを通気することによって 1.5 倍増加した。また、図 3 は嫌氣的に 5 時間培養した後、培養液を酸素によって加圧した結果を示す。この場合、SOD 含量は嫌氣的な培養を行っている時の約 2 倍まで増加した。しかし、圧力を 11 気圧に高めた場合の SOD 含量は 6 気圧に加圧した時に比べて減少した。次に、SOD を誘導するための条件として pH 制御の影響、カタラーゼ添加の効果および誘導時期の影響について検討した。表 1 は SOD を誘導した時の活性変化についてまとめた結果を示す。加圧した状態で pH 制御を行うと溶菌が観察され、SOD 含量は pH 制御を行わない場合に比べてむしろ低下した。カタラーゼを添加して培養液中に生成した過酸化水素を消去した場合、pH 制御の有無にかかわらず若干 SOD 含量は増加した。しかし結局、SOD 含量は 6 気圧に加圧するだけで約 11 U/mg-蛋白質まで高めることができ、さらに pH 制御を行っても、またカタラーゼを添加してもそれ以上顕著に増加しないことが判明した。また、SOD は対数増殖後期（培養 5 時間目）ばかりでなく増殖の定常期初期（培養 7 時間目）における加圧によっても同様に誘導された。

表 1. SOD 誘導条件の検討

Run No.	誘導条件			誘導後の時間 (hr)	SOD 含量 (U/mg-protein)
	加圧 (O ₂ at 6 atm)	pH 制御 (pH 6.8)	カタラーゼ添加 (100 U/ml)		
1	-	-	-	-	5.34 ^a
2	+	-	-	2	11.0
3	+	+	-	2	10.2
4	+	+	+	2	11.8
5	+	+	+	2(3) ^b	11.0(12.6) ^b
6 ^c	+	+	+	2	11.3

SOD は嫌氣的に 5 時間 (Nos. 1~5) または 7 時間 (No. 6) 培養した後それぞれの条件において誘導した。

^a嫌氣的に培養している間の平均 SOD 含量を示す。

^b誘導後 3 時間目の値を示す。

^cSOD を培養 7 時間目すなわち増殖の定常期初期に誘導した。

表 2. 添加剤による SOD の誘導

添 加 剤 化合物および金属イオン	濃 度	相 対 活 性 ^b (%)	相 対 濁 度 ^c (%)
— ^a		100	100
Methyl viologen	1 mM	109	97
	5 mM	141	92
Phenazine methosulfate	5 μM	86	106
	50 μM	85	105
5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone	20 μM	145	68
	100 μM	144	54
2-Methyl-1,4-naphthoquinone	10 μM	158	81
	100 μM	162	68
Cu ²⁺	10 μM	104	93
	100 μM	82	95
Fe ³⁺	100 μM	99	95
	500 μM	90	93
H ₂ O ₂	100 μM	144	101
	200 μM	150	105
	500 μM	155	95
	1 μM	155	84
	2 μM	86	65

^a無添加，振盪培養を 100 とした。

^b添加 5 時間目の相対活性を示す。

^c添加 5 時間目の相対濁度を示す。

SOD の誘導機構に関して，以上の実験からだけでは分子論的および定量的結論を得ることはできない。したがって，酸素供給量または消費量と酸素消費に関与する酵素活性の関係を解明するには，高圧下で正確に溶存酸素を測定することが先ず第一に必要であり，現在高圧下における溶存酸素の測定法について検討を進めている。

3. 薬剤による SOD の誘導

振盪培養を行い酸化還元物質および金属イオンによる SOD の誘導について検討した。表 2 はそれらの結果を示す。それぞれ複数の濃度について検討した結果，5 mM メチルビオロゲンと 0.1～0.5 mM 過酸化水素の添加は増殖に対してあまり影響を及ぼさず，SOD を誘導した。

4. 過酸化水素による SOD の誘導条件

表 2 の結果に基づいて酸素による加圧ばかりでなく過酸化水素による SOD の誘導について検討した。図 4 は 5 時間嫌氣的に培養した後に過酸化水素を添加して培養を継続した結果を示す。添加する過酸化水素の濃度が高くなるにつれて増殖

量は徐々に低下し，逆に SOD 含量は次第に増加した。しかし，2.0 mM になるように過酸化水素を添加した場合には，急激に濁度が低下したことから，溶菌を起こしたことがわかった。一方，SOD 含量は溶菌につれてしだいに低下した。次に，過酸化水素を添加する培養時期について検討した。図 5 は対数増殖後期（培養 5 時間目）と定常期初期（培養 7 時間目）に 1.0 mM になるように過酸化水素を添加した培養結果を示す。酸素による加圧の場合と同様に，SOD は増殖時期にかかわらずほぼ同じ程度まで誘導された。過酸化水素による活性酸素消去酵素の誘導機構に関しては他の微生物に関して若干検討されているが，詳細は不明である。今後さらに SOD 以外の活性酸素消去酵素の活性変化について検討しなければならない。

5. SOD の誘導生産

通性嫌気性（厳密には耐性嫌気性）微生物による SOD の生産は，微生物の最適生育条件と物質の醗酵生産条件が異なる代表的な例である。菌体

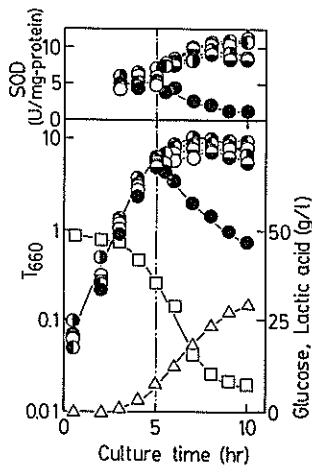


図4. 過酸化水素によるSODの誘導。
培養5時間目に過酸化水素を添加した。
(□) グルコースと(△) 乳酸は無添加の培養における結果を示す。
 T_{660} : 660 nm における濁度。
(●) 無添加; (○) 0.2 mM; (◐) 0.5 mM; (○) 1 mM; (●) 2 mM。

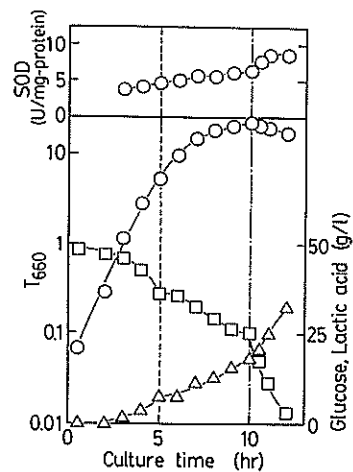


図6. 高濃度培養後のSODの誘導。
培養10時間目に過酸化水素(1 mM)を添加した。
(□) グルコース; (△) 乳酸; (○) SOD. (○) T_{660} : 660 nm における濁度。

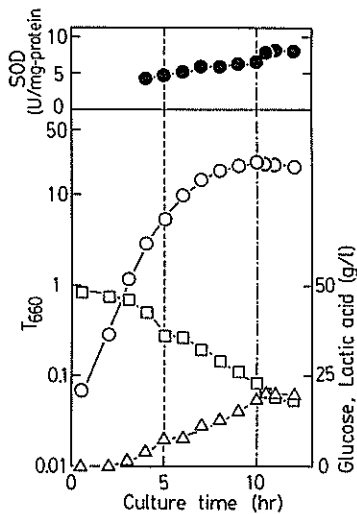


図5. 高濃度培養後のSODの誘導。
培養10時間目に培養液を高圧酸素(6 atm)によって加圧した。
(□) グルコース; (△) 乳酸; (●) SOD. (○) T_{660} : 660 nm における濁度。

内酵素であるSODの生産効率は既に報告したように菌体自体の生産性を増加すれば向上できる。SODの生産効率をさらに引き上げるためには生

育に最適な嫌気的条件下で十分に菌体を生産した後、細胞当たりのSOD含量を高めてやれば良いと考えられる。そこで、以前に提案した膜濾過型バイオリアクターを用いて生育に阻害となる代謝産物を除去し、かつ新鮮培地を供給しながら嫌気培養を行った後、酸素による加圧または過酸化水素の添加によってSODを誘導することを検討した。図5と6は嫌気的に高濃度培養を行った後それぞれ酸素による加圧または過酸化水素の添加によってSODを誘導した結果を示す。先ず嫌気的な回分培養の後、培養5時間目から膜濾過型バイオリアクターを用いて濾過培養をさらに5時間継続した。その後、培養10時間目にSODを誘導した。酸素によって加圧した場合には8.1 U/mg-蛋白質までSOD含量を高めることができたが、この値は表1において示したSOD含量(約11 U/mg-蛋白質)ほど高くない。また、過酸化水素を添加することによってSODを誘導した結果においてもSOD含量は9.2 U/mg-蛋白質であり、図3および4に示した値(約11 U/mg-蛋白質)ほど増加しなかった。しかし、膜濾過型バイオリアクターを用いて生育に阻害となる代謝産物を除去し、かつ新鮮培地を供給しながら嫌気培養を行っ

た結果、菌体濃度は回分培養の約3倍まで高めることができ、さらにSOD含量も嫌気培養時の約1.6~1.8倍まで高めることができた。したがって、生育に適した嫌気的条件下で十分に菌体を生産した後、細胞当たりのSOD含量を高めることができ、最終的にSODの生産効率を向上できた。今後の課題と発展

本研究では、耐性嫌気性微生物の代表である乳酸菌を高圧酸素条件下および活性酸素としての過酸化水素存在下において培養し、その増殖特性と活性酸素消去酵素の一種であるSODの誘導と生産について検討した。その結果、高圧酸素条件下および過酸化水素存在下においてSOD含量は嫌気培養時の2倍以上に増加することがわかった。しかし、これまでは、乳酸菌のSOD活性だけしか測定しておらず、1) NADHの関与するオキシダーゼ、パーオキシダーゼなどの酸素関連酵素の活性変化、2) NADHを生成および再生するためのエネルギー源（グルコース、ピルビン酸など）の存在の影響、3) 人工的環境（高圧酸素、スーパーオキシド生成系など）下における大腸菌、酵母などの活性酸素消去酵素の活性変化と増殖の関係、4) *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*などのカビ類の活性酸素消去酵素活性などの諸点に関して今後検討する予定である。現在、人工的環境下における乳酸菌およびカビ類のNADHオ

キシダーゼ、NADHパーオキシダーゼ、グルタチオンオキシダーゼ活性について検討している。

口頭発表

- 1) 星野一宏, 中川功夫, 伊藤丈洋, 谷口正之, 藤井 盈宏: 膜濾過型バイオリクターによる活性酸素消去酵素の効率的生産, 化学工学会第54年会講演要旨集, p. 550 (1989).
- 2) 谷口正之, 中川功夫, 伊藤丈洋, 星野一宏, 藤井 盈宏: 濾過培養によるスーパーオキシドジスムターゼの効率的生産, 日本農芸化学会1989年大会講演要旨集, p. 105 (1989).
- 3) 星野一宏, 熊倉 広, 伊藤丈洋, 谷口正之, 藤井 盈宏: 膜濾過型バイオリクターによるスーパーオキシドジスムターゼの効率的生産: 化学工学会第22会秋季大会講演要旨集, p. 161 (1989).
- 4) 星野一宏, 熊倉 広, 浦崎博幸, 谷口正之, 藤井 盈宏: 乳酸菌の高濃度培養と有用物質の効率的生産への利用, 平成元年度日本醸酵工学会講演要旨集, p. 210 (1989).

発表論文

- 1) M. Taniguchi, I. Nakagawa, K. Hoshino, T. Itoh, K. Ohno and M. Fujii: Production of superoxide dismutase from *Streptococcus lactis* by using a bioreactor with a microfiltration module. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2447-2453 (1989).
- 2) M. Taniguchi, K. Hoshino, T. Itoh, H. Kumakura and M. Fujii: Effect of hyperbaric oxygen on production of superoxide dismutase in *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, to be submitted.