酸素障害防御の立役者——嫌気性菌のNADH オキシダーゼ

樋口 允子*

嫌気性菌が分子状酸素(O_2)に曝されると、2種類のNADHオキシダーゼ(過酸化水素生成型と水生成型)を誘導的に合成する。カタラーゼやペルオキシダーゼをもたない嫌気性菌にとって過酸化水素は毒物のはずであり、過酸化水素生成型NADHオキシダーゼの機能は不明であった。近年、過酸化水素生成型NADHオキシダーゼが、サルモネラ菌や大腸菌の酸素ストレス防御酵素アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ(AhpCF)のF成分と高いホモロジーがあり、AhpC成分存在下でペルオキシダーゼ活性を有することが発見され、水生成型のみならず過酸化水素生成型オキシダーゼもまた、酸素障害防御の機能を果たすことが明らかとなった。

およそ38億年前、無酸素状態の地球上に最初の生命体が誕生した⁽¹⁾。初期の生命体は、化学進化の過程で蓄積した糖やアミノ酸を利用して増殖に必要なエネルギーを得ており、発酵型原始嫌気性菌のみの世界が続いたと考えられる。生命の起源と初期進化の過程は実証できるものではないが、近年、浅海深海熱水噴出域や海浜の硫黄坑などにのみ棲息する海洋性超好熱微生物が次々と発見され、原始生命体の初期進化の謎を解く手がかりを与える

ものとして注目されている⁽²⁾。海洋性超好熱菌は地球最古の生物で、近年の進化系統樹から始原細胞に最も近いと考えられている。これまで研究された *Thermococcus* 属菌や *Pyrococcus* 属菌は、いずれも嫌気性従属栄養古細菌で、発酵によりエネルギーを得ていることが明らかとなった。

今日、これら超好熱菌は地球上のごく限られた高温地帯にのみ棲息する嫌気性古細菌であるが、現存する真正の嫌気性細菌もまた、ヒトや動物の腸管内、反すう動物のルーメン、土壤中、特に水田や汚泥、海水や淡水の堆積物中に多く棲息しており、好気性生物の大繁栄の陰で、細々と生きてきたかに見える。酸素は嫌気性菌に対しては好気性生物に対する以上に強い毒性をもつはずであり、生き残るためには、まったく酸素のない環境に逃げ込むか、さもなければ地球大気の酸素分圧の高まりに呼応して、酸素ストレスに対して何らかの防御術を身につけたにちがいない。

NADHオキシダーゼは、生細胞に普遍的に存在するNADHを分子状酸素(O_2)で直接酸化する酵素で、嫌気性菌が O_2 に曝されると誘導的に合成される。ここでは、嫌気性菌が好気環境に適応するプロセスで進化してきたと思われる酸素耐性型嫌気性菌のNADHオキシダーゼ

NADH Oxidase as An Antioxidant Enzyme in Anaerobic Bacteria

* Masako HIGUCHI, 東北大学農学部

を中心に、酸素ストレスに対する防御という観点から解説を試みたい。

嫌気性菌はなぜ酸素感受性か

すべての好気性生物は酸素呼吸を行ない、細胞膜やミトコンドリアに局在するチトクロームオキシダーゼを介した一連の電子伝達系により NADH を酸化し、最終的には O_2 を還元して H_2O にする過程で NAD を再生している。これに対し、酸素呼吸系をもたない嫌気性菌は、NADH 生成反応を還元型代謝産物生成反応と共役させるか、または H_2 として放出することにより NAD を再生している。酸素呼吸の過程で O_2 が完全に 4 電子還元されると H_2O になるが、 O_2 の還元状態の差や生成物の副次反応により、 H_2O_2 、スーパーオキシドラジカル ($O_2^{\cdot-}$)、一重項酸素 (O^1)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) などの活性酸素が生成する。これらの活性酸素種は膜の脂肪酸を酸化して過酸化脂質をつくり出し、タンパク質を酸化し、また DNA を破壊する。

したがって、 O_2 を使うすべての生物は、酸素代謝の過程で産生する毒性物質から身を守らなければならないわけで、大腸菌では酸素障害防御酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼがあり、また酸素傷害を受けた DNA の損傷を修復する酵素としてエクソヌクレアーゼ III や recA タンパク質が知られている。これに対して、酸素呼吸を行わない嫌気性菌の多くは、ヘム合成能を欠くためチトクロームオキシダーゼやカタラーゼをもたない。また、ペルオキシダーゼや SOD を欠いているか、あっても活性が低い⁽³⁾。したがって、偏性嫌気性菌は総じて活性酸素に対して無防備の状態にあるといえる。

偏性嫌気性菌の酸素耐性と NADH オキシダーゼとのかかわり

高度に酸素感受性の偏性嫌気性菌は、自然界では、無酸素状態の特殊な環境に営々と生き続けるか、あるいは好気性生物が酸素呼吸によって O_2 を消費してくれる環境、つまり好気性菌と共生して生きるかである。共生する好気性菌によって保たれる嫌気的環境は、時には様々な要因によってバランスが崩され、常に無酸素状態にあるとはいいがたい。したがって、一時的に O_2 に曝されたとき、酸素ストレスから自己を護る術を備えていれば生存が可能となる。

カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、SOD を完全に欠く偏性嫌気性菌 *Peptostreptococcus anaerobius* は高度に酸

素感受性で、ヒトの臓器の腫瘍から得られた臨床分離株は、寒天培地上で O_2 に曝されると 1 時間以内に 90 % 以上が死滅し、この菌の懸濁液を好氣的に振とう培養した場合も、同様にすぐ死滅する⁽⁴⁾。ところが、この菌懸濁液にカタラーゼを添加しておく、4 時間好氣的に振とうした後でも菌は 100 % 生存しており、嫌氣的に反応させた懸濁菌よりも速くグルコースやビルビン酸を代謝できるという。ここで特に注目されたのは、カタラーゼ存在下で O_2 に曝したときの *P. anaerobius* の代謝は O_2 消費を伴っており、この O_2 消費が菌体内の NADH オキシダーゼによるという発見である⁽⁵⁾。

ヒツジのルーメンから分離した偏性嫌気性菌 *Selenomonas ruminantium* の生育に対する O_2 濃度の影響をケモスタット培養で調べると、かなり低い O_2 分圧 (10~15 mm Hg) で生育度は最大となり、この O_2 濃度で菌体内 NADH オキシダーゼもまた、最大活性を示した⁽⁶⁾。 O_2 分圧 10~15 mm Hg 程度の低い O_2 濃度で生育が限界であるが、この O_2 濃度下では菌体内 NADH オキシダーゼは、最大活性を維持し菌の生育を支えると考えられる。

偏性嫌気性菌における NADH オキシダーゼの存在は、*Clostridium* 属菌⁽⁷⁾ や北極海で捕獲された魚から分離した海洋性低温細菌 *Bacteroides* 属菌でも報告されているが⁽⁸⁾、ここに列挙しなかった偏性嫌気性菌の多くが NADH オキシダーゼをもつ可能性は充分にある。

これらの知見は、多くの偏性嫌気性菌が潜在的に NADH オキシダーゼ誘導能をもち、菌が O_2 に曝されたとき、低濃度の酸素 (O_2 分圧 10~15 mm Hg 以下) であれば、誘導された NADH オキシダーゼが菌体内の酸素を除去して酸素ストレスから自己防衛する可能性を示唆するものである。

耐気性嫌気性菌は高い NADH オキシダーゼ活性をもつ

Streptococcus 属菌、*Enterococcus* 属菌、*Lactococcus* 属菌などで代表されるレンサ球菌は、嫌気好気両環境下で生育が可能な通性嫌気性のグラム陽性菌で、ヘム合成能を欠き、チトクローム系をもたず、好気環境下でも発酵によってエネルギーを得ている。したがって、同じ通性嫌気性菌ではあるが、チトクロームを介した酸素呼吸系でエネルギーを得ている大腸菌やサルモネラ菌とは大きく異なっている。これらのグラム陰性菌にはカタラーゼがあり、菌体内のグルタチオンレベルも高めに保たれている。これに対して、*Streptococcus* 菌はカタラーゼを欠く上、菌体内グルタチオンの蓄積もない⁽⁹⁾。このため、レンサ球菌は通性嫌気性菌とはいえ、潜在的に酸素スト

レスの脅威に曝されている。

筆者らは、ヒトの口腔から分離した *Streptococcus mutans* グループに属する菌株を好気培養すると、①嫌気好気両環境下で大差なく生育できる典型的な耐気性菌群と、②培養の初期に生育阻害を受けるが最終的には嫌気培養菌と同程度まで生育する耐気性菌群、および③酸素により生育が著しく阻害される酸素感受性菌群の3群に分かれ、耐気性には幅があることを見いだした⁽¹⁰⁾。各好気培養菌の菌体内 NADH オキシダーゼ活性のレベルは、菌の生育度と相関し、酸素感受性菌では低く、酸素耐性菌では高いことを明らかにした。また、嫌気培養菌を O₂ に曝して好気培養すると、酸素耐性菌では菌体内 NADH オキシダーゼ活性が誘導前の約 20 倍まで増大するのに対し、酸素感受性菌では嫌気培養菌のレベルに留まることがわかった⁽¹¹⁾。

これらの知見は、通性嫌気性菌には、偏性嫌気性菌に近い酸素感受性菌から好気性菌に近い酸素耐性菌までが包含され、酸素への適応がスペクトラム的であるが、総じて NADH オキシダーゼ誘導能の高い菌は酸素耐性であることを示唆している。

耐気性ストレプトコッカス菌の NADH オキシダーゼ

1. *S. mutans* は 2 種類の NADH オキシダーゼを誘導合成する

S. mutans の酸素耐性株を好気培養し、菌の細胞抽出液をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離し、酵素活性染色を施すと、ゲル上に NADH オキシダーゼ反応を示す 2 本の活性バンドが見いだされた。再度、*S. mutans* の別の酸素耐性菌 2 株についてその存在を確認した結果、3 株ともに 2 種の NADH オキシダーゼの存在が明らかとなった。O₂ で NADH を直接酸化する NADH オキシダーゼ反応は、O₂ の還元生成物によって、1 電子還元による O₂⁻、2 電子還元による H₂O₂、そして

4 電子還元による H₂O の 3 種類が考えられる (図 1 の反応式 1, 2, 3)。しかし、O₂⁻ は非酵素的に H₂O₂ へ変換されるから、実際には、式 (1) と (2) は区別できない。したがって、この 2 本の活性バンドは、過酸化水素生成型と水生成型の 2 種類の酵素に対応すると考えられるが、2 種類の水生成型酵素である可能性もある。酸素耐性菌が誘導合成する NADH オキシダーゼが、酸素ストレスから自己を防御するとすれば、むしろ、無害の水を生成する酵素であるほうが理にかなっている。

そこで、好気培養菌の細胞抽出液中の NADH オキシダーゼ作用で生じる NADH 酸化反応の生成物中に、H₂O₂ が検出されるか否かを検討した。NADH の酸化に伴った O₂ 濃度の低下をモニターし、反応が完全に停止した時点でカタラーゼを添加したところ、予期に反して新たな O₂ の生成を観察した。この結果は、カタラーゼによって分解される H₂O₂ がこのオキシダーゼ反応生成物中に存在したことを示し、2 本の活性バンドのいずれかが過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼであるとの確証が得られた⁽¹¹⁾。

2. 2 種類の NADH オキシダーゼは酵素化学的にも免疫学的にも異なる

高い誘導活性をもつ *S. mutans* 酸素耐性株の好気培養菌から 2 種類の酵素を SDS-PAGE 上で単一バンドになるまで純化し、各精製酵素が確かに過酸化水素生成型酵素と水生成型酵素であることが、NADH の酸化過程で生成する H₂O₂ の有無により同定された。両酵素とも NADH ペルオキシダーゼ活性をもたず、また NADH の酸化過程で O₂⁻ を生成しないことが判明した。両酵素はいずれもフラビン酵素で、単量体当たり 1 分子の FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を含み、過酸化水素生成型酵素が分子量 56,000 の単量体 4 個から成る 4 量体であるのに対して、水生成型酵素は分子量 50,000 の単量体であった。興味あることに、反応系に

NADH オキシダーゼ	(1) NADH + 2O ₂	→ NAD ⁺ + H ⁺ + 2O ₂ ⁻
NADH オキシダーゼ	(2) NADH + H ⁺ + O ₂	→ NAD ⁺ + H ₂ O ₂
NADH オキシダーゼ	(3) 2NADH + 2H ⁺ + O ₂	→ 2NAD ⁺ + 2H ₂ O
NADH ペルオキシダーゼ	(4) NADH + H ⁺ + HOOH	→ NAD ⁺ + 2H ₂ O
アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ	(5) NAD(p)H + H ⁺ + HOOH	→ NAD(P) ⁺ + 2H ₂ O
グルタチオンレダクターゼ	(6) NADPH + H ⁺ + GSSG	→ NADP ⁺ + 2GSH
チオレドキシンレダクターゼ	(7) NADPH + H ⁺ + Pro(S-S)	→ NADP ⁺ + Pro(SH) ₂

図 1 ■ NADH オキシダーゼ反応の種類とフラビン結合性ペルオキシダーゼおよびジスルフィドレダクターゼによる反応
Pro (S-S) はタンパク質の S-S 基を、(SH)₂ はその還元型を示す。

表 1 ■ 嫌気性菌から単離精製された NADH オキシダーゼの比較

菌種	O ₂ 還元 生成物	単量体		FAD	等電点 pI	至適 pH	基質特異性	K _m (μM)	FAD 依存性
		分子量	数						
<i>Streptococcus mutans</i>	H ₂ O ₂	56,000	4	1	6.6	6.0	NADH	50	あり
<i>Amphibacillus xylanus</i>	H ₂ O ₂	56,000	4	1	ND	ND	NADH	20	あり
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	H ₂ O ₂	75,000~ 78,000	6	1 +Fe ₂ S ₂	ND	ND	NADH	20	あり
<i>Streptococcus mutans</i>	H ₂ O	50,000	1	1	4.8	7.2	NADH	25	なし
<i>Enterococcus faecalis</i>	H ₂ O	51,000	1 2	1 1	5.2 4.9	6.8	NADH	40	あり
<i>Serpulina hyodysenteriae</i>	H ₂ O	48,000	1	1	5.2~ 7.0	5.5	NADH	10	なし
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	H ₂ O	53,000	2	1	4.0	6.5	NADH	120	なし

FAD を添加すると、添加濃度に伴って過酸化水素生成型酵素の NADH 酸化活性が増大したが、水生成型酵素の活性にはまったく影響がなかった。両酵素とも NADH にきわめて高い特異性をもつが、NADH に対する K_m 値、両酵素の作用至適 pH、等電点などが異なっている (表 1)。これらの結果は、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼと水生成型 NADH オキシダーゼとは酵素化学的に異なった酵素であることを意味する。精製した両型酵素をそれぞれ家兎に免疫して得た抗血清は、相当する酵素とは反応したが、抗原としなかった酵素との交叉反応は示さなかったことより、免疫学的にも異なることが判明した⁽¹²⁾。

これまでに、嫌気性菌の NADH オキシダーゼは、好熱性の偏性嫌気性菌 *Thermoanaerobium brockii* と通性嫌気性菌 *Amphibacillus xylanus* から過酸化水素生成型酵素が、また乳酸菌 *Enterococcus faecalis* と *Leuconostoc mesenteroides*、通性嫌気性のラセン菌 *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* から水生成型酵素が、それぞれ単離精製されているが^(12,13)、*S. mutans* で発見されたように、水生成型、過酸化水素生成型両型酵素をもつ菌は知られていない。表 1 から、これまでに単離精製された嫌気性菌の NADH オキシダーゼは、いずれも NADH に特異的な酵素で、最適 pH や K_m が多少異なるが、単量体当たり 1 個か 2 個の FAD を含有するフラビンタンパク質であること、また、好熱菌 *T. brockii* は単量体の分子量が他のものより大きく、単量体当たり 2 個の FAD と [Fe₂S₂] を含有する特殊な酵素であることがわかる。

3. 2 種類の NADH オキシダーゼは *S. mutans* 以外のレンサ球菌にも存在する

S. mutans と同じレンサ球菌である *E. faecalis* からは、水生成型酵素のみが精製されているが、はたしてこ

の菌には過酸化水素生成型酵素が存在しないのであろうか。また *S. mutans* 以外のレンサ球菌にも水生成型、過酸化水素生成型両酵素をもつ菌がいるのであろうか。

これらの疑問を解くために、*E. faecalis* を含む *Streptococcus* 属菌、*Enterococcus* 属菌、*Lactococcus* 属菌などの各種レンサ球菌 9 菌株を選び、これらの好気培養菌の細胞抽出液中に含まれる過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼ活性の有無を、NADH の酸化により生成する H₂O₂ の有無をカタラーゼ添加による O₂ 生成を酸素モニター法で調べ、さらに PAGE で分離した酵素活性バンドを両型酵素の抗血清との反応性により検出した。この結果、*E. faecalis* を含む 3 株では、存在が明白に認められたのは、水生成型 NADH オキシダーゼのみで、過酸化水素生成型酵素は検出できなかったが、6 株 (*S. milleri*, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. thermophilus*, *E. casseliflavus* および *L. lactis*) の細胞抽出液中には、水生成型と過酸化水素生成型両型酵素の存在を確認することができた (未発表)。

4. 両酵素の遺伝子解析と一次構造の比較

過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼと水生成型 NADH オキシダーゼとは、酵素化学的にも免疫学的にも異なるとすれば、両酵素の遺伝子はどうか異なるのであろうか。また、両酵素遺伝子の発現はどう連動しているのであろうか。

S. mutans のゲノム DNA からクローン化した両酵素遺伝子を含む DNA 断片の塩基配列を解析した結果、*S. mutans* の過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼ遺伝子 (*nox-1*) は 1,530 bp から成り、510 個のアミノ酸をコードし、分子量は 55,200 と算出され、また水生成型 NADH オキシダーゼ遺伝子 (*nox-2*) は 1,371 bp から成り、457 個のアミノ酸をコードし、分子量は 49,900 と算出された。遺伝子から算出された分子量は、先に SDS-

図 2 ■ NADH オキシダーゼの進化系統樹

PAGE で求めた分子量と両酵素ともきわめてよく一致していた。nox-2 の上流および下流には未同定の遺伝子の存在が明らかとなり、nox-1 と nox-2 両遺伝子は *S. mutans* の染色体 DNA 上に並んでいないことが判明した。

両酵素のアミノ酸配列のホモロジーは 20 % 以下であり、両酵素が遺伝子レベルでも異なることが証明された^(14,15)。*S. mutans nox-1* 遺伝子から翻訳されたアミノ酸配列と *A. xylophilus* の NADH オキシダーゼとの相同性は 58.5 % であったが、好熱菌の *T. Brockii* とは、NADH 結合部位に相当する 30 アミノ酸残基に対して 50 % のホモロジーを示し、他はまったく異なるものであった。最近入手した *Streptococcus pyogenes* の NADH オキシダーゼ全塩基配列情報（オクラホマ大学レンサ球菌ゲノム解析プロジェクト）から、そのアミノ酸配列と *S. mutans* の過酸化水素生成型酵素の配列を比較したところ、両者は 75.6 % ときわめて高いホモロジーを示した。*S. mutans nox-2* 遺伝子から翻訳されたアミノ酸配列は *E. coli*⁽¹⁶⁾ とは 40.8 %、*S. typhimuriae*⁽¹⁷⁾ とは 46.3 % のホモロジーであった。これらのホモロジー検索の結果から、図 2 の進化系統樹が得られた。この結果は、過酸化水素生成型酵素と水生成型酵素とはまったく別々に進化してきたものであることを示唆する。

過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼはアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼとして機能する

ここで、嫌気性菌の酸素耐性の問題に立ち返ろう。確かに、*S. mutans* の酸素耐性株の水生成型 NADH オキシダーゼは、細胞内の O_2 を消費して還元状態を保持し、酸素ストレス防御に寄与する。しかし、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼの細胞内濃度が水生成型酵素の 10 分の 1 であったとしても、カタラーゼやペルオキシダーゼをもたない菌にとって、 H_2O_2 を生成する NADH

オキシダーゼは、酸素障害に荷担しこそすれ酸素障害防御にかかわるとは考えられない。この矛盾を説明するために、好気代謝の過程で蓄積するピルビン酸が非酵素的に H_2O_2 を分解して H_2O にする可能性を考えたが、真の機能は不明であった。

ところが近年、この過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼが、サルモネラ菌や大腸菌の酸素ストレス防御酵素アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼ（AhpCF：AhpC と AhpF の 2 成分系）の AhpF と高いホモロジーがあり、また nox-1 遺伝子の上流に AhpC と高いホモロジーのある遺伝子の一部が存在することが明らかとなった⁽¹⁸⁾。AhpCF は、各種アルキルヒドロペルオキシド類を対応するアルコール類に変える酵素で、 H_2O_2 を基質にしたとき H_2O に変える。サルモネラ菌の精製酵素は分子量 22,000 の非フラビンタンパク（AhpC）成分と、FAD を含む分子量 57,000（AhpF）成分の 2 成分からなるもので、その反応は、AhpC が基質である過酸化物を還元し、続いて AhpF が NADH を酸化すると同時に AhpC を再還元すると考えられている⁽¹⁹⁾。そこで、*S. mutans nox-1* の上流にある遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定してサルモネラ菌の AhpC との類似性を明らかにするとともに、この遺伝子産物が過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼと共働してペルオキシダーゼ活性を示すか否かを検討した。

1. *S. mutans* の AhpC 遺伝子のクローニングと一次構造の決定

S. mutans nox-1 の上流にある遺伝子をクローニングし塩基配列を解析した結果、nox-1 遺伝子のすぐ上流に 558 bp からなる *S. mutans* の AhpC 構造遺伝子の存在を確認した。また、翻訳されたアミノ酸配列は、サルモネラ菌の AhpC と 61.1 %、大腸菌のものと 60.2 % のホモロジーを示した。*S. mutans* の AhpC 様タンパクは 186 個のアミノ酸残基からなり、その分子量はサルモネラ菌の AhpC よりやや小さく、20,460 であった。*S.*

mutans の *AhpC* 構造遺伝子上流にはプロモーター配列と SD 配列が存在し、下流は停止コドン (TAA) の後に、9 塩基をおいて、すぐに *nox-1* 構造遺伝子が続くことから、両タンパク質は *AhpC* 構造遺伝子上流のプロモーターを使って一気に読まれ、発現するものと考えられる。

2. 過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼは *AhpC* 存在下で H_2O をつくる

S. mutans の *AhpC* 遺伝子を発現ベクターに組み込み、大腸菌内で大量に発現させ、これを疎水カラムクロマトにより精製して、*AhpC* 機能の解析を行なった。過

酸化水素生成型 NADH オキシダーゼによる NADH 酸化反応で生成する H_2O_2 は、カタラーゼ添加後の O_2 生成をモニターすることにより、その存在が確かめられたが、この反応を *S. mutans* の精製 *AhpC* 共存下で行なうと、カタラーゼ添加後の O_2 生成はまったくみられず、 H_2O_2 を生成しないことが判明した(図 3)⁽²⁰⁾。この結果は、*S. mutans* の *AhpC* と *S. mutans* の過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼが、サルモネラ菌のアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼと同様に、NADH ペルオキシダーゼ反応を行ない、 O_2 を H_2O に還元することに確証を与えるものである。

過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼは、単独では

図 3 ■ 過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼは *AhpC* 存在下では水を生成する

図 4 ■ *Nox-1* が *AhpC* と共働して示す NADH ペルオキシダーゼ反応のモデル

H₂O₂ を生成するオキシダーゼであるが、AhpC との共存下でペルオキシダーゼ反応を示すことは、*A. xylanus* の NADH オキシダーゼでも明らかにされている⁽²¹⁾。*A. xylanus* の AhpC 遺伝子も、その上流を含めた全構造遺伝子は不明であるが、*S. mutans* の AhpC 遺伝子と同様、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼの構造遺伝子のすぐ上流にあり、両者がセットで発現制御を受けている可能性が強い⁽¹⁹⁾。

過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼが AhpC と共働して示すペルオキシダーゼ反応機構の詳細は今後の研究を待たねばならないが、大まかな反応スキームは図 4 のように考えられている⁽¹⁹⁾。

過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼが AhpC 共存下で示すペルオキシダーゼ反応は既知の NADH ペルオキシダーゼによるものとう違うか

1. 水生成型 NADH オキシダーゼと NADH ペルオキシダーゼとの類似性

結論的には、*S. mutans* の 2 種類の NADH オキシダーゼのうち、水生成型酵素のほうが真の NADH オキシダーゼということになる。同じ *Streptococcus* 属菌である *E. faecalis* は、酸素ストレス防御酵素として本来の NADH オキシダーゼを備えているが、過酸化水素生成型酵素と AhpC によるペルオキシダーゼ系はないらしい。その代わり NADH ペルオキシダーゼ (図 1 の反応式 4) をもっている。*E. faecalis* NADH ペルオキシダーゼは、分子量 50,000 の単量体当たり 1 個の FAD を含み、安定なホモ 4 量体をとるフラビン酵素であるが、そのアミノ酸配列を *E. faecalis* NADH オキシダーゼと比較すると 44 % のホモロジーがあり、両者は構造的に類似した酵素である⁽²²⁾。また、反応機構も類似し、両者とも堅く結合した FAD のほかに、非フラビン型の酸化還元活性部位をもっている。*E. faecalis* の NADH オキシダーゼの反応は、まず NADH が酵素に結合したフラビンを還元し、還元型フラビンが O₂ を還元して H₂O₂ とし、次いでシステインのチオールがこの H₂O₂ を H₂O に還元することによって、O₂ の H₂O への 4 電子還元を 1 分子上で達成すると考えられている⁽²³⁾。このオキシダーゼ反応にかかわるシステインスルフェン酸は、*E. faecalis* の NADH ペルオキシダーゼ分子中に存在することが、酵素の結晶解析により明らかにされている⁽²⁴⁾。現在、*E. faecalis* の NADH オキシダーゼとともに、*S. mutans* の水生成型酵素の結晶解析による構造研究が進行中であり、反応機構の詳細は今後に期待される。

2. 過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼと NADH ペルオキシダーゼとの相違

一方、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼと O₂ との反応は、酵素に結合した還元型フラビンが O₂ を還元して H₂O₂ にするもので、そこには *E. faecalis* の NADH オキシダーゼや NADH ペルオキシダーゼにみられる過酸化物分解の活性中心はない⁽²⁵⁾。過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼは、むしろ H₂O₂ や様々な過酸化物の還元反応を触媒する AhpC タンパク質を還元する酵素で、ジスルフィドレダクターゼ活性をもつフラビントタンパク質として機能する⁽²⁵⁾。

3. NADH 依存性 FAD 結合型フラビン酵素の構造類似性の比較

最後に、酸素ストレスにかかわる NADH オキシダーゼとその関連酵素の活性部位のアミノ酸配列を比較し、水生成型 NADH オキシダーゼと過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼとの相違と類似性を明らかにしておきたい。図 5 に、2 つの FAD 結合部位と NADH 結合部位、そして酸化還元反応の活性中心となるシステインを含むアミノ酸配列を示す。いずれの酵素も、FAD 結合部位と NADH 結合部位のアミノ酸配列はよく保存されているが、酸化還元活性中心となるシステインの位置は、水生成型 NADH オキシダーゼや NADH ペルオキシダーゼのグループと、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼやサルモネラ菌の AhpF グループとで大きく異なることがわかる。これらを代表的なジスルフィドレダクターゼと比較すると、前者のグループの酸化還元活性中心となるシステインの位置は、大腸菌のグルタチオンレダクターゼ (図 1 の式 6) の配列⁽²⁶⁾ に類似し、後者のグループは大腸菌のチオレドキシンレダクターゼ配列⁽²⁷⁾ に類似した。

これらの結果は、水生成型 NADH オキシダーゼの遺伝子が、大腸菌ではグルタチオンレダクターゼとなって現われ、過酸化水素生成型 NADH オキシダーゼの遺伝子は、アルキルヒドロペルオキシドレダクターゼやチオレドキシンレダクターゼの中に受け継がれていることを示している。

*

最近の *Science* 誌に、水深 2,600 メートルの海底から分離した超好熱性古細菌 *Methanococcus jannaschii* の全ゲノム解析データが公表された⁽²⁸⁾。意外なことに、NADH オキシダーゼ遺伝子や AhpC 遺伝子とその偏性嫌気性古細菌のゲノム中に存在することが判明した。こ

タンパク質	アミノ酸配列	位置
N末端領域 [FAD結合部位 I]		
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	K I V I V G A N H A G T A A I	3—19
水型NADHオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	K V V V V G C T H A G T S A V	2—18
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. hyodysenteriae</i>)	K V I V I G C N H A G T W A A	2—18
NADHペルオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	K V I V L G S S H G G Y E A V	2—18
グルタチオンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	D Y I A I G G G S G G I A S I	6—22
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	D V L V I G G G P A G N S A A	210—226
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. pyogenes</i>)	D V L V I G G G P A G N S A A	210—226
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>A. xylophilus</i>)	D V L V I G G G P A G A S S A	210—226
AHP-F (<i>S. typhimurium</i>)	T V L I V G S G P A G A A A A	222—238
チオレドキシニンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	K L L I L G S G P A G Y T A A	8—24
酸化還元活性中心部位		
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	N I S F L G C G	38—45
水型NADHオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	N I S F L S C G	36—43
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. hyodysenteriae</i>)	N I S F L A C G	36—43
NADHペルオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	F I S F L S C G	36—43
グルタチオンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	T C V N V G C V	41—48
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	Y C P H C D G P	336—343
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. pyogenes</i>)	Y C P H C D G P	336—343
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>A. xylophilus</i>)	Y C T H C D A P	335—342
AHP-F (<i>S. typhimurium</i>)	Y C P H C D G P	356—362
チオレドキシニンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	A C A T C D G F	139—146
中間領域 [NAD(P)H]		
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	R I A V V G A G Y I G V E L	164—177
水型NADHオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	R V V V V G G G Y I G I E L	149—162
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. hyodysenteriae</i>)	K V M V V G A G Y I G V E L	159—172
NADHペルオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	N V V V I G S G Y I G I W A	151—164
グルタチオンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	R V A V V G A G Y I A V E L	175—188
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	K V A V I G G G N S G L E A	349—362
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. pyogenes</i>)	K V A V I G G G N S G L E A	349—362
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>A. xylophilus</i>)	H V A V V G G G N S G I E S	349—362
AHP-F (<i>S. typhimurium</i>)	R V A V I G G G N T F T A V	369—382
チオレドキシニンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	K V A V I G G G N T F T A V	152—165
C末端領域 [FAD結合部位 II]		
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	F L V D K K Q E T S I P D V Y A I G D	276—294
水型NADHオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	I E V N E Y M Q T S N P D I F A A G D	263—281
水型NADHオキシダーゼ (<i>S. hyodysenteriae</i>)	I V V D T T M K T T K P D V F A I G D	271—299
NADHペルオキシダーゼ (<i>E. faecalis</i>)	I K T D E Y M R T S E P D V F A V G D	263—281
グルタチオンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	I V V D K Y Q N T N I E G I Y A V G D	285—313
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. mutans</i>)	I I V A K D G A T N I P A I F A A G D	462—480
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>S. pyogenes</i>)	I I V D K H G S T N I P G I F A A G D	462—480
過酸化水素型NADHオキシダーゼ (<i>A. xylophilus</i>)	I V I D K K G Q T S V P G I F A A G D	461—479
AHP-F (<i>S. typhimurium</i>)	I I I D A K C E T S V K G V F A A G D	486—504
チオレドキシニンレダクターゼ (<i>E. coli</i>)	H F T G N A T Q T S I P G V F A A G D	279—297

図 5 ■ FAD, NADH 各結合部位および酸化還元活性中心部位のアミノ酸配列の比較

水型：水生成型，過酸化水素型：過酸化水素生成型

これらの各遺伝子から翻訳されたアミノ酸配列は，*S. mutans* の水生成型 NADH オキシダーゼおよび *S. mutans* の AhpC のいずれに対しても 30 % 近いホモロジーを示した。地球上で最古の生物といわれる超好熱菌

のゲノム中に存在するこれらの遺伝子が何か特別の機能を果たしているのか、その機能は不明であるが、太古の原始生命体が様々な塩基配列を試行錯誤で組み合わせて今日の遺伝子のプロトタイプをつくり上げ、それらが環境に適応しながら新しい機能をもった遺伝子として進化し、引き継がれてきたとも考えられる。酸素ストレス防御にかかわる NADH オキシダーゼも太古から脈々と受け継がれた遺伝子の末裔なのである。

謝辞：多くの助言をいただき、図4の反応スキームの原図を提供してくださったウエイクフォレスト大学 L.B. Poole, *S. pyogenes* の NADH オキシダーゼ全塩基配列情報をいただいたオクラホマ大学のレンサ球菌ゲノム解析プロジェクト (USPHS/NIH 研究助成金による) チーム B.A. Reo, S. Clifton, M. McShan および J. Ferretti, また原稿を御校閲いただき、有益な御助言を賜りました神尾好是教授と山中健生教授に深く感謝いたします。

文献

- 堀 寛：“RNA の世界”，クバプロ，1995，p.178.
- 小林哲夫：化学と生物，**33**，795 (1995).
- J.G. Morris：*Adv. Microbiol. Physiol.*，**12**，169 (1975).
- F. Frolander & C. Carlsson：*J. Clin. Microbiol.*，**6**，117 (1997).
- E. Hoshino, F. Frolander & J. Carlsson：*J. Gen. Microbiol.*，**107**，235 (1978).
- O.A. Samah & J.W.T. Wimpenny：*J. Gen. Microbiol.*，**128**，355 (1982).
- K. Maeda, K. Truscott & R.K. Scopes：*Biochem. J.*，**284**，551 (1992).
- G. Bentzen & H. Larsen：*Arch. Microbiol.*，**151**，95 (1989).
- R.C. Fahey：*Adv. Exp. Med. Biol.*，**86A**，1 (1977).
- M. Higuchi：*J. Gen. Microbiol.*，**130**，1819 (1984).
- M. Higuchi：*Oral Microbiol. Immun.*，**7**，309 (1992).
- M. Higuchi, M. Shimada, Y. Yamamoto, T. Hayashi, T. Koga & Y. Kamio：*J. Gen. Microbiol.*，**139**，2343 (1993).
- T.B. Stanton & N.S. Jensen：*J. Bacteriol.*，**175**，2980 (1993).
- M. Higuchi, M. Shimada, J. Matsumoto, Y. Yamamoto, A. Rahman & Y. Kamio：*Biosci. Biotech. Biochem.*，**58**，1603 (1984).
- J. Matsumoto, M. Higuchi, M. Shimada, Y. Yamamoto & Y. Kamio：*Biosci. Biotech. Biochem.*，**60**，39 (1996).
- R.P. Ross & A. Claiborne：*J. Mol. Biol.*，**227**，658 (1992).
- T.B. Stanton, R. Sellwood & N.S. Jensen：U1961 (accession No. by GenBank).
- H.Z. Chae, K. Robison, L.B. Poole, G. Church, G. Storz & S.G. Rhee：*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，**91**，7017 (1994).
- L.B. Poole：*Biochemistry*，**35**，65 (1996).
- L.B. Poole, M. Shimada & M. Higuchi：“Flavins and Flavoproteins”，Proceedings of the 12th Intern. Symp., Walter de Gruyter, Berlin, 1997, in press.
- Y. Niimura, L.B. Poole & V. Massey：*J. Biol. Chem.*，**270**，25645 (1995).
- S.A. Ahmed & A. Claiborne：*J. Biol. Chem.*，**264**，19856 (1989).
- R.P. Ross & A. Claiborne：*J. Mol. Biol.*，**227**，658 (1992).
- T. Stehle, S.A. Ahmed, A. Claiborne & G.E. Schulz：*J. Mol. Biol.*，**221**，1325 (1991).
- L.B. Poole：私信.
- S. Greer & R.N. Perham：*Biochemistry*，**25**，2736 (1986).
- M. Russel & P. Model：*J. Biol. Chem.*，**263**，9015 (1988).
- C.G. Bult, O. White, G.J. Olsen, L. Zhou, J.C. Venter *et al.*：*Science*，**273**，1058 (1996).

プロフィール

安保 徹 (Toru Abo) 昭和22年10月9日生<略歴>昭和47年東北大学医学部卒業/同年青森県立中央病院内科研修/49年東北大学歯学部助手/平成3年新潟大学医学部医動物学教室教授，現在にいたる<研究テーマと抱負>1990年に胸腺外分化T細胞を発見し，この細胞の生物学的意義を研究．また，白血球の自律神経支配についての研究にも力を入れている<趣味>囲碁5段(研究が進まなくなるたびに熱中し，少しずつ強くなってしまう)

相垣 敏郎 (Toshiro Aigaki) 昭和31年1月2日生<略歴>昭和56年東京都立大学大学院理学研究科生物学専攻博士課程中退/同年(財)東京都老人総合研究

所生物学部助手/62年スイス・チューリッヒ大学動物学研究所博士研究員/平成元年(財)東京都老人総合研究所実験生物学部門研究員/3年米国ブランダイス大学生物学部客員研究員/5年東京都立大学講師/6年同助教授，現在にいたる<研究テーマと抱負>行動のしくみを分子レベルで解明すること．そのために日々新しい突然変異体を探している<趣味>スポーツいろいろ(ラグビー観戦，テニスなど)，おいしいワインを飲むこと

植野 正也 (Masaya Ueno) 昭和41年12月8日生<略歴>平成3年神戸大学医学部医学科卒業/同年京都大学附属病院外科研修/4年公立甲賀病院外科勤務/8年京都大学大学院医学研究科消化

器外科勤務，現在にいたる<研究テーマと抱負>チオレドキシシン TRX/ADF による癌細胞における p53 のレドックス制御<趣味>スキー，水泳

沖野 龍文 (Tatsufumi Okino) 昭和39年10月19日生<略歴>昭和63年東京大学農学部水産学科卒業/平成5年同大学大学院農学系研究科博士課程修了後，新技術事業団伏谷着生機構プロジェクト研究員/7年宇都宮大学農学部講師/9年同助教授，現在にいたる<研究テーマと抱負>ラン藻の生物活性物質，特殊な環境のものを調べたい<趣味>スキューバダイビング，スキー