

〔報 文〕

## シイタケ子実体のスーパーオキシドジスムターゼの 精製と諸性質

不破眞佐子・池田啓一・川崎広明・山倉文幸  
高ひかり・峯木礼子・藤村 務・松本 孝

Purification and Some Properties of Superoxide Dismutase from  
Pilei of *Lentinus edodes* Fruiting Bodies

Masako FUWA, Keiichi IKEDA, Hiroaki KAWASAKI,  
Fumiyuki YAMAKURA, Hikari TAKA, Reiko MINEKI,  
Tsutomu FUJIMURA and Takashi MATSUMOTO

Crude extract of *Lentinus edodes* (*L. edodes*) contained more than three kinds of superoxide dismutases (SODs) which were distinguished electrophoretically. All of these were found to be insensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and cyanide. A centrifugal study of the crude extract in 0.25 M sucrose solution revealed that most of the SOD activities are located in the cytoplasmic fraction.

We purified one of these superoxide dismutases from pilei of *L. edodes* to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, DE-32 ion-exchange, Sephadex G-100 gel filtration and Butyl-toyopearl hydrophobic chromatographies. The purified enzyme showed that a single protein band coincided with the single SOD activity band in native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The purified SOD showed a single band in PAGE in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and its subunit molecular weight was estimated to 23 ± 0.5 kDa. The subunit molecular weight of SOD was also estimated by LC-MS analysis to be 22,184 Da. Using the sedimentation equilibrium centrifugation method the molecular mass of native SOD was estimated to be 84,240 Da. These observations suggest that the enzyme is a tetramer composed of subunits of equal size. Metal analysis of the native enzymes revealed 0.64 g-atoms Mn per mole subunit in the preparations whose specific activity were 3500 U/mg. Direct analysis of N-terminal amino acid of this enzyme by Edman degradation using a protein sequencer cannot detect any amino acid residue, but amino acid residue of N-terminal appeared as serine residue after the treatment of the enzyme with tetrafluoroacetic acid in a vapor phase at 60°C for 10 min. Therefore, the N-terminal amino acid was modified with acetyl group. The modification of N-terminal amino acid is the first example of Mn-SOD. Some of other physiological and biochemical properties of the enzyme were also investigated.

*Key words:* *Lentinus edodes* SOD (シイタケの SOD), purification (精製), modification of N-terminal amino acid (N末端アミノ酸の修飾)

## 緒 言

真核生物は、動物界、植物界、菌界そして原生生物界に大別され、菌界は更に担子菌類、子囊菌類、接合菌類等に分類される。これらの真核細胞には異化作用に酸素を利用するミトコンドリアが存在し、酸素の毒性消去に関する様々な生体システムが備わっている。生物が外部から摂取する低分子量の食物由来抗酸化物質のほか、生物体内で生合成されるグルタチオンなどの低分子と、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ, ペルオキシダーゼなどの酵素もその防御機構の重要な一つとして働いている。SOD はスーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素に不均化する反応を触媒する酸化還元酵素で、活性中心の補因子の含有金属の違いにより、これまでに Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD と Ni-SOD の 4 種類が知られている。主に Cu,Zn-SOD は真核生物の細胞質, Mn-SOD は真核生物のミトコンドリアと細菌, Fe-SOD は細菌と植物, Ni-SOD は原核生物に分布している。好気的環境下にいる生物には複数の SOD 酵素が存在しているものも多数知られており、例えばヒトには 3 種類の SOD アイソザイム (SOD1, SOD2, SOD3) が知られている。SOD1 は細胞質に存在する Cu,Zn-SOD, SOD2 はミトコンドリアに存在する Mn-SOD, SOD3 は細胞外に存在する Cu,Zn-SOD である。

このように SOD は広範な生物に普遍的に存在する酵素であるため、生物の分類学的、進化論的観点から注目され、これまで数多くの生物から SOD が分離精製され比較検討された<sup>1)</sup>。近年は SOD の 1 次構造に関してはゲノム解析からの情報収集がなされるようになった。子実体を形成する担子菌類の SOD の中で、直接酵素を精製しタンパク質化学的に分析している例はヒラタケ属の *Pleurotus olearius*<sup>2)</sup> とマンネンタケ属の *Ganoderma microsporum*<sup>3)</sup> などである。菌糸から直接分離精製され、いずれも Mn-SOD で約 20 kD の subunit の 4 量体であることが報告されている。また子囊菌門の *Humicola lutea*<sup>4)</sup> や、子実体を作らない担子菌門の *Phanerochaete chrysosporium*<sup>5)</sup> でも SOD が分離精製され

ている。しかし、動物界や植物界に属する生物の SOD に比べ、菌界の SOD に関するタンパク質化学的報告は少ない。

シイタケ (*Lentinus edodes*) は担子菌類に属するキノコで、日本をはじめ広く東アジアで食用や薬用に古くから供され、近年はその生理的機能性について注目されているが、シイタケの SOD を分離精製し、その酵素学的検討をした報告はない。本報告では、シイタケから SOD を精製しその性質を調べる中で、新規に本酵素の N 末端アミノ酸が化学修飾されていることを見出したので、酵素の精製法、諸性質と共に酵素の N 末端アミノ酸について報告する。

## 実験方法

### 試薬

キササンチンオキシダーゼ (バターミルク製) とシトクローム *c* (ウマ心臓) は和光純薬工業 (株) 製, DE-32 は Whatman Japan (株) 製, Sephadex G-100, プロテイン分子量マーカー (LMW) は LKB-Pharmacia (株) (現 GE Healthcare Bio-Sciences (株)) 製, Butyl-toyopearl 650s は東ソー (株) 製, その他の試薬は全て市販の特級品を用いた。

### 試料

シイタケは明治製菓 (株) (現 株式会社 明治) および森産業 (株) で培養・収穫した JMS 5K-16 (登録品種) を使用した。

### SOD 粗酵素液の調製

シイタケから柄 (軸) の部分を除き、傘 (笠) の部分のみを  $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結した。凍結した傘の部分 5 mm 画に裁断し、その重量 (2,782 g) と 1,400 g の海砂および 3,000 mL の 1 mM EDTA, 0.1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF), 1 mM ヨードアセトアミドを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) (以下緩衝液 A) と共に自動乳鉢を用いて 1 時間磨砕した。磨砕後、静置し得られる上澄みを  $12,000\times g$  で 30 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離し上澄液を回収した。このとき得られる沈殿は静

置し上澄みを除いた沈殿に添加し、再度、1,400 g の海砂と 3,000 mL の緩衝液 A を加え、自動乳鉢で更に 1 時間磨砕した。磨砕終了後、遠心分離により上澄液を回収し、先に回収した上澄液と合わせたものを、シイタケの粗酵素液とした。

### SOD の精製

SOD の精製における以下に記述した全ての方法は極力 4°C 以下で実施した。攪拌している粗酵素液に 40% 飽和になるよう磨砕した結晶硫酸アンモニウムを徐々に加え、一晩放置した。塩析した沈殿を 12,000 × g で 30 分間、遠心分離して除き、その上澄液に更に 90% 飽和になるよう結晶硫酸アンモニウムを加え 2 日間放置後、同様に遠心分離して沈殿を回収した。回収した沈殿を少量の緩衝液 (1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1 mM ヨードアセトアミドを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) (以下緩衝液 B)) で溶解し、同じ緩衝液 B の 5L を 12 時間毎に 6 回交換しながら透析した。透析で生じた不溶性の沈殿を遠心分離により除いた後、上澄液を緩衝液 B であらかじめ緩衝化した DE-32 イオン交換カラム (3×25 cm) に通過させ、カラムに未吸着で SOD 活性のあるフラクションを緩衝液 B を用いてカラムから回収した。未吸着で回収された SOD 活性のあるフラクションはコロジオン濃縮後、0.1 mM EDTA を含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で平衡化した Sephadex G-100 ゲル濾過カラム (4×86 cm) を通過させ、酵素活性のあるフラクションを回収した。

回収したフラクションに結晶硫酸アンモニウムを加え、40% 飽和硫酸アンモニウム溶液に調製した後、あらかじめ 40% 飽和硫酸アンモニウムを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) で平衡化した Butyl-toyopearl 650s の疎水クロマトカラム (2.5 × 14 cm) にかけて、硫酸アンモニウム濃度を 40% (400 mL) から 0% (400 mL) までの直線的濃度勾配で溶出した。酵素活性のあるフラクションを回収し、2.5 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) に透析後、同じ緩衝液であらかじめ平衡化した 2nd DE-32 カラム (2×15 cm) に通過させ、再度未吸着部分に溶

出するフラクション (SOD-A) を集めた。この段階で試料はほぼ均一な状態になるが、ポリアクリルアミド電気泳動的に不均一の場合はゲル濾過とイオン交換のカラムクロマトグラフィーを繰り返した。なお、この 2nd DE-32 カラムに吸着したフラクションには NaCl の濃度勾配で分離される 2 種類の SOD 活性を持つフラクション (SOD-B, SOD-C) が存在した。SOD-A, SOD-B, SOD-C のこの段階で回収された全酵素活性はそれぞれ、311,000 U, 53,000 U, 12,000 U であった。

### 酵素活性の測定

SOD の酵素活性および酵素単位はキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系によるシトクローム c の還元速度を利用した McCord & Fridovich の方法<sup>6)</sup>で測定した。またタンパク質の定量はウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry 等の方法<sup>7)</sup>で算出した。

### ポリアクリルアミド電気泳動

未変成の状態でのポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native PAGE) は、Davis の方法<sup>8)</sup>に準じディスク型およびスラブ型のゲルを調製し電気泳動した。電気泳動後のタンパク質の検出は CBB 染色で、酵素活性の検出は Beauchamp & Fridovich の方法<sup>9)</sup>で行った。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含むスラブ型 SDS-PAGE は Laemmli の方法<sup>10)</sup>に準じた。

### 沈降平衡法による分子量測定

SOD の分子量は日立 282 型分析用超遠心器に RAM-18SC ローター、紫外吸収用ダブルセクターセル、吸収走査記録装置を装着し、回転数: 9000 rpm, 測定温度: 25°C, 溶媒: 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 の条件下で測定した。4 時間毎に 280 nm の吸収で SOD の沈降状態を観察記録し、沈降平衡状態の保持されている 24 時間目の吸収走査記録から次式により分子量を求めた。

$$M_w = [2RT/(1-v\rho)\omega^2] \times d\ln C/dr^2$$

なお、R は気体定数、T は測定温度、 $v$  は溶質の偏比容、 $\rho$  は溶液の密度、 $\omega$  は角速度、C はセル中の各点における溶質の濃度 (280 nm の吸光度)、 $r$  は回転中心からの距離である。また、 $\rho$  は 1.010 g/mL、 $v$  は試料のアミノ酸組成から 0.735 と仮定<sup>11)</sup>して算出した。

サブユニットの分子量は Laemmli の方法<sup>10)</sup>による 0.1% SDS を含むポリアクリルアミド電気泳動法で分子量マーカーを Phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa),  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 kDa) を基準にして推定した。また、AB SCIEX 社製 API QSTAR PULSAR *i* 質量分析計を用いて分子量を測定した。

#### その他の方法

酵素中の金属含有量は超純水で透析した試料を直接日立 Z-7000 型多元素同時分析原子吸光光度計で測定した。構成アミノ酸組成の決定は Maruyama & Sugawara の方法<sup>12)</sup>に従い酵素を 0.2% トリプトアミンを含む 4M メルカプトエタンスルホン酸で 110°C, 24 時間加水分解した。同一条件下で加水分解したアミノ酸組成既知のリゾチームの分析結果をアミノ酸回収率の補正項に用いた。組成分析は日立 L-8500 型高速アミノ酸分析計を用いて測定した。酵素の熱安定性を調べる実験では 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.8) 中で、また pH 安定性の実験では各 pH に調整した 50 mM McIlvaine 緩衝液中に SOD 濃度を 50 U/mL に調整し測定し、その 20  $\mu$ L を用いて残存活性を測定した。

#### N 末端アミノ酸

試料酵素 20~50  $\mu$ g をトリフルオロ酢酸にて 60 °C, 10 分間、気相で処理した後、アプライドバイオシステムズ製 470A 型プロテインシーケンサーと AB SCIEX 社製 API QSTAR PULSAR *i* 質量分析計を用い LC-MS, LC-MS/MS 分析により N 末端アミノ酸配列を決定した。

## 結 果

シイタケ JMS 5K-16 の粗抽出液をスラブ型 Native PAGE にかけた結果を Fig. 1 に示した。活性染色の結果から、粗酵素液の中には電気泳動で移動度の異なる 2~3 種類の SOD の存在が確認され、最も移動度の少ない SOD が主要な活性染色バンドであった。複数認められた活性染色のバンドはいずれも 0.3% 過酸化水素や 1 mM KCN 存在下での染色具合と大差なく、いずれも阻害されない Mn-SOD と推測された。



Fig. 1. SOD activity in the crude extract of *Lentinus edodes*.

Twenty  $\mu$ l of the extract was loaded onto a polyacrylamide gel and stained for SOD activity by the method of Beauchamp & Fridovich<sup>9)</sup>.

一方、この粗酵素液を 0.25 M ショ糖溶液中で 5,000 g で遠心分離した上澄液には主に Fig. 1 の移動度の小さい SOD フラクションが、沈澱部分には移動度の大きい SOD フラクションが分布した (Fig. 2)。

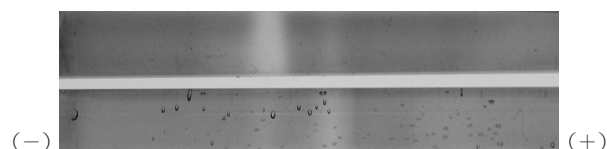


Fig. 2. SOD activities of the supernatant and precipitate fractions by centrifugation of the crude extract of *Lentinus edodes* containing 0.25 M sucrose.

Upper lane: supernatant fraction, lower lane: suspension of precipitate fraction.

SOD の精製は「実験方法」の「SOD 粗酵素液の調製」, 「SOD の精製」に記した方法で実施した。シイタケの粗酵素液からの SOD の精製法の一例を Table-1 に、精製した酵素の Native PAGE (Fig. 3-A) および分子量マーカーと並べて電気泳動した SDS-PAGE の結果 (Fig. 3-B) を示した。どちらの電気泳動においても単一なバンドを示し、Native PAGE ではタンパク質染色のバンドと活性染色によるバンドは一致した (未発表データ)。精製された

Table-1. Purification of SOD from *Lentinus edodes*

Purification steps	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	7310	37500	111700	3.0		
40-90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	236	8000	113800	14.2		
1st DE-32	320	1120	497600	444	1	100
Sephadex G-100	225	250	460000	1840	4.1	92.4
Butyl toyopearl	144	140	373000	2664	6.0	75.0
2nd DE-32	415	89.6	311250	3474	7.8	62.6

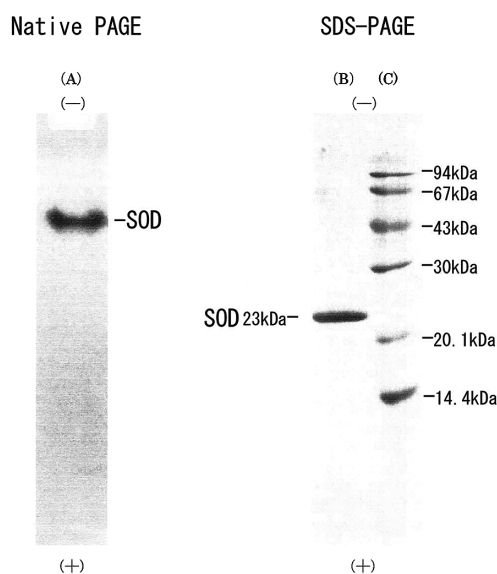


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified SOD. The gels are stained for protein. (A): Native PAGE of purified SOD, (B): SDS-PAGE of purified SOD, (C): SDS-PAGE of maker proteins

SODの比活性は3,500 U/mgであった。

なお、最後の2nd DE-32に試料液を通過させた後、カラムを塩化ナトリウムの塩濃度勾配で溶出したところ溶出濃度の異なる2つのSODフラクションが回収され、それらと未吸着のSODをNative PAGEで泳動した結果をFig. 4に示した。この結果から今回精製したSODはFig. 1の最も泳動距離の短いSOD、2nd DE-32に吸着したSODは泳動距離の大きいSODと考えられる。

またSDS-PAGEによる分子量としてはFig. 3-Bの結果から23±0.5 kDaであると推定された。この結果はESI-MS法からの推定値、22,184 Daとはほぼ一致していた。一方、精製酵素の高速沈降平衡法による分子量の測定からは、重量平均分子量が84,240 Daと算出され、本酵素は分子量的に同一のサブユ

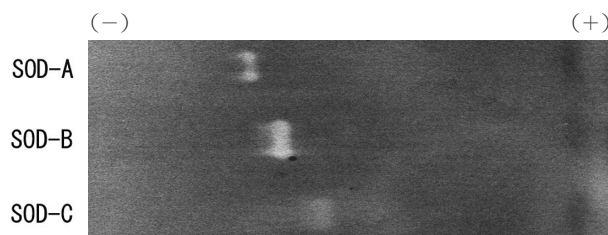


Fig. 4. Difference in mobilities by the electrophoresis of three SODs separated by 2nd DE-32 chromatography (SOD-A) Non-adsorbed fraction, (SOD-B and SOD-C) Adsorbed fractions

ニットが4量体を形成しているものと思われた。また、精製酵素の可視・紫外吸収スペクトルは可視部にMn-SODに特徴的な吸収を示した(未発表データ)。

Mn-SODに特徴的な吸収スペクトルを示したことから、酵素中の金属分析を行ったところ、鉄および銅の含有量はサブユニットの分子量を23 kDaと

Table-2. Amino acid composition (moles per mole subunit) of Mn-SOD from *Lentinus edodes* and other species a) Basidiomycota, b) Ascomycota, c) Bacteria, d) Mammalia

	<i>Lentinus edodes</i>	<i>Ganoderma microsporium</i> <sup>13)</sup>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> <sup>5)</sup>	<i>Agaricus bisporus</i> <sup>14)</sup>	<i>Schizophyllum commune</i> <sup>15)</sup>	<i>Coprinopsis cinerea</i> <sup>16)</sup>	<i>Humicola lutea</i> <sup>3)</sup>	<i>Escheria coli</i> <sup>17)</sup>	<i>Human liver</i> <sup>17)</sup>
	a)	a)	a)	a)	a)	a)	b)	c)	d)
Lys	13	14	15	9	14	18	10	17	14
His	9	9	10	8	9	8	12	8	10
Arg	3	4	4	6	5	7	7	6	4
Asx	21	20	20	22	22	21	18	24	22
Thr	15	9	9	11	15	8	13	11	7
Ser	13	10	10	11	10	14	16	9	7
Glx	21	21	22	18	18	25	16	19	23
Pro	9	9	9	10	9	10	10	9	10
Gly	17	14	17	17	17	16	22	13	19
Ala	23	26	25	16	21	30	20	27	17
Cys	1	0	0	4	0	0	0	0	2
Val	10	7	8	9	7	9	13	10	9
Met	1	2	2	2	2	2	2	2	2
Ile	11	15	10	12	13	14	8	6	11
Leu	20	20	22	25	20	18	10	21	20
Tyr	6	7	9	7	8	10	2	7	9
Phe	9	7	9	8	9	11	5	11	6
Trp	3	3	5	5	6	5	5	6	6
Total	205	197	206	200	205	226	189	206	198

仮定すると 0.01 g-atom/mol 以下であるのに対しマンガンは  $0.64 \pm 0.026$  g-atom/mol であった。以上の結果から精製された SOD は補因子として Mn を含む SOD であることがわかった。

#### 酵素の安定性

酵素の pH 安定性を確認するために 25°C で pH 2.9, 4.0, 6.6, 9.0, あるいは熱安定性を確認するために pH 7.8 で 37°C, 45°C, 60°C にそれぞれ 30 分間放置し、残存活性を測定した。pH 安定性については、pH 2.9 では全く活性が認められず失活したが、pH 4.0 以上ではほとんど活性の減少は認められなかった。一方、熱安定性は 37°C ではほとんど活性の減少は認められなかったが、45°C では約 50%, 60°C では約 65% 近くの活性が失われた。

#### 酵素のアミノ酸組成

酵素のアミノ酸組成はサブユニットの分子量の 22.1 kDa を基に、最も近い整数値で示した。また、担子菌類や近縁の糸状菌から分離精製された、あるいはゲノム解析などで一次構造が判明した担子菌類の Mn-SOD のアミノ酸組成も合わせて Table-2 に示した。

#### 酵素の N 末端アミノ酸

1D-SDS-PAGE 後 PVDF 膜に転写し、CBB-R350 で染色したバンドを切り出し、実験に使用した。精製した酵素を直接あるいはあらかじめ 0.6 mol/L 希塩酸で 24 時間酸処理した後、プロテインシーケンサーで分析したが、いずれの場合も分析不能であった。これは本酵素の N 末端アミノ酸のアミノ基が遊離の状態ではなく、更にホルミル化以外で化学修飾されている可能性が推測された。シイタケは動物や植物と並び真核生物であり、また真核生物の細胞内タンパク質での N 末端アミノ酸の化学修飾はアセチル化されたものが多いので、トリフルオロ酢酸を気相で 60°C, 10 分間処理する脱アセチル化法とプロテインシーケンサーおよび LC-MS-MS を組み合わせて、N 末端アミノ酸の同定を試みた。その結果、N 末端のアミノ酸がセリンであり、それに続くシーケンスが決定できた (Fig. 5)。また、LC-MS-MS による N 末端ペプチドの質量数が 1042.5 である (Fig. 6) ことから N 末端ペプチドのアミノ酸配列順序は AcSNTLPPLPY と推定された。以上の結果から、本酵素の N 末端アミノ酸はセリンがアセチル化されているものと推定される。

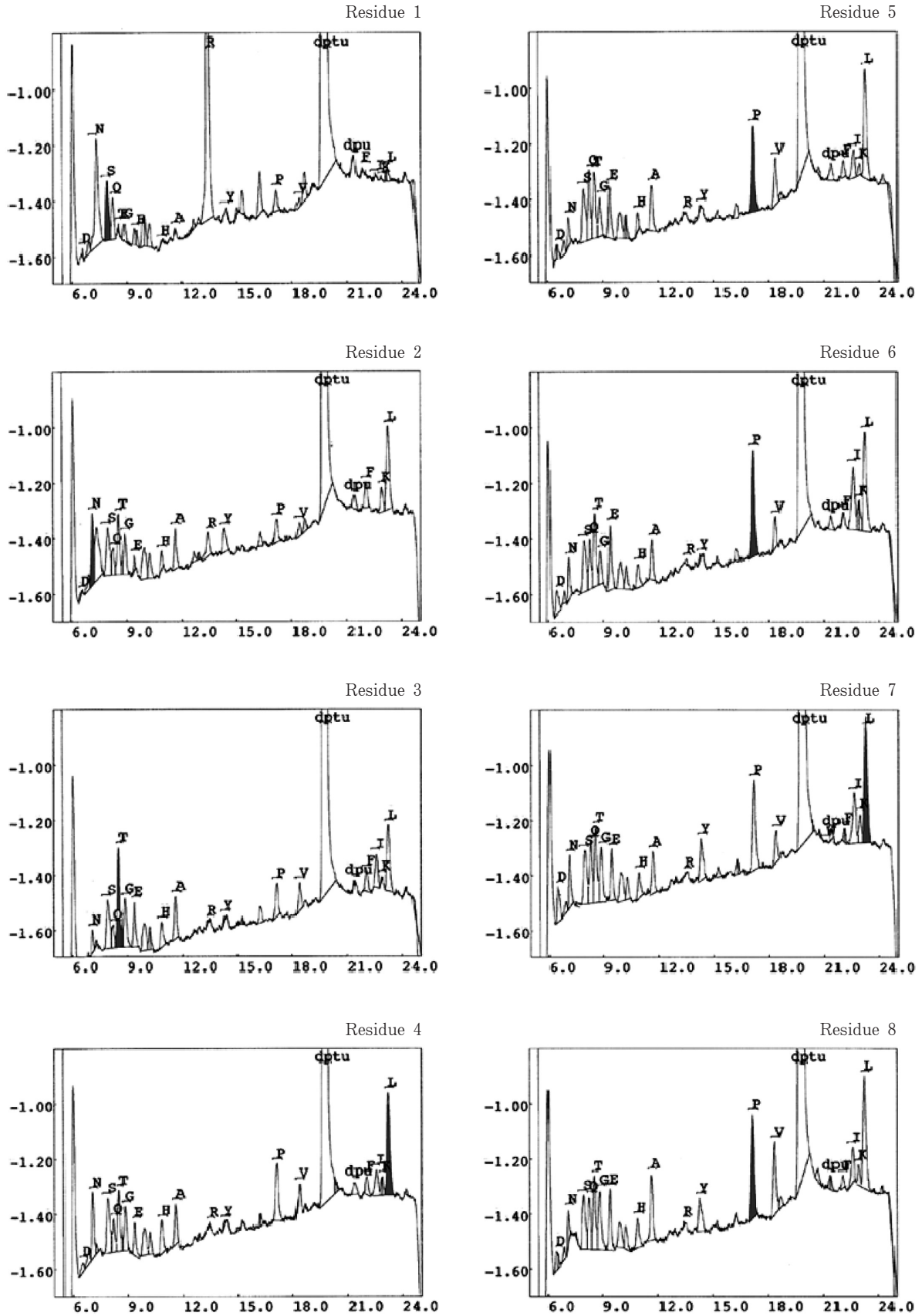


Fig. 5. *N*-terminal sequence analysis after the de-acetylation  
 The *N*-terminal amino acid sequence after the de-acetylation of enzyme on PVDF membrane of 1 D-SDS-PAGE was determined by automated Edman degradation.

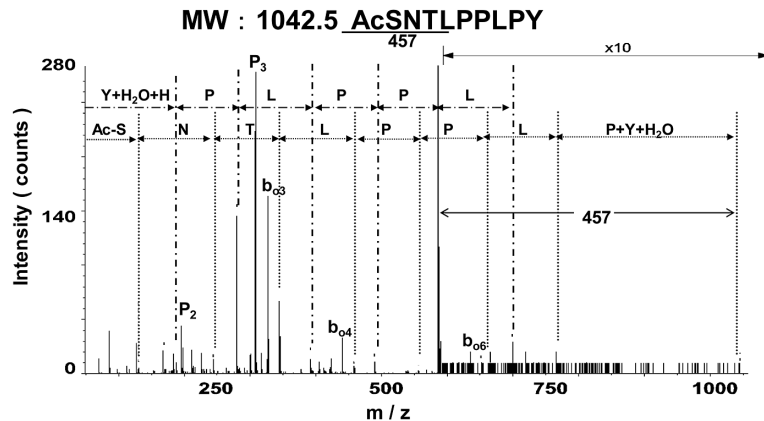


Fig. 6. MS/MS spectrum  
MS/MS spectrum of the ion at  $m/z$  1,042.5. The amino acid sequence of the precursor ion is shown in the upper part of the figure. The molecular weights of the fragments are given below the sequence. Detected molecular masses of the fragments are indicated in the MS/MS spectrum.

## 考 察

シイタケ子実体の傘の粗酵素液には電気泳動的に KCN で阻害されない複数の SOD 活性が認められた。この結果は、Belinky 等による数種の担子菌門の粗酵素液での電気泳動の結果<sup>18)</sup>の中でも、シイタケの KCN で阻害されない SOD 活性が複数検出され、泳動パターンも我々の結果と酷似していた。しかし、数種の担子菌の SOD の泳動パターンはかなり異なっていた。この違いを確認するため、シイタケ子実体の傘の粗酵素液から多量に存在する一種類の Mn-SOD を精製した。この Mn-SOD はショ糖溶液中での遠心分離の結果から細胞質由来の SOD であると考えられる。この精製された Mn-SOD の分子量や四次構造は、既に報告されている Mn-SOD と同じく分子量が 84 kDa で同一のサブユニットが会合した 4 量体構造を有していることがわかった。*Phanerochaete chrysosporium* からの Mn-SOD とシイタケの Mn-SOD は電気泳動的な移動度に大きな差が認められるので、アミノ酸組成のわかった、あるいは SOD の塩基配列から算出される他の担子菌門の SOD と比較した (Table-2)。シイタケ SOD で塩基性アミノ酸の含有が少なめに思えるが、相対的にどれもほぼ同じ組成を有していた。酵素の金属含有量や安定性に関しても、他の Mn-SOD と比較して大きな差は認められなかった。真核生物においては、Mn-SOD は通常ミトコンドリ

アに局在している。細胞質に Mn-SOD が存在している例はあまりなく、担子菌門に特有の分布と考えられる。その意義は明確ではないが、通常真核生物の細胞質に存在する Cu,Zn-SOD と比較して過酸化水素で失活しないという性質が関係しているのかもしれない。Cu,Zn-SOD の場合、過酸化水素分解酵素 (Catalase や glutathione peroxidase など) と共存していないと失活の可能性がある、十分機能を発揮することが出来ない、通常これらの酵素も細胞質に十分量存在する。もし、担子菌門において、過酸化水素分解酵素の量が細胞質において十分でない状態で SOD が働くような状況があるとすると、そこに存在する SOD は Mn-SOD である必要がある。今後、担子菌門において、細胞質の過酸化水素分解酵素量や過酸化水素が高濃度存在する生理的な必要性があるのか、などについても検討する必要がある。

現在知られている Mn-SOD の N 末端アミノ酸に関しては、かなりの酵素でメチオニン残基が N 末端になっている。シイタケの Mn-SOD については N 末端アミノ酸がセリン残基でしかもアセチル化されていることが判明した。N 末端アミノ酸の修飾としては、今までホルミル基、アセチル基、ミリスチル基、ピログルタミル基、メチル基などが知られているが、その中でホルミル基による修飾は、一般に原核細胞のタンパク質に認められる。Cu,Zn-SOD については、ウシやヒトの赤血球からの Cu,Zn-SOD の N 末端アミノ酸はアセチル基で修飾されているが、



ヒトの Cu,Zn-SOD を大腸菌で発現させるとアセチル化されない<sup>19)</sup>。また、同様のことを酵母で行った場合には、N 末端アセチル化が起こる<sup>20)</sup>。Mn-SOD に関しては、*Bacillus stearothermophilus* (細菌), *Escherichia coli* (細菌), *Saccharomyces cerevisiae* (酵母), ヒト肝臓からの Mn-SOD の N 末端アミノ酸は化学修飾を受けていない。従って、Mn-SOD の N 末端アミノ酸が化学修飾を受けている初めての例であると考えられる。ただ、塩基配列から決定された Mn-SOD の N 末端アミノ酸残基は化学修飾を受けているか否かは不明であるので、今後、他の Mn-SOD の N 末端アミノ酸の修飾の有無に関しては精製酵素を用いて直接分析することも必要と思われる。一般に真核生物の Mn-SOD はシグナルペプチドをもち、ミトコンドリアに移行後に切断を受けるので N 末端アミノ酸はアセチル化されていない。一方、細胞質の Cu,Zn-SOD は N 末端アミノ酸がアセチル化されているものが多く、また酵母やヒトの細胞質に存在する多くのタンパク質の N 末端アミノ酸がアセチル化を受けているが、その意義はよくわかっていない。細胞質に存在するシイタケの Mn-SOD もアセチル化を受けるが、その意義に関しても現在のところ不明である。現在、シイタケ Mn-SOD の一次構造についても検討中である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、貴重なご意見、ご尽力を賜りました明治製菓株式会社生物科学研究所(現 株式会社 明治)の宇佐美英企氏、川手雄二氏並びに実験材料のシイタケをご提供くださいました明治製菓株式会社(現 株式会社 明治)および森産業株式会社に厚く御礼申し上げます。また、沈降平衡法による分子量の測定は大阪市立工業研究所の竹西繁行氏のご厚意で測定・分析して戴きました。ここに深謝いたします。

## 引用文献

- (1) 浅田浩二(1983) 山中健生, 大塚齊之助編 金属タンパク質の化学 講談社 pp 275-283
- (2) Lavelle F., Durosay P. & Michelson A. M. (1974) *Biochimie* 56, 451-458

- (3) Shu-Mei Pan, Jr-Shin Ye & Ruey-Shyang Hseu (1997) *Biochemistry and Molecular Biology International* 42, 1035-1043
- (4) Dolashka-Angelova, P., Genova, L., Stoeva, S., Stefanov, B., Angelova, M., Hristova, R., Pashova, S., & Voelter, W., (1999) *J. Peptide Res.* 54, 279-289,
- (5) Raziye, Ö., Bozkaya L. A., Esin, A., Necdet, S. & Leman, T., (1999) *Enzyme and Microbial Technology* 25, 392-399
- (6) McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055
- (7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- (8) Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- (9) Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971) *Anal. Biochem.* 44, 276-287
- (10) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- (11) 野田春彦, 菊地昌子(1977) 阿南功一ほか編 基礎生化学実験法3 物理化学的測定 [1] 丸善 pp 30-84
- (12) Maruyama, K., & Sugawara, T. (1981) *J. Chromatogr.* 224, 315-321
- (13) Wang, Huei-Fang (1996) Thesis of Graduate Institute of Agricultural Chemistry, National Taiwan University
- (14) GenBank: CAB 94731.1
- (15) NCBI Reference Sequence: XP\_003036155.1
- (16) NCBI Reference Sequence: XP\_001837757.2
- (17) Parker, M. W., Blake, C. C. F., Barra, D., Bossa, F., Schinina, M. E., Bannister, W. H., & Bannister, J. V. (1987) *Protein Engineering* 1, 393-397
- (18) Belinky, P. A., Goldberg, D., Krinfeld, B., Burger, M., Rothschild, N., Cogan, U. & Dosoretz, C. G. (2002) *Enzyme and Microbial Technology* 31, 754-764
- (19) Hartman, J. R., Geller, T., Yavin, Z., Bartfeld, D., Kanner, D., Aviv, H. & Gorecki, M., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 7142-7146
- (20) Hallewell, R. A., Mills, R., Tekamp-Olson, P., Blacher, R., Rosenberg, S., Ötting, F., Masiarz, F. R. & Scandella, C. J. (1987) *Nature Biotechnol.* 5, 363-366

(ふわ まさこ 健康デザイン学科)  
 (いけだ けいいち 順天堂大学スポーツ健康科学部)  
 (かわさき ひろあき 順天堂大学環境医学研究所)  
 (やまくら ふみゆき 順天堂大学医療看護学部)  
 (たか ひかり 順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター生体分子研究室)  
 (みねき れいこ 順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター生体分子研究室)  
 (ふじむら つとむ 順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター生体分子研究室)  
 (まつもと たかし 管理栄養学科)