The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Human liver manganese superoxide dismutase : puri-fication crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity
Author(s)	松田, 幸彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37412
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【146】

氏名・（本籍）	松田幸彦（まつだ ゆきひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9500 号
学位授与の日付	平成3年2月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Human liver manganese superoxide dismutase: purification crystallization, subunit association and sulfhydryl reactivity （ヒトMn－スーパーオキシド ジスムターゼにおけるサブユニット構造とその特異的解離に関する研究 －チオール基との関連－）
論文審査委員	（主査）教授 垂井清一郎　（副査）教授 谷口 直之　教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

【目　的】

ヒトMn－スーパーオキシド ジスムターゼ（Mn－SOD）は，その一次構造が決定され各サブユニット当りシステイン残基が2個存在することが報告されている。しかしその立体構造やシステイン残基間の相互関係については未だ明らかではない。本研究では，サブユニット構造を明らかにするために，ヒト肝臓から精製したMn－SODを材料として，その分子量を低角レーザー光散乱法を用いて詳細に検討した。また変性剤で単量体に解離する時に二段階の構造変化が認められた。この機序としてチオール基の存在様式の変化が関与していると推測された。この点を明らかにするために，変性剤，還元剤，チオール基修飾剤等の処理を組み合わせた実験を行い比較検討した。

【方法ならびに成績】

(I) Mn－SODのサブユニット構造

1）酵素精製：凍結融解した肝臓をホモジナイズして，その超遠心上清をDE-52，hrdroxylapatite，Sephacryl S-300，Polybuffer exchanger-94，Hydroxylapatite，Red Sepharose のクロマトグラフィー操作を行い，比活性が6,100 U/mg SODの単一精製標品を得た。Mn－SODの活性測定はBeauchamp らの方法に準じてシアン存在下で行った。

2）サブユニット構造：分子量測定は低角レーザー光散乱法にて行った。Mn－SODの分子量は88,600±2,000，SDS処理でモノマー化した分子量は21,300±4,000であった。一方，HPLC－ゲル濾過法から得たStokes' radiusは38Åであり分子量75,000に相当した。以上の結果からMn－SODはnon-globular な非共有結合4量体構造をとっている事が明らかとなった。

3）変性剤に対する安定性：8 Murea，1％SDS存在下における活性と高次構造の変化を経時的に検討した。urea中では活性および高次構造が未処理酵素と同様な変化を示した。SDS中では短時間に失活し，続いてサブユニットの解離が認められた。電気泳動上2種類のモノマー（25 kD，23 kD）が確認でき，時間の経過と共に23 kDが主成分になった。

(II) チオール基の存在様式

1）チオール基の定量：Ellmanの方法によりチオール基の定量を行った。未変性Mn-SOD 1分子当り4個同定できた。urea±DTT，SDS±DTT存在下において室温ではチオール基が4個同定された。さらに変性剤＋還元剤＋加熱条件下では期待値の8個が同定できた。しかし変性剤＋加熱のみの条件下では同定できるチオール基が2－3個と減少した。この減少はMn－SODがその過程においてジスルフィド橋を形成する結果と推測した。

2）ジスルフィド橋形成部位の決定：Mn－SODは非還元時にはSDS－PAGE上23 kDが主成分として，還元処理を追加した時は25 kDのみが認められた。予め未変性Mn－SODの反応性チオール基をカルボキシアミドメチル化した場合は非還元，還元いずれの条件下においても25 kDのモノマーが認められた。この結果，ジスルフィド橋はサブユニット内に存在する2個のチオール基間に形成されることが明らかとなった。

3）反応性チオール基の部位決定：予めEllman試薬で修飾した未変性Mn－SODと還元型活性化チオールセファロースを弱アルカリ条件下で互いにジスルフィド結合させた後，酸性条件下においてペプシン消化を行った。さらに遊離ペプチドを洗浄後再び弱アルカリに戻して結合ペプチドを還元剤で溶出した。溶出ペプチドのアミノ酸配列を決定した結果，反応性チオール基は196番目のシステイン由来と判明した。

【総　括】

1）ヒトMn－SODはnon-globularな非共有結合同種4量体よりなりその活性および高次構造は8 Murea に対して安定であったが，1％SDSに対しては不安定であった。

2）各サブユニットに存在する2個のシステインのうち140番目は，サブユニット内に埋没しており，196番目はその表面に存在していた。

3）還元剤非存在下でサブユニットを解離させるとこの2個のシステインは容易にジスルフィド結合を形成し，その結果，電気泳動にて還元剤存在下におけるモノマー（25 kD）よりも2 kD小さく認識された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ヒトMn－SODの構造解明の一つの方法として低角レーザー光散乱法を用いてサブユニット構造を解析し，更に分子構造に大きな影響を与えるシステイン残基に注目し変性剤，還元剤，チオール修飾剤を用いてその物理化学的性質を解明したものである。その結果ヒトMn－SODは非共有結何同種

4量体であることを明確にした。またサブユニット内に存在する2個のシステインの1個は分子表面に存在し，反応性チオール基として作用するが，他方は分子内に埋もれており非反応性であることを示した。更にこの反応性チオール基は196番目のシステインに由来することを決定した。 また，この2個のチオール基は分子変性過程において容易にサブユニット内ジスルフィド結合を形成することも明らかにした。

本研究は，Mn－SODの高次構造解明に関して貴重な知見を加えたものであり，学位に値すると考えられる。