Osaka University Knowledge Archive

Title	Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction : Implication of reactive oxygen species
Author(s)	大河原, 知水
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38165
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【 3 】

氏　　名	大河原知水（おおかわら ともみ）
博士の専攻分野の名称	博　士　（医　学）
学位記番号	第　1 0 4 5 7　号
学位授与年月日	平成 4 年 12 月 2 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Site-specific and random fragmentation of Cu, Zn-superoxide dismutase by glycation reaction:Implication of reactive oxygen species **（銅・亜鉛スーパーオキサイドディスムターゼの糖化反応と活性酸素の産生による特異的断片化）**
論文審査委員	（主査） 教 授　谷口　直之 （副査） 教 授　田川　邦夫　　教 授　多田　道彦

論文内容の要旨

［目　的］

生体内の活性酸素消去系に重要な役割を担っているとされる，銅・亜鉛スーパーオキシドディスムターゼ（Cu, Zn-SOD）の糖化反応と活性酸素の産生，及びそれに伴う酵素の変化について明らかにする。

［方法ならびに成績］

In vitro で Cu, Zn-SOD をグルコースと37度でインキュベートし，糖化反応に伴う酵素の変化を検討したところ，酵素は非酵素的糖化反応を受け活性を低下させた。SDS-PAGE による検討では，酵素は断片化され分子量約15KD と5KD の2種類のフラグメントを生じた。断片化の程度は，グルコース濃度に依存して強まり，より高濃度のグルコースでは断片化は急速に進行し非特異的な断片化への移行が観察された。これらの現象は還元力のないソルビトールでは観察されず，還元力の強いフルクトースではより強く起こった。

還元糖によって起こる断片化は，カタラーゼ（0.2mg／ml）あるいは EDTA（5mM）の添加により完全に抑制され，H_2O_2 と金属イオンの関与が示唆された。実際に H_2O_2（5mM）とインキュベートすると Cu, Zn-SOD は同様に断片化されたが，この際 EDTA により非特異的断片化のみが抑制され特異的断片化は抑制されなかった。

DMPO をトラップ剤として ESR法により活性酸素の同定を試みた。糖化 Cu, Zn-SOD から DMPO-OH のシグナルが同定され，またこのシグナルがカタラーゼの添加によって消失したことから断片化にラジカルの関与が裏付けられた。不活化 SOD の糖化反応生成物から同定された DMPO-OH のシグナルは，カタラーゼによって抑制できなかったことから，糖化反応成生物より発生するラジカルはスーパーオキシドであり，SOD 活性により H_2O_2 に変換され断片化に関与していることが明らかになった。さらに溶液中の溶存酸素を窒素置換することで断片化は完全に抑制されることから，溶存酸素が金属イオンの存在下で糖化反応生成物によって還元されスーパーオキシドが生成すると考えられた。

断片化を受ける部位を各断片のアミノ酸配列を分析することにより同定した。5KD 断片は Cu, Zn-SOD の N末端と，15KD断片は His 63からの配列と一致した。また，5KD 断片のアミノ酸組成を分析したところ，3残基のプロリンは

全て同定され，断裂部位がPro 62-His 63のペプチド結合であることが明らかになった。

［総　括］

我々は，以前より生体と活性酸素の関係に注目し，Cu, Zn-SODが糖化反応により活性を低下させること，また糖化反応による活性低下のメカニズムとして酵素の中の特定のアミノ基の糖化が深く関与していることを明らかにしてきた。今回の結果から糖化反応によりCu, Zn-SODが受ける修飾とそのメカニズムが明らかになった。

反応は3つの段階に分けられる。第一段階は，酵素の糖化反応と，スーパーオキシドの生成である。この反応は遷移金属イオンと溶存酸素が必須である。生成物であるスーパーオキシドはCu, Zn-SODの基質であり，直ちにH_2O_2に変換され反応系に蓄積する。第二段階ではCu, Zn-SODの活性中心の銅イオンとH_2O_2の局所的なFenton反応により活性中心でOH・が発生する。OH・は極めて反応性が高く，活性中心近傍に位置するPro 62-His 63配列のペプチド結合を攻撃し破壊する。これによって，Cu, Zn-SODは二つの分子量を持った断片に分かれる。切断を受ける部位のHis 63は，Cu, Zn-SOD分子の三次元構造において銅イオン（活性の発現に関与），亜鉛イオン（分子の立体構造に関与）両方に配位している重要なアミノ酸であり，この部位が攻撃されることにより分子内より銅イオンが遊離し反応系に蓄積する。第三段階は反応系に蓄積した遊離の銅イオンとH_2O_2のFenton反応により，OH・が生じCu, Zn-SODが攻撃される。これは第二段階が活性中心で起きたのに対し，部位特異性が無く非特異的な断裂となる。以上の3つの段階を経てCu, Zn-SODは糖化反応に引き続き，特異的・非特異的な断裂を受けることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

Cu, Zn-SODは，糖尿病の病態や老化現象により糖化反応（マイヤー反応）を起こし，活性の低下とともに特異的および・非特異的な酵素の断片化を起す。さらにその断片化が活性酸素によるものであることを明らかにした。

この機構を詳細に検討した結果，糖化反応により

1）活性酸素が生成し，Pro 62-His 63間のペプチド結合が切断され，特異的な断片化を起こすこと

2）次に遊離した遊離した銅イオンと過酸化水素のFenton反応により，ランダムな断片化を起こすことが明らかになった。

本研究は，マイヤー反応により生成した活性酸素が，タンパク質のペプチド結合を特異的に切断するという初めての報告である。今後糖尿病の合併症の発症病理と活性酸素の関係を解明する上で重要な発見であり学位授与に値するものであると認める。