

Title	Stability of mutant superoxide dismutase-1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis determines the manner of copper release and induction of thioredoxin in erythrocytes
Author(s)	小川, 康子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40708
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名	小 川 康 子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13748 号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Stability of mutant superoxide dismutase-1 associated with familial amyotrophic lateral sclerosis determines the manner of copper release and induction of thioredoxin in erythrocytes (家族性筋萎縮性側索硬化症患者の赤血球中における変異 SOD-1 蛋白の安定性と銅遊離および thioredoxin 誘導に関する検討)
論文審査委員	(主査) 教授 柳原 武彦 (副査) 教授 岡田伸太郎 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

常染色体優性遺伝を示す家族性筋萎縮性側索硬化症(FALS)の家系の一部で、CU/Zn SOD(SOD-1)遺伝子の突然変異が1993年に初めて報告されて以来、現在までに50以上の突然変異が知られている。ヒト変異 SOD-1 遺伝子のトランスジェニックマウスも同様に運動ニューロン病を示す結果より変異 SOD-1 蛋白が何らかの細胞毒性を獲得するものと考えられている。我々は、患者赤血球において、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計(HPLC-ESI/MS)とイオン交換クロマトグラフィーを用い変異 SOD-1 蛋白の特性を調べ、脆弱な変異 SOD-1 蛋白からの遊離銅が細胞毒性の原因となるのではないかという仮説を検討した。

【方法および成績】

FALS 患者の hemolysate より抗ヒト SOD-1 ポリクローナル抗体を用いて得た免疫沈降物を、HPLC-ESI/MS で解析することで、赤血球細胞質内の正常および変異 SOD-1 蛋白を識別した。その結果、変異 SOD-1 蛋白の存在を確認できる安定型(G37R, H46R等)と全く存在を確認できなかった不安定型(I149T, 126L2 塩基欠失等)に分類された。つぎに、脆弱な変異 SOD-1 蛋白の特性を調べるために、患者赤血球中より SOD-1 蛋白の精製を試みた。まず、大量に存在するヘモグロビンを除くために、従来のエタノール/クロロホルム法は用いず、2.5mM トリス酢酸バッファー(pH6.0)で平衡化したCM-52セルロースに20倍希釈した hemolysate を添加しヘモグロビンを吸着させた。この void volume を同じバッファーで平衡化したDE-52セルロースに添加し、0mM-200mM NaCl濃度勾配を用いて溶出させた。脆弱な変異 SOD-1 蛋白からの銅遊離が細胞毒性の原因となるのではないかという仮説を検討するために上記の精製過程において各フラクションの SOD 活性と蛋白濃度に加え銅イオン濃度の測定、HPLC-ESI/MS による解析もおこなった。その結果、安定型のみならず不安定型においても SOD 活性とは無関係な異常な銅イオンの溶出を認めた。さらに、安定型においては SOD 蛋白以外の蛋白溶出が正常人と比べて増加しているフラクションをみいだした。このフラクションを濃縮し15% SDS-PAGE に泳動したところ約12kD のバンドが増加しており、HPLC-ESI/MS においても MW11745.9の分子量をもつ蛋白の増加を認めた。このバンドを PVDF 膜にプロット後アミノ酸シーケンスを行った結果、N 末端がV KQIE を示し、S-S 結合還元作用を持つ thioredoxin と同定された。抗ヒト thioredoxin モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットでもこの増加しているバンドが thioredoxin である

ことが確認された。このことより赤血球細胞質内において、安定型変異 SOD-1 蛋白より遊離した銅イオンによる metal-catalysed protein oxidation が起こっていることが予想された。

【総括】

以上の結果より、安定型と不安定型変異 SOD-1 患者の赤血球細胞質内において変異 SOD-1 蛋白からと思われる異常な銅の遊離が起こっていると推察されたが、この異常な遊離銅が細胞毒性を示す経路は、thioredoxin が誘導されている安定型と誘導が認められない不安定型とは異っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病因は未だ明らかにされていないが、家族性筋萎縮性側索硬化症(familial ALS)の一部にCu/Zn SOD(SOD-1)遺伝子変異が示されてより、酸化ストレスが脊髄前角細胞死へ関与している可能性を示唆する知見が報告されてきた。本研究はfamilial ALS患者赤血球中において変異SOD-1蛋白よりと思われる遊離銅の存在及び安定型の変異SOD-1蛋白が存在する細胞質内においてmetal-catalysed protein oxidationが起こっている可能性を示しており、今後、thioredoxinを治療マーカーあるいは治療薬として応用し得る可能性も示唆された。以上により学位の授与に値すると考えられる。