Osaka University Knowledge Archive

Title	Oxidative damage due to copper ion and hydrogen peroxide induces GlcNAc-specific cleavage of an Asn-linked oligosaccharide
Author(s)	江口, 裕伸
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43716
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

【19】

氏　　名	江　口　裕　伸（えぐち　ひろのぶ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16816　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Oxidative damage due to copper ion and hydrogen peroxide induces GlcNAc-specific cleavage of an Asn-linked oligosaccharide （過酸化水素と銅イオンによる酸化ストレスはアスパラギン結合型糖鎖のGlcNAc特異的な切断を引き起こす）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　岡本　光弘

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

活性酸素種は炎症や虚血などにおいてその産生増加が認められ、抗酸化剤などの活性酸素消去物質によって症状の悪化が抑えられることから、活性酸素はそれらの病態に関与すると考えられており、また活性酸素種による脂質過酸化や蛋白質分解などにより細胞の機能が障害されることもよく知られている。一方、慢性関節リウマチにおいて、ヒドロキシラジカルなどの活性酸素種が細胞外マトリックスであるヒアルロン酸を分解することによって症状の悪化を引き起こすことが報告されており、糖鎖も活性酸素の標的分子の一つであることが示唆されている。しかし、活性酸素種によって糖鎖がどのようにダメージを受けるのかについてはそれほどよくわかっていない。本研究では、このような点を明らかにするために、ピリジルアミンにより蛍光標識したアスパラギン結合型（N型）糖鎖を用いて活性酸素による糖鎖分解のメカニズムについて検討した。

【方法および成績】

まず、活性酸素産生系としてヒポキサンチン／10mU キサンチンオキシダーゼ系（HX/XO）および4mM H_2O_2/40 μM $CuSO_4$、4mM H_2O_2/40 μM $FeSO_4$を用いて、種々のN型糖鎖（二本鎖糖鎖、bisected 二本鎖糖鎖、三本鎖糖鎖、四本鎖糖鎖）の分解について検討を行った。これらの活性酸素産生系で37℃にて5分間処理し、逆相 HPLC により変化を調べたところ、HX/XO、4mM H_2O_2/40 μM $FeSO_4$では糖鎖構造に変化は認められなかったが、4mM H_2O_2/40 μM $CuSO_4$の場合では分解物とみられるいくつかのピークが検出された。これらのピークを回収しβ-ヘキソサミニダーゼで消化後、逆相 HPLC を用いて解析した結果、糖鎖の切断は主として *N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）で起きており、マンノースの部位で切断された分解産物は認められなかった。これら活性酸素産生系で生じる活性酸素種の違いがこのような GlcNAc 特異的な糖鎖の切断メカニズムを規定している可能性について検討するため、DMPO をスピントラップ剤として用いた電子スピン共鳴法（ESR）により活性酸素種を解析した。その結果、いずれの活性酸素産生系においてもヒドロキシラジカルと考えられる DMPO-OH アダクトが検出されたことから、これら活性酸素産生系で生じる活性酸素種には違いがなく、単にヒドロキシラジカルを生成するだけでは糖鎖は切断されないことがわかった。コラーゲンのようなタンパク質では銅イオンが結合することにより部位特異的な切断が起こることが示唆されていることから、この糖鎖の分解において銅イオンと糖鎖の GlcNAc 残基との相互作用

が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。キトビオース（GlcNAcβ1-4GlcNAc）およびセロビオース（Glcβ1-4Glc）と銅イオンとの相互作用についてESRおよび紫外部吸収法を用いて解析した結果、銅イオンはキトビオースに結合するがセロビオースには結合しないことがわかり、さらに、$H_2O_2/CuSO_4$によってキトビオースは切断されるがセロビオースは切断されないことも明らかになった。一方、鉄イオンの場合はキトビオースとの結合は認められず、$H_2O_2/FeSO_4$で糖鎖の切断が起こらないことをよく説明した。以上の結果は*N*-アセチル基が銅イオンとの相互作用に関与し、この相互作用によりGlcNAcの近傍に局所的にヒドロキシラジカルが生成され、糖鎖の特異的な切断を起こしていることを示唆した。

【総括】

今回の結果より、GlcNAcなど*N*-アセチル基を持つ糖鎖はその構造内に銅を結合し、そこに過酸化水素などが反応すると局所的にヒドロキシラジカルが生じることが考えられた。最近、*N*-アセチル基に糖ラジカルが生じやすいことが報告され、今回のように局所的に生成されたヒドロキシラジカルは非常に*N*-アセチル基に糖ラジカルを生じさせやすく、糖鎖の部位特異的な切断を引き起こすと考えられる。慢性関節リウマチでは炎症部位に銅が増加すること、およびヒアルロン酸の分解が報告されており、活性酸素の関与が示唆されている。このような病態において今回のようなメカニズムが関与している可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

活性酸素種は炎症など、種々の病態においてその産生が増加し、脂質の過酸化や蛋白質の分解など生体高分子の機能低下に関与していることが知られている。しかし、活性酸素種の糖鎖に与える影響に関しては詳しい解析がなされていない。申請者は蛍光標識した種々のアスパラギン結合型糖鎖（二本鎖糖鎖、bisected二本鎖糖鎖、三本鎖糖鎖、四本鎖糖鎖）を用いて活性酸素の影響を解析し、過酸化水素と銅イオンにより糖鎖の*N*-アセチルグルコサミンの還元末端側で特異的な切断が起こることを見出した。この糖鎖構造に含まれる*N*-アセチル基が銅イオンと結合することにより、*N*-アセチルグルコサミンの近傍に反応性の高いヒドロキシラジカルの産生を引き起こし、糖鎖の部位特異的な切断をきたすことを明らかにした。活性酸素による糖鎖切断メカニズムの解析は、炎症などの際に活性酸素が生体分子に与える役割の解明に寄与するもので、本研究は博士の学位論文に値するものと認められる。