

Title	Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis
Author(s)	高宮, 里奈
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43869
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏 名	高 宮 里 奈
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 5 9 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 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	Glycation Proceeds Faster in Mutated Cu, Zn-Superoxide Dismutases Related to Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (家族性筋萎縮性側索硬化症における変異 Cu、Zn-COD の糖化反応の亢進)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 高 井 義 美 教 授 佐 古 田 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動神経が選択的に障害される進行性神経疾患であり、0.8~6.4/10 万人の有病率と報告されている。ALS 患者の 5~10%が家族性 ALS (FALS) であり、そのうち 20~30%では Cu、Zn-Superoxide Dismutase (Cu、Zn-SOD) の遺伝子の変異が見つかった。しかしながら、この Cu、Zn-SOD の変異が FALS の発症機構にどのように関与しているかは不明な点が多い。最近 ALS が高齢発症であることから、アルツハイマー病、パーキンソン病と同様に蛋白糖化反応の亢進が発症に関与している可能性が示唆されてきている。今回我々は変異 Cu、Zn-SOD リコンビナントタンパクを用いて、変異 Cu、Zn-SOD の糖化反応について解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

FALS で見つかった遺伝子の点変異のうち、G37R、G93A、I113T の変異 Cu、Zn-SOD 及び野生型をバキュロウイルス/昆虫細胞系で発現させた後、イオン交換カラムを用い精製を行った。各変異 Cu、Zn-SOD にグルコースを 100 mM 添加し、2 週間 37℃で反応させ、メイラード反応の初期生成物を認識する抗ヘキシトールリジン抗体でウェスタンブロット (WB) を行なった。その結果、用いた三種類の変異 Cu、Zn-SOD 全てにおいて、野生型より糖化の亢進が認められた。またグルコース添加前に、変異型が野生型よりも糖化を受けていたことから、大量発現系中の細胞培養液中に含まれているグルコース (4 mM) により糖化を受けている可能性が示唆された。精製したタンパクから、ボロン酸カラムを用い糖化タンパクを除去した後、1、10 mM のグルコースを添加し同様の実験を行ったところ、変異 Cu、Zn-SOD (G37R、G93A) は、濃度依存的、時間依存的に野生型よりも糖化を受けていた。また、グルコースよりも強い還元力を持つフルクトース (1、10 mM) を変異 Cu、Zn-SODs (G37R、G93A) に添加し、抗フルクトースリジン抗体を用い WB を行ったところ、変異 Cu、Zn-SOD は濃度依存的に野生型よりもフルクトースによる糖化を受けていることが分かった。タンパクが糖化を受ける過程でスーパーオキシドを生じる事が知られているため、変異 Cu、Zn-SOD とグルコース (100 mM) 及びフルクトース (1 mM) を 37℃で反応させた際の活性酸素種の産生について検討を行った。スーパーオキシドは、SOD による触媒で過酸化水素を生じるため過酸化水素の産生を測定したところ、糖化変異 Cu、Zn-SOD (G93A) は、野生型に比べて、約二倍の過酸化水素の産生が認められ

た。

〔 総 括 〕

以上の結果より、変異 Cu、Zn-SOD は、野生型よりもグルコースやフルクトースによる糖化反応を受けやすい事が分かった。また、変異 Cu、Zn-SOD は、糖化を受けることによる過酸化水素の産生が増加していることが認められた。これらのことにより、変異 Cu、Zn-SOD は糖化を受けて、局所で活性酸素を生じ、運動神経を障害することにより FALS の原因の一つになっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) では、Cu、Zn-Superoxide dismutase (Cu、Zn-SOD) の遺伝子の変異が 100 種類近く見いだされているが、FALS の発症機構にどのように関与しているかは不明である。本研究では、FALS で見い出されている点変異のうち、G37R、G93A、I113T の変異 Cu、Zn-SOD と野生型をバキュロウイルス/昆虫細胞系より精製し、抗糖化蛋白抗体 (抗ヘキシトールリジン抗体、抗フルクトースリジン抗体) を用い蛋白糖化反応について検討を行っていた。各変異 Cu、Zn-SOD にグルコースやフルクトースを添加した結果、いずれの変異 Cu、Zn-SOD も野生型に比べて、糖化反応の亢進が認められた。また蛋白が糖化反応を受ける際、活性酸素種が生じることが知られているが、グルコースやフルクトースを変異 Cu、Zn-SOD (G93A) に添加すると、野生型に比べ過酸化水素を生じやすくなっていることが報告していた。以上の結果より、変異 Cu、Zn-SOD は、長期間糖化反応を受け続けることにより、局所で活性酸素を生成し、FALS の一要因になっている可能性を提示していた。以上の理由から本研究は、学位の授与に値すると考えられる。