

Title	Cysteine 111 Residue Affects Aberrant Affinity for Copper in Mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase
Author(s)	渡邊, 将平
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47459
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	わた なべ しょう へい 渡 邊 将 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 20960 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	Cysteine 111 Residue Affects Aberrant Affinity for Copper in mutant Cu/Zn Superoxide Dismutase (システイン 111 残基は変異 SOD1 における異常銅親和性に影響する)
論文審査委員	(主査) 教 授 佐古田三郎 (副査) 教 授 戸田 達史 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の主な原因のひとつとして、Copper/Zinc superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子の異常が知られている。発症メカニズムとしては、変異 SOD1 トランスジェニックマウスは発症するが、正常 SOD1 トランスジェニックマウスや SOD1 ノックアウトマウスは発症しないことから、変異 SOD1 による toxic gain-of-function 仮説が考えられている。現在のところ変異 SOD1 の毒性の本態は不明であるものの、銅を介した酸化的ストレスが発症に関与することを示唆する報告は多い。しかし、銅を SOD1 の活性部位に運搬するシャペロン蛋白である Cu chaperone for SOD1 (CCS) をノックアウトしたマウスでも発症に変化がみられなかったことから、銅の FALS の病態への関与を疑問視する意見もある。そこで、我々は SOD1 の活性部位外での銅との相互作用の証明のため、銅親和性クロマトグラフィー (Cu-IMAC) を用いて正常および変異 SOD1 の銅親和性を検討した。また、正常および変異 SOD1 の銅親和性の違いに関与する部位として、過去に変異 SOD1 (H46R) において銅との結合の報告がある SOD1 のシステイン 111 残基 (Cys111) に着目して、付加的に Cys111 をセリンに置換 (C111S) した変異 SOD1 についても検討した。

〔方法ならびに成績〕 正常および変異 SOD1 (A4V、G85R、G93A) 発現ベクター、さらに各変異 SOD1 ベクターに mutagenesis により C111S を追加した発現ベクターおよび対照として C57S を追加した発現ベクターを作成した。各ベクター 2 μ g を 15×10^4 の COS7 細胞に導入して SOD1 蛋白を発現させ、48 時間後に細胞抽出液を調製した。あらかじめ塩化銅 (II) 溶液で飽和しておいた IMAC 用カラムに各細胞抽出液を加え、弱い銅キレート剤であるイミダゾール溶液の濃度を漸増 (0-100 mM) させながら溶出し、最後に強い銅キレート剤である EDTA (50 mM) にてカラムの銅に結合した蛋白をすべて溶出した。各濃度のイミダゾールにて溶出された分画について抗 SOD1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて解析したところ、変異 SOD1 は正常 SOD1 と比べて高濃度のイミダゾールで溶出される傾向がみられ、高い銅親和性を持つことが示唆された。しかし、変異 SOD1 に C111S を追加すると、この高い銅親和性は改善され、正常 SOD1 の溶出パターンに近づく傾向がみられた。これに対して C57S を追加しても、銅親和性に改善はみられなかった。次に、蛋白合成阻害作用をもつシクロヘキシミドを負荷することにより、C111S

による変異 SOD1 蛋白の安定性への影響を検討した。各発現ベクター $1\mu\text{g}$ を 4×10^4 の COS7 細胞に導入した 48 時間後にシクロヘキシミド 1mg/ml を負荷し、さらに 0、6、12 時間後に細胞抽出液を調製した。各反応時間の細胞抽出液について抗 SOD1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により解析したところ、変異 SOD1 にてみられた 12 時間後の SOD1 蛋白量の著明な減衰が C111S を追加することで、改善される傾向がみられた。C57S の追加では改善効果はみられなかった。

〔総括〕 変異 SOD1 は正常 SOD1 と比べて、活性部位外において高い銅親和性を持つことが示唆された。さらに変異 SOD1 において蛋白表面に位置する Cys111 は銅親和性や蛋白質の不安定性に関与する重要な部位であり、Cys111 への細胞内分子の修飾または銅の直接的な結合が変異 SOD1 の毒性に関係する可能性が示唆された。今後、生体内での Cys111 における現象を解明することが、FALS の画期的な治療法の開発につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) の主要な原因のひとつである変異 SOD1 の異常な銅親和性を示し、さらにこの異常な銅親和性に変異 SOD1 のシステイン 111 残基が関与することを証明したものである。本研究の特色は変異 SOD1 の活性部位外での銅との異常な親和性を示すために、目的とする蛋白表面の銅との親和性を解析できる銅親和性クロマトグラフィー (Cu-IMAC) という手法を用いた点にある。さらに、変異 SOD1 のシステイン 111 残基をセリンに置換すると、異常な銅親和性が軽減され、また変異 SOD1 蛋白の不安定性が改善されるという結果は、今後の FALS に対する新規治療法開発につながりうるものである。よって、本研究は学位の授与に値すると考えられる。