The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Monomerized Cu, Zn-superoxide dismutase induces oxidative stress through aberrant Cu binding
Author(s)	岸上, 仁
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54130
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【80】

氏　　名	岸　上　　仁（きし　がみ　ひとし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２３６４９　号
学位授与年月日	平成22年３月23日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Monomerized Cu, Zn-superoxide dismutase induces oxidative stress through aberrant Cu binding （モノマー化した変異SOD1は異常な銅の結合を介して酸化ストレスを誘導する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　佐古田三郎 （副査） 教　授　祖父江憲治　　教　授　武田　雅俊

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、運動ニューロン死をきたす致死的な神経変性疾患である。ALSの約10％は家族性(Familial ALS; FALS)であり、その一部でCu, Zn-superoxide dismutase (SOD1)遺伝子の変異が原因として知られているが、その神経毒性メカニズムは未だに明らかになっていない。SOD1は銅を含有する酵素として知られており、銅を介した酸化ストレスがFALSの病態に関与しうるかについてこれまでに議論されてきた。この観点から、筆者の研究グループではALSと銅、酸化ストレスとの関連につき研究を進めてきた。そして銅キレート剤が変異SOD1マウスの生存期間を延長することを示した。また、固相化銅親和性クロマトグラフィーにて変異SOD1の銅親和性を検討したところ、変異SOD1を導入したCOS7細胞、酵母、トランスジェニックマウス脊髄のいずれにおいても、変異SOD1では、野生型でも見られる銅親和性の低い分画に加え、野生型では見られない銅親和性の高い分画 high-affinity for Cu fraction(SOD1^{HAC})を分離できることがわかった。

本研究では、このSOD1^{HAC}が変異SOD1毒性の機序を解明する手掛かりになると考え、その生化学的性質、酸化ストレスとの関連につき検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

SOD1はダイマーを形成し、各サブユニット内にシステイン残基(Cys)が4つ存在する。うちCys57とCys146は分子内ジスルフィド結合を形成し、遊離で存在するCys111はSOD1の不安定性に関わると言われる。Cysの状態については、システイン残基の修飾剤であるAMSの反応性を検討した。また野生型SOD1のCysを修飾することによるSOD1^{HAC}の出現の有無を検討した。モノマー/ダイマー状態については、ゲル濾過クロマトグラフィーにて検討した。またクロスリンカーを用いモノマー化を阻害したときのSOD1^{HAC}量の変化を検討した。次に、thiol oxidase活性を測定することにより変異SOD1の酸化ストレスへの関与について検討した。その活性は変異SOD1にシステインを反応させた際のシステインの減少量により測定した。最後に、細胞レベルで同様の変化が見られるかを確認するため、変異SOD1ベクターを導入した培養細胞(Neuro2a細胞)にて総thiol濃度の変化を検討した。

SOD1^{HAC} はAMSで修飾されにくかったことから、遊離Cysが何らかの修飾を受けていることが示唆された。そこで野生型SOD1のシステイン残基を過酸化水素、GSNOでそれぞれ処理したところ、SOD1^{HAC}を生成できることがわかった。またMALDI-TOF-MSによりその修飾はCys111に起こっていることがわかった。ゲル濾過クロマトグラフィの結果では、本来SOD1はダイマーであるはずであるが、SOD1^{HAC}の大部分はモノマーに解離していた。またサブユニット間をクロスリンクし、モノマー化を阻害したSOD1では、SOD1^{HAC}を認めなかった。

次に、変異SOD1は野生型SOD1より高いthiol oxidase活性を持つことがわかった。またGSNO処理にてSOD1^{HAC}を獲得した野生型SOD1では、thiol oxidase活性も上昇していた。また変異SOD1にC111S変異を導入するとSOD1^{HAC}は減少するが、これによりthiol oxidase活性も低下した。またクロスリンカーにて変異SOD1のモノマー化を阻害するとthiol oxidase活性も低下した。最後に、変異SOD1を導入したNeuro2a細胞では銅存在下で総thiol濃度が減少することがわかった。

〔　総　　括　〕

変異SOD1は銅を介して毒性を獲得しており、その機序としてCysの関与が示唆された。変異SOD1は、Cys111が翻訳後修飾を受けることでモノマー化し、異常な銅親和性を獲得し、それにより酸化ストレスを増大させているという機序が考えられる。

今後、thiol酸化のターゲットタンパクの検討してゆくことはALSの病態解明に重要な役割を果たすと考えられる。また、治療の面ではSOD1のCys111を保護することでモノマー化を抑制する、あるいは異所性の銅結合部位に対する構造特異的な阻害剤を使用する、といった方法が将来の可能性として考えられる。

論文審査の結果の要旨

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因は未だ不明であり、家族性ALSの原因である変異SOD1の神経毒性機序もわかっていない。本研究により、変異SOD1は銅を介して毒性を獲得し、その機序としてSOD1の111番目のシステインの関与が示唆さ

れた。変異SOD1は、システイン残基が翻訳後修飾により本来の二量体から単量体に解離し、異常な銅の結合が起こり、高いチオール酸化酵素活性を獲得することで酸化ストレスを増大させているという機序が考えられた。

今後、チオール酸化のターゲットを検討することがALSの病態解明につながる可能性があり、治療の面ではSOD1の111番目のシステインの保護や異所性の銅結合部位に対する構造特異的な阻害などの方法が将来の可能性として考えられる。このように本研究はALSの病態解明や将来の治療に重要な役割を果たすと考えられ、博士の学位授与に値するものと認める。