

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：22007～2008
 課題番号：19790231
 研究課題名 (和文) 細胞質型 SOD の臓器特異的ミトコンドリア局在を制御する機構の解明
 研究課題名 (英文) Mechanism of tissue-specific distribution of mitochondrial SOD1
 研究代表者
 松本 紋子 (MATSUMOTO AYAKO)
 大阪大学・微生物病研究所・寄附研究部門助教
 研究者番号：60444519

研究成果の概要：家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) において、ミトコンドリア内の S-ニトロシル化をうけたタンパク質量の減少が報告され、ミトコンドリア内にも局在する Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) の Cu が脱ニトロシル化を促進しているのではないかと推測されたが、根本的な点で矛盾があったので再検討した。生体内での SOD1 による脱ニトロシル化活性は期待できるものではなく、野生型と FALS 変異型 SOD1 において、脱ニトロシル化活性の値に有意差は認められなかったことより、FALS と SOD1 の脱ニトロシル化活性との関連は見出せなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：抗酸化酵素、活性酸素、スーパーオキシドジスムターゼ、筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

生体内で消費される酸素の約 95% はミトコンドリア内膜上の電子伝達系によるが、その 1～2% がスーパーオキシドに変換されると推定されている。すなわち活性酸素種の主な発生源はミトコンドリアである。ミトコンドリアの膜間腔 (Intermembrane space: IMS) にも細胞質型である Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) が局在することは、ミトコンドリア内膜から IMS 側に放出されるスーパー

オキシドを消去するのに重要であると考えられる。筋萎縮性側索硬化症の早期にミトコンドリア障害が見られるが、ミトコンドリア SOD1 との関連性は未知な部分が多い。

2. 研究の目的

家族性筋萎縮性側索硬化症 (FALS) において、ミトコンドリア内の S-ニトロシル化をうけたタンパク質量の減少が報告され、ミトコンドリア SOD1 の Cu が脱ニトロシル化を促進

しているのではないかと推測された。しかし、SOD活性はEDTAのようなキレート剤では阻害されないのに対し、脱ニトロシル化活性は阻害されるという、どちらも活性中心にCuが関与しているにもかかわらず、矛盾した結果が報告されていた。そこで、この矛盾点とミトコンドリア内のS-ニトロシル化との関係を再検討した。

3. 研究の方法

野生型とFALS変異型のリコンビナントSOD1をSf9細胞に発現させ、精製した。また、ニトロシル化転移反応を起こさないように、6番目のシステイン残基をアラニン、111番目のシステイン残基をセリン(C6A/C111S)に変異させたSOD1を大腸菌に発現させ、精製した。それらのSOD1を用いて脱ニトロシル化活性を測定した。GSNOはグルタチオンと亜硝酸ナトリウムを混合して用時調製し、モル吸光係数にて335nm($586\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)と544nm($17.2\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)における濃度を計算した。

4. 研究成果

(1) GSNOは冷暗所にて保存しても溶液中の微量金属と反応して自然分解することが知られており、EDTAなどの金属キレート剤を添加して保存するか、用時調製しなければならない。キレート剤無添加の場合、使い捨てのプ

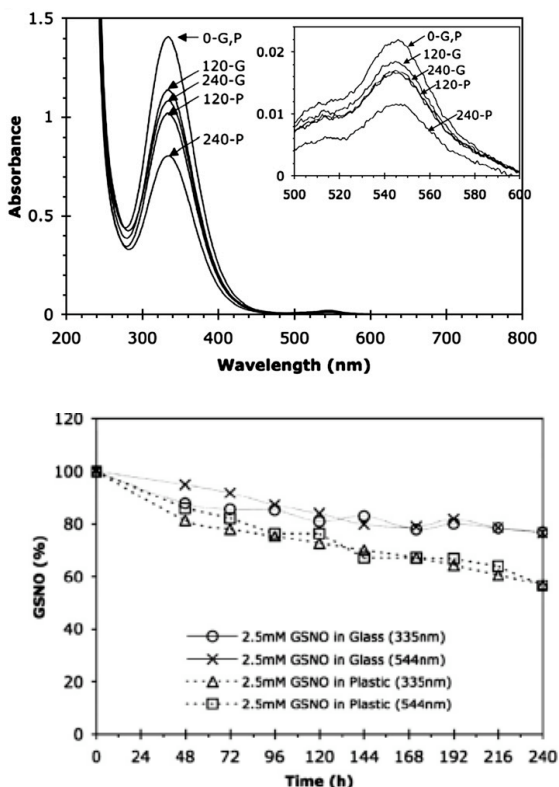


図1. ガラス容器中に保存した時GSNOの自然分解

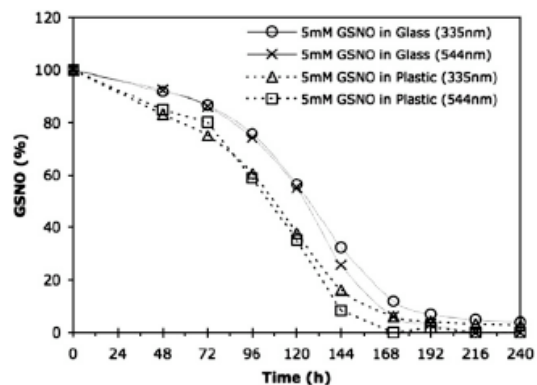
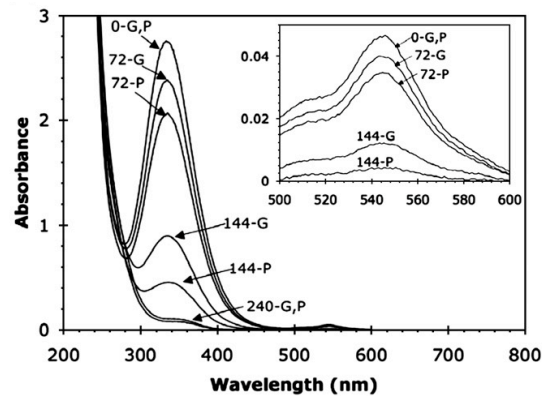


図2. プラスティック容器中に保存した時のGSNOの自然分解

ラスティック容器中に保存すると、ガラス容器中に保存した時よりも速く分解することがわかった(図1, 2)。

(2) GSNOの自然分解産物は既に、GS(O)SG, GS(O)₂SG, GSSGであることがESI-MSによって同定されているが、GSOHとアダクトを形成するDimedoneをGSNOに加えることによって分解が抑制され、その結果、図3のa~dの反応が起きているであろうと推測される。SOHは非常に不安定なのでaの反応はすぐにb以下へと進み、ESI-MSで検出できなかったであろうと考えられていた(図3)。

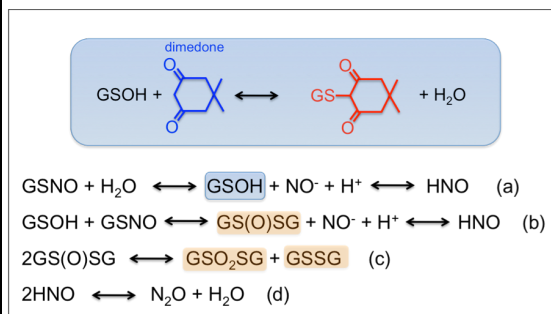


図3. DimedoneとGSNO自然分解産物との反応

Dimedone を水に溶かした GSNO に添加すると自然分解を抑制するとの報告があるが、GSNO は pH に依存して安定性が変化するので、PBS (pH 7.4) 条件下で再検討した。すると Dimedone は GSNO と反応し、325nm と 544nm の両波長で吸光度の増加を示し、モル吸光係数による GSNO の濃度計算が不可能であることがわかった (図 4)。これらの波長の増加は、Dimedone と GSNO の分解 (中間) 産物との反応によるものであろうと推測される。

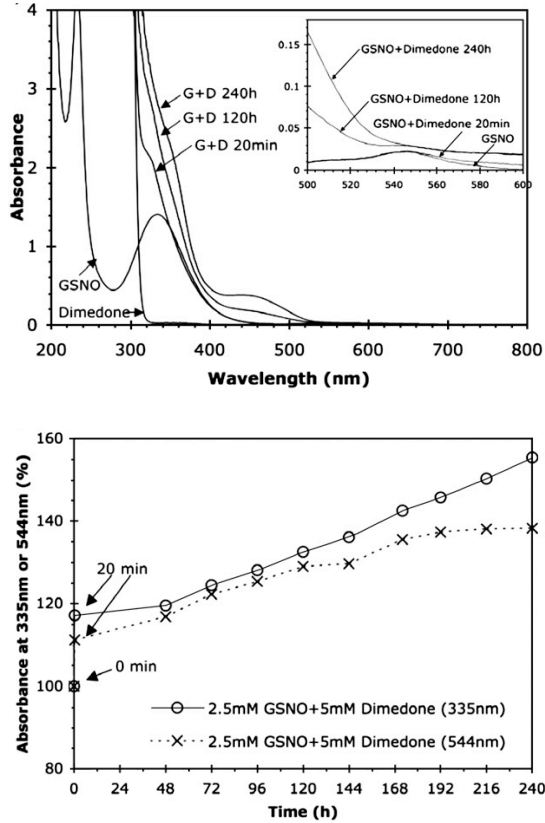


図 4. Dimedone と GSNO の反応

(3) 野生型と FALS 変異型 SOD1 を精製し、脱ニトロシル化活性を測定した。その活性値は非常に低く、生体内での SOD1 における脱ニトロシル化活性は期待できるものではなかった。また、野生型と FALS 変異型 SOD1 において、脱ニトロシル化活性の値に有意差は認められなかったことより、FALS と SOD1 の脱

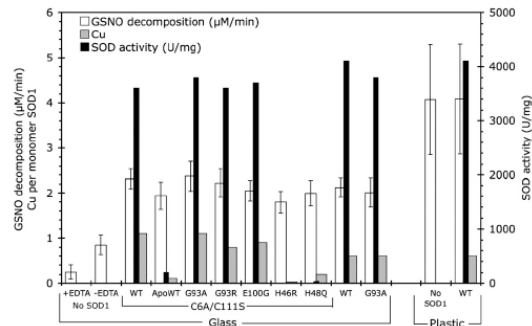


図 5. SOD1 の脱ニトロシル化活性と SOD 活性

ニトロシル化活性との関連は見出せなかった。この実験においても、プラスチック容器を用いると、GSNO の分解速度が増し、非常に低い SOD1 における脱ニトロシル化活性を検出することさえできなかった。また、SOD 活性と脱ニトロシル化活性が相関しないことより、活性中心の Cu は脱ニトロシル化活性とは無関係であることが示唆された (図 5)。

(4) GSNO 自然分解産物の影響を調べるため、11 日間冷暗所で保存した GSNO と用時調製した GSNO の比率を変え、GSNO と GSH の反応を検討した (図 6)。

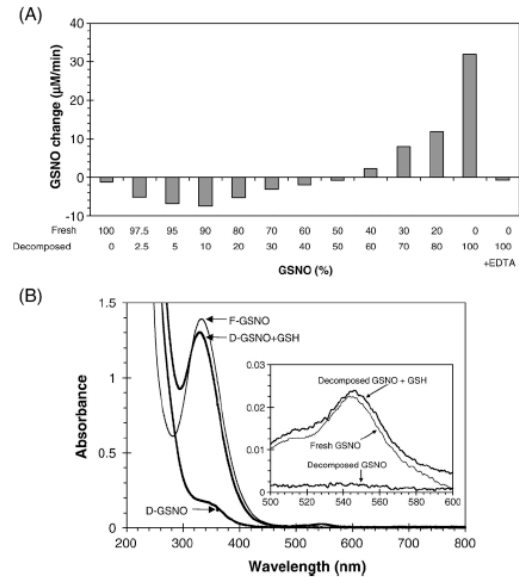
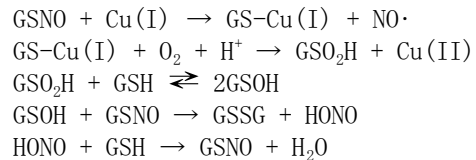


図 6. GSNO 自然分解産物の影響

(A) GSNO 自然分解産物と用時調製後の GSNO の割合を変え、GSH と反応させた際の GSNO 総量の変化をモル吸光係数により算出

(B) GSNO 自然分解産物に GSH を添加した際の吸光度の変化

その結果、GSNO 自然分解産物は GSH と速やかに反応して GSNO を再産生することがわかった。これは以下の反応が起こっている可能性が推測される。



以上の (1) ~ (4) の結果より、野生型と FALS 変異型 SOD1 において、脱ニトロシル化活性の値に有意差は認められず、FALS と SOD1 の脱ニトロシル化活性との関連は見出せなかった。また GSNO 総量の変化は、GSNO の分解産物にも影響されることが示唆された。さらに GSNO の研究をする際の注意点として、実験にプラスチック製品を用いると、それだけで GSNO の分解を促進することがわかった。

これらの研究結果は学術雑誌、Free Radical Biology and Medicine, 43(5), 830-836, 2007 (査読有) に記載されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Ayako Okado-Matsumoto, Irwin Fridovich, Putative denitrosylase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase. Free Radical Biology and Medicine, 43(5), 830-836, 2007, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

① 松本紋子、スーパーオキシドディスムターゼにおける S-ニトロソチオール代謝活性、BMB2008, 2008.12.10, 神戸

② Ayako Okado-Matsumoto, Cystamine effects as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis. SFRBM 15th Annual Meeting, 2008.11.21, Indianapolis, USA

③ 松本紋子、スーパーオキシドディスムターゼにおける S-ニトロソチオール代謝活性、第 61 回日本酸化ストレス学会、2008.6.20, 京都

④ Ayako Okado-Matsumoto, Putative Denitrosylase Activity of Cu, Zn-Superoxide Dismutase. BMB 2007, 2007.12.14, 横浜

⑤ Ayako Okado-Matsumoto, Putative Denitrosylase Activity of Cu, Zn-Superoxide Dismutase. SFRBM 14th Annual Meeting, 2007.11.15, Washington DC, USA.

⑥ Ayako Okado-Matsumoto, Modification of Cysteine 111 in Human Cu, Zn-superoxide Dismutase. The 27th International Symposium of Cancer in Sapporo. 2007. 7.12, 札幌.

⑦ Ayako Okado-Matsumoto, Modification of Cysteine 111 in Human Cu, Zn-superoxide Dismutase. Experimental Biology 2007 Annual Meeting, 2007.4.30, Washington DC, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 紋子 (MATSUMOTO AYAKO)

大阪大学・微生物病研究所・寄附講座助教
研究者番号：60444519

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし