

審査の結果の要旨

氏名 金学正

タンパク質のカルボニル化 (protein carbonylation) は、タンパク質が酸化されてアミノ酸側鎖がカルボニル化される現象である。医学領域では、タンパク質のカルボニル化は細胞レベルおよび個体レベルの酸化的障害や老化に関連すると考えられており、広く研究されている。一方、イヌでも老化に伴って大脳のカルボニル化タンパク質が増加することが知られているが、それ以外の知見は乏しい。本研究では、イヌの代表的な内分泌疾患であるクッシング症候群に着目した。そしてクッシング症候群のイヌでは、慢性的なグルココルチコイド過剰によって体内のタンパク質の酸化的障害が促進されているという仮説に立脚し、以下の研究を実施した。

第1章では、クッシング症候群に罹患したイヌの血清を収集し、優先的または特徴的に増加するカルボニル化タンパク質を探索して同定することを目的とした。東京大学附属動物医療センターに来院し、各種検査でクッシング症候群と確定診断されたイヌ 14 頭の血液を材料として、市販のキットを用い、血清中のカルボニル化タンパク質を検出した。その結果、症例の血液で特徴的にカルボニル化された 35 kD のバンドが観察された。このバンドを質量分析法によって解析したところ、イヌのハプトグロビンであることが確認された。さらに、デンストメトリーを用いてイヌ血中のカルボニル化ハプトグロビンおよび総ハプトグロビンを半定量したところ、健康対照群や炎症性疾患群と比較して症例群で有意な高値であるか、高値の傾向にあった。ハプトグロビンは急性相タンパク質の一つであることから、同じ検体でイヌの代表的な急性相タンパク質である c-反応性タンパク質 (CRP) を測定したところ、血中ハプトグロビンは CRP と関連しなかった。以上より、クッシング症候群のイヌでは炎症以外の機序によってハプトグロビンが誘導され、さらにカルボニル化されて血中を循環する可能性が示された。

第2章では、グルココルチコイドが肝細胞のハプトグロビン産生ならびにカルボニル化に与える影響を観察するため、試験管内実験を行った。健常ビーグル犬由来の初代培養肝細胞を含む市販の培養キットを、細胞のロットを揃えて購入し、実験に供した。I 型コラーゲンでコートした 24 穴プレートに 7.0×10^4 /well の肝細胞を播種し、 $0 \mu\text{M}$ 、生理的濃度 ($5 \mu\text{M}$) あるいは薬理学的高濃度 ($50 \mu\text{M}$) のデキサメタゾンを含む培養液中で、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で 0、

24、48 および 72 時間培養した。ハプトグロビンはデキサメタゾン非存在下または $5\mu\text{M}$ 存在下で同様に産生されたが、 $50\mu\text{M}$ 存在下では産生が抑制された。また、カルボニル化ハプトグロビンは $5\mu\text{M}$ のデキサメタゾン存在下で増加傾向が認められ、他の条件では増加しなかった。つまり、試験管内のイヌ肝細胞ではグルココルチコイドの有無に関わらずハプトグロビン合成が行われるが、生理的濃度のグルココルチコイドの存在下では肝細胞内におけるカルボニル化が促進される可能性が示された。

続いて第 3 章では、血中のハプトグロビンが酸化的条件下で優先的に酸化され、自然の抗酸化物質や酸化マーカーとして働く可能性を確認するために、イヌの血清を過酸化水素 (H_2O_2) で直接酸化し、カルボニル化ハプトグロビンの変動を観察した。その結果、カルボニル化ハプトグロビンは H_2O_2 濃度に依存して増加したが、アルブミンや未同定の低分子タンパク質のカルボニル化がより顕著であった。したがって、酸化的状態にあるイヌ血清では、ハプトグロビンはとくに優先的に酸化されない可能性が高いと考えられた。

以上を総括すると、クッシング症候群のイヌ血中のカルボニル化ハプトグロビンの増加は、全身の炎症や酸化的状況によるものではなく、肝臓のハプトグロビン産生がグルココルチコイドによって直接刺激された結果であると考えられた。また、産生されたハプトグロビンは、肝細胞内の段階で既にカルボニル化することも明らかとなった。したがって、カルボニル化ハプトグロビンは、クッシング症候群や外因性グルココルチコイド投与による肝臓への影響を反映するマーカーや、肝細胞内の酸化的状況を反映するマーカーとして、今後検討する価値があると考えられた。本論文はイヌのハプトグロビンの誘導とカルボニル化を多角的に明らかにしたもので、獣医学の学術上貢献するところが少なくない。よって審査員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。