Osaka University Knowledge Archive

Title	Some Factors That Influence the Nonenzymatic Glycation of Peptides and Polypeptides by Glyceraldehyde
Author(s)	唄, 安夫
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36811
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【71】

氏名・(本籍)	唄(ばい)　安夫(やすお)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 9015 号
学位授与の日付	平成2年3月14日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Some Factors That Influence the Nonenzymatic Glycation of Peptides and Polypeptides by Glyceraldehyde (ペプチド及びポリペプチドのグリセルアルデヒドによる非酵素的糖化反応に及ぼす要因)
論文審査委員	(主査)教授 田川 邦夫 (副査)教授 垂井清一郎　教授 谷口 直之

論文内容の要旨

〔目　的〕

タン白質のアミノ基は糖のカルボニル基と非酵素的にシッフ塩基を形成し，アマドリ転移を経て比較的安定なケトアミンを生成する。例えば，糖尿病のコントロールに用いられているヘモグロビンA_{1c}ではグルコースがβ鎖N末端バリンと結合し安定している。またグリセルアルデヒドは，ヘモグロビンSのα鎖の16位リジンとケトアミンを形成する事により抗鎌状化作用を示す。

この様なタン白質の糖化反応特異性を規制する要因を検討する目的で，モデル反応を用い反応に与える諸条件を検討した。

〔方法ならびに成績〕

酸素化及び脱酸素化条件下で，ヒト及びウマヘモグロビンのN末端のアミノ基とグリセルアルデヒドとの反応性を比較検討した。いずれの反応混合物も，陽イオン交換樹脂（CM52）にて分離され，ヘモグロビンA_{1c}と同様，N末端アミノ基の修飾された画分が早く溶出された。各画分につき，尿素変性によりα及びβ鎖に解離後，トリプシン消化を行い，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にてペプチドマップを得た。各ピークのアミノ酸分析を行い，また^{14}Cの取り込みからN末端アミノ基へのグリセルアルデヒドの結合を求めた。その結果，いずれのヘモグロビンについても，α鎖に比較してβ鎖末端のアミノ基への結合が主であった。またヒトヘモグロビンは，脱酸素化で本結合は促進されたが，ウマヘモグロビンでは促進を認めなかった。ヒトヘモグロビンのβ鎖では2位にヒスチジン残基を有するが他の場合には有さない。そこでヒスチジン残基に注目し，以下の実験を試みた。

一連のアミノ酸，ペプチドとグリセルアルデヒドの反応性を，アミノ基の減少をフルオレスカミン

で蛍光光度的に測定することにより検討した。アミノ酸についてはヒスチジンの反応性が最も強く，アルギニンが続いた。カルボキシル基をアミドやアルコールに置換すると反応性は一般に増大した。C末端を固定しN末端を変化させたジペプチドの反応性についても，ヒスチジルジペプチドが最も高く，アルギニルペプチドがこれに続いた。N末端を固定し，C末端を変化させたジペプチドの反応性についても同様の結果を得た。トリペプチドについても，第2位にヒスチジンを有する場合，反応性は促進した。一般的に，遊離アミノ酸，ジペプド，トリペプチドと鎖が長くなる程反応性は増大した。ヒト及びウマヘモグロビンのα及びβ鎖よりトリプシン消化，HPLC等にてN末端オリゴペプチドを純化し，夫々の反応性を検討した。ヒトヘモグロビンAのβ鎖のN末端より得られた2位にヒスチジンを有するヘプタペプチドは，α鎖のN末端より得られた2位にロイシンを有するヘキサペプチドよりもグリセルアルデヒドに対する反応性は大きく，またウマヘモグロビンのβ鎖のN末端より得られた2位にグルタミンを有するヘプタペプチドよりも中性での反応性は大きかった。りん酸塩はジペプチドとグリセルアルデヒドとの反応性を増大せしめた。2，3－グリセロりん酸はヒスチジンやアルギニンを含むジペプチドの反応性を増大した。一方フィチン酸は，反応性の増大を持たらさなかった。

グリセルアルデヒドとアラニルヒスチジンとの反応物を還元後HPLCにて純化し，プロトンNMRを得た。光学活性なグリセルアルデヒドを用い，反応開始時よりシッフ塩基を$NaCNBH_3$で還元すると，活性中心は保持された。一方，反応終了時に$NaBH_4$で還元すると活性中心は崩壊したが，完全なラセミ化は起こらなかった。即ち反応の律速段階はケトアミンの生成にあることを示唆した。

〔総　括〕

アミノ酸やペプチド，ポリペプチドのN末端のグリセルアルデヒドとの反応性を検討した。速度論的解析等から，反応性は反応近傍の塩基性残基の触媒を受けるものと推察した。この結果が，タン白質糖化の反応残基特異性の検討に応用されるものと考えた。NMRは，モデル反応に於ける理論的な反応中間体，反応経路に合致した。本モデル研究が，糖尿病の合併症，老化，動脈硬化の研究の基礎的なアプローチになる事を期待している。

論文の審査結果の要旨

本研究は，蛋白質の糖化反応（グリケーション）を，ペプチド及びポリペプチドとグリセルアルデヒドのモデル反応にて検討したものである。反応速度論的解析より，本反応は構成アミノ酸の組成，配列，鎖の長さに影響されることを見出した。特に反応近傍のヒスチジン残基の反応促進性は，ヘモグロビンAのN端のグリケーションがβ鎖に選択的である理由に，2位のヒスチジン残基の触媒作用を示唆した。モデル反応のNMR解析より，アマドリ転移が反応の律速段階であることを示した。このモデル反応の結果は，蛋白質のグリケーションに応用し，さらに糖尿病合併症等の研究に有用なるものと考えた。