



| | |
|--------------|---|
| Title | In vivo glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme : identification of glycation sites |
| Author(s) | 高橋, 素子 |
| Citation | 大阪大学, 1995, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/39042 |
| 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

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | 高 橋 素 子 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 1 7 5 9 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 7 年 3 月 23 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻 |
| 学 位 論 文 名 | In vivo glycation of aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme : identification of glycation sites (アルデヒド還元酵素の生体内における糖化部位の決定) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 谷口 直之 (副査) 教 授 岡本 光弘 教 授 高井 義美 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

蛋白質と還元糖との間でおこる Maillard 反応は glycation と呼ばれ、その結果生ずる AGE products は分子内・分子間架橋を形成して蛋白質の構造や機能の変化を引き起こすため、その変化は糖尿病性合併症や老化に深く関与するものとして注目されている。これまでに我々はアルデヒド還元酵素が Maillard 反応の中間代謝産物である 3-deoxyglucosone (3-DG) を NADPH 依存性に還元し、解毒していることを示した。本研究は、このアルデヒド還元酵素自身の糖化について解析することを目的としておこなわれた。

【方法ならびに成績】

1. 糖化アルデヒド還元酵素の単離：ラット肝よりアルデヒド還元酵素を精製し、ボロネートカラムにて糖化画分と非糖化画分に分画した。その結果アルデヒド還元酵素はラットの生体内で糖化をうけており、糖化画分では非糖化画分と比較して活性が低下していることがわかった。
2. アルデヒド還元酵素の糖化部位の決定：糖化による一次構造上の修飾部位を決定するため、糖化アルデヒド還元酵素をトリチウム化水素化ホウ素ナトリウムで還元して糖化部位をラベルし、リジルエンドペプチターゼ消化したのち、HPLC のボロネートカラムで分画することによって糖化ペプチドを得た。糖化ペプチドは抗ヘキシトールリジン抗体と反応した。さらに、そのペプチドを逆相 HPLC で分画し、放射活性を示すペプチドについてアミノ酸シーケンスを決定して糖化を受けた部位を同定した。その結果、修飾部位は N 末端より 22 番目、67 番目、84 番目、140 番目、152 番目のリジンであることがわかった。ペプチドの付加物をマスマスペクトロメトリーによって解析したところ、分子量 164 と 1-デオキシヘキトールに一致し、グルコースによる修飾であることが確認された。
3. 糖尿病モデルラットにおけるアルデヒド還元酵素の糖化：糖尿病ラットはストレプトゾトシンを静注して作製した。糖尿病ラット及び健常ラット腎のホモジネートをボロネートカラムにて糖化画分と非糖化画分とに分画し、ELISA を用いて各画分中のアルデヒド還元酵素を定量することによって、アルデヒド還元酵素の糖化の程度を比較した。その結果、糖尿病ラットでは健常ラットと比較して腎のアルデヒド還元酵素の糖化が進んでいることが明らかとなった。

【総括】

アルデヒド還元酵素の糖化部位は N 末端付近に集中していることがわかった。アルデヒド還元酵素では NADPH

の総部位はC末端に近い263番目のリジン付近にあると考えられている。従って糖化による不活性化はNADPHの結合に直接影響を与えるためではなく、基質の結合や酵素の構造に影響するためと考えられる。アルデヒド還元酵素が糖化を受けて3-DGを代謝する活性が低下すると、AGE productsの生成が促進されるため、この現象は重要である。糖尿病ラットを用いた実験の結果より、アルデヒド還元酵素の糖化が糖尿病合併症の進展に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

糖尿病合併症の成因として蛋白質の非酵素的糖化反応（マイヤー反応）が重要視されている。この反応は老化にも深く関与するものとして注目されている。このマイヤー反応の中間代謝産物の1つである3-デオキシグルコソン（3-DG）は2つのカルボニル基をもつ反応性の高い物質である。3-DGはアルデヒド還元酵素によりNADPH依存性に還元、解毒される。本論文ではアルデヒド還元酵素自身が生体内で糖化を受けて不活性化すること、およびその生体内で糖化される部位が主に140番目のリジンであることを、マスマススペクトロメトリー、抗ヘキシトールリジン抗体等を用いて解明した。この現象は糖尿病合併症の進展に関与することが示唆された。ここでは生体内で糖化された蛋白質の糖化部位を決定しており、糖化蛋白質の解析法に新しい方法を導入した。また本論文により糖尿病合併症の病態と3-デオキシグルコソンの代謝との関係の一端が明らかとなった。

以上のことより、本論文は医学博士の学位を授与するに値すると認定する。