



Title	Fragmentaion of Ceruloplasmin Following Non-Enzymatic Glycation Reaction
Author(s)	Islam, Kazi Nazrul
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39886
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	イ ス ラ ム カ ジ ナ ズ ル Islam Kazi Nazrul
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 5 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 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	Fragmentaion of Ceruloplasmin Following Non - Enzymatic Glycation Reaction (グリケーション反応によるセルロプラスミンの断片化)
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

【背景, 目的】

グルコースやフルクトースなどの還元糖は、グリケーション反応（非酵素的糖化反応）により種々のタンパク質と反応し、翻訳後修飾を引き起こす。これによりタンパク質は不活化され、その機能が障害される。特に分子中に金属を有するタンパク質は、遷移金属の銅や鉄により促進されるフェントン反応を介してヒドロキシラジカルを産生するため、グリケーションにより障害を受けやすいと考えられる。そこで、今回銅を含有している主要な血漿タンパクであるセルロプラスミンが、グリケーション反応によりどのように修飾されていくかを検討した。

【方法】

ウシセルロプラスミンを血漿より精製し、グルコースあるいは過酸化水素とインキュベーションし SDS 電気泳動により断片化の有無を調べた。この断片化がカタラーゼや EDTA の添加、またさらにヒドロキシラジカル消去剤により抑制されるかを調べた。この時、グルコースによる断片化がグリケーション反応によるものであることを確かめるためにグリケーション反応の初期反応生成物のアマドリ化合物を同定する抗ヘキシトールリジン抗体を用いたウェスタンブロット法と糖化タンパク質を認識するボロネートカラムを用いた。またグルコースとのインキュベーションによる銅の遊離を原子吸光法により測定した。さらにこのセルロプラスミンとグルコースとのインキュベーションによりヒドロキシラジカルが実際に生成されているか否かを ESR にて検討した。

【成績, 考察】

セルロプラスミンとグルコースをインキュベーションするとグリケーションを受けることがボロネートカラムにて確認され、またヘキシトールリジンを生成することがウェスタンブロット法にて示された。セルロプラスミンはグルコース (0.1M) とのインキュベーション (3 日間) により断片化が認められ、還元力の強いフルクトースとインキュベーションすると断片化がより著明になった。しかし、還元力を有さないソルビトールによつては断片化は全く認められなかった。また、原子吸光法により銅イオンを測定したところ、セルロプラスミンがグリケーションによる断片化で銅イオンを遊離することが確認された。この断片化はカタラーゼや EDTA、さらにヒドロキシラジカル消去剤 (マンニトール、メチオニンなど) の添加により抑制された。また、過酸化水素 (5 mM) を直接添加するとこの断片化は数分のうちに著明に認められ、これも EDTA によって抑制され、銅イオンの関与が示唆された。さらに、ESR により DMPO を用いるスピントラップ法で、セルロプラスミンがグリケーションによりヒドロキシラジカルが

実際に産生されているかどうかを検討した。その結果、DMPOOHが同定され、ヒドロキシラジカルが確認された。しかし、セルロプラスミンのみ、またはグルコースのみをインキュベーションしてもヒドロキシラジカルの産生は認められなかった。このヒドロキシラジカルの産生もEDTAによって抑制され、銅イオンの関与が示唆された。これらの結果より、グリケーション反応によりスーパーオキシド、過酸化水素、さらに遊離した銅によるフェントン反応により最終的にヒドロキシラジカルが生成され、セルロプラスミンが断片化したと考えられた。グリケーション反応によるこれらの結果は糖尿病合併症と関係しているのではないかと考えられ、また銅イオンの遊離という点では動脈硬化の進展にも関与しているのではないかとと思われる。

【総括】

セルロプラスミンはグリケーション反応の過程で産生される活性酸素、特にヒドロキシラジカルにより断片化される。このグリケーション反応が糖尿病により促進されることより、セルロプラスミンの断片化が糖尿病合併症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

グルコースやフルクトースなどの還元糖はタンパク質のアミノ基と反応していわゆるメイラード反応をおこし、タンパク質やDNAの切断さらには、脂質の過酸化をおこし、糖尿病の進展や合併症に重要な役割を果たす。しかしその機構は不明な点が多い。本論文は、銅含有タンパク質であるセルロプラスミンの分子が、メイラード反応により、切断されることを明らかにしたものである。この機構を検討した結果、メイラード反応により生じたもっとも反応性の高い活性酸素分子種であるヒドロキシラジカルがこの切断の主因であった。このヒドロキシラジカルの生成は、セルロプラスミン分子が切断されて遊離した銅イオンが触媒するフェントン反応によることをESRをもちいたスピントラップ法やヒドロキシラジカルの消去剤により証明した。本研究は、メイラード反応により生成する活性酸素が銅や鉄などの遷移金属を含むタンパク質の分子の切断やDNAの切断にかかわっていることを明らかにしたものであり学位に値する研究と考えられる。