The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Immunological detection of glycated proteins in normal and streptozotocin-induced diabetic rats using anti hexitol-lysine IgG
Author(s)	Theingi, Myint
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39897
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

【11】

氏　　名	Theingi（テインギ）　Myint（ミン）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　12360　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	Immunological detection of glycated proteins in normal and streptozotocin-induced diabetic rats using anti hexitol-lysine IgG （正常ならびにストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットにおける糖化タンパク質の抗ヘキシトールリジン抗体を用いた免疫学的検出）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　谷口　直之 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　岡本　光弘

論　文　内　容　の　要　旨

【背景，目的】

メイラード反応はタンパク質などのアミノ基と還元糖の間に起こる非酵素的反応である。まず，還元糖のアルデヒド基がアミノ基とシッフ塩基を形成し，その後アマドリ化合物を生成する。これは$NaBH_4$により還元してヘキシトールリジンとして同定できる。この反応は，還元糖の量とそれに曝されるタンパク質の寿命が長い程起こりやすいため，生体では血糖値が高い程，また老化が進んでいる程増加すると考えられる。したがって，アマドリ化合物の量は糖尿病や老化の指標となるが，最近メイラード反応によって起こる様々な酵素の失活や細胞機能の低下がこうした病態の原因となっている可能性が注目されている。本研究では，ヘキシトールリジンを合成し，これを兎に免疫することによって特異的抗体を作成し，それを用いて正常と糖尿病ラットでのアマドリ化合物の検出を行った。

【方法，成績】

グルコースとリジンを37℃でインキュベートすることによって生成するアマドリ化合物のフルクトースリジンを$NaBH_4$で還元し，ヘキシトールリジンを合成した。これをグルタルアルデヒドを用いてkeyhole limpet, ovalbumin, bovine serum albuminに結合させ，未反応物を透析により除去したものを抗原として用いた。各100 μgを兎のリンパ節に免疫し，追加免疫を数回行った後に得られた抗血清より免疫グロブリン画分を得た。CH－sepharose 4Bにヘキシトールリジンを結合させて，抗原アフィニティーカラムを作製し，抗ヘキシトールリジン抗体を精製した。BSAを2.5mMのD（＋）グルコースとインキュベートして糖化BSAを作製し，標準試料として用いた。正常ラットとストレプトゾトシンを投与することによって作成した糖尿病ラットの各組織を各種プロテアーゼインヒビター存在下にホモジナイズし，10,000 gの超遠心で得られた上清をイムノブロットで解析する試料として用いた。赤血球については低張液中で溶血後2,000 gで沈殿を除きその上清を用いた。以上の試料をモル比で100倍の$NaBH_4$と4時間反応させて還元した後，10%SDS－PAGEで分離した。電気泳動後PVDF膜に移し，抗体と反応させた。また，本抗体を用いたELISA系を確立し，糖化タンパク質の定量を行った。

まず得られた抗体の特異性をELISAによって検討したところ，非糖化タンパク質とは全く反応性を示さず，$NaBH_4$で還元した糖化タンパク質とのみ反応した。また，本抗体はフルクトース，ガラクトース，もしくはリボースとインキュベートして作製した糖化タンパク質とは反応性を示さなかったことから，グルコースによって糖化されたタンパク質に特異的であることが分かった。次に，正常および糖尿病ラットの脳，心臓，脾臓，肝臓，副腎，腎臓

の各臓器の可溶性画分を本抗体を用いてイムノブロットによって解析した。正常ラットでは特に肝臓で本抗体に反応するタンパク質が多く，腎臓などの他の臓器にもわずかに検出された。一方，糖尿病ラットでは脳，目のレンズ，肺，腎臓など調べたいずれの臓器においても反応するタンパク質が著しく増加していた。血清タンパク質は血糖に曝されているため，他の細胞内タンパク質よりも糖化の程度が著しかった。とりわけ，血清中ではアルブミン，赤血球中ではヘモグロビン，炭酸脱水酵素などが強く糖化を受けていた。

【考察】

糖尿病や老化に伴い糖化を受けたタンパク質が増加し，それがこうした病態と深く関わっていることが明らかになってきたことから，生体におけるメイラード反応の重要性が指摘されている。メイラード反応の役割を明らかにする上で糖化タンパク質の量を正確に見積もることは不可欠な過程である。これまでに Advanced Glycation End Products（ＡＧＥ）とよばれるメイラード反応の最終産物については，抗体の作製や受容体に関する研究はあるが，初期反応産物であるヘキシトールリジンに対する抗体を用いた検討はほとんどない。

今回作製したヘキシトールリジンに対する抗体は特異性が高く，グルコースによって糖化を受けたタンパク質を $NaBH_4$ で還元した場合にのみ反応し，他のフルクトースやリボース，ガラクトースによる糖化タンパク質とは反応しなかった。本抗体を用いて行ったイムノブロットによって，ストレプトゾトシン投与で作製した糖尿病ラットでは，脳をはじめ様々な臓器で糖化タンパク質の量が増加していることが分かった。また，肝臓など一部の臓器では正常状態でもある種のタンパク質が糖化を受けていることが明らかとなった。これは，糖尿病に限らず，加齢とともに糖化タンパク質の量が増すことが，老化に伴う様々な臓器の機能低下に関わっている可能性を示唆するものと思われる。本抗体は，糖尿病や老化にとどまらず，グルコースによる糖化反応の関与する病態の解析にとって有用な検出手段となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

メイラード反応は，タンパク質などのアミノ基と還元糖の間に起こる非酵素的反応であり，老化や糖尿病に重要な役割をはたす。本論文は，メイラード反応の初期反応生成物のアマドリ化合物であるフルクトースリジンをグルコースとＬ－ポリリジンから合成し，さらに $NaBH_4$ で還元して，１－ヘキシトールリジンを合成した。これを，keyhole limpet hemocyanin，卵白アルブミン，ウシ血清アルブミンなどと結合させて，抗原とし，ポリクローナル抗体を作成した。抗体は，抗原アフィニティーカラムにより精製した。本精製抗体は，グルコースによって糖化されたタンパク質に特異的であった。この抗体をもちいて，正常ラットおよびストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの各臓器，血清などにおけるアマドリ化合物の反応性をウェスターンブロッティングで検討した。その結果，糖尿病ラットの血清，各臓器では著しい糖化タンパク質の増加が見いだされた。とくに脳，水晶体，肺，腎臓に多く，また，赤血球ではヘモグロビンのほか，炭酸脱水酵素が著しく糖化されていた。本研究は，抗原の構造とエピトープの明確なアマドリ化合物の特異抗体をはじめて作成したものであり，実験的な糖尿病における糖化タンパク質の研究のみならず，ヒト糖尿病患者の糖化タンパク質を特異的に同定できるもので，有用性が非常に広く，学位に値すると考えられる。