

Title	Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats
Author(s)	星, 歩
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40080
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	ほし 星	あゆむ 歩
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	第 12978 号	
学位授与年月日	平成9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	Glycation and inactivation of sorbitol dehydrogenase in normal and diabetic rats (正常および糖尿病ラットにおけるソルビトール脱水素酵素のグリケーションと不活性化)	
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 中村 敏一	

論文内容の要旨

【目的】

グルコースをソルビトールに還元し、更にフルクトースへと酸化するポリオール代謝経路の亢進は蛋白の非酵素的糖化(グリケーション)反応などと共に糖尿病合併症の原因と考えられている。グルコースをソルビトールに還元する酵素である Aldose Reductase (AR) については研究が進んでおり、その特異的阻害剤は臨床応用もされている。一方、Sorbitol dehydrogenase (SDH) は、ソルビトールをフルクトースに酸化する酵素であるが、アルコール脱水素酵素スーパーファミリーに属する酵素としての視点からの酵素学的研究がされてきているにすぎない。今回、糖尿病ラットでの SDH 蛋白と mRNA の発現について調べ、グリケーション反応のポリオール代謝経路への影響について検討した。

【方法】

7週齢の Wistar 系雄性ラットにストレプトゾトシンを60mg/kg投与して糖尿病ラットを作成し、28から30週後に屠殺して SDH 酵素活性、蛋白、そして mRNA の発現を検討した。対照としては同週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。各臓器は摘出後、20mM リン酸緩衝液 (pH6.5)、2 mM MgCl₂ 溶液中でホモジナイズし、100,000×g で遠心してその上清を SDH の活性測定、Western blot および免疫沈降に供した。活性測定は D-フルクトース存在下で生成する NADH の340nm の吸収を測定して行った。Western blot および免疫沈降法には精製したラット SDH で免疫した家兔の抗血清および精製した IgG 画分を用いた。mRNA の発現はラット SDH の cDNA をプローブとして Northern blot 法にて検出した。精製 SDH のグリケーションは、Chelex-100resin により金属を除去した50mM リン酸緩衝液 (pH7.4)、150mM NaCl、0.025%Na₂S₂O₃ 中で100mM までの還元糖(フルクトース、グルコース)と80 μg の SDH を37°C でインキュベーションして行った。

【成績】

SDH の組織分布について調べたところ、mRNA、蛋白、活性のいずれも他の臓器に比較して肝臓、腎臓、精巣で高かった。精巣においては mRNA と蛋白および活性のレベルに解離が認められた。糖尿病群では、対照群に比較して肝臓における mRNA レベルが上昇しているにもかかわらず蛋白、活性レベルの低下が認められた。その原因を明

らかにするために免疫沈降を行ったところ、糖尿病ではSDHの抗ヘキシトールリジン抗体に対する反応性が上昇していた。更に精製SDHをin vitroでフルクトースおよびグルコースとインキュベートした結果、比活性の低下が見られた。グルコースとインキュベートしたSDHについては、グルコースと蛋白質のリジン残基との間に形成されるグリケーション産物のアマドリ中間体を認識する抗ヘキシトールリジン抗体に対する反応性が上昇しており、この活性低下がグリケーションの結果であることが示唆された。

【総括】

本研究では、ポリオール代謝経路の酵素であるSDHについて、その組織分布ならびに糖尿病ラットにおける発現変動について検討した。SDHは、in vitroでグリケーション反応を受けることにより比活性が低下した。フルクトースではグルコースに比べより速い比活性の低下が認められた。in vivoでは精巣ならびに糖尿病状態の肝臓においてmRNAと蛋白質のレベルの解離が認められること、また肝臓においてはSDHのグリケーションが糖尿病群で進んでいることから、糖尿病状態の肝臓や精巣ではSDHが還元糖により修飾され、比活性と蛋白質レベルの低下が起こる可能性が示唆された。従来、ポリオール代謝経路の亢進は、ARの代謝産物であるソルビトールの細胞内への蓄積が原因となって合併症を引き起こすと考えられてきたが、それよりもSDHの生成物であるフルクトースによるグリケーションが重要である可能性が考えられる。本研究はフルクトースの生成経路であり細胞内のフルクトースの主な供給源であるポリオール代謝経路の合併症における新たな役割を示唆するものとする。

論文審査の結果の要旨

ポリオール代謝経路は糖尿病合併症の原因の一つと考えられているがその機序についてはよくわかっていない。申請者は、ポリオール代謝経路の中間代謝産物であるソルビトールを基質とするソルビトール脱水素酵素（SDH）から生成するフルクトースに注目した。まず、SDHの分離精製と抗体の作成を行った。SDHの組織分布と糖尿病ラットでの変化をタンパク、活性を検討した。mRNAの発現も検討した。SDHのメイラード反応による糖化反応を検討した。その結果、グルコースとインキュベートしたSDHは、抗ヘキシトールリジン抗体（グルコースと蛋白質のリジン残基との間に形成されるグリケーション産物のアマドリ中間体を認識する）に対する反応性が上昇しており、SDH比活性の低下がグリケーションの結果であることが示唆された。このことよりこの代謝経路が合併症を引き起こす原因として非酵素的糖化反応（グリケーション反応）の亢進が重要であることを明らかにした。このことは糖尿病合併症の原因を考える上で大変興味深い。本研究はこれからの糖尿病合併症の研究に一つの方向性を与えるものであり、本論文は学位の授与に値すると思われる。