

Title	Human Erythrocyte Bisphosphoglycerate Mutase : Inactivation by Glycation In Vivo and In Vitro
Author(s)	藤田, 剛
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41217
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	藤 田 剛
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 14309 号
学位授与年月日	平成11年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Human Erythrocyte Bisphosphoglycerate Mutase: Inactivation by Glycation <i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> (ヒト赤血球ビスホスホグリセリン酸ムターゼの <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> におけるグリケーションによる失活)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 高井 義美 教授 中村 敏一

論 文 内 容 の 要 旨

(目的)

2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM) は 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) の合成と分解に関与する多機能酵素で、2,3-DPG 合成活性、2,3-DPG ホスファターゼ活性およびホスホグリセリン酸ムターゼ活性の3種の活性を有する酵素である。ヒト BPGM は赤血球に存在し、2,3-DPG を介してヘモグロビン (Hb) からの酸素の解離に重要な役割を果たしている。糖尿病患者では Hb の β 鎖 N-末端 Val のアミノ基が主にグリケーションを受け、その結果 2,3-DPG との親和性が低下し、末梢組織での酸素解離障害をきたすことが想定されている。私達は糖尿病患者赤血球の BPGM に着目し、2,3-DPG 合成活性を調べたところ、その活性がコントロールに比較して低下していることを見出した。そこで、糖尿病患者での BPGM の活性低下の機序を明らかにする目的で本研究を行なった。

(方法ならびに成績)

糖尿病患者の赤血球中の 2,3-DPG 合成活性と BPGM 蛋白を測定した。BPGM 蛋白は作製した抗ヒト BPGM ウサギ抗体を使用した ELISA 法により測定した。その結果、糖尿病患者の BPGM の比活性は約 14 U/mg とコントロールに比べて約 70% に低下していた。糖尿病患者の BPGM の比活性の低下の機序を調べるため、糖尿病患者のプール赤血球から BPGM を精製した。また、ヒト BPGM 遺伝子をクローニング後、その DNA を導入した *E. coli* から BPGM を精製し、*in vitro* におけるグリケーションに供した。

糖尿病患者赤血球から精製した BPGM の比活性は低く 15 U/mg であった。グリケーションを受けた蛋白に親和性を示すボロン酸カラムにより、精製酵素をさらに分画した。BPGM は非吸着画分と吸着画分に分離された。非吸着画分の比活性はコントロールや組換え型酵素の比活性と同程度であったが、吸着画分の BPGM 活性は認められなかった。また、吸着画分は抗ヘキシトールリシン抗体との反応性を示した。そこで、BPGM のグリケーションによる活性低下を確認するため、精製組換え型酵素を 0.1 M グルコースと 37°C でインキュベートした。その結果、3種の BPGM 活性は経時的に低下した。同時に Amadori 生成物を定量すると経時的に増加した。また、グルコースとインキュベ-

トした BPGM は抗ヘキシトールリシン抗体と反応した。これらの結果から、糖尿病患者 BPGM の活性低下はグリケーションが原因であると考えられた。

次に、BPGM の *in vitro* および *in vivo* におけるグリケーション部位を同定した。グルコースとインキュベートした BPGM をリシルエンドペプチダーゼで消化後、逆相 HPLC で分離した。その結果グリケーションを受けていない BPGM のペプチドマッピングで見られた12ピークの他に余剰ピークとして5つのピークが出現した。各ピークをアミノ酸配列分析した結果、この余剰ピークにグリケーションを受けた Lys 残基を含むペプチド断片が含まれていた。*in vitro* におけるグリケーション部位として、Lys2, Lys4, Lys17, Lys42, Lys158, Lys196が同定された。一方、糖尿病患者から精製した BPGM のボロン酸カラムでの吸着画分を用いて、同様の方法にて、*in vivo* におけるグリケーション部位を同定した。リシルエンドペプチダーゼ消化で得られたペプチド断片のマッピングから、一つの余剰ピークが得られた。そのピークのアミノ酸配列を解析した結果、Lys158のみが *in vivo* におけるグリケーション部位として同定された。

(総括)

1. Hb からの酸素解離に重要な役割を果たしている 2,3-DPG の合成・分解に関与する酵素である BPGM の糖尿病における活性低下の機序について解析を試みた。糖尿病患者から精製した BPGM がボロン酸カラムに吸着し、その吸着画分の BPGM は活性を示さず、抗ヘキシトールリシン抗体と反応した。また、BPGM が *in vitro* におけるグリケーションで経時的に活性を失い、抗ヘキシトールリシン抗体と反応するようになった。
2. BPGM の *in vitro* および *in vivo* におけるグリケーション部位を同定した。*in vitro* におけるグリケーション部位は Lys2, Lys4, Lys17, Lys42, Lys158, Lys196である。また、*in vivo* におけるグリケーション部位は Lys158のみである。
3. *in vitro* および *in vivo* におけるグリケーション部位として、Lys158が一致していたことから、糖尿病患者の BPGM 活性の低下の機序として、赤血球が比較的高い濃度のグルコースに長期間曝されるために、赤血球中の BPGM の158番目の Lys 残基がグリケーションを受け活性低下を起こすことが明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

BPGM はヘモグロビン (Hb) からの酸素の解離に重要な役割を果たしている 2,3-DPG の合成・分解に関与する酵素で、2,3-DPG 合成酵素、2,3-DPG ホスファターゼおよびホスホグリセリン酸ムターゼの3種の酵素活性を有する。

2,3-DPG は Hb に結合して酸素の解離を促進する因子であるが、糖尿病状態で増加する HbA1c では 2,3-DPG の結合部位の近傍が糖化を受けているため、2,3-DPG の結合が阻害されることから、末梢組織の微小循環での酸素の解離が抑えられ Hypoxia を起こすとされている。本研究は、糖尿病患者の BPGM の有する 2,3-DPG 合成活性が低下していることを見だし、その低下の機序を明らかにする目的で行われたもので、糖尿病患者赤血球から精製した酵素のボロン酸カラムへの吸着および抗ヘキシトールリシン抗体との反応性から酵素がグリケーション(糖化)を受けていることを明らかにしている。また、ヒト BPGM 遺伝子をクローニングし、*E. coli* で大量発現させて得た組換え型酵素を用いて、*in vitro* における BPGM の糖化反応によって酵素の有する3種の活性が同様に低下することを確認した。そして、*in vivo* および *in vitro* における糖化酵素の一次構造解析から、Lys158残基が糖化を受けることによって酵素活性が低下することを明らかにしている。

蛋白質のグリケーションは、種々の酵素の活性低下をもたらす、糖尿病合併症への関与の可能性も指摘されている。Hb の酸素解離の制御を行い、生理的意義の大きい 2,3-DPG の合成と分解に直接関わっている BPGM の活性低下機序を明らかにした意義は大きく、本研究は学位の授与に値すると思う。