

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Specific detections of the early process of the glycation reaction by fructose and glucose in diabetic rat lens  |
| Author(s)    | 川崎, 佳巳   |
| Citation     | 大阪大学, 1999, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/41683">https://hdl.handle.net/11094/41683</a>  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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           | 川 崎 佳 巳   |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 4 5 2 7 号   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成11年3月25日  |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科外科系専攻   |
| 学 位 論 文 名     | Specific detections of the early process of the glycation reaction<br>by fructose and glucose in diabetic rat lens<br>(糖尿病ラット水晶体におけるフルクトース及びグルコースによる非<br>酵素的糖化反応の前期生成物の特異的検出) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 田野 保雄<br><br>(副査)<br>教 授 谷口 直之    教 授 岡本 光弘   |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

水晶体蛋白は寿命が長く、非酵素的糖化反応が白内障の成因に関与していることが指摘されている。一方、高血糖状態において、ポリオール経路、すなわちアルドース還元酵素 (AR) によりソルビトールが蓄積する浸透圧仮説も、糖尿病性白内障の発症原因の一つと考えられている。ソルビトールは更にソルビトール脱水素酵素 (SDH) によってフルクトースに代謝されるが、糖尿病ラットでは、水晶体のフルクトース濃度がグルコース濃度近くに上昇することが知られている。in vitro においては、フルクトースは環状構造をとりにくいいため、グルコースよりも非酵素的糖化反応を起こしやすいことが確認されている。そこで、グルコースだけでなく、ポリオール経路から産生されるフルクトースも、水晶体蛋白の非酵素的糖化反応に関与している可能性があると考え、それを実証するため、以下の実験をおこなった。

### 【方法】

ストレプトゾトシン (STZ) 50mg/kg 静注によって誘発した糖尿病ラット水晶体を用いて検討を行い、コントロールラットと比較した。フルクトースによる非酵素的糖化反応 (fructation) の前期生成物を認識する抗体、あるいはグルコースによる非酵素的糖化反応 (glucation) の前期生成物を認識する抗体を用いて解析を行った。水晶体蛋白の fructation および glucation を、糖尿病の罹病期間別 (STZ 静注後、8 週、20 週、24 週、28 週) に、ELISA によって解析した。次に、STZ 静注後 4 週の糖尿病ラット群とコントロールラット群において、水晶体のソルビトール量と fructation の程度を比較した。また、ポリオール経路代謝に関与する酵素 (AR, SDH) のタンパクレベルでの発現を、イムノブロットにて確認した。水晶体蛋白はそのほとんどがクリスタリンと呼ばれる構造蛋白であり、STZ 静注後 20 週のラット水晶体蛋白をゲル濾過によって  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  クリスタリンに分離した後、各々のクリスタリンの fructation および glucation の濃度を、ウェスタンブロッティングと ELISA によって解析を行った。また、in vitro において、水素化シアノほう酸ナトリウム存在下にて fructation させた  $\gamma$  クリスタリンを消化酵素にてペプチドに断片化した後、HPLC, MALDI-TOF-MS による質量解析およびアミノ酸分析によって、fructation の起こった主な部位を決定した。

## 【成績】

糖尿病ラットではコントロールラットと比較して、罹病期間とともに fructation および glucation の亢進が認められた。STZ 静注後28週において fructation が減少しているのは、fructation の進行に伴う架橋形成による水晶体蛋白の不溶化が原因と思われた。コントロールラット群と STZ 静注後4週の糖尿病ラット群との比較では、ソルビトール濃度の上昇とともに fructation が亢進していることが確認された。ポリオール経路代謝に関与する酵素の発現は、AR に関してはコントロールと糖尿病群で差がなかったが、SDH に関しては糖尿病群で亢進していた。 $\alpha$ クリスタリンは、フルクトースならびにグルコースのいずれについてもその糖化のレベルは低いが、 $\beta$ 、および $\gamma$ クリスタリンにおいては、高血糖状態で fructation および glucation とともに亢進していた。in vitro における $\gamma$ クリスタリンのフルクトース付加は、主にN末端のグリシン残基に起こることが確認された。

## 【総括】

糖尿病ラットにおいては、グルコースだけでなく、ポリオール経路から産生されるフルクトースも、水晶体蛋白の非酵素的糖化反応に関与している事が確認された。特に $\beta$ クリスタリン、および $\gamma$ クリスタリンの glucation および fructation が白内障発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

本研究は、フルクトースによる糖化反応 (fructation) の前期生成物を認識する抗体と、グルコースによる糖化反応 (glucation) の前期生成物を認識する抗体を併用し、フルクトース濃度上昇が他臓器よりも顕著であると言われている糖尿病ラット水晶体での、fructation と glucation の寄与を検討したものである。

糖尿病の合併症の2大原因として提唱されているのが、ポリオール経路による浸透圧仮説と、糖化反応である。ポリオール経路において、グルコースはアルドース還元酵素によってソルビトールに代謝され、ソルビトール脱水酵素によってフルクトースに代謝される。in vitro の実験では、フルクトースはグルコースに比べて鎖状構造を作りやすいため、グルコースよりも糖化反応を起こしやすいことが知られている。高血糖状態でこの経路の亢進が認められる臓器では、fructation が合併症の一因となっている可能性が考えられる。しかし、フルクトースとグルコースからはよく似た糖化反応の後期生成物 (AGE) が形成されるため、AGEに着目して両者を区別することはできない。従って、fructation の前期生成物に着目し、その特異的な構造を認識する抗体を作成した。この抗体と、既に作成した glucation の前期生成物を認識する抗体を併用して、解析を行った。

結果は、糖尿病ラット水晶体ではコントロールラットと比較して罹病期間とともに glucation のみならず fructation の亢進も認められたこと、ソルビトール濃度の上昇とともに fructation の亢進が確認されたこと、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンの fructation および glucation が亢進していたこと、以上より、グルコースだけでなく、ポリオール経路から産生されるフルクトースも、水晶体蛋白の糖化反応に関与している事が確認された。特に、 $\beta$ -および $\gamma$ -クリスタリンの glucation のみならず fructation も、糖尿病性白内障の一因である可能性が示唆された。

以上のように、水晶体における、フルクトースによる糖化反応の関与を実証したのは本研究が初めてであり、糖尿病の合併症解明や治療法の確立という観点からも、学位の授与に値すると考えられる。