OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Immunological detection of fructated proteins in vitro and in vivo
Author(s)	宮澤, 伸子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42994
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

【 43 】

氏名	宮澤伸子（みやざわのぶこ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 14840 号
学位授与年月日	平成11年5月28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	Immunological detection of fructated proteins in vitro and in vivo （in vitro および in vivo におけるフルクトースによる糖化タンパクの免疫学的検出）
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

【目的】

糖尿病性合併症の発症メカニズムとして基礎的、臨床的観点から注目されてきた仮説の一つに、高血糖によりもたらされるポリオール代謝異常がある。ポリオール代謝経路の亢進、すなわちアルドース還元酵素（AR）の活性化によりソルビトールが蓄積する。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。一方、還元糖とアミノ基の間で起こる非酵素的糖化反応（グリケーション）の結果生じるタンパク質の構造や機能の変化が、糖尿病のみならず種々の疾患や老化などに関与する可能性が議論されている。還元糖としては血糖であるグルコースがもっとも大量に存在するが、ポリオール代謝経路より生じたフルクトースもまた還元糖であり、グリケーションの点ではむしろグルコースよりも強力に作用する。フルクトースによる糖化反応（Fructation）の前期反応中間体はHeyns生成物とよばれ、グルコースによる糖化反応（Glucation）の結果生じるAmadori生成物とは構造的に異なる。こうした前期反応生成物から蛍光性の後期反応生成物（AGE）が生じる。

今回、糖尿病性合併症に関わるポリオール代謝とグリケーションの二つの仮説の相互関係を明らかにする目的で、Heyns生成物に特異的な抗体の作製を行った。さらに、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットでのHeyns生成物の検出を行い、in vivoでフルクトースによるグリケーションが実際に起こり、糖尿病で亢進していることを確認した。

【方法】

フルクトースとN^{α}-t-Boc-L-Lysineをメタノール中65°Cで反応させて、前期生成物であるFructated N^{α}-t-Boc-Lysineを作製した。TLCプレート上で反応の進行を確認後、陽イオン交換クロマトグラフィーで未反応物を除去した標品について、NMRによる構造解析を行った。Bocを除去した後、Fructated Lysine（FL）をグルタールアルデヒドを用いてOvalbuminに結合させ、これを抗原として兎のリンパ節免疫を行った。その血清よりIgG画分を得て、さらに抗原アフィニティーカラムを通して、抗Fructated Lysine（FL）抗体を精製した。

得られた抗体の特異性をイムノブロットならびにELISAにより検討した。また本抗体に加えて、これまでに開発した、還元したAmadori生成物を認識する抗Hexitol Lysine（HL）抗体を用いてGlucationとFructation反応を比較

検討した。

更に、コントロールならびにストレプトゾトシン誘発糖尿病リットの各組織をプロテアーゼインヒビター存在下にホモジナイズし、超遠心分画した。その上清を試料として、ウエスタンブロッティング法とELISAでフルクトースによる糖化タンパクの解析を行った。

【成績】

作製したFructated N^{α}-t-Boc-LysineのMALDI-TOF/MSによる質量分析の結果から、フルクトースが付加されていることを確認した。作成した抗体を用いて行ったFructated BSAに対する競合ELISAでは、フルクトース、グルコース、リジン、Glucatedリジンは阻害せず、Fructatedリジンのみが阻害作用を示した。各種還元糖とインキュベートしたBSAをELISAとウエスタンブロッティング法で検討した結果、本抗体は、フルクトースとインキュベートしたタンパク質のみを認識していることが明らかになった。

BSAに1～100 mMのフルクトースを加えて37°Cで8日間インキュベートしFructationの進行についてを検討したところ、15 mMから糖化が認められ、50 mM以上で強い糖化反応が検出された。また、抗FL抗体と抗HL抗体を用いて100 mMのフルクトースならびにグルコースによるグリケーションを比較したところ、初期反応生成物はいずれも14日を超えても増加し続けた。この時生成するAGEタンパクのレベルを特異的な蛍光を測定することによって定量したところ、フルクトースの場合はグルコースよりもかなり早期にAGEを生成することが明らかになった。

眼ではポリオール代謝活性が高く、特に糖尿病ではフルクトースの蓄積が認められるので、本抗体を用いてコントロールラットとストレプトゾドシン投与により作成した糖尿病ラットの眼におけるFructationの程度を検討した。その結果、正常ラットでもある程度Fructationを受けており、その程度は加齢と共に増加した。またその程度は糖尿病では著しく亢進していた。イムノブロットによる解析の結果、主に水晶体クリスタリンがFructationを受けていることが分かった。

【総括】

これまでは、糖尿病性合併症の成因として独立に論じられてきたグリケーショントポリオール代謝説について、その接点となるポリオール代謝経路より生成されるフルクトースによる糖化反応に注目して検討を行った。フルクトースによる糖化反応はグルコースより約10倍も速く進むことが知られているが、Heyns生成物を特異的に検出する方法がこれまでに無かったために、生体における糖化反応への寄与についてはほとんど検討されていなかった。今回作成した抗FL抗体は、グルコースによる糖化反応とフルクトースによる糖化反応を簡便に識別できるため、有用性は高いと考えられる。実際に適用したところ糖尿病ラットでは、ポリオール代謝経路から産生されるフルクトースにより水晶体クリスタリンがグリケーションを受けていることが示された。以上の結果から、グルコースばかりではなく、フルクトースによるグリケーションも白内障の発症に関わっている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

メイラード反応は、グルコースやフルクトース等の還元糖が非酵素的にタンパクに付加する反応である。前期反応では、タンパク質などのN末端アミノ基やリジンのεアミノ基が還元糖のカルボニル基と反応してシッフ塩基を経て比較的安定な前期生成物を形成する。この前期反応生成物は、反応する還元糖がグルコースの場合はアマドリ化合物であり、フルクトースの場合はヘインズ生成物と呼ばれ構造的に異なる。後期反応としては、前期生成物から複雑な解裂や縮合を経て反応性の高い中間体が形成され、さらに蛍光性のある後期生成物AGEが形成される。フルクトースによる糖化反応はグルコースより約10倍も速く進むことが知られているが、ヘインズ生成物を特異的に検出する方法がこれまでに無かったために、生体における糖化反応への寄与についてはほとんど検討されていなかった。

ヘインズ生成物に特異的な抗体の作製を行った。抗原N^{ε}-fructated-lysineは、N^{α}-t-Boc-lysineとフルクトースを反応させた後トリフルオロ酢酸による加水分解でBoc基を除いて作製し、NMRおよびMALDI-TOF-MSにより同

定した。この抗原をグルタールアルデヒド存在下でOvalbuminに結合させてウサギにリンパ節免疫をした。抗血清を抗原アフィニティーカラムにて精製し、抗FL抗体とした。本抗体の特異性と定量性をELISAおよびウエスタンブロッティングにて検討した。抗FL抗体によってグルコースによる糖化反応(グルケーション)とフルクトースによる糖化反応(フルクテーション)を簡便に識別できることが明らかになった。

糖尿病ラット水晶体においては、ポリオール代謝が非常に活発であり、ソルビトールからさらに代謝されたフルクトースがグリコース濃度以上に上昇することが報告されている。抗FL抗体を用いてストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット水晶体でのヘインズ生成物の検出を行った結果、in vivoでフルクテーションが実際に起こり、糖尿病で亢進していることを確認した。

本研究は、抗原の構造とエピトープの明確なヘインズ生成物の特異抗体を作製したものであり、タンパクのフルクテーションを検出できる初のポリクローナル抗体の開発に成功したものである。グルコースばかりではなく、フルクトースによるグリケーションも白内障の発症に関わっている可能性が示唆され、グリケーションとポリオール代謝説の二つの仮説の相互関係を明らかにした意義は非常に大きく、学位に値するものと考える。