



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

氏 名	宮 澤 伸 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 4 0 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) をグルタルアルデヒドを用いて Ovalbumin に結合させ、これを抗原として兔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プロットならびに 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、ウェ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^ε-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 とウェ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。イムノプ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と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^ε-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ト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 (グリケーション) 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える。