

## 論文要旨

論文題目 糖尿病診断マーカー物質が糖代謝に与える影響の解析

久保田研究室 佐久間元基

### ・ 序論

代表的な生活習慣病である糖尿病は、日本人の食生活などのライフスタイルの変化により、近年罹患率が増加し続けている。国内の糖尿病患者数は、未治療患者と境界糖尿病例も含めると 1620 万人 (平成 14 年度厚生労働省調査による推定値)であり新たな国民病となっている。糖尿病は、糖尿病性腎症・糖尿病性網膜症・糖尿病性神経障害といった直接的な合併症を引き起こすだけでなく、脳血管障害 (脳梗塞、脳出血) や心筋梗塞のリスクを増大させることが知られており、その予防や早期発見と適切な治療は国民衛生保健上非常に重要である。

糖尿病やその合併症状の診断には、これまでさまざまな診断マーカー物質が提案され臨床的に使われてきている。しかし、その多くに関しては、通常は糖尿病の病態に依存して変化する従属的な因子であり、それ自体が糖尿病の病態を主体的に変化させている病因的な要素であるとは考えられていない。

糖尿病のマーカー物質の一つである 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール (AG) は、グルコースの 1 位炭素の水酸基がデオキシ化された化合物で、細菌から高等動植物にまで、非常に広い範囲の生物の生体内から見つかっている生体内物質である。AG は正常なヒトの生体内では、可逆的なリン酸化以外ほとんど代謝を受けず代謝的に不活性な物質である反面、体液中のレベルを一定に保つための独自のシステムが備わっていることから、生体内で何らかの生理的機能を持った物質であることが推察される。

大腸菌においては、AG の前駆体でグリコーゲンの分解によって生じる 1,5-アンヒドロ-D-フルクトース (AF) の生成量が、菌体内のグリコーゲン蓄積量と相関しており、培地中のグルコースが消費されると同時に AF が AG へと代謝されること、AG にはグリコーゲン蓄積を促進する効果があることが発見され、AG 合成経路によるグリコーゲンの代謝調節モデルが提案されている。ほ乳類でも臓器別の AF 濃度がグリコーゲン蓄積量と相関していることや、白血病由来培養細胞 K-562 の持つ AF の還元能力がグルコースによって阻害されるという報告があり、ほ乳類細胞においても AF・AG がグリコーゲンの代謝調節機構を持っていることが予想される。

## ・実験と結果

### ・実験 1

ほ乳類の臓器のうち最も多くのグリコーゲンを蓄える臓器である肝臓でのグリコーゲン代謝と AF・AG との関係を解析するため、肝臓の代謝モデルとして広く使われているヒト肝ガン由来細胞 HepG2 を材料として用い、以下のような方法で AF・AG によるグリコーゲン代謝への影響を調べた。

1) 予めグルコース濃度 4.5g/l の DMEM 培地中で HepG2 細胞をプレインキュベートしグリコーゲンを蓄積させたあと、DMEM 培地のグルコース濃度を 0g/l もしくは 0.5g/l に下げ、1mg/ml の AF もしくは AG を添加して 12 時間インキュベートしグリコーゲンを消費させた (Fig. 1. 1; Fig. 1. 2)。

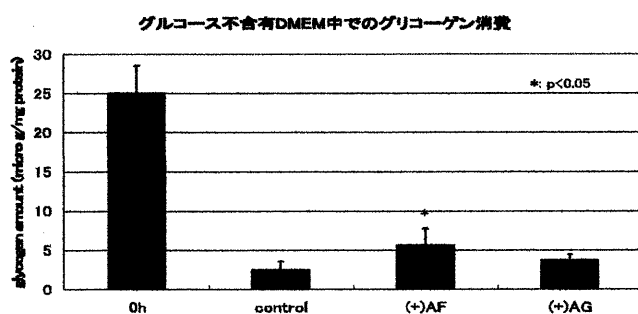


Fig. 1. 1

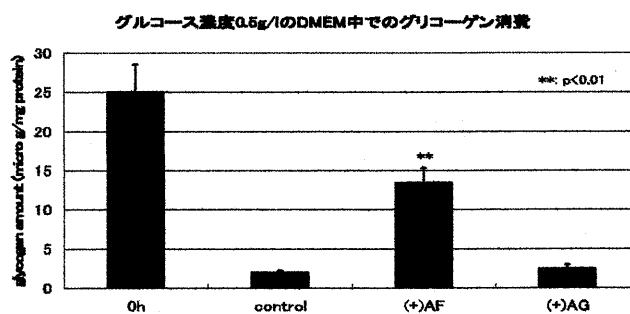


Fig. 1. 2

2) 予めグルコース不含有の DMEM 培地中で HepG2 細胞をプレインキュベートしグリコーゲンを消費させたあと、DMEM 培地のグルコース濃度を 4.5g/l もしくは 2.25g/l に上げ、1mg/ml の AF もしくは AG を添加して 12 時間インキュベートしグリコーゲンを蓄積させた (Fig. 2. 1; Fig. 2. 2)。

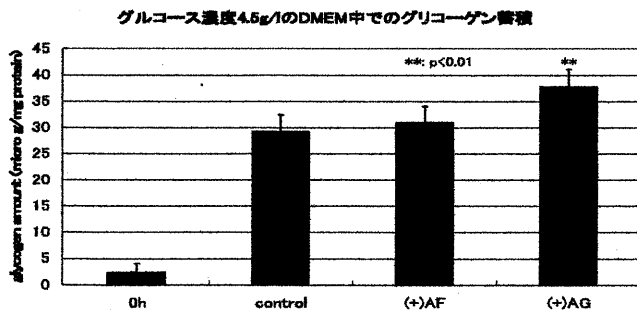


Fig. 2. 1

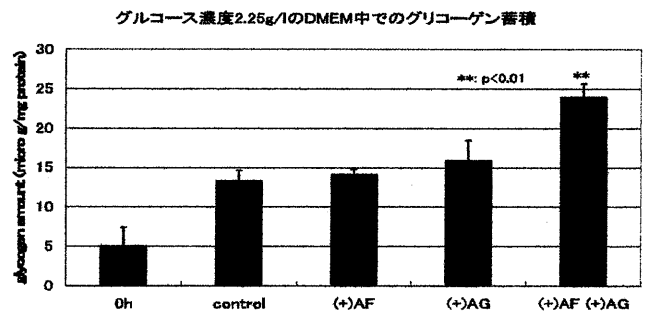


Fig. 2. 2

3) HepG2 細胞を AF 1mg/ml とグルコース濃度 0, 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 4.5 g/l を含む DMEM 培地中で 6 時間インキュベートし、還元されて生じた培地中の AG 量を測定した (Fig. 3. 1)。

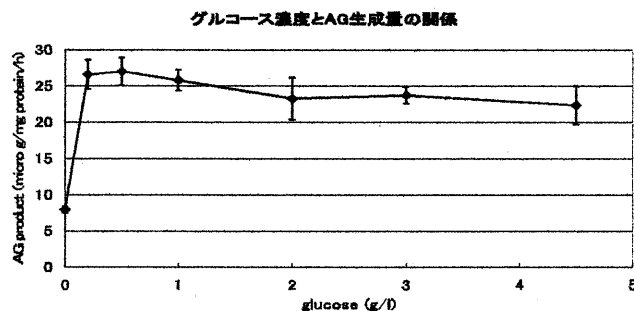


Fig. 3. 1

4) 予めグルコース不含有の DMEM 培地中で HepG2 細胞をプレインキュベートしグリコーゲンを消費させたあと、グルコース濃度 4.5g/l、AF 濃度 1mg/ml の DMEM 中で培養し、0, 1.5, 3, 4.5, 6, 12, 24 時間後の蓄積グリコーゲン量と培地中の AG 量を測定した (Fig. 4.1, Fig. 4. 2)。

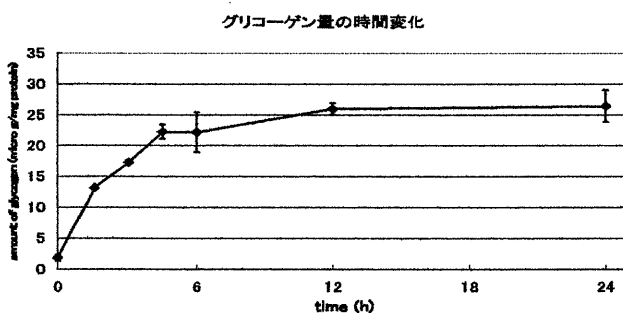


Fig. 4. 1

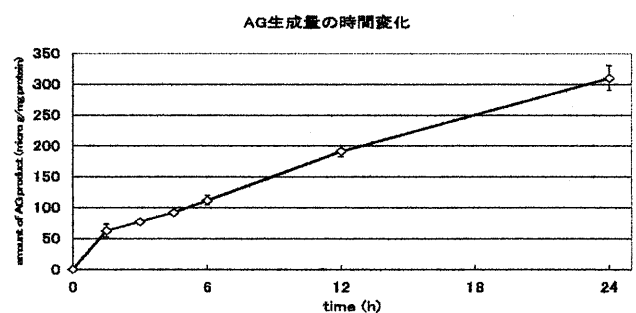


Fig. 4. 2

#### ・考察 1

実験 1-1) より、AF にはグリコーゲンの分解を抑制する効果があるが、AG には抑制効果がないことがわかった一方、実験 1-2) より AG にはグリコーゲンの蓄積を促進する効果があるが、AF には促進効果がないことがわかった。すなわち、AF と AG はともにグリコーゲン蓄積量を増加させる効果があるが、作用を及ぼす方向(分解・蓄積)がそれぞれ異なっているということ

がわかった。

また実験 1-3) より、HepG2 の AF 還元能力はグルコース濃度が 0 の時にもっとも少なく、0.2~0.5g/l 程度の低グルコース濃度で還元力がピークに達し、グルコース濃度が上昇すると緩やかに還元能力が阻害される(グルコース濃度 4.5g/l でピークから 20%減)というパターンを示し、HepG2 細胞ではグルコースが AF 還元能力をあまり強く阻害しないことがわかった。

一方実験 1-4) より、HepG2 のグリコーゲン蓄積量はインキュベート開始後 1.5 時間までに急速に増加したのち、蓄積のペースを落として 6 時間でプラトー値になり 24 時間後まで変化しないが、AG 生成量は培地交換直後の 1.5 時間までに急速に増加したのちは 24 時間後までほぼ一定のペースで増加した。また  $t=1.5h$  の前と後とで、単位時間あたりの AG 生成量は約 4:1 の差があった。このことから、HepG2 細胞での AF 還元能力はグルコースによって直接的には阻害されないものの、グリコーゲンの蓄積量に依存して阻害されていることが示唆された。

以上の結果をまとめ、ほ乳類細胞における AG 合成経路とグリコーゲン代謝調節のモデルを描くと Fig. 5.1 および Fig. 5.2 のようになる。

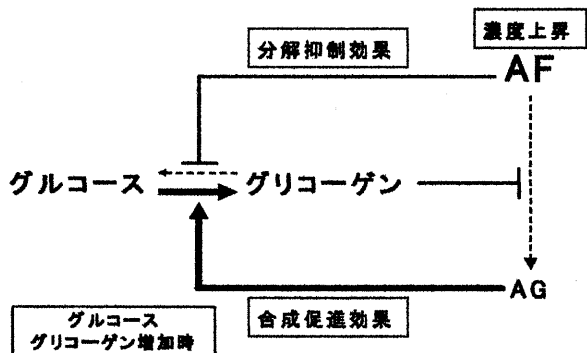


Fig. 5.1

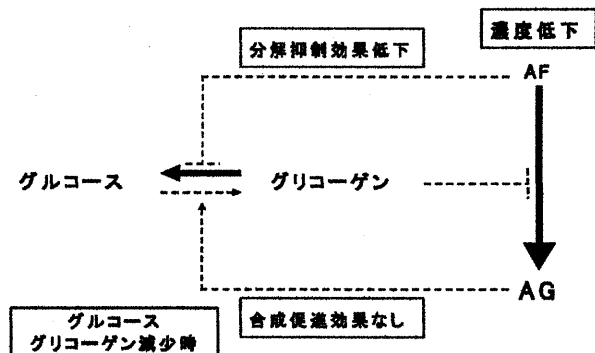


Fig. 5.2

グルコース濃度が高いとき(Fig. 5.1)、AG の効果によりグリコーゲン蓄積が促進され、蓄積したグリコーゲンが AF の還元を阻害するために AF 濃度が上昇し、AF がグリコーゲンの分解を抑制するためグリコーゲンがより一層蓄積するようになる。一方グルコース濃度が低下すると(Fig. 5.2)、グリコーゲンが分解されて AF 還元阻害が解除され、AF 濃度が低下するためグリコーゲンの分解抑制も解除されより一層グリコーゲンが分解される。またこの条件下では AG にはグリコーゲン量を増加させる効果がない。このようなシステムはグリコーゲンの増加・減少変化をよりはっきりさせるように働くと考えられ、既存のグリコーゲン代謝調節機構を補助するような役割を持っていると思われる。

## ・実験 2

ほ乳類細胞での AG 合成経路の役割を分子生物学的手法を用いて解明するため、AG 合成経路の酵素の中で唯一同定ができていて、ブタ肝臓の AF レダクターゼの部分的なアミノ酸配列を元に、マウスの AF レダクターゼ候補遺伝子をクローニングし、組換えタンパク質の

性質を調べて酵素学的に AF リダクターゼであるか確認することとした。

NCBI BLAST プログラムを用い、ブタ AF レダクターゼのアミノ酸配列に対して相同性の高い cDNA を検索したところ、aldo-keto reductase family 1, member E1 (AKR1E1) が最も高い相同性 (アミノ酸一致 66%、類似 78%) を示した。特に基質特異性に関与する構造モチーフの変異と、基質結合ポケットを構成する残基 (Fig. 6. 1) が、その他の近縁な Aldo-keto reductase よりもブタ AF レダクターゼと AKR1E1 との間に強い類似を示した。

protein	residue	48	50	51	80	111	112	114	122	123	220	299	301	303
mouse aldose reductase		A	V	Y	W	H	W	T	Y	F	W	C	L	S
AKR1E1		A	L	Y	W	H	W	M	D	I	--	A	F	T
pig AF reductase		A	L	Y	n.d.	H	W	M	D	L	--	S	F	I

Fig. 6. 1 基質結合ポケットの残基の比較

この AKR1E1 に対する PCR プライマーを設計し、マウス肝臓全 RNA を出発材料にして RT-PCR を行い目的 cDNA を増幅した。この cDNA を発現ベクターに組み込み大腸菌で組換えタンパク質を発現させ、DE52 カラムおよび Red Sepharose CL-6B カラムの二段階で精製し、CBB 染色した SDS-PAGE 上で単一バンドを得た (Fig. 6. 2)。

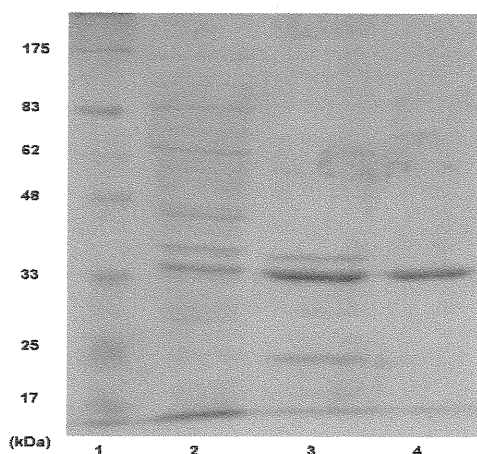


Fig. 6. 2 各精製段階のフラクションの SDS-PAGE 像

レーン 1: 分子量マーカー

レーン 2: 細胞破碎上清

レーン 3: DE52 フラクション

レーン 4: Red Sepharose CL-6B  
フラクション

アクリルアミドゲル濃度: 12%

レーン 1~3 のタンパク量: 10 $\mu$ g

この精製酵素の基質特異性を調べたところ、AF に対する基質特異性が最も高く、ついで 2,3-ブタンジオンへの特異性も高かった。その他のカルボニル化合物、特にヘキソースへの反応性は小さいか検出不能であり、AG を AF に酸化する逆反応は測定されず、ブタ AF レダクターゼの基質特異性と一致した (Table 6. 1)。また反応動力学定数は  $K_m=1.02\text{mM}$  (ブタ酵素:  $0.44\text{mM}$ )、分子回転が 9.3 分子/秒 (ブタ酵素: 8.7 分子/秒) であり、概ね一致した。

Substrate	Concentration (mM)	Relative activity of recombinant protein (%)	Relative activity of pig liver AF reductase (%)
AF	0.3	100	100
Glucose	0.5	n. d.	n. d.
Fructose	0.5	0.9	n. d.
Glucronic acid	0.5	5.1	15.2
2,3-butanedione	0.5	76.4	53.4
DL-glyceraldehyde	0.5	n. d.	n. d.
formaldehyde	0.5	1.9	7.3
acetone	0.5	n. d.	n. d.
9,10-phenanthrenequinone	0.2	18.0	--
AG (reverse reaction)	100	n. d.	n. d.

Table 6. 1 AKR1E1 およびブタ AF レダクターゼの基質特異性

以上のことから、AKR1E1 はマウスにおける AF レダクターゼの遺伝子であることが酵素学的に確認できた。

#### ・まとめ

これまで糖尿病の病態に従属的な因子としてのみ認知されてきたマーカー物質 AG とその代謝経路が、グリコーゲン代謝のコントロールという形で糖代謝に関与し糖尿病の病態をコントロールしているという可能性が示された。また AG 合成経路の酵素 AF レダクターゼの遺伝子をクローニングできたことにより、AG 合成経路の役割の解明に分子生物学的な手法をとることが可能となった。AG 合成経路によるグリコーゲン代謝調節機構の詳細が明らかになれば、糖尿病のより詳細な診断や治療、また新たな治療薬の開発にも繋がることが期待される。