

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 佐久間元基

上記の論文提出者による学位請求論文、「糖尿病診断マーカー物質が糖代謝に与える影響の解析」は、糖尿病のマーカー物質の一つである1,5-アンヒドログルシトール (以下 AG) と、その前駆体でグリコーゲンの分解から生じる1,5-アンヒドロフルクトース (以下 AF) がグリコーゲン代謝に対して与える影響を、肝臓の代謝モデル細胞として広く使われているヒト肝ガン由来細胞 HepG2 を用いて解析したものである。また AG の合成経路の酵素である AF レダクターゼの遺伝子をマウス肝臓よりクローニングし、組換え酵素の性質を解析したものである。

第1章「緒言」では、糖尿病のマーカー物質である AG とその前駆体 AF の諸性質について概論している。グリコーゲンが AF へと分解され、AF が AG へと還元される AF 経路が、大腸菌においてグリコーゲン代謝調節に関与している、という先行研究と、ほ乳類細胞内における AF 代謝とグリコーゲン、グルコースとの関係についての知見から、ほ乳類細胞においても AF 経路によりグリコーゲン代謝が調節されている、という仮説を導き、本研究の位置づけを行っている。

第2章「AF・AG が HepG2 細胞のグリコーゲン代謝に及ぼす効果の解析」では、ほ乳類生体内での主要なグリコーゲン代謝器官である肝臓におけるグリコーゲン代謝と AF・AG の関係を、HepG2 細胞を材料に用いて解析している。グリコーゲンの代謝方向が異なる (蓄積もしくは分解) 条件でのグリコーゲン保持量の変化と、培地中への AF もしくは AG の添加による影響を解析した。その結果、AF はグリコーゲン分解を抑制するが蓄積を促進しない、また AG はグリコーゲン蓄積を促進するが分解を抑制しない、という結果を得ている。

第3章「HepG2 細胞の AF 還元能力とグルコース・グリコーゲンの関係」では、第2章と同じく HepG2 を材料に使い、細胞の持つ AF 還元能力とグルコース・グリコーゲンとの関係を解析している。異なるグルコース濃度条件での AF 還元能力を見た実験と、HepG2 細胞のグリコーゲン蓄積と AF 還元量の時間変化を追った実験から、HepG2 細胞の AF 還元能力はグルコースによっては直接的に阻害されず、グリコーゲンの蓄積量に依存して阻害されている可能性が高い、という結果を得ている。

第4章「マウスの AF レダクターゼの候補遺伝子クローニングと組換えタンパク質の酵素的性質」では、AF から AG への還元を触媒する酵素であり、先行研究でタンパク質の精製が報告されている AF レダクターゼ (ブタ肝臓由来) のアミノ酸配列をもとに、マウスの AF レダクターゼ遺伝子のクローニングを行っている。また組換えタンパク質の発現、ならびに組換えタンパク質の酵素的性質の解析を行っている。検索で候補に挙げられた cDNA、Aldo-keto reductase 1, member E1 (AKR1E1) とブタの AF レダクターゼの間で、アミノ酸配列 (特に基質特異性に関係する箇所)、組換えタンパ

ク質の基質特異性、組換えタンパク質の反応動力的性質、の各点において高度な一致が見られたことを示している。

第5章「総括」では、以上の実験より得られた結果に対して考察を行っている。細胞内でAFおよびAGの対象となっているターゲットが何であるかについての推察を行い、またAF還元能力の阻害が何によって、またどのようにして起こっているのかについての若干の考察を行っている。また、第2章および第3章で得られた知見をもとに、ほ乳類におけるAF経路によるグリコーゲン代謝調節のモデルを提案し、AF経路がグリコーゲンの蓄積・分解の切り換えをより顕著にする役割を持っていると推論している。さらに、分子生物学的な手法によるAF経路の機能解明においてAFレダクターゼ遺伝子を用いることの利点について考察し、AF経路の機能解明が将来糖尿病治療への応用という将来の展望について述べている。

本論文の学位審査会における主な質疑応答を以下に記載する。いずれも適切な答えが得られた。

問：グリコーゲン代謝に対するAF・AGの効果を見る実験において、HepG2を材料として用いたことは妥当であるのか。

答：ほ乳類細胞におけるグリコーゲン代謝とAF経路の関係については先行研究が存在していない。培養細胞という単純化した系を用いて、AF経路とグリコーゲン代謝が関係しているという仮説を確認することを優先した。

問：実験に用いたAF・AGの濃度は妥当か？

答：AGの濃度は生体内のレベルの数十倍、AFの濃度はさらにその10~100倍程度で、いずれも非常に高濃度である。しかし、上でも述べたとおり、まずAF・AGが実際にほ乳類細胞に対して効果を持っているかどうかを確かめるため、正常値以上のレベルでの投与を行った。またAFに関して言えば、細胞膜のAFに対する透過性がきわめて低いため、細胞内での実効濃度は低いと考えられる。

問：実験で見られたグリコーゲン保持量の変化の大きさは、生理的に意味のあるものと考えられるのか。また実際の生体内でAF・AGがどの程度生理的な意味を持っているのか。

答：グリコーゲン代謝を調べる実験では、人為的な条件ではグリコーゲンの蓄積が起こりにくくなることが知られている。もっとも生体内の条件に近い灌流肝臓を用いた実験でも、灌流液中のグルコース濃度を生体内で観測される値よりも高くしないと、有意なグリコーゲン蓄積増加が起これないと報告されている。灌流肝臓よりも生理的な条件から遠ざかる培養細胞の系で、統計的に有意なグリコーゲン保持量変化を観測できたことから、生体内でもAF・AGが十分にグリコーゲン代謝を変化させると考えている。

またAF経路が細菌からほ乳類に至るまで進化的に保存されているという事実は、AF経路が生

理的に意味を持っていることの傍証になると考える。

本論文は、ほ乳類の生体内での役割についてほとんど報告されていない AG と、AG の前駆体である AF、さらに AG の生合成経路である AF 経路が、グリコーゲン代謝を調節するという機能を持っていることを明らかにしている。また、マウスの AF レダクターゼ遺伝子を、既知のブタ肝臓 AF レダクターゼとのアミノ酸配列の相同性だけでなく、酵素学的にも確認している。いずれの研究結果に対しても十分な学術的価値が認められ、従って、本審査委員会は博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。