

# 審査結果の要旨

論文題目 「カルボニル化合物による蛋白の修飾と生体への影響」

学位申請者 山口 広子

本論文は、加齢や生活習慣病の進行に伴って蓄積が増加することが知られている終末糖化産物 (AGEs: Advanced glycation end-products) の測定系を確立し、その病態との関連性を評価したものである。我が国では、40 歳以上を対象とした特定健康診査において、高血糖の保健指導判定値として空腹時血糖が 100 mg/dL 以上またはヘモグロビン A1c (HbA1c) が 5.6%以上とされている。これらの基準値を超えた高血糖は 2 型糖尿病の疑いがあるとされ、受診勧奨判定値としては空腹時血糖が 126 mg/dL 以上または HbA1c が 6.5%以上とされている。慢性的な高血糖によって引き起こされる生体の恒常性の破綻は 2 型糖尿病の特徴であり、最終的には代謝異常による広範囲な血管障害を引き起こす。本研究では、糖代謝異常により生成される 2 つの AGEs に着目している。具体的には、解糖経路の亢進で生成される *N*<sup>ε</sup>-(5-hydroxy-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)ornithine (MG-H1) と、ポリオール経路の亢進で生成されるグルコースリジン (GL) を対象とし、それぞれの AGEs を免疫化学的手法および質量分析装置を用いた生体 AGEs の高感度測定系を確立し、糖尿病合併症に關与する代謝異常の評価を行っている。本論文の構成は以下の通りである。

第 1 章では、メチルグリオキサール由来 AGE である MG-H1 修飾タンパク質の免疫化学的な測定系の確立について述べられている。MG-H1 は解糖系より生成することが知られているが、迅速な測定系がないことから特定の研究機関でしか測定がなされていない。申請者はモノクローナル抗 MG-H1 抗体を使用し、免疫化学的手法による簡便な MG-H1 の測定系を確立している。そして 2 種類の免疫化学的手法 (ELISA 法とウェスタンブロット法) を使用してメチルグリオキサール修飾タンパク質の検出に有効であり、さらに機器分析手法で定量した含量と正の相関があることを確認したことから、今後、抗体を用いた MG-H1 の定量が代謝評価に有用であることを示している。

第 2 章では、フルクトース由来 AGE である GL を用いたポリオール経路の活性評価および 2 型糖尿病合併症との関連性評価について報告している。これまで血液中の GL 測定は困難とされていたが、血清の前処理条件を検討することで、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析 (LC-MS/MS) での定量系を確立している。さらに GL の生成経路を確認する目的で、アルドースレダクターゼを欠損させた不死化マウスシュワン細胞を使用して、高糖条件下に曝露した際の細胞および培養培地における GL 産生量の低下を確認している。その結果、GL がポリオール経路下流の活性を反映しており、かつ細胞内で産生された GL が細胞外に放出されることを確認していることから、血液における GL 測定はポリオール経路を評価できる可能性が高いことを報告している。そこで臨床研究に進んだ所、2 型糖尿病患者の GL レベルは健常者よりも有意に高いこと、さらに血管合併症の発症によって、より高値を示すことを見いだしている。しかしながら、現在糖尿病の診断マーカーとして使用されているヘモグロビン A1c (HbA1c) は変化しなかったことから、HbA1c は血糖値の変動を評価できるが合併症の発症予測はできないのに対して、GL 測定は糖尿病血管合併症の発症予測に有望であることをはじめて報告している。これら報告は詳細かつ的確に述べられており、学術的な価値が高いと判断される。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。

したがって、学位申請者 山口 広子 氏は東海大学博士（農学）の学位を授与されるに値すると判断した。

#### 論文審査委員

|    |           |       |        |                 |
|----|-----------|-------|--------|-----------------|
| 主査 | 博士（工学）    | 米田 一成 | 農学部教授  | （生物科学研究科生物科学専攻） |
| 委員 | 薬学博士      | 小野 政輝 | 農学部教授  | （生物科学研究科生物科学専攻） |
| 委員 | 博士（農学）    | 木下 英樹 | 農学部准教授 | （生物科学研究科生物科学専攻） |
| 委員 | 博士（環境共生学） | 平野 将司 | 農学部准教授 | （生物科学研究科生物科学専攻） |
| 委員 | 博士（医学）    | 永井 竜児 | 農学部教授  | （生物科学研究科生物科学専攻） |