

5/1
1999
127
①

寄	贈
山 岡 孝 氏	平成
	年
	月
	日

筑波大学

博士（医学）学位論文

糖尿病性慢性合併症の研究

—— ヒトアルドース還元酵素に関する分子生物学的検討 ——

1991

筑波大学大学院博士課程医学研究科

山岡 孝

目次

第 1 章 緒言	1
(I) ポリオールとポリオール経路	1
(II) ポリオール経路とアルドース還元酵素 (A R) 研究の歴史	2
(III) ポリオール経路と糖尿病性慢性合併症	3
① ソルビトールの過剰蓄積と浸透圧仮説	3
② ミオイノシトールの減少とポリオール経路	4
③ Na^+/K^+ -ATPase の活性低下とポリオール経路	5
④ A R の存在部位	5
⑤ A R 阻害剤	6
(IV) 研究目的	6
第 2 章 バキュロウイルスー昆虫細胞系を用いて 発現させた h A R の精製とその特性	8
[はじめに]	8
[方法]	9
(I) バキュロウイルスー昆虫細胞発現系	10
① S F 9 細胞への遺伝子導入	10
② ウイルスのタイトレーション	10
③ プラークスクリーニング	10
④ 大量培養	11
(II) 組換え h A R の精製	11
(III) 組換え h A R の特性	11
① 分子量	12
② 等電点	12
③ N 端のプロセシングと修飾	12
④ C 端のプロセシング	12
⑤ 糖鎖の結合	13
⑥ 酵素学的検討	14

⑦ A R 阻害剤の効果	-----	1 4
[結果]	-----	1 4
(I) バキュロウィルス-昆虫細胞系による h A R の発現	---	1 4
(II) 組換え h A R の精製	-----	1 4
(III) 組換え h A R の特性	-----	1 5
① 分子量	-----	1 5
② 等電点	-----	1 5
③ N 端のプロセシングと修飾	-----	1 5
④ C 端のプロセシング	-----	1 5
⑤ 糖鎖の結合	-----	1 6
⑥ 酵素学的検討	-----	1 6
⑦ A R 阻害剤の効果	-----	1 6
[考察]	-----	1 6
[小括]	-----	1 9

第 3 章 部位特異的変異誘発法を用いた h A R の		
構造活性相関の解析	-----	2 0
[はじめに]	-----	2 0
[方法]	-----	2 2
(I) 部位特異的変異誘発法	-----	2 2
(II) 変異 A R 蛋白質の発現と精製	-----	2 3
(III) 基質、補酵素、A R 阻害剤に対する親和性	-----	2 3
[結果]	-----	2 3
(I) L y s - 2 6 3 が変異した h A R	-----	2 3
① glyceraldehyde に対する親和性	-----	2 3
② N A D P H に対する親和性	-----	2 4
③ A R 阻害剤に対する親和性	-----	2 4
(II) H i s - 4 2、H i s - 1 8 8 がそれぞれ		
変異した h A R	-----	2 4
① glyceraldehyde に対する親和性	-----	2 4
② N A D P H に対する親和性	-----	2 4

③ A R 阻害剤に対する親和性	-----	2 5
[考察]	-----	2 5
(I) L y s - 2 6 3 が変異した h A R	-----	2 5
(II) H i s - 4 2、H i s - 1 8 8 がそれぞれ 変異した h A R	-----	2 6
[小括]	-----	2 6
 第 4 章 h A R c D N A を導入したトランスジェニック マウスの作成	-----	2 8
[はじめに]	-----	2 8
[方法]	-----	2 9
(I) ベクターの作成	-----	2 9
(II) Founder の作成	-----	3 0
(III) Southern blotting	-----	3 0
(IV) Northern blotting	-----	3 0
(V) 病理組織学的検討	-----	3 0
(VI) ガラクトース負荷	-----	3 1
[結果]	-----	3 1
(I) Founder の作成と継代	-----	3 1
(II) Northern blotting	-----	3 1
(III) 病理組織学的検討	-----	3 2
(IV) ガラクトース負荷	-----	3 2
[考察]	-----	3 2
(I) Founder の作成と継代	-----	3 2
(II) Northern blotting	-----	3 3
(III) h A R 陽性マウスにおける糖尿病性慢性合併症の発生	-----	3 4
[小括]	-----	3 5
 第 5 章 全体的な考按	-----	3 7

第6章 総括	-----	4 0
謝辞	-----	4 1
参考文献	-----	4 2
図表	-----	5 1

略語
(出現順)

AR	; アルドース還元酵素
hAR	; ヒトアルドース還元酵素
SDH	; ソルビトールデヒドロゲナーゼ
cDNA	; complementary DNA
PI	; ホスファチジルイノシトール
PIP ₂	; ホスファチジルイノシトール-4、5-二リン酸
DG	; 1、2-ジアシル-sn-グリセロール
IP ₃	; イノシトール-1、4、5-三リン酸
NPV	; 核多角体病ウイルス
AcNPV	; <i>Autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
SF9	; <i>Spodoptera frugiperda</i> (蛾) の小腸由来の培養細胞
pfu	; plaque forming unit
SDS-PAGE	; ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動
2-ME	; 2-メルカプトエタノール
DTT	; ジチオスレイトール
HPLC	; 高速液体クロマトグラフィー
TFA	; トリフルオロ酢酸
TPCK	; トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン

PVDF ; polyvinylidene difluoride

IC₅₀ ; 50%阻害濃度

K_m ; ミカエリス定数

K_{cat} ; 触媒定数

AcAR ; hARcDNAが組込まれたAcNPV

pI ; 等電点

RHAR ; 組換えhAR

HT ; ヒト睪丸AR

RT ; ラット睪丸AR

RL ; ラット水晶体AR

RaL ; ウサギ水晶体AR

PLP-AMP ; pyridoxal 5'-diphospho-5'-adenosine

OPC ; オリゴヌクレオチド精製カートリッジ

MHC ; 主要組織適応複合体

SV40 ; simian virus 40

BDF₁ ; C57BL/6とDBA/2との交配によって得られたF₁マウス

AR陽性マウス; Southern blotting によってhARの導入が確認されたマウス

HE ; ヘマトキシリン、エオジン

PTAH ; リンタングステン酸ヘマトキシリン

PAM ; 過ヨウ素酸メセナミン銀