

第5章 全体的な考按

糖尿病性慢性合併症の発症機構におけるポリオール経路の関与を明らかにし、さらにその律速酵素であるARのより良い阻害剤の開発を促して、治療に役立てるために、我々は本研究を進めてきた。

まず、第2章で述べたように、hAR cDNAをバキュロウイルスー昆虫細胞系によって大量に発現させ、短時間で簡単に、しかも高収量で純度の高いhARを精製する方法を確立した。さらに、この組換えhARの分子量、等電点、蛋白プロセッシング、蛋白修飾、酵素学的性質、阻害剤に対する親和性などを詳細に検討した結果、ヒト組織中から精製されたARとの相違は見いだせず、同一性が示された。均質で純度が高く、ヒト組織中と同一のhARを大量に供給するシステムが完成したことによって、多くの糖尿病研究者たちがこのhARを標準蛋白標品として実験に供することが可能になり、いちいち動物やヒトの組織からARを精製する必要がなくなり、精製途中に発生するAR蛋白の変性によるデータのばらつきからも解放されることになる。また、AR阻害剤を開発し、スクリーニングテストに供する場合に、動物組織のARに対する阻害効果をその判定基準とすることが多いが、ARに対する阻害剤の効果には種差が存在するため、ヒト組織と同一のARをスクリーニングテストに用いることが望ましい。バキュロウイルスー昆虫細胞系で発現させたhAR標品はこの条件に最もふさわしく、より有効性の高いAR阻害剤を開発するために、大きな貢献をされると考えられる。さらに、将来的にはhARを結晶化し、X線回析によってその活性中心を解析する道が開けたことになる。活性中心の3次元構造が解明されれば、大型コンピューターで計算して、それに相補的な薬物をデザインすることが可能となる。この薬剤は、特異的にhARのみを認識するため効果が確実で副作用の少ない究極のAR阻害剤といえる。

ARの結晶をX線回析する場合に、基質や補酵素あるいは、AR阻害剤を結合した

状態で結晶化されているのであれば、それらの結合の状態は明確にされるが、そうでない場合には基質や補酵素との結合部位を後から推定しなければならない。そのときに、基質との結合に与るアミノ酸残基や触媒中心に参加するアミノ酸残基が判明していれば、その構造活性相関を3次元的に解明することが容易になる。そのような目的で我々は h A R の活性発現に重要なアミノ酸残基であると考えられる H i s - 4 2、H i s - 1 8 8、L y s - 2 6 3 を他のアミノ酸に置換した変異 A R を作成し、基質、補酵素、A R 阻害剤との親和性を検討した。H i s - 4 2、1 8 8 のいずれかが触媒中心に参加しているであろうという予想は実験結果から否定されたけれども、L y s - 2 6 3 が基質のアルデヒド基と結合し、A R 阻害剤との結合にも重要なはたらきをしていることが、示唆された。今後、A R の補酵素結合部位や触媒中心を探る手段として、部位特異的変異誘発法はアミノ酸残基の化学修飾法よりも有用な手段と考えられる。また、L y s - 2 6 3 が基質のアルデヒド基と結合していることをより直接的に検討するために、放射性ラベルをした基質と A R とを NaBH_4 で架橋し、プロテアーゼで分解後、結合部のペプチドを精製してアミノ酸配列を決定するという実験も行う予定である。

第4章で述べた、h A R を導入したトランスジェニックマウスに関する検討はまだ始まったばかりである。h A R 遺伝子の導入が Southern blotting で確認され、h A R m R N A の発現は northern blotting によって証明された。さらに病理組織学的所見として、腎系球体の浸出性病変類似の変化、白内障、網膜血管の小動脈瘤形成などが認められた。したがって、このマウスを用いることによって、いくつかの要因が複雑に関与しながら発症する糖尿病性合併症におけるポリオール経路の位置付けが明確になるものと期待される。糖尿病状態におけるさまざまな代謝異常のなかから、ポリオール代謝の亢進という異常だけを純粹に作り出すことによって、糖尿病性慢性合併症はどの臓器においてどのように具現されるのであろうか。ポリオール代謝の亢進は糖尿病性合併症の初期変化に主に関与するとされているが、糖尿病性合併症の初期以降の変化は、ポリオールの蓄積が引金となって、二次的に発生してくるものなのであろうか。それとも、ポリオールの蓄積以外の要因が加わらなければ、糖尿病性慢性合併症はある一定の段階で進行が停

止するのでしょうか。このような疑問に回答を与える最も有効な手段がhARを導入したトランスジェニックマウスである。また、hARを導入したマウスにさらにフルクトキナーゼ遺伝子を導入し、ポリオール経路と解糖系とをつなぐことによってポリオールの蓄積を防ぎ、糖尿病性慢性合併症を発症しにくくすることができれば、糖尿病性慢性合併症の遺伝子治療モデルとなるであろう。

今後も、hARを導入したトランスジェニックマウスの解析を中心として、糖尿病性慢性合併症の成因とポリオール経路との関係をより明確にし、合併症の診断、予防、治療に貢献しうる研究を推進したいと考えている。