

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05544

研究課題名(和文) 食事性終末糖化産物がRAGEを介したシグナル伝達に与える影響の解明

研究課題名(英文) Effect of dietary AGEs on RAGE-mediated signal transduction

研究代表者

小堀 俊郎 (Kobori, Toshiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：10353971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物(AGEs)はタンパク質側鎖が糖によって修飾された多様な分子種の総称であり、食品加工に加え生体内でも非酵素的に生成する。本研究では、ペプチドに消化された食事性(ペプチド型)AGEsは内因性(タンパク質型)AGEsによる受容体RAGEを介した生体影響を減弱しうるのではないかとする作業仮説を検証するため、種々のAGEsのRAGE結合性及び細胞影響を解析した。その結果、AGEsのRAGE結合性と活性酸素発生量は相関すること、タンパク質型AGEsの断片化はRAGE結合性を低下させること、タンパク質型AGEsによる活性酸素の発生がペプチド型AGEsの添加により緩和されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド型の食事性AGEsもタンパク質型の内因性AGEsと同様にRAGEを介した加齢性疾患の一因とする考え方が一般的だが、タンパク質型AGEsとペプチド型AGEsが共存する環境では、前者によるRAGEを介した生体影響が後者によって緩和され、RAGEを契機としたシグナル伝達がAGEsの存在形態によって変動する可能性が示唆された。引き続き検討は必要だが、得られた成果は内因性AGEsの多寡に応じた食生活改善に活用できる知見となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Advanced Glycation End products (AGEs) are a group of amino acids modifications produced with sugars or di-carbonyls, and some AGEs are known to affect health through binding to receptor of AGEs (RAGE). To clarify if peptide-linked AGEs could reduce cellular inflammation through RAGE triggered by protein-linked AGEs, RAGE-binding and cellular effect of protein- and peptide-linked AGEs were analyzed. Superoxide anion was produced in HUVEC upon AGEs, and the production level was correlated with its RAGE binding activity. Proteolysis of protein-linked AGEs reduced its RAGE-binding activity. Furthermore, superoxide anion production by protein-linked AGEs was reduced by adding peptide-linked AGEs to the culture medium. These results suggest that RAGE-mediated signal transduction by intrinsic AGEs might be reduced by dietary AGEs.

研究分野：食品科学

キーワード：終末糖化産物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

終末糖化産物 (AGEs) は糖がタンパク質側鎖に結合してできる多様な化合物の総称である。食品加工時のメイラード反応によって生成するほか、体内でもメイラード反応や糖代謝産物との非酵素反応により生成し (内因性 AGEs) これまで約 50 種類が同定されている。近年、内因性 AGEs の一部が RAGE との結合を介して加齢性疾患 (糖尿病性合併症、動脈硬化、関節リウマチ等) を誘発することから注目されている。食品として摂取した AGEs (食事性 AGEs) と内因性 AGEs に含まれる化学構造は同じであるため、食事性 AGEs も加齢性疾患の一因とする考え方が一般的である。

内在性 AGEs は、血管内皮の細胞膜に存在する RAGE を会合させて加齢性疾患を惹起するシグナルを発生させるほか、RAGE 遺伝子のさらなる発現を亢進するフィードバック機構を駆動させる。この機構が正しいとすれば、ペプチドあるいはアミノ酸まで断片化した食事性 AGEs は、1 分子中に複数の AGEs 修飾残基を持つ可能性が低下するため、RAGE には結合するが RAGE の会合を誘導できず、シグナルは発生しないと推測される。実際、食事性 AGEs で処理した細胞では NF- κ B の発現レベルが弱いとの報告もある。さらに、RAGE と食事性 AGEs との結合は内因性 AGEs との結合と競合しうることを踏まえ、食事性 AGEs は内在性 AGEs による加齢性疾患の惹起を減弱しうるのではないかと作業仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「食事性 AGEs は内在性 AGEs による加齢性疾患の惹起を減弱しうる」という作業仮説を検証することである。これまでに ELISA や機器分析等の分析手法が確立されているのはカルボキシメチルリジン (CML) 等に限られるため、本研究では、RAGE に結合する多種の AGEs を一括して捉えて「力価」として表現することで、分析法が確立されていない AGE や未同定の AGE も含めて生体影響を解析する。

3. 研究の方法

本研究で AGEs の存在形態に焦点を当てて解析するには、RAGE と関係ないシグナル伝達を駆動しうる食品由来の夾雑物の影響を除き、RAGE と結合しうる AGEs に的を絞った解析を可能とする試験設計が必要となる。そのため、内在性 AGEs のモデルとして高純度のウシ血清アルブミンを使い、食事性 AGEs として内在性 AGEs モデルをプロテアーゼ消化したものをモデルとすることにより、内在性及び食事性 AGEs モデルには単位重量あたり同一種類および量の AGEs が含まれるため、存在形態に着目した解析が可能となる。以上を踏まえ、モデルとして調製した内在性 AGEs (タンパク質型) と食事性 AGEs (ペプチド、アミノ酸型) を用いて RAGE と AGEs の相互作用について解析する。

4. 研究成果

(1) RAGE に結合しうる AGEs の一括検出

単一のタンパク質と糖を混合して調製した AGEs であっても分子種として種々の糖化物が含まれるため、どの糖化分子種が RAGE との結合に関与するかを検討した。メチルグリオキサリ (MGO) と BSA を用いて調製した糖化 BSA を用いた場合、BSA に存在するリジンを化学修飾してから MGO により糖化した BSA を用いた場合に分けて、精製 RAGE との結合性が特定の糖化物に対する抗体

との競合反応によって阻害されうるかを評価することによって検討した。その結果、糖化 BSA 中のアルギニン側鎖に生じる MG-H1 は RAGE との結合に関与しないが、リジン側鎖に生じるカルボキシエチルリジン及びペントシジンが RAGE 結合に関与することを示した(図1)。この結果は、糖化分子種の種類によって RAGE との結合性が異なることを示していることから、単一の糖化分子種の挙動を解析するだけでは不十分であり、RAGE に結合する糖化分子種を包括的に検出することの重要性を示唆していた。

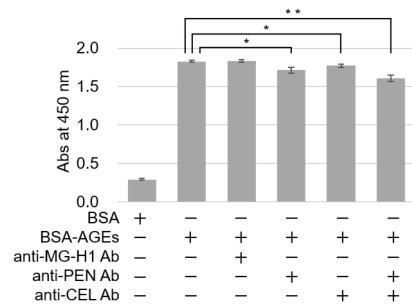


図1 特定の糖化物に対する抗体がAGEsとRAGEとの結合に与える影響。

(2) ペプチド化が RAGE 結合性に及ぼす影響の解析

食品の加工によって生じる食事性 AGEs は消化によってペプチド化されたのちに吸収されることを考慮し、AGEs のペプチドへの断片化が RAGE との結合に影響するかを検討した。内在性 AGEs のモデルとして種々の還元糖で糖化した BSA を調製し、引き続いて酸性条件下でペプシンによって断片化したものを食事性 AGEs のモデルとした。この操作により、両者に含まれる糖化物の分子種及び量を一定に保持できるため、両者と精製 RAGE との結合活性を比較することによって消化による影響を評価した。その結果、使用した還元糖の種類にかかわらず、AGEs をペプチドに断片化することによって RAGE との結合活性が低下することを見出した(図2)。また、キシロース、メチルグリオキサール、グリオキサールで調製した AGEs では、ペプチドへの断片化によっても結合活性が一定程度残存した。これらの結果は、糖化分子種によっては、周辺に存在するアミノ酸残基等とは関係なく RAGE との結合に関与することに加えて、タンパク質の主鎖もしくは別のアミノ酸残基側鎖と協同して初めて RAGE と結合できる糖化分子種が存在していることを示していた。

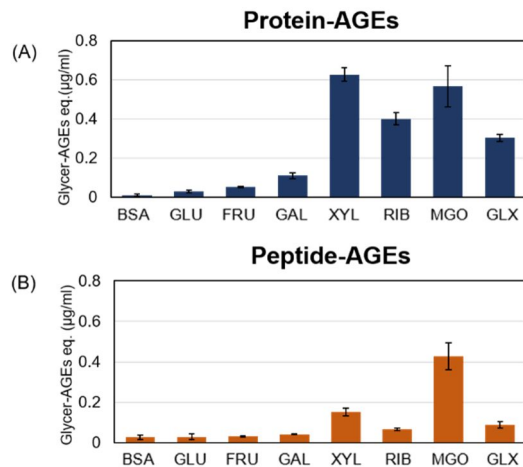


図2 タンパク質型AGEs(A)及びペプチド型AGEs(B)のRAGEとの結合活性。GLU(グルコース)、FRU(フルクトース)、GAL(ガラクトース)、XYL(キシロース)、RIB(リボース)、MGO(メチルグリオキサール)、GLX(グリオキサール)とBSAを混合して調製したAGEs試料を用いた。

(3) AGEs の RAGE 結合性と細胞影響との相関解析

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)への影響を検討するため、上記と同じ AGEs 試料を培地に添加することによって細胞内に生成するスーパーオキシドアニオンを測定した。その結果、スーパーオキシドアニオンの発生量は AGEs のペプチド化によって低下すること、用いた還元糖の種類によって発生量が異なることなどを明らかにした(図3)。また、精製 RAGE を用いて解析した AGEs の結合活性と、AGEs を含有する培地で培養した HUVEC で発生するスーパーオキシドアニオン量との相関を検討したところ、培地への添加量に応じてスーパーオキシドアニオンが増加すること、これが RAGE の中和抗体によって抑制されることから、観察された現象は RAGE を介した細胞影響であることが示唆された。

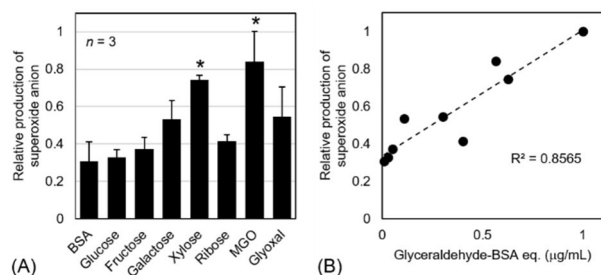


図3 各種糖から調製したAGEs存在下で培養したHUVECから発生したスーパーオキシドアニオン量(A)と、AGEsのRAGE結合活性との相関(B)。

(4) ペプチド型 AGEs がタンパク質型 AGEs と RAGE との結合に及ぼす影響

内在性 AGEs のモデルであるタンパク質型 AGEs の RAGE との結合が、食事性 AGEs のモデルであるアミノ酸型およびペプチド型 AGEs によって変動するかどうかを細胞試験により検討した。これまでに RAGE に対する高い結合活性を示すことが明らかとなったキシロース、メチルグリオキサールで調製したタンパク質型 AGEs を含む培地に対して、グルコースやフルクトース等を用いて調製したペプチド型 AGEs を添加して細胞への影響を検討したところ、いずれのタンパク質型 AGEs の場合においても、ペプチド型 AGEs を添加した際にスーパーオキシドアニオンの発生量が低下し、添加量の増加に応じてスーパーオキシドアニオンの発生量がさらに低下する傾向を示した。観察された現象は、食事性 AGEs が RAGE に結合することにより内在性 AGEs の細胞影響を減弱するとの当初の作業仮説を支持するものであったが、そのメカニズムを解明するには至らなかった。RAGE はパターン認識受容体であり、幅広い基質特異性とリガンドに応じて異なる結合部位を持つことが知られている。今後、食事性 AGEs が RAGE の自己会合に及ぼす影響、あるいは、AGEs と RAGE との結合親和性及び結合部位の相違等の観点から解析を進めることにより、分子メカニズムが解明されると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 GANESH Deepak, TORIGOE Kyoko, KUMANO-KURAMOCHI Miyuki, MACHIDA Sachiko, KOBORI Toshiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Microplate-based Assay for Screening of Advanced Glycation End Products Binding to Its Receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 237 ~ 240
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18C021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobori Toshiro, Ganesh Deepak, Kumano-Kuramochi Miyuki, Torigoe Kyoko, Machida Sachiko	4. 巻 611
2. 論文標題 Assay for advanced glycation end products generating intracellular oxidative stress through binding to its receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114018 ~ 114018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2020.114018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Deepak Ganesh, Kyoto Torigoe, Miyuki Kumano, Sachiko Machida, Toshiro Kobori
2. 発表標題 Predominant Contribution of Lysine derived Advanced Glycation End Products (AGEs) in BSA binding to Receptor for AGEs
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------