

平成22年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580149
 研究課題名（和文） グリセルアルデヒド修飾タンパク質の構造と糖尿病・老化関連疾患発症機構の解明
 研究課題名（英文） Studies on the structure of glyceraldehyde-modified proteins and the mechanism underlying the pathogenesis of diabetes and ageing
 研究代表者
 早瀬 文孝（HAYASE FUMITAKA）
 明治大学・農学部・教授
 研究者番号：80105246

研究成果の概要（和文）：N^α-acetyllysine, N^α-acetylarginine, グリセルアルデヒド（GLA）の反応系で AGE（advanced glycation end products）である MG-H1, GLAP, argpyrimidine および、新規ジヒドロピリミジウム化合物の 2-(4-acetylamino-4-carboxy-butylamino)-5-(5-acetylamino-5-carboxy-pentyl)-7-hydroxy-3,4-dihydro-pyrido[3,2-d]pyrimidin-5-ium (P4) が生成した。さらに、グルコースとフルクトースの分解によって GLA、 α -ジカルボニル化合物の glucosone, 3-deoxyglucosone (3-DG), 3-deoxyxylosone, tetrosone, triosone, 3-deoxytetrosone, glyoxal と methylglyoxal が同定された。3-DG の生理作用について検討を行い、3-DG がマウスマクロファージ細胞株に対して小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導することを見だし、動脈硬化症など糖尿病合併症の発症機構におけるカルボニルストレスの意義を明らかにした。

GLA とクレアチンと N^α-アセチルリジンの反応溶液からも GLAP、MG-H1、Argpyrimidine、P4 の類似体が生成した。一方、グリセルアルデヒドにより修飾されたタンパク質が、インターフェロン β により誘導される感染防御遺伝子の発現を抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：MG-H1, GLAP, argpyrimidine, and 2-(4-acetylamino-4-carboxy-butylamino)-5-(5-acetylamino-5-carboxy-pentyl)-7-hydroxy-3,4-dihydro-pyrido[3,2-d]pyrimidin-5-ium (P4) were identified as AGEs (advanced glycation end products) by the reaction of the N^α-acetyllysine, N^α-acetylarginine, and glyceraldehydes (GLA). Furthermore, glyceraldehyde, glucosone, 3-deoxyglucosone (3-DG), 3-deoxyxylosone, tetrosone, triosone, 3-deoxytetrosone, glyoxal and methylglyoxal were identified by the incubation of glucose or fructose. We found that 3-DG caused apoptosis through the endoplasmic reticulum stress for mouse macrophage cell line, and clarified the significance of the carbonyl stress on the mechanism underlying the pathogenesis of diabetes complication such as arteriosclerosis and ageing. GLAP, and analogs of MG-H1, argpyrimidine, and P4 were also generated from the reaction of GLA, creatine, and N^α-acetyllysine. On the other hand, we revealed that protein modified by GLA suppressed interferon β stimulated gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000

年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品・ストレス・生体分子・糖尿病・老化

1. 研究開始当初の背景

本格的な高齢者社会を迎えたわが国では、糖尿病などの生活習慣病や、老化にともなう神経障害などの「老年病」への対策が急務となっている。これら疾患の発症機構の解明には医学、薬学だけでなく、栄養科学・食品科学など幅広い分野からのアプローチが重要であると考えられる。

糖尿病合併症（DC）などの慢性疾患や老化関連疾患においては、生体内で長期間にわたり進行する反応が重要な役割を果たしている。例えば、動脈硬化や腎症などのDCの発症には、慢性の高血糖状態で亢進したメイラード反応（アミノ基とカルボニル基との非酵素的反応）により生成する多様な「糖化タンパク質」（advanced glycation end product; AGE）が関与することが明らかとなってきた。AGEはその受容体である RAGEとの相互作用を介して細胞機能を修飾する。しかしながらその詳細な機構は依然として不明であり、また反応に関わる化合物に依存して極めて多様な構造のAGEが生成するが、それらがどのような生理作用を発揮するかはほとんどわかっていない。

AGEの生理作用に関する研究は、現在、国内外で、特に医学分野で研究が進められている。2004年9月に開催され、200人以上が参加した「第8回国際メイラード反応会議」において日米欧を中心に質の高い研究報告が多数なされたことは、現在この分野が研究者の大きな関心を集めていることを示している。しかしながら、多くの先端的研究がなされているにもかかわらず「AGEの構造と機能の相関」を検証した例は非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究はグリセルアルデヒド（GLA）により修飾されたタンパク質のメイラード反応後期段階生成物（AGE）構造を明らかにするとともに、その生理作用を解明し、関連疾患発症機構の解明を目的として計画されたものである。

具体的には、以下の2部の大きなテーマからなる。

(1) AGEの構造解析 (1-1) GLA由来新奇AGE

の同定、(1-2) AGE生成機構の解明

(2) AGEの生理作用の解析 (2-1) マクロファージに対するAGEの作用の解明 (2-2) in vivoにおけるAGEの生理作用の解明

これらの研究により、グリセルアルデヒド由来AGEについて「構造と生理作用の両面」から総合的に解析し、疾患発症におけるメイラード反応生成物の意義を解明する計画である。

3. 研究の方法

(1) グリセルアルデヒド（GLA）とLysあるいはArg由来のAGEをHPLCなどを用いて単離・精製し、各種MS、NMR解析によりその構造を明らかにした。

(2) GLAPを含め、これらのAGEの生成機構について検討を加える。また、ヘキサースのみから生成するGLAやジカルボニル化合物を同定する。さらにGLAは脱水反応によってメチルグリオキサール（MG）を生成する可能性があるため、既知のMG由来AGEとも比較検討した。

(3) GLA-BSAがマクロファージのインターフェロン（IFN） α/β 発現を抑制し、感染初期反応を制御しうるかについて明らかにした。このIFN α/β 発現抑制作用について、受容体RAGEの関与の有無を検討した。マクロファージモデルとしては、マウスRAW264.7細胞を用いた。IFN α/β の発現は同様にRT-PCRおよびELISAにより解析した。

4. 研究成果

グルコース系やグルコース-タンパク質系でグリセルアルデヒドの生成を明らかとし、グリセルアルデヒドの定量法を確立した。それぞれの系でグリセルアルデヒドの定量を行い、グルコース系で生成するグリセルアルデヒドの生成量はグルコース-タンパク質系よりも高かった。これは、グリケーションの場合は生成したグリセルアルデヒドがさらにタンパク質を修飾し、AGE（advanced glycation end products）の生成に至ると考えられた。また、グリセルアルデヒドは3-デオキシグルコソン（3-DG）やglucosone（GLUCO）からも生成した。グルコースとフル

クトースの分解によって生成する α -ジカルボニル化合物の化学構造を明らかにした。GLUCO, 3-DG, 3-deoxyxylosone, tetrosone, triosone, 3-deoxytetrosone, glyoxal と methylglyoxal が同定された。さらに、グリセルアルデヒドが関与するグリケーションで argpyrimidine が生成することを明らかにした。N^α-acetyllysine, N^α-actylarginine, グリセルアルデヒドの反応系で AGE である MG-H1, GLAP と argpyrimidine が生成したが、N^α-actylarginine とグリセルアルデヒドの反応系では生成しなかった。従って、argpyrimidine の生成にはリジン残基が必須であることが明らかとなった。さらに、アミノカルボニル反応の中間体である 3-デオキシグルコソン (3-DG) の生理作用について検討を行い、3-DG がマウスマクロファージ細胞株に対して小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導することを見だし、動脈硬化症など糖尿病合併症の発症機構におけるカルボニルストレスの意義を明らかにした。

また、グリセルアルデヒドの関与するグリケーションで生成する架橋性 AGE の化学構造を解析した。結果として、すでに同定した MG-H1, GLAP, argpyrimidine と未同定の生成物を単離・精製した。この未同定な化合物は蛍光を有する黄色化合物であり、FAB-MS, NMR により 2-(4-acetylamino-4-carboxy-butylamino)-5-(5-acetylamino-5-carboxy-pentyl)-7-hydroxy-3,4-dihydro-pyrido[3,2-d]pyrimidin-5-ium と同定した。本化合物はグリセルアルデヒドの関与するグリケーションで生成する新規ジヒドロピリミジウム化合物であった。この化合物は糖尿病合併症の指標に成りうると思われる。

一方、グリセルアルデヒド修飾タンパク質がウイルス感染により発現するインターフェロン誘導遺伝子を下方制御することを見出した。このような AGE の作用は、糖尿病患者が感染症にかかりやすくなる原因の一部となっていることが考えられる。

さらに、生理的条件下においてグリセルアルデヒド (GLA) とグアニジノ化合物、N^α-アセチルリジンから生成する AGE の化学構造を解析した。さらにラット尿細管上皮株化 (NRK-52E) 細胞を用いてそれらの AGE の生理作用について検討した。

GLA とクレアチンと N^α-アセチルリジンの反応溶液から 6 種の主要ピークを検出し、そのうち 1 種は既知の AGE である GLAP であり、その他のピークを CP0, CP1, CP2, CP3, CP4 と命名した。CP0 は MG-H1、CP3 は argpyrimidine、CP4 は P4 の類似体であった。CP0 は反応の初期に増加し生成量が最も多かった。

さらに、CP0 は NRK-52 細胞に対する細胞傷害性を示さなかった。従って、CP0 は

non-toxic AGE であることが示唆された。グアニジノ化合物はタンパク質モデルのアルギニンより反応速度が速いため、生体内では、クレアチンを始めとした遊離のグアニジノ化合物がタンパク質を構成するアルギニンより速く反応しイミダゾリノン化合物を生成すると推察した。一方、グリセルアルデヒドにより修飾されたタンパク質が、インターフェロン β により誘導される感染防御遺伝子の発現を抑制することを見出した。このことから糖尿病患者の生体に生成・蓄積した AGE が感染防御応答を抑制する作用を発揮していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Y. Shirahashi, H. Watanabe, and F. Hayase et.al., Identification of Red Pigments Formed in a D-Xylose-glycine Reaction System, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 2287-2292 (2008). 査読有

② F. Hayase et. al., Formation mechanisms of melanoidins and fluorescent pyrimidium compounds as advanced glycation end products, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1126, 53-58 (2008). 査読有

③ T. Usui, H. Watanabe, F. Hayase et.al., The formation of argpyrimidine in glyceraldehydes-related glycation, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 72, 568-571 (2008). 査読有

④ T. Usui, H. Watanabe, and F. Hayase, et.al., Identification and determination of α -dicarbonyl compounds formed in the degradation of sugars, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71, 2465-2472 (2007). 査読有

⑤ T. Usui, H. Watanabe, and F. Hayase, et.al. Determination of glyceraldehyde formed in glucose degradation and glycation, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71, 2162-2168 (2007). 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 栗本佳奈, 臼井照幸, 村元莉那, 渡辺寛人, 早瀬文孝, グリセルアルデヒドとグアニジノ化合物由来メイラード反応生成物の同定, 2010年度日本農芸化学会, 2010年3月28日, 東京大学駒場校舎

② F. Hayase, Chemistry of pigment as intermediate of melanoidins, 10th International Symposium on the Maillard

Reaction, 2009年8月31日, Palm Cove,
Australia

③ 栗本佳奈、臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝
，グリセルアルデヒドとクレアチンのメイ
ラード反応生成物の構造解析，2009年度日本
農芸化学会，2009年3月28日，マリンメッ
セ福岡

④ 早瀬文孝，メイラード反応後期段階生成
物 (AGE) と生成機構，第18回日本メイラー
ド学会，2008年11月28日，明治大学生田校
舎

⑤ F. Hayase, Formation mechanisms of
melanoidins and fluorescent pyridinium
compounds as advanced glycation
endproducts, 9th International Symposium
on the Maillard Reaction, 2007年9月2日,
Munich, Germany

[図書] (計1件)

① T. Usui, H. Watanabe, F.
Hayase, "Cytotoxicity and oxidative
stress induced by the
glyceraldehyde-related Maillard reaction
products" in "Endogenous Toxins"
p. 213-225, Wiley-VCH (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.isc.meiji.ac.jp/~maillard/home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早瀬 文孝 (HAYASE FUMITAKA)
明治大学・農学部・教授
研究者番号：80105246

(2) 研究分担者

渡辺 寛人 (WATANABE HIROHITO)
明治大学・農学部・教授
研究者番号：20270859

(3) 連携研究者

なし