

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20205

研究課題名(和文)発光物質の生成反応を利用した糖尿病重症化のバイオマーカー簡便定量法の基盤構築

研究課題名(英文)Development of a luminescence-based method to quantify a biomarker for aggravation of diabetes

研究代表者

蟹江 秀星(Kanie, Shusei)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：10828304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：2型糖尿病患者の重症化を防ぐ方法の一つとして、2型糖尿病の重症化予測に資するバイオマーカーであるメチルグリオキサール(MGO)や3-デオキシグルコソン(3-DG)の存在量を指標に重症化リスクの高い患者を見極め、重症化予防策をとることが考えられる。しかしながら、1000万人と推計される2型糖尿病患者の臨床検査に最適なMGOや3-DGの簡便定量法は開発されていない。本研究では、維持管理も含め取り扱いが容易な機器により検出可能な化学発光という現象を利用した、MGOおよび3-DGの簡便定量法の構築を目指した研究に取り組み、化学発光物質への誘導体化反応条件や反応生成物の化学発光条件に関する新知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、MGOおよびMGOと化学構造が類似する化合物がある種のアミノピラジンと反応することで化学発光物質が生成することは知られていたものの、その誘導体化反応条件および反応生成物の化学発光反応条件の検討は不十分であり、発光量によるMGOの簡便定量法の確立には至っていなかった。本研究成果によって、これまで検討されていなかったアミノピラジン関連物質とMGOを反応させた場合でも化学発光物質が生成することや、MGOの誘導体化反応生成物の化学発光反応条件に関する新知見を得た。またその過程で、炎症性バイオマーカーの発光による簡便定量法への応用が期待できる新たな化学発光現象も発見した。

研究成果の概要(英文)：Determination of methylglyoxal (MGO) and 3-deoxyglucosone (3-DG) in patients with type 2 diabetes is useful to identify patients with high risk of aggravation of diabetes. However, it is estimated that the number of these patients in Japan is 10 million, and there is no simple method to determine MGO and 3-DG in the huge patients. Here, I tried to develop a luminescence-based method to quantify MGO and 3-DG, and provided new insights into conditions for chemiluminescence reaction of derivatized products of MGO and 3-DG.

研究分野：生体関連化学

キーワード：化学発光 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

日本国内の糖尿病患者数は1000万人と推計されており、その大部分は生活習慣の乱れにより発症する2型糖尿病である。2型糖尿病の恐ろしさとして、網膜症・腎症・神経障害などの合併症や脳卒中・虚血性心疾患などにつながる点がある。そのように重症化すると患者およびその家族の生活の質が著しく低下するだけでなく、国の医療費を圧迫する要因ともなる。そのため、2型糖尿病の重症化の予防に資する取り組みや研究が進められている。

そうした背景のもと行われた、2型糖尿病の重症化を予測するためのバイオマーカー探索によって、生体中の糖代謝産物であるメチルグリオキサル (MGO) や 3-デオキシグルコソン (3-DG) が多く存在する2型糖尿病患者ほど、重症化しやすいことが報告された。その報告を踏まえ、2型糖尿病患者のうち、生体中でのMGOおよび3-DGの存在量の多い患者を優先して重症化を防ぐための対策を取ることが、より効率的に2型糖尿病の重症化患者の増大を防ぐ一つの方法であると考えられる。

既知のMGOや3-DG定量法としては、フェニレンジアミン骨格を有する化合物との反応により誘導体化した後、液体クロマトグラフィーを連結した質量分析装置 (LC-MS) により解析するという方法が知られている。LC-MSを用いる方法は信頼性における方法である一方、LC-MSは高価な装置あり、維持管理にも手間がかかる。そのため、1000万人近い2型糖尿病患者の重症化の予測を目的とした場合、LC-MSを用いた方法は臨床検査での利用に適した方法とは言い難い。つまり、2型糖尿病患者の重症化リスク把握を目的とした臨床レベルで利用可能なMGOや3-DGの簡便な定量法が存在していないという問題があった。

2. 研究の目的

本研究では、ケトン基とアルデヒド基が隣り合う化学構造を有する α -ケトアルデヒド化合物と α -アミノイミン類の化学反応に着目し、2型糖尿病の重症化予測に資するMGOと3-DGの化学発光物質への誘導体化反応およびその発光反応条件を検討することで、検出感度・安全性・操作性という観点で臨床検査でも利用可能な、発光量により簡便にMGOや3-DGを定量できる手法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MGO や 3-DG との反応により化学発光物質が生成する α -アミノイミン類の探索

過去の研究では、MGOおよびMGOと化学構造が類似する化合物が α -アミノイミン構造を有するある種の2-アミノピラジンや2-アミノピリジンと反応することで化学発光物質が生成することが報告されていた。しかしながら、MGOおよび3-DGと反応し化学発光物質が生成するかどうかという観点で調べられた物質は限定的であり、 α -アミノイミン構造を有する物質を反応させた場合、反応に用いた物質に応じてどのような特性を有する化学発光物質が生成するのかが明確でなかった。そこで、 α -アミノイミン構造を有する市販のアミノピラジン関連化合物 (2-アミノピラジン類、2-アミノピリジン類、2-アミノピリミジン類) とMGOおよび3-DGを反応させ、化学発光特性を有する物質が生成するのか、そして、その生成物ほどの程度発光するのかを調べた (図1)。

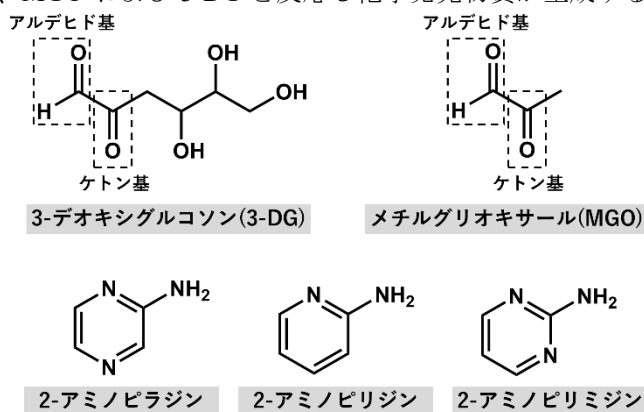


図1. 各種物質の化学構造

(2) MGO および 3-DG とアミノピラジン関連化合物との反応により生成した化学発光特性を有する反応産物の化学発光条件の検討

過去の研究では、MGOやその類似化合物とある種のアミノピラジン類との反応で生成する化学発光物質の発光条件として、有機溶媒および塩基性物質を利用した条件が報告されていた。しかしながら、臨床検査用途での発光定量を考えた場合、人体への毒性を含めた危険性の低い試薬および溶媒を用いた条件で化学発光を起こせることが望ましい。そこで、化学発光反応の発光効率が発光反応の起きる反応場に影響される点に着目し、ミセルを形成する各種界面活性剤や、低分子化合物を分子内部に取り込む性質のあるシクロデキストリン類、市販のタンパク質を添加することで、MGOおよび3-DGの誘導体化産物を化学発光させられるかを調べた。

4. 研究成果

(1) MGO および 3-DG と市販のアミノピラジン関連化合物を酸性エタノール水溶液中で反応させることで様々な反応生成物を得ることができた (図 2)。得られた反応生成物を各種界面活性剤、シクロデキストリン類やアルブミン類を含む pH=8 の緩衝液に加えたところ、発光が観察される反応生成物が存在し、その発光量は界面活性剤およびシクロデキストリンの種類により異なることが明らかになった。また興味深いことに、ある種の 2-アミノピラジンと MGO を反応させて得られる反応生成物については、中性の緩衝液に加えるだけで発光することが確認できた。

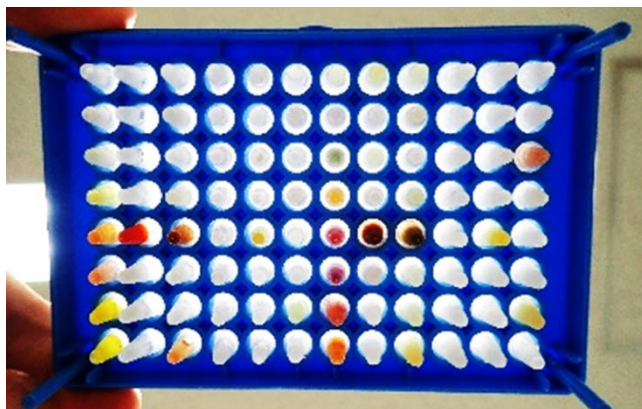


図 2. 市販アミノピラジン類を用いた反応の生成物

中性条件下で発光する反応生成物のさらなる検証を行ったところ、MGO との反応によって化学発光する物質が生成しているだけでなく、蛍光性を有する物質も生成しており、その物質の存在が中性条件下での化学発光に関与していることが示唆された。

(2) タンパク質を活用した化学発光条件を検討する過程で、ウミホタルルシフェリン (MGO や 3-DG と 2-アミノピラジン類との反応によって生じる物質と共通した化学構造を有する化学発光物質) が、ヒト血漿中に存在する α 1-酸性糖タンパク質 (AGP) の存在下で発光するという現象を見出した (図 3)。続いて、ヒト AGP には薬物結合サイトが存在することから、ウミホタルルシフェリンがその結合サイトに取り込まれることで発光しているのかを調べるため、ヒト AGP と結合する化合物 (クロルプロマジン、CPZ) の存在下での発光量を調べた。その結果、CPZ の存在下ではヒト AGP とウミホタルルシフェリンを混合した際の発光量が低下することが明らかになった。このことから、ヒト AGP はウミホタルルシフェリンを分子内部に取りこむことでウミホタルルシフェリンの発光を引き起こしていることが示唆された。

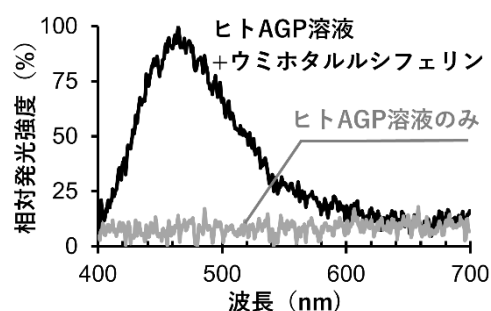


図 3. ヒト AGP とウミホタルルシフェリンを混合した際の発光スペクトル

さらに、ヒト AGP はヒト血清中の炎症性バイオマーカーの一つとして知られていることから、ヒト血清に含まれる AGP の定量を見据え、ヒト血清にウミホタルルシフェリンを混合した際の発光量を調べた。その結果、発光量がヒト血清中の AGP 量に比例することも明らかにした。

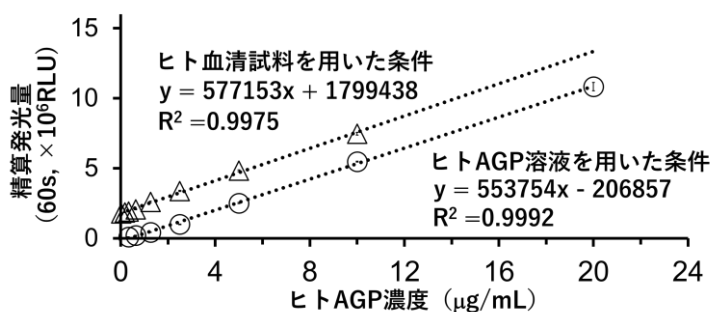


図 4. ウミホタルルシフェリンを混合した際の発光量と AGP 量の相関関係

以上のように本研究では、2-アミノピラジン類に限らず、2-アミノピラジン類や 2-アミノピリミジン類を MGO や 3-DG と反応させた場合でも、化学発光特性を有する物質が生成すること、有機溶媒や塩基性物質を使用しなくともイミダゾピラジノン環およびその類似構造を有する物質を発光させられる条件が存在することを示すことができた。今後、それぞれの化学発光物質の発光反応に適した反応場を提供する分子が開発できれば、生体試料中に存在する生体物質を化学発光物質へ誘導体化し、発光によって生体分子を高感度に検出する系の構築が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanie Shusei, Komatsu Mami, Mitani Yasuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Luminescence of Cypridina Luciferin in the Presence of Human Plasma Alpha 1-Acid Glycoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7516 ~ 7516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21207516	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 蟹江秀星、三谷恭雄
2. 発表標題 ヒト血漿由来の糖タンパク質存在下でのウミホタル由来物質の発光
3. 学会等名 第19回 産総研・産技連LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 蟹江秀星、三谷恭雄
2. 発表標題 ヒト 1-酸性糖タンパク質によるウミホタルルシフェリンの発光
3. 学会等名 SATテクノロジー・ショーケース2022
4. 発表年 2022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
---------	---------