

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05862

研究課題名(和文) ポリアミンの生体内化学反応によるメチルグリオキサールの毒性軽減メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the toxic reduction mechanism by chemical reaction of methylglyoxal with polyamine under the biocondition

研究代表者

筒井 歩 (Tsutsui, Ayumi)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：90531731

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)：生体分子であるポリアミンが酸化ストレス物質のメチルグリオキサールを非酵素的に捕捉し、化学反応をすることでメチルグリオキサールの毒性軽減に寄与していることを示唆する結果を得た。即ち、スペルミジンとメチルグリオキサールが化学反応して生成する新規スペルミジン誘導体の構造を特定し、細胞内物質として同定した。この過程で、ポリアミン誘導体が水溶液中で分子間相互作用することを突き止め、このことに影響しない定量分析条件を確立した。また培地へのメチルグリオキサールの添加によって、スペルミジン誘導体の生成が細胞内で増加することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで主に酵素反応しか注目されてこなかった生体反応において、ポリアミンとメチルグリオキサールが非酵素的に反応したと考えられる化合物を細胞内物質として同定したことの意義は大きい。この結果はポリアミンがメチルグリオキサールの解毒に関わっている可能性を示唆している。メチルグリオキサールは通常、グリオキサラーゼシステムによって代謝されて乳酸に分解され解毒化されている。しかし糖尿病などの病態下においてはメチルグリオキサール量の増加や、グリオキサラーゼシステムに必要な不可欠なグルタチオンの産生に障害が出る希少病の報告もあることから、本研究結果がこれらの問題を解決する足掛かりとなるかもしれない。

研究成果の概要(英文)： We obtained results suggesting that polyamine, a biomolecule, non-enzymatically captures methylglyoxal, a substance of oxidative stress, and chemically reacts with it, contributing to the reduction of toxicity of methylglyoxal. That is, the structure of a new spermidine derivative produced by chemical reaction between spermidine and methylglyoxal was specified and identified as an intracellular substance. In this process, we found that polyamine derivatives interact intermolecularly in an aqueous solution, and established quantitative analysis conditions that do not affect this. We also found that the addition of methylglyoxal to the medium increased the intracellular production of spermidine derivatives.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ポリアミン スペルミジン メチルグリオキサール 糖化反応

1. 研究開始当初の背景

糖化反応は酵素が関与しない生体内の化学反応として、タンパク質のリジン残基の一級アミノ基と糖または糖代謝産物のアルデヒド基との間で起こる反応として知られている。多段階の工程を経てタンパク質に生成する化合物群は、終末糖化産物 (AGEs) と総称され、老化や糖尿病合併症を始めとするいくつかの疾患への関与が指摘されている。タンパク質に起こる糖化反応については、これまで多くの研究がされてきた。しかし生体内や自然界に目を向けたとき、一級アミノ基をもつ化合物はリジン残基だけではない。例えばポリアミンは、一分子中に複数のアミノ基を有する低分子の生体化合物である。細胞増殖に必須の生体物質であり、RNA 構造を安定化し転写の制御に関与することが知られている。さらに抗酸化作用を持つ機能性化合物として、細胞内に 1 mM という高濃度で存在し、血清などの細胞外にも豊富にある。このように機能性物質として知られるポリアミンがリジン残基と同様に化学反応をすることは容易に想像することができる。しかしこれまでにポリアミンの細胞内での化学反応を示す報告は全くなかった。一方メチルグリオキサール (MGO) は、グルコースの解糖系で生成する低分子のアルデヒド化合物で、タンパク質のリジン残基やアルギニン残基と反応して AGEs を形成しやすい。また、MGO はグルコースが糖化反応を起こす際にも中間体として生成する。MGO から誘導されるタンパク質 AGEs には、細胞障害性や遺伝毒性を指摘する研究報告があり、糖尿病や腎不全患者の血中では MGO 誘導型のタンパク質 AGEs に有意な増加が見られることがわかっている。また、MGO 自体にも炎症や酸化ストレス障害の作用があることが示されている。

我々は、ポリアミンが MGO と反応し、有害な MGO のスカベンジャーとして機能している可能性を考えた。本研究を始めるに当たり、スペルミンと MGO が反応した新規化合物を微量ながら細胞内物質として同定しており、本研究では新たにスペルミジン (SPD) と MGO との新規誘導体の細胞内成分としての同定および SPD 誘導体の定量方法の確立、MGO 過剰条件下における細胞内 SPD 誘導体の相対的な増加を確認出来るに至った。

2. 研究の目的

ポリアミンとメチルグリオキサール (MGO) との化学反応が、MGO の毒性の軽減やタンパク質に起こる MGO 由来の糖化反応の抑制に寄与していることを実験的に明らかにする。

3. 研究の方法

3.1 ポリアミン誘導体の定量方法の確立

本研究ではまず Hwang らの方法 (*J. Chromatography B*, **2018**, 1085, 21-29.) を参考に、scherzo SM-18 (3 μ m, 50 \times 2.0mm, Imtakt, Japan) のカラム管を使用して行った。その後カラム管を Symmetry C-18 (5 μ m, 150 \times 4.6mm, Waters, USA) に変更し、溶離液を H₂O-CH₃CN または H₂O-MeOH としてイオンペア試薬 HFPA (heptafluorobutyric acid) を 5mM 用いた測定条件を検討した。

3.2 ポリアミン誘導体の分子間相互作用について

前項の 3.1 で LC/MS 分析条件の検討に際し、誘導化やイオンペア試薬を使用しない場合、しばしばリテンションタムのズレが生じるなどしたため、スペルミジン誘導体の分子間相互作用が疑われた。本研究で用いたスペルミジン誘導体 4 種類 (LASpd-1, LASpd-2, CESpd-1, CESpd-

2)は構造異性体の関係にあり、それぞれに鏡像異性体が存在する。そこで CESpd-1 および CESpd-2 に対し、それぞれ *S* 体と *R* 体を合成し、計 4 種類の誘導体を用いて分子間相互作用について調べるため、核磁気共鳴法 (NMR) により ¹H NMR および DOSY を測定した。

3.3 スペルミジンから誘導される新規細胞内物質の同定

スペルミジンと MGO との直接反応では想定される構造異性体が 4 種類考えられる。そこで 4 種類すべての誘導体 (LASpd-1, LASpd-2, CESpd-1, CESpd-2) をそれぞれ 9 または 10 ステップでラセミ体として合成し単離して標品とした。それらを H₂O (5mM HFBA)-CH₃CN (5mM HFBA)の溶離液を用いて前項の 3.1 で確立した分析方法で分析に供し、ライセートした HeLa、ME-180 または HepG2 細胞を用いて細胞内成分の同定を行った。

3.4 MGO の培養液添加条件下におけるスペルミジン誘導体の細胞内成分としての増加

HepG2 (400 × 10⁴ cells) 細胞に対して 40% MGO を 10mL 添加して 37°C の 5% CO₂ 雰囲気下で一晩インキュベーションした。細胞をライセートして、抽出等の前処理をした後、細胞内成分を LC/MS に供した。なお、MGO の添加により夾雑物が増加し、目的ピークと重なったため LC/MS の溶離液を H₂O-MeOH に変更した。

4. 研究成果

4.1 ポリアミン誘導体の定量方法の確立

ポリアミン誘導体に対して、誘導化またはイオンペア試薬を用いない条件下での LC/MS/MS 測定では、合成して単離した単一化合物として測定したにも関わらず、プリカーサーイオンおよびプロダクトイオンを同じとする、リテンションタイムが異なる複数のピークが確認された。このため誘導化やイオンペア試薬を用いない条件は本研究の定量分析条件としては適用できなかった。そこで本研究ではイオンペア試薬の HFBA を溶離液に添加する条件で検討を行い、最終的に H₂O-CH₃CN または H₂O-MeOH の溶離液に HFBA を 5 mM 添加する測定条件で、目的物が再現よく安定して検出できることがわかった。本研究では、LC/MS で定量分析を行い、さらに LC/MS を用いて分取したサンプルを MS/MS 分析に供することで細胞内成分としてのポリアミン誘導体の同定分析を行う方法とした。

4.2 ポリアミン誘導体の分子間相互作用について

実験では 4 種類のスペルミジン誘導体の存在比による ¹H NMR のピークシフトおよび拡散係数について調べた。CESpd-1 および CESpd-2 は立体制御をせずに合成すると、それぞれ *R* 体と *S* 体の生成比が 2:3 となることが別途行った解析で分かっている。図 1 の上段は CESpd-1(*R*) : CESpd-1(*S*) : CESpd-2(*R*) : CESpd-2(*S*) = 1:1:1:1、中段は立体制御をせずに合成した CESpd-1 : CESpd-2 = 1 (*R*:*S*=2:3) : 1 (*R*:*S*=2:3)、下段は CESpd-1(*R*) : CESpd-1(*S*) : CESpd-2(*R*) : CESpd-2(*S*) = 2:3:2:3 のチャートを示した。上段の CESpd-1(*R*) : CESpd-1(*S*) : CESpd-2(*R*) : CESpd-2(*S*) = 1:1:1:1 と下段の 2:3:2:3 を比較すると、不斉炭素に結合する CH ピークがシフトし、拡散係数にも差があった。一方、立体制御をせずに合成した CESpd-1 : CESpd-2 = 1:1 のピークシフトは立体を分けて合成した CESpd-1(*R*)、CESpd-1(*S*)、CESpd-2(*R*) および CESpd-2(*S*) を 2:3:2:3 で混合したサンプルのピークシフトおよび拡散係数と一致した。これらの結果は、CESpd-1(*R*)、CESpd-1(*S*)、CESpd-2(*R*) および CESpd-2(*S*) が互いに分子間で相互作用し、それはそれぞれの存在比によって変化することを

強く示唆しており、LC/MS を使用した成分同定に影響を与えている可能性があることがわかった。

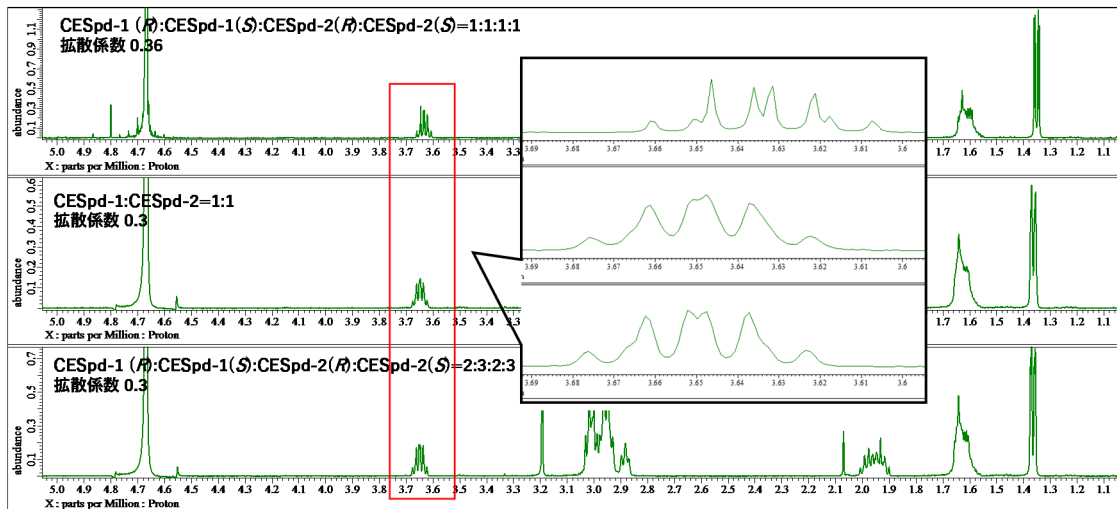


図1. CESpd-1(R)、CESpd-1(S)、CESpd-2(R)、CESpd-2(S)の存在比の違いによる¹H NMRのピークシフトの違いと拡散係数を示した。立体制御をせずに合成した中段のCESpd-1およびCESpd-2のR/S比はそれぞれ2:3である。ピークシフトおよび拡散係数は下段と一致した。不斉炭素に結合しているCHのピークが存在比の違いによりシフトしている。

4.3 スペルミジンから誘導される新規細胞内物質の同定

ライセートしたME-180細胞を前処理し、細胞抽出液をLC/MS (SIMモード: $m/z=218.2$) 分析に供したところ、LASpd-2に相当するピークを検出した(図2)。続いて該当ピークを分取し、MS/MS分析に供し、プロダクトイオンが合成した標品のLASpd-2と一致したため、検出されたピークがLASpd-2であることを確認し、細胞内成分としてLASpd-2を同定した。LASpd-1、CESpd-1およびCESpd-2は検出されなかった。また細胞の種類によって目的とするスペルミジン誘導体の成分量に差が見られ、HeLa細胞では4種類の誘導体すべてが検出されなかった。

SIMモード ($m/z=218.2$)

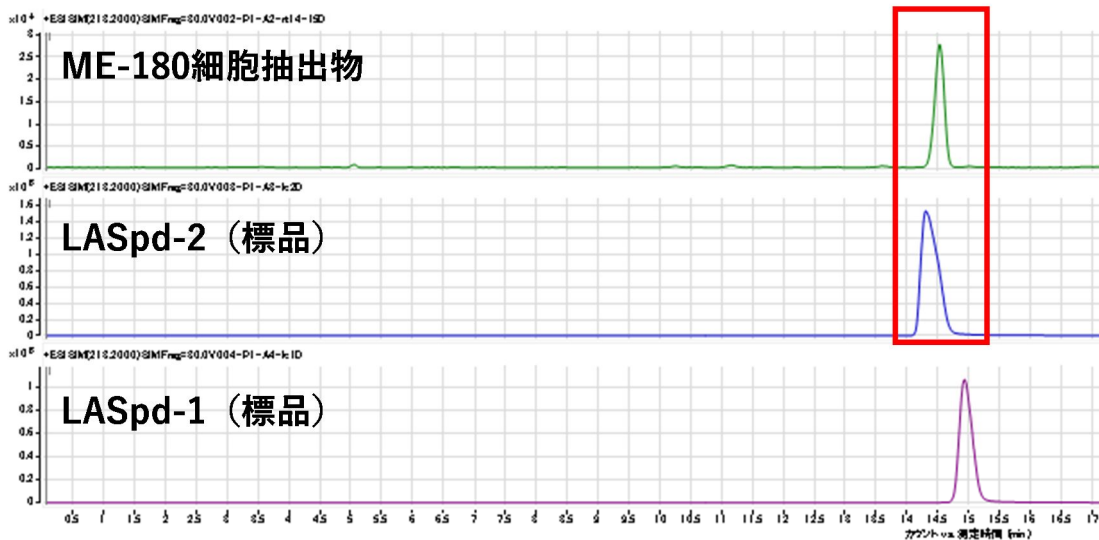


図2. 溶離液 H_2O (5mM HFBA) - CH_3CN (5mM HFBA)での分析結果。リテンションタイム14.5minに検出されたピークがLASpd-2のリテンションタイムと一致していた。

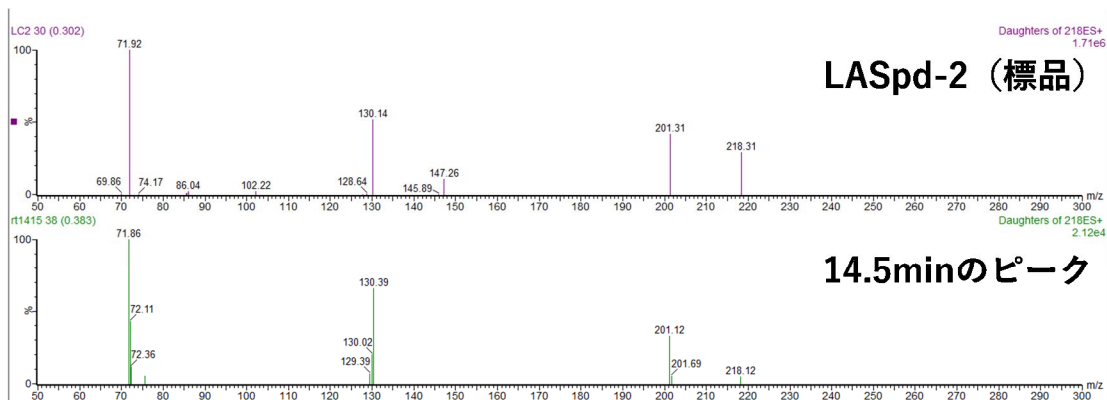


図3. リテンションタイム14.5minに検出されたピークを分取してMS/MS分析に供したところ、標品のLASpd-2のプロダクトイオンと一致した。

4.4 MGO の培養液添加条件下におけるスペルミジン誘導体の細胞内成分としての増加

MGO を添加していない細胞と比較すると MGO を添加した細胞では、その細胞内成分として LASpd-2 に相当するピークの明らかな増加が確認出来た（図 4）。しかし採取量がごく微量であったため分取に至らなかった。LASpd-1、CESpd-1 および CESpd-2 は検出できなかった。MGO 添加条件下での LASpd-2 の増加は細胞内における MGO の毒性軽減にスペルミジンの化学反応が関与していることを強く示唆した。

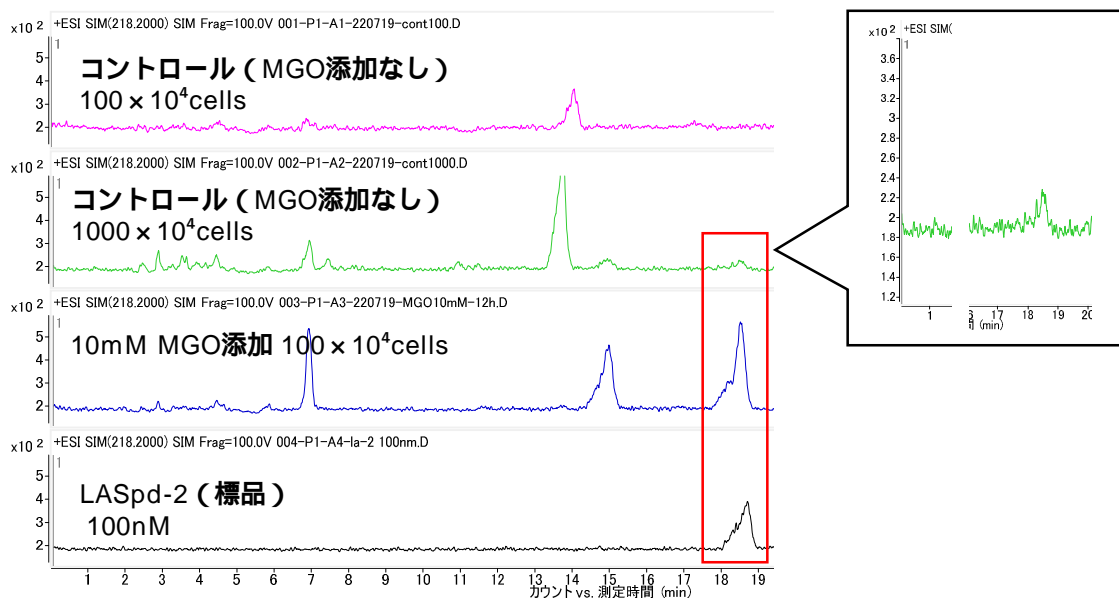


図4. 培養液にMGOを添加していない細胞成分とMGOを添加した細胞成分を比較すると、添加した細胞で明らかにLASpd-2の増加が確認出来た。なお、リテンションタイムが図2と異なっているのは溶離液が違ったためである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下田優人、藤本 崇、田代 充、藤田智之、筒井 歩
2. 発表標題 新規スペルミジン型終末糖化産物の細胞成分としての同定
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Koki Sugiura, Yuta Morishita, Takashi Fujimoto, Miyu Takamizawa, Mitsuru Tashiro, Tomoyuki Fujita and Ayumi Tsutsui
2. 発表標題 The effects to HPLC or LC-MS analysis by intermolecular interaction of polyamine analogs
3. 学会等名 PACIFICHEM 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦広季、森下雄太、藤田智之、筒井 歩
2. 発表標題 グルコースとポリアミン類から誘導される終末糖化産物類縁体の生成と分析
3. 学会等名 第40回日本糖質学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 筒井歩、藤本崇、森下雄太、高見澤美結、杉浦広季、藤田智之、田代充
2. 発表標題 スペルミジン型終末糖化産物モデルの分子間相互作用
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	田代 充 (Tashiro Mitsuru) (40315750)	明星大学・理工学部・教授 (32685)	

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
---------	---------