

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580149

研究課題名（和文）グリセルアルデヒドによるタンパク質修飾物の構造—機能相関の解明

研究課題名（英文）Elucidation of correlation between structure and function of glyceraldehyde modified products

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）：

P4はグリセルアルデヒド（GLA）2分子がリジン、アルギニン間で架橋結合を形成したAGEのジヒドロピリドピリミジニウム化合物である。P4が血清タンパク質、コラーゲン、レンズタンパク質において、正常ラット群と比較して糖尿病ラット群で有意に増加したことを明らかとした。GLA修飾リゾチームの配列解析の結果、K33, K97, K116が修飾され、GLAPが生成していることが明らかとなった。また、同様にアルギニン残基においてもMG-H1などの生成物を同定した。これらの結果はリボヌクレアーゼA、シトクロムcにおいても同様な傾向が認められた。

Caproyl-GLAPを抗原としマウスに免疫した結果、GLAP構造のピリジニウム骨格を認識する抗GLAPポリクローナル抗体が得られた。HL-60細胞、PC12細胞および分化PC12細胞において、GLA-BSA濃度依存的にcontrolと比較して細胞増殖率が減少した。また、GLA-BSA添加群では抗GLAP抗体の添加により、細胞増殖率の減少が回復した。以上の結果、GLA修飾タンパク質の生理作用を示すエピトープの化学構造が、GLA由来の主要AGEのGLAPであることを支持した。

研究成果の概要（英文）：

P4 was identified as a novel dihydropyridinium compound formed by two molecules of glyceraldehyde (GLA), lysine, and arginine. The amount of P4 in serum protein, collagen, and lens proteins significantly increased compared with those in control subjects. The sequence analysis of GLA modified lysozyme revealed that K33, K97, and K116 were modified with GLA, and glyceraldehydes derived pyridinium-type AGE (GLAP) was generated in their lysine residues. Moreover, MG-H1 was also identified in arginine residues. Similar tendency was observed in GLA modified ribonuclease A and cytochrome c. The results of immunized mice with antigen caproyl-GLAP showed that GLAP polyclonal antibody which recognized the pyridinium skeleton of GLAP structure was obtained. The addition of GLA-BSA inhibited the cell proliferation of PC12, HL-60, and differentiated PC12 cells. The inhibition was dose dependent and was restored by the addition of anti-GLAP antibody. The findings were supported that the chemical structure of the epitope showing the physiological effects of GLA modified protein is GLAP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：メイラード反応・グリセルアルデヒド・AGE・リジン・アルギニン・糖尿病

1. 研究開始当初の背景

2007年度調査によれば、わが国の糖尿病患者は2210万人に上り、患者のQOLを著しく低下させる糖尿病合併症（DC）への対策が急務となっている。DCの予防・治療法開発には発症機構の解明が不可欠であるが、そのためには医学・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。

糖尿病患者の体内においては、慢性的高血糖によりメイラード反応（アミノカルボニル反応）が亢進し、生成した「糖化タンパク質」(advanced glycation end product; AGE)がDCの発症に関与することが明らかとなってきた。AGEは受容体RAGEとの相互作用を介して細胞機能を変化させるが、その詳細な機構は依然として不明である。また生体内でも極めて多様な構造のAGE群が生成するが、それら個々の構造の生理作用や、病態との関連性は明らかになっていない。

AGEの生理作用に関する研究は現在国内外で、とくに医学分野で進められており、2009年8月の「第10回国際メイラード反応会議」において質の高い報告が多数なされたことは、この分野の重要性を示している。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」を検証した例はほとんどないのが現状である。

近年、グリセルアルデヒド（GA）由来のAGEがとくに強い生理作用を有し、DC発症に深く関与するとの報告が多数なされている

(Sato et al. *Curr. Mol. Med.* 6, 351-358, 2006など)。GAは反応性が高く、糖尿病患者において増大するという事実もこれを支持する。しかしながら、GAによるタンパク質修飾構造についての知見は皆無であり、したがって生理作用の発揮に関わる化学構造（作用エピトープ）も全く不明であった。

このような状況のもと、申請者らはGAによるAGEとして初めて「GLAP」構造を同定した。GLAPはLysの側鎖にピリジニウム環が形成された構造であり、細胞毒性を有することを確認している (*Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 333-340, 2004)。加えて申請者らはGAによりArg残基が修飾されたArg-pyrimidine (Arg-P) およびMG-H1を見出し、さらに最近LysとArgとの架橋型AGEである「P4構造」を同定している。

一方申請者らはGA修飾タンパク質が脂肪細胞のサイトカイン産生を変化させることを見出している。これはGA由来AGEが糖尿病病態に関与することを強く示唆するものである。さらに最近GA修飾タンパク質がマクロファージの感染防御応答を抑制することを見出している。このように申請者らはGA由来AGEの構造および作用の解析を行ってきた。

2. 研究の目的

糖尿病患者の体内においてはメイラード反応が亢進し、多様なタンパク質修飾構造（AGE）が蓄積して腎症、動脈硬化などの糖尿病合併

症 (DC) の発症に關与する。とくにグリセルアルデヒド (GA) による修飾は強い生理作用 (毒性) をもたらすことが知られているが、具体的なAGE 構造やそれら個々の作用についての知見はほとんどない。本研究は、GA 由来AGE の (1) 生理作用に重要な構造とその生成機構、(2) 新たな作用、および (3) 生体における蓄積量の検出・定量法確立と、病態との関連性の解明を通して、DC 発症機構の一端を解明し、その予防・治療および診断法の開発に貢献することを目的として計画されたものである。

本研究はそれら課題のうち、(1) GA由来AGEの構造と生成機構、(2) GA由来AGEの新たな生理作用、(3) GA由来AGEの生体内存在量と病態との関連性、を明らかにすることを旨として計画されたものである。より具体的には、

(1) (1-1) 新奇AGE構造の同定、(1-2) 生成機構の解明、(1-3) 作用エピトープの解明

(2) (2-1) 生体における検出法確立、(2-2) 病態との関連性の解明

を目指す。これら研究により、GA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、DC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 (GA) とLysあるいはArg由来のAGEとして、既に同定した構造以外にも数種の生成物を確認している。これら構造を HPLCにより単離・精製する。その際、新規充填剤を応用した迅速分析用カラムを適用する。さらに精製したAGEの構造を各種MS、NMR解析により明らかにする。

(2) 既に確立したLC/MSまたはLC/MS/MSによるGLAPの高感度検出法を用い、生体内におけるGLAPの存在確認および定量を行う。具体的には糖尿病ラットや腎障害ラットにおいて血清やさまざまな組織ごとに検討を行い、GLAP蓄積量が増大するかを検討する。

これによりGLAPの蓄積量と病態との関連性を明らかにする。

(3) AGEには、複数のアミノ酸残基が關与する架橋型のものが存在し、独特の生理作用をもつと推定されている。実際我々は既にGAがLysとArgを架橋した形の構造「P4」を見出しており、さらに数種の架橋型AGEの存在を示唆するデータを得ている。このような架橋型AGEについて同様に単離・精製し、各種機器分析にて構造解析を行う。

(4) GLAPについて化学合成し、これをBSAとカップリングさせることにより単一のAGE構造 (GLAP-BSA) の作用 (細胞機能などの相互作用) について明らかにする。

(5) MG-H1、Arg-P、P4や新たに構造を同定したAGEについて、生体内における存在量を明らかにする。また糖尿病の病態による蓄積量変化についても検討する。

(6) 化学合成したGLAPを用い、これをキャリアタンパク質にカップリングして抗原とすることにより、GLAPに対する特異抗体を作製し、これを利用した免疫組織化学分析により、生体内GLAPの蓄積部位を特定する。さらに蓄積と病態との関連性を明らかにする。これにより組織ごとのAGEの蓄積しやすさを明らかにできる。

(7) これら研究成果を総合的に検討・検証し、糖尿病合併症発症におけるGA由来AGEの意義を考察する。

### 4. 研究成果

(1) グリセルアルデヒド由来AGEであるピリドピリミジウムの生体内検出

糖尿病患者の体内においてはメイラード反応が亢進し、多様なタンパク質修飾構造 (AGE) が蓄積して腎症、動脈硬化などの糖尿病合併症 (DC) の発症に關与する。とくにグリセルアルデヒド (GLA) による修飾は強い生理作用 (毒性) をもたらすことが知られているが、具体的なAGE構造やそれら個々の作用についての知見はほとんどない。P4は当研究室で同定されたGLA2分子がリジン、アルギニン間で架橋結合を形成したAGEのジヒドロピリドピリミジウム化合物である。P4が血漿タンパク質、コラーゲン、レンズタンパク質において、正常ラ

ット群と比較して糖尿病ラット群で有意に増加したことを明らかとした。また、飼育期間依存的にP4量が増加したことから、老化の新たな指標としても期待できる。糖尿病や白内障を発症している場合、デヒドロアスコルビン酸の含有量が増加することが知られており、そのデヒドロアスコルビン酸からGLAが形成すると考えられ、その結果P4が糖尿病性白内障のレンズタンパク質で顕著に増加すると考えられる。そこでデヒドロアスコルビン酸からGLAが形成され、P4が生成されるのかを検討した結果、P4が生成された。以上より、生体内におけるP4の生成経路の一部のメカニズムが明らかとなった。一方、GLA由来新奇AGEとしてP5を検出し、イミダゾピペリジン骨格によりLysとArgを架橋した構造であると同定した。P5は糖尿病患者の体内において早い段階で生成すると推定されるため、合併症の早期発症マーカーになると考えられる。

#### (2) グリセルアルデヒド修飾タンパク質の配列解析

当研究室では、リジン残基が修飾を受けているピリジニウム化合物のGLAPおよびアルギニン残基が修飾を受けているイミダゾリノン化合物のMG-H1を主要なAGEとして同定した。タンパク質としてリゾチーム、リボヌクレアーゼA、シトクロムcを用い、生理的な条件下でGLA修飾タンパク質におけるグリケーション生成物の解析と反応機構、配列解析によるアミノ酸残基の修飾部位について解析した。具体的にはSDS-PAGEによりモノマー、ダイマー、トリマーバンドを分画後、トリプシンによりゲル内消化を行い、LC-MS/MS分析により解析した。SDS-PAGEによる分析の結果、GLAにより修飾されたタンパク質は経時的に2量体以上の多量体が増加した。これは、GLAがタンパク質において付加物の生成だけではなく、架橋、重合を引き起こしていることを示唆している。GLA修飾タンパク質の配列解析の結果、リゾチームにおいてはアミノ酸配列のK33, K97, K116が修飾され、GLAPが生成していることが明らかとなった。また、同様にアルギニン残基においても検討を加え、MG-H1などの生成物を同定した。これらの結果から、GLA

により、タンパク質中に特定のアミノ酸残基が修飾を受けていることを明らかにした。(3) グリセルアルデヒド修飾タンパク質の生理作用機構

Caproyl-GLAPを抗原としマウスに免疫した結果、ELISAによりマウス抗血清が、7週目以降に顕著な抗体価の上昇を示した。また、競合ELISAによりGLAP特異的抗体であることを確認した。しかしながら、GLAPと同様のピリジニウム骨格を持つGA-pyridineおよびOP-Lysineに対して交叉反応を示した。よって、本研究により得た抗血清は、GLAP構造のピリジニウム骨格を認識する抗GLAPポリクローナル抗体であることが示された。HL-60細胞、PC12細胞および分化PC12細胞において、GLA-BSA濃度依存的にcontrolと比較して細胞増殖率が減少した。また、GLA-BSA添加群では抗GLAP抗体の添加により、細胞増殖率の減少が回復した。GLA-BSA中にはGA-pyridineおよびOP-Lysineは検出されていないため、抗GLAP抗体がGLA-BSAにおいてGLAPを捕捉することにより細胞毒性を抑制することが示唆された。これらの結果は、GLA修飾タンパク質の生理作用を示すエピトープの化学構造が、GLA由来の主要AGEのGLAPであることを支持した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- 1) 臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝ら、MALDI-TOF-MSによるグリセルアルデヒド修飾アンジオテンシンIIの分析、昭和学院短期大学紀要、45, 55-59 (2013). 査読有
- 2) 渡辺寛人、早瀬文孝、メイラード反応による着色機構、化学と生物、50, 80-82 (2012). 査読有
- 3) Y. Ono, H. Watanabe, F. Hayase, Identification of the blue pigment formed in a D-glucose-glycine reaction system, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 74, 2526-2527 (2010). 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 藤野麻美、早瀬 文孝、渡辺 寛人、上皮細胞の抗ウイルス応答に対するメイラード反応後期段階生成物の作用解析、2013年度日本農芸化学会、2013年3月26日、東北大学

2) 山岸理、渡辺寛人、早瀬文孝ら、グリセルアルデヒド修飾タンパク質が示す細胞毒性は、「GLAP構造」によるものである、2013年度日本農芸化学会、2013年3月25日、東北大学

3) 臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝ら、グリセルアルデヒド修飾タンパク質のグリケーション部位とアミノ酸配列、第22回日本メイラード学会、2012年12月21日、東京農工大学

4) T. Usui, H. Watanabe, F. Hayase et.al., Formation of Maillard reaction products derived from 3-deoxyxylosone, 11th International Symposium on the Maillard Reaction, 2012年9月17日, Nancy, France.

5) 山岸理、渡辺寛人、早瀬文孝ら、グリセルアルデヒド修飾タンパク質の配列解析、2012年度日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学

6) 木村圭一、渡辺寛人、早瀬文孝ら、グアニジン化合物によるグリセルアルデヒド由来グリケーション生成物の形成抑制、2012年度日本農芸化学会、2012年3月23日、京都女子大学

7) 臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝ら、ストロプトゾトシン誘発性糖尿病ラットにおけるグリセルアルデヒド由来架橋性グリケーション生成物の検出、21回日本メイラード学会、2011年10月28日、東京ステーションコンファレンス

8) 森澤秀行、渡辺寛人、早瀬文孝ら、糖尿病におけるグリセルアルデヒド由来蛍光性架橋グリケーション生成物の分析、2011年度日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大

9) 臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝ら、グリセルアルデヒドとクレアチン、リジンの共存下で生成するメイラード反応生成物の同定、第20回日本メイラード学会、2010年9月17日、お茶の水女子大

〔図書〕(計 1 件)

1) 渡辺寛人、早瀬文孝、メディカルレビュー社、AGEsの化学構造、2013、p. 55-61

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔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