グリケーションの生物学

永井 竜児, 佐野 裕之, 堀内 正公*

21 世紀初頭には、わが国の 65 歳以上の人口が国民の 4 分の 1 以上を占めるという急激な高齢化社会を迎えようとしている。これを反映して、加齢に伴って発症率が増加する糖尿病合併症・動脈硬化症などが急増して重要な社会問題となっている。この中でも老化(エイジング)との関連からメイラード反応後期生成物(AGE)が注目されている。この AGE の研究によって得られる情報は、加齢を基盤とする慢性疾患の予防・治療に関して基礎的な情報を提供すると期待される。

グリケーション(メイラード反応)とは

グルコースは、解糖系, TCA サイクルを経て生物万有のエネルギー源である ATP の産生に関与しており、生命維持に不可欠な物質である。しかしその反面、高い反応性を示すアルデヒド基を有するため、生体タンパク質と非酵素的に反応し、結果として様々な機能障害を惹起するという負の側面も持ちあわせている。本反応は、一般にグリケーション(glycation)、もしくは発見者の名に由来してメイラード (Maillard) 反応 (時にアミノ・カルボニル反応) と呼ばれており、大略すると次の 2 段

階の反応で説明される。すなわち、還元糖のアルデヒド基が N 末端アミノ基や、リジン残基の ϵ -アミノ基と反応してシッフ塩基を形成した後、1,2-エナミノールを経てアマドリ転位産物が生成する前期反応と、その後、酸化・脱水・縮合などの複雑な反応を経て、次第に褐色・蛍光・分子内および分子間の架橋形成、またマクロファージなどがもつ AGE 受容体によって、リガンドとして認識されるなどの特徴を有する advanced glycation end products (AGE) へと変化する後期反応に分けて考えられる (図 1)。AGE とは前期中間体が酸化・脱水反応などの複雑な反応を経て不可逆的に生成した構造体の総称であり、既知の AGE 構造としてカルボキシメチルリジン (CML)、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、X1、イミダゾロンなど⁽¹⁾ が挙げられる。

メイラード反応は当初、食品を加工、貯蔵する際に起こる褐変反応として広く食品化学者の間で研究されてきたが、1975 年にヘモグロビン β 鎖の N 末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位産物である HbA1c が生体から同定され、さらに 1984 年に AGE 化タンパク質の特徴の 1 つである蛍光性物質 (励起: 370 nm, 蛍光: 440 nm) が、脳の外側にあるコラーゲンから形成される脳硬膜 (dura mater) に加齢に伴って蓄積

Biological Significance of Glycation

*Ryoji NAGAI, Hiroyuki SANO, Seikoh HORIUCHI, 熊本大学医学部

図 1 ■メイラード反応 (グリケーション)

し、さらにそれが健常人より糖尿病患者のほうが高い値を示すことが報告されるに至り、生体でのメイラード反応が注目されるようになった。本稿では、老化、糖尿病合併症、動脈硬化症に対する AGE の関与、AGE と活性酸素との関係、また AGE 受容体について述べる。

AGE の生体内局在

実際、グリケーションを受けている生体内タンパク質は多数存在する。血液タンパク質では、先に述べた HbA1c をはじめアルブミン、LDL (低密度リポタンパク質) や HDL (高密度リポタンパク質) が知られており、また寿命が 120 日と長い赤血球の膜タンパク質もグリケーションを受けている。このように、多くの生体内タンパク質がグリケーションを受けているが、それらの大半はアマドリ産物までの前期反応による修飾である。メイラード反応はタンパク質のアミノ基とグルコースとの二分子反応であり、反応を促進するための要因はタンパク質あるいはグルコース濃度の上昇であるが、生体でグルコース濃度の上昇する病態は糖尿病として知られている。一方、AGE 化を受けるタンパク質側の増加は知られていないが、生体タンパク質は生まれてから死ぬまでの寿命が大きく異なり、この視点に立てば、当然短寿命のものより長寿命のタンパク質がグリケーションを受けやすく、結果として AGE 形成が促進されと考えられる。たとえば、一度合成されたら宿主と運命をともに

するといわれるほど長寿命タンパク質であるレンズクリスタリン、あるいは皮膚のコラーゲンや、神経系のミエリンも寿命が長いことが知られている。

さて、上述のように、脳硬膜には加齢に伴って AGE の特徴の一つである蛍光性物質が蓄積することが知られていたが、これらの蛍光性物質が AGE の量を直接反映するか否かは不明であった。これに対して近年、AGE 構造に対する特異抗体が開発され、免疫学的手法で生体組織における AGE の同定・定量が可能になった。ポリクローナル抗 AGE 抗体は、AGE 化したウシ血清アルブミン (AGE-BSA) をウサギに免疫して得られた抗血清から、アフィニティーカラムを用いて BSA に対する抗体を除去することによって得られる。また AGE-BSA を複数回免疫したマウスの脾臓をミエロマ細胞と融合した後、AGE-BSA と反応するが BSA とは反応しないコロニーを選別して、モノクローナル抗 AGE 抗体が得られている⁽²⁾。これらの抗体は、アマドリ転位産物などの前期生成物とは反応しないことから、糖とタンパク質の単なる結合物を認識しているのではなく、後期になって初めて現われる AGE 構造を特異的に認識していると考えられる。

抗 AGE 抗体を用いた免疫学的解析によって、ヒト水晶体に AGE の存在が同定され、AGE が加齢に伴って増加することが明らかとなり、老化現象 (エイジング) に対する AGE の関与が初めて示された⁽³⁾。特に、AGE 構造体の中でも抗 CML 抗体を用いた研究によって、ア

ルツハイマーの脳病変部⁽⁴⁾、糖尿病性腎症の腎組織⁽⁵⁾、粥状動脈硬化病変部⁽⁶⁾、透析性アミロイドーシスのアミロイドフィブリル⁽⁷⁾など、種々の病態でCMLが蓄積していることが明らかとなった。

また最近、糖尿病性増殖網膜症の血管新生(angio-genesis)の好発部位である、視神経乳頭部の血管壁にCMLの蓄積が示され⁽⁸⁾、さらにこれらCML蓄積部位は、vascular endothelial growth factor (VEGF)の局在と類似していることから、糖尿病性網膜症の進展に対するAGEの関与が推測されている。しかし現段階では、AGE蓄積が原因となって様々な病態を発症させるのか、あるいは疾病の発症に伴いAGE蓄積が結果として生じるのか、つまりAGE蓄積は原因であるのか、あるいは結果に過ぎないのか依然として明らかではない。しかし、AGEが加齢に依存して増加し、さらに糖尿病合併症などでAGE蓄積が増加・亢進することから、老化や老化を基盤とする疾患の発症・進展にAGEは少なくとも増悪因子として作用していると考えられる。

グリケーションと活性酸素

グリケーションでは、前期反応のアマドリ産物の形成までは酸化反応が関与しないが、ペントシジン、CMLなどのAGE構造体の形成には酸化反応が必須である⁽⁹⁾。特に、主要なAGE構造体の一つであるCML⁽¹⁰⁾は、多価不飽和脂肪酸の酸化からも、グリオキサールを経由して生成されることから、生体タンパク質が糖化(glycation)および酸化(oxidation)されたことを反映するglycoxidation productとして注目されている。

最近、アマドリ転位産物は、活性酸素によって酸化されてAGE化する反面、活性酸素の発生源でもあることが明らかになりつつある。Mullarkeyらは、電子スピン共鳴(ESR)によって、500 mMのグルコースと7日間インキュベートしたRNaseからスーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$)が発生することを報告している⁽¹¹⁾。同様に、神経原線維(PHF)タウタンパク質もグリケーションによって $O_2^{\cdot-}$ が発生し、これが活性酸素によって活性化されることが知られる転写因子NF- κ B(nuclear factor κ B)を活性化することが、神経腫瘍細胞株(SK-N-SH)において報告されている⁽¹²⁾。さらに、 $O_2^{\cdot-}$ の消去酵素として知られるCu-Zn-スーパーオキシドジスムターゼ(Cu-Zn-SOD)がグリケーションを受けると、酵素活性の失活とともに、反応の進行に伴ってアマドリ転位物から発生した $O_2^{\cdot-}$ から不均化反応によって過酸化水素(H_2O_2)が形成され、これがCu-Zn-SODの有する

Cuとフェントン反応を起こし、ヒドロキシルラジカル($OH\cdot$)が発生する。 $OH\cdot$ はDNA鎖やタンパク質を切断する特性を有し、種々の生体反応にtoxicに作用すると考えられる。

これらのことから、生体におけるグリケーションの進行は、アマドリ転位産物に由来する活性酸素によって、生体内の酸化ストレスを増強させる一因となる可能性がある。グリケーションがどの程度寄与しているかは明らかとなっていないが、実際、DNAの酸化レベルの指標である8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)は、インスリン依存性糖尿病患者の血液単球細胞では、正常者に比べて有意に高く、さらに尿中CML含量も正常者に比べて高値であることが報告されている。

さて、先に述べたようにCMLの生成は非酸化的条件下や、抗酸化剤の添加によって抑制されることから、その生成には活性酸素種が関与していることが提唱されている。筆者らは、アマドリ転位産物からのCML生成に関与する活性酸素種を明らかにするために、以下の実験を行なった。

まず、非酸化的条件下でヒト血清アルブミン(HSA)とグルコースを保温して、CMLを含まない糖化HSA(glycated-HSA)を調製し、 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ と反応させた後に、CMLを特異的に認識するモノクローナル抗体(6D12)によって、CMLの生成を比較検討した。CML含量が検出感度以下であったglycated-HSAに、0.4 mMの Fe^{2+} を添加して1時間保温すると、CMLが有意に生成され、この反応は H_2O_2 の同時添加によって、濃度依存的に増加した(図2)。これに対して、 Fe^{2+} 非存在下で H_2O_2 および $O_2^{\cdot-}$ 処理をしても、glycated-HSAからCMLの生成は起こらなかった。また、 Fe^{2+} 添加によるglycated-HSAからのCMLの生成は、 H_2O_2 消去酵素であるカタラーゼや、 $OH\cdot$ 消去剤であるマンニト

図2 ■ CML生成に対する遷移金属と過酸化水素の影響

図 3 ■ グリケーションに伴う活性酸素の発生

M: 遷移金属

ールによって有意に抑制されるが、SOD では抑制されなかった^(13,14)。

これらの結果は、アマドリ転位物から CML の生成には $\text{OH}\cdot$ が関与していることを示している。また、 Fe^{3+} は glycated-polylysine と結合し、その結合にはアマドリ転位物のエネジオール構造が関与していることが推測されている。したがって、遷移金属はタンパク質のエネジオール構造に結合した後、アマドリ転位物などから発生した H_2O_2 とフェントン反応によって金属結合部位で $\text{OH}\cdot$ を発生し(図 3)⁽¹⁵⁾、自らのタンパク質や周囲の組織に障害的に作用すると考えられる。さらに、遷移金属によってグルコースが自己酸化を起こし、 $\text{OH}\cdot$ を発生する可能性も考えられている。これらの結果から、CML は加齢に伴って次第に蓄積するのみならず、炎症を伴う病態では発生したヒドロキシルラジカルによって、比較的短期間に組織に蓄積する可能性が考えられる。

一方、活性酸素種の発生源として、太陽光に含まれる紫外線の皮膚への曝露が考えられるが、Mizutani ら⁽¹⁶⁾ は露光部に誘発される日光性弾性繊維症 (actinic elastosis) の病変部で増生した弾性繊維に CML の蓄積が高いことを見だしており、AGE 蓄積が皮膚の日光老化現象にも関係していることを明らかにしている⁽¹⁷⁾。

AGE 受容体の構造と機能

AGE 化タンパク質は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージなどに発現する AGE 受容体と反応し、種々の細胞現象を惹起することが知られている。こ

れまでに cDNA がクローニングされている AGE 受容体としては、MSR-A (macrophage scavenger receptor A)⁽¹⁸⁾、ガレクチン-3⁽¹⁹⁾、RAGE (receptor for AGE)⁽²⁰⁾ の 3 つが知られている。MSR-A の cDNA を CHO 細胞に過剰発現させると、これらの細胞は MSR の本来のリガンドであるアセチル LDL 同様、AGE-BSA に対しても活発に取り込むようになる⁽²¹⁾。また、MSR ノックアウトマウスの腹腔マクロファージを用いた最近の実験によると、ノックアウトによって AGE タンパク質に対するマクロファージの貪食活性も有意に減少した⁽²²⁾。これらの結果は、少なくともマクロファージでは、AGE タンパク質は主に MSR を介して取り込まれることを示しており、MSR の新たな機能として注目される。その他、スカベンジャー受容体ファミリーとして提唱されている CD36、FcγRII-B2、SR-BI (scavenger receptor B-I)、バクテリア結合タンパク質である MARCO (macrophage receptor with a collagenous structure) などについても、これら受容体が AGE をリガンドとして認識するかどうか興味あるところである。

AGE 化タンパク質がリガンドとして認識され、細胞内に取り込まれた後にリソゾームで分解されるというプロセスのいずれかがシグナルとなり、マクロファージや血管内皮細胞などに種々の現象を惹起することが報告されている。たとえば、マクロファージでは TNF、IL-1、IL-6、IGF-1、GM-CSF などのサイトカインが分泌され、細胞増殖・遊走が惹起される⁽²³⁾。血管内皮細胞ではトロンボモジュリンの活性を阻害し、同時に組織因子の活性を上昇させる(図 4)。また、内皮下への単球の遊走

図 4 ■ AGE 受容体を介した細胞の応答

TNF：腫瘍壊死因子，IL：interleukin，IGF：インスリン様成長因子，GM-CSF：顆粒球マクロファージコロニー刺激因子，PDGF：血小板由来成長因子，R：レセプター，N：核

を促進し，動脈硬化初期病変に伴う泡沫細胞形成に関与することも示唆されている。

グリケーションと動脈硬化

血管壁の粥状動脈硬化病変は，病理学的に泡沫細胞 (foam cell) と呼ばれるコレステロールエステル蓄積細胞の出現が特徴である。特に，初期病変では血管内皮に遊走した血中単球がマクロファージに分化する。一方，血中から血管内皮下に移行した LDL は何らかの化学修飾を受けて修飾 LDL へと変化して，これはマクロファージスカベンジャーレセプター (MSR) を介して，マクロファージから活発な取り込みを受け，細胞内にコレステロールエステルを蓄積した泡沫細胞へと変化する (図 5)。

1981 年，血清 LDL の酸加水分解物中に furosine が同定された。すなわち，グリケーションを受けた LDL (glycated-LDL) が初めて示され，このとき，糖尿病患者の glycated-LDL レベルは非糖尿病患者に比べて有意に高値であった。LDL がグリケーションを受けると LDL 受容体に対する認識が低下する結果，クリアランス遅延が起こり，血中 LDL コレステロール値が上昇し，結果として動脈硬化惹起性に作用すると考えられる。さらに，糖尿病患者から分離した LDL は，そのグリケーションのレベルに応じて，健康人より分離した LDL よりも銅による酸化修飾を受けやすいことが知られているが，これは上述したグリケーションによるアマドリ転位物からの活性酸素種の発生メカニズムから理解できる。また，LDL におけるグリケーションが前期から後期まで進行すると，AGE 化した LDL (AGE-LDL) が生成

図 5 ■ 修飾 LDL による泡沫細胞形成機構

CE：コレステロールエステル，LDL：低密度リポタンパク質

する可能性が考えられる。

Bucala らは、血中 LDL をタンパク質成分 (AGE-apoB) と脂質成分 (AGE-lipid) に分画し、抗 AGE 抗体血清を用いた ELISA によって両成分の AGE を定量し、腎不全や糖尿病性腎症では健常人より有意に上昇していることを示した⁽²⁴⁾。彼らが使用している抗 AGE 抗体のエピトープは依然として不明であるが、CML 化した LDL (CML-LDL) は GC-MS 法によって、健常人の血清中に同定されている。つまり、LDL はグリケーションによって、①血中におけるクリアランスの遅延、②LDL の易酸化性の増加、③AGE-LDL 形成、の3つの経路を介して動脈硬化惹起的に作用すると考えられる。最近筆者らは、メイラード反応中間体であるグリコールアルデヒドを用いて調製した AGE-LDL が、高いマクロファージ泡沫化能を有することを見いだした。マクロファージが AGE-LDL のどのような構造を認識して泡沫細胞に至るのか、興味深いところである。

文献

- 1) 永井竜児, 堀内正公: “蛋白の糖化—AGEの基礎と臨床”, 医学書院, 1997, p. 27.
- 2) S. Horiuchi, N. Araki *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **266**, 7329 (1991).
- 3) N. Araki, N. Ueno *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 10211 (1992).
- 4) T. Kimura, J. Takamatsu *et al.*: *Neurosci. Lett.*, **208**, 53 (1996).
- 5) H. Makino, K. Shikata *et al.*: *Kidney International*, **48**, 517 (1995).
- 6) S. Kume, M. Takeya *et al.*: *Am. J. Pathol.*, **147**, 654 (1995).
- 7) T. Miyata, O. Oda *et al.*: *J. Clin. Invest.*, **92**, 1243 (1993).
- 8) T. Murata, R. Nagai *et al.*: *Diabetologia*, **40**, 764 (1997).
- 9) M. Fu, K.J. Wells-Knecht *et al.*: *Diabetes*, **43**, 676 (1994).
- 10) K. Ikeda, T. Higashi *et al.*: *Biochemistry*, **35**, 8075 (1996).
- 11) C.J. Mullarkey, D. Edelstein *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 932 (1990).
- 12) S.D. Yan, S.F. Yan *et al.*: *Nature Med.*, **1**, 693 (1995).
- 13) R. Nagai, K. Ikeda *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 167 (1997).
- 14) 永井竜児, 堀内正公: “Diabetes Frontier”, Vol. 8, メディカルレビュー社, 1997, p. 270.
- 15) M. Chevion: *Free Rad Bio & Med.*, **5**, 27 (1988).
- 16) K. Mizutani, T. Ono *et al.*: *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 797 (1997).
- 17) 小野友道ほか: “Bio Clinica”, Vol. 11, 北隆館, 1996, p. 335.
- 18) T. Kodama, M. Freeman *et al.*: *Nature*, **343**, 531 (1990).
- 19) H. Vlassara, Y.M. Li *et al.*: *Molec. Med.*, **1**, 634 (1995).
- 20) M. Nepper, A.M. Schmidt *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 14998 (1992).
- 21) N. Araki, T. Higashi *et al.*: *Eur. J. Biochem.*, **230**, 408 (1995).
- 22) H. Suzuki, Y. Kurihara *et al.*: *Nature*, **386**, 292 (1997).
- 23) H. Vlassara, R. Bucala *et al.*: *Lab. Invest.*, **70**, 138 (1994).
- 24) R. Bucala, Z. Makita *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9441 (1994).

プロフィール

東江 栄 (Sakae Agarie) 昭和40年8月24日生<略歴>平成元年琉球大学農学部農学科卒業/3年九州大学大学院農学研究科農学専攻修士課程修了/6年同博士課程修了/同年日本学術振興会特別研究員/9年生物系特定産業技術研究推進機構派遣研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>作物学, 光合成と物質生産

石浦 章一 (Shoichi Ishiura) Vol. 34, No. 12, p. 792 参照。現在, 東京大学大学院総合文化研究科・生命環境科学系教授

小山内 実 (Minoru Osanai) 昭和6年4月18日生<略歴>昭和29年東京大学

理学部動物学科卒業後, ドイツ・マックスプランク生化学研究所研究員, 東京都老人総合研究所研究員を経て, 金沢大学理学部教授, 平成9年同退官, 現在にいたる<研究テーマと抱負>昆虫のアミノ酸代謝と生理的意義<趣味>蝶採集

小田 順一 (Jun'ichi Oda) 昭和9年12月20日生<略歴>昭和34年京都大学農学部農芸化学科卒業/40年同大学大学院博士課程修了/同年同大学化学研究所助手/48年同助教授/59年同教授, 現在にいたる<研究テーマと抱負>生体機能の解明とその応用<趣味>スポーツ観戦, 読書

加藤 雅士 (Masashi Kato) 昭和39年8月11日生<略歴>昭和62年名古屋大学農学部農芸化学科卒業/平成元年同大学大学院修士課程修了/4年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了(農博)/名古屋大学遺伝子制御学講座助手, 現在にいたる。この間, 平成3~4年日本学術振興会特別研究員<研究テーマと抱負>下等真核生物(カビ)における遺伝子制御とタンパク質の局在化機構。これらの研究を通じて, 真核生物の普遍的に存在する生命現象の理解とともに, 遺伝子・酵素の新たな高度利用の可能性を探っていく<趣味>演劇鑑賞, テニス, スキー