Maillard 反応生成物の核酸鎖切断活性 ——とくに D-イソグルコサミンについて†

藤 井 昭 治

(京都府立大学農学部)

1. はじめに

還元糖とアミンの反応は一般に“アミノカルボニル反応”あるいは“Maillard 反応”と呼ばれていて、とくにアミンとして基本的なアンモニアとの反応では、化学的には古くより知られている Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Transformation の反応⁽¹⁾に包含される系の一部と理解できる領域であり、一方生体系においてはアンモニアは、L-グルタミンを經由して、アミノ基としてフラクトース-6-リン酸へ導入される 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース (D-グルコサミン) の生合成経路等が知られている。

アンモニアと還元糖の反応では、触媒としてのアンモニアの存在下、アルドース、ケトース間の相互転換、異性化、次いでこれら化合物の二次的なアンモニアとの反応、アマドリ転位、脱水縮合あるいは開裂反応等を経てイミダゾールあるいはピラジン誘導体の生成にまで至る複雑な経過の反応系が知られている⁽²⁾。アミノ糖としてはこの反応系において 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース (D-グルコサミン) が分離確認されているが、1-アミノ-1-デオキシ-D-フルクトース (D-イソグルコサミン) はその生成が予想され、かつこのアミノ糖が関与しない限り生成の説明が不可能な化合物の存在が確認されているにかかわらず、多くの反応生成物中から D-イソグルコサミンは分離同定されていない。この原因として 1 つは D-イソグルコサミンの高反応性に基づいて早急な他物質への変換のため検出が困難なこと、あるいは糖蛋白質、糖脂質等いわゆる“Glycoconjugates”の領域⁽³⁾において D-グルコサミン、D-ガラクトサミン、あるいはシアル酸等のアミノ糖の役割に比し、D-イソグルコサミンに

関する認識が少ない結果ではないか等が考えられる。

本稿においては、還元糖とアンモニアより、その生成が確認されている D-グルコサミンに比して、はるかに強力な DNA 鎖切断活性を示し、同じくその反応系で生成が予想されている D-イソグルコサミンについて略説を試みたい。

2. D-イソグルコサミンの化学合成について

合成法としてはオゾン還元法、アマドリ転位法、ピラジン環開裂法の 3 つに大別される。約 100 年前、Fischer はフェニールグルコソーンを亜鉛と酢酸で還元することにより D-イソグルコサミンを合成したが⁽⁴⁾、1930 年以来 Weygand らが芳香族アミンと 6 炭糖、5 炭糖との N-グリコシドの合成に関する一連の研究で、D-グルコースと種々の芳香族アミンよりアマドリ転位を經由して多くの結晶状 D-イソグルコサミン誘導体を合成した⁽⁵⁾。次いで Kuhn らはパラジウム触媒を用いて、たとえば p-トリル-D-イソグルコサミンを水素添加分解することにより、オゾン法で得たと同一の D-イソグルコサミン酢酸塩を結晶状に分離している⁽⁶⁾。さらに Kuhn らは D-グルコサミンの 2 分子縮合物である 2,5-ビス (D-アラビノテトラヒドロキシブチル) ピラジンを接触水素添加分解してピラジン環を開裂させ、D-イソグルコサミンを得た⁽⁷⁾。

3. D-イソグルコサミンの DNA 鎖切断活性について

アスコルビン酸あるいはいわゆるレダクトン等のウィルス粒子不活性化作用は 1930 年後半の比較的古い時期から知られている事実であり、この不活性化は DNA 鎖切断損傷に基づくものであることが確認されている⁽⁸⁾。

糖類を含むレダクトン類の、生成する酸素ラジカルによる核酸鎖切断反応等、核酸鎖損傷機構に関する詳細については、駒野および柏村・森田の総説を参照していただくこととして^(9,10)、本稿では重複を避けた。DNA 鎖

† DNA Strand Breakage by Maillard Intermediate D-Isoglucosamine.

Shoji FUJII (Kyoto Prefectural University, Shimogamo, Sakyo-ku, Kyoto 606)

図 1 D-イソグルコサミンの各濃度における核酸鎖切断状態 (RF I, RF II, RF III の存在比率) および種々の糖の 20 mM の濃度における核酸鎖切断状態

切断活性におけるレダクトンとしての糖類の反応機構は複雑であるが一般にエンジオール構造に基づくものであり、D-グルコサミンと同様 D-イソグルコサミンについてもアミノレダクトンとしてその核酸鎖切断活性は当然予想されるものであった。

ラセン構造で 2 本鎖閉環ねじれ型スーパーコイル状の大腸菌ファージ $\phi \times 174$ DNA (RF I) は、酸素ラジカル等の作用を受けて 2 本鎖の一方が切断を受け、スーパーコイル状から閉環構造 DNA (RF II) となり、さらに 2 本鎖がそれぞれ切断を受けて直鎖 DNA (RF III) へと変換される。これらはアガロース電気泳動法で分離され定量が可能である。種々な濃度における D-イソグルコサミンによる核酸鎖切断状態 (3 種の DNA の比率) および比較として 20 mM の濃度における他の還元糖による核酸鎖切断状態を示した (図 1)。

具体的実験方法は報文^(11,12)を参照していただくとして本稿ではふれないが、DNA 鎖切断活性において必要とする遷移金属として Cu^{2+} に特異的であるほかは、EDTA 等のキレート剤により反応が阻害され、また

SOD 等酸素ラジカルスカベンジャーでその活性が阻害される点、他の還元糖の、種々の酸素ラジカルの生成に基づく DNA 鎖切断機構と同じ反応であると考えられる。

一般の還元糖と異なる点は、遊離のアミンの 1 種として L-リジンの場合のごとく⁽¹³⁾直接 DNA 鎖と反応する可能性も考えられ、またこれらアミノ糖の場合は *in vivo*, *in vitro* の反応系で 2 分子が酸化的脱水縮合してピラジン誘導体を生成し^(14,15)、ピラジニウムラジカルとの関与⁽¹⁶⁾も予想される。

4. 糖構造と DNA 鎖切断活性との相関関係

図 1 には検討した糖の一部を示してあるが、各種の還元糖の 20 mM の濃度における DNA 鎖切断状態が D-イソグルコサミンの何 mM の濃度に相当するかを示した。D-イソグルコサミンの活性は検討した糖のうち最も強力であった。還元糖は一般に炭素鎖が短いほど活性が大であり、同一の炭素鎖の糖では、中性糖、アミノ糖を通じて D-マンノ構造 > D-ガラクト構造 > D-グルコ構造の順位がみられ、アミノ糖はアミノ基がアセチル基などで誘

導体化されると活性が低下し、これは L-リジン等においてアミノ基がアセチル基などでブロックされた場合にファージ不活性化作用が低下した⁽¹⁸⁾事実とよく似た現象である。また 2-アミノ置換、第一級アルコールのリン酸エステル化により著しくその DNA 鎖切断活性が増強される効果がみられた。

5. D-イソグルコサミンのバクテリオファージ不活性化

アスコルビン酸については、分離精製された DNA の *in vitro* における DNA 鎖切断活性の検討に先立って調べられているのは、ウイルスに対する不活性化作用である⁽⁹⁾。D-イソグルコサミンに関しては pH 7.1 のトリス緩衝液中で処理後、プラーク法で生存率を調べたところ、塩化第二銅の存在下、ssDNA を持つ M 13, λ , dsDNA の T4D, ssRNA の Q β 等のファージの生育を完全に阻害する結果を得た。

さらに D-イソグルコサミンと処理後、これらファージの DNA を抽出して検討したところ、いずれも核酸鎖切断を受けていて、バクテリオファージの不活化はその核酸の損傷に基づくものであった。

6. おわりに

植物組織において、どのような経路で D-グルコサミンが生合成されているかについての知見は見当らないが、大豆等より得られる糖蛋白質植物レクチンは、その糖鎖構造中に D-グルコサミンが発見されている⁽¹⁷⁾。

動物組織においては、D-グルコサミン、D-ガラクトサミン等いわゆる 2-アミノヘキソースの存在はきわめて普遍的であるにもかかわらず、投与された D-ガラクトサミンは肝障害を誘発することが知られている⁽¹⁸⁾。また投与された D-グルコサミンのがん細胞に対する毒性は、D-グルコサミンがヘキソキナーゼで 6-リン酸化され、その際生成する D-グルコサミン-6-リン酸がこの生合成系を制御せず、非制御下に反応が進行することが毒性の原因の 1 つと考えられている⁽¹⁹⁾。

ウイルス不活性化を目的として植物へアミノ糖を投与する場合、宿主植物に対する毒性を検討する必要がある。D-グルコサミンは植物の生長を阻害するが D-イソグルコサミンニューロン酸は D-イソグルコサミンと同程度の DNA 鎖切断活性を保ちつつ、植物に対する毒性がきわめて少なく⁽²⁰⁾、これらの事実、植物に対してアミノ糖を使用する場合について、ある程度の可能性を示唆している。

前述のごとく、活性酸素ラジカルを生成して核酸鎖切断活性を示す物質は還元糖のみならず広くキノン、ポリフェノール類等いわゆるレダクトンとして知られているものであるが、また一方、ファージ不活性化作用を示す物質としてアミノ酸とくに L-リジン等の塩基性アミノ酸が有効であり⁽¹⁸⁾、これらは遷移金属イオンを必要とせず、いわゆるレダクトン類とは全く別の機構であると考えられる。核酸鎖切断活性を持つ物質の多くは変異原性、発がん性であり、食品と関連を持つ Maillard 反応系に含まれる物質群とくにアミノ化合物の作用と反応経路を詳細に検討することは、発がん性の防御、抗ウイルス活性への利用等両面にわたって重要な意味を持つと考えられる。

血中還元糖と蛋白質との反応からの 1-アミノ糖誘導体であるいわゆる“fructosamine”は糖尿病の病徴の指標ともなり⁽²¹⁾、また DNA 核酸鎖切断活性については、緩慢な還元糖と核酸塩基との相互作用による 1 種のアルキル化剤的な機構での核酸鎖の損傷も予想され、さらに活性な Maillard 反応生成物と、核酸保護の核蛋白との相互作用、これらが老化と密接な関係があるとも考えられていて⁽²²⁾今後十分なる実験事実に基づいて検討されるべき問題であろう。

アミノ糖とくに 2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコースの生合成経路としては、L-グルタミン-フルクトース-6-リン酸-アミノトランスフェラーゼの関与する経路について教科書の定着がみられるが、本来、F-6-P $\xrightleftharpoons{NH_3}$ glucosamine-6-P の系では反応は著しく F-6-P へかたよっていて効率の良いアミノ糖合成系路とは思われない⁽¹⁹⁾。抗生物質中に含まれている種々のアミノ糖についてもその生合成経路は不明な点も多く、D-イソグルコサミン経由の経路も含めて、アミノ糖生合成経路を整理再検討することは、今後この領域の発展に対して重要な礎石となるであろう。

- (1) J.C. Speck, Jr.: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **13**, 63 (1958).
- (2) M.J. Kort: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **25**, 311 (1970).
- (3) "The Glycoconjugates," Vol. 1~4, ed. by M.I. Horowitz and W. Pigman, Academic Press, New York, 1977-1982.
- (4) E. Fischer: *Ber. dtsch. chem. Ges.*, **19**, 1920 (1886).
- (5) F. Weygand: *Ber. dtsch. chem. Ges.*, **73**, 1259 (1940).

- (6) R. Kuhn und H. J. Haas : *Liebigs Ann. Chem.*, **600**, 148 (1956).
- (7) R. Kuhn, G. Krüger, H. J. Haas und A. Seeliger : *Liebigs Ann. Chem.*, **644**, 122 (1961).
- (8) 村田 晃 : 蛋白質 核酸 酵素, **20**, 593 (1975).
- (9) 駒野 徹 : 農化, **61**, 233 (1987).
- (10) 柏村直樹, 森田潤司 : 有機合成化学, **42**, 523 (1984).
- (11) S. Nanjou, S. Fujii, K. Tanaka, K. Ueda and T. Komano : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2865 (1984).
- (12) S. Nanjou, S. Fujii, K. Tanaka, K. Ueda and T. Komano : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 459 (1985).
- (13) 村田 晃, 田中啓志, 中津海和正, 源野昭治, 加藤富民雄, 猿野琳次郎, 近藤道男 : 農化, **52**, 385 (1978).
- (14) S. Fujii and Y. Kosaka : *J. Org. Chem.*, **47**, 4772 (1982).
- (15) S. Fujii, R. Kikuchi and H. Kushida : *J. Org. Chem.*, **31**, 2239 (1966).
- (16) M. Namiki and T. Hayashi : "The Maillard Reaction in Foods and Nutrition," ed. by G. R. Waller and M. S. Feather, Am. Chem. Soc., Washington, 1983, p. 21.
- (17) L. Dorland, H. van Halbeek, J. F. G. Vliegenthart and N. Sharon : *J. Biol. Chem.*, **256**, 7708 (1981).
- (18) D. Keppler, R. Lesch, W. Reutter and K. Decker : *Exp. Mol. Pathol.*, **9**, 279 (1968).
- (19) 立木 蔚 : 蛋白質 核酸 酵素, **22**, 1828 (1977).
- (20) 未発表.
- (21) J. R. Baker, J. P. O'connor, P. A. Metcalf, M. R. Lawson and R. N. Johnson : *Br. Med. J.*, **287**, 863 (1983).
- (22) R. Bucala, P. Model and A. Cerami : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 105 (1984).