アマドリ化合物およびグリコシル化タンパク質の酸化的開裂†

川 岸 舜 朗

(名古屋大学農学部)

アミノカルボニル反応は生体成分が関与する場合、通常アミノ酸と還元糖の反応として把握されている。 Schiff塩基の形成に始まり、この不可逆反応によりアマドリ化合物(ケトアミン)を生成する。これは食品系の反応ではさらに褐色色素メラノイジンや加熱処理が加わることで揮発性香気の形成につながっている。一方、生体系でもこのような反応は当然起り、その場合還元糖との反応に関与するのはタンパク質のN末端アミノ基やリジン残基のε-アミノ基、アルギニン残基のグアニジン基である。ここに形成されるSchiff塩基は同様にアマドリ転位して、比較的安定な生成物、ケトアミン体を生ずる(図1)。これはヒト糖尿病の二次障害、白内障や老化のトリガーになっているといわれている。ここでは生体内で生成するグリコシル化タンパク質(glycated protein)およびそのモデルとしてのアマドリ化合物と金属イオンとの生理条件下における相互作用について概説する。

1. タンパク質のグリケーションとクロスリンキング

タンパク質は *in vivo* でも、生体条件下でも容易にグルコースと付加物を形成する⁽¹⁻³⁾。たとえばコラーゲンはグリコシル化とともに不溶化が進み、蛍光物質が増加すること⁽³⁾、RNaseにおいてはタンパク質の表面に位置するリジン残基が選択的にグリコシル化され⁽²⁾、しかもこれは¹³C-NMRによりアマドリ型の付加物(ケトアミン体)であることが証明されている⁽⁴⁾。この過程を図1に示す。このグリコシル化タンパク質は生体中では主として2つの方向に変化すると思われる。1つは advanced glycosylation end products (AGE) と総称される褐色で、蛍光性の重合体の生成であり、他の1つは酸

素と微量の遷移金属イオンの関与で誘導される活性酸素の生成と、これに伴うグリコシル化タンパク質の酸化的開裂である。

AGEの形成はタンパク質の非酵素的グリコシル化に始まるタンパク質間のクロスリンキングによる多量体の生成を意味している⁽⁶⁾。多量体形成に関連して、グリコシル化ポリリジンや-BSA(牛血清アルブミン)の酸加水分解物から蛍光物質 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole (FFI) がクロスリンクの鍵を握る物質として分離、同定された^(6,7)。しかし、その後 FFI は AGE の酸加水分解によってできる二次生成物であり、タンパク質のクロスリンクを形成する物質ではないと指摘された^(8,9)。このクロスリンクを形成する物質としてピロール誘導体も考えられている。すなわち、図1Aに示すようにグリコシル化タンパク質が、いったん 3-デオキシグルコソソ (3-DG) とタンパク質に開裂し、ふたたび縮合反応を行ってピロール誘導体とし、タンパク質のクロスリンクを形成するというものである⁽¹⁰⁾。このピロール化合物は 5-hydroxymethyl-1-alkylpyrrole-2-carbaldehyde で、これ自体も二量化するし、他のアミノ化合物とも容易にSchiff塩基を形成する⁽¹¹⁾。

2. グリコシル化タンパク質の酸化的開裂

タンパク質のグリコシル化は、その多量化を起こす一方で、酸化的な断片化をも誘導する。Ahmedら⁽¹²⁾はグリコシル化 RNase、-ポリリジンおよび *N*^ε-ホルミル-*N*^ε-フルクトースリジン (fFL) を 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中 37°C で 15 日間インキュベートし、前者については加水分解して、これらを HPLC で分析した。その結果、いずれからも *N*^ε-カルボキシメチルリジン (CML) が、また fFL からは同時にエリスロン酸 (EA) も検出された(図1B)。しかも反応系を窒素置換することにより、その生成量は激減し、リン酸緩衝液の濃度を低減することにより CML 生成量も低下した。しかもこの CML や EA は十数年前にすでに血漿、尿に見出

† Oxidative Fragmentation of Amadori Compound and Glycosylated Protein.

Shunro KAWAKISHI (Department of Food Science and Technology, Nagoya University, Nagoya 464-01)

図 1 グリコシル化タンパク質の生成と酸化的開裂

されていたし、また糖尿病患者の尿ではこれらが増加することも知られていた。このことからヒトの体内、とくに糖尿病患者の体内でタンパク質のグリコシル化とその酸化的開裂が起こっていることは確かであろうと思われる。fFL から CML への酸化的開裂は活性酸素の捕捉剤、金属イオンのキレート剤やカタラーゼなどで顕著に阻害されることから⁽¹²⁾、この酸化開裂はリン酸塩中に痕跡程度混在する金属イオン関与による活性酸素の生成とその作用によるものと考えられている。同時に Ahmed らは、fFL の酸化開裂において、CML 生成の他 3-(N^ε-リジノ)-乳酸(LL) とグリセリン酸(GA) も微量ではあるが生成されること、および CML と LL がヒトのレンズクリスタリンや尿にも検出されることを報告している⁽¹³⁾。しかもヒトのレンズクリスタリン中の N^ε-フルクトースリジン(FL) 残基は年齢によってわずかにしか変化しないが、CML 量は 0~80 歳までほとんど直線的に増加することが知られている⁽¹⁴⁾。

Ahmed らの研究では、反応系に金属イオンは添加していないが、この系に遷移金属イオンを加えたらどのような挙動を示すのだろうか。著者らはアマドリ化合物と

図 2 アマドリ化合物の酸化的開裂に対する銅イオンおよびリン酸緩衝液の効果

フルクトース-β-アラニン 10 mM, ●, 水溶液, 銅イオン無添加; □, M/15 リン酸緩衝液 (pH7.2), 銅イオン無添加; ▲, M/15 リン酸緩衝液 (pH7.2), 銅イオン (II) 50 μM; ○, M/15 リン酸緩衝液 (pH7.2), 銅イオン (II) 500 μM; インキュベーション 40°C.

してフルクトース-β-アラニン (FA) を用い M/15 リン酸緩衝液中 (pH 7.2) で Cu(II) の添加効果について調べた。図 2 に示すように水溶液中、Cu(II) 無添加では FA はほとんど変化しないが、リン酸緩衝液中、Cu(II) 無添加では Ahmed らと同様徐々にその分解が進行し

表 1 生理条件下アマドリ化合物の銅イオン (II) 関与による
アミノ酸とグルコソンの酸化開裂

Incubation time (h)	Fructose- β -alanine (FA)			Fructose- <i>p</i> -toluidine (FT)			Fructose-phenylalanine (FP)			<i>N</i> ^α -Fructose- <i>N</i> ^α -Boc- lysine (FL)		
	FA	β -Ala	Aldos ^a	FT	<i>p</i> -T	Aldos ^a	FP	Phe	Aldos ^a	FL	Boc-Lys	Aldos ^a
0	10.0	0	0	2.0	0	0	2.0	0	0	10.0	0	0
2	7.7	0.9	0.8	1.5	0.5	0.5	1.0	0.9	1.0	6.7	3.8	3.0
4	6.0	1.9	2.1	1.3	0.7	0.9	0.2	1.7	1.8	3.6	5.1	4.1
8	4.6	4.0	4.4	1.0	1.1	1.2	0.0	1.7	1.9	1.8	6.4	5.3
24	0.6	7.8	8.8	0.3	1.6	1.6	0.0	1.7	1.9	0.0	7.0	6.9

Incubation: FA and FL (each 10 mM), Cu²⁺ 100 M μ ; FT and FP (each 2.0 mM), Cu²⁺ 50 M μ were incubated in phosphate buffer solution (pH 7.2), respectively, at 40°C for 24 h. The values in Table were represented by mM concentration. ^a: Aldosulose (calculated as glucosone).

た。しかし Cu(II) を添加するとその濃度依存により顕著に FA は分解され、その約 80% は β -アラニンと D-グルコソソ (D-*arabino* hexosulose) を生成した⁽¹⁵⁾。図 1C に示すようにアマドリ化合物が Cu(II) 存在下、自動酸化的にアミノ酸とグルコソソへ開裂することは表 1 に示す他の三種類のアマドリ化合物の例でも明らかであった。また *N*^α-Boc FL について分解物を詳細に検討したところ、Boc-リジン、グルコソソの他に微量ではあるが Boc-CML も分離、確認された⁽¹⁶⁾。この酸化開裂は EDTA や DTPA などの金属キレート剤添加で顕著に阻害されることから、遷移金属イオン関与による自動酸化反応と考えられ、当然この酸化過程で活性酸素の生成も推測された⁽¹⁵⁾。しかもこの開裂はアマドリ化合物のエナミノール構造と Cu(II) の相互作用によるものと考えられる。

一方、Wolff らはタンパク質のグリコシル化において、遷移金属イオンはグルコースの自動酸化を起こし、ケトアルデヒド (グルコソソ) を生成する、これがタンパク質の遊離アミノ基と反応して α -ケトカルビノールアミンを経て Schiff 塩基へ移行すると説明している (図 1D)^(17,18)。この場合グルコースの自動酸化は O₂⁻ を生成し、これより誘導される $\cdot$ OH がタンパク質の断片化を促進する⁽¹⁷⁾。しかしこの考え方に対しては異論も提出されている。すなわち Harding ら⁽¹⁹⁾は自動酸化されない 2-デオキシグルコースでもタンパク質と反応する、グルコースとグリシンの反応物を ¹H-NMR で調べると明らかにケトアルデヒドの反応物とは異なること、また α -ジカルボニルならばアルギニン残基とも反応するが、RNase で調べるとリジン残基の消失は著しいが、アルギニンはそれほどでもないことなどを確認している。こ

のことから Harding らはタンパク質と付加化合物を形成するのはグルコースであって、その自動酸化物ではないと反論している。実際に著者らの研究^(15,16,20)からみてもアマドリ化合物は遷移金属イオンの存在で容易にグルコソソ (ケトアルデヒド) に分解され、このとき生成する活性酸素はタンパク部分の断片化および特定アミノ酸の酸化分解に関与することは明らかであった。したがって Harding らが論及しているようにタンパク質のグリコシル化はグルコースが直接反応すると考えるほうが妥当のように思われる。

3. グリコシル化タンパク質-金属イオン系による活性酸素の生成とタンパク質の断片化

グリコシル化タンパク質の開裂は遷移金属イオンや酸素との複合体形成を通じて開裂し、同時に O₂⁻ およびこれに由来する活性酸素を生成すると推定されている。実際にグリコシル化 HSA (ヒト血漿アルブミン)、 γ -ポリリジンは 50 mM トリス-HCl 緩衝液中で NBT やチトクローム *c* を還元する⁽²¹⁾。これは明らかに O₂⁻ の生成を意味している。アマドリ型のケトアミンは構造的にエンジオールやエナミノール構造をとりやすく、これに金属イオン、酸素が配位して酸素の一電子還元が起り、O₂⁻ が生成するものと考えられる。この O₂⁻ は不均化反応などで H₂O₂ となり、つづいて遷移金属イオンの作用で $\cdot$ OH を生成するのでタンパク質部分の断片化⁽¹⁸⁾、この系と接触しうるタンパク質⁽²⁰⁾や脂質⁽²²⁾に酸化傷害を与える。

すなわち著者ら⁽²⁰⁾はアミノ酸とグルコースの加熱反応液をリン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.2) 中 Cu(II) および BSA と共存させると、アミノ酸として β -アラニン、リジンやアルギニンをういた場合、BSA に顕著な断片

化とヒスチジン残基の分解を観察した。これは生理条件下、アマドリ化合物が Cu(II) によって誘導される反応であり、EDTA, DTPA などの金属キレート剤、カタラーゼ添加によりほぼ完全に阻害されるため、アマドリ化合物-Cu(II)-O₂ 系で生成される O₂⁻ 由来の活性酸素ラジカルが、この系と接触可能な BSA の特定部位に酸化傷害をもたらしたと考えられる。

同様に Sakurai ら⁽²¹⁾はグリコシル化ポリリジンは ADP-Fe(III) の作用で O₂⁻ を生成することを、ルシフェリン同族体を用いる化学微弱発光法により確認した。そしてこの系をラット肝臓より調製したミクロソームとインキュベートすると脂質の過酸化が進行し、これはまた α -トコフェロールにより顕著に阻害された。この脂質の過酸化を誘導する要因もグリコシル化タンパク質のアマドリ型構造と遷移金属イオンの相互作用によって生成する活性酸素種と考えられる。

- (1) J. J. Harding : *Adv. Protein Chem.*, **37**, 247 (1985).
- (2) N. G. Watkins, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *J. Biol. Chem.*, **260**, 10629 (1985).
- (3) V. M. Monnier, R. R. Kohn and A. Cerami : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 583 (1984).
- (4) C. I. Neglia, H. J. Cohen, A. R. Garber, P. D. Ellis, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *J. Biol. Chem.*, **258**, 14279 (1983).
- (5) A. S. Eble, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *J. Biol. Chem.*, **258**, 9406 (1983).
- (6) S. Pongor, P. C. Ulrich, F. A. Bencsath and A. Cerami : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 2684 (1984).
- (7) J. C. F. Chang, P. C. Ulrich, R. Bucala and A. Cerami : *J. Biol. Chem.*, **260**, 7970 (1985).
- (8) F. G. Njoroge, A. A. Fernandes and V. M. Monnier : *J. Biol. Chem.*, **263**, 10646 (1988).
- (9) S. Horiuchi, M. Shiga, N. Araki, K. Takata, M. Saito and Y. Morino : *J. Biol. Chem.*, **263**, 18821 (1988).
- (10) F. Hayase, R. H. Nagaraj, S. Miyata, F. G. Njoroge and V. M. Monnier : *J. Biol. Chem.*, **263**, 3758 (1989).
- (11) F. G. Njoroge, L. M. Sayre and V. M. Monnier : *Carbohydr. Res.*, **167**, 211 (1987).
- (12) M. U. Ahmed, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *J. Biol. Chem.*, **261**, 4889 (1986).
- (13) M. U. Ahmed, J. A. Dunn, M. D. Walla, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *J. Biol. Chem.*, **263**, 8816 (1988).
- (14) J. A. Dunn, J. S. Patrick, S. R. Thorpe and J. W. Baynes : *Biochemistry*, **28**, 9464 (1989).
- (15) S. Kawakishi, J. Tsunehiro and K. Uchida : *Carbohydr. Res.*, **211**, 167 (1991).
- (16) 常広 淳, 内田浩二, 川岸舜朗 : 農化, **64**, 491 (1990).
- (17) S. P. Wolff and R. T. Dean : *Biochem. J.*, **245**, 243 (1987).
- (18) J. V. Hunt, R. T. Dean and S. P. Wolff : *Biochem. J.*, **256**, 205 (1988).
- (19) J. J. Harding and H. T. Beswick : *Biochem. J.*, **249**, 616 (1988).
- (20) S. Kawakishi, Y. Okawa and K. Uchida : *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 13 (1990).
- (21) T. Sakurai and S. Tsuchiya : *FEBS Lett.*, **236**, 406 (1988).
- (22) T. Sakurai, K. Sugioka and M. Nakano : *Biochim. Biophys. Acta*, **1043**, 27 (1990).