

3-デオキシグルコソンによるメイラード反応由来ラジカルの検出と性質

小林隆幸・安田孝之・柴田 均

Detection and Characterization of Radicals Derived from 3-Deoxyglucosone in Maillard Reaction

Takayuki KOBAYASHI, Takayuki YASUDA and Hitoshi SHIBATA

Abstract 3-Deoxyglucosone (3-DG), an α, β -dicarbonyl compounds in phosphate buffer, pH 7.4 with amino acids, produced different ESR spectra depending on the added amino acids, by the use of 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonic acid (DBNBS) which is suitable for spin trapping of carbon centered radicals. 3-DG is known to polymerize protein, but added Lys promoted the dimerization of lysozyme by the involvement of radical generation. As the formation and accumulation of α, β -dicarbonyl compounds is known as carbonyl stress, we proposed that these radicals derived from amino acid via Maillard reaction may contribute oxidative stress, main part of carbonyl stress.

Keywords: carbon centered radical, DBNBS, dicarbonyl compound, oxidative stress

1. 緒 言

生体内に存在する反応性が高い α, β -ジカルボニル化合物の代表格はメチルグリオキサール (MG) であり、ジヒドロオキシアセトンリン酸やグリセロアルデヒド3-リン酸の酵素的、非酵素的な脱リン酸化またはヒドロキシアセトンやアミノアセトンの酸化によって生成 (Che *et al*, 1997, Kalapos, 1999) し、グルタチオンを補酵素とするグリオキサラーゼによって、ラクトグルタチオンを中間体として乳酸へと変換される (Thornalley *et al*, 1993)。もう一方のジカルボニル化合物、3-デオキシグルコソン (3-DG) は図1に示すように、生体内や生体外でのメイラード反応の中間体として生成する。グルコースとアミノ基とのシッフ塩基の形成に始まり、後期糖化終

末産物 (Advanced glycation end products: AGEs) を生成する過程での中間産物であり、MGと同様に反応性が高い化合物である。3-DGはアルデヒド還元酵素の基質となり代謝される (McLellan *et al*, 1994)。MGの生成量は健常者で125 $\mu\text{M}/\text{day}$ と推定されている (Che *et al*, 1997)。MGの血清濃度はインスリン依存糖尿病患者で5-6倍、インスリン非依存患者で2-3倍上昇しているが (McLellan *et al*, 1994)、3-DG濃度も糖尿病患者の血清中で上昇していることが報告されている。これらの反応性が高いジカルボニル化合物が糖尿病合併症の発症にかかわる分子である可能性が高いと考えられている。

すでにMGや3-DGの高い反応性に起因する毒性についての報告が数多くあり、これらのジカルボニル化合物の存在はカルボニルストレスと呼ばれている。その作用は、タンパク質の糖化や重合化を引き起こし、事実単離した酵素にAGEが検出されたことから、生体内でもメイラード反応が進行する根拠となった。またジカルボニル化合物はアポトーシス (Denis *et al*, 2002, Kim *et al*, 2004) やASK1 (Du *et al*, 2001), Plasminogen activator inhibitor-1 (Uchida *et al*, 2004) などの遺伝子発現を誘発する。糖尿病、アルツハイマー病、アテローム動脈硬化症、通常の老化などの数多くの病理学的条件下において、カルボニルストレスが組織損傷を引き起こ

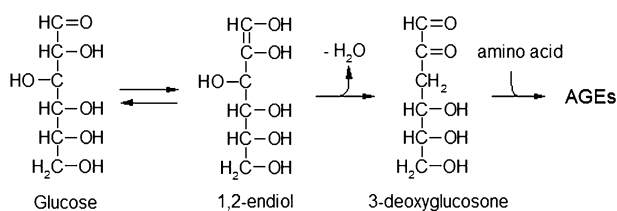


図1 3-Deoxyglucosone (3-DG) の構造, 生成, AGE 形成過程

すメカニズムに関与している (Baynes and Thorpe, 1999). 多くの悪性の病態, 特にメラノーマ (悪性黒色症) において, 内因性のジカルボニル化合物が多くの遺伝子発現や患部の転移に関係することが指摘されている. ジカルボニル化合物はタンパク質の Arg や Lys 残基と反応して AGE 化させるので, メラノーマ組織には多くの AGE 化タンパクが存在する. ジカルボニル化合物とミトコンドリアでの酸化ストレスが Hsp27 を修飾することで抗-アポトーシス作用に変化が生じる (Sakamoto *et al.*, 2002, Schalkwijk *et al.*, 2006).

酸化ストレスの発生が糖尿病合併症の発症に関与するとの報告が数多くある (Beisswenger *et al.*, 2003, Desai and Wu, 2008, Nakayama *et al.*, 2007, Reddy and Beyaz, 2006). 活性酸素以外のラジカル生成に由来する酸化ストレス源として, MG 由来ラジカルが注目されてきた (Kalapos, 2008, Lee *et al.*, 1998, Yim *et al.*, 1995). MG とアミノ酸によるメイラード反応において, 生成するラジカルを直接 EPR で検出し, MG に由来する2種類のラジカル種, すなわち2分子がクロスリンクしたラジカル陽イオン, メチルグリオキサールラジカル陰イオン, さらに好気条件下でのみスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) が生成するとの結論を導いている. しかしながら, これらの実験は生体内では存在しないアルカリ域 (炭酸緩衝液 pH 9.5) で行われており, 中性域ではラジカルの生成は殆ど起こらないと明記されている.

我々は3-DG とアミノ酸とのメイラード反応においてラジカルが生成する可能性についてスピントラップ剤を用いた ESR 法において再検証した. 生体に等しい中性 pH 領域においてシッフ塩基の形成後3-DG 部分のラジカル化を經由してアミノ酸部分がラジカル化する反応経路を指摘し, このラジカル生成に基づくタンパク質の重合化を検証し, さらにこの種のラジカルがジカルボニル化合物に由来する酸化ストレス源となる可能性について考察した.

2. 材料と方法

[試薬等] リゾチーム, アミノグアニジン等の試薬は和光純薬製を用いた. 3-DG は Dojin から購入した. MG はシグマ製で, 減圧蒸留してから使用した. スピントラップ剤, DMPO (5,5-Dimethyl-1-Pyrriline-N-Oxide), DBNBS (3,5-Dibromo-4-nitrosobenzene sulfonic acid, Sodium Salt) は LABOTEC 社から購入した.

[ESR 測定条件] アミノ酸と3-DG が反応した際に生成す

る炭素中心ラジカルの検出は, 10 mM リン酸緩衝液, pH 7.4, 0.1 mM DTPA, 10 mM DBNBS, 5 または 10 mM 3-DG, 記載したアミノ酸の共存下で 20 分間反応させ, Power: 4 mW, Time constant: 0.3 sec, Amplitude: 800 または 300, Modulation width: 0.1 mT, Scan rate: 10 mT/2min の条件下, 扁平セルを用いて JES-FA-100 (JEOL) で ESR スペクトルを検出した. 酸素系ラジカルはスピントラップ剤に 90 mM DMPO を, 3-DG 由来ラジカルは 10 mM DBNBS を用いた.

[タンパク質重合化条件] 100 mM リン酸緩衝液 pH 7.4, 0.1 mM DTPA, 10 mM 3-DG, 2 mg/ml リゾチーム, 40 mM Lys または Pro から構成された反応液を 37°C で 24 時間反応させた後, SDS-サンプルバッファーを等量加えて 5 分間煮沸し SDS-PAGE 用の試料とし, 12.5% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動後タンパク染色に CBB を用いた.

3. 結果と考察

10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 の条件下で, 3-DG と各種アミノ酸によるメイラード反応時におけるラジカルの発生をスピントラップ剤として DBNBS を用いて検証した (図 2). DBNBS は炭素中心ラジカルを検出するために良く用いられる捕捉剤である (Filosa and English, 2001, Khono *et al.*, 1991). O_2^- やヒドロキシルラジカルなどの酸素由来ラジカルは捕捉剤として DMPO が用いられる. アミノ酸を添加しないと 20 分間程度の反応時間では DBNBS によって捕捉されるラジカルは検出されなかったため, 今回の測定条件下において, 3-DG 単独ではラジカル化しないと考えられた. 反応系に Lys (図 2-A), Trp (図 2-B), Arg (図 2-C), Pro (図 2-D) を添加することで, 明確な ESR スペクトルが検出された. DBNBS が捕捉した 3-DG-Lys, 3-DG-Trp, 3-DG-Arg, 3-DG-Pro に由来するラジカルの g 値は, それぞれ 2.0063, 2.0065, 2.0064, 2.0063 と計算された. すなわち共存させたアミノ酸ごとに異なったラジカル種が生成していることが強く示唆された. 3-DG と同類のジカルボニル化合物 MG とプロリンを反応させた場合に検出されるスペクトルを図 3-A に示したが, g 値は 2.0063 と計算され, 3-DG の場合に検出されたスペクトル (図 2-D) と同じであった. また, ジカルボニル化合物からのラジカル生成を検証中に, ジカルボニル化合物単独をアルカリ性にするだけで, DBNBS に捕捉されるラジカルが容易に生成することを発見した. 炭酸緩衝液 pH 9.5 において 3-DG

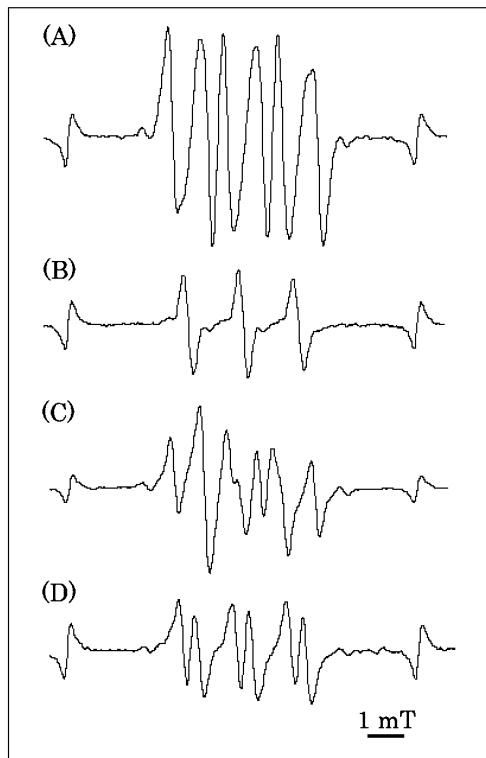


図2 3-DG とアミノ酸の反応で発生するラジカル種の検出
10 mM Phosphate buffer (pH 7.4), 100 μ M DTPA, 10 mM DBNBS を基に、以下の条件で反応を行った。(A) 5 mM 3-DG-5 mM Lys, (B) 5 mM 3-DG-10 mM Trp, (C) 10 mM 3-DG-100 mM Arg, (D) 10 mM 3-DG-100 mM Pro.

由来ラジカルを DBNBS によって捕捉した ESR スペクトルを図 3-B に示した。このスペクトルは図 2 に示した一連のものとは全く異なり、アミノ酸の関与がないので、3-DG の骨格部分がラジカル化したことに由来したものであると考えられた。

メイラード反応過程において、NBT の還元が観察されたことより O_2^- の生成が指摘されている (Yim *et al.* 1995, Lee *et al.*, 1998)。DBNBS では酸素系のラジカルを捕捉できないので、DMPO を用い、さらに生成した O_2^- が不均化した過酸化水素をヒドロキシルラジカルに変換させるために微量の Cu^{2+} を共存させた場合に観察される ESR スペクトルを図 3-C に示した。★印で示した DMPO-OH に特有の 4 本のシグナルとともに、 O_2^- に帰属されるシグナルが観察された。嫌気条件下ではいずれのスペクトルも全く検出されなかった (図 3-D) ので、酸素が一電子還元され O_2^- が生成し、 O_2^- が Cu^{2+} を Cu^+ に還元するとともに、過酸化水素に不均化し、 Cu^+ の作用によってヒドロキシルラジカルが生成することが確認された。またこれまでに報告したジカルボニル化合物とアミノ酸共存下で生成するラジカルは嫌気状態にしてもその ESR スペク

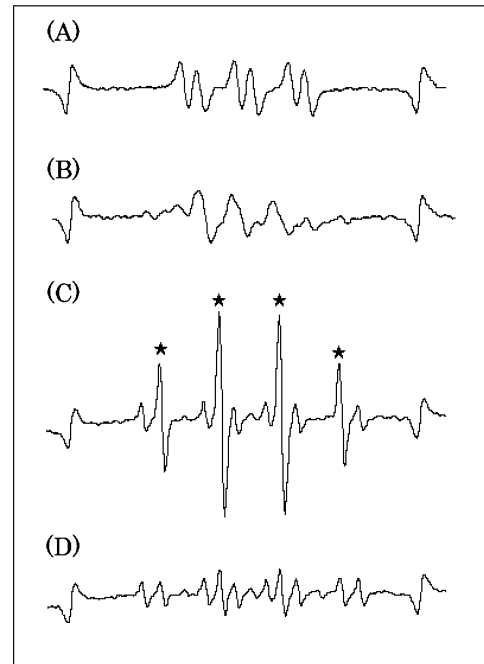


図3 MG と Pro の反応で発生する炭素中心ラジカル、pH 9.5 における 3-DG 由来ラジカル及び 3-DG と Lys の反応時に発生する O_2^- の検出

(A) 10 mM Phosphate buffer (pH 7.4), 100 μ M DTPA, 10 mM MG, 100 mM Pro, 10 mM DBNBS, (B) 3-DG 由来ラジカル (100 mM carbonate buffer, pH 9.5), (C) 5 mM 3-DG, 5 mM Lys, 300 μ M $CuSO_4$, 90 mM DMPO (★: ヒドロキシルラジカル), (D) (C) を嫌気条件下で測定した。

トルに変化はなく生成量が僅かではあるが増加することが観察された。これらの結果は pH 7.4 の中性域でもジカルボニル化合物とアミノ酸によるメイラード反応において、好気・嫌気に関わらずアミノ酸部位でのラジカル化が起こり、酸素の存在下では O_2^- も生成することが明らかとなった。

ジカルボニル化合物によるカルボニルストレスにはタンパク質の重合化が含まれる (Lee *et al.*, 1998, Kang, 2006, Oya *et al.*, 1999) ので、中性域でのメイラード反応によるモデルタンパク質の重合化と生成するラジカル種の関与について検討した。10 mM リン酸緩衝液 pH 7.4 に、重合化を検証しやすいモデルタンパク質としてリゾチームを加え、10 mM 3-DG, 40 mM Lys または Pro の共存下で、37 $^{\circ}$ C, 24 時間反応後、SDS-PAGE により重合化を調べた (図 4)。M は分子量マーカーであり、レーン 1 は化合物無添加の対照である。10 mM 3-DG のみではわずかの二量体形成が認められるが (レーン 2), 40 mM Lys 添加で二量体の生成量は顕著に増加した (レーン 3)。同じ条件で嫌気にした場合、二量体形成への影響は認め

られない (レーン4). 3-DG と Lys を反応させた場合, 単量体のバンド幅広くなり, 単量体自身へのなんらかの作用が窺われた. ^{14}C でラベルされたグルコースから合成した ^{14}C -3-DG を用いた実験により, 3-DG が反応過程においてタンパク質に取り込まれないことを明らかにできたが, 単量体に起きた変化の検証はできていない. Lys の代わりに Pro を添加した場合 (レーン5), さらに嫌気にした場合 (レーン6) には二量体の形成およびバンド幅が広がることも殆ど観察されなかった. これらの結果より, 3-DG 単独では二量体の形成が殆ど進行しない条件下において, Lys の共存により生成する Lys 由来ラジカルはタンパク質を重合化する能力があるが, Pro 由来ラジカルにはその能力がないことを示唆した. また, 嫌気条件下での実験から酸素由来ラジカルは重合化には殆ど関与しないと結論された.

MG と Ala を反応させ, 生成するラジカル種を直接 EPR 法で解析した Yim ら (1995) の反応メカニズムによれば, α, β -ジカルボニル化合物が遊離のアミノ基とシッフ塩基を形成し, この塩基がジカルボニル化合物部位へ電子供与することで, クロスリンクしたラジカル陽イオンとジカルボニル陰イオンラジカルが生成する. 前者が AGE 形成の前駆体となり, 後者が酸素を一電子還元することで O_2^- が生成する. 加えたアミノ酸によって ESR シグナルが異なりアミノ酸またはアミノ酸部位がラジカル化する可能

性と, この種ラジカルの生成量が酸素の共存によって僅かながら影響を受けることを明らかにできたので, Yim ら (1995) の反応メカニズムは一部修正される必要がある. 遊離のアミノ酸ラジカルか 3-DG が結合したラジカルであるかについてはスピントラップ剤に結合した化合物を分析中である.

SOD のペルオキシダーゼ反応中間体はヒドロキシルラジカル並みの強い酸化力を有し炭酸や重炭酸イオンをラジカル化して炭酸ラジカル陰イオンを生成し, 共存するタンパク質を重合化する. そのメカニズムとしてタンパク質表面に位置する Trp がラジカル化し, kynurenine-type の酸化を経て二量体化にいたるメカニズムが提案されている (Zhang *et al.*, 2004). アミノ酸由来ラジカルが Trp をラジカル化して同様の経路によってリゾチームが重合化したものと考えられる.

α, β -ジカルボニル化合物がストレス源となって, いろいろな病気の発症に関与する可能性が指摘されているが, その酸化ストレス発現にアミノ酸との反応を介してアミノ酸部位でラジカルが生成することを明らかにした. カルボニルストレスを緩和する方法として, すでに糖尿病治療に臨床的に使用されているアミノグアノジンのようにジカルボニル化合物を捕捉して無毒化する方法と (Wondrak *et al.*, 2006) アミノ酸由来ラジカルを捕捉する抗酸化剤の利用も効果がある可能性が出てきた. これまでに認められている抗酸化剤の機能性は, 主に酸素由来ラジカルに対する消去能力に対して検証されており, 改めてアミノ酸ラジカルも含めた酸化ストレス源に対する幅広い抗酸化能力を検討する必要がある.

4. 結論

カルボニルストレスを引き起こす α, β -ジカルボニル化合物のうちで, 生体内で2番目に多く, 糖尿病患者の血液中での濃度が上昇している 3-DG がメイラード反応の基質となる際に生成するラジカル種について, 炭素中心ラジカルを効率よく捕捉する DBNBS を用いて検証した. Lys, Trp, Arg, Pro とのメイラード反応においてそれぞれ異なる ESR スペクトルが観察された. 3-DG がラジカル化した際のスペクトルとは異なっていたので, アミノ酸部位がラジカル化している可能性を強く示唆した. 好気条件下のみスーパーオキシドアニオンラジカルの生成が認められた. Lys 由来ラジカルはモデルタンパク質の重合化を促進したが, Pro 由来ラジカルにはこの能力がなく, それぞれのラジカルが持つ酸化能力に差がある可能

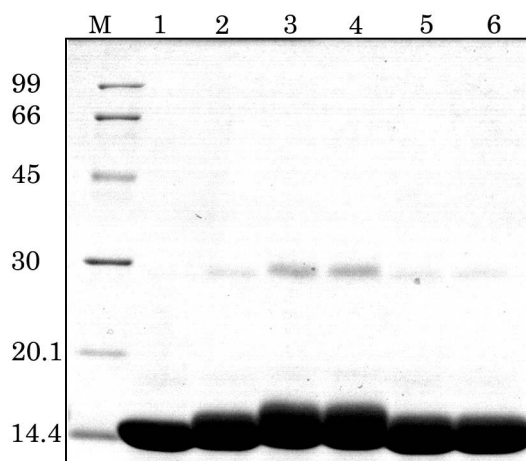


図4 3-DG による Lysozyme の重合化と Lys の添加による促進

Lane 1: 100 mM Phosphate buffer (pH7.4), 100 μM DTPA, 2 mg/ml Lysozyme, Lane 2: Lane 1 の条件に 10 mM 3-DG を添加, Lane 3: Lane 2 の条件に 40 mM Lys を添加, Lane 4: Lane 3 を嫌気条件下で反応, Lane 5: Lane 3 の条件に 40 mM Pro を添加, Lane 6: Lane 5 を嫌気条件下で反応.

性を指摘した。アミノ酸部位がラジカル化する反応機構を提案した。

引用文献

- Baynes, J.W. and Thorpe, S.R. (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **48**: 1-9.
- Beisswenger, P.J., Howell, S.K., Nelson, R.G., Mauer, M. and Szewergold, B.S. (2003) Oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem. Soc. Transact.*, **31**: 1358-1363.
- Che, W., Asahi, M., Takahashi, M., Kaneto H., Okada, A., Higashiyama, S. and Taniguchi, N. (1997) Selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in rat aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 18453-18459.
- Denis, U., Lecomte, M., Paget, C., Ruggiero, D., Wiemsoeger, N. and Lagarede (2002) Advanced glycation end-product induce apoptosis of bovine retinal pericytes in culture: involvement of diacylglycerol/ceramide production and oxidative stress induction. *Free Radic. Biol. Med.*, **33**: 236-47.
- Desai, K.M. and Wu, L. (2008) Free radical generation by methylglyoxal in tissues. *Drug. Metabol. Interact.*, **23**: 151-173.
- Filosa, A. and English, A.M. (2001) Mass spectral analysis of protein-based radicals using DBNBS. *J. Biol. Chem.*, **276**: 21022-21027.
- Kalapos, M.P. (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem. Biol. Intrac.*, **171**: 251-271.
- Kalapos, M.P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.*, **110**: 145-175.
- Kim, J., Son, J.-W. Lee, J.-A., Oh, Y.-S. and Shinn, S.-H. (2004) Methylglyoxal induced apoptosis by reactive oxygen species in bovine retinal pericytes. *J. Korean Med. Sci.*, **19**: 95-100.
- Kohno, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Yoshikawa, T. (1991) Spin-trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxide and the effects of water-soluble antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**: 1447-1453.
- Lee, C., Yim, M.B., Chock, P.B., Yim, H.-S., and Kang, S.-O. (1998) Oxidation-reduction Properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J. Biol. Chem.*, **273**: 25272-25278.
- McLellan, A.C., Thornalley, P.J., Benn, J. and Sonkeen, P. H. (1994) Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci.*, **87**: 21-29.
- Nakayama, M., Saito, K., Nakayama, K., Terawaki, H., Ito, S. and Khono, M. (2007) Radical generation by the non-enzymatic reaction of methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Redox Rep.*, **12**: 125-133.
- Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T. and Uchida, K. (1999) Methylglyoxal modification of protein. *J. Biol. Chem.*, **274**: 24078-24089.
- Reddy, V.P. and Beyaz, A. (2006) Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today*, **11**: 646-654.
- Sakamoto, H., Mashima, T., Yamamoto, K. and Tsuruno T. (2002) Modulation of heat-shock protein 27 (Hsp 27) anti-apoptotic activity by methylglyoxal modification. *J. Biol. Chem.*, **277**: 45770-45775.
- Schalkwijk, C.G., Bezu, J., Schos, R.C., Uchida, K., Stehouwer, C.D.A. and Hinsbergh, V.W.M. (2006) Heat-shock protein 27 is a major methylglyoxal modified protein in endothelial cells. *FEBS Lett.*, **589**: 1565-1570.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1993) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, **344**: 109-116.
- Uchida, Y., Ohbata, K., Yoshioka, T., Murakei T. and Maru, Y. (2004) cellular carbonyl stress enhances the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in rat adipocytes via reactive oxygen species-dependent pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**: 4075-4083.
- Wondrak, G.T., Jacobson M.K. and Jacobson, E.L. (2006) Antimelanoma activity of apoptogenic carbonyl scavengers. *J. Pharm. Exp. Therap.*, **316**: 805-814.
- Yim, H.-S., Kang, S.-O., Hah, Y.-C., Chock, P.B. and Yim, M.B. (1995) Free radicals generated during the glycation of amino acids by methylglyoxal. *J. Biol. Chem.*, **270**: 28228-28233.
- Zhang, H., Joseph, J., Crow, J. and Kalyanaraman, B. (2004) Mass spectral evidence for carbonate-anion radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu/Zn super oxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.*, **279**: 2018-2026.