血管内における酸化ストレス発現機構の解析と制御

(課題番号　06453174)

平成７年度科学研究費補助金「一般研究(B)」
研究成果報告書

平成８年３月

研究代表者　大　澤　俊　彦
(名古屋大学農学部教授)

はしがき

研究組織

研究代表者：大澤俊彦（名古屋大学農学部教授）
研究分担者：川岸舜朗（名古屋大学名誉教授）
堀尾文彦（名古屋大学農学部助教授）
内田浩二 （名古屋大学農学部助手）

研究経費

平成6年　　5、500千円
平成7年　　1、700千円

研究発表

(1) 学会誌

1. Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T., and Kawakishi, S. (1996) Inhibitory effects of caffeic acid ethyl ester on H2O2-induced cytotoxicity and DNA single-strand breaks in Chinese hamster V79 cells. Biosci. Biotech. Biochem. 60, (2), 316-318.

2. Toyokuni, S., Miyake, N., Hiai, H., Hagiwara, M., Kawakishi, S., Osawa, T., and Uchida, K. (1995) The monoclonal antibody specific for the 4-hydroxy-2-nonenal histidine adduct. FEBS Lett. 359, 189-191.

2. Uchida, K., Osawa, T., Hiai, H., and Toyokuni, S. (1995) 4-Hydroxy-2-nonenal-trapping ELISA: direct evidence for the release of a cytotoxic aldehyde from oxidized low density lipoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 212, 1068-1073.

3. Uchida, K., Itakura, K., Kawakishi, S., Hiai, H., Toyokuni, S., and Stadtman, E.R. (1996) Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies. Arch. Biochem. Biophys., in press.

名古屋大学図書
和B 89290

4. Tsuda, T., Mizuno, K., Ohshima, K., Kawakishi,S. and Osawa,T. (1995) Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Antioxidative Components from Tamarind (Tamarindus indica, L.) Seed Coat. J. Agric.Food Chem. 43, 2803-2806.

5. Miura, S., Watanabe, J., Sano, M., Tomita, T., Osawa, T., Hara, Y. and Tomita, I. (1995) Effects of Various Natural Antioxidants on the Cu^{2+}-mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. Biol. Pharm. Bull. 18, 1-4.

6. Osawa, T., Sugiyama, Y., Inayoshi, M. and Kawakishi, S. (1995) Antioxidative Activity of Tetrahydrocurcumin. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 1609-1612.

7. Sugiyama, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T. (1996) Involvement of b-Diketone Moiety in the Antioxidative Mechanism of Tetrahydrocurcumin, Biochem. Pharm., in press

(2) その他の刊行物

1. Osawa, T., Yoshida, A., Kawakishi, S., Yamashita, K. and Ochi, H.: Protective Role of Dietary Antioxidants in Oxidative Stress. Oxidative Stress and Aging (Cutler, R.G., Packer, L., Bertram, J. and Mori, A.), Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland, p.367-377 (1995)

2. 大澤俊彦監修、がん予防食品の開発、シーエムシー(1995)

3. 内田浩二：過酸化脂質の特異的新検出法。ファルマシア 31, 755-759 (1995) .

4. 大澤俊彦：食品抗酸化成分の最新の生体系評価法の開発。フードケミカル、9 (3), 19-26 (1995).

5. 大澤俊彦：抗がん機能の評価。フードケミカル、10 (1), 62-68 (1996).

1　赤血球タンパク質の脂質過酸化産物による修飾

1－1 はじめに

好気的条件下で生きている生物は、効率よくエネルギーを得るために酸素を必要とする。しかし、何らかの理由で生体内の酸素が高濃度になると、組織に傷害を与える。生体内の酸素はミトコンドリア電子伝達系、酸化酵素や、薬剤、紫外線、放射線などにより、反応性の高い活性酸素となる。生成した活性酸素は生体膜に多量に含まれる不飽和脂肪酸の過酸化を引き起こし、それにより二次的に生成する物質が生体成分を修飾し、細胞機能の低下の原因となり、血栓症、動脈硬化症などの疾患へつながる。しかし、生体内には活性酸素による酸化的傷害に対する防御機構が存在している。その機構としては、活性酸素発生の抑制、酵素（スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ）による活性酸素の消去、α-トコフェロール、アスコルビン酸などによるラジカルの捕捉があり、生体成分を酸化的損傷から保護している。しかし、防御機構がうまくはたらかなくなったり、それ以上の活性酸素が発生した場合、細胞機能は酸化的傷害を受ける。このとき、どのような機構で傷害が起こっているかを知ることは酸化的損傷を防ぐうえでも重要である。

1－2　実験方法

1－2－1　赤血球の調整

兎保存血液 100ml に等張液（10mM phosphate buffer, pH 7.4 / 152mM NaCl)100ml を加え、よく振とうした後、1500g で 20 分間遠心分離を行い、上清を除去した。この操作を計 3 回繰り返し、赤血球を得た。実験には、10%（v/v）に等張液で希釈したものを用いた。

1－2－2　赤血球と HNE の反応

10%(v/v)に調製した赤血球に HNE を 0.05、0.1、0.5、1mM になるように加え、全量で 0.5ml とし、37℃で 2 時間インキュベートした。この後、赤血球を等張液で洗い、低張液（10mM phosphate buffer,pH 7.4）で溶血させ、20000g で 40 分間遠心分離を行い、膜画分と溶血液に分けた。

1－3　実験結果及び考察

1－3－1　抗 HNE 修飾蛋白質抗体を用いた検討

抗 HNE-KLH 抗体を用いて HNE 修飾蛋白質の検出を行ったところ、濃度が高くなるにつれ、膜画分、溶血液ともに HNE 修飾蛋白質が増加した(Figs.1,2)。多くの蛋白質が修飾を受けており、特に膜画分ではバンド 1、2 のスペクトリン、バンド 5 のアクチン、溶血液では 30kDa 付近に濃いバンドが検出された。この 30kDa 付近の HNE 修飾蛋白質を p30 とし、分離・同定を試みた。その結果は第 3 章で述べる。

1－3－2　HNE による赤血球内 SH 基の修飾

HNE と反応させた赤血球内のグルタチオン量の測定を行ったところ、HNE 濃度が高くなるにつれ、内部のグルタチオン量が低下した。また、赤血球を SH 基の阻害剤である N-エチルマレイミド(NEM)で前処理した後に HNE と反応させ、HNE 修飾蛋白質の検出を行ったところ、NEM 濃度が 0.1mM 以上で HNE 修飾蛋白質の減少がみられた。これらの結果より、HNE はグルタチオンとの反応以外に赤血球蛋白質の SH 基、つまりシステイン残基と特異的に結合することがわかった。

1－3－3　老化(過酸化物処理)赤血球と HNE の反応

過酸化物と赤血球を反応させた老化赤血球モデルで HNE に対する感受性が変化するかどうかを検討した。抗 HNE-KLH 抗体を用いて HNE 修飾蛋白質の検出を行ったところ、過酸化水素で前処理したもの、t-BuOOH で前処理したもの両方で、膜画文において HNE 修飾蛋白質の増加がみられ、HNE に対する感受性が高くなっていることがわかった。

1－3－4　赤血球内 HNE 標的蛋白質(p30)の分離・同定

ヘモグロビン除去溶血液では、21.5min と 22.7min に大きなピークが検出された(Fig.3)。この二つのピークを p30-1、p30-2 とし、分取して抗 HNE-KLH 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。p30-1、2 ともに抗体陽性であったが p30-2 のほうが濃いバンドで検出され、より HNE に修飾されやすいことがわかった。また、赤血球内に存在する蛋白質のうち、分子量が約 3 万の蛋白としては、カルボニックアンヒドラーゼが考えられるので、カルボニックアンヒドラーゼ標品を HNE と反応させたものでウエスタンブロッティングを行い比較したところ(Fig.4)、p30-2 と一致したため、p30-2 が p30 の本体であると思われる。また、抗カルボニックアンヒドラーゼ抗体に対する検出を行ったものでは p30-1、2 ともに抗体陽性であったため(Fig.5)、p30-1 もカルボニックアンヒドラーゼ由来の蛋白質であると思われる。

1－3－5　HNE 修飾によるカルボニックアンヒドラーゼ活性の変動

赤血球と HNE を反応させたものについて、カルボニックアンヒドラーゼ活性測定を行ったところ、HNE 濃度依存的な活性の低下がみられた(Fig.5)。また、カルボニックアンヒドラーゼ標品と HNE を反応させたものについて HNE 修飾蛋白質の検出とカルボニックアンヒドラーゼ活性測定を行ったところ、HNE 濃度が高くなるにつれ HNE 修飾蛋白質の増加がみられた。

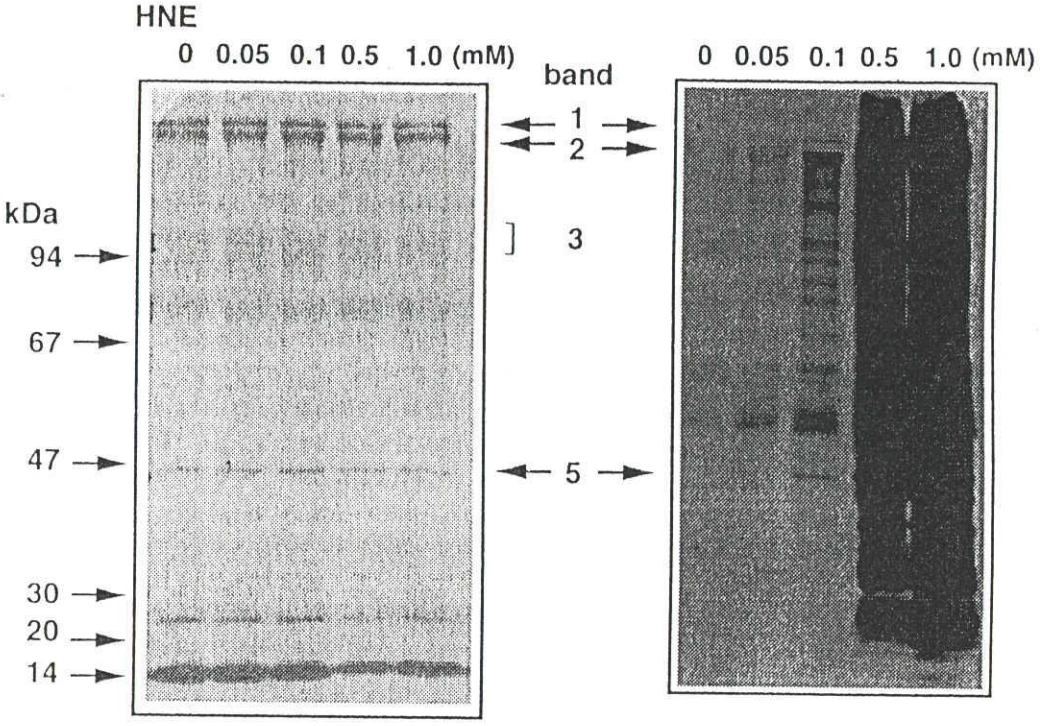


Fig.1. ＨＮＥ処理赤血球膜画分に生成したＨＮＥ修飾蛋白質。10％赤血球をＨＮＥ処理し溶血後、遠心により膜画分を調製。

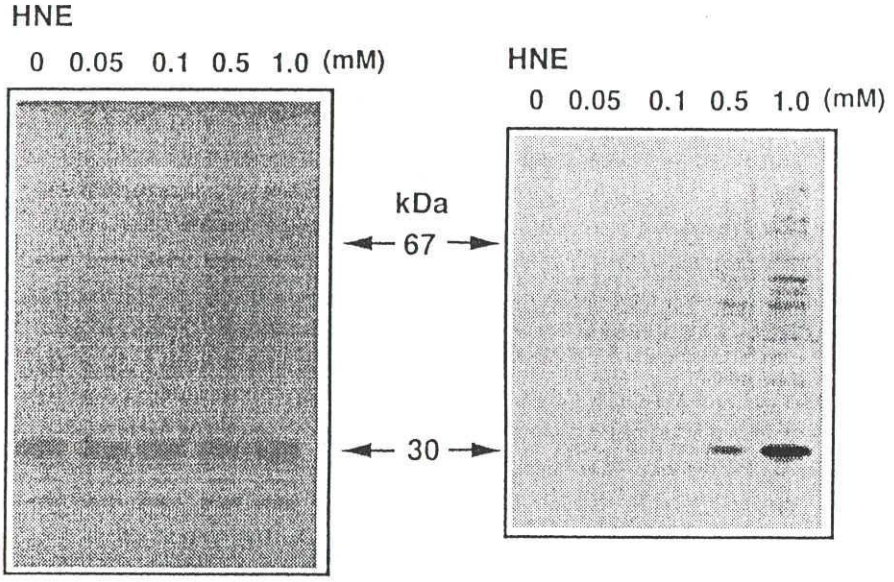


Fig.2. ＨＮＥ処理赤血球溶血液中に生成したＨＮＥ修飾蛋白質。10％赤血球をＨＮＥ処理し溶血後、遠心により溶血液画分を調製。

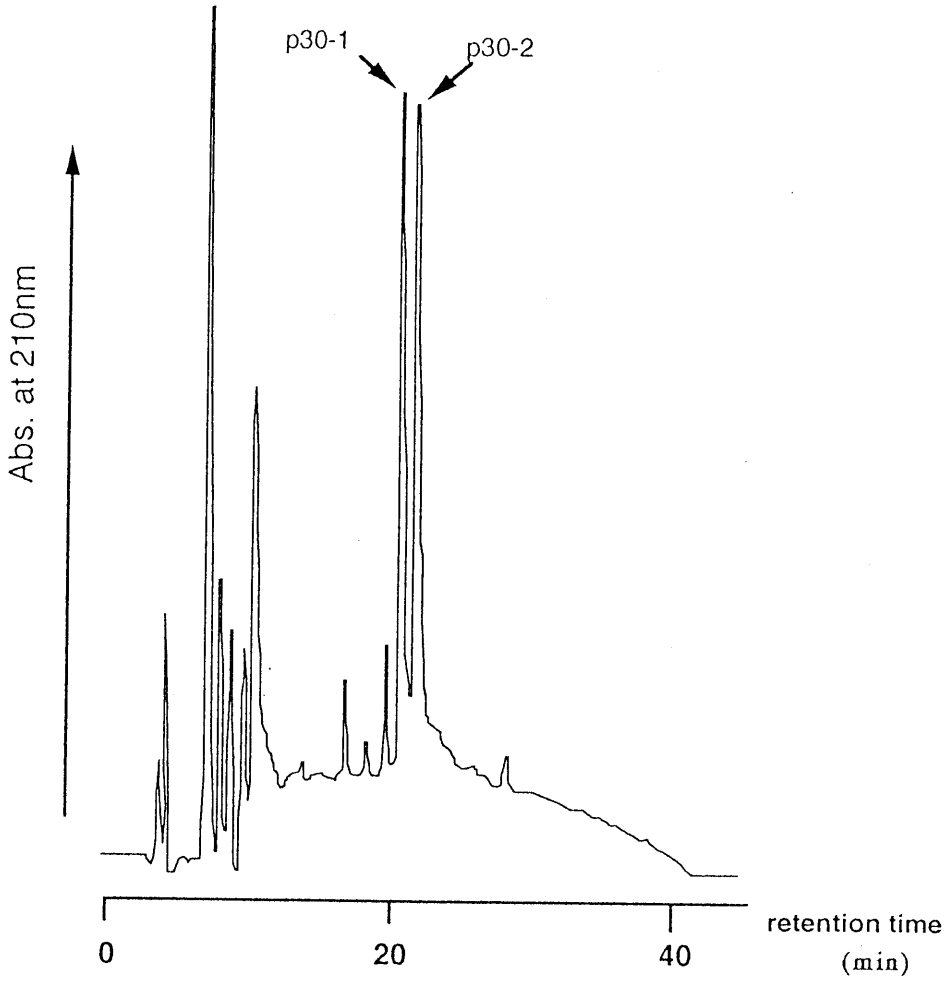


Fig.3. ＨＮＥ処理赤血球溶血液の逆相ＨＰＬＣ分析。

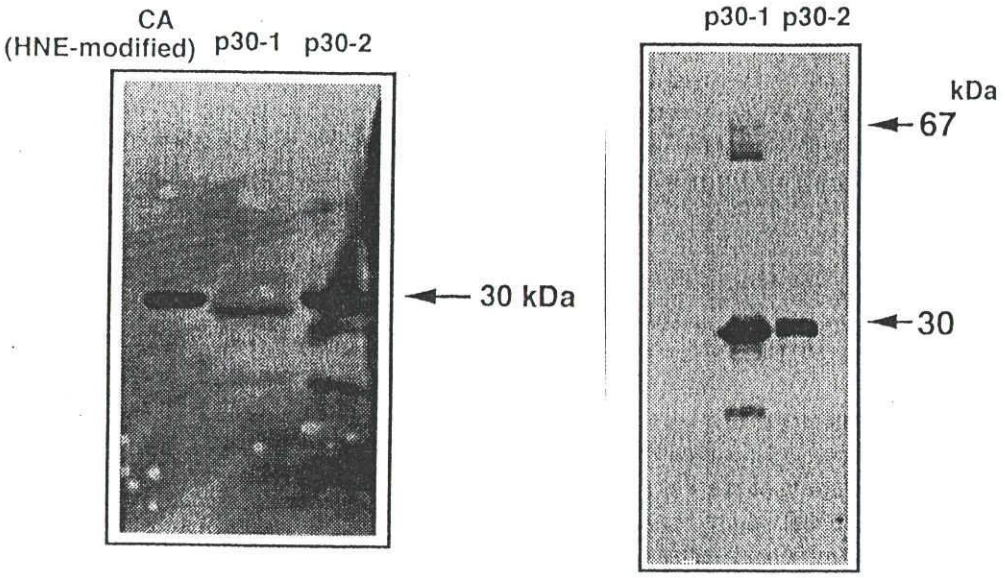


Fig.4. 赤血球内ＨＮＥ標的蛋白質の同定。
左図、抗ＨＮＥ修飾蛋白質抗体；右図、抗カーボニックアンヒドラーゼ抗体

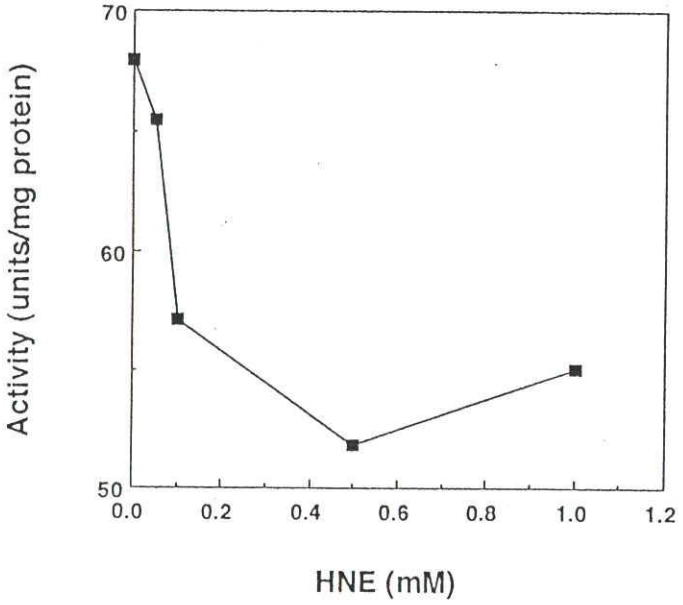


Fig.5. ＨＮＥ処理赤血球内カーボニックアンヒドラーゼ活性の変動。

2　糖尿病合併症の新しいバイオマーカーの解析

2－1　はじめに

血管内における酸化ストレスに関して最近特に注目を集めてきているのが糖尿病合併症であろう。糖尿病は、インスリン分泌不全およびインスリン作用不全に基づく代謝疾患であり、糖尿病の発症に血管因子が関与しているという結果は得られていない。しかし、糖尿病患者の生命予後を左右するのは血管合併症であり、その意味で糖尿病は血管病とも考えられる。このような観点より新しい糖尿病合併症のバイオマーカーを血液中より見いだすことは大変重要だと考えられる。

血液内が高血糖状態を維持することにより、様々な血液構成成分が糖化（グリケーション）と呼ばれる反応を受けることがよく知られている。なかでも、低密度リポタンパク（ＬＤＬ）は糖化と共にグリケーションの段階で生成した活性酸素による酸化を受け、この酸化ＬＤＬがマクロファージに取り込まれた後に泡沫化することが動脈硬化の大きな原因の一つであると考えられている。一方、赤血球もグリケーションの重要なターゲットと考えられている。ヘモグロビンの糖化も糖尿病発症の重要なマーカーと考えられているが、最近、当研究室では糖尿病患者の血液中より新しいタイプの AGE（Advanced Glycation End Products）として MRX を見いだした。MRX は糖尿病を誘発したラットの皮膚、眼内レンズからも検出され、また、尿中に大量に排泄されることが明らかにされた。

そこで、これら MRX、MRY の生成機構と単離・精製及び化学的構造解析を行い、新しいバイオマーカーとなりうるか検討を行った。

2－2　MRX、MRY の生成反応

ウサギの赤血球 10mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース 266mM を 37℃で 2 週間反応させ、タンパク質だけを回収し加水分解を行った。蛍光波長による HPLC 分析を行ったところ（Fig. 1）、溶出時間 13 分付近に糖尿病患者の血清中から見いだされたものと同じ溶出時間で MRX が検出された。

ウサギの赤血球と様々な濃度のグルコース（0、50、100、267、300mM）を 37℃で反応させ経時変化の検討を行ったところ（Fig. 2）、MRX の生成量は濃度依存的かつ反応時間に比例して増加した。

次に生成経路解明のためにモデル系で、BSA 4mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース 1M を 60℃で 1 週間反応させ、タンパク質を回収し、加水分解を行った。分析条件は、ウサギの赤血球とグルコースの反応の時と同様に行った。その結果（Fig. 3）、溶出時間 13 分付近に MRX が検出され、さらに 7 分付近に新しいピーク MRY が検出された。

2－3　MRX、MRY 生成の化学的メカニズムの解明

（1）アミノ酸残基の変化

グリケーションを受けて BSA がどのように変化するのか検討するために、グルコース 1M と 37℃で 1 ヶ月間反応させた BSA 4mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）と、反応させてない Native BSA のタンパク質を回収し、加水分解を行い、アミノ酸分析を行った。

アミノ酸分析の結果（Table 1）、グルコース処理によりリジンが 10.8 残基、アルギニンが 5.9 残基、チロシン 2.3 残基、システインが 0.6 残基減少した。また、溶出時間 18 分付近に少量であるが新しいピークが検出された。溶出時間から、このピークは CML であると予想された。

（2）pH の影響

メイラード反応には pH が大きく影響するので、MRX、MRY の生成にも影響するのか検討を行った。BSA 4mg/ml とグルコース 1mM を pH の異なった緩衝液中で反応させた。

その結果、Fig. 4 に示したように、MRX、MRY、ペントシジン全てにおいて pH9.0 のときに大量に生成してきた。MRX については pH7.4 と pH5.0 では差が無く、pH9.0 のときの 8 割程度であった。MRY は pH7.4 で行うと、pH9.0 のときの半分であった。pH5.0 で反応を行うと、MRY、ペントシジンは殆ど生成してこないことが明らかとなった。

（3）各種タンパク質の MRX、MRY 生成量の比較

MRX、MRY の生成にどのようなアミノ酸が関与しているのか調べるために、全てのアミノ酸を含む 10mM リン酸緩衝液（pH7.4）にグルコースを添加し反応を行ったが、全く生成してこなかった。そこで、ポリペプチドであれば生成してくるのかもしれないという予測をたて、様々なタンパク質（BSA、リゾチーム、カゼイン、リボヌクレアーゼ、グロブリン、プロタミン）10mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース 0.1M を反応させた。ただしコラーゲンは 2.0mg/ml で行い、後でタンパク含量を調整した。これらのタンパク質を 40% TCA で沈殿させ、ジエチルエーテルで洗浄後、加水分解を行った。HPLC 条件は 2－2 と同様で行った。定量分析の結果を Fig. 5,6 に示した。

MRXはBSA、リボヌクレアーゼから大量に生成し、次にリゾチームから多く生成してきた。しかし、プロタミンからは全く生成してこなかった。タンパク質のアミノ酸組成が生成量に関係するので、メイラード反応に主に関与するアミノ酸の組成をTable 2に示した。

MRYはBSAから大量に生成してきたが、リゾチーム、カゼイン、リボヌクレアーゼ、グロブリンからは同程度で、BSAの60%程の生成量であった。しかし、コラーゲンやプロタミンからは全く生成してこなかった。

（4）糖の影響

BSAからMRXが大量に生成してくることと、予備実験においてリゾチームとダイアセチルからMRXが生成してくることが判明したので、次は、還元糖の関与について検討を行った。カルボニル構造を持つ化合物（グルコース、ダイアセイル、グリオキザール、フルクトース）1MとBSAあるいはリゾチーム10mg/ml（10mMリン酸緩衝液、pH7.4）を60℃で2週間反応させ、加水分解を行い、HPLC分析を行った。その結果をFig. 7,8に示した。

MRXはBSAとダイアセチルを反応させても生成してきた。生成量はグルコースと反応させた時よりもわずかに増加した。リゾチームの系ではダイアセチルと反応させたときのみ大量に生成してきた。

MRYはBSA系では、グルコースあるいはグリオキザールとの反応からのみ生成してきた。生成量は、グリオキザールと反応させた場合には、グルコースと反応させた場合の2倍程度増加した。リゾチーム系についても検討を行ったところ、少量ではあるが、グルコースあるいはグリオキザールと反応させた場合に生成してきた。

（5）アミノ酸添加の影響

（2）で述べたように全てのアミノ酸と糖を反応させても、MRX、MRY共に生成してこなかったので、BSA 10mg/ml（10mMリン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース0.1Mの混合液に、アミノ酸分析で減少し、メイラード反応に関与していると予想されるアミノ酸10mg/mlを添加して生成量の比較を行った。反応が複雑になるのを防ぐためにα-アミノ基をBoc基で保護したアミノ酸を用いた。ただし、Boc-システインは入手困難なため、保護していないシステインを使用した。60℃で2週間反応させ、タンパク質を40% TCAで沈殿させて回収し、加水分解を行いHPLCにより分析を行った。BSAとダイアセチルの系でも同様に行った。結果をFig. 9,10,11に示した。

MRX はシステインを添加することによって生成量が増加した。BSA とグルコースの系では、アミノ酸を加えていない反応に比べて 7.2 倍、同様に BSA とダイアセチルの系では、2.2 倍の MRX が生成した。

MRY はアミノ酸を添加するとむしろ減少した。MRX と反対にシステインを添加すると MRY は殆ど生成してこなかった。

（6）ポリアルギニン、システイン、グルコース系による MRX 生成反応

これまでの結果より、MRX の生成にはアルギニンとシステインとグルコースが必須であることが明らかとなった。しかし、今までの検討ではタンパク質の他の要素も関与しているかもしれないと考えられる。そこで、より単純な系を確立するために、ポリアルギニンとシステインとグルコースの反応で MRX が生成してくるか検討を行った。

ポリアルギニン 10mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース 1M とシステイン 0.1M の混合液を 60℃で 2 週間反応させ、ポリペプチドを 40% TCA で沈殿させ、洗浄後加水分解を行った。<HPLC Condition 7>の条件で分析を行ったところ（Fig. 12）、溶出時間 6.6 分に MRX のピークが検出された。さらに、<HPLC Condition 8>の条件で分析を行ったところ、溶出時間 13 分に同じく MRX のピークが検出された。

（7）アルギニンの関与

アルギニン残基がポリペプチドである必要があるか検討を行った。ポリアルギニン 10mg/ml（10mM リン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース 1M とシステイン 0.1M の混合液に、様々な濃度の Boc-アルギニン（0.1M、0.5M、1.0M）を添加し、（6）と同様の実験を行った。その結果（Fig. 13）、Boc-アルギニンを添加することによって、濃度依存的に減少した。

（8）ダイアセチルの関与

BSA の系やリゾチームの系ではダイアセチルの関与が示唆されたので、ポリアルギニンの系でも関与するか検討を行った。（7）と同じ条件で、グルコースの代わりにダイアセチルを添加した。その結果（Fig. 13）、MRX は殆ど生成してこなかった。

（9）SH 基の関与

MRXの生成にシステインが必須であることが明らかとなったが、タンパク質の状態ではほとんどがS-S結合しており、SH基がそのまま反応するか疑問が残る。そこで、BSA 10mg/ml（10mMリン酸緩衝液、pH7.4）とグルコース0.1Mの混合液に、様々なSH基試薬（システイン、シスチン、グルタチオン酸化型、還元型、DTT、2-メルカプトエタノール、過硫酸アンモニウム）0.1Mを添加し、比較検討を行った。反応条件は、（５）と同様で行った。その結果をFig. 14に示した。

どのSH基試薬を添加してもMRXの生成量は2倍から18倍増加した。システインを添加し反応させた場合が最大で18倍の増加を示した。次にシスチンで15倍であった。グルタチオンは酸化型でも還元型でもあまり差はなく、5倍程度であった。

２－４　MRX、MRYの単離・精製

（１）XAD-2による分画

方法２－２－１の（１）、（２）に従って調製したMRX、MRYの混合液を不純物除去のために、XAD-2によって分画を行った。各溶出区分をHPLCにより分析を行ったところ、MRX、MRY共に水溶出区分に存在した。

（２）HPLCによる分取

粗分画した生成反応物中のMRX、MRYを、HPLCを利用して単離・精製した。その結果、ウサギの赤血球とグルコースの反応で生成したMRX 0.5mgと、BSAとグルコースの反応で生成したMRX 1mgとMRY 0.2mgが得られた。

２－５　MRXの構造解析

ウサギの赤血球とグルコースの反応で生成したMRXは単離する過程で極めて微量しか得られなかったため、BSAとグルコースの反応で生成したMRXで機器分析を行うことにした。

２－５－１　各種機器分析の結果

（a）FAB-MS

グリセロールとニトロベンジルアルコールを混合したものをマトリクスとして用いて測定したところ（Fig. 15）、[M+H]+のピークとして 361 が、グリセロールがついたピークとして 453 が確認された。この結果より、MRX の分子量は 360 であると示唆された。

（b）蛍光特性

蛍光波長を測定したところ、励起波長 350nm、蛍光波長 405nm に極大値が観測された。

（c）NMR

MRX を重水に溶かし 1H-NMR (600MHz)、^{13}C-NMR (150MHz)、^{1}H-^{1}HCOSY、HOHAHA、HMQC、HMBC を測定した（Table 2-3）。

その結果、^{1}H-NMR（Fig. 16）より、a と b はケミカルシフトから芳香環由来であると推定された。また、^{1}H-^{1}HCOSY と HOHAHA より、a、b に相関が認められたことと、カップリング定数が 8.5Hz であることから、これらのプロトンは複素芳香族化合物由来であり、さらにオルトカップリングしていると考えられた。

メチル基は HMBC より b と c に相関が認められたことから芳香環に結合していると推定された。

d と e は ^{1}H-^{1}H COSY より相関が認められ、^{13}C -NMR (Fig. 2-17)より d のケミカルシフトが 73ppm であることから、アミノ酸の α 炭素とそこに結合したメチレンであることが推定された。また、e は隣の炭素が不斉炭素であるためキラルエフェクトが観測された。

f から i にかけて ^{1}H-^{1}H COSY と HOHAHA で相関が認められたことと、f と i それぞれのケミカルシフトよりアルギニンの存在が示唆された。

MRX が微量であるため、^{13}C -NMR における 4 級炭素が抜けており、さらに 2 次元 NMR HMBC の結果からは情報が得られなかった。

これらの結果より、Fig. 18 に示すような部分構造が推定された。

2－6　ストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発したラットと正常ラットの MRX 尿中排泄量の比較

予備実験において MRX が尿中に排泄されることがわかったので、糖尿病ラットと正常ラットで排泄量の比較検討を行った。方法 2－2－4 に従って、HPLC を用いて定量分析を行い、MRX の尿中排泄量の差を比較した。

その結果（Table 2-4）、MRXの尿中排泄量は正常ラットに比べ糖尿病ラットでは、尿1mlあたりで4.3倍、タンパク量あたりで2.9倍、1日あたりで21倍の増加が確認された。ただし、糖尿病ラットの尿中タンパク含量は正常に比べ、5倍程度であった。

MRYについては、尿中にはかなり多くの水溶性かつ蛍光性不純物が含まれており、今回行った条件では定量することが困難であった。

2－7　考察

新しいタイプのAGEとして糖尿病患者の血液中より見いだされたMRXが、モデル系であるウサギの赤血球とグルコースの反応から生成してきた。さらに生成機構をシンプルにするためにBSAとグルコースの系で反応を行ったところ、MRXに加えてMRYが生成することが明らかとなった。

アミノ酸分析よりタンパク質がグリケーションを受けることで、塩基性アミノ酸が攻撃を受けやすいことが明らかとなった。さらに、バリンとメチオニンの間の溶出時間18分にCMLのピークが検出された。CMLの生成にもリジンが必須であり、メイラード反応ではリジン残基のアミノ基が最も求核試薬として働きやすいことを裏付ける。

pHの影響について検討を行ったところ、MRX、MRY、ペントシジン全てアルカリ条件下のほうが生成しやすいという結果が得られた。また、ペントシジンとの比較を行ったところ、どの溶媒条件でもMRXやMRYのほうが大量に生成し、弱酸性条件下ではペントシジンは全く生成してこないにも関わらず、MRXは中性条件下と同じくらい生成してくることが判明した。MRYはペントシジンと傾向が類似しており、アルカリ条件下ではかなり大量に生成してくるが、中性条件下では約半分の生成量になり、弱酸性条件下では殆ど生成してこなかった。実際の血液はpH7.4なので、ペントシジンよりもMRXやMRYのほうが多く生成していると示唆される。一般的にメイラード反応はpHが高いほうが後期段階が進みやすいと報告されている。しかし、MRXは弱酸性でも中性条件下と同程度生成してくることから、生体内の各組織でペントシジンより大量に生成すると示唆される。

様々なタンパク質とグルコースを反応させたところ、アルギニンとシステインを多く含むBSA、リボヌクレアーゼから、MRXは大量に生成してくることが明らかとなった。アルギニンをかなり多く含むプロタミンからは生成してこない原因は、システインが含まれていないためであった。その証拠に、プロタミンとグルコースにシステインを添加することにより、MRXが生成することが明らかとなった。

MRXの生成に関与する糖の影響を検討したところ、ダイアセチルと反応させる

と生成しやすいことが判明した。ダイアセチルは糖の酸化分解物であり、弱アルカリ条件下でタンパク質中のアルギニン残基のグアニジノ基と特異的に反応し、加水分解には安定となる（Fig. 19）。これらのことから、溶液中のグルコースがまず酸化分解を受け、ダイアセチルとなった後、アルギニン残基を攻撃し、MRXが生成してくると考えられる。だが、MRXは中性条件下あるいは弱酸性下でも生成してくることとから、別の生成経路も考えられるのでさらに詳しく検討する必要がある。

アミノ酸関与の検討を行ったところ、BSAとグルコースの系においてもBSAとダイアセチルの系においても、システインを添加するとMRXの生成が増加することが明らかとなった。これらのことから、MRXの生成にはシステインが必須であることが示唆された。そこで、アルギニンをかなり多く含むプロタミンと、グルコースの混合液にシステインを添加し、同様の反応を行ったところ、MRXが生成してくることが明らかとなった。以上の結果より、MRXの生成にはグルコースとポリアルギニンとシステインが必要であることが判明した。現在までに提唱されているAGEの構造として、ピラリン、ペントシジン、クロスリンなどが挙げられるが、全てその生成にはリジンが関与している。この点で、MRXは全く新しいAGEであると推定される。MRYの生成は、アミノ酸を添加すると減少してしまい、特にシステインを添加すると殆ど生成してこないことから、MRXの生成とバランスを保っていると示唆された。

MRXの生成にはアルギニンがポリペプチドの必要があることが判明した。しかし今回行った実験では、ポリペプチドのみを回収し加水分解しているので、反応液中で生成したタンパク質に結合していないMRX、つまりBoc-アルギニンと反応して生成したMRXが回収されていない可能性がある。そこで、反応液から糖だけを除去する方法を見いだし、加水分解を行ってMRXの確認をする必要がある。

ダイアセチルの関与をポリアルギニンの系で再検討したところ、MRXは殆ど生成してこなかった。先ほども述べたが、MRXが弱酸性下でも生成することからもダイアセチルの場合はグルコースとの反応とは異なった反応経路が示唆される。また、ダイアセチルは反応性が高く、溶液中でシステインが関与する前にアルギニンと反応してしまい、別の化合物を形成していると考えられる。

MRX生成過程におけるSH基の関与を検討したところ、SH基がそのままでもS-S結合していても生成量には影響しなかった。酸化状態であるため、60℃で2週間反応させている間にSH基がS-S結合してしまい、システインとシスチンの差、あるいはグルタチオンの酸化型と還元型の差がでなかったと考えられる。恐らくSH基が還元剤として働き、生成を促進したと予想されるが、殆どがS-S結合していることを考えると他の要素が関与していると示唆される。今回の実験だ

けではこれ以上の考察ができないので、タンパク質をBSAからポリアルギニンに変えて同じ結果が得られるかどうか検討する必要がある。また、SH基試薬の代わりに還元剤を用いて、MRXが生成するか検討を行う必要がある。

MRXの各種機器分析を行った結果、共役系をもつ複素芳香族化合物であると示唆された。しかし、微量なため決定的な情報が得られず、これ以上の解析は困難であった。そこで、今後ポリアルギニンとシステインとグルコースの反応で生成してくるMRXを大量分取し、機器分析を行う必要がある。MRYの構造解析についても、まだ微量であるために機器分析が行えなかった。今後大量調製し、化学的構造解析を行う予定である。

ストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発したラットと正常ラットの尿中に排泄されるMRXの量を比較検討したところ、糖尿病を誘発したラットに有意な増加が確認された。さらに、尿中に排泄されるタンパク質が増加し、かつタンパクあたりのMRX量が増加していたことから、糖尿病ラットの生体内でMRXが大量に生成され、異物として排泄されやすくなっていると考えられる。今後、尿中にMRXがタンパク質に結合していない形で排泄されているかどうか検討を行う予定である。具体的には尿中のタンパク質をゲル濾過によって除去し、水溶性画分を回収した後、加水分解あるいは未処理し、MRXが存在するか確認を行う。また、ストレプトゾトシン投与による糖尿病ラットのみでなく、自然発症による糖尿病ラット(OLET-F）のMRX尿中排泄量や生体内で蓄積されているか各臓器での検討を行う。

MRYについてはまだin vivo 系では確認されていない。ストレプトゾトシン投与により糖尿病を誘発したラットと正常ラット尿中排泄量で比較検討を行ったが、尿中にはかなり多くの水溶性不純物が含まれており、今回行った条件では定量することが困難であった。化学的構造解析や生成機構を解明した後に、GC-MS、LC-MSの利用あるいは免疫学的方法などで検出する必要がある。

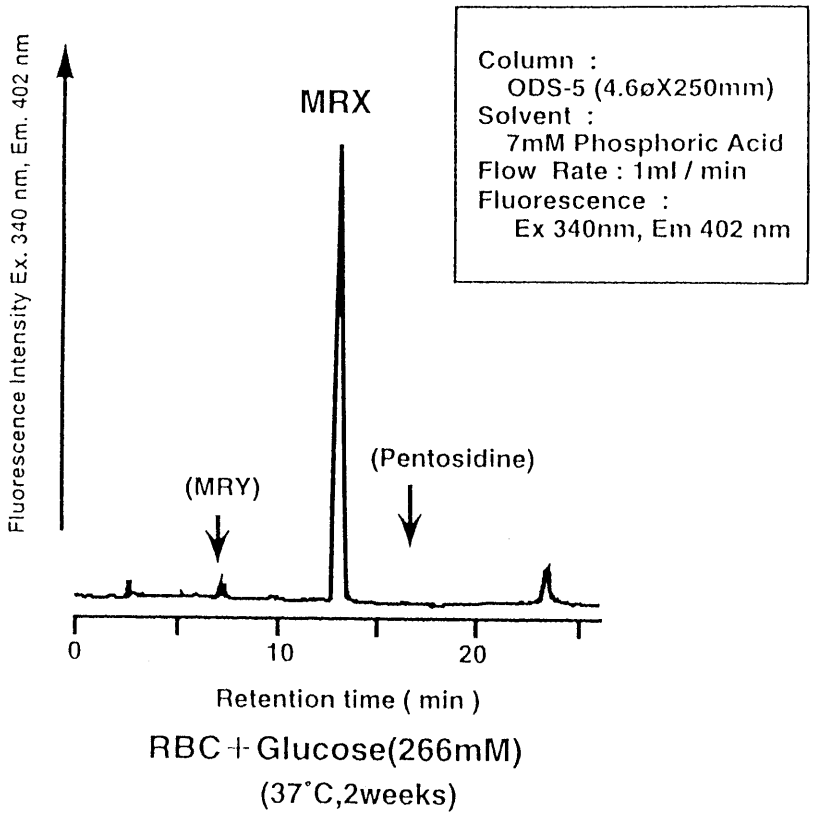


Fig. 1
Formation of MRX by Incubation of Red Blood Cell (RBC) with Glucose

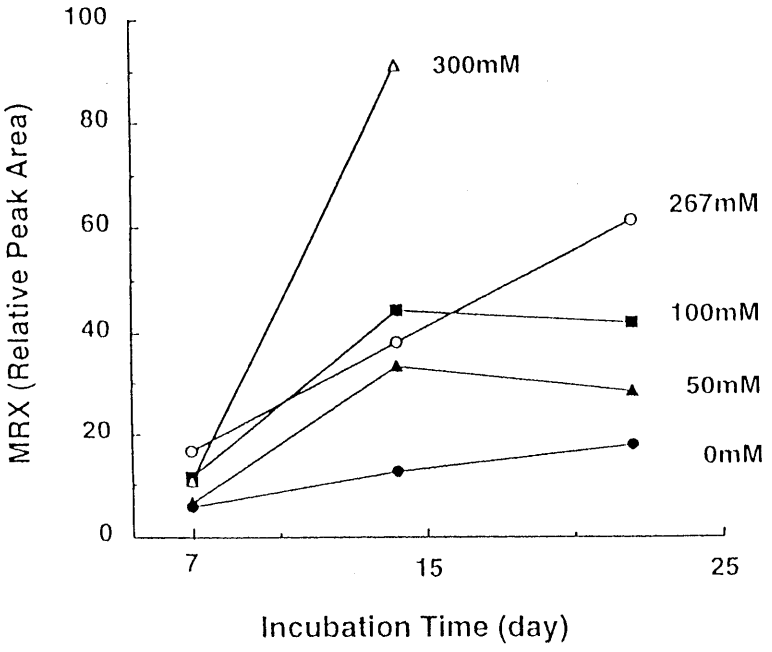


Fig. 2
Formation of MRX by Incubation of RBC with Glucose (0 - 300mM) at 37°C

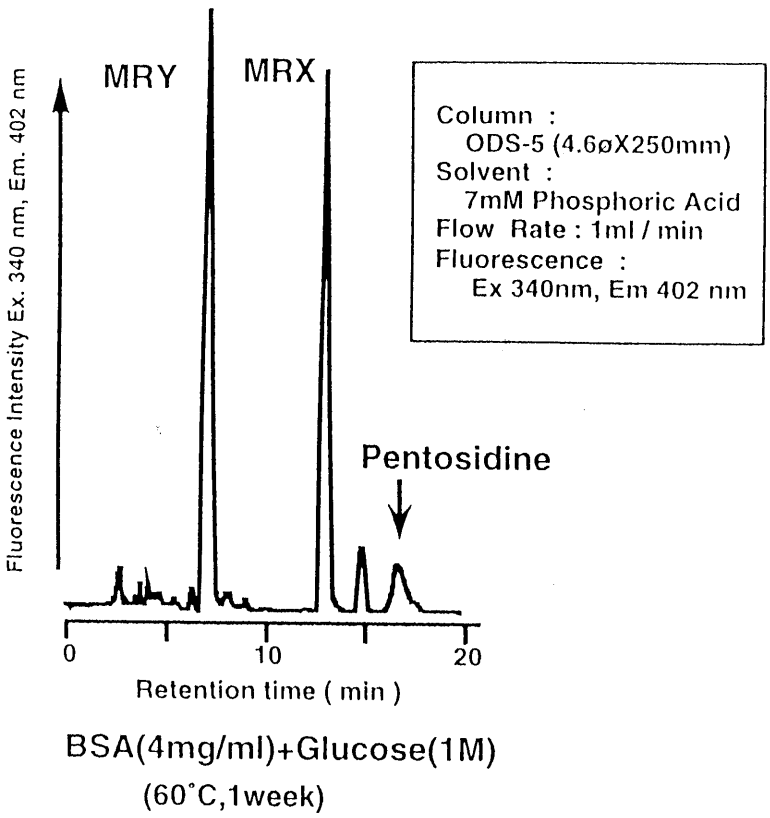


Fig. 3
Formations of MRX and MRY by Incubation of BSA with Glucose

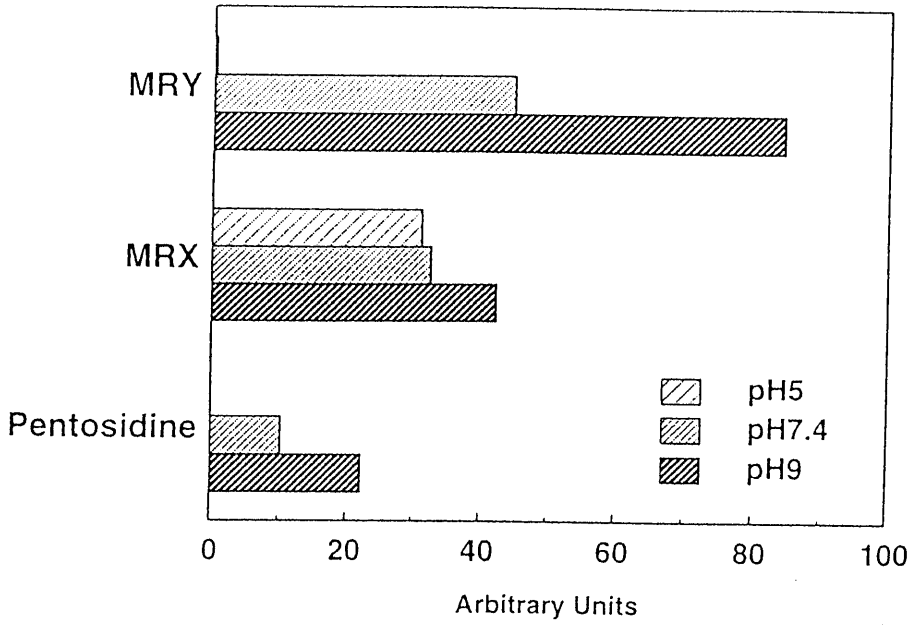


Fig. 4
Effects of pH on the Formation of MRX, MRY and Pentosidine

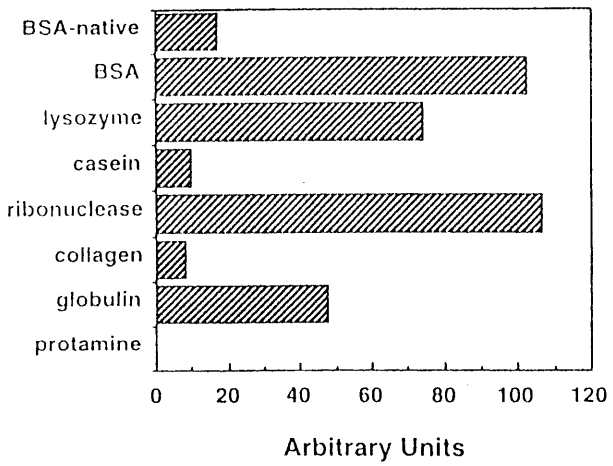


Fig. 5
Participation of Various Proteins in Formation of MRX

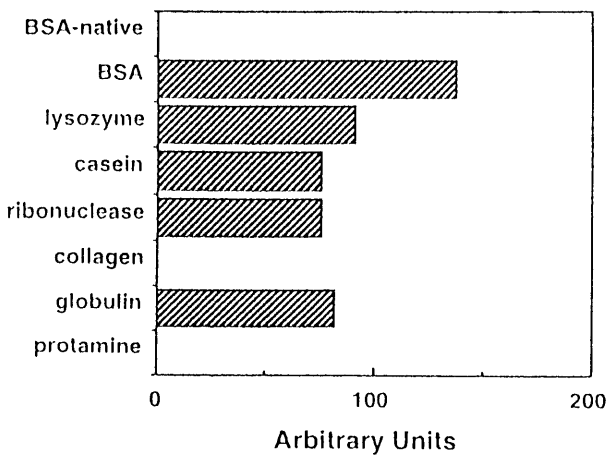
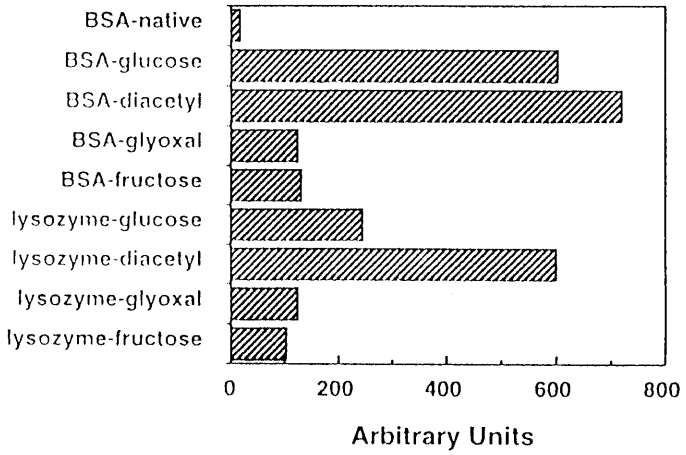


Fig. 6
Participation of Various Proteins in Formation of MRY



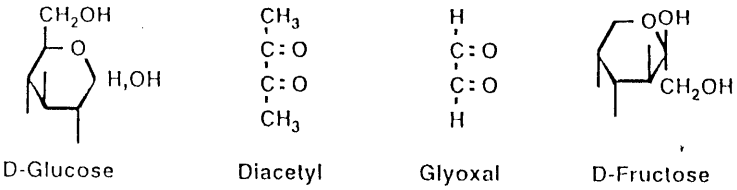


Fig. 7
Effects of Difference in Carbonyl Compounds on Formation of MRX

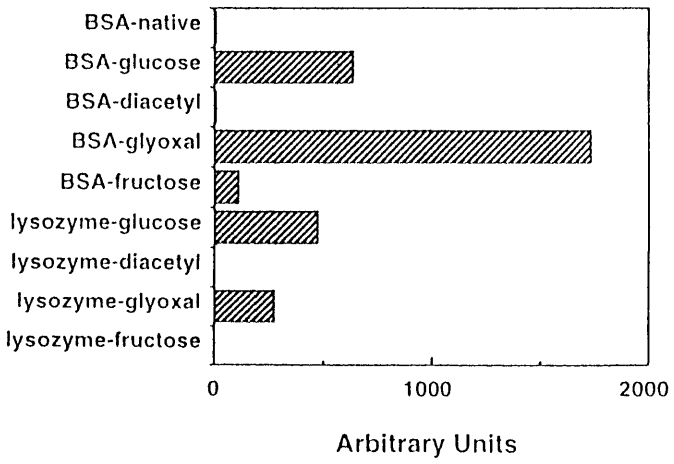


Fig. 8
Effects of Difference in Carbonyl Compouds on Formation of MRY

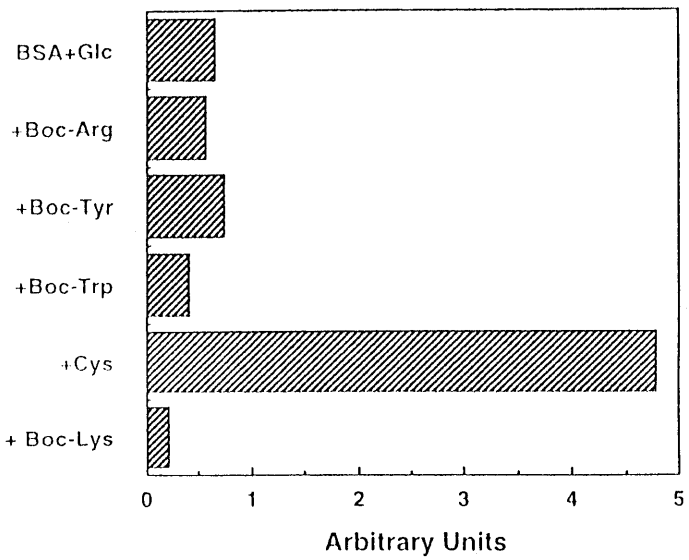


Fig. 9
Effects of Amino Acids on Formation of MRX by Incubation of BSA with Glucose

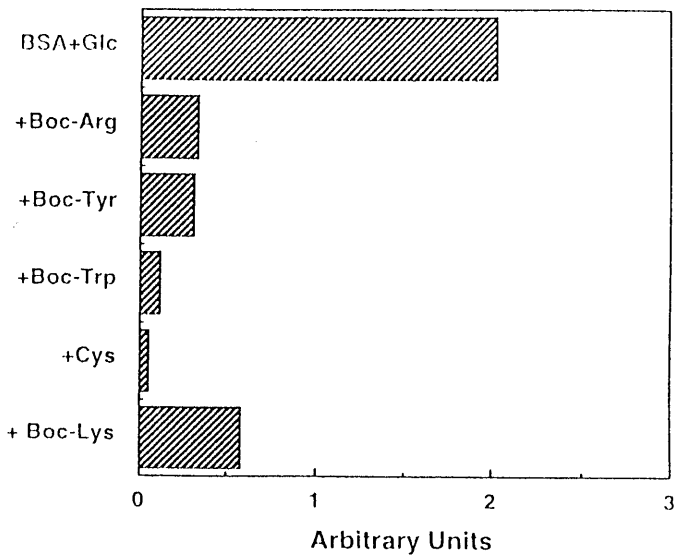


Fig. 11
Additional Effects of Amino Acids on Formation of MRY by Incubation of BSA with Glucose

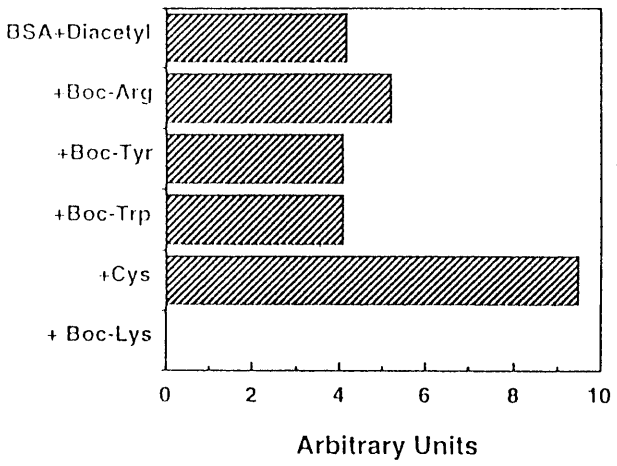


Fig. 10
Additional Effects of Amino Acids on Formation of MRX by Incubation of BSA with Diacetyl

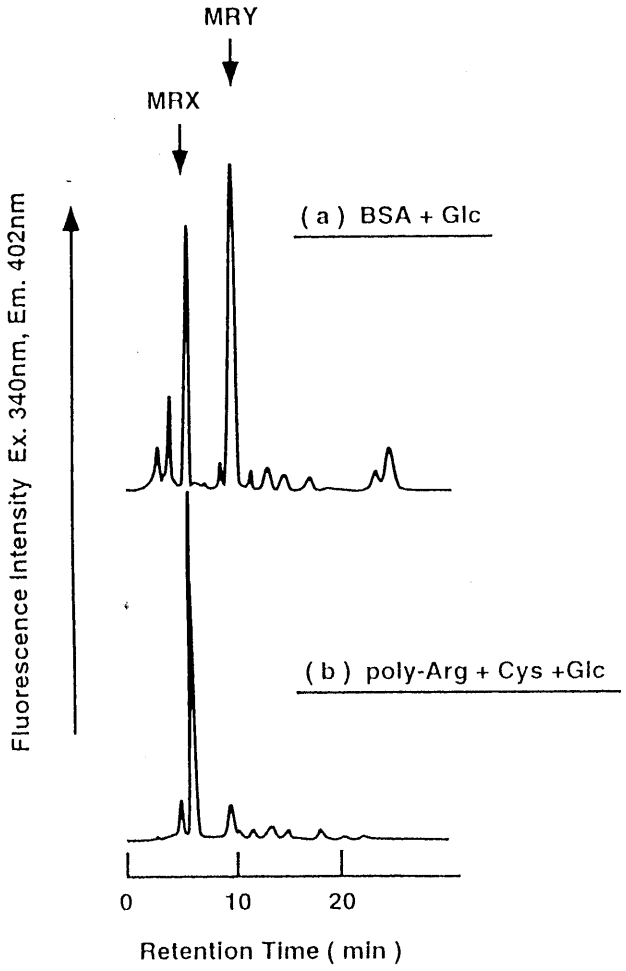


Fig. 12
Difference in Formation of MRX and MRY between BSA+Glucose and Poly-Arginine + Cysteine + Glucose Systems

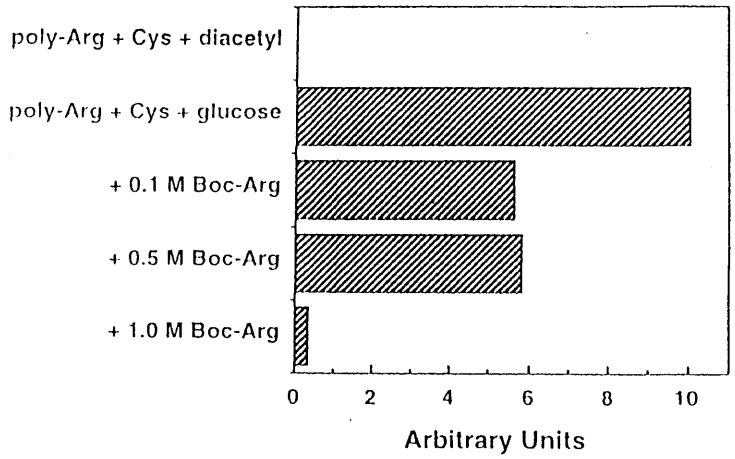


Fig. 13
Contribution of Boc-Arg to Formation of MRX

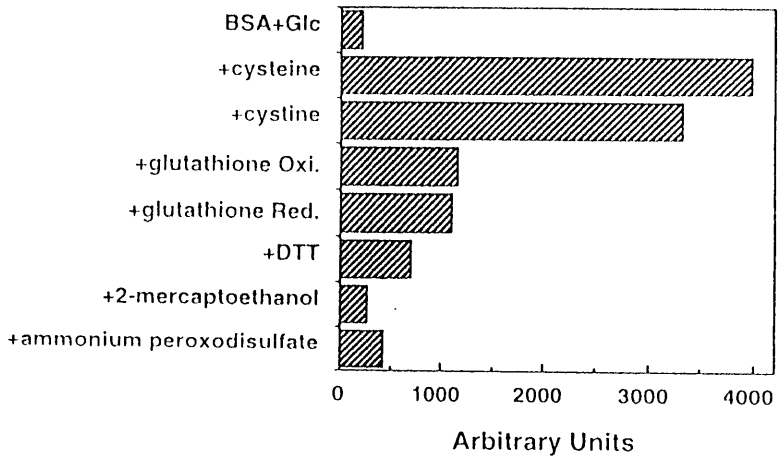


Fig. 14
Additional Effects of SH Compounds on Formation of MRX

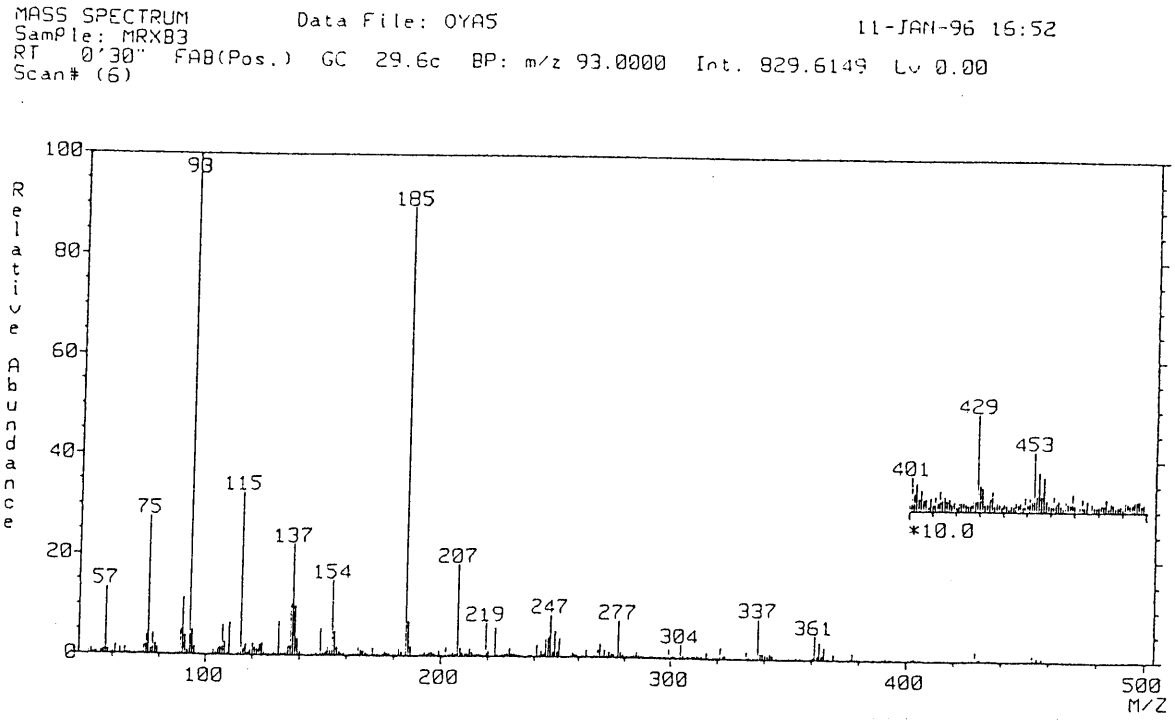


Fig.15
FAB-MS Spectrum of MRX

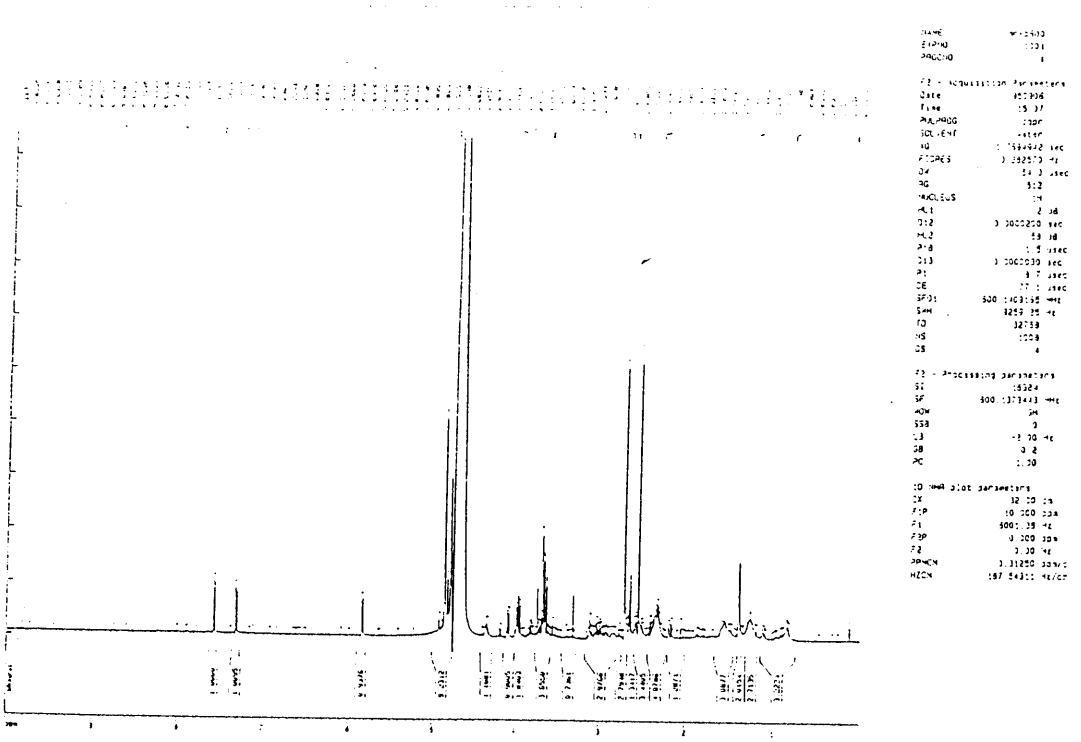


Fig. 16
^{1}H-NMR Spectrum of MRX

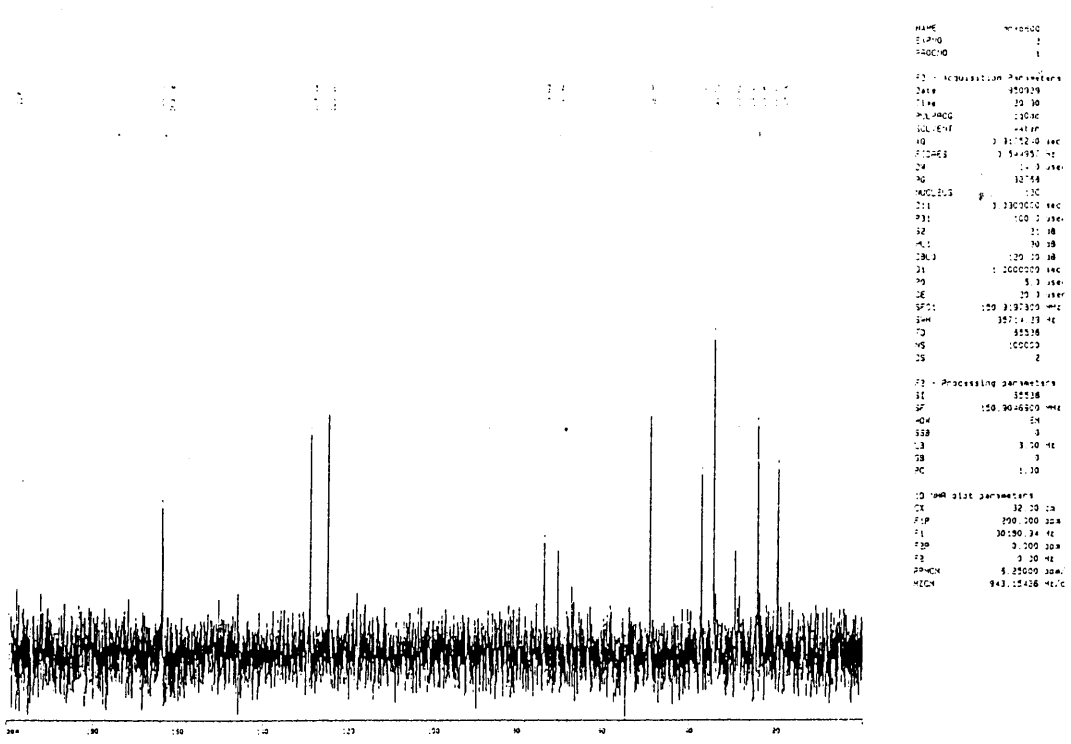


Fig. 17
^{13}C-NMR Spectrum of MRX

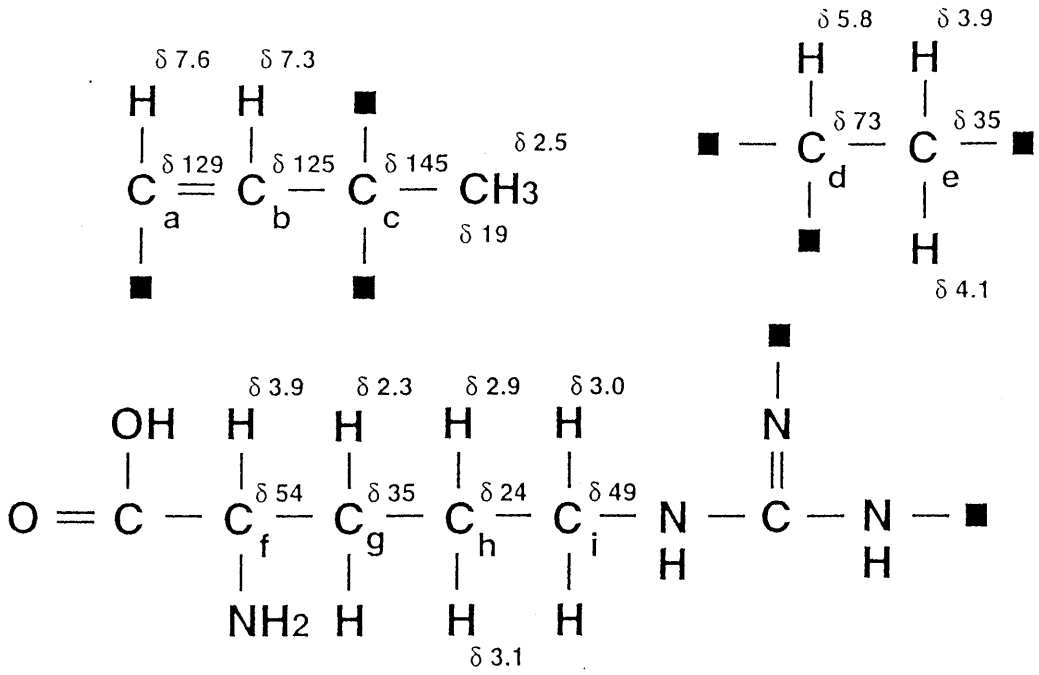


Fig. 18
Partial Structures of MRX

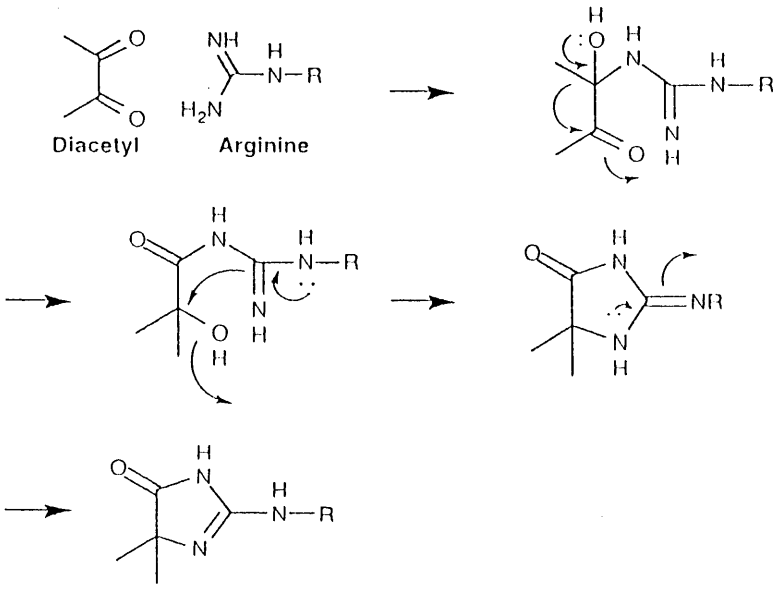


Fig. 19
Proposed Reaction Pathway of
Arginine with Diacetyl

Table 1
Amino Acid Analysis of Native BSA and Glycated BSA (4mg/ml) with Glucose (1M)

Amino Acid (mol %)

Amino acid	BSA	BSA-Glc
Asp	54.7	55.3
Thr	32.9	33.4
Ser	25.8	26.6
Glu	78.3	79.5
Gly	16.9	17.3
Ala	46.6	47.0
Cys	16.9	16.3
Val	34.1	33.8
Met	3.8	3.6
Ileu	13.1	12.9
Leu	61	61
Tyr	19.1	16.8
Phe	27.0	28.8
His	17.3	21.4
Lys	58.9	48.1
Arg	23.3	17.4
Pro	28.3	29.9

Table 2
Amino Acid Composition of Various Proteins (mol %)

Sample	Arg	Lys	Cys
BSA	4.0	10.0	6.0
HSA	4.0	10.0	6.0
Lysozyme	9.0	5.0	6.0
Casein	1.0	5.0	0
Ribonuclease	3.0	8.0	6.0
Protamin	63.0	0	0

Table 3
Chemical Shifts and Coupling Constant of ^{1}H-and ^{13}C-NMR Data of MRX

(600MHz, D_2O)

C	δ (ppm)	H	δ (ppm)		J (Hz)
CH	129.15	a	7.6	d	8.5
CH	125.10	b	7.3	d	8.5
C	145.00	c			
CH	73.63	d	5.8	d	8.8
CH_2	35.00	e	3.9	m	12.0, 9.0
CH	54.00	f	3.9	m	12.0, 7.0
CH_2	34.51	g	2.3	m	
CH_2	24.36	h	2.9	m	
CH_2	48.98	i	3.0		
		j	1.2	m	
CH_3	20.12	k	1.4	d	6.4
		l	1.5	m	
		m	1.6	m	
CH_2	24.47	n	2.3	m	
CH_2	19.76	o	2.5	s	
CH_3	29.60	p	2.6	m	
CH_2	37.32	q	2.7	s	
		r	3.1		
		s			
		t			
CH_2	70.42	u	3.7	m	
		v	3.7	m	
		w			
C=O	163.78				
C=O	164.00				