

<平成24年度助成>

## メイラード反応を阻害する成分の探索

渡 辺 寛 人

(明治大学農学部生命科学科)

### 緒 言

わが国の糖尿病患者は年々増加する傾向にあり、網膜症、腎症など、患者のQOLを著しく低下させる糖尿病合併症の予防・治療法開発が重要な課題となっている。糖尿病合併症の発症にはさまざまな因子の関与が示唆されているが、近年の研究により生体内でおきるメイラード反応(アミノカルボニル反応)生成物による細胞機能障害が大きく関与することが明らかとなってきた。

メイラード反応は、アミノ基の非共有電子対がカルボニル炭素を求核攻撃することによりはじまる。その後、脱水によりイミン(シッフ塩基)が生成し、さらに分子内転位が起きて、アマドリ化合物が生成する。その後、これにさらにアミノ化合物やカルボニル化合物が反応し、またアマドリ化合物から反応性の高いジカルボニル化合物が生成するなどして複雑な反応がおき、反応の後期段階では糖化反応後期段階生成物(advanced glycation end products; AGE)が生成する。

AGEはタンパク質のリジンやアルギニンなどの側鎖をグルコースなどの糖、あるいは糖由来のカルボニル化合物が修飾して形成された多様な構造の総称である。これまでにカルボキシメチルリジン(*N*<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine)、ペントシジン(pentosidine)<sup>1)</sup>、グルコースパン(glucosepane)<sup>2)</sup>(図1)など数多くの構造が同定されている。AGEに関する研究は近年急速に進展し、多様な構造のAGEが生体内においても生成し、蓄積すること、またAGEがその受容体であるRAGE(Receptor

for AGE)との相互作用を介して細胞機能を障害し、網膜症、腎症、動脈硬化症をはじめとするさまざまな合併症をひきおこすことなどが明らかにされてきた<sup>3-5)</sup>。

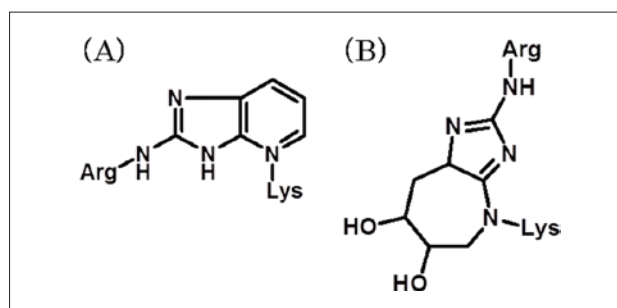


図1 本研究で対象としたAGEの構造  
(A)ペントシジン (B)グルコースパン

このような背景からメイラード反応を阻害する因子は、糖尿病合併症の予防・治療薬となると期待され、多くの薬剤が研究されている<sup>6)</sup>。しかしながら、既存の阻害剤はカルボニル化合物の捕捉を作用点とするものが多く、これらは副作用が強いという問題があった。一方、われわれは、副作用のないメイラード反応阻害剤を食品・生体由来の因子から見出すことを目的として研究を行ってきた。その結果、これまでにFAD(flavin adenine dinucleotide)が「アマドリ化合物を分解する」という新たな機序によりメイラード反応を阻害しうることを見出した。アマドリ化合物は、メイラード反応前期段階における重要中間体であり、その分解はメイラード反応の阻害ならびにAGEの生成抑制につながると考えられた。しかしながら、FADが実際にAGE形成を抑制できるかどうかは明らかになっておらず、その作用機構の詳細は不明であった。本研究は、FADおよび

新たな阻害因子として解析対象としたリボフラビン関連化合物の作用機序を詳細に解明することにより、安全な糖尿病合併症予防・軽減食品の開発のための基礎的知見を得ることを目的としたものである。

## 方 法

### (1) fructose-*p*-toluidine の合成

Hashiba の方法<sup>7)</sup> および O'Brien と Morrissey の方法<sup>8)</sup> を一部改良することにより、モデルとして UV 吸収により検出が可能な *p*-toluidine のアマドリ化合物 (fructose-*p*-toluidine) を合成、精製した。具体的には D-Glucose 0.5 mol、*p*-toluidine 0.1 mol、メタ重亜硫酸ナトリウム 10 mg に水 10 ml を加え、沸騰水中 25 分間攪拌した。その後、水に溶解して陽イオン交換樹脂 Dowex 50 W X-8 (H<sup>+</sup> form, 100-200 mesh; Dow Chemistry Company) に供し、非吸着画分を水で洗浄した後、0.3 M トリクロロ酢酸でアマドリ化合物を溶出させた。NBT (nitro blue tetrazolium) 陽性画分よりジエチルエーテルによりトリクロロ酢酸を除去した後、凍結乾燥した。さらにエタノールを用いた再結晶により精製を行い、fructose-*p*-toluidine を得た。

### (2) $\alpha$ -ジカルボニル化合物の解析<sup>9)</sup> および D-glucosone の合成

D-glucosone をはじめとする  $\alpha$ -ジカルボニル化合物の分析には、2,3-diaminonaphthalene による誘導体化法を用いた。試料に等量の 1 mM 2,3-diaminonaphthalene 水溶液を加え、50℃で 1 時間反応させることにより  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を安定な benzo[g]quinoxaline 誘導体に変換した。誘導体化後の試料を逆相 HPLC (Puresil C18, Waters) に供し、268 nm の吸光度により検出を行った。ジカルボニル化合物誘導体化反応の内部標準としては 1,2-cyclonexanedione を用いた。

また D-glucose より D-arabino-hexose phenylo-

sazone を合成し、さらにこれをもとに合成した D-glucosone をシリカゲルカラム (Silica gel 100 (0.063-0.200), Merck) により精製し、HPLC 分析のための標品とした。

### (3) リボフラビン類によるアマドリ化合物分解反応の解析

各濃度の FAD あるいはリボフラビンと、1 mM アマドリ化合物 (fructose-*p*-toluidine) とを、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中、37℃で反応させ、これを逆相 HPLC カラム (Inertsil ODS-3, GL Sciences) に供した。50% メタノールにより溶出を行い、240 nm の吸光度により fructose-*p*-toluidine あるいはその分解物である *p*-toluidine の検出を行った。

### (4) AGE (グルコースパン) 形成抑制作用の解析

低分子モデル反応系における AGE 形成の抑制作用を解析するため、生体中に多く形成される架橋型の AGE として知られるグルコースパン構造の形成におよぼすリボフラビンの作用を解析した。glucose と  $\epsilon$ -aminocaproic acid からアマドリ化合物 fructose-aminocaproic acid を合成した。これと *N* <sup>$\alpha$</sup> -acetyl-L-arginine を 100  $\mu$ M リボフラビンの存在下、あるいは非存在下で 37℃、7 日間反応させた後、反応物を Pegasil ODS (Sensyu Pak) により分離し、252 nm の吸光度によりグルコースパンの検出を行った。グルコースパンには異性体が存在するため、それぞれの形成について合成したグルコースパン標品を用いて定量を行った。

### (5) タンパク質に形成されたアマドリ構造に対する作用の解析

タンパク質に形成されたアマドリ構造に対してリボフラビン類が作用しうるか、すでに糖により修飾されたタンパク質とのリボフラビン類との反応について検討を行った。具体的には、10 mg/ml ウシ血清アルブミン (BSA) をあらかじめ 1 M D-glucose と 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液

(pH7.4)中、37℃で7日間滅菌状態のもと反応させた。透析により未反応の glucose などを除去し、糖化タンパク質試料とした。反応によりアマドリ構造がBSAに形成されていることをNBT試験により確認した。

10mg/mlの糖化タンパク質試料をそれぞれ100 $\mu$ MのFAD、FMN (flavin mononucleotide)、リボフラビンの存在下、あるいは非存在下で40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中、37℃でさらに7日間反応させることにより、AGEを形成させた。反応後の試料をSephadex G-25によるゲルろ過クロマトグラフィーに供し、タンパク質画分を得た。これを乾固した後、6N HClにより加水分解し、Sep-Pak C18 (Waters)にて吸着する不純物を除去した。その後、逆相HPLC (Inertsil ODS-3)により分離し、蛍光 (Ex. 335 nm/Em. 385 nm)によりペントシジンを検出・定量した。

またリボフラビン類のアマドリ構造分解にともなって糖化タンパク質試料より生成すると考えられる glucosone を定量するため、Sephadex G-25によるゲルろ過クロマトグラフィーの低分子量画分を用い、上述のように2,3-diaminonaphthaleneによる誘導体化による解析を行った。

## 結 果

### (1) FADおよびリボフラビンによるアマドリ化合物分解反応の解析

FADおよびリボフラビンのアマドリ化合物分解作用を解析するために、アマドリ化合物モデルとして fructose-*p*-toluidine を合成し、これを基質とした。リボフラビン類と fructose-*p*-toluidine を24時間反応させ、反応溶液を逆相HPLCにより分離し、240 nmの吸光度により分解産物を検出した。その結果、FADおよびリボフラビンは、濃度依存的に fructose-*p*-toluidine を減少させた(図2)。われわれが既にアマドリ分解作用を見出しているFADと比較して、リボフラビンは高いアマドリ化合物分解活性をもつことが明らかになった。またアマドリ化合物の減少にともない、メイラード反応前のアミノ化合物である *p*-toluidine が増大することが示された。とくにリボフラビンは濃度依存的に *p*-toluidine を生成させ、その生成量はFADによるものよりも顕著に大きかった。これらのことから、リボフラビンはアマドリ化合物である fructose-*p*-toluidine に作用し、これを分解して *p*-toluidine を生成させる、すなわちアミノ基を再生させることが確認できた。

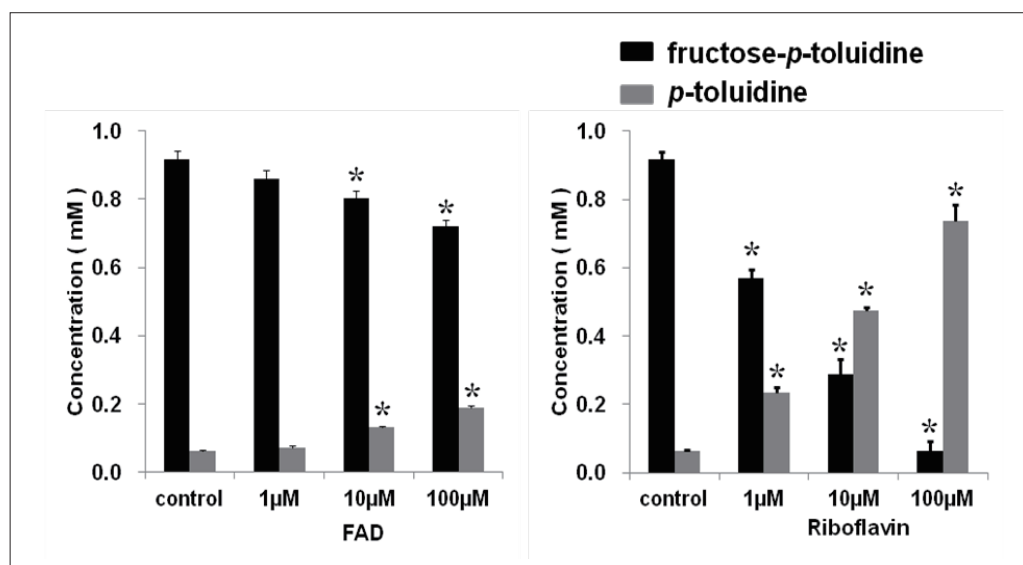


図2 FADおよびリボフラビンによるアマドリ化合物 (fructose-*p*-toluidine) の分解とアミノ化合物 (*p*-toluidine) の再生  
\* $p < 0.05$  vs control.

またその作用はFADよりも大きいことが明らかになった。

FADはアマドリ化合物を分解し、糖に由来する構造としてglucosoneを生成させることがわれわれの研究により明らかになっている。そこでリボフラビンによるglucosoneの生成を2,3-diaminonaphthaleneを用いた誘導体化によって解析した。その結果、リボフラビンはアマドリ化合物の分解にともなってglucosoneを生成させること、その生成量はFADによるものよりも大きいことが確認された(図3)。

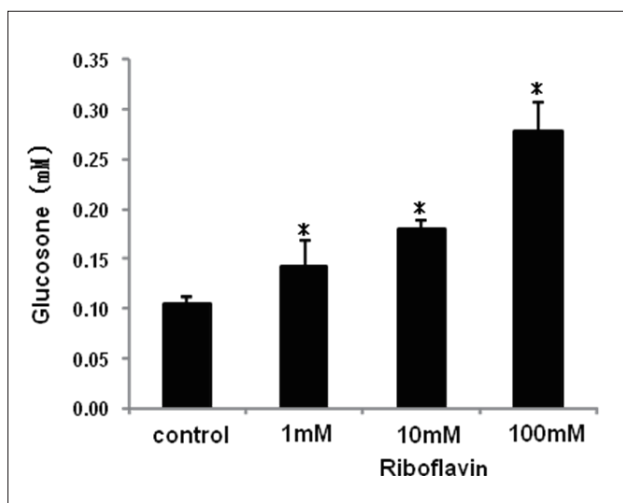


図3 リボフラビンによるアマドリ化合物分解にともなうglucosoneの生成  
\* $p < 0.05$  vs control.

## (2) リボフラビンによるグルコースパン形成抑制作用の解析

リボフラビンがメイラード反応の重要中間生成物であるアマドリ化合物を分解してアミノ基を再生させる作用を有することから、これがメイラード反応の後期段階で形成されるAGEを抑制しうるか検討を行った。具体的には生体内で多量に蓄積することが知られているglucose由来の架橋型AGEグルコースパン(図1)の形成について、glucose、 $\epsilon$ -aminocaproic acid、および $N^{\alpha}$ -acetyl-L-arginineを用いた低分子モデル反応系を用いて解析を行った。グルコースパンには異性体が存在するため、本研究ではそれらをピーク

AおよびピークBとして表すが、リボフラビンを反応系に共存させることにより、両異性体の形成量を有意に減少させた(図4)

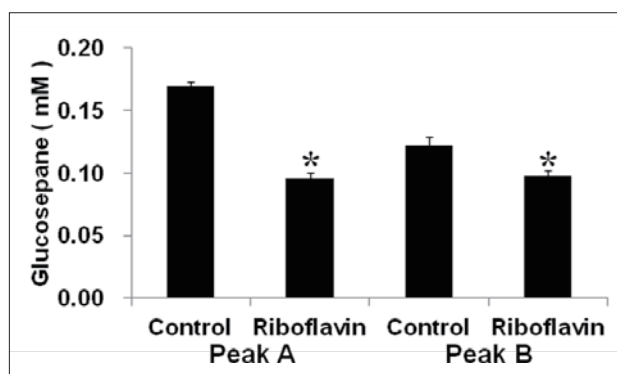


図4 低分子モデル反応系を用いたグルコースパン形成に対するリボフラビンの抑制作用  
ピークAおよびピークBはそれぞれグルコースパンの異性体を示す。\* $p < 0.05$  vs control.

## (3) タンパク質に形成されたアマドリ構造に対するリボフラビン類の作用の解析

低分子モデル反応系において、リボフラビンがAGE形成を抑制することが確認されたことから、次にタンパク質に形成されたアマドリ構造に対してリボフラビン類が分解作用を示すか解析を行った。ここでは、FADとリボフラビンに加え、FMNの作用についても検討した。

BSAとglucoseを37℃で7日間反応させることによりタンパク質アミノ酸残基にアマドリ構造を形成させた。アマドリ構造の形成はNBT試験により行った(データ省略)。糖を除去した後、糖化タンパク質試料にFAD、FMN、およびリボフラビンを添加してさらに37℃で7日間反応させ、AGEを形成させた。塩酸加水分解した後にHPLCにて架橋型AGEであるペントシジン(図1)の形成量を解析したところ、FAD、FMN、およびリボフラビンはペントシジンの形成を有意に抑制した。とくにリボフラビンの抑制作用が最も高いことが示された(図5)。

また、アマドリ構造の分解によって生成するglucosoneの定量を行ったところ、FAD、FMN、およびリボフラビンとの反応により、糖化タンパ

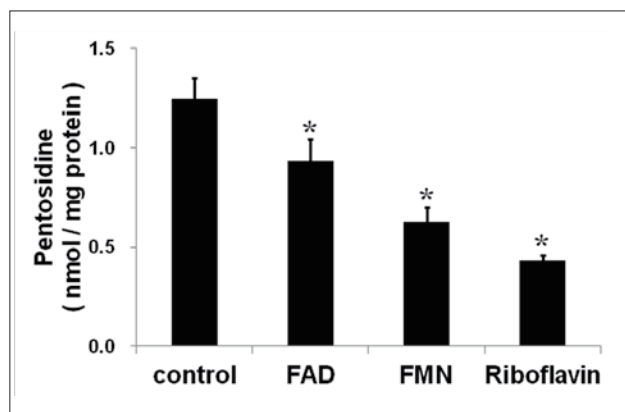


図5 タンパク質反応系におけるペントシジン形成に対するリボフラビン類の抑制作用

\* $p < 0.05$  vs control.

ク質試料より glucosone が生成することが確認された(データ省略)。さらにリボフラビン類による glucosone 生成量は、ペントシジン形成抑制作用の強さに相関したものであった。

## 考 察

既にわれわれはFADがアマドリ化合物を酸化的に分解してアミノ基を再生させることを示しているが、本研究によりリボフラビンが同様の分解作用を示すこと、さらにその作用はFADよりも高いことが明らかとなった。アマドリ化合物はメイラード反応の重要中間体であり、これを分解して元のアミノ基が再生させることは、メイラード反応の抑制において効果的であると考えられる。

一方、リボフラビンあるいはFADによるアマドリ化合物分解にともなって、ジカルボニル化合物であるオゾン(グルコース由来のアマドリ化合物の場合は glucosone)が生じるため、生成したオゾンがメイラード反応を促進してしまうことも推測される。しかしながら、glucose と、 $\epsilon$ -aminocaproic acid および  $N^{\alpha}$ -acetyl-L-arginine の低分子モデル反応系において生じる架橋型 AGE 構造であるグルコースパンの形成をリボフラビンが有意に抑制することが確認された。

微生物にはアマドリ構造を分解する酵素(amadoriase)が存在することが知られており<sup>10)</sup>、

FADを補酵素として低分子アマドリ化合物の分解作用を示すことが明らかとなっている。しかしながら、この酵素がタンパク質に形成されたアマドリ構造を分解できるとの報告はない。本研究では、あらかじめ glucose と反応させることにより形成されたタンパク質中のアマドリ構造をリボフラビン類が分解できるか検討を行った。分解作用を glucose 由来架橋型 AGE であるペントシジンの形成抑制作用により評価したところ、FAD、FMN、およびリボフラビンがペントシジンの形成を有意に抑制することが確認された。このことからこれらリボフラビン類は、タンパク質に形成されたアマドリ構造をも分解できると考えられた。データには示していないが、リボフラビン類との反応により glucosone が生成したこともこれを支持するものと考えられる。また FAD に比較して高いアマドリ化合物分解作用をもつリボフラビンは、高いペントシジン形成抑制作用を示した。

これらのことから、本研究で示したりボフラビンのアマドリ化合物分解作用は、AGEの形成抑制に寄与するものであり、タンパク質のメイラード反応においても AGE 形成を抑制しうることが推定された。今後は低容量のカルボニル捕捉剤を併用することにより、生じたオゾンも捕捉することもメイラード反応の抑制、AGEの形成抑制に有効であると考えられる。

われわれのこれまでの研究では、アマドリ化合物分解作用をもつFADが実際に AGE 形成を抑制するかどうかは不明であった。FADあるいはリボフラビンがペントシジンの形成を有意に抑制することが示された点で、本研究で得られた知見はこれら因子のメイラード反応抑制作用解析において大きな意義があると考えられる。

これまでに報告されたメイラード反応抑制剤は、その抑制機構にカルボニル捕捉作用が関わるものが多く、これらはピリドキサーールなど生体に必要なカルボニル化合物とも反応してしまう

など、その副作用が問題視されている。本研究で研究対象としたリボフラビン類は、アマドリ化合物分解作用という新たな作用点をもつメイラード反応阻害剤であること、また過剰摂取による問題がないと考えられることから、糖尿病合併症予防食品への応用が期待される。今後は糖尿病モデル動物を用いた検討を行うなどして、生体内におけるリボフラビン類のAGE蓄積抑制作用、さらには糖尿病合併症予防作用を解析することが課題である。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、多大な研究助成を賜りました(公財)浦上食品・食文化振興財団、ならびに関係の皆様は厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Sell, D.R. and Monnier, V.M., Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process, *J. Biol. Chem.*, **264**, 21597-21602 (1989)
- 2) Sell, D.R., Biemel, K.M., Reihl, O., Lederer, M.O., Strauch, C.M., and Monnier, V.M., Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes, *J. Biol. Chem.*, **280**, 12310-12315 (2005)
- 3) Ahmed N., Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **67**, 3-21 (2005)
- 4) Yan, S.F., Ramasamy, R., and Schmidt, A.M., Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications, *Nature Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **4**, 285-293 (2008)
- 5) Ramasamy, R., Yan, S.F., and Schmidt, A.M., Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go, *Amino Acids*, **42**, 1151-1161 (2012)
- 6) Reddy, V.P. and Beyaz, A., Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases, *Drug Discov. Today*, **11**, 646-654 (2006)
- 7) Hashiba, H., Participation of Amadori rearrangement products and carbonyl compounds in oxygen-dependent browning of soy sauce, *J. Agric. Food. Chem.*, **24**, 70-73 (1976)
- 8) O'Brien, J. and Morrissey, P.A., Metal ion complexation by products of the Maillard reaction, *Food Chem.*, **58**, 17-27 (1997)
- 9) Usui, T., Yanagisawa, S., Ohguchi, M., Yoshino, M., Kawabata, R., Kishimoto, J., Arai, Y., Aida, K., Watanabe, H., and Hayase, F., Identification and determination of alpha-dicarbonyl compounds formed in the degradation of sugars, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2465-2472 (2007)
- 10) Takahashi, M., Pischetsrieder, M., and Monnier, V.M., Isolation, purification, and characterization of amadoriase isoenzymes (fructosyl amine-oxygen oxidoreductase EC 1.5.3) from *Aspergillus* sp., *J. Biol. Chem.*, **272**, 3437-3443 (1997)

## Analysis of novel food-derived inhibitors of Maillard reaction

**Hirohito Watanabe**

*Faculty of Agriculture, Meiji University*

Glycation, a process that is also known as Maillard reaction, is a post-translational modification of proteins by reducing sugars such as glucose. Reducing sugars react with amino groups in proteins to form the Amadori compounds, which can undergo chemical modifications and form advanced glycation end products (AGE) in tissue proteins. AGE, which is accumulated in diabetes as a result of chronic hyperglycemia, has been implicated in the pathogenesis of diabetic complications such as nephropathy and neuropathy. Therefore, inhibition of AGE formation is thought to be a promising target for therapeutic intervention in the AGE-related disorders such as diabetic complications. Because Amadori compounds are important precursors for AGE in glycation, Amadori compound-degrading factors could effectively inhibit the formation of AGE. We have found that flavin adenine dinucleotide (FAD) catalyses the degradation of Amadori compounds. In this study, we analyzed Amadori-degrading activity of riboflavin, as a novel inhibitor of glycation. A model amadori compound (fructose-*p*-toluidine) derived from glucose and *p*-toluidine was incubated with riboflavin, and Amadori-degrading activity of fructose-*p*-toluidine was determined by reversed phase-HPLC. Riboflavin efficiently degraded fructose-*p*-toluidine and generated *p*-toluidine. These results indicate that riboflavin regenerates amino groups from Amadori compounds and inhibits glycation. Indeed, we found that riboflavin suppressed AGE formation in the reaction of amino acid with glucose. Furthermore, riboflavin suppressed formation of pentosidine, an AGE cross-link in proteins. Our results indicate that the riboflavin-related compounds could be beneficial in preventing the progression of diabetic complications by attenuating AGE accumulation.