

蛋白の糖化—メイラード反応を中心にして—

東京女子医科大学 医学部 化学

ホリカワ ヒロアキ
堀川 博朗

(受理 平成 16 年 3 月 22 日)

Glycation of Protein: Primarily on the Maillard Reaction

Hiroaki HORIKAWA

Department of Chemistry, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

The Maillard reaction is a complex and poorly understood series of reactions between reducing sugars and the primary amino groups of proteins. The resulting advanced glycation end-products (AGEs) and active oxygen species are thought to contribute to the development of diabetic complications and aging. This review describes the basic chemistry of the Maillard reaction.

Key words: glycated protein, advanced glycation end-product (AGE), Maillard reaction, Amadori compound, amino-carbonyl reaction

はじめに

1912年, フランスの化学者 Louis Camil Maillard はアミノ酸と還元糖を加熱すると褐変化反応が起こり黄褐色の色素が生じることを見いだした。そこでこの反応をメイラード反応と呼んでいる¹⁾。この反応はタンパク質でも起こり, 食品の製造および保存中における色・香などの品質の形成や変化に大きな影響を及ぼすことから, 食品化学分野では古くから研究されてきた。たとえば, 味噌・醤油の赤褐色²⁾やビールの黄褐色はこの反応に因るところが大きい。

メイラード反応は非酵素的なタンパク質糖付加反応であることから, 酵素による糖付加反応 glycosylation と区別して glycation グリケーションともよばれる。グリケーションを受けたタンパク質を糖化タンパク質という。

近年, このメイラード反応が健常者の生体内でも起こること³⁾, 特にこの反応の最終段階でタンパク質中に形成される糖化最終産物 AGE (advanced glycation end-products) は, 糖尿病合併症の発症・進展^{4)~6)}, アルツハイマー病⁷⁾など種々の疾患や老化⁸⁾⁹⁾に關与する可能性が指摘され, 医学の分野でも大きな注目を浴びている。

メイラード反応は *in vitro* の実験では糖の種類,

アミノ化合物の種類, さらにはその反応条件によっていろいろな構造の生成物を生じることが知られている。しかし, 生体では実際にどのような反応が起こっているのか未だに不明の点が多い。

本稿では主にグルコースとリジンの ϵ -アミノ基間の反応を中心にしたメイラード反応の化学的理解の現状を紹介する。併せて我々の研究室で得られたこの反応の基礎化学的側面にも言及する。

メイラード反応

図1にはグルコースとタンパク質を構成するリジン残基の ϵ -アミノ基間の反応によって生じた AGE が, タンパク質分子を修飾あるいは架橋するまでの反応過程, いわゆるメイラード反応についてその概要を示した。反応は前期段階と後期段階の反応に分けて考えることが多い。

1. メイラード反応前期段階

メイラード反応は, タンパク質の N 末端アミノ酸の α -アミノ基 ($-\text{NH}_2$) やリジン残基の ϵ -アミノ基がグルコースなどの還元糖のカルボニル基 ($-\text{C}=\text{O}$) と反応して, シッフ塩基を形成することから始まる (図2)。この反応はアミノ-カルボニル反応とよばれ, 古くから有機合成化学の分野で汎用されている。可逆反応なのでグルコース濃度が高くなるに伴って

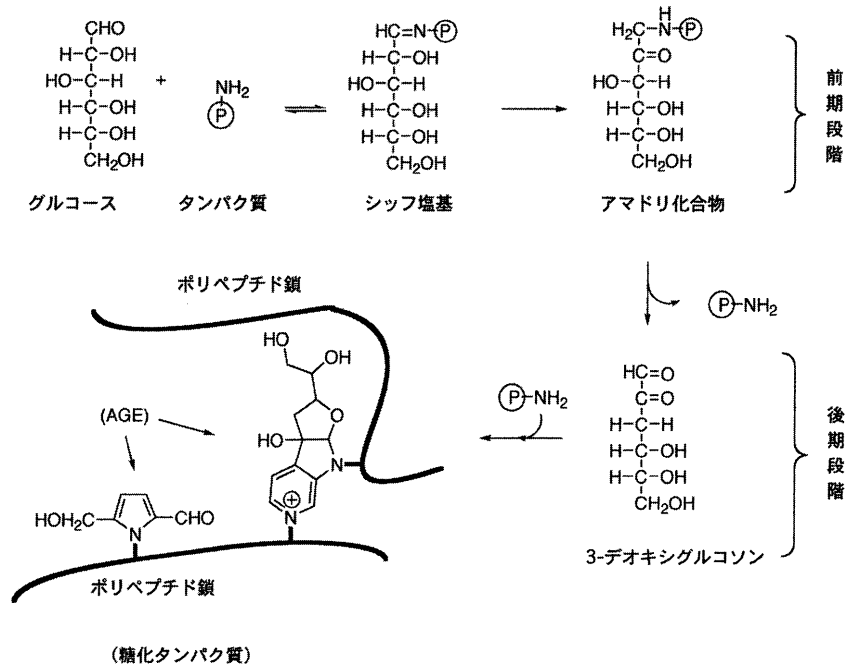


図1 グルコースとタンパク質の反応から始まるメイラード反応の概要

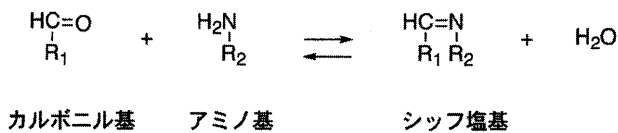


図2 アミノ-カルボニル反応

化学平衡はシッフ塩基を形成する方向に傾く。したがって、生体においても高血糖状態が長期間持続するとアミノ-カルボニル反応によるタンパク質の糖化が促進することになる。

シッフ塩基は、次いで、アマドリ転移反応とよばれる分子内転移反応を自発的に起こし、比較的安定な化合物に変化する。この化合物をアマドリ化合物とよび、この物質が生成するまでの段階をメイラード反応の前期段階 (early stage) とよんでいる。グルコースとリジンが反応して生じるアマドリ化合物をフルクトースリジンとよぶが、これはアマドリ転移反応によってグルコース骨格がフルクトース骨格に変わるためである。

一般にアミノ-カルボニル反応におけるアミノ基の反応性は、タンパク質の N 末端アミノ酸の α -アミノ基よりリジン残基の ϵ -アミノ基の方が大きい。一方、カルボニル基の反応性は、グルコースのようにカルボニル基に隣接する炭素にヒドロキシル基 (-OH) が結合している場合 (図 3-A) よりもカルボニル基が隣接している場合 (図 3-B) の方が大きい。(B)

のように2つのカルボニル基が隣接する化合物を α -ジカルボニル化合物という。 α -ジカルボニル化合物類でも炭素数が少なくなるに伴ってアミノ基との反応性は大きくなる。したがって、炭素数2個のグリオキサール (図 3-C) や3個のメチルグリオキサール (図 3-D) の反応性はグルコースよりも大きい。近年、生体に存在するこれら低分子の α -ジカルボニル化合物による AGE の形成が注目されている¹⁰⁾¹¹⁾。

ところで、糖がアミノ-カルボニル反応を起こすためには糖のカルボニル基が遊離型で存在することが必要である。リボースのような五炭糖やグルコース、フルクトースのような六炭糖は結晶状態では環状構造をとっているために遊離型のカルボニル基は存在しない。遊離型のカルボニル基は糖の場合は鎖状構造のときに現れる。還元糖を水に溶かすと溶液中では環状構造の一部が鎖状構造になり両者間で平衡を保っている (図 4)。したがって、溶液中ではアミノ-カルボニル反応が可能となる。溶液中で鎖状構造の占める割合は還元糖によって異なるが、一般にはフルクトース > グルコース、五単糖 > 六単糖なので、グルコースよりもフルクトースが、また、六単糖のグルコースやフルクトースよりも五単糖のリボースやキシロースの方がアミノ-カルボニル反応を起こしやすい。また、アルカリ溶液中では環状構造は開環して鎖状構造になりやすいので、アミノ-カルボニル反応は酸性側よりもアルカリ性側で進行しやすい。

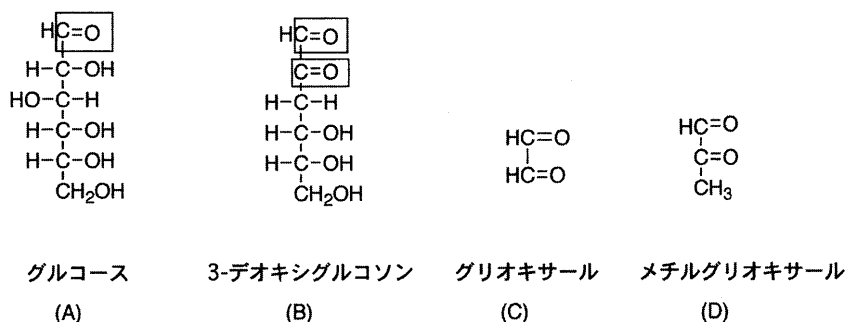


図3 カルボニル化合物

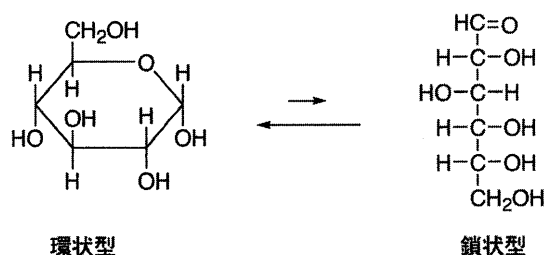


図4 糖の環状型・鎖状型構造

2. メイラード反応の後期段階反応

アマドリ化合物単独の水溶液は生理的 pH 付近でも安定である。しかし、生体では不安定で、徐々に化学変化する。*In vitro* の実験ではアマドリ化合物から種々の物質が生成することが知られている¹²⁾。その中で、メイラード反応を特徴づける生成物は3-デオキシグルコソン (3-DG) で代表される α -ジカルボニル化合物¹³⁾と活性酸素の一種であるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$)¹⁴⁾である。生じた α -ジカルボニル化合物は次にタンパク質のリジン残基やアルギニン残基などのアミノ基と反応して AGE を形成するので、生体にとっては有害な物質と考えられている。一方、 $\cdot\text{OH}$ はタンパク質や DNA の非特異的損傷¹⁵⁾¹⁶⁾、脂質の過酸化反応¹⁷⁾などを惹起し、種々の疾患を誘起するとして注目されている。 $\cdot\text{OH}$ は主に α -ジカルボニル化合物を生成する過程で生じるスーパーオキシド (O_2^-) が過酸化水素 (H_2O_2) に変化し、さらに Fenton 反応によって $\cdot\text{OH}$ を生成すると考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。3-DG からは AGE の一種であるピラリン²⁰⁾やピロピリジン²¹⁾が形成されることが明らかにされている。

アマドリ化合物から AGE が形成されるまでの反応を後期段階 (advanced stage) とよぶ。一般に、AGE は、蛍光性、褐色性、分子内・分子間の架橋形成といった化学的、物理化学的な性質と共に、血管

内皮細胞やマクロファージなどの細胞膜レセプターによって、リガンドとして認識されるという生物学的な特徴を有している²²⁾。現在までに構造が明らかにされた AGE として、上記の他にカルボキシメチルリジン (CML)、カルボキシエチルリジン (CEL)、ペントシジン、クロスリン、イミダゾロンなどが知られているが、これら AGE 間に構造上の特筆すべき共通性はない。これら AGE は生体内に存在する AGE のごく一部と考えられており、さらにどのような構造の AGE が存在し、それぞれがどのような疾患に関わっているのか解決すべき問題として残されている。

AGE はこれまでアマドリ化合物フルクトースリジン由来の α -ジカルボニル化合物 3-DG からのみ形成されると考えられてきたが、シッフ塩基²³⁾や糖の自動酸化分解物²⁴⁾から生成する低分子の α -ジカルボニル化合物や糖の中間代謝物²⁵⁾などからも形成されることが明らかになってきた。図5に近年明らかになった *in vitro* 実験での AGE 形成経路を示した。アマドリ化合物が形成されるまでの初期段階の反応機構は明らかになっているが、後期段階の反応についてはアマドリ化合物の化学的性質を含めて未だ不明の点が多い。たとえば、生体内で最も多く形成されると考えられているアマドリ化合物フルクトースリジンに限ってみても

・純水溶液中では生理的 pH 付近で安定なのに生体ではなぜ不安定になるのか、

・生体では 3-DG 以外にどのような α -ジカルボニル化合物がどのような反応経路で生成するのか、

・後期段階の反応は遷移金属イオンの Fe^{3+} や Cu^{2+} によって促進されることが多くの研究者によって報告されているが、これらの金属イオンがフルクトースリジンの化学変化にどのように関わっているのか。この場合、 Fe^{3+} が促進するという報告¹⁷⁾と

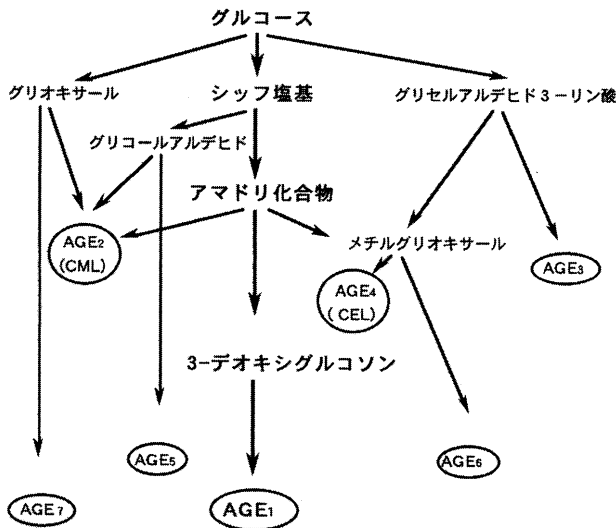


図5 さまざまな AGE の生成経路

Cu^{2+} が促進するという報告²⁶⁾があるが、いずれが促進するのか、

・メイラード反応はアルカリ性側で起こりやすく酸性側に傾くほど起こりにくい。アシドーシスを伴う糖尿病でも AGE の形成が促進するのはなぜか、など、多くの疑問が未解決になっている。

3. どのようなタンパク質が糖化を受けやすいのか

表にメイラード反応を受けることが明らかになったタンパク質を示した。メイラード反応はゆっくりと進行するので、代謝回転の遅いタンパク質、たとえばヘモグロビン、レンズクリスタリン、コラーゲンなどに AGE が蓄積されやすい。ヘモグロビン A1c は最も代表的な糖化タンパク質で、医学分野でメイラード反応が注目されるきっかけになった物質でもある^{31,27)}。ヘモグロビンは、成人型では α 鎖、 β 鎖の各 2 本ずつで構成されているが、A1c は β 鎖の N 末端のバリン残基のアミノ基が糖化反応を受けたものであり、 α 鎖の N 末端のアミノ酸は糖化されていない。この例が示すようにタンパク質中のすべてのアミノ基が同等にメイラード反応を受けるわけではなく、アミノ基周辺にどのようなアミノ酸残基が配置されているかによって反応の受けやすさが異なると考えられている²⁸⁾。

4. AGE 形成抑制薬

糖尿病合併症の発症・進展や老化を防止する一つの方策としてメイラード反応の抑制が考えられている。特に後期段階反応を抑制することが重要と考えられ、種々の抑制薬の開発が行われている。その中

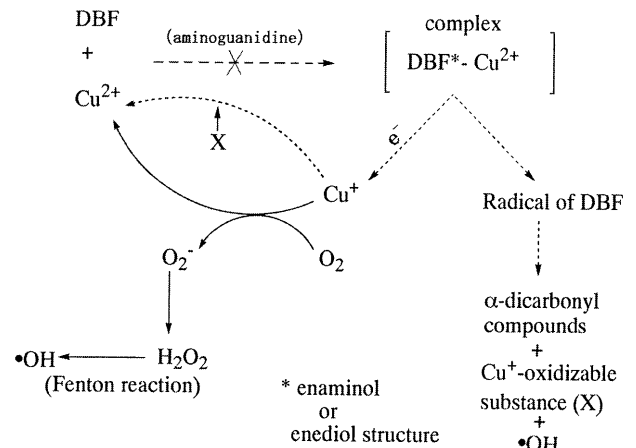


図6 Cu^{2+} 存在下におけるアマドリ化合物の性質

実験はリン酸緩衝液 (pH7.4), 37°C で行った。

DBF: アマドリ化合物の類似物質フルクトースブチルアミン, 破線: 酸素の有無に関わりなく進行する, 実線: 酸素の存在下でのみ進行する。

でアミノグアニジンの一つの開発方向を示した阻止薬として注目され、多くの研究者によって薬理効果や作用機序が検討された^{29)~32)}。その結果、アミノグアニジンは α -ジカルボニル化合物との反応性が大きいことから、その抑制効果は主に α -ジカルボニル化合物の反応性をブロックすることに因るとの考えが広く受け入れられている³³⁾。

5. アマドリ化合物フルクトースブチルアミンの化学的性質

以下に、我々の研究室でモデル化合物を用いて検討してきた遷移金属イオン存在下におけるアマドリ化合物の化学的性質について紹介する^{34,35)}。

アマドリ化合物としてフルクトースリジンの類似物質フルクトースブチルアミン (DBF) を合成し検討した。ブチルアミンはリジンの側鎖と同じ構造なので DBF はフルクトースリジンと類似した性質を示すことが予想された。得られた結果の一部を図 6 にまとめて示した。要約すると

① DBF は Cu^{2+} と容易に錯体を形成する性質を示した。しかし、 Fe^{3+} などの他の遷移金属イオンとは結合しなかった。

② この錯体は不安定で錯体形成と同時に DBF の部分から Cu^{2+} へ 1 電子移動が起こり、その結果、錯体は Cu^+ と非常に不安定な DBF ラジカルに分解した。

③ DBF ラジカルは直ちに自発的に分解し、これに伴って好氣的、嫌氣的いずれの条件下でも α -ジカルボニル化合物を生成した。

表 メイラード反応を受けている生体タンパク質

I. 細胞内タンパク質	
カルモジュリン, ヘモグロビン, レンズクリスタリン**, 筋繊維タンパク質, チューブリン	
II. 細胞外タンパク質	
a) 血漿タンパク質	アルブミン**, アンチトロンビンⅢ, フェリチン, フィブリン, フィブリノーゲン, 高密度リポタンパク質 (HDL)*, 低密度リポタンパク質, 免疫グロブリンG
b) ホルモン	インスリン*, 甲状腺ホルモン*
c) コラーゲン**	皮膚, 腱, 軟骨, 硬脳膜, 大動脈, 糸球体基底膜
d) ケラチン	毛髪, 爪, 角質層
e) 尿中	ペプチド, アミノ酸類
f) 骨中	オステオカルシン
III. 酵素	
アルコールデヒドロゲナーゼ, アルドースレダクターゼ, カテプシンB*, リゾチーム*, ミオシンATPase, β -N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ*, RNase*, スーパーオキシドジスムターゼ	
IV. 細胞膜タンパク質	
赤血球グルコーストランスポーター, 赤血球スペクトリン, ミエリン, 赤血球膜タンパク質	

* *in vitro* で確認されたタンパク質, **メイラード後期反応生成物が認められたタンパク質.

早瀬文孝: 化学と生物 31: 592-601, 1993 より引用.

④錯体の分解に伴って・OHも産生したが, その一部は non-Fenton 反応によって生じた³⁴⁾.

⑤錯体はアミノグアニジンの添加によって消失し, アミノグアニジン共存下では α -ジカルボニル化合物も・OHも生成しなかった³⁶⁾.

これらの性質はフルクトースリジンでも観察されたことから, DBF で観察された性質はアマドリ化合物に共通する性質と思われる. この結果はアマドリ化合物の Cu^{2+} 錯体がメイラード反応後期段階への出発物質である可能性を示唆する. また, アマドリ化合物の Cu^{2+} 錯体はアミノグアニジンの添加によって消失したことから, アミノグアニジンはアマドリ化合物と Cu^{2+} との錯体形成を阻止することによってメイラード反応の後期段階反応を抑止することも考えられる. アマドリ化合物の Cu^{2+} 錯体がメイラード反応後期段階への出発物質であるとする我々の考えは, メイラード反応は Cu^{2+} の存在下で起こりやすい²⁶⁾, AGE の形成抑止薬には Cu^{2+} のキレート剤としての性質^{37)~39)}があるという報告にも一致する. 事実, アミノグアニジンには Cu^{2+} と反応する性質があり, Cu^{2+} に対するキレート剤としての性質があることを我々は明らかにした³⁶⁾.

まとめ

アマドリ化合物フルクトースリジンの関与するメイラード反応を中心にその化学的理解の現状を紹介した. この反応は糖尿病患者ばかりでなく健常者の生体においても起こっており, その生成物が様々な疾患や老化に関与している可能性が指摘されてい

る. メイラード反応を研究する目的の一つに, 生体におけるこの反応を抑止する方策を見いだすことが挙げられる. そのためにはメイラード反応の基礎化学的側面のさらなる解明が必要と思われる.

文 献

- 1) Maillard LC: Action des acides sur les sucres: formation des melanodines per voie methodique. C. R Acad Sci **154**: 66-68, 1912
- 2) 加藤博通, 山田靖宙, 井坂健一ほか: 大豆製品の褐変機構に関する研究: 醤油, 味噌より 3-デオキシグルコソンの分離. 農化 **35**: 412-415, 1961
- 3) Holmquist WR, Schoeder WA: A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A1c. Biochemistry **5**: 2489-2503, 1966
- 4) Monnier VM, Cerami A: Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. Science **211**: 491-493, 1981
- 5) Brownlee M, Vlassara H, Cerami A: Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. Ann Intern Med **101**: 527-537, 1984
- 6) Murata T, Nagai R, Ishibashi T et al: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. Diabetologia **40**: 764-769, 1997
- 7) Sasaki N, Fukatsu R, Tsuzuki K et al: Advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. Am J Pathol **153**: 1149-1155, 1998
- 8) Monnier VM, Kohn RR, Cerami A et al: Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA **81**: 583-587, 1984
- 9) Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR et al: Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. J Biol Chem **273**: 18714-18719, 1998
- 10) Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Baynes JW:

- Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and N-alpha-hippuryllysine: a model for Maillard reaction crosslinks in proteins. *J Org Chem* **60**: 6246-6247, 1995
- 11) **Odani H, Shinzato T, Usami J et al**: Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett* **427**: 381-385, 1998
 - 12) **桜井民子, 中野 稔**: グリケーションとフリーラジカル. *活性酸素・フリーラジカル* **4**: 126-132, 1993
 - 13) **Kato H, Hayase F, Shin DB et al**: 3-Deoxyglucosone, an intermediate product of the maillard reaction. *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition* (Baynes JW et al eds), pp68-83, Alan R Liss, New York (1989)
 - 14) **Sakurai T, Tsuchiya S**: Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEB* **236**: 406-410, 1988
 - 15) **Davies KJA**: A protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Biol Chem* **262**: 9895-9901, 1987
 - 16) **Kaneto H, Fujii J, Suzuki K et al**: DNA cleavage induced by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Biochem J* **304**: 219-225, 1994
 - 17) **Sakurai T, Sugioka K, Nakano M**: O₂-generation and lipid peroxidation during the oxidation of a glycated polypeptide, glycated polylysine, in the presence of iron-ADP. *Biochim Biophys Acta* **1043**: 27-33, 1990
 - 18) **Hunt JV, Dean RT, Wolff SP**: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem J* **256**: 205-212, 1988
 - 19) **Masaki H, Okano Y, Sakurai H**: Generation of active oxygen species from advanced glycatin end-products (AGE) under ultraviolet A (UVA) irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 306-310, 1997
 - 20) **Njoroge FG, Sayer LM, Monnier VM**: Detection of D-glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydr Res* **167**: 211-220, 1987
 - 21) **Hayase F, Hinuma H, Konishi Y et al**: Identification of novel fluorescent pyrrolopyridinium compound formed from Maillard reaction of 3-deoxyglucosone and butylamine. *Biosci Biotech Biochem* **58**: 1936-1937, 1994
 - 22) **Schmidt AM, Vinna M, Gerlach M et al**: Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* **267**: 14987-14997, 1992
 - 23) **並木満夫**: Maillard 反応とグリケーション研究の新展開—Namiki pathway を中心に—. *生化学* **75**: 37-42, 2003
 - 24) **Wolff SP, Dean RT**: Glucose autoxidation and protein modification. *Biochem J* **245**: 243-250, 1987
 - 25) **Usui T, Hayase T**: Isolation and identification of the 3-hydroxyl-5-hydroxylmethyl-pyridinium compound as a novel advanced glycation end product on glyceraldehyde-related Maillard reaction. *Biosci Biotech Biochem* **67**: 930-932, 2003
 - 26) **Kawakishi S, Okawa Y, Uchida K**: Oxidative damage of protein induced by the Amadori compound-copper ion system. *J Agri Food Chem* **38**: 13-17, 1990
 - 27) **Koenig RJ, Peterson CM, Jones RE et al**: Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* **295**: 417-420, 1976
 - 28) **Arai K, Maguchi S, Fujii S et al**: Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase: Identification of the in vitro glycate site. *J Biol Chem* **262**: 16969-16972, 1987
 - 29) **Brownlee M, Vlassara H, Kooney A et al**: Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* **232**: 1629-1632, 1986
 - 30) **Picard S, Parsatharathy S, Fruebis J et al**: Aminoguanidine inhibits oxidative modification of low density protein and the subsequent increase in uptake by macrophage scavengers receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6876-6880, 1992
 - 31) **Hammes HP, Bownlee M, Edelstein D et al**: Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rats. *Diabetologia* **37**: 32-35, 1994
 - 32) **Soulis-Liparota T, Coper M, Papazoglou D et al**: Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocine-induced diabetic rats. *Diabetes* **40**: 1328-1334, 1991
 - 33) **Edelstein D, Brownlee M**: Mechanistic studies of advanced glycosylation endproduct inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* **41**: 26-29, 1992
 - 34) **堀川博朗, 岡田みどり, 中村裕子**: アマドリ化合物は Cu²⁺ との錯体を介して Fenton および non-Fenton の両反応によってヒドロキシルラジカルを生成する. *東女医大誌* **69**: 262-271, 1999
 - 35) **Horikawa H, Okada M, Nakamura Y et al**: Production of hydroxyl radicals and α -dicarbonyl compounds associated with Amadori compound-Cu²⁺ complex degradation. *Free radic Res* **36**: 1059-1065, 2002
 - 36) **堀川博朗, 岡田みどり, 中村裕子**: アマドリ化合物・Cu²⁺ 錯体形成阻害薬としてのアミノグアニジン. *東女医大誌* **72**: 97, 2002
 - 37) **Quian M, Liu M, Eaton JW**: Transition metals bind to glycated proteins forming redox active "glycochelates": Implications for the pathogenesis of certain diabetes complications. *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 385-389, 1998
 - 38) **Price DL, Rhett PM, Thorpe SR**: Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem* **276**: 48967-48972, 2001
 - 39) **Jakus V, Bauerova K, Ritbrock N**: Effect of aminoguanidine and copper (II) ions on the formation of advanced glycosylation end products in vitro study on human serum albumin. *Arzneimittel-Forschung* **51**: 280-283, 2001