

AGE 蓄積における酵素的作用の解析とそのフラボノイドによる調節

(課題番号 14560090)

平成 14 年度～平成 16 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 17 年 6 月

研究代表者 長澤孝志  
(岩手大学農学部農業生命科学科)

## 1. 緒論

厚生労働省の発表した平成14年簡易生命表によると、男性の平均寿命は78.32年、女性の平均寿命は85.23年と女性は世界で初めて85年を超え、男女ともに世界最高の水準を維持し続けている。65才以上の人口も全体の18%以上となり、このような状況下で我が国は、今まさに高齢化社会の到来を迎えている。他方、環境汚染や人間関係、都市空間生活の中でのストレス、あるいは食生活の欧米化や、偏食過食による免疫力の低下、生活習慣病の増加といった社会環境の変化は、我々の健康を蝕み、前述のように先進国の中でもトップクラスの平均長寿を誇っていても、その実態は半健康的な「病氣予備軍」といわれる人々が増え続けているのが現状である。それに伴い、国民医療費、国民一人当たり医療費は、年々著しいペースで増加の一途をたどっており、厚生労働省の発表した平成13年度の国民医療費の総額は約31兆円、国民一人当たりの医療費は約246万円にのぼる。このような社会の負担を軽減するためには、高齢を迎える人々が自分で自分の健康を管理して病気になることが少ない社会を目指すことが重要である。

糖尿病は40歳代後半から急増し、70歳代後半がピークとなる代表的な生活習慣病であり、平成14年に厚生労働省が実施した糖尿病実態調査によって、糖尿病が強く疑われる人は約740万人、糖尿病の可能性を否定できない人を合わせると約1,620万人と推計された。これは、成人のおよそ16%に相当する。また、平成9年度の調査での推計は1,370万人であったことから、この5年間で250万人も増加したことになり、日本人の生活様式の欧米化や人口の高齢化とともに、糖尿病患者は増加の一途をたどっていることが伺える。糖尿病は、心筋梗塞や脳卒中といった現在の日本人の死亡率の上位を占める生活習慣病とは異なり、それを直接の死因とした死亡率は必ずしも高くないが、自覚症状が無いために発見、対処が遅れることが多く、糖尿病性網膜症、白内障（失明）、糖尿病性腎症（腎不全）、糖尿病性神経症（壊疽、アルツハイマー病）といった致命的な合併症を惹起し、糖尿病患者の生活の質をさらに低下させる国民的な健康問題となっている。

糖尿病により引き起こされる合併症の一因として、糖尿病患者の高血糖状態

下において脂質、核酸、タンパク質がグルコース等の還元糖と非酵素的な縮合反応を起こす [1] ことが知られている。この反応は、1912年に Maillard がビールの黄褐色は原料中のアミノ酸やタンパク質と糖の間で起きる非酵素的化学反応の産物であることを明らかにしたことから [2]、発見者の名前にちなんでメイラード反応と呼ばれた。メイラード反応は、食品の加工、貯蔵の際に起こる褐変反応として色、香り、その他の品質の形成、変化に大きな影響を及ぼすことから、当初は主に食品化学分野で広く研究されていた。しかし、1968年にヘモグロビン $\beta$ 鎖のN末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位産物としてHbA<sub>1c</sub>が生体から同定され [3]、さらに1984年にAGE化タンパク質の特徴の1つである蛍光性物質(励起波長:370 nm、蛍光波長:440 nm)が、脳硬膜のコラーゲンに加齢に伴って蓄積し、その糖尿病患者の蓄積が健常人よりも有意に高値であることが示された [4] ことから、タンパク質の非酵素的糖化反応は医化学分野で大きく注目されるに至った。

医化学分野では、メイラード反応は、酵素的にタンパク質に糖を付加するグリコシレーション (glycosylation) と区別してグリケーション (glycation) と呼ばれる。グリケーションは大概すると前期反応 (Early stage of glycation)、中期反応 (Intermediate stage of glycation) および後期反応 (Advanced stage of glycation) に分けられる。その概略を Fig. 1-1 に示す [5]。前期段階は、アミノ酸のN末端アミノ基やリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基の窒素が還元糖のカルボニル基の炭素に求核的に反応するアミノ-カルボニル反応を起こし、脱水縮合を経てシッフ塩基を形成する。中期段階で、シッフ塩基は不安定な構造であるためグルコシルアミノ化合物からアマドリ転移を起こし比較的安定した1-デオキシ-2-ケト型の構造を持つアマドリ転位化合物を形成する。前期、中期段階生成物の多くは、生体内でその存在が確認されており、HbA<sub>1c</sub>、フルクトサミンは糖尿病の臨床マーカーとして用いられている。また、グルコースと生体タンパク質の反応したアマドリ転位化合物であるN<sup>ε</sup>-fructoselysine は加齢 [6] や糖尿病態 [7] によって増加がすることが明らかにされている。

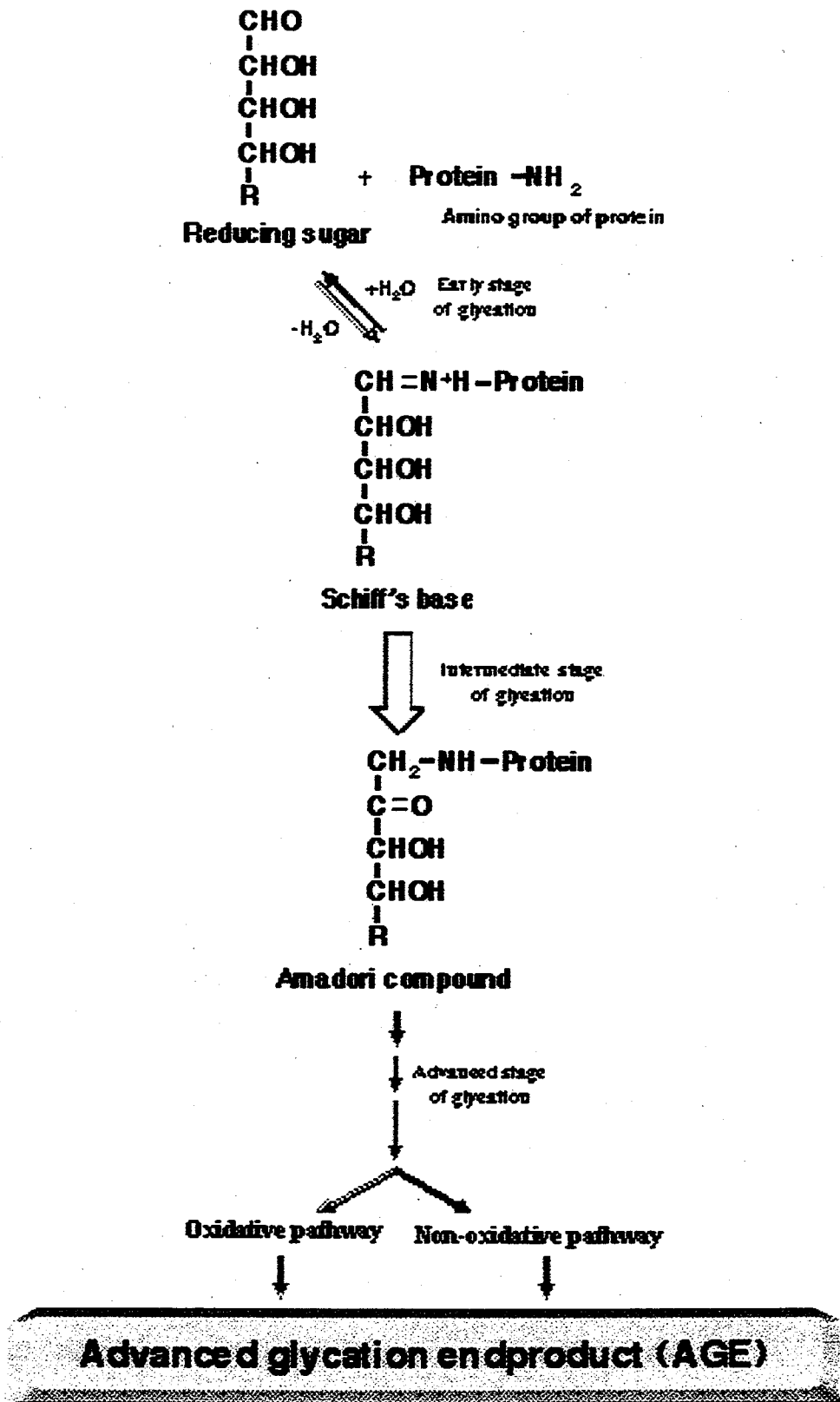


図 1-1 糖とタンパク質によるグリケーション反応の概略

アマドリ転位化合物は、酸化・脱水・縮合・開裂などの複雑な反応を経て褐色・蛍光・架橋形成などの物理化学的特徴を有するグリケーション後期段階生成物 (advanced glycation endproduct : AGE) へと変化する。シッフ塩基は加水分解により可逆的に糖とアミノ化合物に戻りうるが、アマドリ転位以後は普通非可逆反応である。また、シッフ塩基の開裂 [8]、グルコースの自己酸化 [9]、脂質の過酸化 [10]、ポリオール経路による細胞内の糖代謝 [11] などからグリオキサール、メチルグリオキサール、グリコールアルデヒド、3-デオキシグルコソン (3-DG)、グルコソン等のグルコースに比較して非常に高い反応性を示す  $\alpha$ -ジカルボニル化合物が生成し、グリケーションの惹起物質としてタンパク質の AGE 化に深く関与することが近年注目を浴びている [12] (Fig 1-2)。

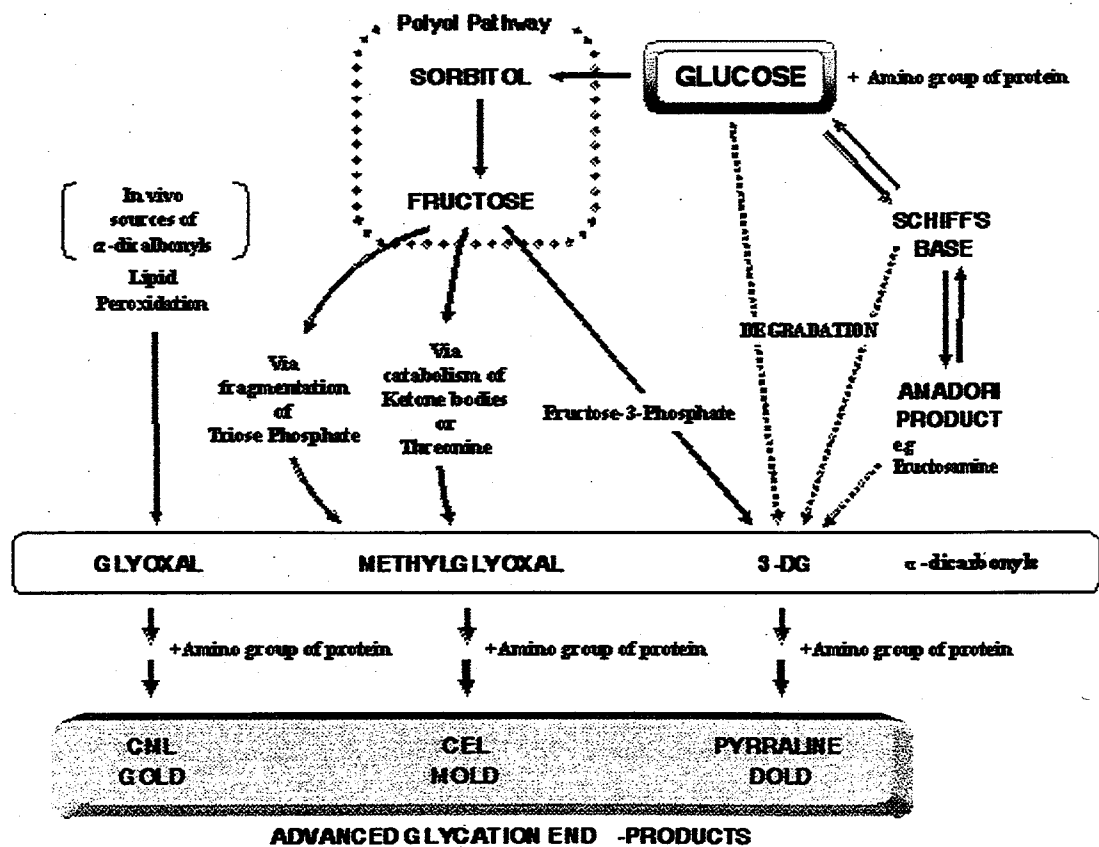
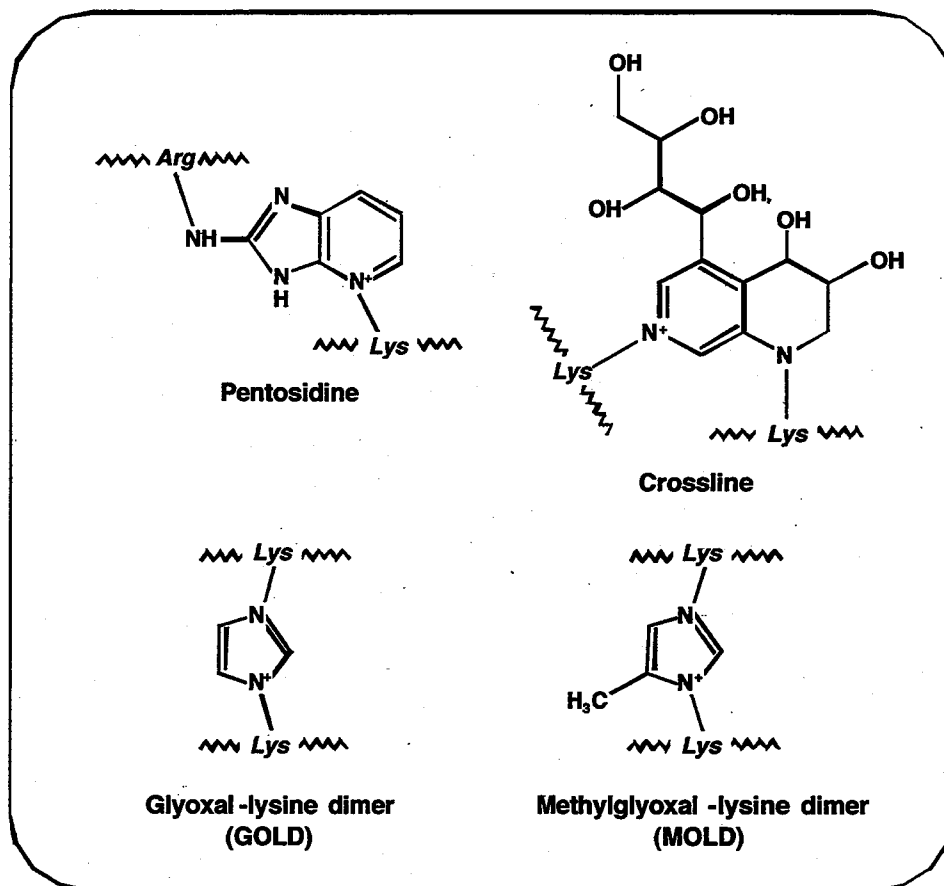


図 1-2  $\alpha$ -ジカルボニル化合物を中心としたグリケーション

現在、生体に存在する AGE 構造として蛍光性・架橋性を有する Pentosidine、Crossline、Glyoxal-lysine dimer (GOLD)、Methylglyoxal-lysine dimer (MOLD)、非蛍光性・非架橋性として  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine (CML)、 $N^{\epsilon}$ -(carboxyethyl) lysine (CEL)、Pyrraline、Imidazolone などが知られている (Fig. 1-3)。Pentosidine はペントースと等モルのリジン、アルギニンが架橋した構造を有し、酸加水分解に安定な蛍光性物質である。加齢や糖尿病の発症に関して人の皮膚に蓄積することが知られ [13]、特に糖尿病の発症や末期の腎症において増加することが報告されている [14]。Crossline は二つのリジン残基を 2 分子のグルコースが架橋した構造を持ち、糖尿病性腎症患者の赤血球膜タンパクに検出されている [15]。GOLD、MOLD は 2 分子のリジンがグリオキザールあるいはメチルグリオキザールによって架橋された構造を有しており、両者とも、尿毒症患者の血清に検出されている [16]。CML は量的に主要な AGE 構造体であると考えられており、加齢に伴いヒトのレンズクリスタリンや皮膚コラーゲンに蓄積することが報告されている [17-19]。また、脂質の過酸化反応からも生成することが報告されており [10]、生体における酸化の指標としても注目されている。CEL はメチルグリオキザール由来の AGE 構造体として、ヒト水晶体タンパク質に加齢に伴って蓄積することが報告されている [20]。Pyrraline はアマドリ転位化合物から発生する 3-DG がタンパク質中のリジン残基と反応して生成するものと考えられており、ヒト血清中におけるピラリンの存在が免疫化学的に確認されている [13, 21, 22]。Imidazolone は、3-DG あるいはメチルグリオキザールがタンパク質のアルギニン残基と反応して生成する。3-DG 由来 imidazolone は、糖尿病患者の腎臓および粥状動脈硬化病巣の特に内膜と中膜に蓄積していることが示されている [23]。

Fluorescent/ Crosslinked



Non-fluorescent/Non-crosslinked

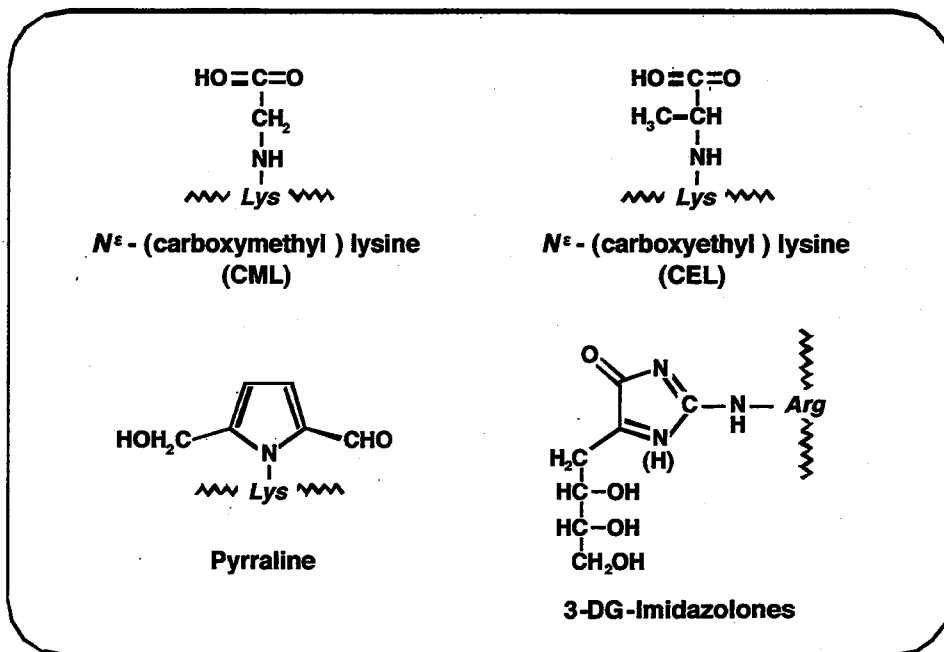


図 1-3 生体から同定された AGE 構造体

これら AGE は、生体の多くの組織において加齢に依存して蓄積すること、また、これら AGE 蓄積が糖尿病合併症や動脈硬化などの血管疾患で有意に増加することが数多く報告されており、糖尿病合併症の発症、進展を説明するものとして AGE の研究が進められている。糖尿病患者の AGE 蓄積は健常者に比べて顕著な増加を示し、水晶体クリスタリンでの AGE 蓄積が糖尿病性白内障の原因になること [24] や、腎組織の AGE 蓄積が糖尿病性腎症に関連すること [25]、また、アルツハイマー病などの老年性疾患においても AGE 蓄積がその要因に考えられている [26]。いずれもタンパク質の代謝回転が低下することや、AGE 化によってタンパク質が本来の機能を失うことが疾患の原因と考えられている。

このように、糖尿病態時に高血糖がもたらす生体への影響は、実に複雑かつ多岐にわたる。さらに、並木ら [27] は、リボースと血清アルブミンの反応初期にフリーラジカルが生成することを ESR によって確認しており、グリケーションが重金属イオンや酸素の関与無しに容易にフリーラジカル化合物を生成し、このラジカル化合物が酸素と反応して活性酸素を生成し、また他のラジカル化合物とも反応する可能性を示唆しており、グリケーション反応の過程において酸化ストレスが発生することを示した。生体系ではグリケーション反応に加えフリーラジカルによる酸化ストレス障害が同時に進行していると考えられ、糖尿病態やそれに伴う糖尿病合併症の進展と、酸化ストレスとの関連性を示す研究の蓄積は数多くなされてきた。[28, 29]。

以上の観点から AGE の蓄積を防止するためには、前期段階および後期段階の反応を阻害することが重要である。後期段階に関しては、活性酸素が関与する系も存在することから、抗酸化的な阻害も考えられる。一方、極めてアミノ基と反応しやすく、容易に AGE を生成するジカルボニル化合物の生成を阻害することも蓄積防止のターゲットとなる。さらにジカルボニル化合物の分解も考慮に入れる必要がある。これらは、酵素的に制御されている。蓄積した AGE の除去も重要なファクターである。

細胞内タンパク質の分解は、プロテアーゼが担っている。プロテアーゼには多くの種類が存在し、消化酵素のように基質特異性が低いものから、シグナル伝達系やタンパク質のプロセッシングに関わるプロテアーゼのように厳密な基



質特異性をもつものまで存在する。細胞内タンパク質をアミノ酸まで分解する系としては、オートファジー-リソソーム系とユビキチン-プロテアソーム系が知られている。細胞が飢餓状態となると、細胞内のオルガネラや細胞質成分をオートファゴソームが取込み酸性化した後、リソソームと融合し、タンパク質が分解される。リソソームに含まれるプロテアーゼとしては、カテプシン B, カテプシン H, カテプシン L などがあり、これらが基質タンパク質を最終的にアミノ酸までに加水分解する。プロテアソームは一つの酵素タンパク質でトリプシン様活性, キモトリプシン様活性などを数種のプロテアーゼ活性を有する高分子量の多機能プロテアーゼで、タンパク質をオリゴペプチドまでに分解する。プロテアソームは、ユビキチンが ATP 依存的に基質タンパク質のリシン残基に結合したタンパク質を特異的に分解する。プロテアソームによる分解系は、いくつかのタンパク質合成の調節因子の活性調節や、抗原抗体反応、細胞周期における役割などが注目されているが、アミノ酸プールの形成にも関与していると考えられている。それでは、AGE 化されたタンパク質の運命はどうなるのだろうか。

活性酸素で酸化修飾されたタンパク質は、分解されやすくなることが知られている。Davies らは、細胞を過酸化水素添加培地で培養すると、タンパク質の分解が速くなることを示した [60]。このとき、培地にプロテアソームの阻害剤を加えると分解が抑制されることから、酸化修飾されたタンパク質はプロテアソームにより分解されることが示唆された。過酸化水素濃度が高い培地で培養した場合には分解が逆に遅くなる。活性酸素などによるタンパク質の非酵素的酸化修飾では、修飾が進むと架橋反応がおこる。したがって、過剰に就職されたタンパク質は分解されにくくなるが、穏やかな酸化ストレスでは、酸化修飾タンパク質はプロテアソームで分解され、系から除去され、細胞を正常な状態に保つと考えられている。しかし、AGE 化されたタンパク質の分解についてはほとんど知見がない。腎臓などの多くの細胞では、スカベンジャーレセプターが発現している。その中には、AGE を認識するレセプター、RAGE がある。これに結合した AGE は、酸化 LDL と同様にマクロファージで分解されることが報告されている [46]。AGE 化されたタンパク質はプロテアソームで分解されるのかどうかについては、未だ知見がない。分解できなかった AGE タンパク質は細

胞内外に蓄積されることになる。

食品からの抗酸化物質の摂取は、体内の抗酸化能力を高め、活性酸素が関与している疾病の発症を抑制できる可能性がある。特に、近年、野菜や果物など植物由来の食品に含まれる多価フェノール性分子、いわゆるポリフェノール類の抗酸化活性が注目されている。ポリフェノールは、芳香族炭化水素の2個以上の水素がヒドロキシル基で置換された化合物の総称で、植物界に広く分布するフラボノイド化合物やその重合体であるタンニンもポリフェノールに属する。主なポリフェノールの分類と、構造を Fig. 1-4 に示した。お茶に多量に含まれるカテキン類をはじめ、ワインに含まれるアントシアニン、レモンに含まれるエリオシトリン、ソバに含まれるルチン、大豆に含まれるイソフラボンなど、ポリフェノールは一般的に食べられる食品に広く含まれている。食品中に含まれるポリフェノールの生体における抗酸化作用については、すでに多くの研究蓄積がある [35-37]。また、*In vitro* の実験において、ポリフェノール類が  $O_2$  やヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) を消去する [38, 39] ことや、フェントン反応によって過酸化水素からの  $\cdot OH$  生成を触媒する鉄などの遷移金属イオンをキレートする [40] ことから、この2つの作用が生体内でポリフェノール類が抗酸化作用を示す主要な要因と考えられている。これらポリフェノールはグリケーションにたいしても阻害的作用を示す可能性が考えられる。グリケーション後段階における活性酸素の関与する反応においては、直接的に抗酸化的にポリフェノールがさようするだろうし、また酵素が関与する部分ではタンパク質レベルや遺伝子レベルで作用する可能性がある。

フラボノイドを含むポリフェノール類はごく日常の食事の中にも多種多様な形態で含まれており、ヒトでは食品成分として1日に数十から数百ミリグラムを摂取しているの見積もられている [41]。毎日の食生活で摂取するポリフェノールの生体内での抗酸化作用、抗グリケーション作用を明らかにし、タンパク質のグリケーションから誘起される糖尿病合併症をはじめとした生活習慣病や老齢関連疾患の進行を抑制する可能性を示すことは、医療機関に掛かることのない健康な身体づくりを毎日の食生活から提案し、高齢を迎えた際の健康状態による肉体的、精神的負担を和らげ、ひいては毎年増大を続ける国民医療費

に歯止めをかけ、社会負担を軽減する一助になるのではないだろうか。

#### 研究組織

研究代表者 : 長澤孝志 (岩手大学農学部農業生命科学科)

研究分担者 : 伊藤芳明 (岩手大学農学部農業生命科学科)

#### 交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,300	0	2,300
平成 15 年度	1,100	0	1,100
平成 16 年度	800	0	800
総計	4,200	0	4,200

#### 研究発表

##### (1) 学会誌等

Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Nishizawa N, Aiba Y and Kitts DD, Inhibition of glycation reaction in tissue protein incubations by water soluble rutin derivative. *Mol. Cell. Biochem.* **249**: 3-10 (2003)

Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Aiba Y, Nishizawa N and Kitts DD, Dietary G-rutin suppresses glycation in tissue proteins of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* **252**: 141-147 (2003)

##### (2) 口頭発表

長澤孝志、田端信晶、葛生佳月、相羽洋一、伊藤芳明、西澤直行. 糖尿病ラットにおける G-ルチンおよび G-ヘスペリジンによる組織タンパク質のグリケーション抑制. 第 10 回生体パーオキシド研究会、平成 14 年 8 月 24 日

澤井秀幸、高橋良子、小浜恵子、伊藤芳明、西澤直行、長澤孝志. ヤマブドウ抽出物の抗グリケーション活性. 第 57 回日本栄養・食糧学会大会、平成 15 年

5月19日

小浜恵子、岸敦、米倉裕一、澤井秀幸、長澤孝志. ヤマブドウ (*Vitis coignetiae*) 抽出物の抗グリケーション活性と抗酸化性. 第50回食品科学工学会大会、平成15年9月13日

長澤孝志、葛生佳月、田端信晶、貴戸武利、伊藤芳明、西澤直行. ルチンとヘスペリジンのグリケーション抑制活性の比較. 日本農芸化学会東北支部第138回大会、平成15年10月12日

長澤孝志、澤井秀幸、藤本智昭、伊藤芳明、西澤直行、山口佑子、岸敦、小浜恵子. ヤマブドウ低分子ポリフェノールのAGE生成阻害作用. 第51回食品科学工学会大会、平成16年9月3日

(3) 出版物 なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

平成17年度に出願予定

## 2. AGE 生成に及ぼすルチンの影響

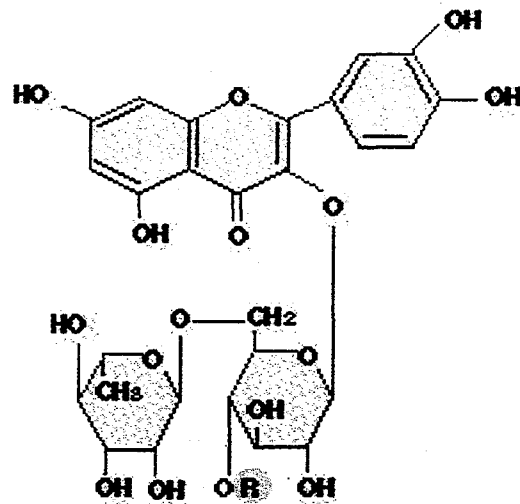
### 2.1. 目的

活性酸素に対する生体の防御機構の一つに、活性酸素消去能がある。このシステムには、SOD、GPx、CAT などの抗酸化酵素の他、 $\alpha$ -トコフェロール、アスコルビン酸などの抗酸化物質が関与している。しかし、抗酸化酵素の活性は、組織にもよるが加齢やストレスによって低下することが知られ、それに伴い活性酸素由来の様々な疾病に対するリスクが増加すると考えられる。

一方で、グリケーションは、タンパク質を取り巻くグルコース濃度に依存した化学反応である。そのため、血糖値が上昇する糖尿病では、各種組織のタンパク質のグリケーションが高まっていることが知られている。グリケーションによる AGE の生成は長時間を要する。従って、AGE の蓄積は、代謝回転の遅いタンパク質に起こりやすいと考えられる。例えば、水晶体レンズタンパク質は代謝回転がほとんどなく、グリケーションによる AGE の蓄積が起こると結果として白内障を生じるといわれている。また、糖尿病性腎症の発症・進展には、糖化タンパク質による細胞機能の変異、グリケーション過程で生じる活性酸素などが関与するという報告がある [28, 29]。

体内の活性酸素消去能を高めるために、食品からの抗酸化物質の摂取が期待されているが、近年、その中でも特に強い抗酸化性を示す植物由来のフラボノイド類や、フェノール性分子が注目を集めている。フラボノイドの一種で、天然に存在するルチンもグリケーションの抑制効果があると報告されている [2]。さらに、ルチン (図 2-1) は、*in vitro* の実験で、OH $\cdot$  や O $_2^-$  消去能を示し、また、H $_2$ O $_2$  からの OH $\cdot$  の生成を強く触媒する鉄をキレートすることが確認されている。また、G-ルチン (図 2-1) は、ルチンの水溶性グルコース誘導体であり、ルチンや他のポリフェノール類より親水性が高く、また溶解時に無味無臭であることから、抗酸化作用を示す食品添加物としての利用が期待されている。したがって、生体内における G-ルチンの抗酸化性は、他のフラボノイドより効果的に作用する可能性が考えられる。

そこで本研究では、ラットにストレプトゾトシンを投与して糖尿病態とし、通常食および G-ルチンを 0.2% になるように添加した飼料を 1 ヶ月間摂取させ



R=H : ルチン

R=Glucose : G-ルチン

図 2-1 ルチンと G-ルチンの構造

た。そして、抗 AGE モノクロナール抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて、糖尿病ラット組織タンパク質の AGE を検出し、G-ルチン摂取が及ぼすグリケーションの抑制効果を検討した。さらに、グリケーションによって生成される  $N\epsilon$ -fructoselysine を HPLC で定量し、生体内における AGE 生成に与える影響を検討した。また、骨格筋、腎臓のタンパク質中のカルボニル基量を測定し、TBA (チオバルビツール酸) 法で過酸化脂質を測定することで、G-ルチン摂取が組織タンパク質の酸化修飾に及ぼす影響を検討した。

## 2.2. 方法

### (1) 実験動物

実験動物は、5 週齢の Wistar 系雄ラット (110~130g : 日本クレア株式会社 : 東京) 26 匹を用いた。ラットは個別のステンレスケージに入れ、室温  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50\% \pm 10\%$  に保ち、午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間の明暗サイクルで飼育した。予備飼育期間中は固形飼料 (ラット、マウス用固形試料 F-2 : 船橋農場) と水道水を自由摂取させた。5 日間の予備飼育後、平均体重がほぼ等しくなるように 5~8 匹ずつ C、DC、R および DR 群の 4 群に分け、実験飼料と

水道水を自由摂取させた。実験飼料は、C群とDC群にはAIN 76に準じた20%カゼイン飼料、R群とDR群には20%カゼイン飼料にG-ルチンを0.2%になるように加えたG-ルチン添加飼料を与えた。DCおよびDR群のラットは、飼育5日目にストレプトゾトシン（和光純薬工業株式会社：大阪）を体重1kg当たり60mgになるように腹腔内注射し、糖尿病態にした。1ヶ月間飼育したあと、ラットをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈からヘパリン処理した注射器で採血後屠殺し、血清、腓腹筋、肝臓、腎臓を摘出した。摘出した血清、腓腹筋、肝臓、腎臓は、液体窒素で速やかに凍結し、 $-85^{\circ}\text{C}$ で分析まで保存した。

### (2) 組織タンパク質の酸化修飾の評価

組織（腓腹筋、腎臓）約100mgにMQ水3mlを加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした（ダイアル4、20秒）。このホモジネート溶液を1mlずつ3本の試験管に分注し、2本に2mlの10mM DNPH / 2.5N 塩酸を、残りの1本には盲検として2mlの2.5N 塩酸を加え、室温で遮光した状態で1時間反応させた。反応後、冷20%TCAを2ml加え、氷冷しながらさらに30分反応させた。その後、 $3,550\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離し上清を取り除いて沈殿を得た。この沈殿を2mlの50% (v/v) 酢酸エチル / エタノールを加えて攪拌し、 $3,000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で10分間遠心分離して遊離のDNPHと脂質を取り除いた。この洗浄を3回繰り返した後、沈殿に6M グアニジン塩酸塩 / 20mM リン酸二水素カリウム (pH 2.3) を2ml加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で10分間のインキュベーションを行い、沈殿を溶解させた。最後に、 $3,550\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で15分間遠心分離し、上清の370nmにおける吸光度を分光吸光度計UV-1200（島津製作所：京都）で測定した。カルボニル基含量は、DNPHの分子吸光係数 $22,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて計算し、組織タンパク質1mg当たりで表した。

### (3) 組織タンパク質中の過酸化脂質の測定

TBA法は、生体試料の脂質過酸化生成物の測定法として広く用いられている。これは、過酸化脂質の分解によって生成されるマロンジアルデヒド (MDA) を、チオバルビツール酸 (TBA) と反応させ、チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) として定量する方法である。組織中の過酸化脂質の定量はTBA法

で行った。

#### (4) 前期段階生成物 (N $\epsilon$ -fructoselysine) の定量

組織(腓腹筋、腎臓)約100mg、血清1mlを遠心管にとり、50% (w/v) TCA1mlを加え、19,800 $\times$ g (10,000rpm)、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。遠心分離後、50% (w/v) TCAを取り除き、ジエチルエーテル2mlを加え、19,800 $\times$ g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、乾燥させたものをタンパク質試料とした。タンパク質試料約5mgを加水分解用パイレックスガラス管(16 $\times$ 150、肉厚2mm)に精秤した。7.75N HClを2ml加えた後、真空ポンプにつなげるようにガスバーナーの炎でガラス管の先を細工した。メタノールバスで凍結後、脱気して封管し、110 $^{\circ}$ Cのブロックバスで24時間加水分解を行なった。放冷後開封し、水酸化ナトリウムと酸化リン存在下で減圧乾固した。これをMQ1mlに溶解した後に、エッペンドルフチューブに移し、19,800 $\times$ gで10分間遠心分離し、上清をHPLCの分析試料とした。HPLCのポンプはLC-6A(島津製作所)、検出器はSPD-6AV(島津製作所)を用い280nmで検出した。カラムはLiChrospher100RP18e、4.6 $\times$ 250mm(Merck)を用いた。移動相は15mM SDS-0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)/アセトニトリル=80/20、流速1.5ml/min、40 $^{\circ}$ Cで分離した。

#### (5) 抗AGEモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによるAGEの検出法

近年、AGE構造に対する特異抗体が開発され、免疫学的手法で生体組織におけるAGEの同定・定量が可能になった。特に、Horiuchiらが開発した抗AGEモノクローナル抗体は、後期段階段階生成物(AGE)全般を特異的に認識することができる。そこで本実験では、抗AGEモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングによりAGEを検出した。

10%のポリアクリルアミドゲルを用いて分離した後に、ニトロセルロース膜へ(0.2 $\mu$ m: Advantec: 東京)セミドライ式の電気泳動転写装置AE6675型(Atto: 東京)を用いて、通電条件を1cm $^2$ につき2mAで40分間通電し、転写した。転写終了後、ニトロセルロース膜をブロッキング液に浸し、4 $^{\circ}$ Cで一



晩ブロッキングした。次いで抗 AGE モノクローナル抗体 ((株)クマモト抗体研究所) と反応させ、さらに二次抗体としてペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG (Amersham : England) と反応させ、ECL 試薬 (Amersham : England) を用いて化学発光を X 線フィルムに感光させて検出した。

### 2.3. 結果

#### (1) 体重、飼料摂取量および血糖値

1ヶ月間の飼育で4群とも体重は増加し、最終日の体重はC、DC、R、DR群でそれぞれ  $345.5 \pm 11.5$  (g)、 $206.3 \pm 13.5$  (g)、 $342.7 \pm 5.5$  (g)、 $215.2 \pm 13.0$  (g) であった。糖尿病態であるDCおよびDR群では、CおよびR群と比較して低い値を示した。また、血糖値もそれぞれ  $173.9 \pm 2.8$  (mg/dl)、 $463.7 \pm 26.5$  (mg/dl)、 $179.2 \pm 5.5$  (mg/dl)、 $460.3 \pm 39.4$  (mg/dl) であり、糖尿病態であるDCおよびDR群では、CおよびR群と比較して高い値を示した。体重変化、飼料摂取量および血糖値にG-ルチン添加の影響は認められなかった。

#### (2) 腓腹筋、腎臓中のタンパク質カルボニル基量の変化

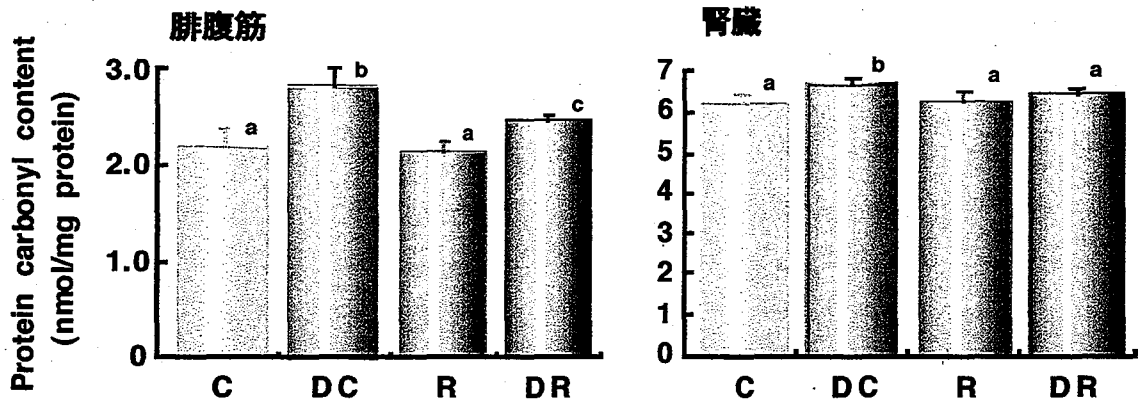
G-ルチン摂取が組織タンパク質カルボニル基量に及ぼす影響を図2-2に示す。タンパク質カルボニル基量は、タンパク質1mg当たりのDNP量で表した。

腓腹筋では、20%カゼイン飼料を摂取させたラットにSTZを投与し、糖尿病態にすることにより、タンパク質カルボニル基量は約30%増加したが、G-ルチンの摂取によりその増加が約60%有意に抑制された。

腎臓でも同様に、DC群では、C群に対してタンパク質カルボニル基量はわずかではあるが有意に増加した。G-ルチンを摂取させたDR群では、その増加が有意に抑制され、C群と同じレベルになった。

#### (3) 腓腹筋、腎臓中の過酸化脂質の変化

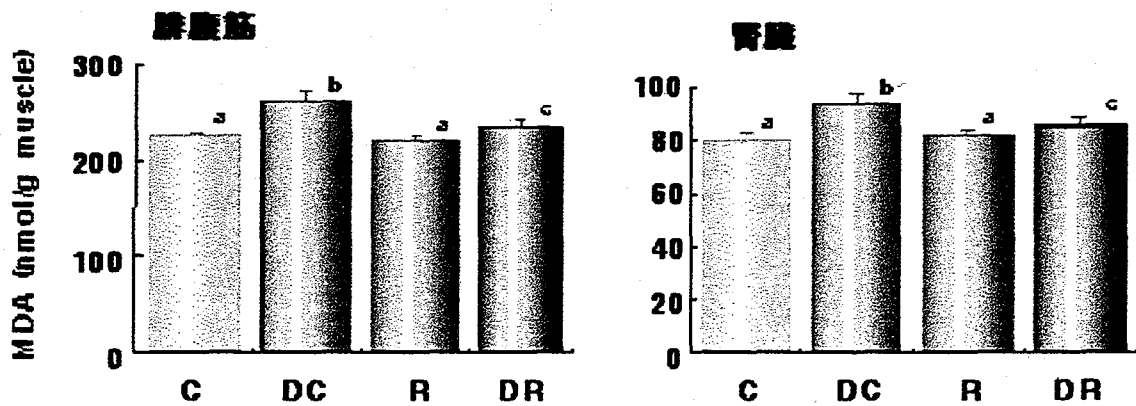
G-ルチン摂取が組織中の過酸化脂質の生成に及ぼす影響を図2-3に示す。腓腹筋では、20%カゼイン飼料を摂取させたラットにSTZを投与し、糖尿病態にすることにより、TBARSの生成は15%増加したが、G-ルチンの摂取によりその増加が約60%有意に抑制された。



C群：20%カゼイン飼料摂取 正常ラット群  
 DC群：20%カゼイン飼料摂取 糖尿病ラット群  
 R群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 正常ラット群  
 DR群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 糖尿病ラット群

値は、平均値±標準誤差 (n=5) 異なる記号間の有意差はp<0.05

図 2-2 G-ルチンを摂取した糖尿病ラット骨格筋と腎臓のタンパク質カルボニル基含量



C群：20%カゼイン飼料摂取 正常ラット群  
 DC群：20%カゼイン飼料摂取 糖尿病ラット群  
 R群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 正常ラット群  
 DR群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 糖尿病ラット群

値は、平均値±標準誤差 (n=5) 異なる記号間の有意差はp<0.05

図 2-3 G-ルチンを摂取した糖尿病ラット骨格筋と腎臓の過酸化脂質量

腎臓でも同様に、DC 群では DC および DR 群、C 群に対して TBARS の生成は約 20%増加したが、G-ルチンを摂取させた DR 群では、その増加が約 60%有意に抑制された。

#### (4) G-ルチン摂取が組織タンパク質の FL 生成に及ぼす影響

G-ルチン摂取が組織中の FL の生成に及ぼす影響を図 2-4 に示す。FL は、タンパク質 1mg 当たりの furosine 量で表した。

腓腹筋では、20%カゼイン飼料を摂取させたラットに STZ を投与し、糖尿病態にすることにより、FL の生成は顕著に増加したが (5.7 倍)、G-ルチンの摂取によりその増加が約 40%抑制された。

腎臓でも同様に、DC 群では、C 群に対して FL の生成は顕著に増加したが (6.3 倍)、G-ルチンを摂取させた DR 群では、その増加が 20%抑制された。

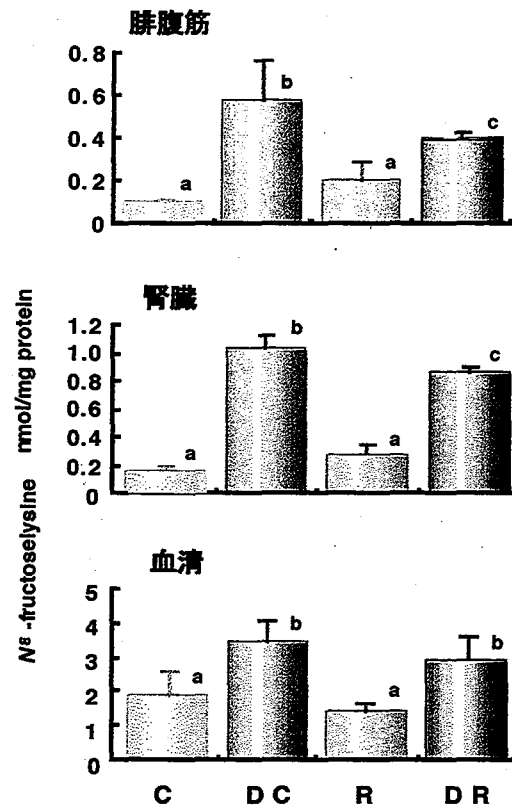
血清は、DC 群では、C 群に対して FL の生成は約 80%増加した。しかし、G-ルチンを摂取させた DR 群では、その増加が約 30%抑制される傾向が認められた。

#### (5) G-ルチン摂取が組織タンパク質の AGE 生成に及ぼす影響

各群の腓腹筋、腎臓および血清を SDS-PAGE (12%gel) で分離し、AGE の生成を抗 AGE モノクロナール抗体を用いたウェスタンブロッティングで検出した結果を図 2-5 に示す。腓腹筋では、アクチンと考えられる 45kDa のバンドでは、AGE の生成と G-ルチンによる抑制作用は各群で認められなかった。また、その他のバンドにおいても AGE の生成は認められなかった。

腎臓では、C 群に対して DC および DR 群でバンド (40~45kDa) が濃く現れ、AGE の生成が認められた。0.2%G-ルチンを摂取させた DR 群では、DC 群に対して AGE の生成は抑制される傾向が認められた。

血清では、C 群に対して DC および DR 群でバンド (31 および 66.2kDa) が濃く現れ、AGE の生成が認められた。0.2%G-ルチンを摂取させた DR 群では、DC 群に対して AGE の生成は抑制される傾向が認められた。その他のバンドにおける AGE の生成は、各群で認められなかった。



C群：20%カゼイン飼料摂取 正常ラット群  
 DC群：20%カゼイン飼料摂取 糖尿病ラット群  
 R群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 正常ラット群  
 DR群：0.2%G-ルチン添加飼料摂取 糖尿病ラット群

値は、平均値±標準誤差 (n=5) 異なる記号間の有意差は $p < 0.05$

図 2-4 G-ルチンを摂取した糖尿病ラットの骨格筋、腎臓および血清の Ne-フルクトースリジン含量

#### 2.4. 考察

酸化修飾の指標となるタンパク質カルボニル基および脂質中のチオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の増加は、糖尿病ラットの腓腹筋と腎臓において、0.2%G-ルチン飼料を摂取することにより有意に抑制された (Fig. 3)。特に、腓腹筋におけるその抑制効果は非常に高く、0.2%G-ルチン摂取により、糖尿病によるタンパク質カルボニル基および TBARS の増加をどちらも約 60%抑制した。このように、G-ルチンは *in vitro* の抗酸化作用だけでなく、糖尿病ラットにおいても、グリケーションによる酸化修飾タンパク質の生成にその作

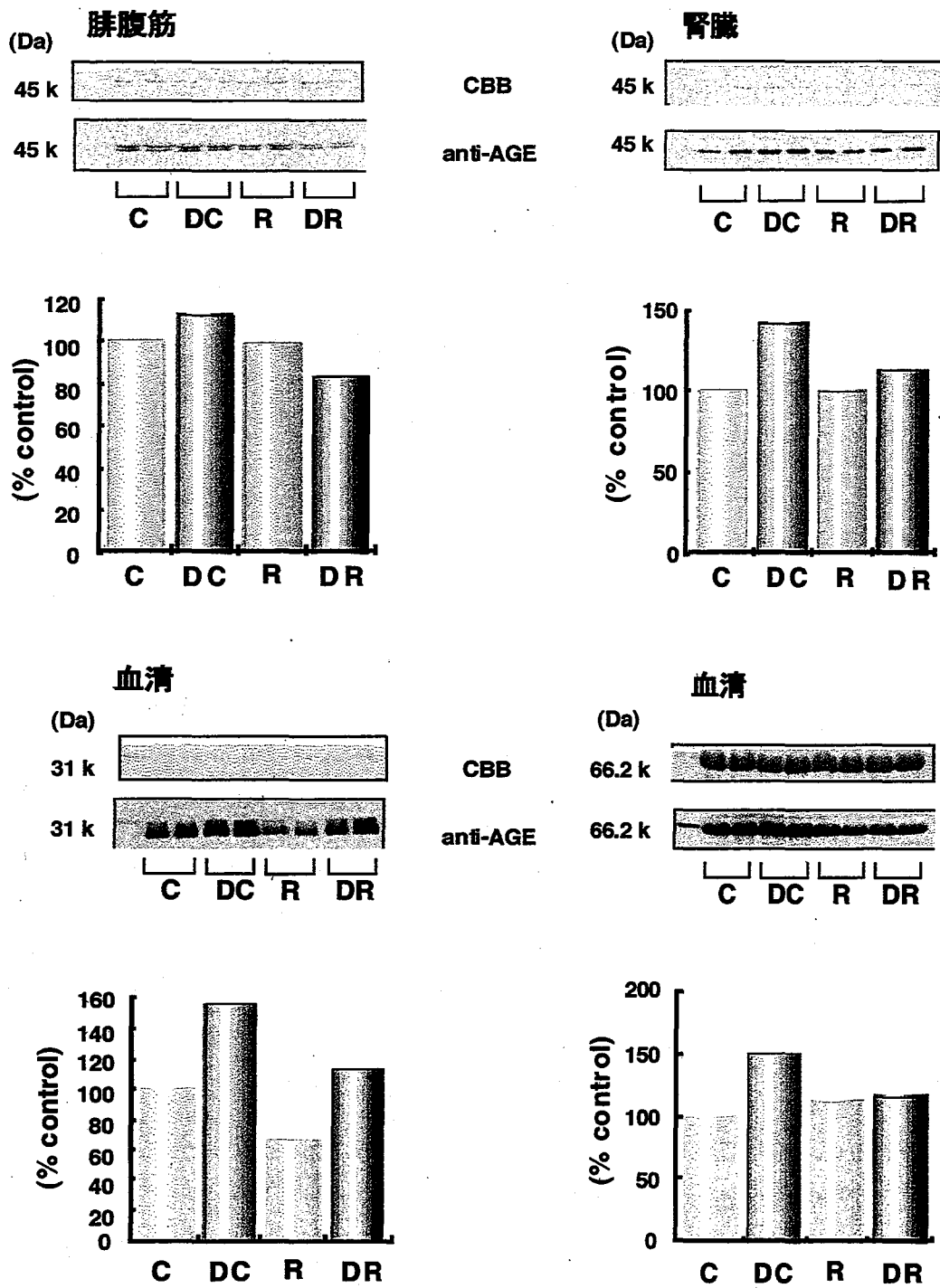


図 2-5 G-ルチンを摂取した糖尿病ラットの組織 AGE

用を発揮することが示された。

Casa ら [42] は、エタノール投与による胃障害に対するルチンの抗酸化作用を報告している。エタノールを投与する 2 時間前に、ラットにルチンを体重 1kg 当たり 200mg 投与し、ルチン投与 1 時間後の TBARS や様々な抗酸化酵素を測定している。その結果、ルチンは、エタノール投与により引き起こされる TBARS の増加を有意に抑制し、さらに、抗酸化酵素の一種である GPx 活性を顕著に増加させる作用があることを報告している。Sajithlal ら [43] は、糖尿病ラットにウコンなどに含まれているクルクミン (curcumin) を体重 1kg 当たり 200mg になるように経口投与し、クルクミン摂取が糖尿病においてどのような影響を及ぼすのかについて検討している。その結果、クルクミンを摂取した糖尿病ラットでは、過酸化脂質を顕著に抑制し、また、糖尿病により減少した生体内のビタミン C およびグルタチオン (GSH) もクルクミン摂取により回復することを報告している。このことから、酸化ストレス状態において、ルチンや G-ルチンは、それ自体の抗酸化作用だけでなく、生体内におけるグルタチオン (GSH) 関連酵素の活性および量にも影響を与えることが考えられる。

活性酸素障害に対する生体防御機構において、抗酸化物質は抗酸化酵素とともに重要な役割を担っている。抗酸化物質には、比較的低分子の活性酸素消去剤 (quencher) や捕捉剤 (scavenger) 以外にも高分子の金属結合タンパクなどが含まれる。生体内で作用する低分子の抗酸化物質には、尿酸やビリルビンなどのように生合成されるものと、ビタミン C、ビタミン E およびフラボノイドのように生合成されず、食品として摂取に依存するものが存在する。

フラボノイドは、 $O_2^-$  を捕捉消去することにより予防型抗酸化剤として作用する可能性がある。Jovanoic ら [44] は、pH10 において、フラボノイドと  $O_2^-$  との反応速度定数は  $3 \times 10^2$  から  $5.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、フラボノイドのなかでもケルセチンやルチンの活性が高いことを報告している。また、ケルセチンやルチンなどのフラボノイドは金属キレート作用を示すことから、その作用も予防型抗酸化剤としての機能に寄与することが考えられる。さらに、フラボノイドは、ペルオキシラジカル ( $ROO\cdot$ ) と反応するため、連鎖切断型抗酸化剤としても作用する可能性がある。しかし、フラボノイドとペルオキシラジカルとの反応速度定数は、ビタミン E の 10 分の 1 かそれ以下であること、

また、フラボノイドは生体膜内部には取り込まれず、むしろ水相の膜表面近傍に存在することが明らかとなっている。Terao ら [45] は、リポソーム膜を水溶性ラジカル発生剤に曝露すると、ビタミン E より先にフラボノイドが消失し、その後、脂質過酸化物が蓄積することを示している。したがって、G-ルチンなどのフラボノイドの抗酸化活性が発揮されるのは、生体膜内部ではなく界面であり、フラボノイドはビタミン E とは異なる位置においてラジカルを効果的に捕捉することが考えられる。

また、本実験では、組織タンパク質の酸化修飾を評価する際、カルボニル基の増加を比色法で測定したが、この方法は、特異性が低く、核酸の影響を受けるといわれている。抗 DNP 抗体を用いたカルボニル基の検出は、核酸の影響はなく、タンパク質のカルボニル基を直接検出できる利点がある。さらに、組織を構成している個々のタンパク質の酸化に対する感受性を検討することができ、酸化修飾による組織の機能の変化を解明する上で大きな手がかりになると考えられる。

次に、糖尿病のような高血糖状態において、G-ルチン摂取がグリケーションによるマドリ転移化合物 (N $\epsilon$ -fructoselysine : FL) および AGE の生成に及ぼす影響について検討した。20%カゼイン試料を摂取させた糖尿病ラット群 (DC 群) では、各組織 (腓腹筋、腎臓、血清) において FL の生成は増加し (Fig. 3- ), その生成量は、血清 > 腎臓 > 腓腹筋の順で高かった。AGE の生成に関しては、腎臓および血清でその増加が認められたが (Fig. 3)、腓腹筋では、糖尿病による AGE の生成は認められなかった (Fig. 3)。したがって、糖尿病による組織中の FL および AGE 生成の違いには、血液中では高血糖によりグリケーションが活性化していたが、腓腹筋では血液中と比較してグリケーションが進展していないことが考えられる。

糖尿病ラットの腎臓では、腎臓タンパク質自体がグリケーションにより AGE 化されただけでなく、血液およびその他の組織中の AGE 化タンパク質が除去・排泄される過程において腎臓に蓄積したことが考えられる。腎臓のメサングウム細胞膜上には、AGE 受容体が存在し、AGE の取り込みおよび分解機能をもつことが明らかとなっている [46]。AGE 受容体には、マクロファージスカベンジャー受容体 A (MSR-A)、galectin-3、RAGE (receptor for AGE) などがあり、

メサンギウム細胞だけでなく血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝類洞クッパー細胞などにも存在する。しかし、組織における AGE 受容体を介した AGE 化タンパク質の取り込みは、様々な細胞現象を誘発することが知られている。例えば、TGF- $\beta$  (transforming growth factor - $\beta$ ) は、細胞増殖・分化および細胞外基質産生の促進作用を有するサイトカインであり、腎臓においては細胞外基質産生の調節に関与している。Throckmorton ら [47] は、メサンギウム細胞において、終末糖化産物が TGF- $\beta$  の作用により収縮したコラーゲン (間質型 III 型コラーゲン) の生成を促進することや、*in vivo* において、アルブミン終末糖化産物により糸球体肥大および糸球体の IV 型コラーゲン、TGF- $\beta$  の遺伝子発現が増強していることを報告している。本章では、グリケーションにおける血管壁の損傷については検討していないが、高血糖が直接反映するであろう血管壁や腎臓などの組織における AGE 化タンパク質の蓄積は、サイトカイン放出や細胞の異常増殖を引き起こし、組織構成細胞の機能変異による糖尿病合併症の発症・進展に関与していることが考えられる。

一方で、0.2%G-ルチン添加飼料を摂取させた糖尿病ラット群 (DR 群) では、DC 群に対して、腓腹筋および腎臓で増加した FL の生成をわずかではあるが有意に抑制した (Fig. 3)。*In vitro* において、20mM グルコース存在下での骨格筋タンパク質のグリケーションでは、G-ルチンの添加により FL の生成をインキュベーション 3 日目では抑制する傾向が認められたが (Fig. 2)、インキュベーション 5 日目では、FL の生成を抑制する作用は認められなかった。初期段階のグリケーション過程における G-ルチンによる FL 生成の抑制には、タンパク質のアミノ基など修飾されやすい部分を保護する作用によるものと考えられる。われわれは、鉄ニトリロ三酢酸 (FeNTA) を投与し、ラジカルを発生させたラットの修飾タンパク質を抗 DNP 抗体を用いて検出し、G-ルチン摂取によるその抑制作用を検討している。その結果、FeNTA の投与によりアクチン、ミオシンおよび分子量 30~40kDa 付近のタンパク質が修飾されることを示している。この結果は、タンパク質の種類により活性酸素に対する感受性が異なることを意味し、筋原線維の主要な構成成分であるアクチンやミオシンも活性酸素によって修飾されやすいことを示している。また、FeNTA の投与により増加したバンドが、G-ルチンの摂取により抑制されることを示している。FeNTA 投与によ



るラジカルの発生と非酵素的なタンパク質糖化反応とは、タンパク質に対するその修飾作用機序は異なるが、その反応により生成される DNP 化タンパク質および FL などの修飾タンパク質が、G-ルチン摂取により抑制されることが明らかになっている。したがって、G-ルチンは、初期段階のグリケーション過程において、タンパク質のアミノ基など修飾されやすい部分を保護することにより、FL の生成を抑制し、それ以降のグリケーション反応を遅延する可能性が示唆される。

### 3. $\alpha$ -ジカルボニル化合物の蓄積に及ぼすフラボノイドの影響

糖尿病合併症の原因となる AGE 生成には反応性の高い $\alpha$ -ジカルボニル化合物である、glyoxal、methylglyoxal、3-deoxyglucoson (3-DG) といったグリケーション反応中間体が生成することが知られている。In vitro での生理的な条件下で、グルコースとタンパク質を反応させると、3-DG が生成する。3-DG は、タンパク質のリジンと反応し、ピラリンやペントシジンといった AGE を生成し、これら AGE が糖尿病性腎症患者の腎臓に蓄積していることが報告されている。また、free の 3-DG 自体が直接血管壁構成細胞に作用する可能性も示唆されており、3-DG と糖尿病血管合併症の係わりも注目されている。

糖尿病合併症である、糖尿病性網膜症、糖尿病性網膜症および糖尿病性神経障害が引き起こされる病因の一つに、ポリオール経路の活性化が挙げられる。ポリオール経路は、高血糖状態において活性化される、アルドース還元酵素 (Aldose reductase : AR) を律速酵素とする経路である (図 3-1)。ポリオール経路では、グルコースは AR によりまずソルビトールに変換され、ソルビトールはソルビトール脱水素酵素 (Sorbitol dehydrogenase : SDH) により、フルクトースに変換される。

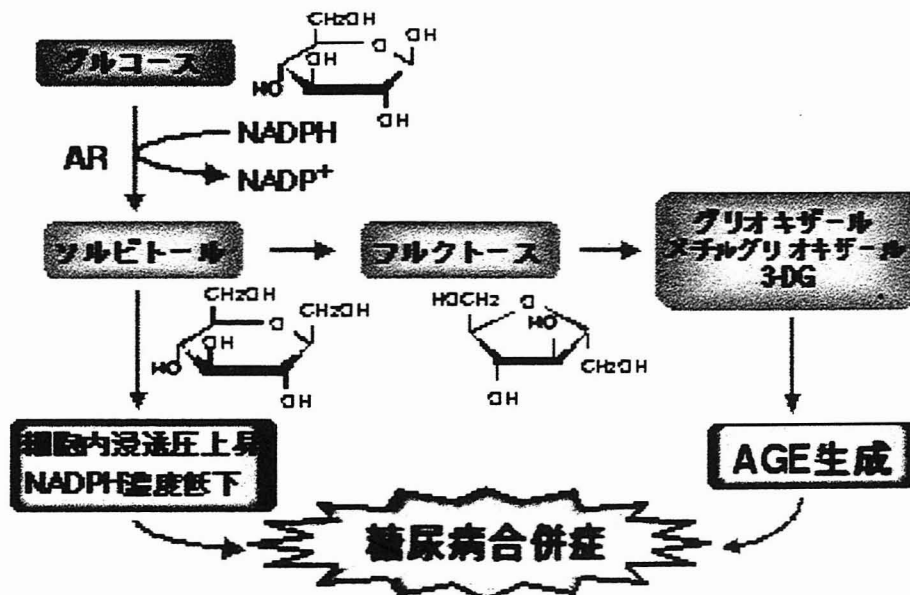


図 3-1 ポリオール経路と糖尿病合併症

ソルビトールは、細胞膜を通じすぐに拡散できないため、細胞内に蓄積され

る。その結果、細胞内浸透圧の上昇や NADPH 濃度の低下などが細胞の機能変異や障害を招き、結果として糖尿病性網膜症、糖尿病性網膜症および糖尿病性神経障害を引き起こす [32-35]。

また、ソルビトールの蓄積だけでなく、ポリオール経路により生成する AGE によっても糖尿病合併症が引き起こされる。ソルビトールから変換されたフルクトースは、グリケーション反応中間体の 3-deoxyglucosone (3-DG) を生成する。3-DG はタンパク質のリジン残基と容易に反応しピラリンやペントシジンといった AGE を生成する。

1980 年以來、糖尿病合併症の予防におけるポリオール経路抑制の重要性から、多くの AR 阻害剤 (aldose reductase inhibitors : ARIs) が研究開発され、実験動物の糖尿病性合併症の進行を抑えることが報告されている [48]。一方、1970 年代の半ばより、いくつかの研究で *in vitro* において、フラボノイドによる AR 活性の抑制が報告されている [49]。しかし、*in vivo* におけるフラボノイド摂取と AR 活性抑制作用については未解明の点が多い。

一方、生体内には $\alpha$ -ジカルボニル化合物を分解する経路も存在する。グリオキザラーゼはグリオキザラーゼ I とグリオキザラーゼ II から成る酵素で、 $\alpha$ -ジカルボニル化合物を分解する。グリオキザラーゼ I は $\alpha$ -ジカルボニル化合物と還元型のグルタチオンとを反応させ、S-D-hydroxyacylglutathione にする酵素である。また、グリオキザラーゼ II は S-D-hydroxyacylglutathione を加水分解しする (図 3-2)。したがって、グリオキザラーゼ活性が増加すれば $\alpha$ -ジカルボニル化合物量は減少し、結果的には AGE の生成を阻害することが可能になる。

そこで本研究では、まず糖尿病ラットにおいて増加した 3DG がフラボノイドの摂取で減少できるかどうか確認し、その際のアルドース還元酵素とグリオキザラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。

## 3.2. 方法

### (1) 3DG の定量

3-DG は非常に不安定なジカルボニル化合物であり、3-DG そのものを定量することは困難である。そこで、3-DG が生体内において AGE の生成にどのような

影響を与えるかを検討するために、Yamada ら [50] の方法に従って、3-DG を 2,3-diaminonaphthalene と反応させ、安定な誘導体に変換し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用い、誘導体化された 2-(2,3,4-trihydroxybutyl)-benzo[g]quinoxaline のピークを検出することで 3-DG を定量した。

肝臓約 100mg を試験管にとり、10mM リン酸緩衝液を 1ml 加え、ホモジナイズした。このホモジネート溶液をエッペンドルフチューブに移し、14,000g、4°C で 15 分間遠心分離した。上清を試験管にとり、これに 0.005% 2,3-pentanedione を 50 $\mu$ l および 6% 過塩素酸を 1ml 加え、3,550 g、4°C で 20 分間遠心分離した。上清をフタ付試験管にとり、これに飽和炭酸ナトリウムを 2ml 加え中和した後、0.1% 2,3-diaminonaphthalene を 100 $\mu$ l 加え、4°C で 16 時間静置し、3-DG と 2,3-diaminonaphthalen を反応させた。これに酢酸エチルを 4ml 加えてよく振とうし、反応生成物を酢酸エチル相に抽出した。酢酸エチル相をナシ型フラスコに移し、もう一度酢酸エチルを 4ml 加えて反応生成物を抽出した。この抽出作業を 3 回行い、集めた酢酸エチル相をロータリーエバポレーターで蒸発乾固した。これにメタノール 200 $\mu$ l を加え反応生成物を溶解し、HPLC 分析試料とした。HPLC のポンプは PU-2089 (日本分光、東京) を用い、カラムは LiChrospher100RP18e (メルク、ドイツ)、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) /アセトニトリル/メタノール=70/15/15 から 20/40/40 の直線グラディエント溶出させた。検出は蛍光分光検出器 (FP-520、日本分光、東京) を用いて励起波長 271nm、蛍光波長 503nm で検出した。

## (2) アルドース還元酵素活性の測定

□ アルドース還元酵素によりグルコースがソルビトールに変換される際、NADPH が NADP<sup>+</sup>に酸化される。本実験では、グリセルアルデヒドを基質とし、アルドース還元酵素により酸化された NADPH を 340nm 吸光度から測定し、活性を算出した。調製したサンプル 20 $\mu$ l に 180 $\mu$ l の 0.065M リン酸ナトリウム-カリウム緩衝液加えて 10 倍に希釈した。この試料に 0.8M 硫酸リチウムを 200 $\mu$ l 加えた後、37°C で保温しておいたアッセイミックス溶液 (0.5mM リン酸ナトリウム-カリウム緩衝液 : 0.5mM NADPH : 50mM グリセルアルデヒド = 1 : 1 : 1) を 600 $\mu$ l 加え、直ちに 340nm での吸光度を 37°C で測定した。吸光度の測定には、分光吸

光光度計 (JASCO UV/VIS Spectrophotometer V-530、日本分光株式会社：東京) を用い、37°C、340nm における 5 分間の吸光度の減少から酸化された NADPH 量を測定して算出した。

活性は、サンプルのタンパク質 1 mg が、1 分間に 1 nmol の NADPH を酸化する酵素量で表した。

### (3) グリオキザラーゼ活性の測定

ラットの肝臓約 100mg に PBS5ml を加え、ホモジナイズし、4°C、8,000g で 15 分間遠心分離したものを試料とした。試料は Lowry 法変法に基づき、タンパク質を定量した。

活性の測定は、石英セルに試料 100 $\mu$ l と 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 900 $\mu$ l、MG50 $\mu$ l、GSH20 $\mu$ l を入れ、直ちに 240nm での吸光度を 30°C で 5 分間経時的に測定した。活性は粗酵素溶液中タンパク質量 1mg の 1 分間あたりの 240nm の吸光度の増加で表した。

### (4) 動物実験

動物実験は 2 回行い、1 回目は第 2 章と同一である。2 回目は以下のように行った。実験動物は、5 週齢の Wistar 系雄ラット (90~110g：日本エスエルシー株式会社、静岡) 18 匹を用いた。ラットは個別のステンレスゲージに入れ、室温 22°C $\pm$ 1°C、湿度 50% $\pm$ 10% に保ち、午前 6 時から午後 6 時までの 12 時間の明暗サイクルで飼育した。予備飼育期間中、3 日間は固形飼料 (CE-2、日本クレア株式会社、東京)、その後 4 日間は AIN-93G に準じた 20%カゼイン飼料を自由摂取させ、同時に水道水も自由摂取させた。7 日間の予備飼育後、非糖尿病態ラット群 (NC 群) 7 匹を分け、それ以外には、ストレプトゾトシンを体重 1kg あたり 50mg となるように尾静脈注射し、糖尿病態にした。注射して 2 日後、体重と血糖値の平均が等しくなるように DC 群と DV 群に群分けし、実験飼料を与えた。実験飼料には、NC 群と DC 群には AIN-93G に準じた 20%カゼイン飼料、DV 群には 20%カゼイン飼料にヤマブドウ低分子ポリフェノール抽出物を 0.13% になるように加えた VL 添加飼料を与えた。添加量は Folin-Denis 法によって測定した総ポリフェノール量がカテキン当量で 0.1% となるように

決めた。28 日間飼育した後、ラットをジエチルエーテル麻酔下で開腹し、下大静脈から採血後心臓を切って屠殺し、肝臓と腎臓を摘出した。これらは液体窒素で速やかに凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で分析まで保存した。

### 3.3 結果

#### (1) 糖尿病ラットにおける肝臓 3-DG 濃度と G-ルチン摂取の影響

3-DG を 2,3-diaminonaphthalene と反応させ、2-(2,3,4-trihydroxybutyl)-benzo[g]quinoxaline 誘導体化することで HPLC 分析により 3-DG を定量することができた。しかし、他のジカルボニル化合物である glyoxal および methylglyoxal は検出できなかった。

20%カゼイン飼料を摂取させた健常ラット (C 群) の肝臓中 3-DG 濃度は  $1.97\mu\text{mol}/\text{mg}$  であった (図 3-2)。20%カゼイン飼料を摂取させた糖尿病ラット (DC 群) の肝臓中 3-DG 濃度は、C 群に対し増加する傾向がみられ、C 群の約 3 倍以上になった。0.2%G-ルチン添加飼料を摂取させた DR 群では、糖尿病で増加した肝臓中 3-DG 生成を抑制する傾向がみられ、DC 群の 65%になったが有意差はなかった。2.5%ヤマブドウ絞り粕抽出物添加飼料を摂取させた DV 群でも、ヤマブドウ絞り粕抽出物摂取による肝臓中 3-DG 生成を抑制する傾向がみられた。

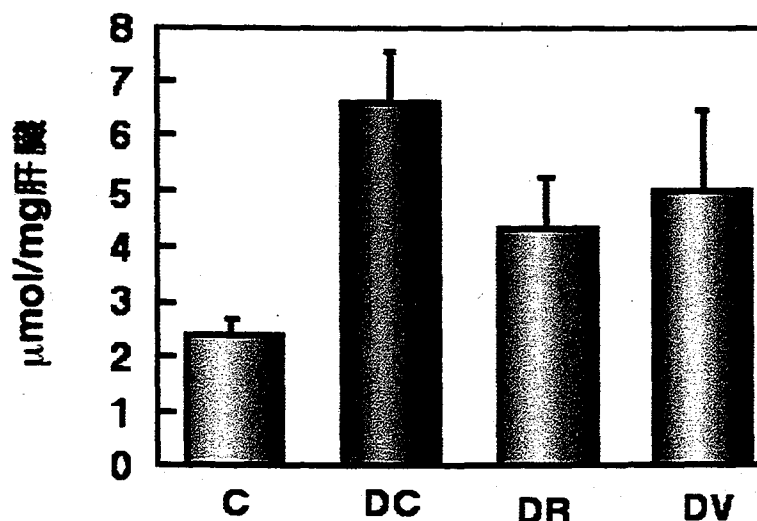


図 3-2 フラボノイド摂取糖尿病ラットの肝臓 3-DG 濃度

#### (2) 糖尿病ラットにおけるアルドース還元酵素活性と G-ルチン摂取の影響

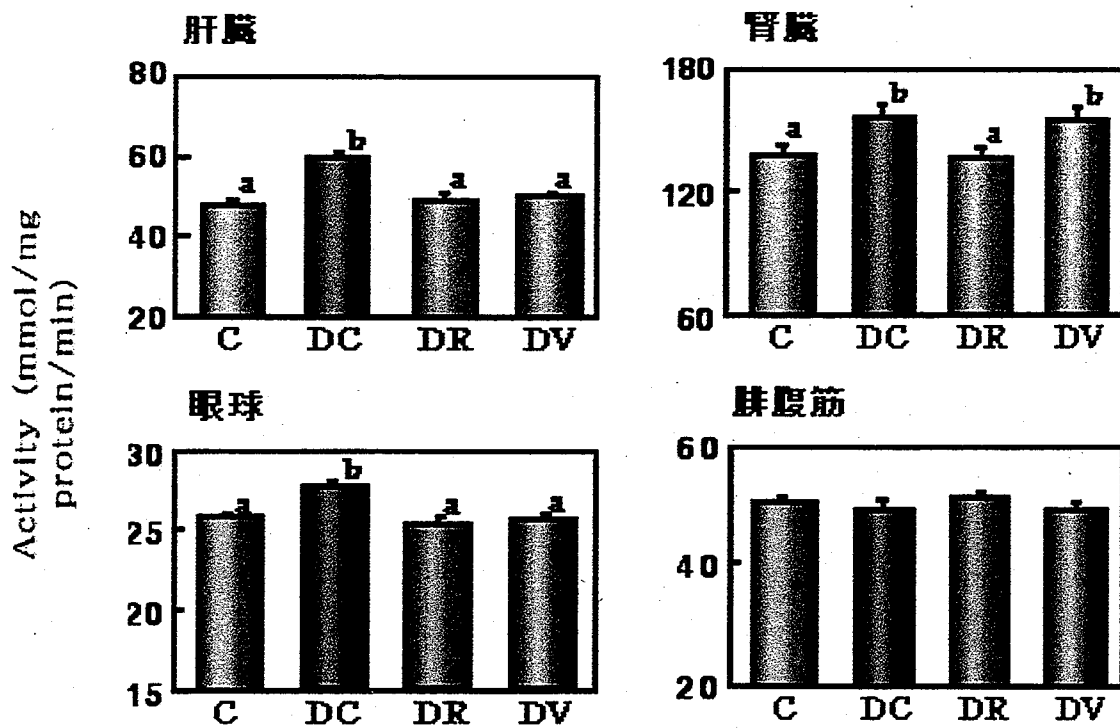
G-ルチンおよびヤマブドウ絞り粕抽出物摂取が肝臓、腎臓、腓腹筋および眼球中のアルドース還元酵素活性に及ぼす影響を図 3-3 に示す。20%カゼイン飼料を摂取させた正常ラット群 (C 群) の肝臓アルドース還元酵素活性は 46.7 nmol/mg protein/min であった。糖尿病ラット群 (DC 群) 肝臓では、C 群に対し 25%有意に増加した。0.2%G-ルチン添加飼料 (DR 群) および 2.5%ヤマブドウ絞り粕抽出物添加飼料を摂取させた群 (DV 群) では、糖尿病で増加したアルドース還元酵素活性を有意に抑制し、C 群と同レベルになった。

G-ルチンおよびヤマブドウ絞り粕抽出物摂取が腎臓中のアルドース還元酵素活性に及ぼす影響を Fig. 3-6 に示す。20%カゼイン飼料を摂取させた C 群の AR 活性は 138.2 nmol/mg protein/min であり、肝臓より有意に高かった。20%カゼイン飼料を摂取させた DC 群のアルドース還元酵素活性は、C 群に対し 13%有意に増加した。0.2%G-ルチン添加飼料を摂取させた DR 群では、糖尿病で増加したアルドース還元酵素活性を有意に抑制し、C 群と同レベルになった。2.5%ヤマブドウ絞り粕抽出物添加飼料を摂取させた DV 群では、ヤマブドウ絞り粕抽出物摂取によるアルドース還元酵素活性抑制作用はみられなかった。

骨格筋 (腓腹筋) では各群の差は認められなかった。アルドース還元酵素は眼球の水晶体で活性が高い。そこで眼球中の活性を測定したところ、わずかではあるが糖尿病ラットで増加した。G-ルチンとヤマブドウ抽出物の摂取は有意にこの増加を減少させた。

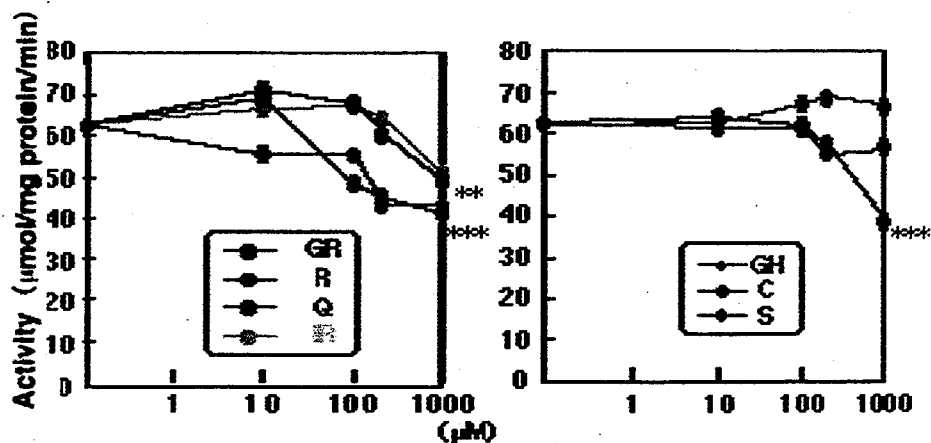
### (3) フラボノイドのアルドース還元酵素活性の阻害

次に *in vitro* におけるアルドース還元酵素の各種フラボノイドによる阻害を検討した (図 3-4)。G-ルチン、ケルセチンおよびスルフレチンを添加した群において、100、200 および 1000 $\mu$ M の G-ルチン添加、200 および 1000 $\mu$ M のケルセチン添加、そして 1000 $\mu$ M のスルフレチン添加により活性の抑制作用が認められた。1000 $\mu$ M の G-ルチン、ケルセチンおよびスルフレチンを添加した群では、対照群に対してスルフレチン>ケルセチン>G-ルチンの順で AR 活性を有意に抑制し、その AR 活性はそれぞれ対照群の 62%、65%および 68%にまで有意に抑制された。



値は、平均値±標準誤差 (n=5)  
異なる記号間の有意差 p<0.05

図 3-3 フラボノイドを摂取させた糖尿病ラットのアルドース還元酵素活性



GR: Gルチン, R: ルチン, Q: ケルセチン, E: イソラムネチン  
GH: G-ヘスペリジン, C: カテキン, S: スルフレチン

\*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 (各組間AR活性における対照群に対する有意差)

図 3-4 フラボノイドによるアルドース還元酵素の阻害



ルチンおよびイソラムネチンを添加した群では、1000 $\mu$ M のフラボノイド添加により、対照群に対し活性が有意ではないが抑制される傾向がみられた。

いずれのフラボノイドを添加した群においても、フラボノイドを 10 $\mu$ M 添加した群では、フラボノイド添加によるアルドース還元酵素活性の抑制作用は認められず、ヘスペリジンおよびカテキンを添加した群では 1000 $\mu$ M のフラボノイドを添加しても、対照群に対し活性を抑制する作用は認められなかった。

#### (5) フラボノイド摂取がグリオキザラーゼ活性に及ぼす影響

フラボノイド添加によるグリオキザラーゼ I 活性に対する影響をまず *in vitro* で検討した (図 3-5)。G-ルチン、EGCg、プロシアニジン B1、は 10 $\mu$ M において活性には顕著な変化がなかったが、100 $\mu$ M においては活性が顕著に上昇した。G-ヘスペリジン添加では活性が上昇しなかった。ヤマブドウ搾り粕抽出物は 0.01mg/ml では活性には顕著な変化がなかったが、0.1mg/ml では活性が顕著に上昇した。

次いで、糖尿病ラットに対するヤマブドウ抽出物摂取がグリオキザラーゼ活性に及ぼす影響を検討した。その結果、糖尿病の発症によりグリオキザラーゼ活性は顕著に減少したが、ヤマブドウ抽出物摂取はそれを回復させることはできなかった (図 3-6)。

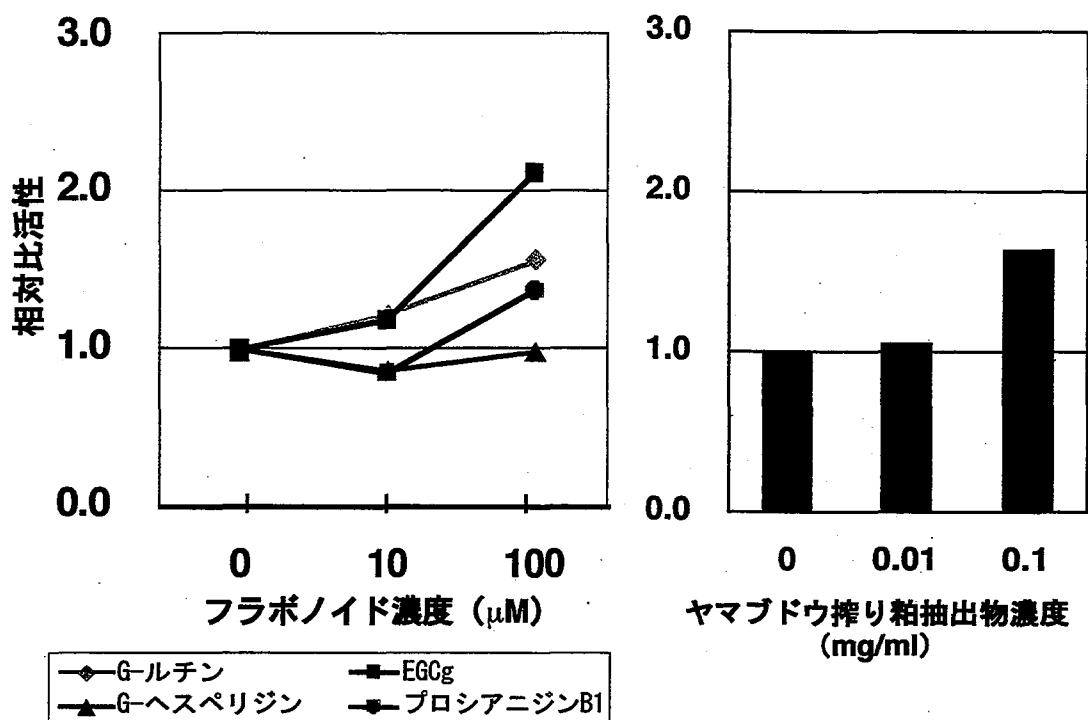


図 3-5 グリオキザラーゼ I 活性に及ぼすフラボノイド添加の影響

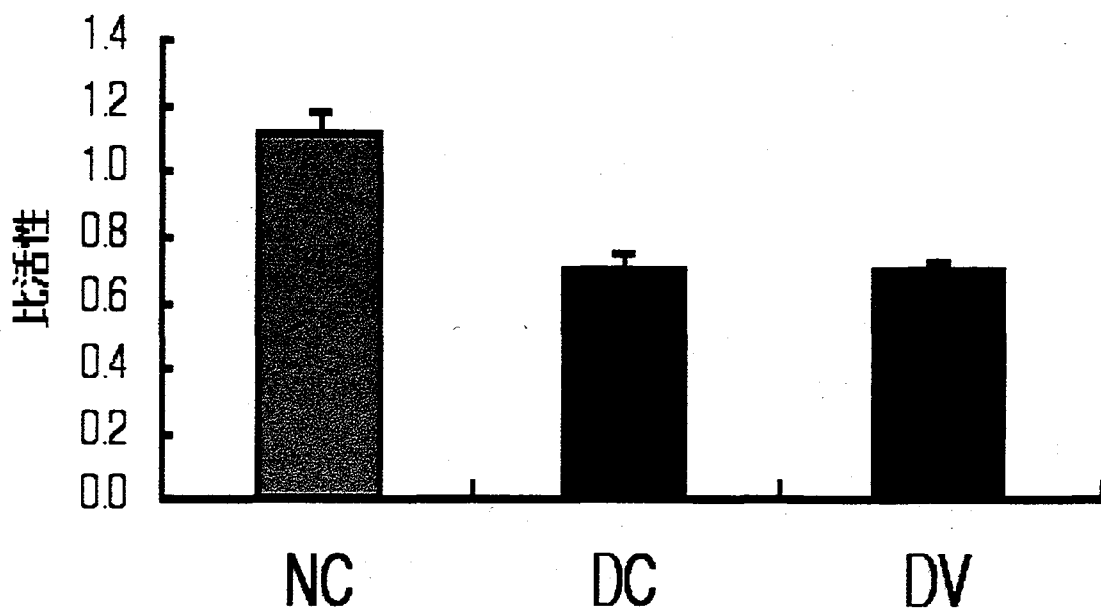


図 3-6 ヤマブドウ低分子ポリフェノールを摂取した糖尿病ラットのグリオキザラーゼ I 活性

### 3.4 考察

Matsuda ら [51] は、フラボノイドの構造上の違いによるラットレンズのアルドース還元酵素活性抑制効果の違いについて検討している。彼らは、フラボンとフラボノールにおいて、7位に水酸基をもつこと、もしくはB環に catechol 構造 (3'位および4'位に水酸基) をもつことで AR 活性抑制効果が高まること、2位と3位の二重結合によりアルドース還元酵素活性抑制効果が高まる、ということを経験した。今回、ケルセチンは肝臓と腎臓のどちらのアルドース還元酵素活性に対しても強い抑制効果を示したが、ケルセチンは上の2つの条件に当てはまる構造をしている。また、ルチンおよび G-ルチンも7位に水酸基をもち、2位と3位に二重結合をもつことから、今回の実験で強いアルドース還元酵素活性抑制効果を示した結果と一致する。また、Lee [52] は *in vitro* の実験で、ラットレンズのアルドース還元酵素活性をケルセチンにより 100% 抑制したと報告しており、ケルセチンは強いアルドース還元酵素活性抑制効果が期待できる。

反対に、今回の実験では、ヘスペリジンとカテキンは肝臓および腎臓のどちらのアルドース還元酵素活性にも抑制効果はみられなかった。Matsuda らは、アルドース還元酵素活性抑制効果の減少に関し、7位に *o*-glucosyl 構造をもつと AR 活性抑制効果が減少すること、B環に pyrogallol 構造 (3'位、4'位および5'位に水酸基) をもつと、B環に catechol 構造をもつよりも AR 活性抑制効果が減少することを報告した。ヘスペリジンは、ルチンによく似た構造をもつフラボノイドであるが、7位に *o*-glucosyl 構造をもつため、ルチンと比較して AR 活性抑制効果が低かった可能性が考えられる。また、今回実験に用いたカテキンは epigallocatechin である。これはB環に pyrogallol 構造をもつため、他のフラボノイドと比較し、アルドース還元酵素活性抑制効果が低かった可能性が考えられる。

これらのことから、フラボノイドには高血糖により増加したアルドース還元酵素活性を抑制する効果があること、そして、その効果の違いはフラボノイドの構造が深く関与している可能性が示唆された。また、*in vitro* において、フラボノイドによる AR 活性の抑制効果は 200 および 1000 $\mu$ M という高濃度でなければ現れないことが示された。

糖尿病ラットにおけるラット組織（肝臓、腎臓、腓腹筋および眼球）アルドース還元酵素活性に対する G-ルチンおよびヤマブドウ抽出物摂取が及ぼす影響について検討した。肝臓、腎臓、腓腹筋および眼球において、20%カゼイン飼料を摂取させた正常ラット群（C 群）のアルドース還元酵素活性は各組織間で有意に異なっており、特に腎臓では有意に高かった。肝臓、腎臓および眼球において、C 群のアルドース還元酵素活性に対し、20%カゼイン飼料を摂取させた糖尿病ラット群（DC 群）のアルドース還元酵素活性は有意に増加した。図 3-2 に見られるように 3-DG 濃度も肝臓で増加していることから、糖尿病でポリオール経路が活性化され、ジカルボニル化合物が蓄積したことが考えられる。糖尿病によりアルドース還元酵素活性が増加する原因として、高血糖状態によるポリオール経路の活性化があげられるが、この他に、グリケーションにより生成した AGE がアルドース還元酵素活性の増加に関わっているという報告がある。Nakamura ら [53] は、微小血管内皮細胞と AGE 化した BSA をインキュベーションすると、AGE 化した BSA の濃度依存的に微小血管内皮細胞のアルドース還元酵素の mRNA が増加すること、またそれに付随してアルドース還元酵素のタンパク質量およびアルドース還元酵素活性も増加することを報告している。このとき、肝臓および眼球において、糖尿病により増加したアルドース還元酵素活性は G-ルチンおよびヤマブドウ絞り粕抽出物摂取により C 群と同程度まで抑えられた。腎臓においては、糖尿病により増加したアルドース還元酵素活性は G-ルチン摂取により C 群と同程度まで抑えられたが、ヤマブドウ絞り粕抽出物摂取による抑制効果はみられなかった。

*In vitro* でのアルドース還元酵素活性抑制効果が確認できたフラボノイド濃度を比較すると、*in vivo* でのアルドース還元酵素活性は *in vitro* よりもかなり少量のフラボノイドにより抑制されたことが考えられる。2 週間 0.2%G-ルチン添加飼料を摂取させた時の肝臓中のケルセチン濃度が 0.1nmol/g であったので（未発表データ）、フラボノイドにより直接アルドース還元酵素活性が抑制されただけでなく、糖尿病ラットにフラボノイドを長期間摂取させたことにより、AGE 生成が抑制され、AGE 生成に伴うアルドース還元酵素の mRNA の増加が押さえられた結果、アルドース還元酵素活性が抑制された可能性が考えられる。

一方、ジカルボニル化合物を分解するグリオキザラーゼは、糖尿病でその活性が低下した。これは糖尿病でアルドース還元酵素活性が低下したことと合わせて考えると、糖尿病でジカルボニル化合物が顕著に蓄積することをよく説明できる。しかし、フラボノイドは *in vitro* ではグリオキザラーゼ I の活性を増加させたが、ラットでは増加させることはできなかった。グリオキザラーゼ I はグルタチオンを補因子とする。したがって、抗酸化物質は還元型グルタチオンの再生を容易にするので *in vitro* ではその活性を増加させることができたものと考えられる。糖尿病では著しい酸化ストレス状態となっている。このような状態では抗酸化物質は多くの活性酸素の消去に消費されると考えられ、還元型グルタチオンの再生にまで効果が出るにはきわめて濃い濃度が必要である。今回の実験ではそれに達しなかったことが示唆された。

グリケーションは本来非酵素的な反応であるが、極めて反応性の高い $\alpha$ -ジカルボニル化合物の生成はポリオール経路を始め酵素的に行われる。また、その分解も酵素的な作用である。これらに対して、フラボノイドが $\alpha$ -ジカルボニル化合物蓄積の抑制方向に働くといふことは大変興味深い。さらに、アルドース還元酵素に見られるように、遺伝子レベルで作用する可能性も本研究で見出された。以上のように、フラボノイドは単なる抗酸化的な働きだけではなく、細胞の恒常性維持に対して総合的に作用することが強く示唆された。

## 4. AGE タンパク質の分解

### 4.1 目的

タンパク質は翻訳後、その機能を発現するために、酵素的にメチル化、リン酸化などの修飾を受けるものが多い。一方、活性酸素種、過酸化脂質、カルボニル化合物などの反応性の高い分子はタンパク質と非酵素的に反応し、予期せぬ修飾を受けることによって本来の機能を失うタンパク質も存在する。そういったタンパク質は異常タンパク質と呼ばれる。グリケーションを受け、AGE によって修飾を受けたタンパク質も異常タンパク質の一種である。AGE 修飾タンパク質は、機能を失った不要なタンパク質であり、それは、その後どのような経路で分解され、生体から除去されるのであろうか。

細胞内の不要なタンパク質を分解するタンパク質分解経路として、ユビキチン-プロテアソームシステムが提唱されている [54]。プロテアソームは損傷したタンパク質の分解や、総合的な代謝回転に応答するサイトゾルに遍在する巨大タンパク質分子の複合体であり、20S と 26S の 2 つの型が存在する。20S プロテアソーム (分子量 70 万) は分子量 2~3 万の  $\alpha$ 、 $\beta$  の 2 種類のサブユニットが 7 個ずつ 4 層に積み重なり、中が空洞の構造をしている。一方、26S プロテアソーム (分子量 160 万) は 20S プロテアソームと 19S 制御サブユニット複合体 (分子量 100 万) から ATP 依存的に構築され、そのタンパク質分解活性の発現に ATP の分解が必須である (Fig. 4-1)。このうち、26S プロテアソームがユビキチン依存的タンパク質分解をつかさどる [54]。

ユビキチン-プロテアソームシステムは二つのシステムから成り立っており、1 つはポリユビキチン化というタンパク質の修飾を行うユビキチンシステム、もう 1 つは 20S プロテアソーム、26S プロテアソーム、19S 制御サブユニットからなるプロテアソームシステムである。前者のユビキチンシステムによってできるポリユビキチン鎖が分解のシグナルとして 26S プロテアソームによって認識され、ポリユビキチン化されたタンパク質が 26S プロテアソームによって ATP 依存的に分解される。

これまでに、軽度の酸化ストレスを与えた細胞ではユビキチン-プロテアソ

ームシステムが誘導されること [55] や、酸化ストレスを与えたラットミオシン重鎖のポリユビキチン化が亢進すること [56] など、酸化修飾タンパク質の分解にユビキチンシステムが関与することを示唆する報告が多数なされており、酸化修飾タンパク質分解経路の一つの有力な説として知られている。他方で、酸化修飾タンパク質の分解には、ユビキチンシステムを経ずに 20S プロテアソームが直接 ATP 非依存的に酸化修飾タンパク質の選択的分解を担っているとする報告 [55] もあり、さらに、ヒトやラットの組織、細胞において 20S、26S ともに加齢に伴ってペプチダーゼ活性が低下することが報告されている [55]。

このように、酸化修飾タンパク質の分解機構については未だ多くの研究者による議論が続いている。一方、糖によって修飾を受けた AGE 化タンパク質の分解経路については、AGE が ATP 依存性のプロテアソームによる分解を妨害することで、糖尿病ラットの肝臓や腎臓のプロテアソームの活性が減損すること [57] や、グリオキザール処理を施した細胞を用いた CML 修飾タンパク質形成下でのプロテアソームの動向 [58] などが報告されているが、現段階での研究蓄積は、まだ発展途上にあるといえる。しかし、糖尿病患者やラットなどの組織タンパク質に AGE が「分解され難く蓄積する」という特性をもつ背景や、蓄積してしまった AGE の体外への除去を視野に入れ、タンパク質の分解に対するグリケーションの影響を考慮することは、タンパク質のグリケーション抑制や AGE 蓄積抑制を検討する上での一つの重要な観点であると考えられる。

本研究では、AGE 化されたタンパク質の分解におけるプロテアソームの役割について、プロテアソーム活性とユビキチン化の両面から検討を行った。

## 4.2 方法

### (1) トリプシンによる AGE-BSA の加水分解産物の検出

AGE 化タンパク質の分解を評価する手段の一つとして、ウェスタンブロット法および ELISA 法を用いて、BSA とフルクトースをインキュベーションして作成した AGE-BSA をトリプシンで加水分解したときに生じる AGE のフラグメントを抗 AGE 抗体を用いたウェスタンブロットと ELISA で検出した。

ウェスタンブロットは先の実験と同様の手順で実施した。ELISA は、IMMUNOTEK ELISA Construction System (ZeptoMetrix Corporation ; USA) を用いて、

AGE-BSA を固相化して行った。

#### (2) ELISA 法による AGE-BSA のトリプシン分解フラグメントの検出

トリプシンによる AGE-BSA の加水分解によって生じたウェスタンブロットでは検出できない分子量 10,000 以下の画分に含まれる分解フラグメントを、限外濾過フィルターを用いて分画し、ペプチド画分中の AGE 構造体を第 2 章、第 2 節、1-5 と同様の方法で競合 ELISA によって検出した。

#### (3) プロテアソームの部分精製

プロテアソームの部分精製は、Tanaka ら [59] の方法で行なった。この方法は、プロテアソームが高分子量のプロテアーゼであることを利用し、遠心分離によってプロテアソームを多く含む画分を得る方法である。

5 週齢の Wistar 系雄ラット (85~100g、日本エスエルシー株式会社；静岡) から採取した肝臓約 2g に冷ホモジネート用緩衝液 (pH7.4) を 16mL 加え、氷冷しながらポリトロンホモジナイザーでホモジナイズした。このホモジネート懸濁液を 20,000×g、4℃ で 20 分間遠心分離し、この上澄を 105,000×g、4℃ で 1 時間遠心分離し、さらにこの上澄を 105,000×g、4℃ で 5 時間遠心分離した。この時できた沈澱をプロテアソーム溶液用緩衝液 3mL で溶解したものを部分精製プロテアソーム溶液として以後の実験に使用した。

#### (4) プロテアソーム活性の測定

部分精製プロテアソームにカテキン、EGCg、ヤマブドウポリフェノールを添加したときのトリプシン様ペプチダーゼ活性、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性、ペプチジルグルタミルペプチダーゼ活性を測定した。プロテアソームは基質特異性の非常に広い酵素であるが、4-メチルクマリル-7-アミド (MCA) と結合した高感度の合成基質を用いて酵素活性を測定した。ペプチドと結合した MCA は、ペプチド結合が切断されると蛍光物質である 7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) を遊離する。そこで、遊離した AMC の蛍光強度を測定することにより、酵素活性を評価することができる。合成基質として Boc-Leu-Arg-Arg-MCA (トリプシン様ペプチダーゼ活性)、Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (キモトリプシ



ン様ペプチダーゼ活性)、Z-Leu-Leu-Glu-MCA (ペプチジルグルタミルペプチダーゼ活性) を用いた。

10 倍に希釈した部分精製プロテアソーム 40 $\mu$ L に、カテキン、EGCg 溶液を 10 $\mu$ L ずつ添加した。また、ヤマブドウポリフェノールを反应用緩衝液に溶解し、総フェノール量がそれぞれの濃度のカテキンと等しくなるように 10 $\mu$ L ずつ添加した。これに基質溶液 50 $\mu$ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベーションした。インキュベーション終了後、直ちに 10%SDS を 100 $\mu$ L 加えて反応を停止させ、さらに 100mM トリス塩酸緩衝液を 2mL 加え、励起波長 380nm、蛍光波長 460nm における蛍光強度を分光蛍光光度計 RF-5300 PC (島津製作所：京都) を用いて測定した。なお、盲検は、部分精製プロテアソームの代わりに精製の際に用いたプロテアソーム溶解用緩衝液を加えたもの、標準試料は基質溶液の代わりに 10 $\mu$ M AMC、部分精製プロテアソームの代わりにプロテアソーム溶解用緩衝液を加えたものを用いた。また、部分精製プロテアソームのタンパク質濃度を Lowry 法変法により測定した。各種ペプチダーゼ活性は、タンパク質 1mg が 1 分間当たりに放出する AMC 量として計算し、フラボノイド無添加のコントロールサンプルに対する相対値で表した。

#### (5) 部分精製プロテアソームのグリケーションが活性に及ぼす影響

部分精製プロテアソームをフルクトースとともにインキュベートし、プロテアソームをグリケーションさせたときの活性に与える影響を検討した。部分精製プロテアソーム溶液をタンパク量が 2mg/mL になるように調整し、プロテアソーム溶解用緩衝液に溶解した D-フルクトースを 0、100、200、300、400、500mM となるように添加した。これを 37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートし、以下の実験に使用した。プロテアソームがフルクトースとの 24 時間のインキュベーションによってグリケーションを起こしたかどうかを確認するために、ウェスタンブロット法によって AGE 化プロテアソームを検出し、活性も測定した。

#### (5) 抗 AGE 抗体と抗ユビキチン抗体を用いた糖尿病ラット肝臓の免疫沈降

STZ 誘導糖尿病ラット肝臓を用いて、抗ユビキチン抗体を用いて免疫沈降させ、さらにこれを抗 AGE 抗体でウェスタンブロットした。

### 4.3. 結果

#### (1) ウェスタンブロット法による AGE-BSA の加水分解フラグメントの検出

AGE-BSA をトリプシンによって加水分解し、生じたフラグメントを、抗 AGE モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットで検出した結果を Fig. 4-3 に示す。CBB 染色では約 69kDa の BSA のバンドの下にトリプシン分解によって生成したフラグメントを観察することができた (図 4-2、CBB 点線枠内)。しかし、抗 AGE 抗体によるウェスタンブロッティングではこのフラグメントは検出されず、これらのフラグメントは AGE 抗体の抗原決定基が失われることが示された。また、トリプシンによる加水分解により、AGE-BSA に特徴的なアグリゲーションを起こして生成したと考えられる高分子域のバンドが反応時間に応じて減少していく様子が確認された (図 4-2、i)。さらに、AGE 抗体によるウェスタンブロッティングで、約 86kDa と約 50kDa に CBB 染色では観察されなかったバンドが確認された (図 4-2、ii、iii)。約 86kDa のバンドはトリプシン無添加のサンプル (①) には確認できないが、トリプシンと AGE-BSA を混和した後直ちにサンプリング処理をした分解時間 0 時間 (②) のサンプルでは確認することができた (図 4-2、ii)。これらの分解によって生じたバンドは、トリプシンによる分解が進むに従って減少し、分解開始から 24 時間後にはほぼ全てが分解されたことが示された。

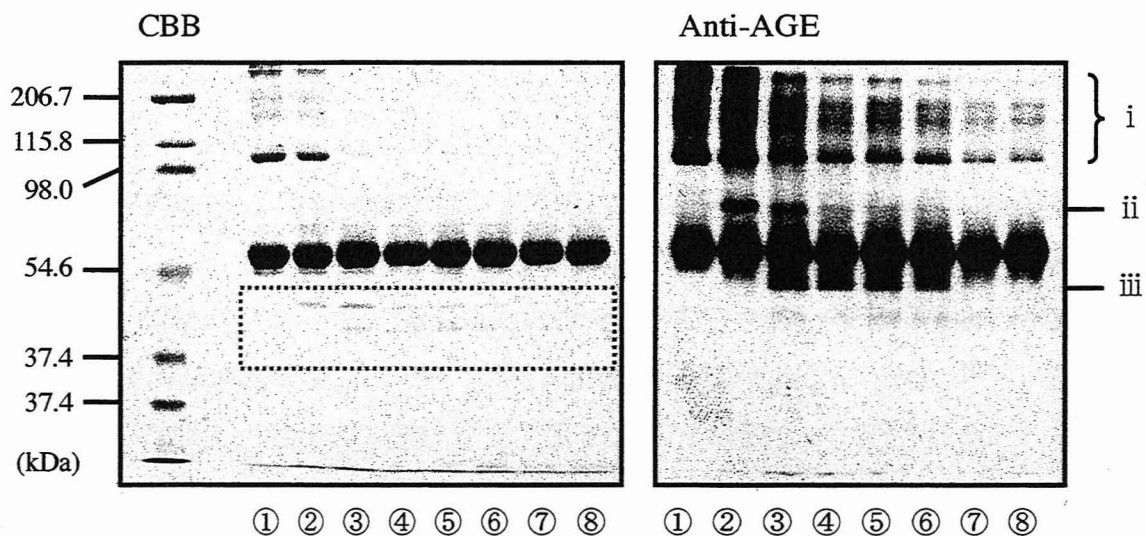


図 4-2 AGE-BSA のトリプシンによる加水分解産物の検出 (ウェスタンブロット)

①トリプシン無添加 ②トリプシン分解時間 0 時間 ③トリプシン分解時間 1 時間 ④トリプシン分解時間 2 時間 ⑤トリプシン分解時間 3 時間 ⑥トリプシン分解時間 6 時間 ⑦トリプシン分解時間 12 時間 ⑧トリプシン分解時間 24 時間

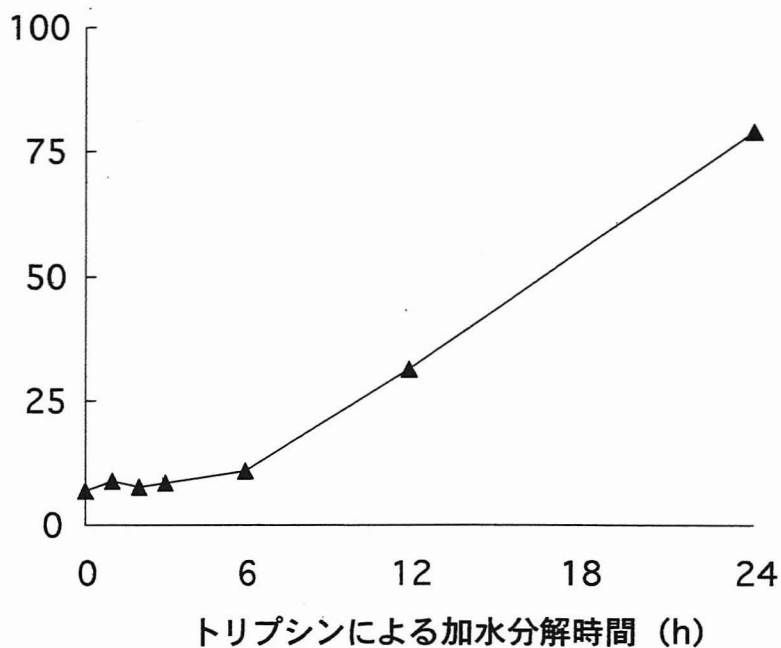


図 4-3 AGE-BSA のトリプシンによる加水分解産物の検出 (ELISA)

## (2) ELISA 法による AGE-BSA の加水分解フラグメントの検出

トリプシンによる AGE-BSA の加水分解によって生じた分子量 10,000 以下のペプチド中の AGE 構造体を競合 ELISA 法によって検出した結果を Fig. 4-4 に示す。競合 ELISA は試料中の遊離抗原量と酵素標識体検出試薬の発色が逆比例するため、試料中の AGE 量が多いほど吸光度は小さく、AGE 量が少ないほど吸光度は大きくなる。そのため、この実験の結果はトリプシン無添加サンプルの吸光度を 100 としたときの、トリプシン処理による吸光度の減少率を分子量 10,000 以下の画分中に遊離した AGE 量の相対値として表した。トリプシンの分解時間に伴って、分子量 10,000 以下の画分に現れる抗 AGE 抗体に認識される遊離ペプチド量が上昇した。このことによって AGE-BSA の分解産物中に含まれる AGE 構造体を、抗 AGE 抗体によって検出できることが示された。

## (3) フラボノイドが部分精製プロテアソームの活性に及ぼす影響

部分精製プロテアソームにカテキン、EGCg、ヤマブドウポリフェノールを添加したときの、各種ペプチダーゼ活性に与える影響を示した結果を、図 4-4 に示す。カテキンの添加は、三種類のペプチダーゼ活性には影響を与えなかった。一方、1000 $\mu$ M の EGCg 添加によって、3 種のペプチダーゼ全ての活性が阻害され、特にキモトリプシン様活性はコントロールの 40%程度まで低下した。ヤマブドウポリフェノールを総フェノール量が 1000 $\mu$ M のカテキンと当量となるように加えると、3 種のペプチダーゼ全ての活性が阻害され、特にキモトリプシン様活性はコントロールの 50%程度まで低下した。

## (4) ウェスタンブロット法による AGE 化部分精製プロテアソームの検出

0~500mM のフルクトースとともに 24 時間インキュベートした部分精製プロテアソーム中に生じた AGE を、抗 AGE 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した結果を図 4-5 に示す。CBB 染色では、24 時間のインキュベーションによる影響は認められなかった。抗 AGE 抗体によるウェスタンブロッティングにより、約 150kDa のバンドがフルクトースの濃度依存的に AGE 化を受けていることが示された (図 4-5、i)。50kDa のバンドは、フルクトースの有無に関わらず、37 $^{\circ}$ C、24 時間のインキュベーションによって AGE が生成した。

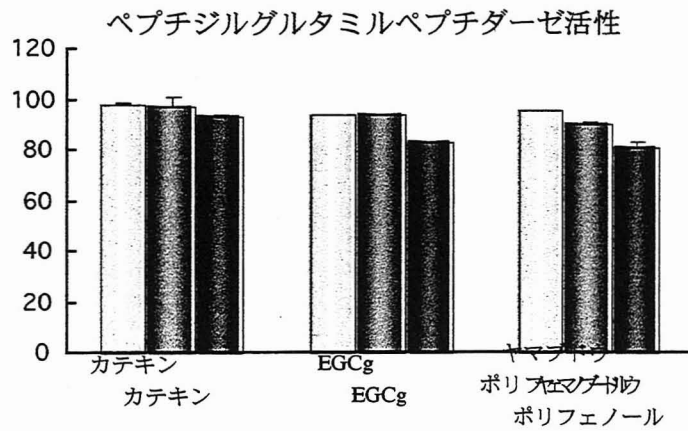
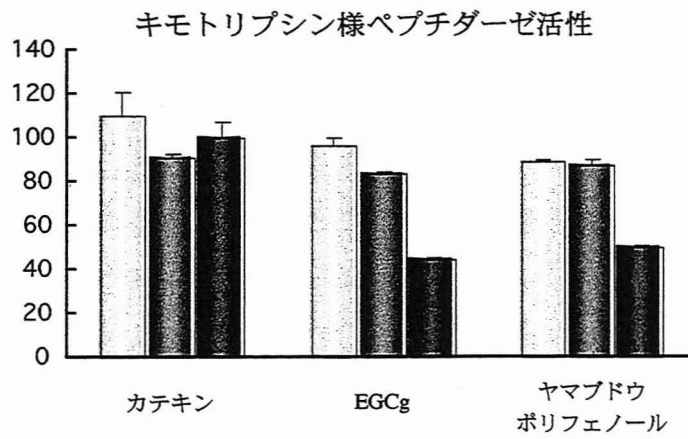
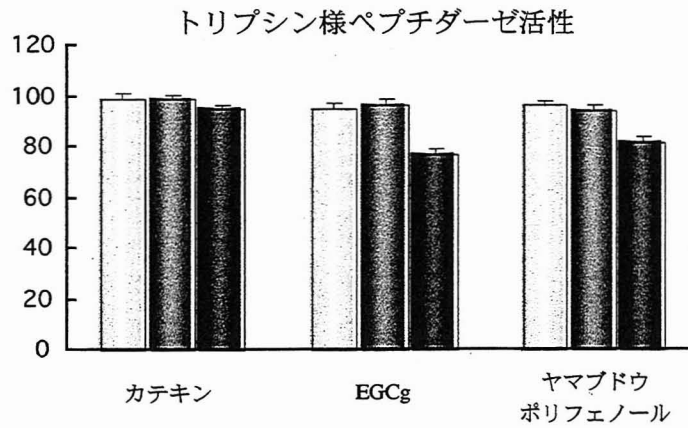


図 4-4 部分精製プロテアソームのペプチダーゼ活性に対するフラボノイドの影響

ヤマブドウポリフェノールは Folin-Denis 法によって測定した総フェノール量がそれぞれの濃度のカテキンと等しくなるように添加した。値はコントロールを 100 としたときの相対値。

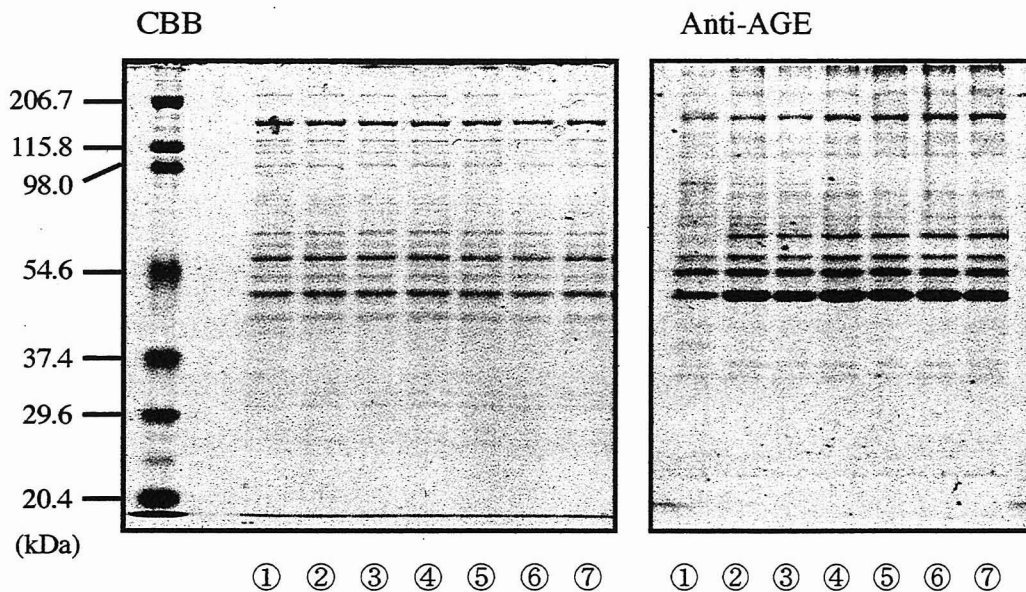


図 4-5 ウェスタンブロット法による AGE 化プロテアソームの検出

①：インキュベート前の部分精製プロテアソーム ②：フルクトース無添加で 37°C、24 時間インキュベート ③：100mM フルクトースとともに 37°C、24 時間インキュベート ④：200mM フルクトースとともに 37°C、24 時間インキュベート ⑤：300mM フルクトースとともに 37°C、24 時間インキュベート ⑥：400mM フルクトースとともに 37°C、24 時間インキュベート ⑦：500mM フルクトースとともに 37°C、24 時間インキュベート

#### (5) 部分精製プロテアソームのグリケーションがペプチダーゼ活性に及ぼす影響

0~500mM のフルクトースとともに 24 時間インキュベートした部分精製プロテアソームのトリプシン様活性、キモトリプシン様ペプチダーゼ活性、ペプチジルグルタミルペプチダーゼ活性を測定した結果を Fig. 4-7 に示す。フルクトースの有無に関わらず、37°C、24 時間のインキュベーションによって 3 種のペプチダーゼ活性全てが著しく低下した。しかし、フルクトースを加えてインキュベーションしたものは、添加したフルクトースの濃度依存的に活性低下が抑えられた。

## (6) 免疫沈降法によるユビキチン化 AGE の検出

### 4.4 考察

本章では、トリプシン分解による AGE-BSA の分解産物の検出と、フラボノイドおよびグリケーションが部分精製プロテアソームのペプチダーゼ活性に与える影響を検討した。

まず、試験的に作成した AGE-BSA をトリプシンによって加水分解し、分解時間推移によるフラグメントの動向を検出した。分解物の SDS-PAGE の後、ゲルを CBB 染色して観察した結果、BSA のバンドの下、40~55kDa 付近に 3 種類のフラグメントを確認した。これらのフラグメントは、トリプシン溶液を添加した直後に最も高分子のもの、インキュベーション開始から 1 時間後に中程度の分子量のもの、3~6 時間後に最も低分子のものが出現し、12、24 時間後にはほぼ視認できないほどに分解されたことを示し、CBB 染色によるトリプシン分解産物の検出は 40~50kDa で有効であることが確認された。ウェスタンブロット法による AGE 断片の検出を行ったところ、CBB 染色で視認されたフラグメントが、ウェスタンブロットティングでは検出できなかった。このウェスタンブロットティングに用いた抗 AGE モノクローナル抗体のエピトープは、N<sup>ε</sup>-カルボキシメチルリジン (CML) であり、CBB で視認された分解産物には CML が含まれないか、あるいはその認識部位がすでに分解されたことが示唆された。また、CBB では確認できない分解物を確認した。これは、CML を含む分解産物が、分解時間が進むにつれて分解によって消失したことを示した。トリプシンだけでなく、生体内から採取したプロテアーゼを用いるなど、応用法が考えられる。

次に、抗 AGE モノクローナル抗体を用いた競合的 ELISA によってウェスタンブロットでは確認できない分子量 10,000 以下のペプチド画分に含まれる AGE の検出を試みた。分子量 10,000 以下の画分に存在する CML は、ELISA 法によって認識することができ、また、それはトリプシンの分解時間に応じて量が増加し、分解が進むにつれてペプチド化する AGE が増加したことを示した。分子量 10,000 以下の画分中に存在する AGE を ELISA によって検出できたことは、今後、例えば糖尿病ラット組織ホモジネート中に含まれるペプチド画分中に含まれる AGE を検出することで、AGE の分解の動向を知る一つの手段になる可能性が考

えられる。

次に、超遠心によるプロテアソームの部分精製を行った。最初の  $10,000\times g$  の遠心でミトコンドリアなどの細胞内小器官を除き、次の  $105,000\times g$  の超遠心で、上清に細胞質画分のみが残る。さらにこの上清を  $105,000\times g$ 、5 時間という強い条件で超遠心することによって、細胞質中でもっとも高分子量であるプロテアソームを多く含む画分を得た。この操作により、超遠心前と比較して、比活性が 3~5 倍に上がった（データは掲載していない）。この部分精製プロテアソームにカテキン、EGCg、ヤマブドウポリフェノールを添加したときのペプチダーゼ活性を測定した結果、 $1\text{mM}$  という比較的高濃度のフラボノイドを添加したときに 3 種類のペプチダーゼ活性の阻害が認められた。この阻害形式については、不明であるが、生体内ではフラボノイドが  $1\text{mM}$  の濃度で存在する可能性はないため、例えばフラボノイドを摂取し体内に吸収された場合、フラボノイドの存在による直接的なプロテアソーム活性への影響を与えることは考え難く、また、逆に活性を促進し、タンパク質の分解を促進するような結果も起こらないと推察される。しかし、体内の弱い酸化ストレスに应答して、プロテアソーム活性が亢進することが報告されており [55]、フラボノイドのような体内で抗酸化活性を発揮する抗酸化剤がプロテアソームシステムに二次的に影響することは十分に考えられる。Ikemoto ら [56] は、ラットの尾部を懸垂することによって無重力状態下におくと、酸化ストレスによって筋タンパク中ミオシン重鎖のユビキチン化が有意に増加したが、このユビキチン化は抗酸化物として知られるビタミン E の大量投与によっては抑制されないことを示した。しかし、酸化ストレスに应答するタンパク質の分解には必ずしもユビキチンを必要としないとする報告 [60] もなされており、今後、フラボノイドを摂取させたラット組織のプロテアソーム活性測定など、*in vivo* での検討の余地があると思われる。

次に、部分精製プロテアソームをフルクトースとともにインキュベートした時のペプチダーゼ活性を測定した。各濃度のフルクトース存在下での 24 時間のインキュベーションにより、部分精製プロテアソームはごく弱いグリケーションが確認された。また、フルクトースの有無に関わらず、24 時間、 $37^{\circ}\text{C}$  のインキュベーションにより SDS-PAGE の泳動パターンに変化が認められ、さらにその



比活性は5分の1程度まで低下した。これはインキュベーション中の部分精製プロテアソームの自己消化を示しており、精製した後のプロテアソームの活性を維持したまま、グリケーションを起こすのは難しいと言える。しかし、この活性の低下は、フルクトースを添加することにより、フルクトースの添加濃度依存的に抑制された。抑制の度合いは僅かであり、原因も不明であるが、フルクトースの添加により自己消化を抑えられた可能性が推察される。また、この実験の結果から、プロテアソームのペプチダーゼ活性は、グリケーションによる低下は起こらないことが示された。我々は過酸化水素添加による酸化ストレス条件下でもプロテアソームの活性が維持されることを示しており、プロテアソームは酸化ストレスに対する耐性が強いことを示している。糖やカルボニルによるストレスでも同じ結果が得られることは考えやすい。今後の課題として、活性を維持したままプロテアソームをグリケーションさせる手法を検討することで、さらに詳細な知見を得ることができると考えられる。

## 参考文献

1. Uchida K, Kawasaki S. *FEBS Lett.*, **322**, 208-210 (1993)
2. Maillard L C. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66-68 (1912)
3. Rajbar S. *Clin. Chim. Acta.*, **22**, 296-8. (1968)
4. Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 583-587 (1984)
5. 並木 満夫. *生化学*, **75**, 37-42 (2003)
6. Robins SP, Bailey AJ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 76-84 (1972)
7. Kasai K, Nakamura T, Kase N, Hiraoka T, Suzuki R, Kogure F, Shimoda SI. *Diabetologia*, **25**, 36-38 (1983)
8. Glomb MA, Monnier VM. *J. Biol. Chem.*, **270**, 10017-10026 (1995)
9. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochemistry*, **34**, 3702-3709 (1995)
10. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9982-9986 (1996)
11. Sima AA, Sugimoto K. *Diabetologia*, **42**, 773-788 (1999)
12. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. *Biochem. J.*, **344**, 109-116 (1999)
13. Sell DR, Carlson EC, Monnier VM. *Diabetologia*, **36**, 936-941 (1993)
14. Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, Ibrahim SA. *Diabetes*, **41**, 36-41 (1992)
15. Aoki S, Hasegawa G, Shigeta H, Obayashi H, Fujii M, Kimura F, Moriwaki A, Nakamura N, Ienaga K, Nakamura K, Kondo M. *Diabetes. Res. Clin. Pract.*, **48**, 119-125 (2000)
16. Odani H, Shinzato T, Usami J, Matsumoto Y, Brinkmann Frye E, Baynes JW, Maeda K. *FEBS Lett.*, **427**, 381-385 (1998)
17. Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *Diabetes*, **41**, 42-48 (1992)
18. Dunn JA, McCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW. *Biochemistry*, **30**, 1205-1210 (1991)
19. Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochemistry*, **28**, 9464-9468 (1989)
20. Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochem. J.*, **324**, 565-70 (1997)
21. Miyata S, Monnier V. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1102-1112 (1992)
22. Njoroge FG, Sayre LM, Monnier VM. *Carbohydr. Res.*, **167**, 211-220 (1987)

23. Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y. *J. Clin. Invest.*, **99**, 1272-1280 (1997)
24. Sima AAF, Sugimoto K. *Diabetologia*, **42**, 773-788 (1999)
25. Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, Dyer DG, Baynes JW. *Diabetes*, **40**, 1010-1015 (1991)
26. Thome J, Munch G, Muller R, Schinzel R, Kornhuber J, Blum-Degen D, Sitzmann L, Rosler M, Heidland A, Riederer P. *Life. Sci.*, **59**, 679-685 (1996)
27. Namiki M, Hayashi T. *J. Agric. Food Chem.*, **23**, 487-491 (1975)
28. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. *Free. Radic. Biol. Med.*, **10**, 339-352 (1991)
29. Baynes JW. *Diabetes*. **40**, 405-412 (1991)
30. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924 (1989)
31. Yamaguchi R, Hirano T, Asami S, Chung MH, Sugita A, Kasai H. *Carcinogenesis*, **17**, 2419-2422 (1996)
32. Sen CK, Atalay M, Hanninen O. *J. Appl. Physiol.*, **77**, 2177-2187 (1994)
33. Ji LL, Dillon D, Wu E. *Am. J. Physiol.*, **258**, R918-R923 (1990)
34. Khan MF, Wu X, Tipnis UR, Ansari GA, Boor PJ. *Toxicology*. **173**, 193-201 (2002)
35. Zhang A, Zhu QY, Luk YS, Ho KY, Fung KP, Chen ZY. *Life Sci.*, **61**, 383-394 (1997)
36. Hirano R, Osakabe N, Iwamoto A, Matsumoto A, Natsume M, Takizawa T, Igarashi O, Itakura H, Kondo K. *Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **46**, 199-204 (2000)
37. Frei B, Higdon JV. *J. Nutr.*, **133**, 3275S-3284S (2003)
38. Husain SR, Cillard J, Cillard P. *Phytochemistry*, **26**, 2489-2492 (1987)
39. Robak J, Gryglewski RJ. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 837-841 (1988)
40. Boyer RF, Clark HM, LaRoche AP. *J. Inorg. Biochem.*, **32**, 171-181 (1988)
41. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. *Lancet*, **342**, 1007-1011.

42. Casa CL, Villegas I, Alarcon de la Lasta C, Mootilva V and Martin MJ *J. ethnopharm.*, **71**, 45-53 (2000)
43. Sajithlal GB, Chithra P, and Chandrakasan G *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 1607-1614 (1998)
44. Javanovic SV, Steenken S, Tosic M, Morjanovic,B, and Simic MG. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4846-4851 (1994)
45. Terao J, Piskula M, and Yao Q *Arch. Biochem. Biophys.*, **308**, 278-284 (1994)
46. Miyazaki A, Nakayama H, and Horiuci S *Trends Cardiovas. Med.*, **12**, 258-262 (2002)
47. Throckmorton DC, Brogden AP, Min B, Rasmussen H, and Kashgarian M *Kidney Int.* **48**, 111-117 (1995)
48. Malamas MS, Hohman TC and Millen J *J. Med. Chem.*, **37**: 2043-2058 (1994)
49. Okuda J, Miwa I, Inagaki K, Horie T and Nakayama M *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 3807-3822 (1982)
50. Yamada H, Miyata S, Igaki N, Yatabe H, Miyauchi Y, Ohara T, Sakai M, Shoda H, Oimomi M, and Kasuga M *J. Biol. Chem.* **269**: 20275-20280 (1994)
51. Matsuda H., Morikawa T, Togichida I, and Yoshikawa M *Chem. Pharm. Bull.* **50**: 788-795 (2002)
52. Lee HS *J. Agric. Food Chem.* **50**: 7013-7016 (2002)
53. Nakamura N, Obayashi H, and Fujii M *Free Radic. Biol. Med.*, **29**: 17-25 (2000)
54. Ciechanover A *Biochem. Soc. Trans.*, **31**: 474-481 (2003)
55. Gomes-Marcondes MC and Tisdale MJ *Cancer Lett.*, **180**: 69-74 (2002)
56. Ikemoto M, Nikawa T, Takeda S, Watanabe C, Kitano T, Baldwin KM, Izumi R, Nonaka I, Towatari T, Teshima S, Rokutan K, and Kishi K *FASEB J.*, **15**: 1279-1281 (2001)
57. Suarez G, Etlinger JD, Maturana J, and Weitman D *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**: 209-213 (1995)
58. Bulteau AL *J. Biol. Chem.*, **276**: 45662-45668 (2001)
59. Tanaka K. Ii K, Ichihara A, Waxman L, and Goldberg AL *J. Biol. Chem.*, **261**: 15197-15203 (1986)
60. Davies KJA *Biochimie*, **83**: 301-310 (2001)