

遊離アミノ酸の抗糖化作用

杉原 憲¹⁾, 加藤 志郎²⁾¹⁾香川大学大学院 農学研究科 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393)²⁾香川大学 農学部 (〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393)

(受付 2023年8月31日, 受理 2023年9月26日)

Anti-glycation effects of free amino acids

Ken SUGIHARA¹⁾, Shiro KATO²⁾¹⁾Graduate School of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kagawa 761-0795, Japan²⁾Faculty of Agriculture, Kagawa University, 2393 Ikenobe, Miki, Kagawa 761-0795, Japan

Summary

Glycation is a non-enzymatic reaction between the amino group of a protein or amino acid and the carbonyl group of a reducing sugar. Various advanced glycation end products formed through glycation reactions are suggested to be involved in diseases such as age-related diseases and diabetic complications. To inhibit glycation reactions *in vivo* has become an important issue, and various anti-glycation agents have been explored. In this manuscript, the current state and future perspective of free amino acids as anti-glycation agents will be described.

1. タンパク質糖化反応とは

糖化反応とは、タンパク質やアミノ酸のアミノ基と還元糖のカルボニル基との間の非酵素的な反応のことであり、1912年にフランスのLC Maillardにより発見されたことからメイラード反応とも呼ばれる¹⁾。糖化反応は、アミノ基によるカルボニル基に対する求核攻撃から始まる。次いで、 Schiff塩基の形成を経て、アマドリ転移によりアマドリ化合物が形成されるまでを前期反応と言い、酸化反応や脱水反応によりメチルグリオキサールや3-デオキシグルコソンなどのカルボニル化合物を中心とした中間体生成物の生成²⁾を経て、不可逆的に終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs)³⁾と呼ばれる多様な物質が形成されるまでの反応を後期反応と言う。

糖化反応は、食品の調理・加工時に色や香りなどの品質に影響を与えることから、発見当初は食品化学分野において精力的に研究されていた。一方、現在では、血中グルコースによりヘモグロビンが糖化されることで生成するアマドリ化合物である糖化ヘモグロビン A1c (HbA1c) が、健常者と比較して糖尿病患者の赤血球中で有意に増加することが見出されたこと^{4,5)}などを契機とし、生体内糖化反応に対する関心が高まりを見せている。AGEsには蛍光性および架橋の有無によって種々の化合物が存在し³⁾、生体内糖化反応の進行および AGEs の生成は加齢性の疾患や糖尿病合併症などの様々な疾患に関与していることが示唆

されている⁶⁻⁸⁾。また、生体内ではD-グルコースやD-フラクトースの代謝過程において生成されるグリセルアルデヒドとタンパク質間の反応によっても AGEs が生成され⁹⁾、AGEs 生成経路は非常に複雑である (Fig.1)。

2. 抗糖化物質

生体内の糖化反応を抑制するため、糖化反応に対する阻害作用を示す分子 (抗糖化物質) の探索が精力的に行われ

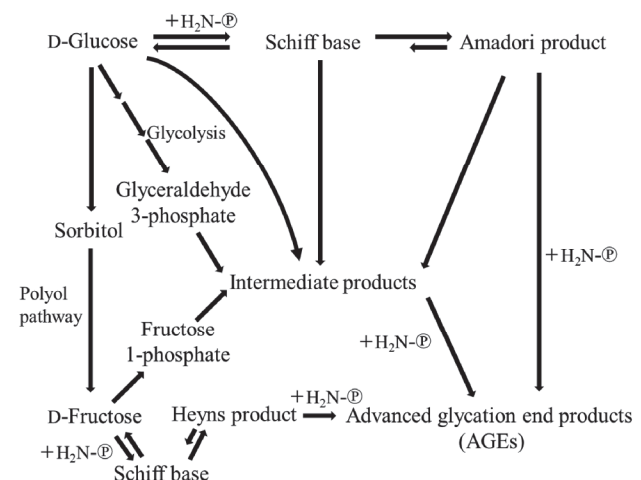


Fig. 1 Glycation pathway and AGEs formation
Intermediate products mainly refer to carbonyl compounds such as glyoxal, methylglyoxal, and glyceraldehyde, and the products vary by pathway.

ている。抗糖化試験において陽性対照としてよく用いられるアミノグアニジンは、糖尿病合併症の治療を目的として開発されていた糖化反応阻害剤である。アミノグアニジンはカルボニル化合物を捕捉することで AGEs の生成を抑制するが¹⁰⁾、大規模臨床試験において貧血や肝障害などの副作用が確認されたことから、現在治療薬としての使用には至っていない。抗糖尿病薬であるメトホルミンは肝臓における糖新生を抑制することで血糖値を下げる作用があり、肥満や2型糖尿病の患者に活用されているが、同時に、 α -ジカルボニル化合物の捕捉作用を示すことも確認されており¹¹⁾、その結果、糖化反応阻害作用を示す。

近年では、天然物由来の成分が注目を集めており、多様な抗糖化物質が同定されている (Table1)。天然物由来の抗糖化物質は植物に由来するものが多く、主にポリフェノール類による作用であることが示唆されている。その抑制機序は、抗酸化活性やジカルボニル種捕捉作用²⁰⁾などによって AGEs の生成経路が阻害されるためであると考えられている。ポリフェノール類以外では、アミノ酸やペプチド類の一部が抗糖化作用を示し、一例を挙げるとジペプチドである L-カルノシンはヒト体内においても生合成される分子であり、安全性の高い抗糖化剤としての可能性が着目されている。アミノ酸やペプチド類は比較的単純な構造からなる分子であることや合成の容易さ、低毒性の観点から抗糖化剤として期待されている²¹⁾。

3. 遊離アミノ酸による抗糖化作用

糖尿病合併症の1つに糖尿病性白内障がある。白内障は眼の水晶体が混濁することで視力障害を引き起こす疾患であり、主として糖化、酸化ストレスおよびポリオール経路の亢進によって糖尿病性白内障は引き起こされ、また進行するとされている²²⁾。水晶体におけるインスリン非依存的なグルコース取り込み、および水晶体クリスタリンの代謝回転がほとんど起こらないことが要因となって、水晶体タンパク質は糖化による影響を受けやすい²³⁾。水晶体タンパク質のクリスタリンの中でも α -クリスタリンは変性タンパク質の凝集を防ぐシャペロンとしての役割を担っており、

糖化に伴う α -クリスタリンの機能喪失はタンパク質の凝集による水晶体の混濁と密接に関連すると考えられる²⁴⁾。Streptozotocin (別名, streptozocin) (STZ) 誘発性糖尿病ラットにおいて L-リジンの経口投与により白内障の発症および進行の遅延が確認されており、これは L-リジンの投与による血清中グルコース濃度の低下と、それに伴う AGEs 形成や凝集の減少によるものであると考えられている¹⁷⁾。また、STZ 誘発性糖尿病ラットに対して D-リジンを皮下接種することで、糖化ヘモグロビンおよび糖化レンズタンパク質の減少が確認されており²⁵⁾、L-アミノ酸の鏡像異性体である D-アミノ酸も糖化反応に対して影響を及ぼす可能性が示唆される。

L-アルギニン、グリシン、L-アラニン、L-アスパラギン酸および L-グルタミン酸もまた、白内障の進行を遅延させ得る可能性が示唆されている。L-アルギニンはグリオキサールやメチルグリオキサールなどのオキシアルデヒドや、デヒドロアスコルビン酸およびその分解生成物であるキロゾンやエリスルロース、デオキシスレオゾン捕捉することで AGEs の産生を抑制すると考えられている¹⁸⁾。グリシンの経口投与により、STZ 誘発性糖尿病ラットにおける血清中グルコース、タンパク質の糖化および AGEs 生成が減少することが示され²⁶⁾、グリシンとグルコース間の非酵素的反応による遊離グルコース濃度の低下が一因となる可能性が指摘されている^{26,27)}。ヒト由来水晶体タンパク質と放射線標識されたグルコースを用いた *in vitro* 糖化反応において、L-アラニン、L-アスパラギン酸または L-グルタミン酸の添加により放射線標識グルコースが結合したタンパク質の減少が認められ、これらのアミノ酸によるタンパク質糖化に対する抑制作用が示されている²⁸⁾。

含硫アミノ酸である L-システインは、糖化反応中間体生成物の一つであるグリオキサールなどのジカルボニル化合物と結合することでタンパク質のカルボニル化を阻害し、タンパク質の糖化を抑制すると考えられる²⁹⁾。

L-ヒスチジンは、*in vitro* で糖化反応による架橋形成を強く抑制することが明らかになっており、第一級アミノ基とイミダゾール窒素の両方が関与している可能性がある¹⁹⁾。

L-カルノシンは β -アラニンと L-ヒスチジンから成るジ

Table 1 Anti-glycation agents from natural sources

Anti-glycation agents	Class	Acting point	Reference
Ginger extract	Polyphenol	Unknown	[12]
Kuromoji extract	Polyphenol	Inhibition of intermediates formation	[13]
Curcumin	Polyphenol	Trapping methylglyoxal	[14]
Pyridoxamine	Vitamin	Trapping intermediates	[15]
Thiamin	Vitamin	Inhibition of early stages of glycation	[16]
L-Lysine	Amino acid	Reducing free glucose concentration	[17]
L-Arginine	Amino acid	Trapping intermediates	[18]
L-Carnosine	Dipeptide	Inhibition of cross-linking AGEs formation	[19]

ペプチドであり、多くの生物体内に存在する。哺乳類においては、筋肉や脳に比較的高濃度で存在し³⁰⁾、筋肉疲労や活性酸素の抑制などの役割を担う。L-ヒスチジンと同様、*in vitro*での糖化反応試験研究によりタンパク質の架橋形成を強く抑制することが明らかになっており、第一級アミノ基とイミダゾール窒素の両方が関与している可能性がある¹⁹⁾。L-カルノシンとL-ヒスチジンは同様のメカニズムで架橋形成を抑制していると考えられるが、その作用はL-ヒスチジンの方が強いと報告されている¹⁹⁾。

4. おわりに

糖化反応により生成される AGEs は現在まで様々な分子の構造が解明されてきてはいるものの、未だ同定されていない AGEs も数多く存在する。また、生体内におけるその生成経路は非常に複雑であり、いまなお AGEs 生成機構の解明および有効かつ安全な糖化阻害剤の開発はその途上にある。このような状況下で、近年、天然物に由来する抗糖化物質の探索が精力的に進められ、アミノ酸やペプチドの抗糖化作用に関する報告も徐々に増えつつあるが、不明な点も多く残る。タンパク質源性アミノ酸である L-アミノ酸のみならず、その鏡像異性体である D-アミノ酸による抗糖化作用に関する報告もあり、その作用機序は興味深い。今後の、アミノ酸やペプチドを用いた糖化反応抑制に関する研究の進展および生理学的な利用の発展が期待される。

文 献

- 1) Maillard LC (1912) Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. C R Acad Sci 154: 66-68.
- 2) Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ (2003) Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. Diabetes 52 (8): 2110-2120.
- 3) Ahmed N (2005) Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin PR 67 (1): 3-21
- 4) Kunkel HG, Wallenius G (1955) New hemoglobin in normal adult blood. Science 122 (3163): 288
- 5) Tessier FJ (2010) The maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. Pathol Biol 58 (3): 214-219
- 6) Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A (1994) Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci 91 (11): 4766-4770
- 7) Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. Proc Natl Acad Sci 91 (20): 9441-9445
- 8) Haus JM, Carrithers JA, Trappe SW, Trappe TA (2007) Collagen, cross-linking, and advanced glycation end products in aging human skeletal muscle. J Appl Physiol 103 (6): 2068-2076
- 9) Takeuchi M, Yamagishi S (2004) Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) *in vivo*. Medical hypotheses 63 (3):453-455
- 10) Thornalley P, George AY, Argirov OK (2000) Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. Biochem Pharmacol 60 (1): 55-65
- 11) Lopez DR, Lecomte M, Moinet G, Patereau G, Lagarde M, Wiernsperger N (1999) Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. Biochem Pharmacol 58 (11): 1765-1773
- 12) Anwar S, Almatroudi A, Allemailem KS, Joseph RJ, Khan AA, Rahmani AH (2020) Protective effects of ginger extract against glycation and oxidative stress-induced health complications: an *in vitro* study. Processes 8 (4): 468
- 13) Simode A, Ashibe B, Matsumi S, Yagi M, Yonei Y (2022) Antiglycation effect and antiviral effect of kuromoji (*Lindera umbellata* Thunb.) extract. Glycative stress research 9 (4): 221-227
- 14) Hu TY, Liu CL, Chyau CC, Hu ML (2012) Trapping of methylglyoxal by curcumin in cell-free systems and in human umbilical vein endothelial cells. Journal of agricultural and food chemistry, 60 (33): 8190-8196.
- 15) Ahmad S, Shahab U, Baig MH, Khan MS, Khan MS, Srivastava AK, Saeed M, Moinuddin (2013) Inhibitory effect of metformin and pyridoxamine in the formation of early, intermediate and advanced glycation end-products. PloS one 8 (9): e72128
- 16) Abdullah KM, Arefeen A, Shamsi A, Alhumaydhi FA, Naseem I (2021) Insight into the *in vitro* anti-glycation and *in vivo* antidiabetic effects of thiamine: Implications of vitamin B1 in controlling diabetes. ACS omega 6 (19): 12605-12614
- 17) Bahmani f, Bathaie SZ, Aldavood SJ, Ghahghaei A (2019) Prevention of α -crystallin glycation and aggregation using L-lysine results in the inhibition of

- in vitro* catalase heat-induced-aggregation and suppression of cataract formation in the diabetic rat. *Int J Biol Macromol* 132: 1200–1207
- 18) Fan X, Xiaoqin L, Potts B, Strauch CM, Nemet I, Monnier VM (2011) Topical application of L-arginine blocks advanced glycation by ascorbic acid in the lens of hSVCT2 transgenic mice. *Mol Vis* 17: 2221–2227
 - 19) Hobart LJ, Seibel I, Yeargans GS, Seidler NW (2004) Anti-crosslinking properties of carnosine: significance of histidine. *Life Sci* 75 (11): 1379–1389
 - 20) Anwar S, Khan S, Almatroudi A, Khan AA, Alsahli MA, Almatroodi SA, Rahmani AH (2021) A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds. *Mol Biol Rep* 48: 787–805
 - 21) Chilukuri H, Kulkarni MJ, Fernandes M (2018) Revisiting amino acids and peptides as anti-glycation agents. *Med Chem Commun* 9(4): 614–624
 - 22) Kyselova Z, Stefek M, Bauer V (2004) Pharmacological prevention of diabetic cataract. *Journal of Diabetes and its Complications*. 18 (2): 129–140
 - 23) Pokupec R, Kalauz M, Turk N, Turk Z (2003) Advanced glycation endproducts in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. *Graef Arch Clin Exp* 241: 378–384
 - 24) Kumar MS, Reddy PY, Kumar PA, Surolia I, Reddy GB (2004) Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: physiological significance and caveats of *in vitro* aggregation assays. *Biochemical Journal* 379 (2): 273–282
 - 25) Sensi M, Rossi MGD, Celi FS, Cristina A, Rosati C, Perrett D, Andreani D, Mario UD (1993) D-Lysine reduces the non-enzymatic glycation of proteins in experimental diabetes mellitus in rats. *Diabetologia* 36: 797–801
 - 26) Bahmani F, Bathaie SZ, Aldvavood SJ, Ghahghaei A (2012) Glycine therapy inhibits the progression of cataract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Vis* 18: 439–448
 - 27) Ramakrishnan S, Sulochana KN (1993) Decrease in glycation of lens proteins by lysine and glycine by scavenging of glucose and possible mitigation of cataractogenesis. *Experimental eye research* 57 (5): 623–628
 - 28) Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R, Arunagiri (1996) Free alanine, aspartic acid, or glutamic acid reduce the glycation of human lens proteins. *Glycoconjugate J* 13: 519–523
 - 29) Mahdaviard S, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Heidarzadhe H (2014) L-Cysteine is a potent inhibitor of protein glycation on both albumin and LDL, and prevents the diabetic complications in diabetic-atherosclerotic rat. *Food Res Int* 62: 909–916
 - 30) Hipkiss AR (2005) Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial?. *Mechanisms of ageing and development* 126 (10): 1034–1039