

〔研究ノート〕

ヒト血清アルブミンの糖化反応による カルボキシメチルリジンの生成箇所の同定

松本 孝・山倉文幸・重永綾子・伊藤美香

Identification of Carboxymethyllysine Forming Sites
by Nonenzymatic Glycation of Human Serum Albumin *in Vitro*

Takashi MATSUMOTO, Fumiyuki YAMAKURA,
Ayako SHIGENAGA and Mika ITOH

Human serum albumin (HSA) is an abundant plasma protein and is modified by glucose in plasma. The incubation of HSA with glucose at 37°C for four weeks resulted in the formation of carboxymethyllysine in 11 sites of lysine residues of HSA (65, 190... I, 199, 233, 313, 378... II, 402, 432, 519, 525, 573... III). The same experiments without glucose showed no carboxymethyllysine formation.

Although early studies established that four lysine residues (Lys199, Lys281, Lys439 and Lys525) had been modified by nonenzymatic glycosylation, carboxymethylations of Lys281 and Lys439 were not detected in this experiment. Most carboxymethylation of lysine residues in HSA was located in domain III in our study.

Key words: human serum albumin (HSA) (ヒト血清アルブミン), glycation (糖化反応),
carboxymethyllysine (CML) (カルボキシメチルリジン)

背 景

タンパク質の翻訳後修飾には、リン酸化などの酵素による修飾と、生体共存物質による非酵素的修飾がある。前者は代謝調節などに重要な機能を発揮するのに対し、後者は酵素の活性中心近傍の場合、生理的には害となる場合が多い。タンパク質はグルコースのような還元糖と共存すると、タンパク質中の側鎖アミノ基、つまりリジン残基と還元糖が非酵素的に反応し Schiff 塩基を形成しアマドリ転移反応を経由して最終的な $N^ε$ -カルボキシメチルリジン (CML) やペントシジンなどの糖化最終産物 (advanced glycation endproducts: AGEs) へ変化する。この非酵素的修飾でよく知られているタンパク質としてヘモグロビン A1c がある。このタンパク質はヒトの

1~2 カ月間の血糖値コントロールを反映しており、ヘモグロビン β 鎖の N 末端バリンの修飾状況を測定することで高血糖状況にあるか否かを判定できる。一方、ヘモグロビンと同様に糖化されグリコアルブミンとなることで知られるヒト血清アルブミン (HSA) は、血清中に約 4 g/dl と血清タンパク質の半分以上を占め、約 2 週間の血糖値コントロールの状況を反映する。HSA は分子量約 66500 Da の単純タンパク質で 585 個のアミノ酸で構成されており、その中に 59 個ものリジン残基がある。

HSA の機能は多彩で、タンパク質合成におけるアミノ酸の運搬、疎水性の脂肪酸、ホルモン、薬物の輸送担体としての機能、浸透圧維持などがあり、様々な生理機能で恒常性の維持に関わっているため、それぞれの結合部位に関する研究も多数報告されて

いる^[1-3]。一方、アルブミンの翻訳後修飾に関する報告も多数存在し、糖尿病患者における HSA では主に 4 カ所 (Lys199, Lys281, Lys439, Lys525) のリジンが糖化を受けると報告されている^[4]。HSA が様々な物質の輸送担体として働く理由としてはその高次構造中にいくつかの結合サイトを持ち、そのサイトとリガンドの親和性によって結合の有無が決まることが挙げられる。HSA の高次構造は三つのドメイン構造 (ドメイン I, ドメイン II, ドメイン III) を持っており、ドメイン II とドメイン III には薬物を結合させるサイト (Arg197~Glu297, Pro384~Tyr497)^[5] が存在する。グルコースは水溶性で血液を介して各組織に運搬されるが、HSA は血清中に多量に存在するタンパク質であることから、そこに存在するリジン残基は、血液中で運搬されるグルコース、すなわち血糖と常に接触し非酵素的糖化反応が起きるのは必然的事態で、糖尿病患者などにおいてはその確率が増すことが知られている。血液中のグルコース量が長時間高い状態に維持されると、タンパク質とグルコースによる非酵素的糖化反応が進む。この非酵素的糖化反応は HSA 自体の高次構造や結合サイトの崩壊を引き起こし、様々な HSA の機能に影響を及ぼすものと思われる。

そこで、筆者らは HSA とグルコースによる *in vitro* の非酵素的糖化反応を起こさせ、HSA のリジン残基の修飾部位と各種結合部位との関連について検討を行うことを本研究の目的とした。そのため、リジン残基の糖化産物として知られている、*N*^ε-カルボキシメチルリジン (CML) の HSA 中における部位を LC-MS/MS を用いて解析した。

実験方法

試薬:

ヒト血清アルブミン (HSA) は和光純薬製 (Lot No. TLL2018), トリプシンはプロメガ製 (V5113), その他の試薬は試薬特級および質量分析用グレードを使用した。

糖化反応:

HSA の糖化は反応混液の最終濃度が HSA (5 mg/ml), グルコース (10 mg/ml) を窒化ナトリウ

ム (0.28%) リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) (26 mM) となるように調製した試料溶液 1.0 ml を 5 本用意し、1 本はそのまま -28°C で凍結保存し、残り 4 本を 37°C, 暗所で反応を開始させ、1 週間ごとに 1 本ずつ取り出し、実験に使うまで -28°C で凍結保存した。コントロールとしては上記反応混液のうちグルコースのみを加えないものを 2 本調製し、同様に 0 週間, 4 週間反応させた試料を調製した。

タンパク質の還元アルキル化およびトリプシン消化:

試料の一次構造解析にあたり、あらかじめ試料の還元カルボキシアミドメチル化を既報^[6]に従って行った。糖化 HSA の 2 mg を 7 M グアニジン塩酸塩, 10 mM エチレンジアミン四酢酸を含む 500 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.5 に置換し、そこにジチオトレイトールを嫌氣的に 10 mg 添加混合し容器内の空気を窒素に置換し 2 時間室温に放置、タンパク質内のジスルフィド結合を還元した。その後 25 mg のモノヨードアセトアミドを加え暗所で 0.5 時間室温放置し還元カルボキシアミドメチル化を行った。還元カルボキシアミドメチル化後、試料を透析チューブに移し 50 mM 炭酸水素アンモニウムに暗所で十分に透析した。透析を完了した糖化 HSA 試料にモル比で 1/100 量のトリプシンを添加し、37°C で 24 時間の加水分解を行った。

LC-MS/MS 分析:

上記のトリプシンで加水分解した糖化 HSA は凍結乾燥後、0.2 ml の超純水に溶解し LC-MS/MS の試料とした。消化ペプチドの MS 分析は AB SCIEX 社製の Triple TOF 4600 型を使用し、イオン化法はエレクトロスプレーイオン化のポジティブモードを用いた。

LC-MS/MS 条件は AB SCIEX 社の Triple TOF 4600 型に島津製作所製の NexeraXR HPLC システム (ポンプ: LC-20ADXR, オートサンプラー: SIL-20AC, システムコントローラー: CBM-20A, カラムオープン: CTO-20AC) を接続し、カラム Capcel Pak C8 Column (SG300 Å 5 μm 4.5×250 mm) (資生堂製) を用い、カラムオープン温度: 25°C, 流速 0.5 ml/min, 0.1% ギ酸を含む水溶液中でアセトニトリル濃度を 0% (0 min) から 45% (50 min) の直線濃度勾配で分析

時間を 50 分間に設定し分離分析した。解析はデータベース: SwissProt とソフトウェア: Mascot (MATRIX SCIENCE 社製) を用いて行った。CML の同定のために、増加質量 (Dynamic modification) である 58.0055 Da をリジン残基に当てはめた。

結果および考察

Fig. 1 には LC で分離された HSA のトリプシン消化ペプチドのクロマトグラフィーを示した。Fig. 1 (a) はグルコースを添加せずに 37°C で 4 週間放置した Control HSA の消化ペプチド, Fig. 1 (b) はグルコースを添加して 37°C で 4 週間放置した

Sample HSA の消化ペプチドのクロマトグラフィーであるが、かなりの箇所でイオン強度や溶出時間の違いが認められた。

そこでグルコース存在下で 0, 1, 2, 3, 4 週間 (以下それぞれ S0, S1, S2, S3, S4 とする), およびグルコース非存在下で 0, 4 週間 (それぞれ C0, C4) 放置した HSA のトリプシン消化物の LC-MS/MS 分析をすると, C0, C4, および S0 の試料では CML は検出されなかったが, S1, S2, S3, S4 の試料ではすべてにおいて CML が検出された (Table 1)。なお, この表に示されるペプチドは Mascot を用いた解析で Score Clear された CML を含むペプチドのみを

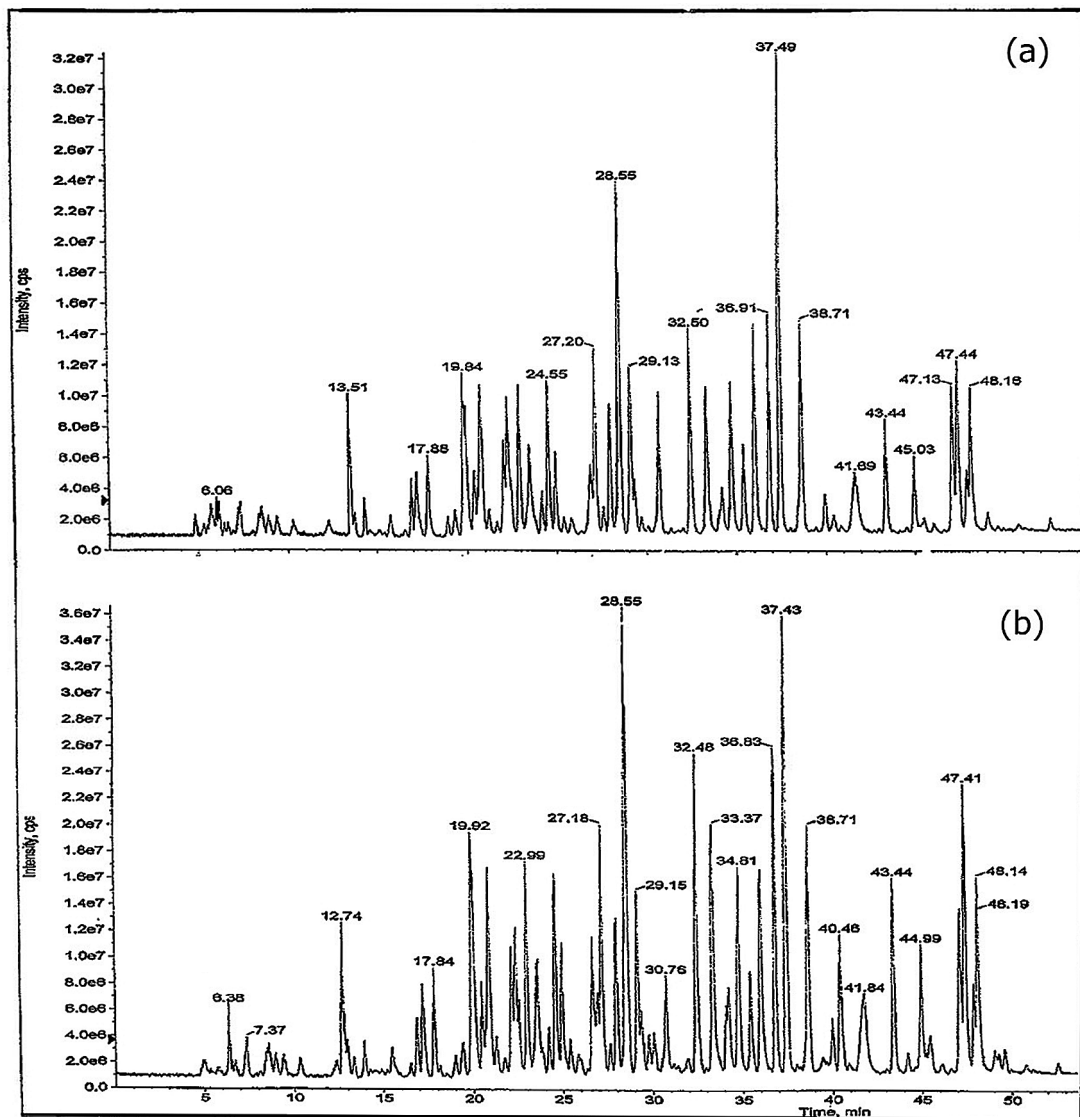


Fig. 1 Total ion current chromatograms of tryptic digests of (a) control HSA (C4) and (b) sample HSA (S4)

Table 1 The location of CML sites detected in glycated HSA (Sample HSA)

Peptid-Start	Sequence	Peptid-End	CMLの位置	S1	S2	S3	S4	Dm
52	TCVADESAENCD cm KSLHTLFGDK	73	64		○			I
187	DEG cm KASSAK	195	190			○		I
198	L cm KCASLQK	205	199			○		II
226	AEFAEVSc cm KLVTDLTK	240	233			○		II
287	SHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES cm K	313	313			○		II
373	VFDEF cm KPLVEEPQNLIK	389	378			○		II
390	QNCELFEQLGEY cm KFQNALLVR	410	402				○	III
429	NLG cm KVGSR	436	432		○	○	○	III
501	EFNAETFTFHADICTLSE cm KER	521	519	○	○	○	○	III
525	cm KQTALVELVK	534	525		○	○	○	III
574	cm KLVAASQAALGL	585	574		○	○		III

cm K: carboxymethyllysine residue, Dm: ドメイン

提示している。

以上の結果を HSA で知られている 3つのドメインに存在するリジン残基に当てはめて考えると, S1ではドメイン III に 1カ所, S2ではドメイン I に 1カ所とドメイン III に 4カ所, S3ではドメイン I に 1カ所とドメイン II に 4カ所とドメイン III に 4カ所, S4はドメイン III のみに 4カ所で, CML が検出され, S2~S4の糖化箇所の再現性から考察すると Lys432, Lys519, Lys525 が糖化されやすいと結論できる。以前の報告^[4]では, 糖尿病患者の血清から得られた HSA の *in vivo*での糖化箇所を, ケトアミン付加体の $^3\text{H-NaBH}_4$ ラベル化産物のトリプシン消化で得たが, それらの糖化部位のうち, 今回の実験では Lys281, Lys439 の CML 化は検出されなかった。また, 今回使用した HSA の検査報告書によると電気泳動法による含量が 98% であること以外, 脂肪酸含量など混入成分の記述はないが, 血中の遊離脂肪酸は 99% 以上は HSA に結合して存在すると言われているので, 実験に用いた HSA に脂肪酸が結合していた可能性は否定できない。その場合, 脂肪酸の結合位置は各ドメインに分布して合計 7カ所存在し, とくに薬物の結合しやすいサブドメインの II A と III A に結合部位が集中している^[1]。そこで, HSA の三次元構造上で今回の糖化されやすいと考えられる Lys432, Lys519, Lys525 を Fig. 2 に示し

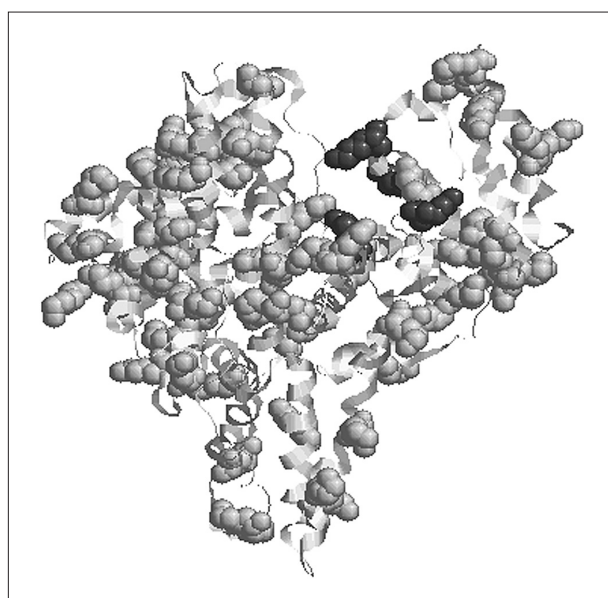


Fig. 2 The three dimensional structure of HSA and the sites of CMLs

The location of lysine residues in HSA are given in spacefill models.

Gray: unmodified lysine

Black: CML

This structure is based on PDB file 1UOR

てみると, CML 化部位はドメイン III B 近傍に集中していた。脂溶性の高いビリルビンはドメイン II A に結合し抗酸化機能の維持に役立っているが^[5], 今回の結果はドメイン III に存在する Lys432, Lys519, Lys525 が CML 化されていたので, HSA で確認されている各サイトにこれ等の脂肪酸やビリルビンが

存在し、ドメインⅢには脂肪酸などの結合サイトがないために、糖化箇所がサイトⅢに集中したのかもしれない。また、近年の報告ではCML化される箇所が Lys12, Lys51, Lys93, Lys159, Lys205, Lys233, Lys276, Lys286, Lys378, Lys414, Lys439, Lys538, Lys545 などの糖化も報告されている^[7]。実験に使用するHSAの状態による違いや、糖化によるAGEsがCMLに限られる訳ではないため、HSAの糖化箇所の同定にはより詳細な検討が必要である。

文 献

- [1] Ananyo A. Bhattacharya, Tim Grüne, Stephen Curry: Crystallographic Analysis Reveals Common Modes of Binding of Medium and Long-chain Fatty Acids to Human Serum Albumin, *J. Mol. Biol.*, 303, 721-732, (2000)
- [2] Jiří Neuzil, Roland Stocker: Free and Albumin-bound Bilirubin Are Efficient Co-antioxidants for α -Tocopherol, Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation, *J. Biol. Chem.*, 269, 16712-16719, (1994)
- [3] Ulrich Kragh-Hansen, Victor Tuan Giam Chuang, Masaki Otagiri: Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin, *Biol. Pharm. Bull.* 25, 695-704, (2002)
- [4] Niggi Ibreg, Rudolf Flückiger: Nonenzymatic Glycosylation of Albumin *in Vivo*; Identification of Multiple Glycosylated Sites, *J. Biol. Chem.*, 261, 13542-13545, (1986)
- [5] 山田尚之, 窪田和幸, 河上麻美, 鈴木榮一郎: アルブミンの化学構造と機能および翻訳後修飾による変化. 栄養—評価と治療 24, 110-115, (2007)
- [6] 滝尾拓士: タンパク質の切断 pp 75-112, 日本生化学会編「新生化学実験講座 第1巻タンパク質Ⅱ一次構造」(1990) 東京化学同人
- [7] Yu Wang, Haiyang Yu, Xiaoli Shi, Zhipu Luo, Donghai Lin, Mingdong Huang: Structural Mechanism of Ring-opening Reaction of Glucose by Human Serum Albumin, *J. Biol. Chem.*,

288, 15980-15987, (2013)

(まつもと たかし 管理栄養学科)

(やまくら ふみゆき 順天堂大学国際教養学部)

(しげなが あやこ 順天堂大学スポーツ健康医科学研究所)

(いとう みか 研究支援機器センター)