

Original article

## Conventional evaluation of glycation with plate reader and its correlation with CML formation

Sayuri Kato<sup>1)</sup>, Ryoji Nagai<sup>1,2)</sup>

1) Laboratory of Food and Regulation Biology, Graduate School of Agriculture, Tokai University

2) Laboratory of Food and Regulation Biology, Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto, Japan,

Glycative Stress Research 2021; 8 (4): 171-174

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## プレートリーダーを用いた簡便なグリケーション進行の評価とCMLとの相関性

加藤紗優里<sup>1)</sup>、永井竜児<sup>1,2)</sup>

1) 東海大学大学院農学研究科食品生体調節学研究室

2) 東海大学農学部バイオサイエンス学科食品生体調節学研究室

### 抄録

メイラード反応は還元糖のカルボニル基とアミノ酸のアミノ基が反応して、食品のみならず生体内でも進行する。本反応の初期にアマドリ転位物、その後、酸化や縮合反応などを経て終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) が生成する。AGEs生成にはアミノ酸の種類、温度などが関係している。本研究では依然として定量が困難であるAGEsをプレートリーダーで簡便に測定し、*N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML) に対する抗体を用いたELISAと比較した。さらに、AGEsの生成が変化することが予測される糖の種類 (ribose, fructose, glucose) や濃度 (5 mM, 30 mM) を代えて、これらAGEsの生成がどのように変化するかを評価した。AGEs生成を蛍光強度で評価した結果、プレートリーダーでインキュベート期間や糖の種類による変化が認められた。さらにその影響は糖質が高濃度であるほど顕著であった。そして簡易的な蛍光測定と抗体を使用したCML測定の間で相関性が確認されたことから、プレートリーダーで簡便にGlycationを評価できると考えられる。

**KEY WORDS:** 終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs)、糖化反応 (glycation)、  
蛍光、*N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML)

## はじめに

食品や生体には様々な糖やアミノ酸、ペプチド、タンパク質が存在する。糖のカルボニル基とアミノ酸のアミノ基が反応することで褐変反応であるメイラード反応が起こる。本反応はおおまかに前期および後期の反応に分けられる。前期反応では、カルボニル基とアミノ基が脱水縮合してシッフ塩基を経てアマドリ転位生成物（アマドリ化合物）が生成され、そこから様々なジカルボニル化合物も生成される。このアマドリ化合物は比較的安定な化合物であるが、後期段階では酸化、脱水反応などにより終末糖化産物（advanced glycation end products: AGEs）が生成される。本反応の進行に影響を及ぼす因子には糖やアミノ酸の種類、温度などが考えられる<sup>1)</sup>。

メイラード反応は食品の加熱のみならず生体内でも起きており、その進行は食品の加熱調理に比較して緩やかであるが、糖尿病では進行が早い。これは糖尿病では健常者よりも血糖が高いためメイラード反応がより進行すること、さらに代謝経路や炎症反応から生成するカルボニル化合物によって迅速に生体AGEsが生成するからである<sup>2)</sup>。

AGEsには蛍光を有する種類があり、それらは一般的に励起波長 370 nm、蛍光波長 440 nm で検出がなされている<sup>3)</sup>。AGEs 含量を評価する方法として蛍光強度の測定、抗AGEs抗体を用いたELISA、機器分析などがあげられるが、AGEs測定は依然として困難な場合が多い。

今回、マイクロプレートリーダーを用いて簡便に蛍光強度でAGEsを評価し、酸化反応で生成することが知られているCML<sup>4,5)</sup>に対する抗体を用いたELISAと比較した。さらに、AGEs生成に影響をおよぼすことが知られている糖の種類や濃度によるAGEs生成の影響を、蛍光法とELISA法で比較した。蛍光性AGEsと非蛍光性のCMLでは測定方法が異なるため、現状では、これらAGEsの生成や阻害を評価するときは、それぞれ別の方法が行われている。そこで、AGEs生成条件に変化を加えた時の蛍光性AGEsとCMLの生成に相関関係が認められるかを検証した。

## 方法

### サンプルの調製

2 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA: Sigma, Darmstadt, Germany) にグルコース、フルクトース (関東化学、東京)、リボース (富士フィルム和光純薬、大阪) のいずれかを加え、糖の濃度が 5 mM、30 mM になるように phosphate buffer saline (PBS) で調製した。これらを 37 °C で 0, 3, 7, 14 日間インキュベート後、-20 度で保存し、後日、蛍光及びELISA法でAGEsを測定した。各糖、濃度、インキュベート時間を3サンプルずつ調整した。

### 蛍光測定

インキュベートした各サンプルを蒸留水を用いて10倍希釈し、200  $\mu$ L ずつ 96 ウェルプレート (Tecan Greiner 96 Flat Transparent, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) に添加して、蛍光プレートリーダー (Tecan infinite M PLEX, テカンジャパン、神奈川県川崎市) にて励起波長 370 nm、蛍光波長 470 nm で蛍光測定した。

### ELISA

インキュベートしたサンプルを 1  $\times$  PBS を用いて BSA 1  $\mu$ g/mL に希釈して 96 well プレート (Clear Flat-Bottom Immuno Nonsterile 96-Well Plates, Thermo, Massachusetts, USA) に添加して、常法にしたがって CML を測定した<sup>6)</sup>。具体的には、抗原を冷蔵で 1 日静置したのち、0.5 % ゼラチン (Sigma, Darmstadt, Germany) で Blocking 後、1 次抗体として monoclonal anti-CML antibody (0.5  $\mu$ g/mL) をプレートに 100  $\mu$ L 添加して 1 時間室温で静置した。次に Horseradish peroxidase 標識した 2 次抗体 Goat antibody Mouse IgG (KPL, USA) をプレートに 100  $\mu$ L 添加して 1 時間室温で静置後、OPD (富士フィルム和光純薬、大阪) を用いて発色した。6 分間発色した後、2 M 硫酸で反応停止させ、TECAN infinite M PLEX にて吸光度 492 nm で測定した。

### 統計解析法

フリー統計ソフト EZR (Easy R)<sup>7)</sup> を用いてボンフェローニ解析を行って有意差検定を行った。

## 結果

### 蛍光によるAGEs生成の比較

蛍光測定の結果から、六単糖のグルコース、フルクトースよりも五単糖のリボースで蛍光性AGEsの生成は増加し、さらに濃度依存的、時間依存的な増加が認められた (Fig. 1-a, b)。さらに同じ六単糖でもグルコースよりフルクトースで高い蛍光強度を示した。14 日目の各サンプルにおいて多重検定 (ボンフェローニ) を行った結果、5 mM の濃度では、(1) リボースとフルクトースの間、(2) リボースとグルコースの間、(3) フルクトースとグルコースの間で蛍光強度に有意差を認めた。30 mM の濃度では、(1) リボースとフルクトースの間、(2) リボースとグルコースの間で蛍光強度に有意差を認めた。

### CML 生成の比較

5 mM の糖濃度において、CML は六単糖のグルコース、フルクトースよりも五単糖のリボースで生成が増加し、30 mM でも同様の結果が得られた (Fig. 2-a, b)。つまり、CML 生成は糖の濃度依存的、時間依存的に増加すること

が明らかとなった。14日目の各サンプルにおいて多重検定 (ボンフェローニ)を行った結果、5 mMの濃度では、(1)リボースとフルクトースの間、(2)リボースとグルコースの間でCML含量に有意差を認めた。30 mMの濃度では、5 mMの時と同様のグループ間でCML含量に有意差を認めた。

### 蛍光による AGEs 生成と CML 量の比較

蛍光性 AGEs と CML の生成量に相関性があるのか、インキュベート14日間行ったサンプルを用いて評価した。5 mMと30 mMの糖濃度のリボースとフルクトースでは強い相関性がみられた (Fig. 3-a, b, e, f)。さらに高濃度のリボースとフルクトースではより強い相関性が示された。対してグルコースでは相関性が認められなかった (Fig. 3-c, d)。

### 考察

通常AGEsを測定するときは蛍光検出器を備えたHPLCや質量分析装置を用いることが多いが、機器の維持費や、サンプルの前処理が多段階必要である。それに対して今回はプレートリーダーにて蛍光性AGEsを低コストで簡便に一度に多検体の測定ができた。

蛋白のGlycationに伴い蛍光強度が増加し、蛍光検出器でAGEs含量を評価することが一般的に行われている。しかしながら、これまでの蛍光測定では3 mL程度のサンプルをキュベットに移して蛍光検出器で測定する必要があった。今回、0.2 mg/mLの反応溶液を0.2 mL用いて蛍光強度を測定し、蛍光強度が時間依存的に増加することが確認されたことから、プレートリーダーでAGEsが

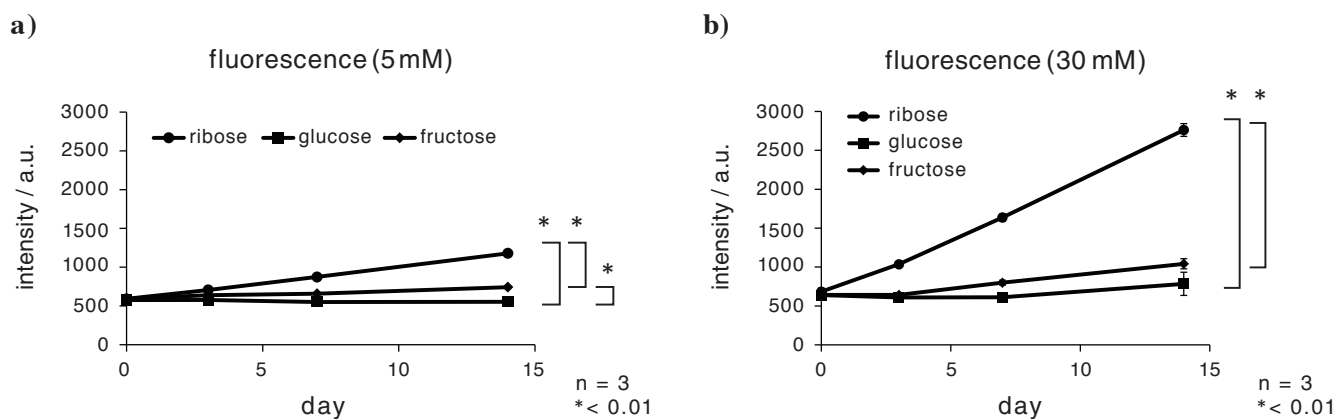


Fig. 1. Measurement of fluorescent AGEs in fluorescence assay.

**a)** Fluorescence AGE intensity of 5 mM ribose, 5 mM glucose, 5 mM fructose; **b)** Fluorescence AGE intensity of 30 mM ribose, 30 mM glucose, 30 mM fructose. Bar indicates standard deviation. \*  $p < 0.01$  by Bonferroni's multiple test,  $n = 3$ , performed on each sample at day 14 using EZR software. AGEs, advanced glycation end products.

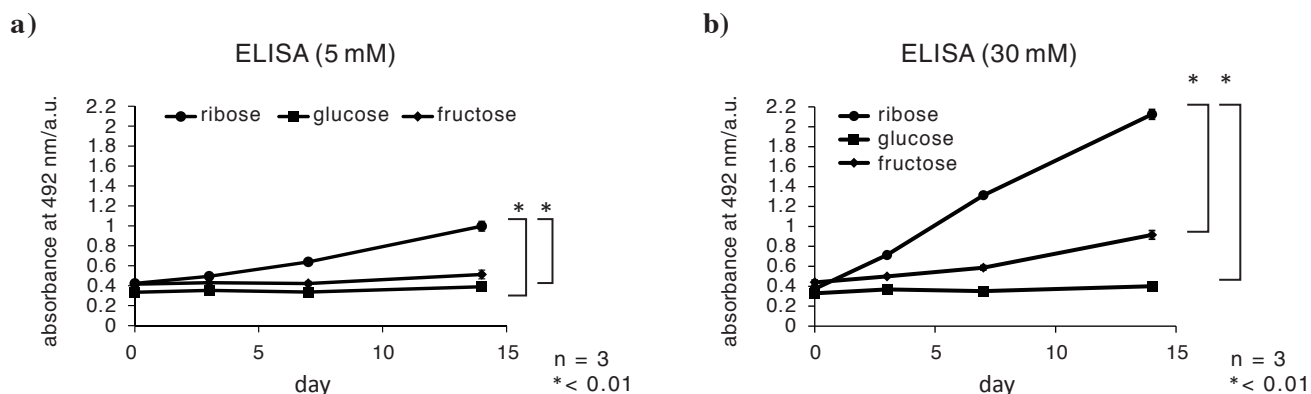
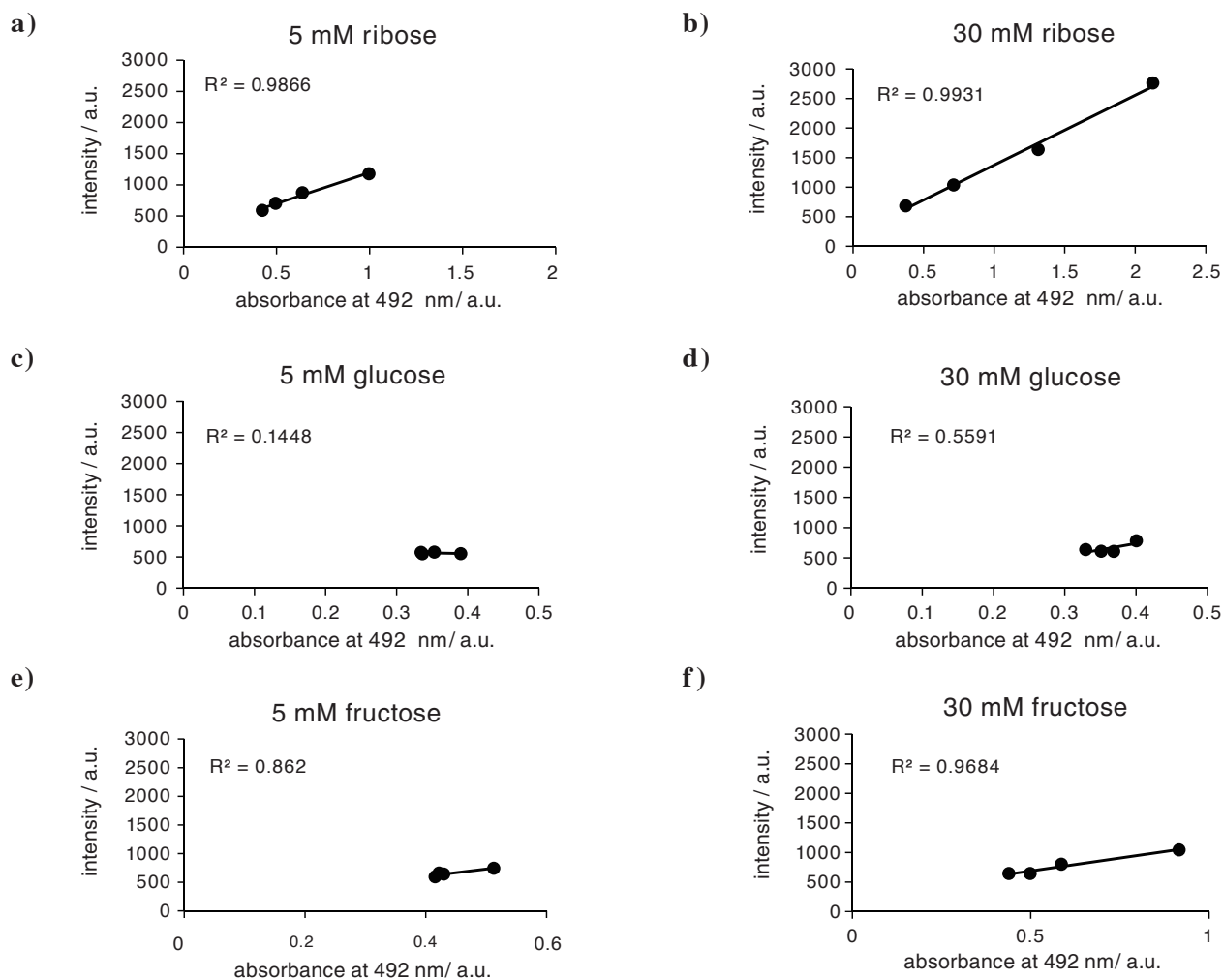


Fig. 2. CML measurement in ELISA.

**a)** CML formation of 5 mM ribose, 5 mM glucose and 5 mM fructose; **b)** CML formation of 30 mM ribose, 30 mM glucose and 30 mM fructose. Bar indicates standard deviation. \*  $p < 0.01$  by Bonferroni's multiple test,  $n = 3$ , performed on each sample at day 14 using EZR software. CML,  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine; ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay.



**Fig. 3. Correlation between results of fluorescent AGEs and CML.**

**a)** 5 mM ribose; **b)** 30 mM ribose; **c)** 5 mM glucose; **d)** 30 mM glucose; **e)** 5 mM fructose; **f)** 30 mM fructose. Samples incubated for 14 days with each sugar and concentration shown in Fig. 1 and Fig. 2 were used for evaluation. AGEs, advanced glycation end products; CML,  $N^{\epsilon}$ -(carboxymethyl) lysine.

評価できていると考えられた。さらに抗CML抗体を用いたELISAの結果の相関性も確認されたことから、今回の手法で、これまでより簡便にAGEs生成が評価できていることが確認された。今後、本手法はAGEs生成阻害剤の探索などに有用であると期待される。

蛍光測定より、AGEsの生成が糖濃度や反応時間に依存して促進されること、さらに六単糖よりも五単糖においてAGEs生成が増加したことが示された。

ELISA法におけるCML生成では、リボース、グルコース、フルクトースにおいて濃度依存的、時間依存的にCMLの生成量が増加したことが示された。つまり蛍光性AGEsと同様に六単糖よりも五単糖においてCMLの生成量が増加したことが示された。

そして、蛍光性AGEsとCMLではリボースとフルクトースでは強い相関性が示された。さらに、糖の濃度が高いほどより強い相関性が示されたことから、糖尿病のような高血糖状態では蛍光性AGEsとCMLの生成量が相関する可能性が高い。

今回データは載せていないが、抗体を用いたELISA法でMG-H1も検証したが、あまり変化は認められなかった。

以上のことから、蛍光性AGEsは96ウェルのプレートリーダーで簡便に評価可能であること、CMLと相関性があることが確認された。本法は大量検体の測定が必要な、AGEs生成阻害剤の探索などに活用できると思われる。

## 利益相反申告

すべての著者は、利益相反のないことを表明する。

## 謝辞

本研究は、永井竜児が日本学術振興会の科学研究費補助金(助成番号: 20K05895)を受けて実施した。

## 参考文献

- 1) Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, et al. Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*. 1995; 34: 3702-3709.
- 2) Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of *N*<sup>ε</sup>-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem*. 1986; 261: 4889-4894.
- 3) Suehiro A, Uchida K, Nakanishi M, et al. Measurement of urinary advanced glycation end-products (AGEs) using a fluorescence assay for metabolic syndrome-related screening tests. *Diabetes Metab Syndr*. 2016; 10(1 Suppl 1): S110-S113.
- 4) Nagai R, Ikeda K, Higashi T, et al. Hydroxyl radical mediates *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234: 167-172.
- 5) Nagai R, Unno Y, Hayashi MC, et al. Peroxynitrite induces formation of *N*<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: Novel pathways for protein modification by peroxynitrite. *Diabetes*. 2002; 51: 2833-2839.
- 6) Nagai R, Fujiwara Y, Mera K, et al. Immunochemical detection of *N*<sup>ε</sup>-(carboxyethyl)lysine using a specific antibody. *J Immunol Methods*. 2008; 332: 112-120.
- 7) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013; 48: 452-458.