

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K02263

研究課題名(和文) 飲食品中終末糖化産物(AGEs)の分布状況およびAGEs形成に及ぼす因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of distribution of advanced glycation end-products (AGEs) in food and drink and factors on the formation of AGEs

研究代表者

能見 祐理 (Nomi, Yuri)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：20614887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メイラード反応の後期段階で生成する終末糖化産物(Advanced Glycation End-products; AGEs)は様々な食品に含まれており、慢性疾患の発症に関与する可能性がある。本研究ではメイラード反応生成物を包括的に評価し、食品中AGEsの生成に及ぼす因子の解明を試みた。モデル系での検証により、糖質の還元能だけでなく、糖質の種類および結合様式が特定のAGEsとその前駆体である α -ジカルボニル化合物(α -DCs)形成に関与することが示唆された。また、飲食品での検証により、焼成パンにおけるAGEsの生成経路を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では多種類のAGEsや α -DCsをモニターできる分析系を新たに構築し、AGEsおよび関連成分(糖質、アミノ化合物、アマドリ化合物、 α -DCs)を包括的に解析することが可能となった。モデル系と実際の飲食品での検証を組み合わせることで、AGEs生成に関与する因子を新たに複数同定することができた。本研究で見出されたAGEs生成メカニズムに関する知見は、AGEs低減に向けた方策を講じるための一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGEs) produced in the late stages of the Maillard reaction are contained in various foods and are possible to be involved in the development of chronic diseases. In this study, we comprehensively evaluated the Maillard reaction products and attempted to elucidate the factors that influence the production of AGEs in foods. Validation using model reaction systems showed that not only the reducing ability of sugars, but also the type and binding mode of sugars are involved in the formation of specific AGEs and their precursors, α -dicarbonyl compounds (α -DCs). In addition, validation using foods led us to clarify formation mechanism of AGEs contained in baked bread.

研究分野：食品化学

キーワード：メイラード反応 終末糖化産物(AGEs) α -ジカルボニル化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ基とカルボニル基の非酵素的な褐変反応であるメイラード反応は食品の加工、貯蔵の工程で起こることが知られており、この反応の後期段階で生成する終末糖化産物 (Advanced Glycation End-products; AGEs) は様々な食品に含まれる。食事由来の AGEs は糖尿病合併症やアルツハイマー病などの慢性疾患の発症に関与する可能性が指摘されている。食事性 AGEs の生理作用について精確に評価するには、適切な分析手法を確立し、できるだけ多種類の AGEs 構造に関するデータを得ること、そして共存する他成分や中間体の動態に関する情報を加味した上で食事性 AGEs の形成因子を明らかにする必要があると考えられるが、十分に検証されていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、様々な飲食品中の AGEs の動態解析を通じて AGEs の分布状況を明らかにするとともに、その形成に関与することが予想される共存する食品成分 (糖・脂質およびその分解物) や AGEs 前駆体とされる糖分解物 -ジカルボニル化合物 (α -DCs) についても同時に解析することで AGEs 生成に及ぼす因子を解明することを目的とした。本研究で測定した主な AGEs 構造体を Fig. 1 に示す。

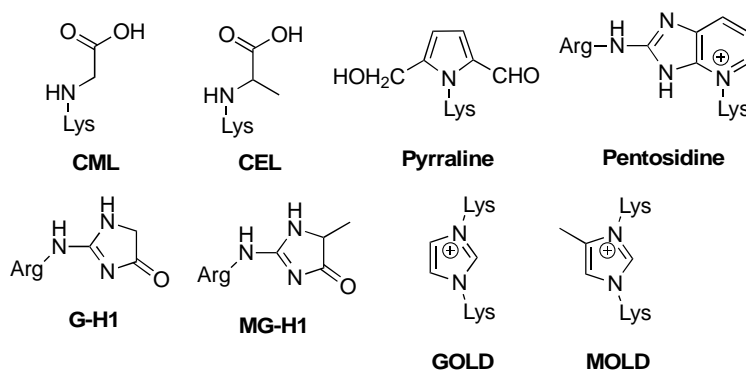


Fig. 1 本研究で測定した主な AGEs

3. 研究の方法

(1) 各種成分の分析法構築の検討

AGEs および関連成分 (糖質、アミノ化合物、アマドリ化合物、 α -DCs) の分析法を構築した。特に AGEs 前駆体の α -DCs については、単糖由来のみならず二糖由来の α -DCs も評価できる分析系の構築を検討した。

(2) モデル系および飲食品での検証

上述の構築した分析系を用いて、モデル系および飲食品での検証を試みた。モデル系においては、11種の糖質 (グルコース、ガラクトース、フルクトース、スクロース、ラクトース、1-ケストース (GF₂)、ニストース (GF₃)、イヌリン加水分解物 (IOS)、95%フルクトオリゴ糖 (FOS)、99%ガラクトオリゴ糖 (GOS)) を用いて、アミノ酸 (Lys, Arg) およびタンパク質 (カゼイン、ホエイ) モデル反応系を用いて各種成分の分析を行い、検証した。特に、ホエイタンパク質モデル反応系については、メイラード反応の初期・中期・後期段階のマーカー物質の解析を通じて AGEs 形成に関与する因子の解明を試みた。

また、固体・ペースト食品の前処理方法について検討を行い、最終的に酵素加水分解法を用いてタンパク質結合型 AGEs を分析する方法を確立した。本手法を用いて、加工・貯蔵によるメイラード反応亢進が予想されるいくつかの飲食品について、各種成分の分析を行った。

4. 研究成果

(1) 各種成分の分析法の構築

CML, MG-H1, pyrraline などを含め 8 種の AGEs をモニターできる LC/MS/MS 分析系とともに、極性物質を保持しやすいカラムと MS を組み合わせて二糖由来の α -DCs についても評価できる LC/MS 分析系を新たに構築し、これら化合物の定性と定量が可能となった。また、AGEs 形成に寄与する可能性が高い糖質やアミノ酸などの分析システムも新たに構築した。

(2) モデル系での検証

上述の分析法構築により AGEs 生成機構について詳細に解析することが可能になったため、簡便なモデル系を用いた単糖、二糖、オリゴ糖を含む各種糖質の AGEs 生成能評価を行った。結果を Fig. 2 に示す。

測定した AGEs のうち、CML, CEL, G-H1, MG-H1 の 4 種が検出された。単糖類(グルコース、フルクトース、ガラクトース)は CML, G-H1, MG-H1 の生成量が多かった。二糖類ではスクロースで CML, CEL, G-H1 が生成されたが、その生成量は他の糖質と比較すると非常に少なかった。一方、マルトースとラクトースは CML に偏った生成傾向がみられた。オリゴ糖類では GF2, GF3, 95%FOS で CML, CEL, G-H1, MG-H1 が生成されたが、その生成量は少ない傾向がみられた。一方、IOS は特異的に CEL, MG-H1 を生成していた。また、99%GOS は CML に偏った生成傾向がみられた。糖質の種類によって特異的な AGE 生成傾向がみられ、糖質の還元能だけでなく、糖質の種類および結合様式が特定の AGEs 形成に関与することが示唆された。

次に、AGEs 前駆体とされる α -DCs 生成量の比較結果を Fig. 3 に示す。AGEs の結果と同様に、単糖類で α -DCs 生成量が多く、還元能を有しない Suc, GF2, GF3, FOS では生成が少なく、特定の α -DCs を顕著に生成するオリゴ糖が見出された。Fru が多数結合した IOS はメチルグリオキサール(MG)やトリオゾン(TRIO)を多く生成した。IOS は特異的に CEL, MG-H1 を生成していたが、どちらの AGEs も MG を前駆体として生成することが報告されていることから、IOS は MG の生成を介して CEL や MG-H1 を多く生成したと考えられた。

Gal が多数結合した GOS ではデオキシヘキソソソ(DH)、特に 3-デオキシグルコソソ(3-DG)が多く生成していた。3-DG は CML の前駆体であることが報告されていることから、GOS は 3-DG の生成を介して CML を特異的に生成したと考えられる。GOS のみの加熱においても多量の DH が生成していたことから、生成した DH のほとんどがカラメル化により生成したと考えられる。また、グリオキサール(GO)と MG についても GOS のみを加熱した際にも生成したため、同様にカラメル化により生成したと考えられる。デオキシペントソソ(DP)は 1-4 グリコシド結合をもつオリゴ糖の特異的分解物であることが報告されており、今回用いた GOS は大半が 1-4 結合で構成されているため、DP はオリゴ糖特異的な分解物である可能性が高い。以上のように、糖質の種類ごとに α -DCs および AGEs の特異的な形成が見られたことから、これら分析種をマーカー物質として加工食品の品質評価に応用できる可能性が見出された。

調製粉乳を模したタンパク質モデル系においても、おおむねアミノ酸モデル系と同様の傾向が見られた。また、GOS から 3-DG が特異的に生成する要因を特定することができた (data not shown)。3-DG の形成要因を排除することで、GOS から顕著に生成される CML を抑制できる可能性が見出された。さらに、これまで解析がなされなかった特定の AGE 種の顕著な増加が確認された (data not shown) ことから、モニターする AGE 種の妥当性について今後検証する必要がある。

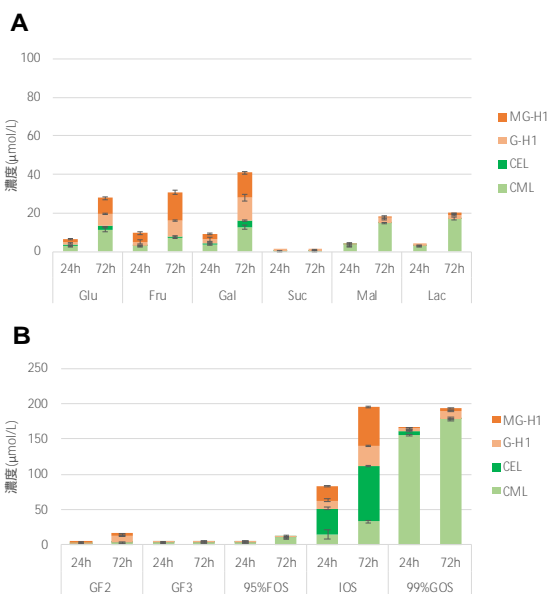


Fig. 2 アミノ酸モデル系 (pH 7.4, 60)における各種糖質の AGEs 生成量の比較
(A) 単糖・二糖類 (30 mM), (B) オリゴ糖 (60 mg/ml)の濃度で実施。*: p<0.05, **: p<0.01 vs Glucose

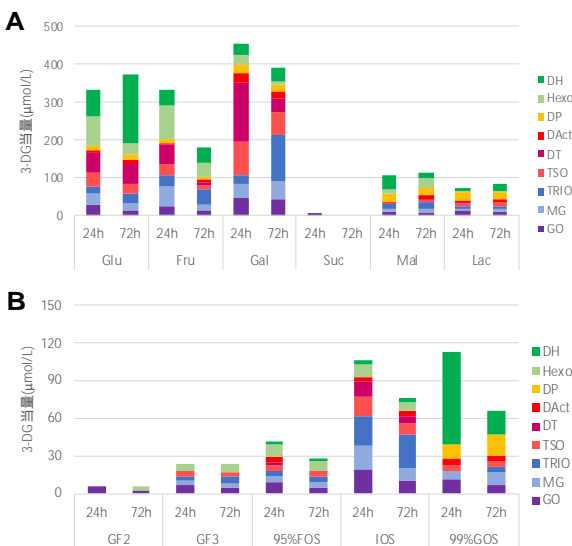


Fig. 3 アミノ酸モデル系 (pH 7.4, 60)における各種糖質の α -DCs 生成量の比較
(A) 単糖・二糖類 (30 mM), (B) オリゴ糖 (60 mg/ml)の濃度で実施。

(3) 飲食品における検証

固体・ペースト食品の前処理方法について検討を行い、最終的に酵素加水分解法を用いてタンパク質結合型 AGEs を分析する方法を確立した。本手法を用いて、加工・貯蔵によるメイラード反応亢進が予想されるいくつかの飲食品について、各種成分の分析を行ったところ、焼成パンにおける AGEs の生成経路を明らかにすることができた (Fig. 4)。焼成パン中に含まれる AGEs の形成には脂質ではなく糖質の関与が高いことが明らかとなったため、加工形態に応じて糖質の種類を選択し、糖質の安定性を高める方策を講じることが AGEs 低減に繋がると考えられる。

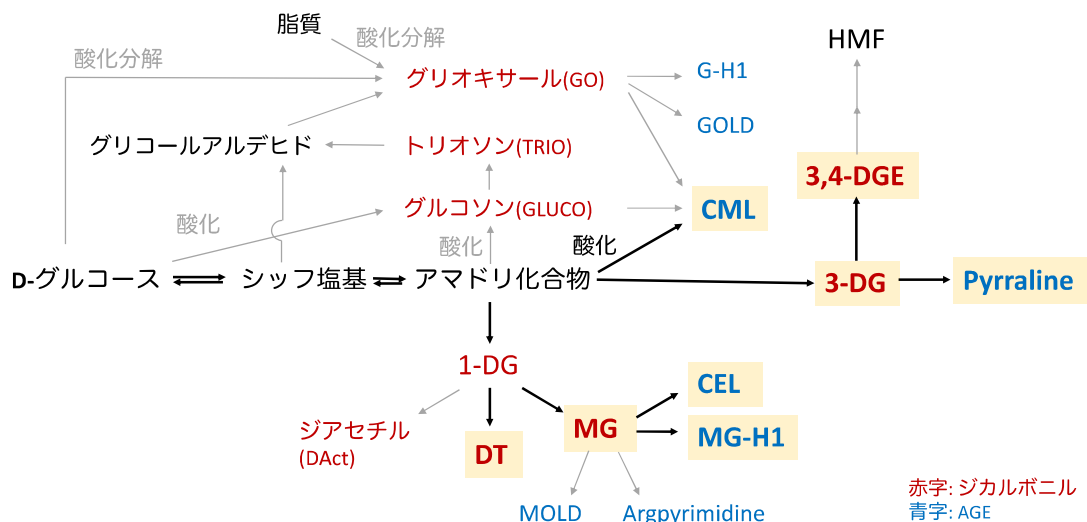


Fig. 4 予測されるメイラード反応機構と焼成パンにおける主要反応経路

焼成パン中に検出された AGEs および α -DCs を黄色バーで示すとともに、焼成パンにおける反応経路を太字で示した。

各種オリゴ糖を含む市販の調製粉乳の AGEs および α -DCs の分布を調べた結果、 α -DCs についてはモデル系と同様の生成傾向が見られたが、AGEs については含まれるオリゴ糖の違いによる差は見られなかった。各社製造法や貯蔵期間が異なるため、一概に比較することが困難であった。食品中 AGEs の形成には様々なファクターが関わっていると推測される。

以上のように、モデル系と実際の飲食品での検証を組み合わせ、AGEs のみならず関連成分についても広範に解析することで、AGEs 形成メカニズムに関する有用な知見が得られることが明らかとなった。ただし、飲食品は夾雑成分が多種多様に存在するため、食品ごとに特徴や性質を考慮した上での適切な前処理法の開発が必須となる。タンパク質に結合した AGEs 構造体を遊離させるのに、反応条件がマイルドである酵素加水分解法が最も適しているが、必要な酵素が非常に高価かつ入手しにくいいため、AGEs 測定サンプル数に制限がかかってしまうことになった。当初の予定ではより広範に様々な飲食品の測定を試みる予定であったが、上記の理由で測定する飲食品を絞っての検討を余儀なくされた経緯がある。妥当性を担保できるハイスループットな前処理および分析手法の開発によって、多くの研究機関で測定が可能となり、多角的な知見が数多く得られることで研究がより進展すると期待される。メイラード反応は「カルボニル化合物」と「アミノ化合物」というたった 2 つの発物質から数万以上の多種多様な生成物が形成され非常に複雑な反応機構を示すため、多数のデータを包括的に処理できる情報科学を活用したアプローチも今後求められてくるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomi Yuri、Otsuka Yuzuru	4. 巻 10
2. 論文標題 Isolation, identification, and proposed formation mechanism of a novel hydrophilic compound formed by Maillard reaction between pyridoxamine and pentose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58727-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 OTSUKA Yuzuru、UETA Etsuko、NOMI Yuri	4. 巻 56
2. 論文標題 AGEsの精密分析と食品化学，医学への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 KAGAKU TO SEIBUTSU	6. 最初と最後の頁 242～243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1271/kagakutoseibutsu.56.242	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森友樹，久代孝一，能見祐理，松本 均
2. 発表標題 各種糖質の終末糖化産物(AGEs)の生成能評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 能見祐理，山崎健人，佐藤眞治，松本均
2. 発表標題 カルノシンとキシロースのメイラード反応で形成される低分子黄色色素の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------