

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：32670

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700925

研究課題名（和文） 食品中メイラード反応生成物の生成機構および生体内における消化・吸収性に関する解明

研究課題名（英文） Elucidation of formation mechanism, digestion and absorption of Maillard reaction compounds formed in food

研究代表者

山口 敬子（YAMAGUCHI KEIKO）

日本女子大学・家政学部・助教

研究者番号：00440074

研究成果の概要（和文）：ペプチドのグルコース修飾パターンにおいては、グルコース修飾ペプチド LEKFD よりピリリウムイオンまたはヒドロキシメチルフリリウムイオンの生成の可能性が示唆された。食品中における AGEs の生成については、牛ひき肉をモデルとして用いた結果、フライパン焼きでは CML や蛍光性物質の生成が認められたがオープン焼きではあまり認められなかった。グルコース修飾タンパク質の *in vitro* および *in vivo* における消化・吸収性については、*in vitro* では修飾タンパク質が未修飾よりも消化しにくい結果であったのに対し、*in vivo* では修飾タンパク質が未修飾よりも速やかに消化・吸収された。

研究成果の概要（英文）：A pyrylium or hydroxymethyl furylium ion of glucose-modified peptide LEKFD seem to be produced by the Maillard reaction. CML content and fluorescence intensity in meat increased when it was pan-broiled. The rate of increasing CML and fluorescence in baked meat was lower than that of pan-broiled meat. *In vivo*, it is estimated that modified  $\beta$ -Lactoglobulin was digested more easily than that of native  $\beta$ -Lactoglobulin. However, it was not observed *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品栄養学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：メイラード、糖化ペプチド、糖化タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

メイラード反応生成物のなかには疾病との関わりが深い物質があり、近年、特に注目されているものが生体内 AGEs（Advanced glycation end products）である。生体内 AGEs は老化や糖尿病合併症を引き起こす因子であることから、食品中 AGEs も生体内 AGEs と同様に疾病の進展に関与する可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、（1）乳清タンパク質の一種

である  $\beta$ -ラクトグロブリンの構造中に含まれるペプチド（LEKFDKALKA、LEKFD）を用いて食品中におけるメイラード反応生成物の生成メカニズムの解明を行い、さらに、（2）牛ひき肉を用いて食品中 AGEs の生成についても解明を行った。また、（3） $\beta$ -ラクトグロブリンを用いてメイラード反応生成物の消化・吸収性について検討を行った。

## 3. 研究の方法

（1）ペプチド LEKFDKALKA、LEKFD のグルコース修飾パターン

ペプチド LEKFD および LEKFDKALKA を用い、D-グルコースと共に 110°C、0~24 時間、pH6.7 の条件下で反応させ、グルコース修飾ペプチドとした。HPLC、ESI-MS、MALDI-MS を用いて分析を行い、グルコース修飾パターンの解析を行った。

(2) 2種の調理法による牛ひき肉中 AGEs の生成量

牛ひき肉を用いてオープン焼き (170°C) とフライパン焼き (230°C) の2種の調理法により 0~30 分間加熱した。AGEs の一種である CML を ELISA 法により測定することにより、どの程度 AGEs が含まれているかを解明した。また、AGEs は蛍光性を有するものがあるため、蛍光光度計 (Ex 370nm, Em 440nm) を用いて蛍光性の度合いも明らかにした。

(3) グルコース修飾β-ラクトグロブリンの消化・吸収性

①グルコース修飾タンパク質の修飾程度

β-ラクトグロブリンを用い、D-グルコースと共に 50°C、RH75%、7 日間反応させ、グルコース修飾タンパク質とした。一方、未修飾タンパク質の調製法は、β-ラクトグロブリンのみを 50°C、RH75%、7 日間反応させた。アミノ酸アナライザーを用いて、修飾反応におけるリジンの減少率をβ-ラクトグロブリンの修飾率とみなし、修飾程度を測定した。

②グルコース修飾タンパク質の in vitro における消化・吸収性について

①において調製した未修飾タンパク質および修飾タンパク質は、ペプシン 3 時間、パンクレアチン 20 時間により消化し、生成した消化物を限外ろ過により分子量 3000 以下、3000~10000、10000 以上に分画した。その後、凍結乾燥して収量を量った。また、HPLC を用いて各画分をそれぞれ分析した。

③グルコース修飾タンパク質の in vivo における消化・吸収性について

体重約 200g の Wistar 系雄ラットにタンパク質を含まない飼料を与えて 3 日間の予備飼育を行った。予備飼育後 24 時間絶食させ、未修飾および修飾タンパク質 250mg/0.8ml を経口投与したものをそれぞれ未修飾群、修飾群とした。また、水を 0.8ml 経口投与したものをコントロール群とした。それぞれの群を試料投与してから 20 分、40 分、60 分後に解剖し、胃・小腸上部・小腸下部において残存する内容をそれぞれ回収した。消化管内残存物を限外ろ過により分子量 3000 以下、3000 以上に分画した後、凍結乾燥を行い、収量を量った。また、HPLC を用いて各画分の残存物をそれぞれ分析した。

#### 4. 研究成果

(1) グルコース修飾ペプチドの修飾反応の解析

①ペプチド LEKFDKALKA のグルコース修飾パターン

HPLC 分析を行った結果、グルコースの結合数および結合部位の異なる複数の修飾ペプチドが生成していることが示唆された (図 1)。

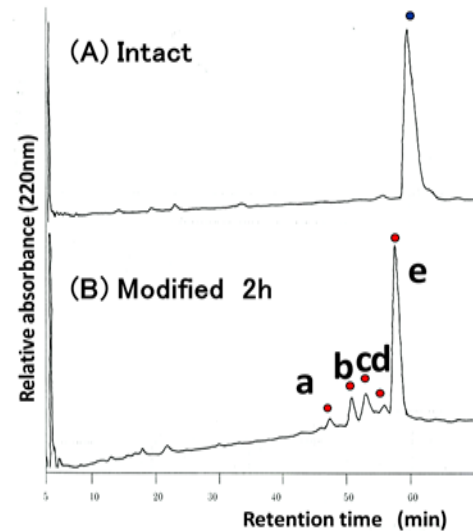


図 1 未修飾・修飾ペプチド LEKFDKALKA の HPLC 分析

Intact : 未修飾ペプチド

Modified 2h : 修飾ペプチド 2 時間加熱

また ESI-MS 分析を行った結果、ペプチド 1 分子あたりにグルコースが 1 分子および 2 分子によって修飾されたペプチドの存在が明らかとなった (図 2、3)。

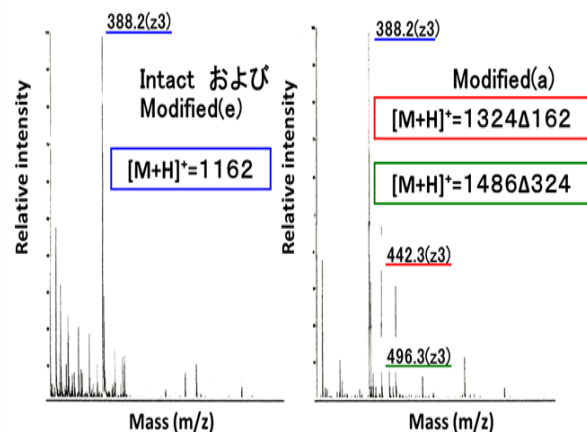


図 2 未修飾・修飾ペプチド LEKFDKALKA の ESI-MS による質量測定

Intact および Modified(e) : 未修飾ペプチドおよび修飾ペプチドのピーク e

Modified(a) : 修飾ペプチドのピーク a

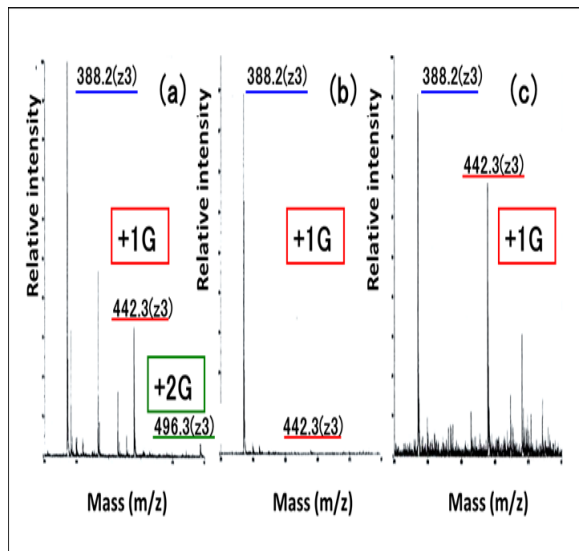


図3 修飾ペプチド LEKFDKALKA のピーク a、b、c の ESI-MS による質量測定  
 +1G: ペプチド 1 分子あたりグルコースが 1 分子結合  
 +2G: ペプチド 1 分子あたりグルコースが 2 分子結合

②ペプチド LEKFD のグルコース修飾パターン  
 HPLC 分析および ESI-MS 分析を行った結果、ペプチド 1 分子あたりにグルコース 1 分子によって修飾されたペプチドの存在が明らかとなり、さらにピリリウムイオンまたはヒドロキシメチルピリリウムイオンである可能性が示唆された (図 4)。

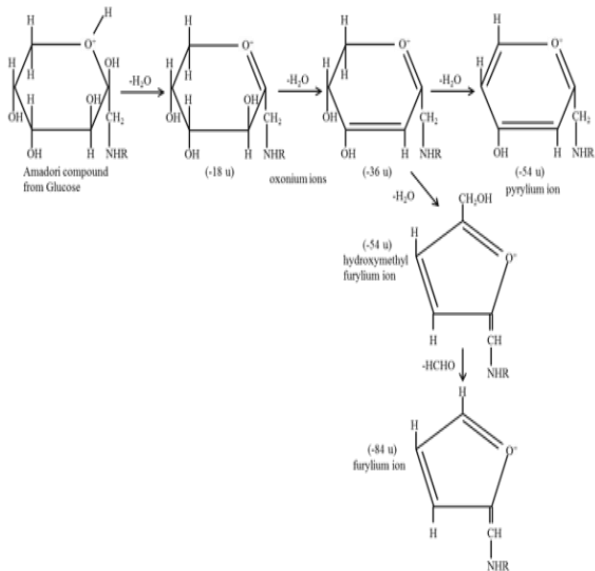


図4 グルコース修飾ペプチドのピリリウムイオンおよびヒドロキシメチルピリリウムイオンへの生成経路

(2) 2 種の調理法による牛ひき肉中 AGEs の生成量

フライパン焼きにおいては AGEs や蛍光性物質の生成が認められたがオープン焼きでは認められなかった (図 5、6)。フライパン焼きでは短時間で AGEs が生成されるが、その後 AGEs は分解される可能性が示唆された。

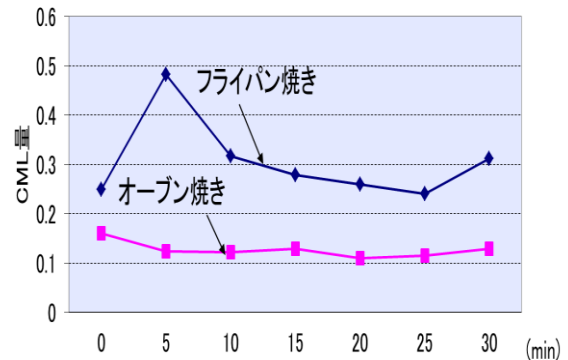


図5 調理法による CML 生成量の比較

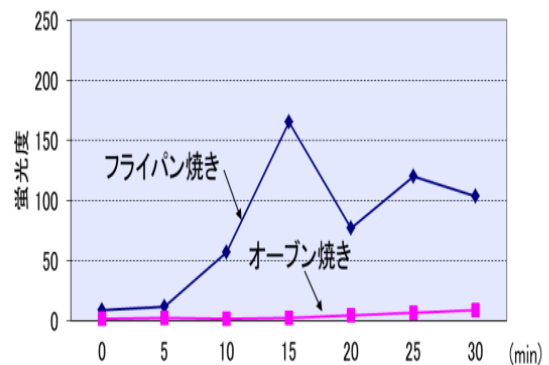


図6 調理法による蛍光性物質の生成量の比較

(3) グルコース修飾 β-ラクトグロブリンの消化・吸収性

①グルコース修飾タンパク質の修飾程度

本研究の糖化条件では、グルコース修飾の程度が 55%であることが明らかとなった。

②グルコース修飾タンパク質の in vitro および in vivo における消化・吸収性について

グルコース修飾タンパク質の消化・吸収性を比較した結果、in vitro では修飾タンパク質が未修飾よりも消化しにくい結果であったのに対し、in vivo では修飾タンパク質が未修飾よりも速やかに消化・吸収された (表 1、図 7-9)。

Molecular weight fraction	Yield (%)	
	Native $\beta$ -Lactoglobulin	Modified $\beta$ -Lactoglobulin
Below 3000Da	62	49
3000~10000Da	24	13
Over 10000Da	14	38

表1 未修飾・修飾 $\beta$ -ラクトグロブリン消化物の収量分布

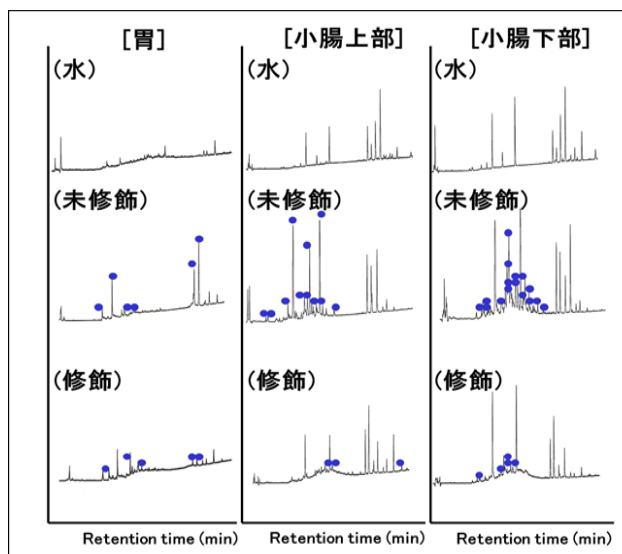


図7 投与 20 分後の未修飾・修飾 $\beta$ -ラクトグロブリン消化物のペプチドパターン (分子量 3,000 以下)

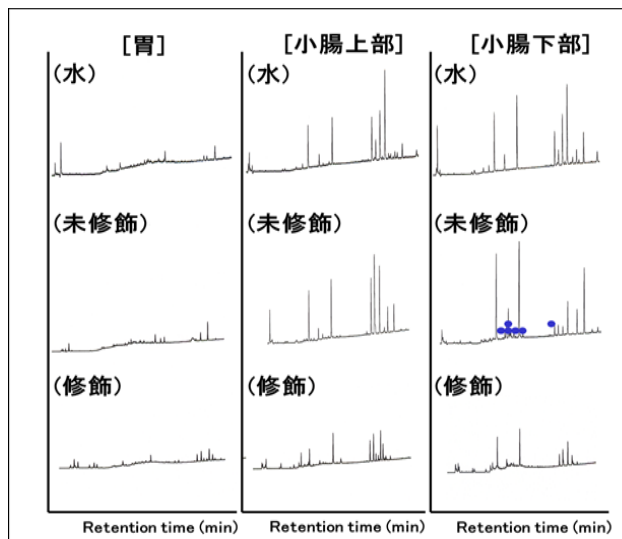


図8 投与 40 分後の未修飾・修飾 $\beta$ -ラクトグロブリン消化物のペプチドパターン (分子量 3,000 以下)

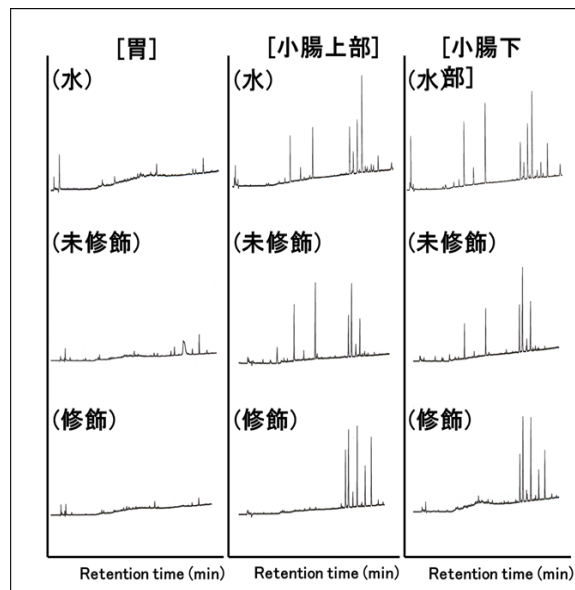


図9 投与 60 分後の未修飾・修飾 $\beta$ -ラクトグロブリン消化物のペプチドパターン (分子量 3,000 以下)

修飾 $\beta$ -ラクトグロブリンは、投与 20 分後にはほとんど生体内に吸収されたが、未修飾 $\beta$ -ラクトグロブリンは、投与 20 分後、 $\beta$ -ラクトグロブリン由来のペプチドの生成が認められ、まだ完全に吸収されていないことが明らかとなった。投与 40 分後には、未修飾 $\beta$ -ラクトグロブリンもほぼ 100% 生体内に吸収された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) Yamaguchi Keiko, Nomi Yuri, Homma Takeshi, Kasai Midori, Otsuka Yuzuru, Determination of furosine and fluorescence as markers of the Maillard reaction for the evaluation of meat products during the actual cooking condition, Food science and technology research, 査読有, VOL. 18, 2012, 67-76 DOI : 10.3136/fstr.18.67

[学会発表] (計 1 件)

① Yamaguchi Keiko, Otsuka Yuzuru, Determination of furosine and fluorescence in cooked meat, 9th International Symposium on the Maillard Reaction, 2012 年 09 月 16 日~2012 年 09 月 20 日, Nancy, France

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 敬子 (YAMAGUCHI KEIKO)

日本女子大学・家政学部・助教

研究者番号：00440074