

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650482

研究課題名(和文) AGEs測定値を指標とした新規な食品の安全性および品質評価基準の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation criteria for food safety by AGE measurement

研究代表者

永井 竜児 (Nagai, Ryoji)

東海大学・農学部・准教授

研究者番号：20315295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、メイラード反応後期生成物(AGEsもしくはmelanoidins)含量の高い食品を多く摂取すると糖尿病が悪化するなど、我が国のAGEs含量の高い伝統食品である味噌や醤油の摂取も危険性が問われている。今回我々は、味噌中のタンパクに存在するAGEsに対する抗体を作製し、味噌中AGEs含量の測定を可能とした。現在、抗体と反応する構造を解析中であり、このAGE含量と病態の関与を解明することにより、AGEsを含有することによる味噌の風評被害などを低減できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recent studies demonstrate that Advanced Glycation End-products (AGEs)/melanoidins generated from the Maillard reaction in foods are associated with the worsening of diabetes. Those reports raise questions about the risk for intake of Japanese traditional foods such as Miso and Soy source. In the present study, we developed the assay system for AGEs content in Miso by instrumental analysis and immunochemical method. Accurate measurement of AGEs content in Miso may decrease the harmful rumor.

研究分野：生化学 食品化学

キーワード：メイラード反応 食品 安全性 栄養学

1. 研究開始当初の背景

我が国ではメイラード反応を利用した伝統的な食品が多く存在し、その後期生成物 (AGEs) の生成を制御することによってより嗜好性の高い食品を開発する研究が続けられている。海外ではコーヒーやビールなどの褐色色素の形成、香気及び味覚成分として長きにわたり AGEs の研究が行われてきた。また AGE 化タンパク質は消化酵素による分解能が低下するため、食物繊維と同様、腸内細菌の繁殖を促しプレバイオティクス作用を有することも報告されている (Rufián-Henares JA ら、J Agric Food Chem. 57(2):432-438, 2009)。これに対して、生体内で酵素やコラーゲン等の構造タンパク質に生成した AGEs が加齢関連疾患の発症に関与することから (Nagai R ら J. Biol. Chem. 282. 34219-34228, 2007)、食品から経口的に摂取された AGEs も生体に負の作用を及ぼす可能性が指摘されている。実際、AGEs 高含有の食品はマウス (Sandu O ら、Diabetes 54. 2314-2319, 2005) およびヒト (Uribarri J ら、Diabetes Care 34. 1610-1616, 2011) において糖尿病の発症率を増加させるという米国グループの研究報告がなされ、味噌・醤油をはじめとする AGEs 高含有食品の安全性が広く問われはじめている (図 1)。しかし、これら AGEs 高含有食品のモデルは 230°C で 30 分加熱するなど、一般的調理法とは逸脱した条件で調製されていることが多い。また、永井ら (申請代表者) は温度によって生成する AGEs の種類が変化することを報告している (AGEs/メラノイジンの生体応答とそのメカニズム：第 19 回日本メイラード学会・シンポジウム)。食品中 AGEs の善悪に関する情報が錯綜する背景として、AGEs が単一構造ではなく定量が困難であり、生体への影響を評価する方法も統一化されていないため、危険性が過剰に見積もられてしまう状況を招いている。

過去100年来の研究

食品中AGEの利点

日本の伝統的食品
味噌・醤油等

AGEs生成を制御し、より
嗜好性の高い食品の開発

過去5年来の研究

食品中AGEsの疑問点

生体への影響

- ・糖尿病発症率増加
- ・発がん性

社会的混乱

今回の研究テーマ

- ・AGEsの正確な測定
- ・体内動態
- ・生理作用の評価

食品の品質および安全性 評価の新たな指標構築

図 1 : 食品における AGEs の利用価値と疑問点

2. 研究の目的

AGEs 高含有食品の危険性に関する情報が錯綜する理由として、①AGEs は単一構造ではないこと、②正確な定量が困難であり食品中 AGEs 含量の情報が統一されていないことがあげられる。今回、特に味噌に焦点をあて、AGEs の定量、生物学的影響に対する評価を行い、安全性評価のみならず、新たな品質評価の指標を構築する。

3. 研究の方法

味噌中 AGEs の測定

様々な味噌(図 1) 1 g を量りとり 3mL の蒸留水を加えて TritonX-100 (final 0.5%) 存在下でテフロンホモジナイザーにてホモジナイズした後、4000rpm 10min で遠心した。上

清をタンパク定量、アセトン沈殿にて脱塩し、5-20%グラジエントの SDS-PAGE で解析を行った。



図 1： 様々な味噌試料

褐色色素の単離

SDS-PAGE の時と同様に味噌成分を抽出し、ホクエツ HS、セパビーズなどの樹脂にかけ、NaOH, HCl 等で色素成分を単離した。

質量分析装置による分析

SDS-PAGE の時と同様に味噌成分を抽出し、分子量フィルターで濾過、脱塩、有機溶媒抽出等で処理条件を検討し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置

(LC-MS/MS) で AGE 構造体として知られる N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) の分析を行った。なお、熟成に伴う CML 含量の変化を測定する目的で、未熟成の味噌を作製した。

抗体作製

味噌や醤油の熟成過程において、糖の分解からグリセルアルデヒド (GLA) の生成を推測した。そこで、グリセルアルデヒド修飾したウシ血清アルブミン (GLA-BSA) をマウスに免疫し、グリセルアルデヒド修飾した Keyhole limpet hemocyanin (GLA-KLH) 陽性、未修飾の BSA 陰性の抗体産生ハイブリドーマを探索し、GLA 由来 AGEs 構造に対するモノクローナル抗体を作製した。新たに得られたグリセルアルデヒド由来 AGEs 構造に対するモノクローナル抗体と、熟成期間の異なる味噌との反応性を確認する。また、 α 位を Cbz で保護したリジンとグリセルアルデヒドを保温した後、生成物を高速液体クロマトグラフィーで分取し、どの画分が抗体と反応するかを競合法 ELISA で確認し、抗体のエピトープを解析した。単離された抗体と反応性を示す画分は精密質量分析装置及び NMR で構造解析を行った。

ノクローナル抗体と、熟成期間の異なる味噌との反応性を確認する。また、 α 位を Cbz で保護したリジンとグリセルアルデヒドを保温した後、生成物を高速液体クロマトグラフィーで分取し、どの画分が抗体と反応するかを競合法 ELISA で確認し、抗体のエピトープを解析した。単離された抗体と反応性を示す画分は精密質量分析装置及び NMR で構造解析を行った。

4. 研究成果

SDS-PAGE による解析

5-20%グラジエントの SDS-PAGE で解析を行った所、熟成した味噌ではバンドがほとんど検出されなかった (図2)。これは熟成に伴ってタンパクの大半はペプチドレベルに分解されていたと考えられる。

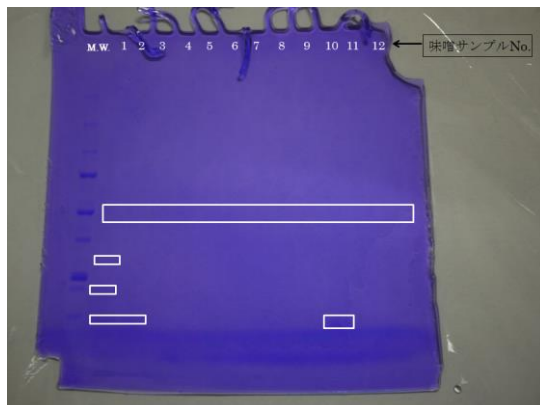


図 2： SDS-PAGE による蛋白の単離

褐色色素の単離

食品の色素成分を抽出するホクエツ HSあるいはセパビーズ樹脂にかけ、味噌中の色素成分の単離を行った (図3)。その結果、ホクエツ HS樹脂にかけた後、1N NaOHで溶出することによって、味噌中の色素成分が単離できることが確認された。

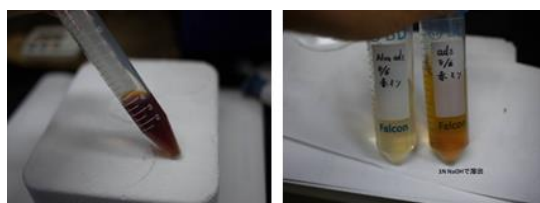


図 3：色素成分の単離：(左)単離前、(右)単離後

質量分析装置による分析

分子量フィルターで濾過、脱塩、有機溶媒抽出等で処理条件を検討し、タンデム質量分析装置で AGE 構造体として知られる CML の分析を行った。低分子画分を抽出することによって、CML が綺麗に検出されることが明らかとなった(図 4)。これに対して、未熟成味噌では CML 含量が非常に低く、測定が困難であった。

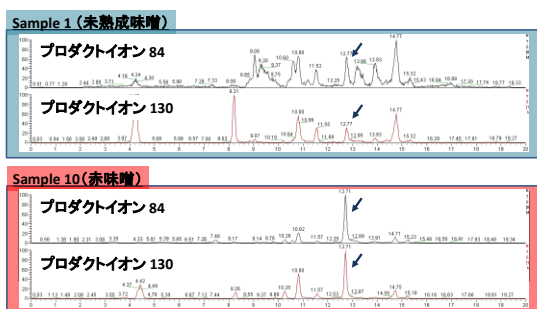


図 4：未熟成味噌と赤味噌中の CML 検出結果比較

また、米・大豆、大豆、麦・大豆の味噌でそれぞれ CML を測定した結果、以下の通りとなった(図 5)。

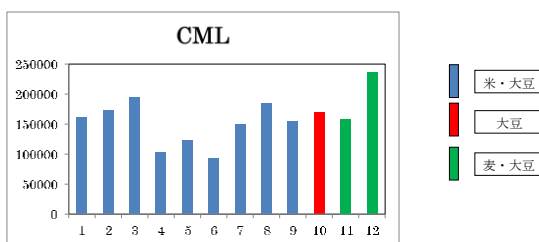


図 5：各種味噌における CML の測定

抗体作製

GLA で AGEs 化したウシ血清アルブミン (GLA-BSA) をマウスに免疫して 3 株のモノクローナル抗体を得た。特に活性の高かった 2A5 の反応性を酵素標識免疫法 (ELISA) で確認した結果、GLA 修飾蛋白と強い反応性を示した(図 6)。

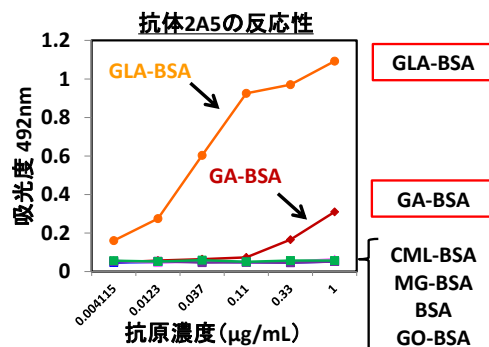


図 6：2A5 の反応性

本抗体を用いて、味噌中 AGEs を競合 ELISA で測定した。競合 ELISA のため、発色を抑制した試料は AGEs 含量が高いと評価できる。その結果、# 11-12 の味噌が特に AGEs 含量が高いことが確認された(図 7)。

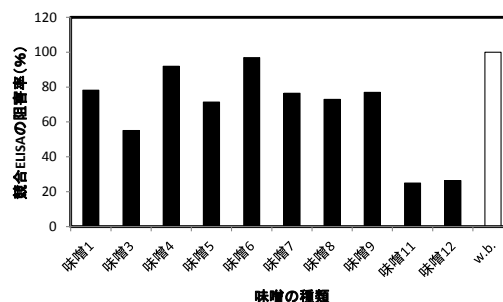


図 7：競合 ELISA による味噌中 AGEs の測定

また、GLA 由来 AGEs を認識するモノクローナル抗体のうち、特に活性の高かった 2A5 のエピトープ解析を行った。その結果、本抗体は GLA 修飾した Ac-Lys と反応性を示したが、GLA 修飾した Ac-Arg や Ac-His とは反応性を示さないことが競合 ELISA で確認され、本抗体のエピトープ構造は Lys 由来の AGEs 構造であると考えられた。次に GLA と Lys 由来の AGEs 構造をさらに特定する目的で、 α アミノ基が CBZ で保護された Lys を用いて GLA 修飾体を作製し、ODS カラムを備えた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分画を行った。現在、本抗体のエピトープ構造を解析中である。

まとめ

食品の色素成分を抽出するホクエツHSあるいはセパビーズ樹脂にかけ、味噌中の色素成分の単離を行った結果、ホクエツHS樹脂で効率良く色素成分が単離され、現在構造の解析を進めている。また熟成味噌において既知AGEs構造であるCMLがLC-MS/MSで測定が可能となり、CMLは熟成期間に応じて増加する傾向が認められた。

また、発酵中に生成すると考えられるグリセルアルデヒドから AGEs が生成すると予測し、グリセルアルデヒド由来 AGEs 構造に対するモノクローナル抗体の作製に成功した。したがって、競合 ELISA による食品中 AGE 測定のための土台ができたと考えられる。

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 6 件) (全て査読有)

- ① Shibuya T, Kaburagi T, Nagai R, Oshiro S,
The effects of moderate exercise on secretory IgA production in mice depends on dietary carbohydrate intake
J Clin Biochem Nutr. In press (査読有)
- ② Nagai R, Shirakawa J, Ohno R, Moroishi N, Nagai M.
Inhibition of AGEs formation by natural products. Amino Acids. 46(2):261-266, 2014
doi: 10.1007/s00726-013-1487-z (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

- ① 永井竜児、白河潤一、大野礼一、品川雅敏、畑野孝太、市川寛子、須川日加里、濱田空斗、田川智也、織嶋郁也、永井美芽、荒川翔太郎、江藤歩
加熱調理と AGEs/メラノイジン
第 24 回日本メイラード学会 熊本県
熊本市 熊本市国際交流会館
2014 年 11 月 7 日
- ② 永井竜児
AGEsの測定法および食品成分を用いたAGEs生成阻害化合物の探索、

第3回糖化ストレス研究会、東京都千代田区 ちよだプラットフォームスクウェア、2012年12月20日

- ③ 永井竜児、
抗酸化ポリフェノールによるAGEs生成の抑制と加齢関連疾患予防への応用、
第64回日本栄養・食糧学会、宮城県仙台市 東北大学川内キャンパス、2012年5月20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 竜児 (NAGAI Ryoji)
東海大学・農学部・准教授
研究者番号：20315295

(2) 研究分担者

川上 茂樹 (KAWAKAMI Shigeki)
大阪大学・産業科学研究所・特任准教授
研究者番号：90432509