

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240096

研究課題名(和文)メイラード反応による安全性確保のためのデータベース作製

研究課題名(英文) Establishment of the data-base of food with Maillard reactions for food safety

研究代表者

本間 清一 (HOMMA, Seiichi)

お茶の水女子大学・生活科学部・名誉教授

研究者番号：50017240

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：メラノイジンの分子構造を明らかにするため、微生物分解菌を探索した。その結果有用な数種の微生物を見出した。供試微生物は、南西諸島の宮古島等において糖蜜が施用される畑地や、マングロープの林床土壌やリター等から採取した。採取したサンプルは廃糖蜜を脱色することができた。またラッカーゼ活性を示した。メイラード反応の初期反応をMSおよびDADにより解析した。メイラード反応生成物のメチルイミダゾールやジケトンの培養細胞や動物個体の遺伝子発現に及ぼす作用を明らかにした。メイラード反応生成物である、PhIP、ピラジン、CML、CELなどのLC-MS分析法を確立し、食品中の含有量を測定し、データベース化した。

研究成果の概要(英文)：We have found out a few effective micro-organisms that can decompose melanoidin polymers to detect the molecular structure by summing the chemical characteristics of the decomposition products. The micro-organism samples were collected mainly from sugarcane farm and mangrove floor soil in the Ryukyu Archipelago. The sugarcane was decomposed by the sample obtained in Miyako Island. Those samples showed laccase activity. Mechanism of maillard reaction was investigated. Maillard reaction products were introduced to cell or animals and effect of those compounds on gene expression was measured. New method to analyze MI, PhIP, Pyrazines, CML, CEL etc with LC-MS/MS was established and contents of those products in foods were analyzed and the results were stored in database.

研究分野：食品科学

キーワード：メイラード 褐変 アミノカルボニル反応 AGE 微生物分解 LC-MS/MS 食品

1. 研究開始当初の背景

健康影響評価の対象になる食品中の物質は、調理・加工・貯蔵の過程の加熱で起こる食品成分間反応でつくられるものが多い。国民の関心を引いたものに、古くは魚のお焦げから生じるヘテロサイクリックアミン、最近ではメチルイミダゾールがある。加熱反応のメイラード反応では糖とタンパク質との反応で出きる未知の物質群があると推定されるが、日本では、健康影響評価は、ピラジンとアクリルアミド以外はなされていない。この反応で生成する AGEs (最終糖化産物) は、糖尿病合併症や老化と関連することが報告され、食品中 AGEs の生体への影響も注目されている。また低分子反応生成物には PhIP など発癌に関係する可能性が高いと言われている。メイラード反応には多くの反応中間体が存在するが、一般の調理・加工で起こるものの為、長い食習慣から安全とみなされてきた。一方最近の LC-MS/MS の分析法の進歩は飛躍的で、今まで分析の出来なかった食品抽出物の多成分を網羅的に分析できるようになった。我々はビタミン E 同族体 8 種類を LC-MS/MS/MS 分析により同時に分析する方法を開発し、天然のハーブ類の葉に今まで知られていなかったトコトリエノールが多数存在することを発見するなどの実績があり (JAgricFoodChem 2012)、分析技術は高い。代謝産物を網羅的に解析し、その植物の固有のものを明らかにする方法はフィンガープリント法とも呼ばれるが、この技術を食品に応用することで食品中の危害物質などの化合物を網羅的に解析し、食品固有の化合物フィンガープリントを作成し、データベース化することが期待される。

2. 研究の目的

加工食品の安全性のために、

(1) 危害物質等の生成メカニズムの解明と微生物等の利用による代謝分解

加熱に伴って糖とアミノ酸の反応により

様々な物質が生じるが、そのメカニズムはまだ十分には解明されておらず、その生成メカニズムを解明する。また生じたメラノイジンや AGEs がそのまま自然界では蓄積せず消滅する原因として考えられるメラノイジンあるいは製糖の副産物である廃糖蜜を分解する菌の機能について研究する。そのために、廃糖蜜中のメラノイジン分解微生物の検索を行う。

(2) 培養細胞や動物実験による安全性テスト

成分間反応でできた複雑な化合物群が安全なのかどうかを動物細胞の培養系を使って明らかにする。またどのような変化が生じるかを動物実験により明らかにする。

(3) LC-MS/MS 等を用いアミノカルボニル反応生成物のフィンガープリントをつくり、データベース化する

PhIP、イミダゾール化合物、CML などの MS のフラグメントパターンを明らかにし、分析の基礎的なデータベースとし、それを基にコーラやキャラメル、しょうゆ等の実際の加工食品成分を LC-MS/MS で分析し、それぞれの食品中の化合物フィンガープリントを作成し、データベース化する。

3. 研究の方法

(1) メイラード反応の機構解明とメラノイジン分解微生物の検索

グルコースとペプチド (LEKFD) を加熱反応させ、グルコース修飾パターンを解析し、メイラード反応の機構を明らかにする。HPLC、ESI-MS/MS、MALDI-MS/MS を用いて分析を行い、化学反応による構造変化やその機構について検討を行う。廃糖蜜中のメラノイジンなどを資化し生育し脱色する微生物を土壤中からスクリーニングする。微生物が見つければその微生物の同定と性質、メラノイジン分解酵素の性質を明らかにする。

(2) 培養細胞や動物実験による安全性テスト

ヘテロサイクリックアミンやメチルイミダゾールの安全性をヒトの肝細胞などを用いて遺伝子発現を指標に検討する。またラットにジケトンを投与し、反応を明らかにする。

(3) LC-MS/MS 等を用いて、アミノカルボニル化学反応生成物のフィンガープリントをつくり、データベース化する

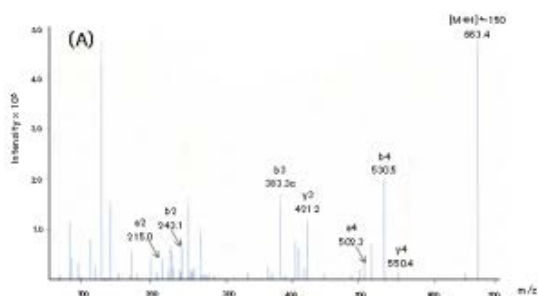
食品中の AGEs を LC-MS/MS で分析するために、PhIP, MI, CEL, MG-H1 等の AGEs のマスフラグメントパターンを明らかにし、これらの化合物の分析に適したカラムおよび分離条件を明らかにし、LC-MS/MS による定量法を確立し、実際の食品を分析し、データベースソフトウェアを用いてデータを蓄積し、Web で検索可能なデータベースを作成する。

4. 研究成果

4-1 メイラード反応の機構解明

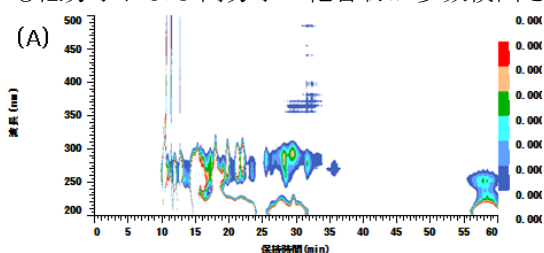
4-1-1 初期反応

乳清タンパク質の一種である β -LG の構造中に含まれるペプチド Leu-Glu-Lys-Phe-Asp (LEKFD) を用いて、メイラード反応中における Glc 修飾パターンを解析し、分解および架橋について検討を行った。HPLC により分取した分画を MS および MS/MS により分析し、構造解析を行った。主要なピークである Peak 3 のマススペクトルでは、イオン化した未修飾 LEKFD として $[M+H]^+$ (m/z 651) および $[M+2H]^{2+}$ ($326 m/z$) が観測された。Peak 5 のマススペクトルにおいて、LEK*FD のイミニウムイオン



(-150 u) に相当する $[M+H]^+$ (m/z 663) も観測された。また、LEK*FD のイミニウムイオンに相当する $[M+H]^+$ (m/z 663) は、Peak 4 のマ

ススペクトルにおいても確認された。Peak 9 および Peak 9' のマススペクトルでは、LEK*FD のピリリウムまたはヒドロキシメチルフリリウムイオン (3 分子の水が脱水、-54 u) に相当する $[M+H]^+$ (m/z 759) が観測された。Peak 1 のマススペクトルでは、EK および KFD に相当する $[M+H]^+$ (m/z 276) および $[M+H]^+$ (m/z 409) が観測され、ペプチド分解の可能性が示唆された。フォトダイオードアレイ検出システムによるゲルろ過クロマトグラフィーにより MRP_s を分析した結果、LEKFD の分子量よりも低分子および高分子の化合物が多数検出さ



れ、24 時間の加熱により MRP_s の一部はペプチド分解あるいはペプチド架橋が生じたことが示唆された。(FoodChem2014)。

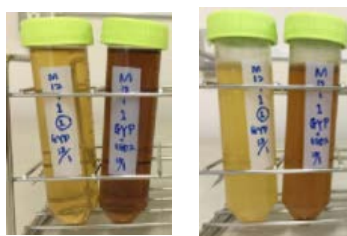
4-1-2 分解反応

4-1-2-1 微生物分解

廃糖蜜中のメラノイジン分解微生物の検索

供試微生物は、メラノイジンの一種である廃糖蜜 (サトウキビ精製工場での副産物) が施用される畑地や、投棄される場所等、ならびにマングローブの林床土壌等から採取した。採取場所は、南西諸島の宮古島、沖縄島および与論島とした。供試液によるメラノイジン脱色・変色機能の有無を検証するために、培地に廃糖蜜を加え、供試液を 0.5ml 加えた後、30°C のインキュベータ内で 2~5 日間培養した。pH が下がると培地が脱色されることから、培養期間中に目視で脱色・変色の変化を確認できた試料は順次 pH を測定し、pH 値 5~7 のものだけを継代した。宮古島で採取したサンプルのうち 3 サンプルが残った。これらを PCR 法により種を同定した結果、全て *Lactbacillus Plantarum* の仲間であることが

判明した。不完全菌 M1 株及び、上記の高城・岡戸らより分離された脱色する微生物 11 種、さらに分離された 6 種、およびラッカーゼ生産菌を用いて脱色試験を行ったところ、M1 及び M4-3、M12-1、M13-2、M14-1 において脱色が見られた。上記の 5 種においては特に菌体への着色が少なく、モラセスを脱色できる可能性がある株だと考えられた。そこでラッカーゼを生産するか判定するために、バーベンダム反応を行った。ラッカーゼを生産すれば、培地内のタンニン酸が酸化され培地が褐色に変化する。その結果 M1 株及び M4-3、M12-1、M13-2、M14-1 の培地において、褐変が見られ、脱色試験、ラッカーゼ生産試験の結果から M12-1、M14-1 がモラセスを脱色するのに有用な株だと考えた。サンプルを M12-1 と M14-1 の 2 種に絞り、長期間培養し脱色試験を行った。その結果、M12-1、M14-1 共に、7 日後から目視で脱色が観察出来た。(図) HPLC-DAD による解析の結果、M12-1、M14-1 共に、モデルメラノイジンのモラセスと被る位置のピークの減少が見られた。



0 日目 M12-1 21 日目 モラセス

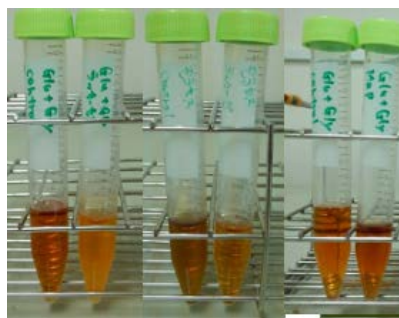
モデルメラノイジン(グルコース+グリシン)を用いて、M12-1、M14-1 の脱色試験を行った。目視での脱色はほとんど見られなかった。HPLC-DAD による解析を行ったところ、M12-1、M14-1 共に、モデルメラノイジンのモラセスと被る位置のピークが減少していた。

M4-3 培養サンプルを超音波破碎機で摩砕し、セルフリーの摩砕物からリン酸緩衝液 (pH7) で抽出しさらに硫酸塩析をし、30~70%飽和画分に、モデルメラノイジンの分解活性の存在を認めた。その際 HPLC から極めて遅く溶出される成分が新たに生じていることが認めら

れた。本酵素の他のモデルメラノイジンに対する活性(特異性)は検討中である。

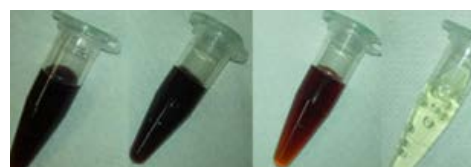
4-1-2-2 酵素および酸化剤による分解

ラッカーゼやマンガンペルオキシダーゼ酵素によるメラノイジンの分解を行った。ラッカーゼで処理したものはモデルメラノイジン、モラセス共に目視での脱色が確認できた。マンガンペルオキシダーゼで処理したものは目視で脱色が確認できなかった。(図)



左からメラノイジン (M) + 無添加 (C)、M+ラッカーゼ (R)、モラセス (H) + C、H+R、MC、M+マンガンペルオキシダーゼ (MnP)

ラッカーゼと同様にラジカル反応を行う次亜塩素酸を用いて pH 5.0、90°C で合成したモデルメラノイジン (Glc+アミノ酸) の脱色試験を行い、色の変化を目視で観察した。(図)



グルコースグリシンメラノイジン

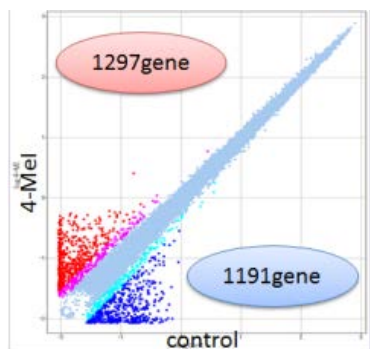
無添加、100 倍希釈、10 倍希釈、原液
次亜塩素酸原液と 10 倍希釈した次亜塩素酸で処理したものに脱色が見られた。

4-2 メイラード反応物の代謝

メチルイミダゾールの代謝

遺伝子発現の網羅的解析をおこなった。HepG2 細胞に 250µM の 4-MeI を添加し 4 時間後に抽出した RNA を用いて、マイクロアレイを実施した。発現量がコントロールと比較して 3 倍以上になったものを赤で示した。この

中で有意に上昇した遺伝子が 1297 個、有意に減少した遺伝子が 1191 個あり、パスウェイ解析を行った。

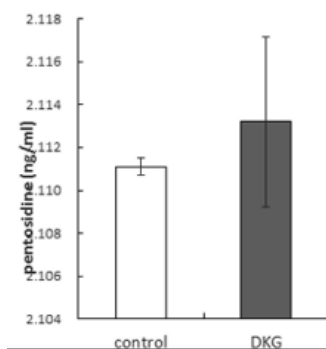


Pathway	down	Pathway	up
Metabolic pathway	59	Metabolic pathway	78
Huntington's disease	19	Pathway in cancer	21
Alzheimer's disease	16	PI3K-Akt signaling pathway	20
Parkinson's disease	15	Regulation of actin cytoskeleton	19
:	:	:	:

FGF5、PIK3R1、CREB1 などは濃度依存的に発現上昇がみられた。薬物代謝に関する遺伝子について代表的な遺伝子をリアルタイム PCR で調べたが発現量に大きな変動がみられなかった。

ジカルボニル化合物の動物への影響

α -ジカルボニル化合物はメイラード反応の中間生成物の一つで、反応性が非常に高い。 α -ジカルボニル化合物である 2,3-ジケトグルコン酸の生体に与える影響を明らかにするため、ラット尾静脈内に DKG を投与してその影響を調べた。DKG 群とコントロール群の血漿ペントシジン濃度に有意差はないが、DKG を投与した場合の方が高かった。



肝臓における HO-1mRNA のレベルをみるとコントロール群よりも DKG 群の方がやや低かったが、RAGEmRNA、SVCT1mRNA および SVCT2mRNA

のレベルは DKG 投与群の方が高い傾向にあった。

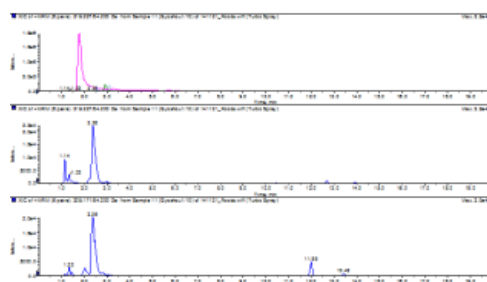
4-3 メイラード反応物の網羅的分析と食品のフィンガープリントデータベース

4-3-1 LC-MS/MS による分析

食品のフィンガープリントデータベース作成のために、メイラード反応生成物の LC-MS/MS 分析法の開発を行った。メチルイミダゾールの定量では、移動相は A: 15mM アンモニア水溶液、B: 15mM アンモニア/アセトニトリルを用いグラジエント条件で溶出を行った。MS の条件の Q1Q3 は 83.1/56.0 とした。食品中の MI を測定したところ、コーラ類で非常に高い値を示した。

HMF、ピラジンも ODS カラムと QTRAP2000 を用いて分析した。移動相は A: 0.1%ギ酸水溶液、B: 0.1%ギ酸/アセトニトリルを用い溶出を行った。MS はピラジン、HMF の Q1Q3 はそれぞれ 81.0/54.1 と 127.1/109.2 を用いた。HMF はカラメル、コーヒー、コーラから検出された。2,6DM-Pyr はカラメル、コーヒーおよびコーラで検出された。2,3,5TM-Pyr はコーヒーやきな粉抽出物で少量検出された。

以上述べたメイラード反応生成物は ODS カラムに保持されるため、LC-MS/MS により分析できたが、CML や MG-H1 などの主要物質は水溶性物質で従来抗体による分析か、誘導体化しての LC-MS/MS 分析またはソナリーらが 2本の連結したハイパーカラムにより直接 LC-MS/MS 分析を行っているのみである。そこで

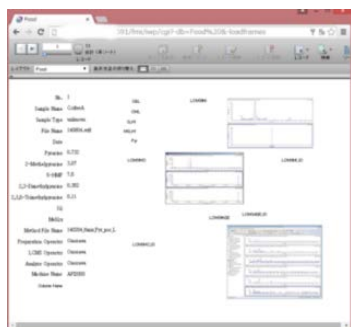


様々なカラムの中から最近開発されたアミノカラムを用い、5 種類の AGEs について LC の最適条件、MS 分析の最適なパラメーターを決

定し、LC-MS/MSによる同時分析法を確立した。Q1は219.227等を、Q3には84.4等を用い分析を行った。各種食品を分析したところCELは醤油や黒糖入り蒸しパンなどから、CMLは魚醬などから検出された。黒糖入り蒸しパンからはMG-H1やG-H1も検出された。

4-3-2 データベース

食品中のメイラード反応生成物のデータベース作成とWeb公開



LC-MS/MS 分析により得られた MI, PhIP, MG-H1 などのメイラード反応生成物の食

品中の濃度と分析チャートをまとめたデータベースを作成した。さらに Web で公開する機能を利用し、公開した。

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 8 件)

1. Keiko Yamaguchi, Takeshi Homma, Nomi Y. Otsuka Y. Characterisation of Maillard reaction products derived from LEKFD - A pentapeptide found in β -lactoglobulin sequence, glycated with glucose - By tandem mass spectrometry, molecular orbital calculations and gel filtration chromatography coupled with continuous photodiode array. *Food Chemistry*, 2014; **145**:892-902. (査読有、IF 3.3) DOI: S0308-8146(13)01236-3 [pii] 10.1016/j.foodchem.2013.08.134 他

[学会発表] (計 35 件)

Nakanishi Y., Okado M., Takagi Y., Yamamoto Y., Kobayashi Y., Matsui Y.,

Homma S. Separation of microbes to degrade melanoidin formed in cane molasses and model system (2012年9月17日) IMARS Nancy、フランス

他

[図書] (計 3 件)

スタンダード栄養・食物シリーズ2 生化学第16章～第20章 上田悦子、大塚讓 東京化学同人、東京 (2014) 他

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 清一 (HOMMA, Seiichi)

お茶の水女子大学・名誉教授

研究者番号: 50017240

(2) 研究分担者

山口 敬子 (YAMAGUCHI, Keiko)

日本女子大学・家政学部・助教

研究者番号: 00440074

松井 芳光 (MATSUI, Yoshimitsu)

東京農業大学・応用化学部・助手

研究者番号: 10647845

大塚 讓 (OTSUKA, Yuzuru)

戸板女子短期大学・食物栄養科・教授

研究者番号: 20134833

中西 康博 (NAKANISHI, Yasuhiro)

東京農業大学・国際食料情報学部・准教授

研究者番号: 60246668

鈴木 恵美子 (SUZUKI, Emiko)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号: 80154524

安藤 直子 (ANDO, Naoko)

東洋大学・理工学部・准教授

研究者番号: 70360485

(3) 連携研究者

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