

平成30年6月19日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16195

研究課題名(和文) 高極性メイラード反応生成物に着目した一斉分析法の開発と食品の安全性評価手法の確立

研究課題名(英文) Development of a simultaneous quantification method focusing on highly polar Maillard reaction products and establishment of food safety evaluation method

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では研究実績が少ない高極性物質に着目し、加工食品中の挙動に関する基礎的な知見を得ることを目的として、1)終末糖化産物AGEsの定量法の開発と食品試料への適用、2)新奇メイラード反応生成物の探索と同定という2つのテーマを軸にして研究を進めた。1)において、簡便なLC-MS/MS定量法を構築し、本法を用いて様々な醤油やビール系飲料を分析した。原材料・製造法や貯蔵条件によって形成するAGEsに差が見られたため、食品の品質評価に応用できる可能性が示された。2)において、カルノシンとキシロースの加熱溶液から450 nmに極大吸収を示す化合物を単離し、構造を明らかにするとともに、抗酸化性を評価した。

研究成果の概要(英文)：We focused on highly polar Maillard reaction products and aimed to develop a simple and sensitive method to analyze several advanced glycation end products (AGEs) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The developed method enabled to separate and quantitate simultaneously seven AGEs and was applied to the determination of free AGEs contained in various kinds of soy sauce and beer. The major AGEs in soy sauce and beer were CML, CEL, and MG-H1. Furthermore, long-term storage of soy sauce increased CML. This study revealed that materials, processing condition, and protein content clearly affected the levels of AGEs in food. We isolated a novel yellow pigment from model Maillard reaction system containing L-carnosine and D-xylose under weakly acidic condition. This compound possesses two carnosine residue and a pyrrolyl-methylidene-pyrrolone structure. We then showed that this compound had potent antioxidant activity.

研究分野：食品科学

キーワード：メイラード反応 終末糖化産物 AGEs カルノシン

### 1. 研究開始当初の背景

食品の加工・調理に伴う代表的な成分間反応としてメイラード反応がある。この反応はアミノ基とカルボニル基との間に起こる非酵素的褐変反応として広く知られているが、反応の条件 (pH, 温度, 酸素の有無など) によって多種多様な生成物が形成するため、研究が始まってからほぼ1世紀近く経った現在でもいまだに反応機構の全容が明らかにされていない。元来食品中の成分間反応として研究が進展したが、生体内でも同様の反応が起こることが証明されて以来、糖尿病合併症やアルツハイマー、統合失調症などの疾病との関連についても研究が盛んに行われている。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。食事から摂取される AGEs は炎症を促進し、糖尿病関連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が、食事性 AGEs の分析方法は確立されていないため、その吸収・代謝挙動やその生理作用については未解明な部分が多い。

メイラード反応生成物の化学的解明を目指した研究はこれまで主に低～中極性物質に絞って行われてきた。その理由として、液液分配により有機溶媒に移行しやすく精製が容易になること、また、高極性物質を分離する手段が乏しかったことが挙げられる。しかしながら、近年の分離技術の向上・質量分析装置の高度化によって、高極性物質についても分析を実現できる環境が整ってきた。メイラード反応によって生成される化学物質のうち、Acrylamide や Heterocyclic-amine, 4(5)-Methylimidazole などは健康への危害要因となることが知られている。しかし、これら以外にも危害要因となりうる化学物質が食品や飲料に含まれている可能性は否定できない。メイラード反応は食品中に起こる主要な化学反応であるにも関わらず不明な点が多く、測定法も確立されていないものが多いのが現状である。

以上のような背景から、メイラード反応研究において、既知物質に対しては食品中の分布やその生理活性・安全性を明らかにすること、未知物質に対しては形成される条件下での探索と同定を行うこと、この2つのアプローチが重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに研究実績が少ない高極性物質に着目し、これら反応生成物を分子レベルで明らかにするとともに、加工食品中の挙動に関する基礎的な知見を得ることを目的として、1) 簡便で正確な終末糖化産物 AGEs の定量法の開発と食品試料への適用、2) 新奇メイラード反応生成物の探索と同定という2つのテーマを軸にして研究を進めることにした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 終末糖化産物 AGEs の定量法の開発と食品試料への適用

質量分析装置は LCMS-8030 (Shimadzu 社製) を用いた。AGEs 7 種 (CML, CEL, G-H1, MG-H1, GOLD, MOLD, Pentosidine) の標品を用いて、LC-MS/MS による MRM 条件の最適化および分離カラムの選別を行った。開発した LC-MS/MS による定量法を用いて、除タンパクおよび固相抽出カラムによる前処理を行い、様々な醤油およびビール系飲料中に含まれる遊離 AGEs の定量分析を行った。また、醤油を貯蔵した試料も同様に分析した。

#### 2) 新奇メイラード反応生成物の探索と同定

新奇物質を探索するにあたり、抗糖化作用をもつイミダゾールジペプチドのカルノシンに着目した。カルノシンは畜肉に多く含まれるため、調理加工に伴いメイラード反応を起こすことが予想されるが、その反応生成物に関する報告は少ない。また、カルノシンは多彩な生理機能が報告されているが、メイラード反応による構造変化に伴い、その生理機能に変化がもたらされることも予測されることから、ターゲット物質として選定した。

食品系を模したモデル反応系にて、カルノシンと glucose(六炭糖)あるいは xylose(五炭糖)を組み合わせ、pH, 温度, 酸素の有無などの反応パラメータを変化させた際の反応溶液を調製し、各種分析機器を用いて新奇物質の探索を行った。見出された物質については、単離・構造解析を試みた。さらに、同定した物質の特徴づけを行った。

### 4. 研究成果

1) 分離カラムに Intrada Amino Acid (Imtakt 社製) を用いて、適切な MRM 条件を組み合わせることにより、イオンペア試薬を用いずに高感度で簡便な LC-MS/MS 定量法を構築することができた。本法を用いて様々な醤油やビール系飲料に含まれる遊離 AGEs を分析した。結果を Fig. 1 に示す。

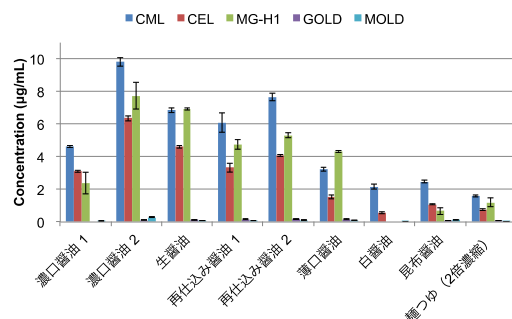


Fig. 1 各種醤油中の遊離 AGEs 含量

醤油中には CML, CEL, MG-H1, GOLD, MOLD が検出され、主要なものは CML, CEL, MG-H1 であった。醤油の種類によって含有量に差が見られたため、AGEs 形成に関与する因子を特定すべく、褐変度 (450 nm での吸光度) との

相関をみたところ、いずれの AGE においても正に相関する傾向がみられた (Fig. 2)。

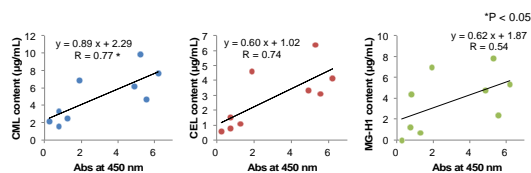


Fig. 2 醤油中 AGEs 量と褐変度との相関

続いて、炭水化物・タンパク質量との相関をみたところ、タンパク質量と強い正の相関がみられた (Fig. 3)。

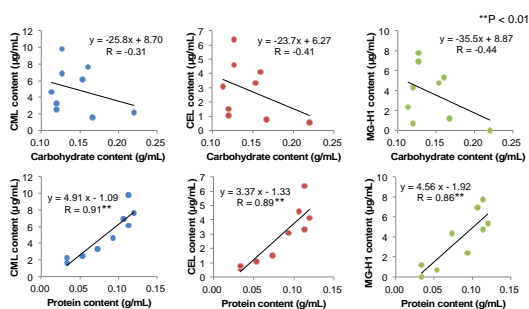


Fig. 3 醤油中 AGEs 量と炭水化物・タンパク質量との相関

また、醤油の貯蔵中における変化を検討したところ、37 で 0-4 ヶ月貯蔵すると時間経過とともに CML が顕著に増加することを見出した (Fig. 4)。一方、4 で貯蔵した試料では増加を抑制したことから、醤油中の CML は醤油の貯蔵履歴を反映する指標となりうることが示唆された。

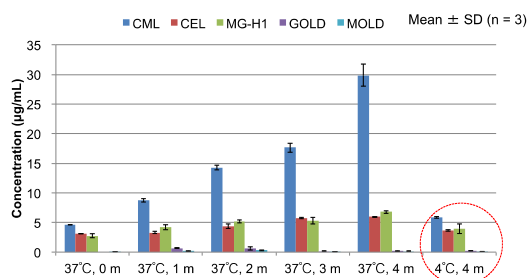


Fig. 4 醤油を貯蔵した際の遊離 AGEs 量の変化

続いて、ビール系飲料を定量した結果を Fig.5 に示す。

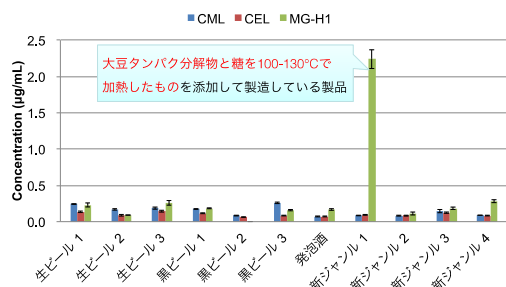


Fig. 5 各種ビール類の遊離 AGEs 量

ビール中には CML, CEL, MG-H1 が検出された。本分析法によって初めてビール中に CML, CEL を同定することができた。新ジャンル 1 のサンプルにおいて、MG-H1 量が顕著に増大していたが、この理由として、当該製品は大豆タンパク分解物と糖を高温で加熱したものを添加して製造された製品であるためだと考えられた。

以上の結果より、原材料・製造方法や貯蔵条件によって形成する AGEs に違いが見られたことから、食品の品質評価に応用できる可能性が示された。

2) カルノシンをグルコースまたはキシロース (各 30 mM) を 200 mM リン酸 (pH 7.0) または酢酸 (pH 5.0) 緩衝液で溶解し、95 で 1, 3, 5 時間加熱した試料を DAD-HPLC で分析し、反応生成物の解析を行ったところ、カルノシン + キシロース溶液 (pH 5.0) にて、400 nm に吸収を示す黄色呈色ピークを複数検出したため、これらの単離を試みた。カルノシンとキシロース (各 60 mM) を 5 時間加熱した試料溶液を調製し、ODS カラムクロマトグラフィー、分取 HPLC による分画、単離を行った。単離できた黄色色素について MS、NMR による構造解析を行った。HPLC-DAD 分析の結果、カルノシン + キシロース加熱溶液 (pH 5.0) にて 450 nm に極大吸収波長を示す 4 つのピークを検出した。さらに、分取 HPLC による単離の結果、1 つの色素 (Peak3) を単離することができた。構造解析の結果、peak3 はカルノシン 2 分子のアミノ基部分に pyrrolyl-methylidene-pyrrolone 骨格を有することが確認された。同様の構造を有する Dipyrrolone (DPL) 類はリジンと五炭糖の反応により特異的に形成される黄色色素であったため、その形成にはリジンの -アミノ基が必須であると考えられていたが、カルノシン単独でも形成されることが明らかとなった。よって、DPL 類は様々なペプチド、タンパク質のリジン残基や N 末端アミノ基においても形成される可能性が示唆された。

また、本色素の生理活性を検査するため、ABTS ラジカル消去能と金属キレート能について評価したところ、未変化体のカルノシンと比較していずれの活性も上昇していた。特に ABTS ラジカル消去能については Trolox と同等の活性を示したことから、メイラード反応により機能が付与されたことを確認した。

さらに、本色素の生成条件について詳細に検討したところ、pH 5.0 付近の弱酸性条件下で顕著に生成量が增大すること、酢酸緩衝液中では酢酸自体が反応前駆体となり、DPL 様の 450 nm 付近に吸収を示す副生成物が複数形成すること、酸素存在下では生成量が減少することなどを明らかにした。

以上の得られた成果を踏まえて、今後は本色素の副生成物の化学構造についても明らかにするとともに、DPL 類の食品中の分布について解析する予定である。本研究の成果より、メイラード反応を適切にコントロールすることで好ましい色調および抗酸化性を付与することが可能となり、食品の品質向上に寄与できる可能性が示された。

#### 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2件)

1. Okura, T.; Ueta, E.; Nakamura, R.; Fujioka, Y.; Sumi, K.; Matsumoto, K.; Shoji, K.; Matsuzawa, K.; Izawa, S.; Nomi, Y.; Mihara, H.; Otsuka, Y.; Kato, M.; Taniguchi, S.-i.; Yamamoto, K., High Serum Advanced Glycation End Products Are Associated with Decreased Insulin Secretion in Patients with Type 2 Diabetes: A Brief Report. *Journal of Diabetes Research* **2017**, *2017*, 1-7.
2. Nomi, Y.; Annaka, H.; Sato, S.; Ueta, E.; Ohkura, T.; Yamamoto, K.; Homma, S.; Suzuki, E.; Otsuka, Y., Simultaneous Quantitation of Advanced Glycation End Products in Soy Sauce and Beer by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry without Ion-Pair Reagents and Derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 8397-8405.

##### [学会発表](計6件)

1. 能見祐理, 最終糖化生成物 AGEs の LC-MS/MS による一斉分析法の開発と食品試料への適用, 日本分析化学会第 30 回新潟地区部会研究発表会, 2016 年 9 月 30 日(新潟)
2. 能見祐理, LC-MS/MS による最終糖化生成物 AGEs の分析法の開発と褐変食品試料への適用, 日本食品分析学会平成 28 年度学術集会(招待講演), 2016 年 9 月 9 日(東京)
3. 能見祐理, 安中博紀, 谷晃, 佐藤真治, 大塚譲, 最終糖化生成物 AGEs の LC-MS/MS による分析法の開発と褐変食品試料への適用, 日本食品科学工学会第 63 回大会, 2016 年 8 月 26 日(名古屋)
4. Yuri NOMI, Etsuko UETA, Tsuyoshi OHKURA, Kazuhiro YAMAMOTO, and Yuzuru OTSUKA, Simultaneous quantification

of advanced glycation endproducts without ion-pair reagents by a liquid chromatography-tandem mass spectrometry in human serum, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 1-4 日(神戸)

5. 能見祐理, 佐藤真治, 大塚譲, 高極性物質に着目したピリドキサミン由来メイラード反応生成物の探索と同定, 日本農芸化学会 2015 年度関東支部大会, 2015 年 9 月 26 日(東京)
6. Yuri NOMI, Shinji SATO, and Yuzuru OTSUKA, Isolation, identification, and formation condition of a novel meillard reaction product derived from pyridoxamine and sugars, 12th International Symposium on the Maillard Reaction. 2015 年 9 月 1-4 日(東京)

##### [図書](計1件)

1. 監修 宮澤陽夫、執筆 能見祐理 他, メイラード反応の機構・制御・利用 第 11 章 糖質(還元糖) p.96-104, シーエムシー出版, 2016, 229.

#### 6. 研究組織

##### (1) 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