

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 6日現在

機関番号：32648

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500797

研究課題名（和文）調理・加工によるビタミンC由来メイラード反応生成物の健康への影響

研究課題名（英文）The health effects of dietary glycated protein by ascorbic acid

研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授

研究者番号：70314573

研究成果の概要（和文）：アスコルビン酸（AsA）およびその酸化加水分解生成物である2,3-ジケトグルロン酸（DKG）と食品タンパク質（カゼイン）との緩衝液中での加熱反応をグルコースおよびジカルボニル化合物を対照として行った。アミノ・カルボニル反応生成物がDKGについては、グリオキサール（GO）、メチルグリオキサール（MGO）と同程度であった。DKG由来グリケーション反応生成物（DKG-Casein）について、細胞増殖への影響を調べたところ、GOおよびMGOの場合よりも低濃度での細胞増殖抑制が認められた。さらに、AGE受容体（RAGE）のmRNA発現を調べたところ、DKG-Caseinの処理によりRAGEの発現が有意に上昇することが明らかになった。従って、食品中のビタミンC酸化生成物由来アミノ・カルボニル反応生成物が生体に影響を与え、その機構がRAGEを介する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The health effects of food-derived glycated casein by ascorbic acid (AsA) oxidation products were *in vitro* investigated. AsA, 2,3-diketogulonic acid (DKG), glucose, glyoxal (GO) and methylglyoxal (MGO) were heated with casein, and their yields of glycated products were determined. Formation of DKG-casein was at similar level to GO- and MGO-casein. The cytotoxicity of DKG-casein was examined using intestinal cell line Caco-2. The larger inhibitory effect in Caco-2 cellular proliferation by DKG-casein was observed than GO- and MGO-casein. The expression of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) mRNA in Caco-2 was studied. Stimulation of Caco-2 with DKG-casein resulted in a significant increase in RAGE mRNA expression. Therefore, dietary ascorbic acid-derived glycation products might have a risk for human health and the effect was suggested to be mediated by RAGE.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：食品栄養科学、調理科学

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ビタミンC、酸化、メイラード反応、加熱調理、AGE受容体、安全性

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは毎日食品材料を調理・加工して食べ物として摂取している。調理・加工過程において食品成分は分解などの単独の変化のみならず、他の成分との間にも様々な反応が起こる。このような食品成分間反応のひとつとしてメイラード反応、すなわちアミノ・カルボニル反応（糖化反応ともいう）が広く知られている。食品が調理・加工時に褐色に着色する反応のひとつで、タンパク質、アミノ酸などのアミノ基と、糖類などのカルボニル基が反応する非酵素的褐変反応である。この反応により、着色物質のみならず香ばしい香气成分が生成するため、特に焼く、揚げるなど高温での加熱調理食品の嗜好性付与に重要な役割を果たしている。この食品の調理・加工過程におけるアミノ・カルボニル反応について、食品の嗜好性に関しては生成物、反応機構、反応制御など様々な研究が古くから盛んに行われてきている。また、アミノ・カルボニル反応の最終生成物であるメラノイジンについては抗酸化性や抗変異原性なども報告されている。

近年、このアミノ・カルボニル反応が生体内においても進行することが明らかになり、糖尿病合併症、腎不全、がん、神経変性疾患などの種々の疾病の発症・進展と関わるということが明らかになり、医学分野などで研究が飛躍的に進行し、作用メカニズムも含めて解明されつつある。このような内因性のアミノ・カルボニル反応生成物の生体への影響が明らかになる中で、外因性、すなわち飲食物由来のアミノ・カルボニル生成物の健康への影響についても関心が向けられるようになってきた。

ビタミン C（アスコルビン酸（AsA））はグルコースと化学構造が類似していることから、アミノ・カルボニル反応においてその出発物質のひとつであるカルボニル化合物として作用することが知られている。この AsA 由来のアミノ・カルボニル反応については生体内での研究が、レンズタンパク質の糖化反応を中心に研究が進んでおり、ペントシジンなどの後期糖化生成物（Advanced glycation endproduct; AGE）が報告されており、糖尿病合併症や老化との関連も指摘されている。

しかしながら AsA が関わる食品由来のアミノ・カルボニル反応生成物の生体への影響についてはほとんど研究がなされていない。食の安心・安全に対する関心が高まる中で、本来食品に含まれている栄養素について分解反応や他の食品成分との反応により生じた化合物の安全性に関する解明が必要な時期にきていると考えられる。特に AsA は私たちが長い間摂取してきた食品に含まれる食品成分であり、食品添加物としても広く用いら

れている。また生合成能が欠如しているため私たち霊長類にとって必須の栄養素である。しかしながら、食品中で抗酸化作用を発揮したあと必然的に酸化されるため、反応性の高いデヒドロアスコルビン酸や 2,3-ジケトグルロン酸(DKG)などの酸化分解生成物が食品中の他の成分と反応する可能性は十分に考えられる。すでに食品の加工・保蔵過程で生成する有害物質として報告され、世界中でショッキングなニュースとして報道されたアクリルアミドやフラン類もアミノ・カルボニル反応を経て生成するのではないかと推定されており、AsA やその酸化分解生成物からの生成の可能性も指摘されている。さらには飲食物中の食品成分間反応生成物が疾病の発症や進展に関わる可能性も考えられる。このように私たちにとって有効な栄養素も食品や生体内で変化あるいは他の成分と反応する過程で有害な成分が生成する可能性は考えられるが、これまで十分に研究が行われてこなかった。このような背景から、AsA 由来アミノ・カルボニル反応生成物を摂取した際の私たちの健康への影響について解明する必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

AsA は生体内においては健康時には酸化されても直ちに還元されて元に戻すシステムが備わっているが、食品中ではそのような酵素等が存在しない場合が多いため、デヒドロアスコルビン酸や DKG などの AsA の酸化生成物が高濃度に存在する可能性は十分に考えられる。従って食品の調理・加工・保蔵条件下においては AsA に由来するアミノ・カルボニル反応生成物が生体内よりもかなり多く生成していることが予想される。そこで本研究では AsA、特に反応性が高いその酸化加水分解生成物である DKG と食品中のタンパク質との反応について、アミノ・カルボニル化合物の生成について調べ、またアミノ・カルボニル反応生成物の安全性の評価を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) アミノ・カルボニル反応生成物の調製

食品の加熱調理・加工のモデル系として、50mM カルボニル化合物と 10mg/ml カゼインとの反応をリン酸緩衝液 (0.1M, pH6) 中、70°C で 10 分あるいは 60 分間加熱を行った。カルボニル化合物として AsA、DKG を用い、対照として、グルコースおよび反応性が高いことで知られているジカルボニル化合物であるメチルグリオキサール (MGO)、グリオキサール (GO) を用いた。なお、AsA は反応条件を pH 6 にするためナトリウム塩を、DKG は常法により AsA より調製したカリウム塩を用いた。

反応後、低分子画分を除くため、一晚透析を行った。

#### (2) アミノ・カルボニル反応生成物の測定

アミノ・カルボニル反応生成物である後期糖化生成物 (AGE) の生成度を褐色度 (吸光度) および蛍光強度の測定により調べた。褐色度は 420nm、350nm での吸光度を分光光度計により測定し、蛍光強度は、励起波長 340nm、蛍光波長 415nm で分光蛍光光度計により測定した。

#### (3) ジカルボニル化合物の定量

DKG からのジカルボニル化合物の生成をカゼイン存在下および非存在下において調べた。反応条件は前述のとおりである。カゼイン存在下の反応については、反応後 6% 過塩素酸水溶液を加え遠心分離後 10% NaHCO<sub>3</sub> 溶液で中和した。反応液に 5.5mM ジエチレントリアミン 5 酢酸および 2mM 2,3-ジアミノナフタレンを加えて、50°C で 1 時間反応させて誘導体化した。ジカルボニル化合物のベンゾキノキサリン誘導体を HPLC 法により測定した。カラム; Inertsil - ODS (150 mm×4.6 mm I.D, GL Sciences)、移動相; 水-アセトニトリルのグラジエント溶出法、流速; 0.8ml/min、UV 検出器 (268nm) の条件で分析した。

#### (4) アミノ・カルボニル反応生成物の細胞増殖への影響

AsA 由来アミノ・カルボニル反応生成物の生体への影響について、ヒト腸管上皮モデル細胞 Caco-2 (理化学研究所 バイオリソースセンター) を用いて MTT 法により調べた。Caco-2 は 20% 牛胎児血清、ペニシリンストレプトマイシンを含む DME 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞数を 6.0×10<sup>4</sup> cells/ml で 96 穴プレートに播種し、48 時間培養後、試験培地に置換して 72 時間培養し、MTT 法により細胞増殖を測定した。アミノ・カルボニル反応生成物は前述の反応条件で 60 分間加熱を行ったものを透析後、凍結乾燥を行い、0.01~5 mg/ml の濃度で培地に添加したものを試験培地として用いた。

#### (5) 細胞培養系におけるアミノ・カルボニル反応生成物の RAGE mRNA 発現への影響

細胞培養系における AGE 処理を行ったときの AGE 受容体 (RAGE) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により調べた。Caco-2 を、カゼイン、DKG-カゼイン (DKG とカゼインのアミノ・カルボニル反応生成物) を 1~2 mg/ml の濃度で培地に添加した試験培地中で 5 時間培養した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。RNA は PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行い、mRNA の発現量は TaqMan プローブによるリアルタイム PCR 法 (7300 Real Time PCR System: Applied Biosystems) により定量した。RAGE の mRNA の

発現量は、GAPDH mRNA を内在性コントロールとし、 $\Delta\Delta Ct$  法を用い計算した。

## 4. 研究成果

### (1) アミノ・カルボニル反応生成物の生成

食品タンパク質としてカゼインを用い、カルボニル化合物として AsA および DKG を用いて水溶液中で加熱反応を行い、アミノ・カルボニル反応の後期段階で生成する AGE の生成度を褐色度 (吸光度) および蛍光強度の測定により調べた。褐色化および蛍光性を有することは AGE の特徴である。その結果、褐色化に関しては、DKG が顕著に進行しており、次いで MO、GO が高く、AsA はグルコースと同程度に低かった (図 1)。また、蛍光強度に関しては、MO、GO、DKG の順に高く、AsA とグルコースは極めて低かった (データは示していない)。DKG は反応性が高いことが知られているジカルボニル化合物である MG や GO と同程度あるいはやや高いことが示され、DKG が AGE の生成に寄与することが明らかになった。ビタミン C (AsA) 自体はアミノ・カルボニル反応において反応性の高い化合物ではないが、その酸化分解生成物のひとつである DKG はジカルボニル構造を有しているため反応性が高く、食品中においても加熱調理・加工などの過程において容易にタンパク質などと反応する可能性があることが確認された。

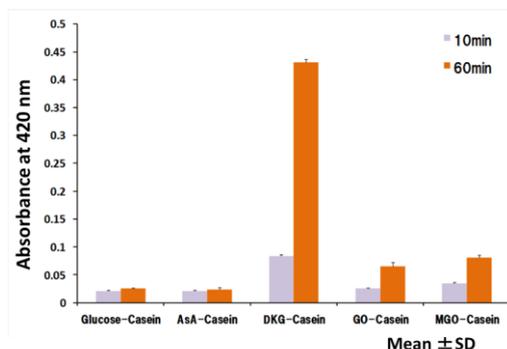


図 1. アミノ・カルボニル反応生成物の褐色度

### (2) アミノ・カルボニル反応におけるジカルボニル化合物の生成

アミノ・カルボニル反応や糖類の自動酸化の過程において、反応性の高い種々の  $\alpha$ -ジカルボニル化合物が中間体として生成することが知られている。そこで DKG からのジカルボニル化合物の生成について検討した。標準物質として GO、MGO、2,3-ブタンジオンを用いて定量分析を行ったところ、DKG の分解生成物のうちジカルボニル化合物は GO と 2,3-ブタンジオンの生成を確認し、反応時間 5 分での GO 量はモル比で 2,3-ブタンジオンの 5~7 倍であった (データは示していない)。他に 2,3 のピークが確認されたが、これらの化合物の同定・定量については今後さらに

検討が必要である。この GO 量の経時的な変化についてタンパク質の共存の有無の違いも含めて調べた (図 2)。いずれの条件下においても反応時間 5 分において最も GO 量が高いことから、反応の初期の段階から GO が生成していることが考えられた。また、カゼイン非存在下においても GO 量がカゼイン存在下よりもやや低いものの確かに生成が認められたことから、DKG から生成した GO がカゼインと反応している可能性も考えられた。カゼイン存在下では反応時間 15 分以降 GO 量が著しく減少し、30 分あるいは 60 分間では消失していることから GO とカゼインとの反応の可能性が支持された。

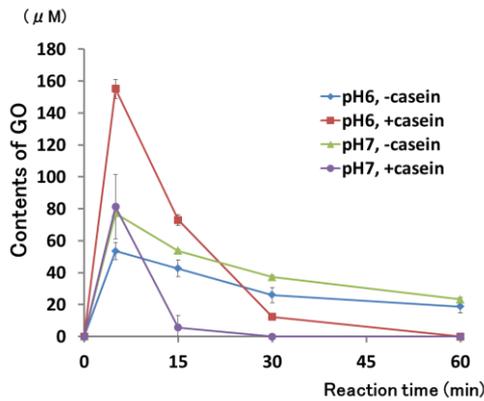


図 2. DKG からの GO の生成

### (3) アミノ・カルボニル反応生成物の細胞増殖への影響

DKG からのアミノ・カルボニル反応生成物 (DKG-Casein) の生体への影響を調べる第一段階として、消化器系の培養細胞の一つである Caco-2 の細胞増殖への影響を検討した (図 3)。対照として、グルコース、ジカルボニル化合物である GO および MGO とのアミノ・カルボニル反応生成物 (Glucose-Casein、GO-Casein、MGO-Casein) を用いた。また、DKG よりもはるかに AGE 生成量の低かった AsA とのアミノ・カルボニル反応生成物 (AsA-Casein) についても調べた。その結果、DKG-Casein は 0.1 mg/ml の培地への添加濃度で、有意に細胞増殖を抑制した。他のアミノ・カルボニル反応生成物も 5 mg/ml の添加濃度でいずれも有意な増殖抑制が認められたが、この濃度で DKG-Casein については約 60%にまで増殖抑制が見られ、一般に反応性が高いことがよく知られている GO-Casein や MGO-Casein よりも高い細胞増殖抑制を示した。また、Caco-2 は大腸がん由来細胞であるため、腸管正常細胞であるヒト正常小腸細胞 FHs74Int を用いて同様の細胞増殖実験を行ったところ、Caco-2 の場合と同様に増殖抑制が認められた。さらに、実際の消化管の中の状態により近い状態を再現するために、DKG-Casein に消化酵素による人工消化を行

った試料について Caco-2 で検討したところ増殖抑制がみられた。以上の結果から、食品中の DKG 由来アミノ・カルボニル反応生成物が生体に影響を及ぼす可能性が示唆された。

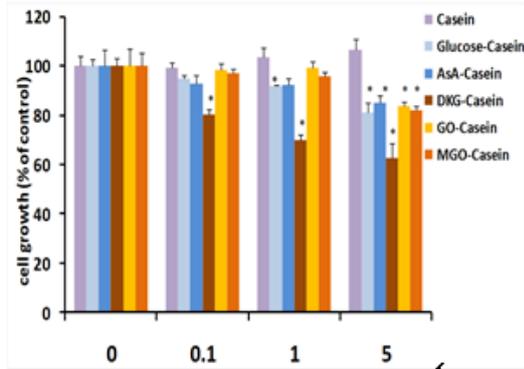


図 3. アミノ・カルボニル反応生成物の細胞増殖への影響

### (4) アミノ・カルボニル反応生成物の細胞の RAGE mRNA 発現への影響

DKG-Casein が腸管細胞に増殖抑制を引き起こすことが明らかになったが、どのような機構によるものかを検討するために、AGE の受容体 (RAGE) の発現への影響を調べた。RAGE は AGE 修飾タンパク質をリガンドとして認識する AGE 受容体と結合することにより、この結合を引き金として AGE 受容体はサイトカインの産生亢進などの種々の細胞応答を引き起こして糖尿病合併症などの様々な疾患の発症・進展に関与することが知られている。Caco-2 の RAGE mRNA レベルへの DKG-Casein の影響を調べた結果を図 4 に示す。5 mg/ml の濃度での DKG-Casein 処理により、RAGE mRNA は未処理あるいは casein 処理の約 1.4 倍に有意に上昇した。DKG-Casein の Caco-2 への影響は RAGE を介する可能性が示唆された。

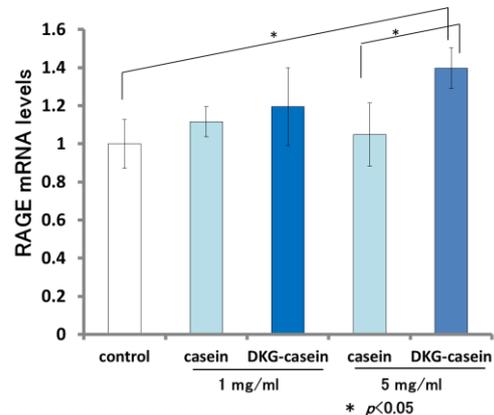


図 4. アミノ・カルボニル反応生成物の RAGE mRNA 発現への影響

本研究により AsA の酸化生成物が調理・加

工過程においてアミノ・カルボニル反応に関わることが示された。また、AsA の酸化生成物と食品タンパク質から生成した飲食物由来グリケーション反応生成物が生体に影響を及ぼす可能性が示唆され、その機構は RAGE を介する可能性が示唆された。このことから、私たちに必要な栄養素の一つであるビタミン C も食品や生体内で変化あるいは他の成分と反応する過程で有害な成分が生成する可能性があることが示され、私たちの食生活の安全を考えるうえで興味深い基礎データが得られたと考えている。今後さらに細胞への影響の詳細なメカニズムに関する検討や動物個体レベルでの研究などが必要である。

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

① 三宅紀子、酒井清子、松井裕巳、吉川巧、鈴木恵美子、倉田忠男；食品の調理・加工過程におけるビタミン C 由来グリケーション反応生成物の健康への影響、日本調理科学会、2011 年 8 月 30 日、高崎健康福祉大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

東京家政学院大学・現代生活学部・准教授  
研究者番号：70314573

##### (2) 研究分担者

鈴木 恵美子 (SUZUKI EMIKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創生科学研究科・教授

研究者番号：80154524