



メイラード反応機構解明に向けた 反応生成物の一斉分析法の開発と構造決定およびその機能解析

新潟薬科大学応用生命科学部 能見 祐理

はじめに

メイラード反応はカルボニル基とアミノ基の共存により起こる非酵素的褐変反応であり、食品の加工・貯蔵時に普遍的に起こる成分間反応のひとつである。元来食品中の化学反応として研究が進んできたが、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をはじめとする加齢変性疾患や、統合失調症などの疾病との関連についても研究が行われている。メイラード反応は反応の条件 (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、1912年に反応が見出されて以来現在でも反応機構の全容が明らかにされていない。筆者はメイラード反応の機構解明に向けて、先行研究で見逃されてきた未知化合物の探索とその構造解析や、簡便な一斉分析法の開発とその応用研究を通じて、メイラード反応機構における未同定の関与因子を特定し、その機能を明らかにする研究に取り組んできた。それらの成果について紹介する。

1. メイラード反応生成物の構造決定と機能解析

1-1. グルタチオンと α -ジカルボニル化合物の反応機構の解析

メイラード反応の中間体として知られる α -ジカルボニル化合物 (α -DCs) の一種であるグリオキサール (GO) と抗酸化ペプチドであるグルタチオン (GSH) のメイラード反応生成物の解析を行った。研究開始当初、GSH とグルコースあるいはフルクトースとのメイラード反応によって生成する転位生成物が GSH 関連酵素の活性低下を引き起こすことが報告されていた。 α -DCs はグルコースやフルクトースよりも反応性が高く、糖尿病患者の血中において GO 量の上昇と GSH の枯渇が同時に見られることから、疾病の進展に伴う代謝不全によって GSH と GO のメイラード反応が亢進すると予想し、pH 7.4 でのモデル条件下において GO との反応生成物を探索した結果、dioxo-morpholine 構造をもつ新奇化合物を同定し、その生成機構を明らかにした (図 1A)¹⁾。この研究で見出された反応生成物は、

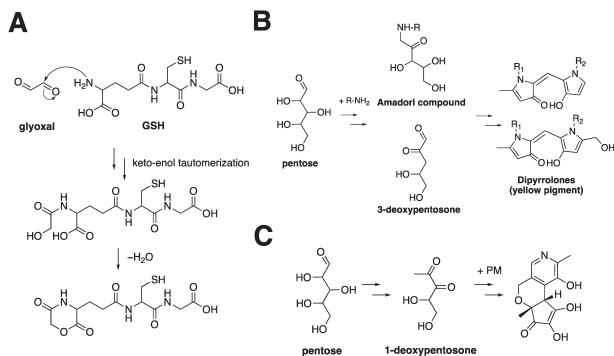


図 1. 構造決定されたメイラード反応生成物

細胞内酸化ストレスの増大に伴うアルデヒド修飾体のバイオマーカーとして機能する可能性がある。

1-2. ペントース由来低分子色素 dipyrrolone 類の類縁体の構造同定と反応機構の解析

醤油や味噌などの弱酸性褐変食品中で褐変に寄与すると考えられる低分子色素化合物構造の同定や反応機構の解析を中心に行った。メイラード反応は反応の条件の違いによって多種多様な生成物が形成するにもかかわらず、従来のモデル反応系を用いた研究では特定の反応条件 (中性付近, ヘキソースと Lys, Arg の反応) が専ら採用され、それ以外での条件下での検証が十分なされていなかった。食品においては弱酸性を示すものも多く、より反応性が高いペントースも含まれていることから、弱酸性条件下におけるペントースとアミノ酸のメイラード反応に着目して研究を進めた結果、xylose と Lys から特異的に形成する新奇低分子黄色色素 dipyrrolone 類が Lys 以外のアミノ酸の N 末端アミノ基からも生成されることを証明した²⁾。また、¹³C 安定同位体を用いた検証により、hydroxymethyl 基が付加した dipyrrolone 類縁体の生成機構を解明した³⁾。また、これら色素類の機能解析を行い、味増強作用や抗菌作用はないものの、アスコルビン酸よりも高い抗酸化活性があることを明らかにした。さらに、メイラード反応の中期段階で生成する α -DCs の一斉分析法の構築に取り組み、構築した分析法を用いて過去に同定した dipyrrolone 類の反応機構について改めて解析を行い、dipyrrolone 類の反応前駆体を特定することに成功した (図 1B)⁴⁾。食品には様々な糖質やアミノ化合物が含まれていることから、このような低分子色素構造がタンパク質側鎖部分に多数形成・累積し、メイラード反応に特徴的な褐色を呈することが示唆される。構造不詳である高分子褐色物質メラノイジンの化学構造解明に迫る研究成果といえる。

1-3. ピリドキサミンとペントース由来反応生成物の解析

アミノ基を有するビタミン類のメイラード反応生成物について、高極性物質を分離できる分析手法を用いて解析を行った。メイラード反応生成物に限った話ではないが、構造決定のために物質を単離する場合、有機溶媒による抽出や逆相カラムクロマトグラフィによる分離を用いる事例が多く、極性の高い水層画分についてはあまり解析がなされていない。そこで高極性画分に着目し、逆相カラムとは異なる分離挙動を示すカラムを用いて探索した結果、ビタミン B₆ 類縁体である pyridoxamine (PM) とペントースのメイラード反応で生成する新奇化合物を構造決定するとともに、反応前駆体の特定に成功した (図 1C)⁵⁾。この化合物は中性条件下の加熱で容易に生成し収率が比較的高いにもかかわらず、逆相カラムには保持されないためこれまで解析がなされていなかったものと思われる。PM はヒト介入試験において統合失調症患者の血漿中 pentosidine 値を

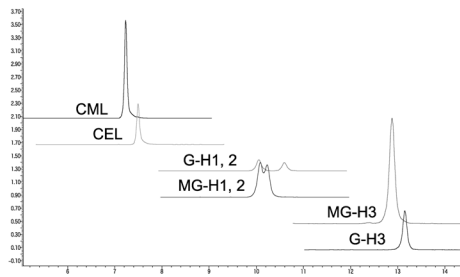


図2. AGEsのMRMクロマトグラム

減少させ、精神症状の改善が一部見られたことから、最も有力なAGEs阻害剤として期待される。PentosidineはriboseとLys, Arg側鎖の架橋によって生成するAGE構造体であり、今回見出された反応機構はPMがもつAGEs形成阻害作用の一端を担う可能性がある。

2. 終末糖化産物 (AGEs) の一斉分析法の開発とその応用

メイラード反応の指標となりうる化合物群について質量分析装置を用いた簡便かつ高感度に定量できる分析法の開発に取り組んだ。メイラード反応は食品中に起こる普遍的な化学反応であるにも関わらずその機構や生成物については未だ不明な点も多く、測定法も確立されていないものが多い。メイラード反応の後期段階で生成するAGEsは高温で熱加工された食品だけでなく、加齢や疾病の進展に伴って体全体で緩やかに生成され、慢性疾患の発症と増悪の原因となることが報告されている。体内における過剰な内因性のAGEs生成は炎症誘発過程に関与することがわかっているが、食事性AGEsの活性や代謝については未だ不明な点が多い。そこでまずは我々が日常摂取する食品中のAGEs量を把握すべく、LC-MS/MSを用いたAGEsの一斉分析法を構築した(図2)。本分析法は誘導体化などの複雑な前処理をせずに直接化合物を分離・保持することが可能であり、今後同定される新奇AGE構造体についても対応できるように設計された。実際に、本分析法により測定可能なAGEsは現在13種まで拡張している。構築した分析法を用いて褐変食品である醤油・ビール類のAGEsの分布を明らかにした。原材料・製造方法や貯蔵・加工条件によって形成するAGEsの種類に違いが見られたことから、AGEsの測定を食品の品質評価に応用できる可能性が示された⁶⁾。

また、鳥取大学医学部との共同研究において本分析法を生体試料へも適用させ、2型糖尿病患者の血中carboxymethyllysine (CML)濃度が上昇することを明らかにした⁷⁾。さらに、男女10名における外因性の食事性AGEsと内因性の生体AGEsとの関連や血中での動態の解析によって、CMLは赤血球中に分布する一方で、methylglyoxal-derived hydroimidazolone (MG-H1)は食事に由来することを明らかにした。150人の血中のAGE類の含有量と遺伝子の多型との関係についても調べ、血中CML濃度がヒトのアルコール類代謝経路の律速酵素ALDH2遺伝子の多型と相関していることを明らかにした⁸⁾。

おわりに

以上、メイラード反応により生成する未知化合物の構造決定と機器分析による解析を通じていくつかの新たな知見を得ることができた。しかし、未だ捉えきれていない反応に関わる諸因子がまだまだ存在するという課題も浮き彫りになった。これら

因子を見出すには、分析技術を大いに活用しつつ、新しい技術・手法を柔軟に取り入れ、多角的な視点で実験をデザインし結果を慎重に深く解析する必要があると考えている。今後も研究に邁進し、メイラード反応の方向性を決定づけるような関与因子を明らかにしていきたい。メイラード反応を理解し制御・応用するための新規知見を獲得し、食品の品質制御や食品産業の発展に貢献していく所存である。

(引用文献)

- 1) Nomi Y, Aizawa H, Kurata T, *et al.*, Glutathione reacts with glyoxal at the N-terminal, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2408-2411 (2009).
- 2) Nomi Y, Sakamoto J, Takenaka M, *et al.*, Conditions for the formation of dilyl-dipyrrolones A and B, and novel yellow dipyrrolone derivatives formed from xylose and amino acids in the presence of lysine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 221-226 (2011).
- 3) Nomi Y, Masuzaki R, Terasawa N, *et al.*, Formation mechanism and characterization of dilyl-dipyrrolones, the Maillard-type yellow pigments, *Food Funct.*, **4**, 1067-1075 (2013).
- 4) Nomi Y, Yamazaki K, Mori Y, *et al.*, Identification of dipyrrolone pigments and their precursors formed in the Maillard reaction of carnosine and pentose under weakly acidic conditions, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, 2042-2053 (2021).
- 5) Nomi Y, and Otsuka Y, Isolation, identification, and proposed formation mechanism of a novel hydrophilic compound formed by Maillard reaction between pyridoxamine and pentose, *Sci. Rep.*, **10**, 1823 (2020).
- 6) Nomi Y, Annaka H, Sato S, *et al.*, 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.*, **64**, 8397-8405 (2016).
- 7) Okura T, Ueta E, Nakamura R, *et al.*, High serum advanced glycation end products are associated with decreased insulin secretion in patients with Type 2 diabetes: A brief report, *J. Diabetes Res.*, **2017**, 5139750 (2017).
- 8) Nomi Y, Kudo H, Miyamoto K, *et al.*, Free advanced glycation end product distribution in blood components and the effect of genetic polymorphisms, *Biochimie*, **179**, 69-76 (2020).

謝辞 本研究は、日本女子大学大学院家政学研究科、お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科、同大学生生活環境教育研究センター、および新潟薬科大学応用生命科学部で実施されました。メイラード反応研究に取り組む機会を与えてくださり、学生時代に多大なるご指導を頂きました日本女子大学のグエンヴァンチュエン先生、構造解析を一からご指導くださいました新藤一敏先生に深く御礼申し上げます。日々の研究生生活でのご指導とご助言のみならず、研究者として必要な視点や考察力、姿勢を示してくださいましたお茶の水女子大学の村田容常先生(現 東京農業大学)、新たな分野への挑戦や共同研究の推進など研究の幅を広げるための機会を沢山与えて頂くと共に、本賞にご推薦くださいました大塚讓先生に心より厚く御礼申し上げます。研究を自由に遂行できる環境を整えてくださり、日頃から暖かいお言葉と有意義なご助言を頂きました新潟薬科大学の佐藤真治先生、松本均先生に心より感謝申し上げます。最後に、研究を遂行するにあたり、多大なるご助力をくださった全ての先生方、諸先輩方、共同実験者の皆様、学生諸氏に深く感謝申し上げます。