

# LC-MS/MS を用いた食品素材の非蛍光性糖化最終産物

## CML 生成抑制作用評価

瀬戸山 央、橋本 知子、廣川 隆彦（化学技術部 バイオ技術グループ）

### 1. はじめに

近年、生体を構成するタンパク質や脂質の糖化が皮膚老化、動脈硬化など様々な疾患の一因となることが明らかにされつつある<sup>1)</sup>。この糖化を抑制するための1つの方法として機能性食品の摂取がある。広く行われている機能性食品の抗糖化性評価法には *in vitro* で蛍光性の糖化最終産物 (AGEs: Advanced Glycation End Products) の生成抑制作用を評価する方法がある。一方、AGEs は様々な化合物の総称であり非蛍光性の化合物も存在する<sup>2)</sup>。

本研究は、非蛍光性糖化最終産物の1つである CML (カルボキシメチルリジン) に着目した。CML はグルコースとリジンの反応産物の1つとして構造決定された化合物であり、糖とタンパク質が反応して生成するアマドリ化合物がさらに酸化分解を受けて生成することが知られている<sup>3)</sup>。生体中に形成される AGEs の中で比較的多く存在し、皮膚に蓄積し皮膚老化に関与することが明らかにされている<sup>4)</sup>。

一般に機能性食品の CML 生成抑制作用評価は ELISA 法を用いて行われている<sup>5)</sup>。ELISA 法は抗原抗体反応を利用した方法であり、高感度にタンパク質中の CML を分析することが出来る。一方、分析には作業工程が多く時間がかかることや、用いる抗体が高価であるなどのデメリットがある。本研究では ELISA 法に代わる方法として、微量成分を高感度に分析することが可能である LC-MS/MS を用いた CML 分析方法について検討を行い、分析方法の確立および食品素材の CML 生成抑制作用評価方法の構築を目的として行った。

### 2. 実験及び結果

#### (1) 糖化タンパク質の調製

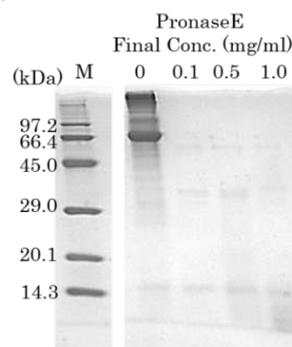
牛血清アルブミンおよびグルコースをそれぞれ終濃度 8 mg/ml および 0.2 M となるように PBS (pH7.0) に溶解し、60℃、40 時間反応させることでウシ血清アルブミンを糖化させ、糖化タンパク質溶液 (糖化牛血清アルブミン溶液) を調製した。

#### (2) 糖化タンパク質の酵素分解

CML は糖化タンパク質のリジン残基が糖化修飾されることで生成するが、糖化タンパク質を直接 LC-MS/MS で分析することはできない。そのため、プロテアーゼにより遊離アミノ酸に分解する必要がある。調製した糖化タンパク質溶液に PronaseE (プロテアーゼ) を反応液中終濃度 0.1 ~ 1.0 mg/ml となるように加え 37℃、24 時間酵

素分解処理し、分解の様子を SDS-PAGE により確認し最適な PronaseE の濃度について検討を行った。SDS-PAGE には 12.5% 均一ゲルを用い、泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー (CBB) 染色にてタンパク質を検出した。タンパク質分子量マーカーは EzStandard (AE-1440、ATTO 社製) を用いた。

SDS-PAGE の結果、PronaseE の濃度依存的に糖化牛血清アルブミン (分子量 66.4kDa) が分解され、低分子領域のバンドが濃くなる様子が観察された (図1)。この結果から、終濃度 1 mg/ml の PronaseE で 37℃、24 時間処理することで糖化牛血清アルブミンを十分に分解できることが分かった。



SDS-PAGE(12.5% Gel),CBB染色

図1 SDS-PAGE 後のゲル画像

#### (3) LC-MS/MS による CML の解析

糖化タンパク質の酵素分解により遊離した CML を測定するため、LC-MS/MS を用いた CML 分析条件の検討を行った。表1に示す条件で標準 CML 溶液を分析した。その結果、標準 CML の濃度が 0.007~0.7ppm の濃度範囲で良好な直線性を有する検量線を得ることができ (図2)、LC-MS/MS を用いた CML 分析条件を確立することができた。

表1 CML 分析時の LC-MS/MS 条件

LC条件	
カラム	BEH Amide 100mm(Waters社製)
移動相	A:0.1%ギ酸水、B:アセトニトリル
流速	0.5ml/min
グラジエント条件	B. Conc:70%(0min)→50%(0.2min)→25%(3.0min) →25%(4.0min)→70%(5.0min)→70%(7.0min)
カラム温度	40℃
MS条件	
イオンモード	ESI Positive
MRMモード	205.2 > 84.82
コーン電圧	15V
コリジョン電圧	20V

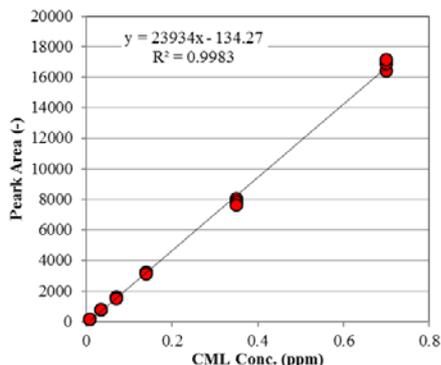


図2 LC-MS/MS分析によるCML標準溶液の検量線

確立した分析条件を用いて、実際に調製した糖化タンパク質溶液を酵素分解したものについてCMLが検出、定量できるかを試みた。

牛血清アルブミンおよびグルコースをそれぞれ終濃度8 mg/ml および0.2 M となるようにPBS (pH7.0) に溶解し、60°C、40 時間反応させることでウシ血清アルブミンを糖化させ、糖化タンパク質溶液(糖化牛血清アルブミン溶液)を調製した後、PronaseEを反応液中終濃度0.02 ~ 1.0 mg/ml となるように加え37°C、24 時間酵素分解処理し、限外濾過により得た分子量10K未満の画分について表1に示す条件でCMLの分析を行った。その結果、PronaseEの濃度依存的にCML濃度が高まる傾向が確認でき、PronaseE終濃度1.0 mg/mlで十分酵素分解できることがわかった(図3)。

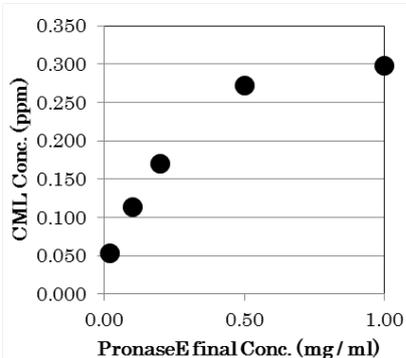


図3 PronaseE濃度とCML生成量の関係

#### (4) LC-MS/MSを用いた食品素材のCML生成抑制作用測定

牛血清アルブミンを用いた糖化タンパク質調製、酵素分解、LC-MS/MSによるCML分析までの一連の方法を用いて食品素材のCML生成抑制作用評価を行った。

食品素材として市販されている野菜、果物およびハーブを細断し、10倍容の70%メタノールで抽出後、遠心分離を行い上清を回収、0.45µm フィルターでろ過したものを試料溶液とした。

試料溶液、ウシ血清アルブミン(終濃度8 mg/ml) およびグルコース(終濃度0.2 M)をPBS (pH7.0) に溶解し、60°C、40 時間糖化反応を行った。その後、PronaseEを反応溶液中1.0 mg/ml となるように加えて37°C、24 時間酵素分解し、限外濾過により得た分子量10K未満の画

分について表1に示す条件でLC-MS/MSによるCMLの分析を行った。試料溶液のかわりに70%メタノール溶液を加え同様の操作を行ったものをコントロールとし、コントロールのCML生成量(A)および試料を添加した際のCML生成量(B)より以下の式でCML生成抑制率(%)を算出した。

$$\text{CML生成抑制率(\%)} = \{(A-B) / A\} \times 100$$

結果を図4に示す。いくつかの食品素材について50%近いCML生成抑制率を示し、これらの食品素材にCML生成抑制作用があることが明らかとなった。

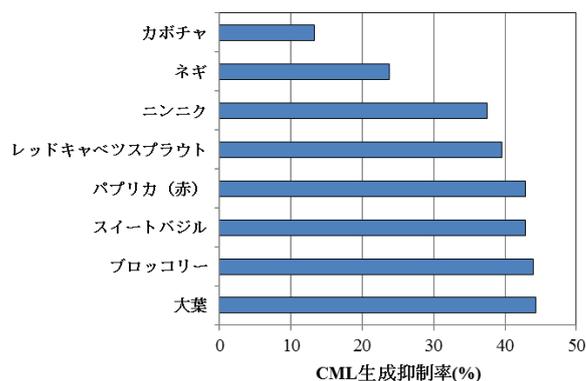


図4 食品素材のCML生成抑制作用

### 3. 考察及び今後の展開

LC-MS/MSを用いたCML分析方法について検討を行い、ウシ血清アルブミンおよびグルコースを用いて調製した糖化タンパク質について、酵素分解することでCMLを遊離させ、遊離したCMLのLC-MS/MS分析方法を確立することができた。また確立した方法を用いて、数種類の食品素材を対象としたCML生成抑制作用評価を行った結果、いくつかの食品素材にCML生成抑制作用があることが明らかとなった。

一方、今回の分析では各食品素材について1回の測定しか行っていないため、今後測定回数や試料数を増やし本研究で確立した評価方法の精度についての検討が必要である。また、従来法であるELISA法との相関についても今後の検討課題である。

#### 【参考文献】

- Palimeri, S. Palioura, E. Diamanti-Kandarakis, E., *Diabetes Metab Syndr Obes*, **8**, 415-426 (2015).
- Thorpe, SR. Baynes, JW., *Amino Acids*, **25**, 275-281 (2003).
- Ahmed, MU. Thorpe, SR. Baynes, JW., *J Biol Chem*, **261** (11), 4889-94 (1986).
- Masamitsu, I. Masayuki, Y. Keitaro, N. Yoshikazu, Y., *ANTI-AGING MEDICINE*, **8** (3), 23-29 (2011).
- Wakako, K. Tomohiro, A. Seikoh, H. Ryoji, N., *J Biochem*, **136**, 831-837 (2004).

【外部発表】 口頭発表 1件