

# グルコース修飾タンパク質の消化および吸収性について

## —牛乳由来β-ラクトグロブリンのメイラード反応生成物に関する研究—

### Digestion and Absorption of Glucose-modified Proteins:

Study on Maillard Reaction Products of  $\beta$ -lactoglobulin from Bovine Milk

中島 敬子

Keiko Nakajima

#### 要旨

メイラード反応により修飾されたタンパク質のおいしさに関する機能や栄養機能・保健機能についての研究は数多く行われてきた。しかし、生体内における修飾タンパク質の消化・吸収性に関する研究はあまり行われていない。そこで、本研究ではβ-ラクトグロブリン(β-LG)をグルコースと共に反応させ(修飾率約50%)、グルコース修飾の程度と消化・吸収性について*in vitro*および*in vivo*において検討した。*In vitro*において、修飾および未修飾β-LGをペプシン・パンクレアチン系酵素により消化させた。消化物の収量を量り、さらにHPLC分析を行った。一方、*in vivo*においては、Wistar系ラットに修飾および未修飾β-LGを経口投与した。一定時間経過後に解剖し、消化物の収量を量った後にHPLC分析を行った。その結果、β-LGは修飾率約50%の場合、修飾と未修飾ではペプチド結合の切断形式が異なることが推測された。また、*in vivo*においては、修飾は未修飾よりも速やかに消化・吸収されることが明らかとなった。グルコースを修飾させることによりβ-LGのアレルゲン性が緩和する可能性が考えられた。

●キーワード: メイラード反応 (Maillard reaction) / 消化 (digestion) / 吸収 (absorption)

#### I. はじめに

食品の貯蔵・加工・調理の過程において、食品の構成成分であるアミノ基とカルボニル基の間で非酵素的な反応が生じる。この反応は1912年にフランスの生化学者L. C. Maillardにより発見され、メイラード反応(アミノ・カルボニル反応)と呼ばれている。アミノ基は遊離アミノ酸、アミン、ペプチド、タンパク質などの構造中に存在し、またカルボニル基は糖、脂質あるいはそれらの分解生成物であるアルデヒド、ケトンなどの構造中に存在するため、ほとんどの食品中においてメイラード反応は起きている。

食品科学や食品産業の分野では、メイラード反応によって味、色、香りの生成およびテクスチャー(食感)の変化をもたらされることから、食品の品質向上・品質劣化の双方に関与する反応であるとみなされている<sup>1)</sup>。

一方、栄養的側面についても数多くの研究が行われ、メイラード反応の初期段階ではリジンおよびその他の必須アミノ酸の損傷によりタンパク質の栄養価の低下が問題とされている<sup>2)</sup>。また、メイラード反応の後期段階では、タンパク質の構造的な変化により消化酵素の作用を受けにくくなることが報告されている<sup>3)</sup>。

近年では、メイラード反応は抗酸化作用や善玉菌といわれるビフィズス菌の増殖促進効果など、保健的機能を有する反応であることが明らかになりつつある<sup>4-8)</sup>。しかし、その一方で食品の加工および調理の過程において、発がん性を有する様々な有害物質<sup>9-13)</sup>がメイラード反応により生成することも明らかとなっている。

さらに、メイラード反応の後期段階では後期糖化生成物(Advanced glycation end products: AGEs)が生成する。生体内で生じるAGEsの場合、高血糖を伴う様々な疾病(例えば糖尿病、白内障、腎臓疾患、動脈硬化、神経変性疾患など)の進展に関与することが明らかとなっている<sup>14)</sup>。一方、食事性AGEsは生体内において炎症を亢進させることが報告されているが<sup>15,16)</sup>、これらのAGEsは吸収されても大半が腎臓により速やかに排泄されるためヒトの健康に害を与える可能性は低いといった報告もあり<sup>17)</sup>、食事性AGEsの生体内における生理作用については、未だ解明されていない。

したがって、これらメイラード反応生成物の消化パターンや生体内における吸収性に関して解明することは極めて重要であるが、詳細に検討した研究はほとんど見当たらなかった。そこで本研究では、グルコース修飾タ

ンパク質をモデルとし、一次構造が知られている $\beta$ -LGを用いて、*in vitro* および *in vivo* における修飾の程度と消化・吸収性との関連性について検討した。

## II. 材料および方法

### 1. Mass Spectrometer による $\beta$ -LGの質量分析 (実験1)

ウシ $\beta$ -LG (Sigma-Aldrich) は、0.1%ギ酸・50% $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ を用いて5 $\mu\text{M}$ に希釈し分析試料とした。TOF型LC/MSMariner (Applied Biosystems) の分析装置を用いて、シリンジポンプ (Harvard Apparatus, PHD2000 Infusion) によるインフュージョン法により測定した。流速0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 、イオン化部はエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法、検出モードは陽イオン検出、Nozzle potentialは100V、Splaytip potentialは3,500V、データ回収は100–2000amuにおいて5 seconds/spectrumとした。検出されたマススペクトラムは解析ソフト Data Explorer (Per Septive Biosystems) を用いて解析し、マスデコンボリューションにより質量の確認を行った。

### 2. グルコース修飾 $\beta$ -LGの調製

$\beta$ -LGをD-グルコース (グルコース) (和光純薬工業) と共に1:2 (重量比) の割合で各々超純水に溶解させて混合し、凍結乾燥処理して粉末試料とした。粉末系、50 $^{\circ}\text{C}$ 、RH75%の条件下で7日間反応させた後、流水透析 (4 $^{\circ}\text{C}$ 、3日間) により未反応のグルコースを除去し、再び凍結乾燥して非透析画分をグルコース修飾 $\beta$ -LGとした。

### 3. アミノ酸アナライザーによる修飾率の測定 (実験2)

グルコース修飾 $\beta$ -LG中のリジン残基をアミノ酸アナライザーにより測定し、その減少率を修飾率として算定した。グルコース修飾 $\beta$ -LG 2.5mgを加水分解管に採取し、6N HClで110 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間の加水分解後、エバポレーターによって減圧下でHClを除去し、アミノ酸分析計 (JASCO LCCS-905) によりリジン量を測定した。

### 4. グルコース未修飾および修飾 $\beta$ -LGのHPLC分析 (実験3)

グルコース未修飾および修飾 $\beta$ -LGは、超純水を用いて1mg/mlの濃度に希釈し、HPLC試料とした。分析装置はShimadzu HPLC-10Aを用い、カラムはInertsil HPLC COLUMN WP800 C8 5 $\mu\text{m}$  (GL Science,  $\phi$  4.6  $\times$

150mm) を用いて分析した。流速0.5ml/min、検出波長220nm (UV)、溶出条件は(0.05% TFA $\cdot$ H<sub>2</sub>O) / (0.05% TFA $\cdot$ CH<sub>3</sub>CN) = (60/40) to (40/60) in 30minの条件下で測定した。

### 5. ペプシン・パンクレアチン系酵素による*in vitro*消化実験

グルコース未修飾および修飾 $\beta$ -LG 10mgに0.1NHCl 1.3mlを加え5 $^{\circ}\text{C}$ で17時間タンパク質を変性させた。さらに、0.2mlペプシン溶液 (1.5mg/2ml 0.1N HCl) を加え37 $^{\circ}\text{C}$ で3時間反応後、0.2N NaOHを用いて中和させ、0.75mlパンクレアチン溶液 (5mg/7.5ml 0.1M P.B. pH8.0) と防腐剤として0.01%チモール溶液 10 $\mu\text{ml}$ を加え37 $^{\circ}\text{C}$ で20時間の反応を行った。反応後、沸騰浴中で10分間加熱して反応を止めた。得られた消化液は、脱塩装置 (旭化成(株)、マイクロアシライザーG1) により脱塩し、凍結乾燥して消化物とした。

### 6. *In vitro*系消化物の限外ろ過による分画 (実験4)

*In vitro*系において消化された消化物は、限外ろ過膜 (DIAFLO ultrafiltration membranes YM3, YM10, PM10膜) (グレースジャパン) を用いて窒素ガス加圧下で分子量3,000Da以下、3,000Da-10,000Da、10,000Da以上の3画分に分画した。

### 7. *In vitro*系消化物のHPLCによるペプチドパターンの分析 (実験5)

分画した*in vitro*系消化物は超純水を用いて900 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 濃度に調製し試料とした。分析装置はShimadzu HPLC-10Aを用い、カラムはInertsil HPLC COLUMN WP800 C8 5 $\mu\text{m}$  (GL Science,  $\phi$  4.6  $\times$  150mm) を用いて分析した。流速0.5ml/min、検出波長220nm (UV)、溶出条件は(0.1% TFA $\cdot$ H<sub>2</sub>O) / (0.1% TFA $\cdot$ CH<sub>3</sub>CN) = (100/0) to (69/31) in 80minの条件下で測定した。

### 8. ラットによる*in vivo*消化実験

Wistar系雄ラット (体重約200g) を未修飾 $\beta$ -LG群、修飾 $\beta$ -LG群、コントロール群の3群に分け、無タンパク質食を3日間自由摂取させた。飼育温度は23  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ 、水は自由摂取とし、12時間の明暗サイクルにより飼育した。予備飼育後24時間絶食させ、未修飾LG群にはグルコース未修飾 $\beta$ -LG溶液 (250mg/0.8ml)、修飾 $\beta$ -LG群にはグルコース修飾 $\beta$ -LG溶液 (250mg/

0.8ml)、コントロール群には水をゾンデにより経口投与した。投与してから一定時間経過後(20-60min)に解剖し、胃、小腸上部および下部の内容物(ペプチド混合物)を採取した。

### 9. *In vivo* 系消化物の限外ろ過による分画(実験6)

*In vivo* 系において消化された消化物は、限外ろ過膜(DIAFLO ultrafiltration membranes YM3, YM10, PM10膜)(グレースジャパン)を用いて窒素ガス加圧下で分子量3,000Da以下、3,000Da-10,000Da、10,000Da以上の3画分に分画した。

### 10. *In vivo* 系消化物のHPLCによるペプチドパターンの分析(実験7)

分画した *in vivo* 系消化物は超純水を用いて900µg/20µl濃度に調製し試料とした。分析装置はShimadzu HPLC-10Aを用い、カラムはInertsil HPLC COLUMN WP800 C8 5µm (GL Science, φ4.6×150mm)を用いて分析した。流速0.5ml/min、検出波長220nm(UV)、溶出条件は(0.1% TFA・H<sub>2</sub>O)/(0.1% TFA・CH<sub>3</sub>CN) = (100/0) to (69/31) in 80minの条件下で測定した。

## III. 結果および考察

### 1. Mass Spectrometerによるβ-LGの質量分析(実験1)

β-LGをMass Spectrometerにより質量を測定したところ(Fig. 1(A))、多価イオンとして多数のイオン

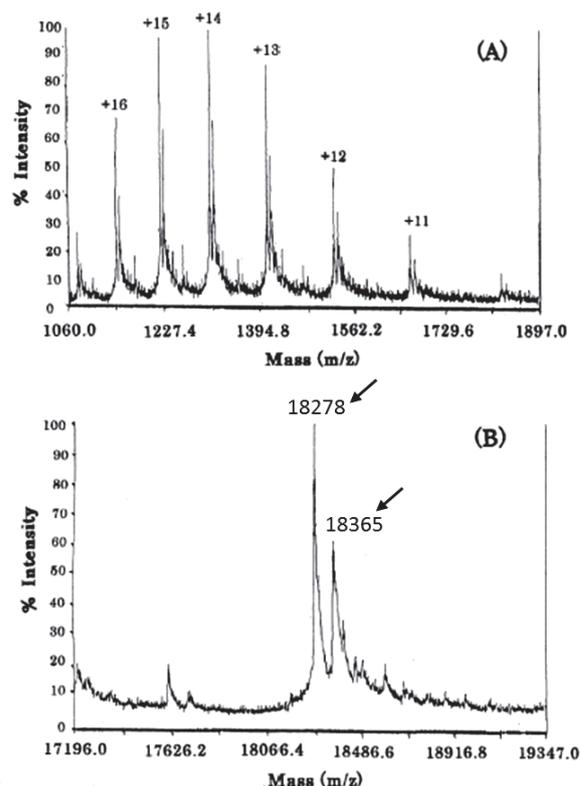


Fig. 1. Mass Spectrometerによるβ-LGの質量測定  
(A) 多価イオンでの検出パターン  
(B) マスデコンボリューションによるマススペクトラム

ピークが検出された。これらのイオンピークをマスデコンボリューションにより解析したところ(Fig. 1(B))、2つのピークが認められて各々m/z (z1) = 18365、18278であった。



Scheme 1. β-LG 変異体 A および B の全一次構造

$\beta$ -LGは乳清タンパク質の約50%を占める主要なタンパク質であるが、牛の品種による変異体が知られており、これまでにA, B, C, D, E, F, G型が認められている。またGodovac-Zimmermannらによってその一次構造は明らかにされている(Scheme 1)<sup>18)</sup>。そこでこの配列をもとにData Explorerを用いて変異体AおよびBのモノアイソトピック質量(z1)を計算したところ、それぞれ18368、18282であった。したがって、本研究で用いた $\beta$ -LGには変異体AおよびBが含まれていることが確認された。

## 2. アミノ酸アナライザーによる修飾率の測定(実験2)

$\beta$ -LGを7日間グルコースによって反応させたところ、タンパク質構造中のリジン量は未修飾のものを100%とすると修飾 $\beta$ -LGで45%であった(Table 1)。すなわち、修飾反応によるリジン残基の損失率は55%であった。

リジンは必須アミノ酸のひとつであり、栄養的に重要なタンパク質であるが、メイラード反応によって損傷を受けやすく栄養価の低下が問題とされている。グルコースによる修飾反応では、タンパク質構造中の塩基性アミノ酸あるいはN末端アミノ酸のアミノ基にグルコースのカルボニル基が反応して引き起こされる。なかでも特にリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基はグルコースとの反応性が高い。そこで本研究では、 $\beta$ -LG中のリジン残基の減少率を修飾の程度(修飾率)とみなした。したがって、7日間修飾 $\beta$ -ラクトグロブリンの修飾率は約50%であった。

Erbersdoblerらは主な食品について修飾率を測定している。ビスケットは46%、ドイツパン(Zwieback)は42%、という値が報告されている<sup>19, 20)</sup>。彼らはリジンの損失率をリジンとグルコースの初期反応生成物であるフラクトースリジン量から算出しているため、本研究における修飾率とは若干異なる。リジンの定量法では、強酸による加水分解によってフラクトースリジンの一部をもとのリジンへ回復させるため、低値を示している可能性がある。我々も実際の食品について修飾率を測定す

Table 1. 未修飾および修飾 $\beta$ -LGのグルコース修飾率

	リジン残存率	リジン減少率
未修飾 $\beta$ -LG	100%	0%
修飾 $\beta$ -LG	45% <sup>a)</sup>	55% <sup>b)</sup>

a) 未修飾 $\beta$ -LG中リジン量を100%とした場合の残存率

b) 未修飾 $\beta$ -LG中リジン減少を0%とした場合の減少率

ることが望ましいが、本研究で調製した修飾タンパク質は食生活において日常的に摂取されている程度の修飾率であることが予測される。

なお同条件で修飾反応させたオボアルブミンの修飾率は59.5%、 $\beta$ -カゼイン50.1%およびリゾチーム51.4%であり多くのタンパク質は本条件で反応させることで修飾の程度をおよそ50%として調製できることが明らかとなった<sup>21)</sup>。

## 3. グルコース未修飾および修飾 $\beta$ -LGのHPLC分析(実験3)

未修飾および修飾 $\beta$ -LGをHPLCにより分析した結果をFig. 2に示す。修飾 $\beta$ -LGは限外ろ過によりモノマーを単離したのち分析した。

未修飾 $\beta$ -LGは2つのピーク(ピークaおよびb)に分かれることが確認された。これは試料中に変異体AおよびBが含まれているためと推察された。一方、修飾 $\beta$ -LGではピークcおよびdがグルコース修飾された修飾物である可能性が示唆された。グルコースの修飾により親水性が増したため、溶出保持時間が短くなった可能性が推察された。またピークeは、ピークaおよびbと溶出保持時間が近いことから、グルコース未修飾の $\beta$ -LGである可能性が示唆された。なだらかな山のような形で検出され、条件設定の検討を試みたが未修飾 $\beta$ -LGのように2つのピークに分離することはできなかった。

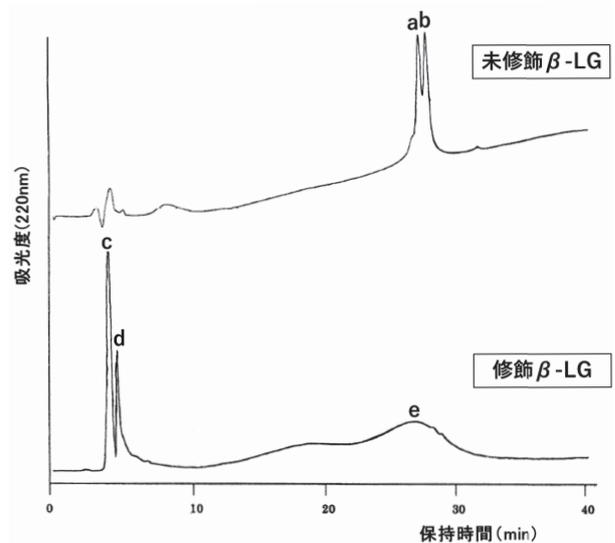


Fig. 2. 未修飾および修飾 $\beta$ -LGのHPLC分析

ピークa, b: 未修飾 $\beta$ -LG由来ペプチド

ピークc, d, e: 修飾 $\beta$ -LG由来ペプチド

修飾  $\beta$ -LG 中には変異体のほかに修飾の程度や修飾パターンの異なるもの、もしくは修飾されなかったもの、というように構造的に様々な状態のものが混在しているのではないかと推察された。Morgan らはラクトースによって修飾させた  $\beta$ -LG 中の修飾パターンについて検討したが同サンプル中においてラクトースによる修飾パターンは必ずしも均一ではないことが分かった<sup>22,23</sup>。タンパク質一分子あたりに結合しているラクトース分子数にはばらつきがあり、結合数が同じ場合でもその結合部位に違いが認められた。一方、Fogliano らも  $\beta$ -LG 構造中のラクトースの結合部位の同定を行ったが、ラクトースのアミノ酸残基への結合部位には特異性があり Lys100 は立体構造的に最も修飾されやすい部位であると報告している<sup>24</sup>。

したがって、同条件下において反応させた修飾タンパク質でも複数の修飾パターンが含まれていることが示唆された。このことは修飾タンパク質の構造を把握することの難しさを示しているが、未修飾に比べ構造的に変化に富んでおり、消化酵素によるペプチド結合の切断形式やペプチドの生成にも多種多様な影響をもたらすのではないかと推察された。

#### 4. *In vitro* 系における消化物の収量分布 (実験4)

未修飾および修飾  $\beta$ -LG はペプシン・パンクレアチン消化後、分子量 3,000Da 以下、3,000Da - 10,000Da、10,000Da 以上に分画し収量を測定した (Table 2)。

消化物の収量を比較した結果、修飾  $\beta$ -LG は未修飾  $\beta$ -LG よりも低分子画分の収量が減少し、高分子画分が増加した。

メイラード反応によって修飾を受けたタンパク質では消化性の低下を招くことが広く知られている。メイラード反応の初期段階ではタンパク質構造中のリジンを始めとする塩基性アミノ酸に糖が結合するが、修飾されたアミノ酸残基は消化酵素の作用を受けにくくなり、隣接するアミノ酸残基もその影響を受ける。そして、中期段階

Table 2. *In vitro* 系における未修飾および修飾  $\beta$ -LG 消化物の収量分布

画分 (分子量)	未修飾 <sup>a)</sup>	修飾 <sup>b)</sup>
3,000Da 以下	62%	49%
3,000Da ~ 10,000Da	24%	13%
10,000Da 以上	14%	38%

未修飾<sup>a)</sup>: 未修飾  $\beta$ -LG 由来消化物

修飾<sup>b)</sup>: 修飾  $\beta$ -LG 由来消化物

では反応性の高いカルボニル化合物が生成するが塩基性アミノ酸に加えてシステインやメチオニンなどのアミノ酸も修飾を受ける<sup>2)</sup>。また、メイラード反応の過程において消化酵素の阻害物質が生成し<sup>25,26)</sup>、後期段階ではクロスリンク (架橋構造) の形成によって立体構造的に消化酵素の作用を受けにくくなる<sup>3)</sup>。したがって、本研究においても、これらの理由から修飾  $\beta$ -LG において低分子画分の消化物の収量が減少したと考えられる。

以上の結果により、*in vitro* 系においては、 $\beta$ -LG はグルコースの修飾率が 50% であると、消化酵素による作用を受けにくくなることが明らかとなった。

#### 5. *In vitro* 系における消化物の HPLC によるペプチドパターンの分析 (実験5)

未修飾および修飾  $\beta$ -LG をペプシン・パンクレアチン系酵素により消化し、分子量 3,000Da 以下、3,000Da - 10,000Da、10,000Da 以上に分画後、分子量 3,000Da 以下の消化物は HPLC による分析を行った (Fig. 3)。

未修飾  $\beta$ -LG 消化物と修飾  $\beta$ -LG 消化物のピーク波形を比較した結果、ピークの検出パターンに差が認められた。

これまでに修飾タンパク質の消化パターンについて検討が行われている。 $\beta$ -カゼイン (8 日間, 50°C, RH75%)<sup>21)</sup>、リゾチーム (20 日間, 50°C, RH75%)<sup>27)</sup>、rhDNase I<sup>28)</sup> の HPLC パターンはそれぞれ未修飾タンパク質とは異なり、修飾タンパク質より特異的にピークが生成することが報告されている。このような違いは、

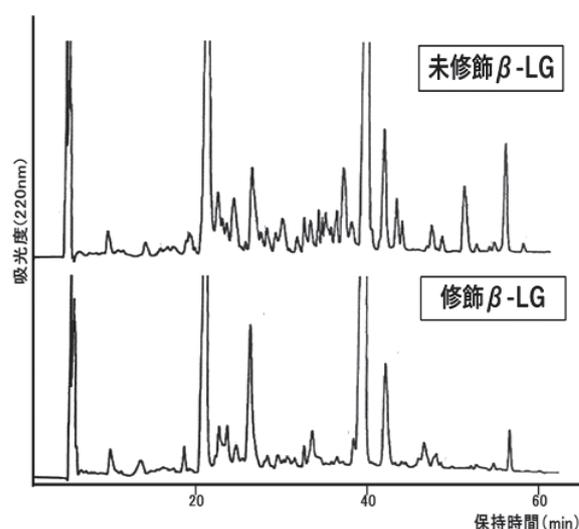


Fig. 3. 未修飾および修飾  $\beta$ -LG の *in vitro* 系消化物 (分子量 3,000Da 以下) の HPLC 分析

消化酵素によるペプチド結合の切断形式が未修飾と修飾とでは異なるためであると考えられる。さらに、修飾することで特異的にペプチドが生成する可能性も示唆される。

## 6. *In vivo* 系における消化物の収量分布 (実験 6)

*In vivo* 系における未修飾および修飾  $\beta$ -LG の消化・吸収性を調べるために、Wistar 系雄ラットにこれらのタンパク質を投与し、一定時間経過後、消化管内に残存する消化物を採取し、収量を測定した (Fig. 4)。各々の収量値は、胃および小腸内の残存量を加算した総量で示した。

未修飾  $\beta$ -LG を投与してから 20 分経過後の消化管内の残存物は 153.8mg であり、60 分経過後の残存物は 111.5mg であった。一方、修飾  $\beta$ -LG は投与してから 20 分経過後の消化管内の残存物が 114.3mg であり、未修飾  $\beta$ -LG の 60 分経過後の残存物量とほぼ同じ収量であった。さらに、60 分経過後の残存物は 43.1mg であり、水を投与してから 60 分経過後の残存物量 37.1mg とほぼ同じ値であった。したがって、グルコースの修飾率が約 50% の修飾  $\beta$ -LG は、未修飾  $\beta$ -LG よりも速やかに消化・吸収されることが明らかとなった。

未修飾  $\beta$ -LG を投与してから 60 分経過後の胃の残存物は 91.1mg であり、投与してから 20 分経過後の残存物量 100.8mg とほぼ同程度であった。未修飾  $\beta$ -LG においては多くの未消化物が胃に残存していることが示唆

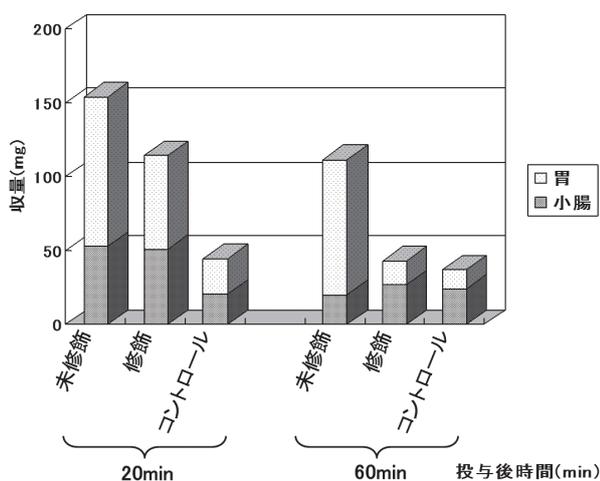


Fig. 4. *In vivo* 系における未修飾および修飾  $\beta$ -LG 消化物の収量分布

未修飾：未修飾  $\beta$ -LG 溶液 (250mg/0.8ml) 投与群  
 修飾：修飾  $\beta$ -LG 溶液 (250mg/0.8ml) 投与群  
 コントロール：水投与群

された。一方、修飾  $\beta$ -LG を投与してから 60 分経過後の胃の残存物は 16.2mg であり、投与してから 20 分経過後の残存物量 63.3mg よりも著しく収量が減少していた。したがって、グルコースの修飾率が約 50% の修飾  $\beta$ -LG は、胃における消化酵素の感受性が高まり、消化されやすくなることが推測された。

*In vitro* においては、修飾  $\beta$ -LG は未修飾  $\beta$ -LG よりも消化性が低かったのに対し、*in vivo* においては修飾  $\beta$ -LG は未修飾  $\beta$ -LG よりも消化・吸収性が高まる結果となった。梅津らは、グルコース修飾率 60% の修飾リゾチームについて検討をしており、*in vitro* において修飾リゾチームは未修飾リゾチームよりも消化性が低下した結果となったが、*in vivo* においては未修飾リゾチームと同様に消化・吸収されることを報告した<sup>29)</sup>。*In vitro* 系と *in vivo* 系での消化性が異なるのは、*in vivo* 系には複数の消化酵素が作用しペプチド結合の切断部位が多いことに起因すると、彼らは推測している。したがって、修飾  $\beta$ -LG においても同様に *in vitro* 系と *in vivo* 系における消化性の差異がみられたと考えられる。

$\beta$ -LG は、牛乳中に含まれる乳清の主成分であり、人乳中には含まれないタンパク質である。また、球状構造を形成しているため、胃の中で消化を受けにくく、未分解のまま小腸に到達しやすい。したがって、牛乳タンパク質の中でも主要なアレルゲンとされている。これまでに、加熱や酵素分解、発酵などによる低アレルゲン化の研究が行われてきた<sup>30,31)</sup>。なかでも、乳タンパク質を低分子化することで抗原構造を壊すことが重要とされてきた。その一方で、 $\beta$ -LG を含む分離乳清タンパク質は、オリゴイソマルトースとのメイラード反応により人工胃液中におけるペプシンとの感受性が高まり、さらには  $\beta$ -LG の抗原性が低下したことが、Li らにより報告された<sup>31)</sup>。本研究においても、グルコース修飾率約 50% の  $\beta$ -LG は、未修飾  $\beta$ -LG よりも胃における消化酵素との感受性が高まり速やかに消化・吸収されたため、 $\beta$ -LG が有するアレルゲン性も低下した可能性が示唆された。

## 7. *In vivo* 系における消化物の HPLC によるペプチドパターンの分析 (実験 7)

Wistar 系雄ラットに未修飾  $\beta$ -LG、修飾  $\beta$ -LG または水を投与し、一定時間経過後、消化管内に残存する消化物を採取し、分子量 3,000Da 以下、3,000Da-10,000Da、

10,000Da 以上に分画後、分子量 3,000Da 以下の消化物は HPLC による分析を行った (Fig. 5, 6, 7)。

未修飾  $\beta$ -LG を投与してから 20 分経過後の胃に残存した消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンは、水を投与した場合のパターンと異なっていた (Fig. 5)。水投与のパターンに現れたピークは内在性のペプチドであると考えられることから、未修飾  $\beta$ -LG のパターンに現れたピークには、 $\beta$ -LG 由来のペプチドが含まれることが明らかとなった。また、未修飾  $\beta$ -LG を投与してから 60 分経過後の胃に残存した消化物 (分子量 3,000Da 以下) においても同様の結果となった。さらに、修飾  $\beta$ -LG を投与してから 20 分および 60 分経過後の胃に残存した消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンも、水を投与した場合のパターンと異なっていた。したがって、修飾  $\beta$ -LG のパターンに現れたピークには、修飾  $\beta$ -LG 由来ペプチドが含まれることが明らかとなった。未修飾  $\beta$ -LG を投与してから 20 分経過後の小腸上部に残存した消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンは、水を投与した場合のパターンと異なっていたことから、 $\beta$ -LG 由来のペプチドが含まれることが示唆された (Fig. 6)。しかし、投与してから 60 分経過後の小腸上部においては、水を投与した場合のパターンとほぼ同じであったことから、 $\beta$ -LG 由来のペプチドの生成は認められなかった。また、同様の結果が小腸下部においてもみられた (Fig. 7)。さらに、修飾  $\beta$ -LG においても未修飾  $\beta$ -LG と同じ結果と

なり、20 分経過後の小腸上部および下部に残存した消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンが水を投与した場合のパターンと異なり、修飾  $\beta$ -LG 由来のペプチドが含まれることが明らかとなった (Fig. 6, 7)。

ラットに投与してから 20 分経過後の胃および小腸の消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンや、60 分経過後の胃の消化物 (分子量 3,000Da 以下) のペプチドパターンは、修飾と未修飾において差が見られた。したがって、修飾  $\beta$ -LG のペプチド結合の切断部位は未修飾  $\beta$ -LG における切断部位と異なることが推察された。

これまでにタンパク質の消化吸収については数多くの研究が行われてきた。タンパク質の多くはアミノ酸よりもジペプチドやトリペプチドの形で吸収されるが、近年ではこうしたペプチドのほうがアミノ酸よりも吸収効率がよく、さらにアミノ酸組成のバランスが保たれるため栄養的に利用性が高い、という見方が広まっている<sup>32-34)</sup>。また、Chabance らは被験者に乳製品を与え、食事後の胃、十二指腸、および血清中ペプチドの生成状況について検討を行い、カゼイン由来のオリゴペプチド (ペプチド鎖長 24) を血清中で確認した<sup>35)</sup>。

食品タンパク質中には種々の生理活性ペプチドが配列し、それらのペプチドが生体内で様々な機能を発現していることが広く知られている<sup>36,37)</sup>。ペプチドの吸収機構については不明な点が多いが、長鎖のペプチドについてもそのままの形で吸収され、何らかの生体調節機構に関

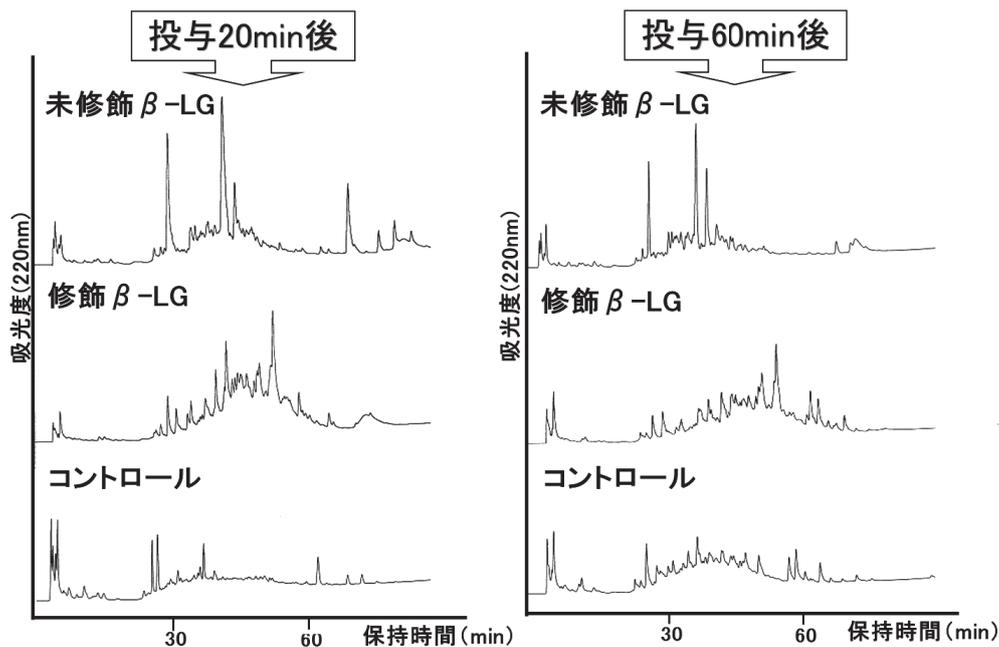


Fig. 5. 未修飾および修飾  $\beta$ -LG の胃における消化物 (分子量 3,000Da 以下) の HPLC 分析

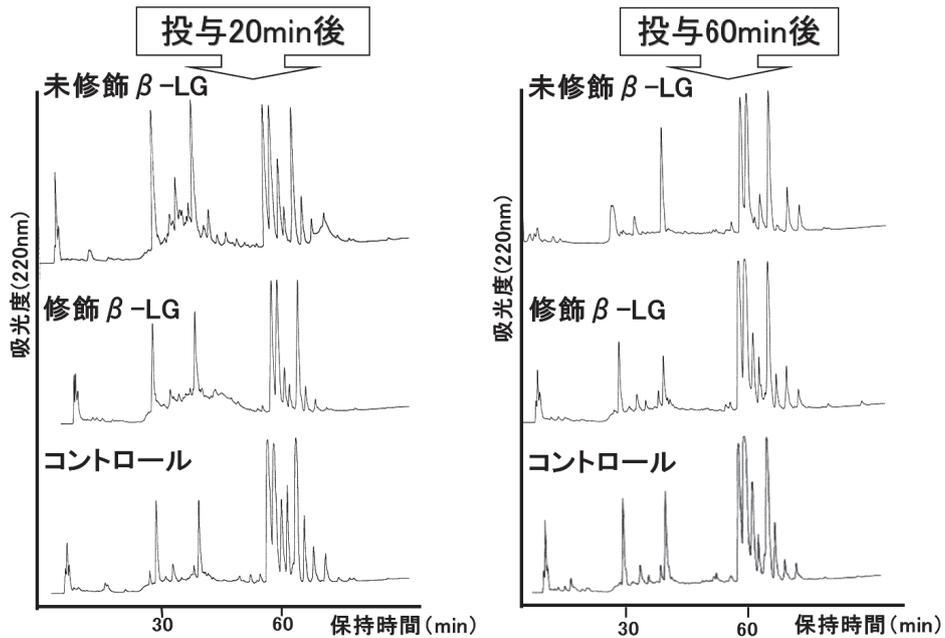


Fig. 6. 未修飾および修飾  $\beta$ -LG の小腸上部における消化物 (分子量 3,000Da 以下) の HPLC 分析

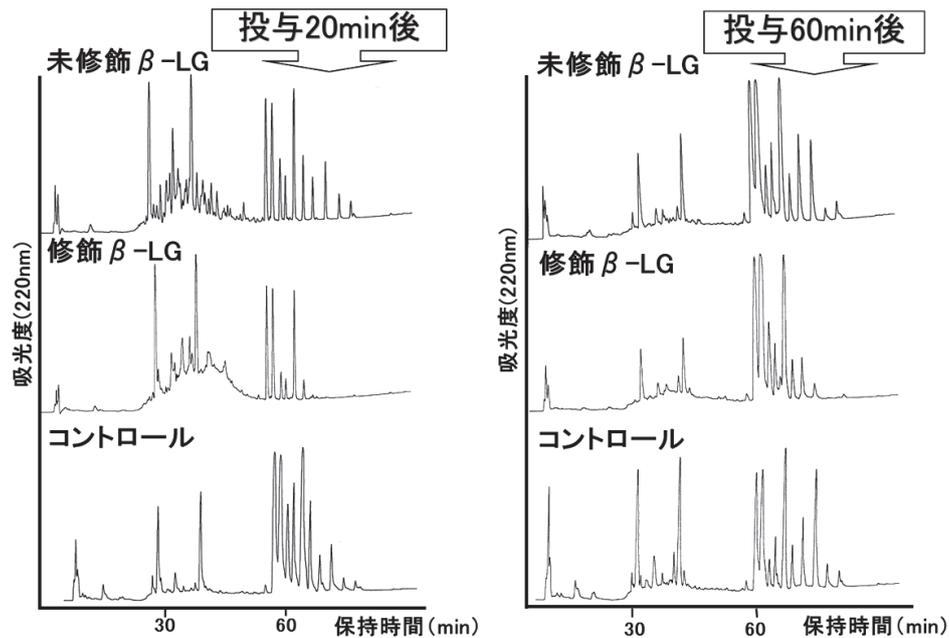


Fig. 7. 未修飾および修飾  $\beta$ -LG の小腸下部における消化物 (分子量 3,000Da 以下) の HPLC 分析

わっている可能性も考えられる。

したがって、消化により生じる食品タンパク質由来のペプチドの生成状況を解明することは極めて重要である。さらに、実際の食生活において、摂取しているタンパク質のほとんどはメイラード反応によって修飾を受けた修飾タンパク質であるため、修飾タンパク質の消化によるペプチドの生成状況、および消化酵素によるペプチ

ド結合の切断形式について解明することが望まれる。

#### IV. まとめ

本研究において、リジンがグルコースにより約 50% 修飾された  $\beta$ -LG の場合、以下のことが明らかとなった。

## 1) $\beta$ -LG 消化物の収量

*In vitro* においては、修飾は未修飾よりも消化性が低かった。一方、*in vivo* においては、修飾は未修飾よりも速やかに消化・吸収されたことが明らかとなった。*In vitro* 系と *in vivo* 系での消化性が異なる結果となった理由としては、*in vivo* 系には複数の消化酵素が作用しペプチド結合の切断部位が多いことに起因すると推察された。また、*in vivo* の結果により、 $\beta$ -LG はグルコースを修飾させることにより、胃における消化酵素との感受性が高まり、消化されやすくなることが推測された。また、アレルギー性が低下する可能性が示唆された。

## 2) $\beta$ -LG 消化物の HPLC 分析

*In vitro* および *in vivo* において、未修飾と修飾では検出されたペプチドパターンが異なることが明らかとなった。未修飾と修飾ではペプチド結合の切断形式が異なることが推測された。

## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご指導とご助言を賜りました日本女子大学教授グエン・ヴァン・チュエン先生に心より深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行や取りまとめにおいて多くのご協力を頂いた日本女子大学生化学・食品機能科学研究室の皆様にも深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C., Dalgalarrodo, M., Haertlé, T. (2006). Impact of Maillard type glycation on properties of  $\beta$ -lactoglobulin. *Biotechnol. Adv.*, 24(6), 629-632.
- 2) Hurrell RF, Finot PA, Ford JE. (1983). Storage of milk powders under adverse conditions. I. Losses of lysine and of other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. *Br J Nutr.*, 49(3), 343-354.
- 3) Hansen, L. P., Millington, R. J. (1979). Blockage of protein enzymatic digestion (carboxypeptidase- B) by heat-induced sugar-lysine reactions. *J Food Sci.*, 44, 1173-1177.
- 4) Jing, H., Melissa, Y., Wong, P. Y. Y., Kitts, D. D. (2011). Comparison of physicochemical and antioxidant properties of egg-white proteins and fructose and inulin Maillard reaction products. *Food Bioprocess Technol.*, 4(8), 1489-1496.
- 5) Lertittikul, W., Benjakul, S., Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH. *Food Chem.*, 100(2), 669-677.
- 6) Liu, P., Huang, M., Song, S., Hayat, K., Zhang, X., Xia, S., Jia, C. (2012). Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from Soy protein hydrolysates with different molecular weight distribution. *Food Bioprocess. Technol.*, 5(5), 1775-1789.
- 7) Sun, Y., Hayakawa, S., Puangmanee, S., Izumori, K. (2006). Chemical properties and antioxidative activity of glycated  $\alpha$ -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction. *Food Chem.*, 95(3), 509-517.
- 8) 山本靖彦, 棟居聖一. (2015). 糖化制御と生活習慣病の予防. *日本食生活学会誌*, 25(4), 237-240.
- 9) Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.*, 95(4), 290-299.
- 10) Turesky, R.J. (2007). Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol Lett.*, 168(3), 219-227.
- 11) Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature.*, 419 (6906), 448-449.
- 12) Moon, J.K., Shibamoto, T. (2011). Formation of carcinogenic 4(5)-methylimidazole in maillard reaction systems. *J. Agric. Food Chem.*, 59(2), 615-618.
- 13) Hengel, M., Shibamoto, T. (2013). Carcinogenic 4(5)-methylimidazole found in beverages, sauces, and caramel colors: chemical properties, analysis, and biological activities. *J. Agric. Food Chem.*, 61(4), 780-789.
- 14) Baynes, J. W. (2001). The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp. Gerontol.*, 36(9), 1527-1537.
- 15) Kellow NJ, Coughlan MT. (2015). Effect of diet-derived advanced glycation end products on inflammation. *Nutr Rev.*, 73(11), 737-759.
- 16) Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM, de Courten B, Bügel S, Nielsen J, Skibsted LH, Dragsted LO. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol.*, 60, 10-37.
- 17) Ames, J. M. (2007). Evidence against dietary advanced glycation endproducts being a risk to human health. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51(9), 1085-1090.
- 18) Godovac-Zimmermann J, Braunitzer G. (1987). Modern aspects of the primary structure and function of  $\beta$ -lactoglobulin. *Milchwissenschaft*, 42(5), 294-297.
- 19) Erbersdobler HF. (1989). Protein reactions during food processing and storage--their relevance to human nutrition. *Bibl Nutr Dieta.*, 43, 140-155.
- 20) Erbersdobler HF, Hupe A. (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z Ernährungswiss.*, 30(1), 46-49.
- 21) 梅津裕生. (2000). アミノ・カルボニル反応高分子生成物の栄養生理的側面に関する研究. 日本女子大学大学院人間生活学科博士論文
- 22) Morgan F, Léonil J, Mollé D, Bouhallab S. (1997). Nonenzymatic lactosylation of bovine beta-lactoglobulin under mild heat treatment leads to structural heterogeneity of the glycoforms. *Biochem Biophys Res Commun.*, 236(2), 413-417.
- 23) Morgan, Vénien A, Bouhallab S, Mollé D, Léonil J, Peltre G, Levieux D. (1999). Modification of bovine beta-lactoglobulin by glycation in a powdered state or in an aqueous

- solution: immunochemical characterization. *J Agric Food Chem.*, 47(11), 4543-4548.
- 24) Fogliano V, Monti SM, Visconti A, Randazzo G, Facchiano AM, Colonna G, Ritieni A. (1998). Identification of a beta-lactoglobulin lactosylation site. *Biochim Biophys Acta.*, 1388(2), 295-304.
- 25) Oste RE, Dahlqvist A, Sjoestroem H, Noren O, Miller R. (1986). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vitro studies. *J. Agric. Food Chem.*, 34(2), 355-358.
- 26) Oeste RE, Miller R, Sjoestroem H, Noren O. (1987). Effect of Maillard reaction products on protein digestion. Studies on pure compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 35(6), 938-942.
- 27) Tagami U, Akashi S, Mizukoshi T, Suzuki E, Hirayama K. (2000). Structural studies of the Maillard reaction products of a protein using ion trap mass spectrometry. *J Mass Spectrom.*, 35(2), 131-138.
- 28) Quan CP, Wu S, Dasovich N, Hsu C, Patapoff T, Canova-Davis E. (1999). Susceptibility of rhDNase I to glycation in the dry-powder state. *Anal Chem.*, 71(20), 4445-4454.
- 29) Umetsu H, Van Chuyen N. (1998). Digestibility and peptide patterns of modified lysozyme after hydrolyzing by protease. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 44(2), 291-300.
- 30) Bu GH, Luo YK, Lu J, Zhang Y. (2010). Reduced antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin by conjugation with glucose through controlled Maillard reaction conditions. *Food Agric Immunol.*, 21(2), 143-156.
- 31) Li Z, Luo Y, Feng L, Liao P. (2013). Effect of Maillard reaction conditions on antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin and the properties of glycosylated whey protein during simulated gastric digestion. *Food Agric Immunol.*, 24(3-4), 433-443.
- 32) 青山敏明, 福井健介, 山本孝史. (1996). ラットに強制投与された窒素源の違いが胃内通過時間に及ぼす影響. *日本栄養・食糧学会誌*, 49(1), 46-51.
- 33) 中埜拓, 島谷雅治, 村上雄二, 佐藤則文, 井戸田正. (1994). 乳清タンパク質酵素分解の消化吸収性. *日本栄養・食糧学会誌*, 47(3), 195-201.
- 34) 中村強, 栗林稔, 吉原大二, 竹下保義. (1997). 乳タンパク質および乳たんぱく質加水分解物の消化吸収障害ラットにおける栄養学的影響. *日本栄養・食糧学会誌*, 1997(5), 355-361.
- 35) Chabance B, Marteau P, Rambaud JC, Migliore-Samour D, Boynard M, Perrotin P, Guillet R, Jollès P, Fiat AM. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie.*, 80(2), 155-165.
- 36) Meisel H, Bockelmann W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and tropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 76(1-4), 207-215.
- 37) Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, Takenaka Y, Yamamoto T, Yamauchi R, Tsuruki H, Takahata K. (2000). Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases. *Biofactors.*, 12(1-4), 143-146.