

# LC-MS/MS 法による非蛍光性 AGEs 生成抑制作用評価法の検討

瀬戸山 央 (地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所, setoyama@kistec.jp)

## Evaluation method for Inhibition of non-fluorecein advanced glycation endproducts (AGEs) formation by LC-MS/MS

Ou Setoyama (Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, Japan)

### 要約

糖化によって体内で生成するAGEsは、加齢性疾患に関与していることが明らかとなっており、AGEsの生成を抑制する機能性食品が数多く開発されている。機能性食品のAGEs生成抑制作用評価法のうち、非蛍光性AGEs生成抑制作用評価は主にELISA法によって行われているが、高価な抗体を使用するため多検体の食品素材スクリーニングには向いていない。そこで本研究では非蛍光性AGEsのうちCML、CMAに着目し、多検体の食品素材スクリーニングを容易にするためにLC-MS/MSを用いたCML生成抑制作用評価法およびCMA生成抑制作用評価法について検討を行った。その結果、既知抗糖化化合物である塩酸アミノグアニジンに対して、LC-MS/MS法はELISA法と同等の結果を示すことが明らかとなった。

### キーワード

LC-MS/MS, 糖化, AGEs, CML, CMA

### 1. はじめに

糖化は、食品や生体中のアミノ酸やタンパク質と還元糖の非酵素的反応のことである。生体内ではグルコースが反応の起点となり、反応中間体である種々のジカルボニル化合物を経てタンパク質最終糖化産物 (AGEs: Advanced glycation end-products) が生成する (竹内他, 2007)。近年、糖化が皮膚老化、腎障害、動脈硬化、骨粗鬆症などの加齢性疾患に関与していることが明らかとなっており、糖化による加齢性疾患の予防を目的とした抗糖化作用を有する機能性食品が多く開発されている (米井, 2010)。

AGEsは様々な糖化産物の総称であり、これらのうち蛍光性を有しているAGEsのことを蛍光性AGEsという。機能性食品の抗糖化作用は、主に *in vitro* における蛍光性AGEs生成抑制作用を測定し評価している (Hori et al., 2012)。蛍光性AGEs生成抑制作用測定は、タンパク質として牛血清アルブミン、還元糖としてグルコースを用いる簡便で安価に実施できる抗糖化作用評価方法である。一方、生体内で生成されるAGEsのうち蛍光性をもつAGEsはペントシジン、クロスリンなど数種類のみであり、蛍光性を持たない非蛍光性AGEsが多数存在することが明らかとなっている (今泉・山岸, 2004)。これまでに存在が明らかにされている非蛍光性AGEsとしては、カルボキシメチルリジン (CML)、カルボキシメチルアルギニン (CMA)、カルボキシエチルリジン (CEL)、ピラリンなどがある (八木他, 2018)。本研究では、これら非蛍光性AGEsのうちCMLおよびCMAに着目した。CMLはヒトの皮膚や血中にも存在することが明らかとなっており、糖尿病や酸化ストレス亢進時に生成するため糖化ストレスマーカーの1つとなっている (Odani et al., 2001; Kawabata et al., 2011)。またCMAは生体タンパク質の中でコラーゲン中に特異的に存在することが明らかとなっている (Iijima et al., 2000)。

従来、CMLやCMAの測定は主にELISA法によって行われて

いる (藤原, 2010; Nagai et al., 2014)。しかし、ELISA法は高価な抗体を用いるため、機能性食品開発において多検体の素材に対する非蛍光性AGEs生成抑制作用 (CML生成抑制作用およびCMA生成抑制作用) スクリーニングには向いていない。そこで本研究では、高価な抗体を用いずに機器分析によって非蛍光性AGEs生成抑制作用評価を行う方法の確立を目的とし、LC-MS/MSを用いた評価方法の検討を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試薬

アセトニトリル (LC/MS用)、ギ酸 (LC/MS用) は富士フィルム和光純薬株式会社製を、プロテアーゼ (PronaseE, *Streptomyces griseus* 由来) はSigma-Aldrich社製を用いた。非蛍光性AGEs標準物質としたCMLおよびCMA、Collagen Type I (Bovine Skin 由来) は株式会社ニッピ社製を用いた。その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社製を用いた。

#### 2.2 LC-MS/MS 装置および測定条件

LC-MS/MSは、Waters社製ACQUITY UPLC H-ClassおよびXevo TQDを用い、カラムにWaters社製ACQUITY UPLC BEH Amide Column (100×2.1 mm i.d., 1.7 μm)を用いて分離を行った。移動相はA液を0.1%ギ酸含有超純水、B液をアセトニトリルとしてグラジエント溶出を行い、流速は0.5 ml/minとした。グラジエントは、移動相A液 : B液 = 30 : 70 (0 min) → 50 : 50 (0.2 min) → 75 : 25 (3.0 min) → 75 : 25 (4.0 min)

表1: LC-MS/MS測定条件

Ionization	ESI - Positive
Corn voltage	15 V (CML), 35 V (CMA)
Collision energy	20 V (CML), 25 V (CMA)
MRM* m/z	205.2 → 84.32 (CML)
	233.4 → 70.32 (CMA)

Note: \* MRM; Multiple Reaction Monitoring.

→30 : 70 (5.0 min) →30 : 70 (7.0 min) とした。試料注入量は 2  $\mu$ l、カラム温度は 40  $^{\circ}$ C とした。MS/MS 測定の場合は表 1 に示す通りとした。

標準試料は、CML、CMA をそれぞれ 0.1 % ギ酸含有超純水に溶解したものとした。

### 2.3 LC-MS/MS 法による CML 生成抑制作用評価

試料溶液として既知抗糖化化合物である塩酸アミノグアニジン を純水に溶解したものをを用いた。100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.5 ml、純水 0.1 ml、40 mg/ml 牛血清アルブミン溶液 0.2 ml、2 M グルコース溶液 0.1 ml に試料溶液を 0.1 ml 加え、十分攪拌後に 60  $^{\circ}$ C、40 時間インキュベーションし糖化反応を行ったものを反応液 A とした。コントロールとして、試料溶液の代わりに純水を添加したものを同様にインキュベーションし反応液 B とした。ブランクとして、試料溶液およびグルコース溶液の代わりに純水を添加したものを同様にインキュベーションし反応液 C とした。

Iijima et al. (2007) の方法を一部改変し、糖化反応を行った反応液 A、B および C 各 0.1 ml に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.1 ml、2 mg/ml プロテアーゼ溶液 (100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 溶解) 0.2 ml を加え攪拌後、37  $^{\circ}$ C、24 時間インキュベーションしたタンパク質を酵素分解した。その後、セントリカット超ミニ (分画分子量 1 万、倉敷紡績株式会社製) に 0.35 ml を添加し 5000 rpm、60 分間の遠心分離 (MRX-152、トミー精工株式会社製) を行い、ろ液に含まれる CML 量を LC-MS/MS にて分析した。

CML 生成抑制作用評価は、下式を用いてコントロールに対する CML 生成抑制率を算出した。

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

### 2.4 LC-MS/MS 法による CMA 生成抑制作用評価

試料溶液として塩酸アミノグアニジン を純水に溶解したものをを用いた。100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.1 ml、純水 0.02 ml、3 mg/ml Collagen type I 溶液 1.0 ml、2 M グルコース溶液 0.04 ml に試料溶液を 0.02 ml 加え、充分攪拌後に 60  $^{\circ}$ C、72 時間インキュベーションし糖化反応を行ったものを反応液 A とした。コントロールとして、試料溶液の代わりに純水を添加したものを同様にインキュベーションし反応液 B とした。ブランクとして、試料溶液およびグルコース溶液の代わりに純水を添加したものを同様にインキュベーションし反応液 C とした。

Iijima et al. (2007) の方法を一部改変し、糖化反応を行った反応液 A、B および C 各 0.1 ml に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 0.1 ml、2 mg/ml プロテアーゼ溶液 (100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 溶解) 0.2 ml を加え攪拌後、37  $^{\circ}$ C、24 時間インキュベーションしたタンパク質を酵素分解した。その後、セントリカット超ミニ (分画分子量 1 万、倉敷紡績株式会社製) に 0.35 ml を添加し 5000 rpm、60 分間の遠心分離 (MRX-152、トミー精工株式会社製) を行い、ろ液に含まれる CMA 量を LC-MS/MS にて分析した。

CMA 生成抑制作用評価は、下式を用いてコントロールに対する CMA 生成抑制率を算出した。

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

### 2.5 ELISA 法による CML、CMA 生成抑制作用評価

試料溶液として塩酸アミノグアニジン を純水に溶解したものをを用いた。ELISA キットは、コスモバイオ株式会社製のコラーゲン AGEs 抗糖化アッセイキット (CML 特異的, グリオキサール) およびコラーゲン AGEs 抗糖化アッセイキット (CMA 特異的, グリオキサール) を用い、添付のマニュアルに従って測定を行った。吸光度測定は吸光マイクロプレートリーダー (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、Multi-skan Sky) を用いて行った。

### 2.6 統計処理

すべての測定は 3 回行い、平均値  $\pm$  標準偏差として表示した。統計ソフトは、4Steps エクセル統計第 3 版 (オーエムエス出版, 2011) 付属エクセルアドインソフト Statcel3 を用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 LC-MS/MS による非蛍光性 AGEs (CML、CMA) の分析

標準試料とした CML、CMA を LC-MS/MS にて分析し、作成した検量線を図 1 に示した。CML は 7 ~ 350 ppb で、CMA は 1.6 ~ 200 ppb の範囲で直線性の良好な検量線を得ることができた。

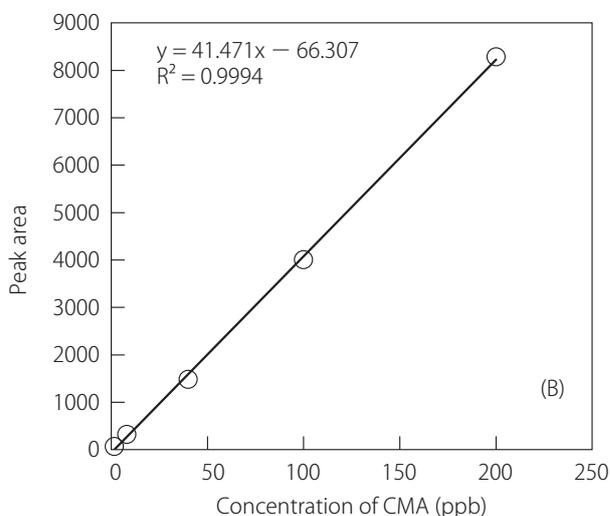
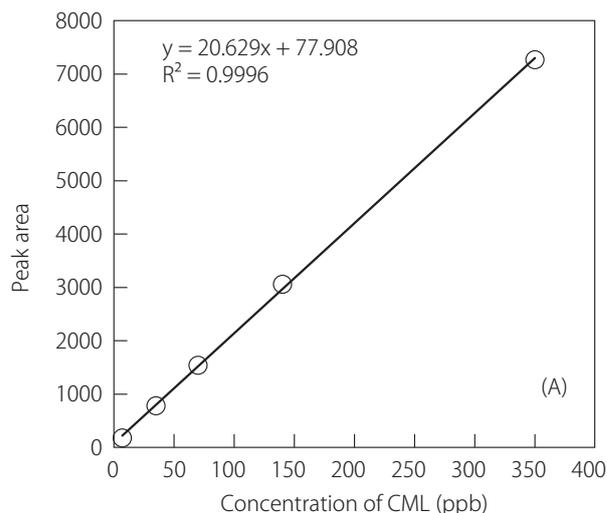


図 1 : CML の検量線 (A)、CMA の検量線 (B)

### 3.2 LC-MS/MS 法および ELISA 法による CML 生成抑制作用評価

LC-MS/MS法およびELISA法による塩酸アミノグアニジンのCML生成抑制作用評価を行った結果を図2に示す。塩酸アミノグアニジンは、終濃度0.2、0.4、0.8、2、4、10 mMとなるように調製して測定を行った。その結果、LC-MS/MS法およびELISA法のどちらにおいてもCML生成抑制率は試料濃度に比例して高まること示された。一方、ELISA法とLC-MS/MS法では、同一試料濃度においてCML生成抑制率に差がみられた。この要因として、糖化反応に用いている糖およびタンパク質の種類の違いが考えられる。

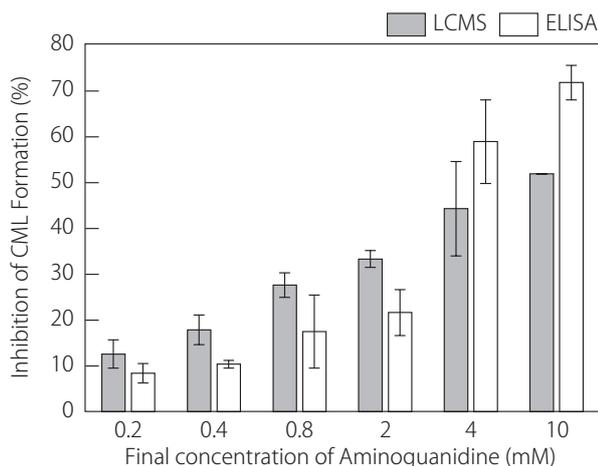


図2：LC-MS/MS法およびELISA法によるCML生成抑制作用評価

LC-MS/MS法ではグルコースを糖として、牛血清アルブミンをタンパク質として用いているが、ELISA法ではグリオキサールを糖として、コラーゲンをタンパク質として用いている。グリオキサールはグルコースの酸化反応などで生成し、グルコースよりも高い反応性を示すことが報告されている (Nagai et al., 2002)。そのためグリオキサールを用いているELISA法は、LC-MS/MS法よりも短時間でCMLの生成が進行していると考えられる。またCMLは、タンパク質を構成しているアミノ酸のうちリジンがカルボキシメチル化したものである。今回ELISA法で用いたコラーゲンおよびLC-MS/MS法で用いた牛血清アルブミン中のリジン基は、その数やタンパク質中での配置がそれぞれ異なっていることから、カルボキシメチル化の程度も異なることが考えられる。これらが同一試料濃度におけるCML生成抑制率の差につながっていると推察できる。

塩酸アミノグアニジンのCML生成抑制作用評価について、LC-MS/MS法およびELISA法の結果を相関図にしたものを図3に示す。R<sup>2</sup>値は0.898となり、LC-MS/MS法およびELISA法の結果には強い相関関係が認められた。このことからLC-MS/MS法によるCML生成抑制作用測定は、ELISA法と同等の結果を得ることができると考えられる。

### 3.3 LC-MS/MS 法および ELISA 法による CMA 生成抑制作用評価

LC-MS/MS法およびELISA法による塩酸アミノグアニジンのCMA生成抑制作用評価を行った結果を図4に示す。塩酸アミノグアニジンは、終濃度0.4、0.8、2、4 mMとなるように調

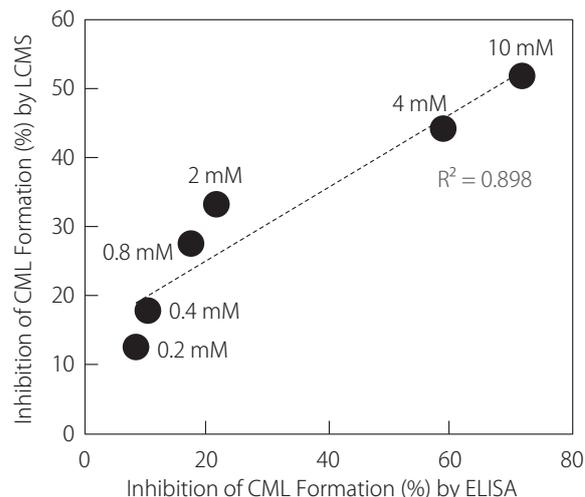


図3：CML生成抑制作用評価におけるLC-MS/MS法およびELISA法の関係

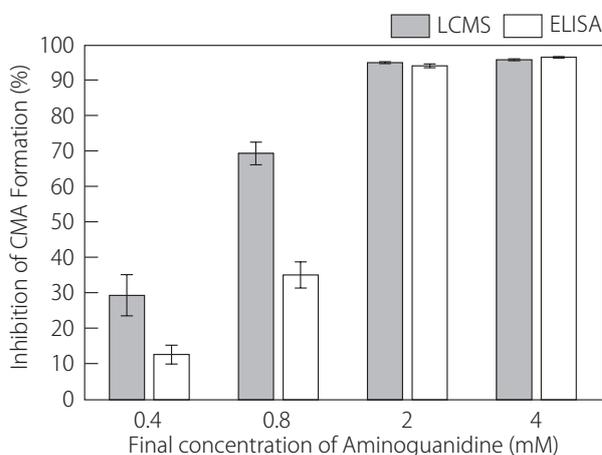


図4：LC-MS/MS法およびELISA法によるCMA生成抑制作用評価

製して測定を行った。その結果、LC-MS/MS法およびELISA法のどちらにおいてもCMA生成抑制率は試料濃度に比例して高まること示され、2 mMにおいて抑制率はほぼ100%となった。一方、ELISA法とLC-MS/MS法では、0.4、0.8 mMにおいてCMA生成抑制率に差がみられた。この要因として、糖化反応に用いている糖の種類および糖化反応温度・時間の違いが考えられる。

LC-MS/MS法ではグルコースを糖として用いているが、ELISA法ではグリオキサールを糖として用いている。グリオキサールはグルコースよりも高い反応性を示すため、CMLと同様にグリオキサールを用いているELISA法は、LC-MS/MS法よりも短時間でCMAの生成が進行していると考えられる。またLC-MS/MS法での糖化反応温度・時間は、60℃・72時間であるが、ELISA法では37℃・7日間と異なっている。Hori et al. (2012) はAGEs生成が温度と時間により影響を受けることを報告している。そのため、今回のLC-MS/MS法とELISA法においてもAGEs生成に違いが生じたと考えられる。これらが同一試料濃度におけるCMA生成抑制率の差につながっていると推察できる。

塩酸アミノグアニジンのCMA生成抑制作用評価について、LC-MS/MS法およびELISA法の結果を相関図にしたものを図5に示す。R<sup>2</sup>値は0.893となり、LC-MS/MS法およびELISA法の結果には強い相関関係が認められた。このことからLC-MS/MS法によるCMA生成抑制作用測定は、ELISA法と同等の結果を得ることができると考えられる。

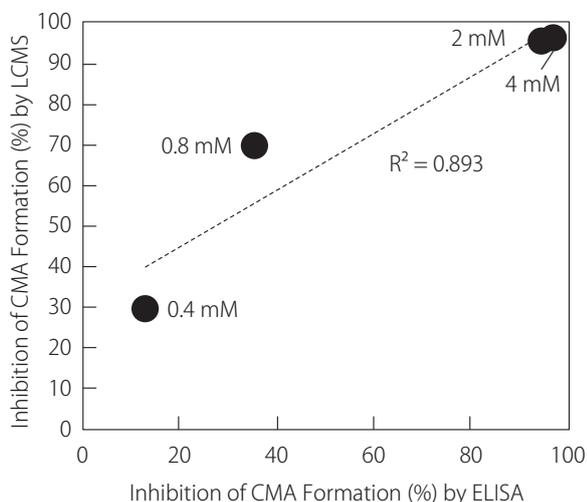


図5：CMA生成抑制作用評価におけるLC-MS/MS法およびELISA法の関係

#### 4. まとめ

非蛍光性AGEsのうちCML、CMAに着目し、LC-MS/MSを用いたCML、CMA生成抑制作用評価方法について検討を行った。その結果、塩酸アミノグアニジンに対して、従来法であるELISA法と同等の結果が得られることを確認した。一方、ELISA法とLC-MS/MS法では同一試料濃度におけるCML生成抑制率およびCMA生成抑制率の値に差が認められた。これは両法で用いている糖とタンパク質の種類が異なることや、糖化反応温度・時間が異なることによるものと考えられた。そのため今後、糖とタンパク質の種類や糖化反応温度・時間を一致させ両法の比較検討を更に行っていく必要があると考える。また本研究では、既知抗糖化化合物である塩酸アミノグアニジンのみを用いて検討を行ったが、今後、今回検討を行ったLC-MS/MSを用いた非蛍光性AGEs生成抑制作用評価方法を機能性食品の評価に用いるためには、機能性食品や食品成分でのさらなる検討をしていく必要がある。LC-MS/MSを用いたAGEsの分析については、Sivan et al. (2006) や大塚他 (2018) により食品中に含まれるAGEsの分析方法について報告がある。一方、本研究で検討を行ったようなAGEs生成抑制作用評価に対してLC-MS/MSを用いてはならず、LC-MS/MSを用いた非蛍光性AGEs生成抑制作用評価方法はこれまでにない新たな方法であると考えられる。

#### 引用文献

Hori, M., Yagi, M., Nomoto, K., Shimode, A., Ogura, M., and Yonei, Y. (2012). Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Medicine*, Vol. 9, No. 6, 135-148.

Hori, M., Yagi, M., Nomoto, K., Ichijo, R., Shimode, A., Kitano, T., and Yonei, Y. (2012). Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Medicine*, Vol. 9, No. 5, 125-134.

藤原章雄 (2010). 皮膚の老化予防を目的としたコラーゲンのAGE化阻害物質の探索. *コスメトロジー研究報告*, Vol. 18, 27-32.

Iijima, K., Murata, M., Takahara, H., Irie, S., and Fujimoto, D. (2000). Identification of N $\omega$ -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochemical Journal*, Vol. 347, Pt. 1, 23-27.

Iijima, K., Fujimoto, D., and Irie, S. (2007). Amount of N $\omega$ -(Carboxymethyl) arginine generated in collagen and bovine serum albumin during glycation reactions is significantly different. *Connective Tissue Research*, Vol. 48, No. 5, 271-276.

今泉勉・山岸昌一 (2004). AGEs研究の最前線 糖化蛋白質関連疾患研究の現状. *メディカルレビュー社*.

Kawabata, K., Yoshikawa, H., Saruwatari, K., Akazawa, Y., Inoue, T., Sayo, T., Uchida, N., and Sugiyama, Y. (2011). The presence of N( $\epsilon$ )-(Carboxymethyl) lysine in the human epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1814, No. 10, 1246-1252.

Nagai, R., Unno, Y., Hayashi, M., Masuda, S., Hayase, F., Kinae, N., and Horiuchi, S. (2002). Peroxynitrite induces formation of N $\epsilon$ -(carboxymethyl) lysine by the cleavage of amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose. *Diabetes*, Vol. 51, No. 9, 2833-2839.

Nagai, R., Shirakawa, J., Ohno, R., Moroishi, N., and Nagai, M. (2014). Inhibition of AGEs formation by natural products. *Amino Acids*, Vol. 46, 261-266.

Odani, H., Iijima, K., Nakata, M., Miyata, S., Kusunoki, H., Yasuda, Y., Hiki, Y., Irie, S., Maeda, K., and Fujimoto, D. (2001). Identification of N( $\epsilon$ )-carboxymethylarginine, a new advanced glycation endproduct in serum proteins of diabetic patients: Possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 285, No. 5, 1232-1236.

大塚讓・上田悦子・能見祐理 (2018). AGEsの精密分析と食品科学, 医学への応用. *化学と生物*, Vol. 56, No. 4, 242-243.

Silvan, J. M., van de Lagemaat, J., Olano, A., and Del Castillo, M. D. (2006). Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 41, No. 5, 1543-1551.

竹内正義・佐藤隆・瀧野純一・小林由佳・古野理美・山岸昌一 (2007). AGEs (終末糖化産物)にはどのようなものがあるかー毒性終末糖化産物仮説ー. *生体の科学*, Vol. 58, No. 6, 502-511.

八木雅之・高部稚子・石崎香・米井嘉一 (2018). 糖化ストレスと抗糖化作用の評価. *オレオサイエンス*, Vol. 18, No. 2, 67-73.

米井嘉一 (2010). 糖化による疾患と抗糖化食品・素材. シーエムシー出版.

(受稿：2020年4月17日 受理：2020年5月7日)