

グルコースとアンモニアとの 室温における非酵素的反応 —その反応機構—

Nonenzymatic Reaction of Glucose and Ammonia at Room Temperature
—Mechanism of the Reaction—

菅 田 恵 子

This study has begun when ninhydrin-reactive compound was found to be produced at room temperature as soon as glucose and dibasic ammonium phosphate solutions were mixed. The reaction seemed to be similar to Maillard reaction. Therefore, the experiments have been performed to purify and determine the structure of the compound. glucose and dibasic ammonium phosphate were used throughout this experiment to produce the ninhydrin-reactive compound which is referred to as NR compound in this report. The reaction mixture was desalted in MicroAcilyzer and applied on cation-exchange resin, Dowex 50W-X8 column (H^+) at pH 2.0 to eliminate glucose. The NR compound adsorbed to the resin was eluted with 3.0N HCl solution. Finally, the residual salt in the eluent was removed by gel-filtration method with Sephadex G-10 column and the eluent containing NR compound thus purified was concentrated in rotary evaporator at the temperature lower than 40°C. NR compound solution thus obtained have no glucose and almost no salts. The chemical structure of the NR compound was determined by amino acid analyzer, HPLC, FAB/MS, ion spray LC/MS and NMR. (a) The retention time of NR compound in amino acid analyzer was different from that of galactosamine but the same as that of glucosamine. However, reduced NR compound and reduced glucosamine were eluted at different time. (b) Mass spectrum of the NR compound produced by FAB/MS showed similar pattern to that of glucose. And both FAB/MS and ion spray LC/MS showed that the molecular weight of the compound was 179. (c) According to the result of NMR analysis, amino-residue binds to the carbon at position 1 of the compound and hydroxy residue binds to the carbon at position 2, 3 and 4. The position 1 and position 2 is in S-trans configuration. (d) Amino acid analyzer showed that the retention time of reduced NR compound and that of glucamine were the same. FAB/MS and ion spray LC/MS showed that molecular weight of the two compounds are the same (M. W.=181).

These results indicate that the peak of the NR compound observed by amino acid analyzer is Amadori product of Maillard reaction, 1-amino 1-deoxyfructose although some of the data suggested a possibility that it is the mixture of enol- and keto-form of Amadori products. since apparent NR compound was found in a patient suffering from hepatic coma due to hyperammonemia caused by liver cirrhosis, NR compound is possibly formed in patients with hyperglycemia and/or hyperammonemia and can play some physiological role in the patients. Not only in patients but also in normal subjects, the level of ammonia in portal vein is rather high and NR compound is possibly formed in the vein that affects the liver function in an unknown way.

Key Words : maillard reaction, schiff base, glucose, ammonia.

メイラード反応¹²⁾または非酵素的褐変現象 (nonenzymatic browning reaction)²⁻⁷⁾は、食品の加工・調理・貯蔵中に、食品中に普遍的に起こる食品成分間のアミノ-カルボニル反応である。この反応により食品は褐変し、におい物質を発生し、タンパク質の栄養価を損なうこともある。味噌、醤油、焼き菓子、パン、コーヒーなどは、この反応を積極的に利用して嗜好性を高めている例であるが、一方、粉乳、果汁などの貯蔵中の褐変は、品質劣化の原因となり、栄養的、生理的機能をも左右している。反応の初期段階では、還元糖が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、アミン由来のアミノ基などと反応して、シッフ塩基 (アルドイミン) 結合物を生成し、次いで、アマドリ転位して、安定なケトアミンを形成し、後期段階には、そのアマドリ化合物が、脱水、転位、重合を行ない、蛍光を持った褐色のメラノイジンを形成する。しかし、この反応は、決して単純なものではなく、反応生成物には中間産物も含め種々のものがある。しかし、食品化学の分野で広く研究されているメイラード反応は、主としてアミノ化合物と還元糖による反応であって、タンパク質による反応については、1949年、Mohammad ら⁸⁾、および1950年、Lea と Hannan⁹⁾が、還元糖とタンパク質による反応や引き続いて起こるタンパク質の重合によってタンパク質中のアミノ酸残基が損失することを報告をしているにもかかわらず、その後は、おもに栄養学的研究が多く、化学的解析はほとんど進展していないのが現状である。

一方、生体内でもタンパク質とグルコースとの間にメイラード反応が起こっていることが発見された。1968年、Rahbar¹⁰⁾が、糖尿病患者の血液中にHbA_{1c}が増加していることを報告したのを契機として、HbA_{1c}の化学構造が研究され、1977年、Cerami らによって、HbA_{1c}がβ鎖N末端のバリンにグルコースがアマドリ転移した形で結合していること¹¹⁾、そして、その反応は非酵素的に起こる¹²⁾ことが明らかにされた。さらに、1981年には、Bunn らが、HbA_{1c}は、シッフ塩基 (preA_{1c}) を経て形成されたアマドリ生成物^{13,14)}であることを明らかにした。シッフ塩基は、不安定な化合物であり、分離、精製されたわけではなく、反応速度論的解析によってその存在が推定されているに過ぎない。

生体内でのこのような反応は、“nonenzymatic glycosylation”（最近では、“glycosylation”とも言う。）とよばれ、HbA_{1c}のみではなく、各種の生体タンパク質について同様の反応が発見されている。この反応の進行に伴い生成された AGE (advanced glycosylation endproducts) は、次第に不溶化し、近接タンパク質と結合して架橋を形成し、組織の障害を生じると考えられており、老化や成人病発症との関連が推論されている。

大腸菌 K12 株の誘導株 W4627 を用いた実験中¹⁵⁾ に、グルコースと第二リン酸アンモニウムの混合溶液から、室温で、非酵素的にニンヒドリン陽性物質が形成され、菌の増殖が阻害されたが、このニンヒドリン陽性物質は、メイラード反応に類似した反応により形成されると考えられた。

この研究は、上記のニンヒドリン反応陽性物質を分離、精製して構造を決定し、且つ、その物質が、種々の組織でのグリコシル化反応のなかで、生理的に何らかの役割を担っているという可能性を検討することを目的としている。本報では、ニンヒドリン陽性物質の構造解析について報告する。

実験方法

1. 反応液の調整：

グルコース 4.5g と第二リン酸アンモニウム 3.75g を蒸留水に溶解し、全量を 50ml とする。この溶液は、pH 8.5 であり、溶液中の各試薬の濃度は 0.5M となる。

2. NR 物質の精製法：

1) マイクロアシライザー

上記の、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液から、第二リン酸アンモニウムをマイクロアシライザー【旭化成(株)：G-1100 型】を用いて脱塩した。この機械の原理は、特殊な陽イオン交換膜と陰イオン交換膜を用いた電気透析法であるが、室温で、約 6 時間 30 分間脱塩すると、50ml の試料が 36.5ml に減少し、pH 7.0 になる。脱塩終了後直ちに、3 N 塩酸 0.4ml を加えて、pH 2.0 に調整し、リン酸の残存量をモリブデン酸アンモニウム法¹⁶⁾で調べた後、4℃で保存した。この反応液の一部はアミノ酸分析計により、ニンヒドリン反応陽性物質が形成されていることを確認した。この時、同一条件で、グルコースと第二リン酸アンモニウムの単独溶液もアミノ酸分析計で測定した。

以後、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの組み合わせにより形成されるニンヒドリン反応陽性物質を NR 物質と称し、次の精製段階に使用した。

2) 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

反応液中の NR 物質を吸着させ、グルコースを溶出するため、強酸性陽イオン交換樹脂 Dowex 50W-X8 (50-100Mesh)【米国ダウケミカル社製】を用いた。マイクロアシライザーで脱塩した反応液 30ml は、0.01N 塩酸で平衡化したカラム^{17,18)} (2.5×40cm) で分画した。流速は、1ml/min とし、0.01N 塩酸 630ml を流した後、蒸留水 210ml で洗浄した。次に、吸着した

菅 田 恵 子

NR 物質を溶離するため、3 N塩酸 1050ml を流した。反応液を添加した後、溶出液を 210ml ずつ 9 分画に分取した。

各分画につき、試験紙プレテスト 8 A 【和光純薬(株)製】により、グルコースの有無を定性的に測定し、同時に pH を測定して、塩酸と蒸留水の溶出した分画を検出した。次で、各分画を、37°Cでロータリーエバポレーターを用いて濃縮、乾固した後、蒸留水に溶解した。この各溶液について、再度 pH を調べ、塩酸を用いて pH を約2.0に調整した後、グルコース C テストワコー 【和光純薬(株)製】を用いてグルコースを定量した。同時にアミノ酸分析計により、NR 物質を定量した後、NR 物質の溶出した分画を集めた。

3) Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィー^{19,20)}

イオン交換クロマトグラフィーで溶出した NR 物質分画を、Sephadex G-10 カラム (2.5 × 40cm) に添加し、0.01N 塩酸溶液 180ml で溶出した。流速は、ペリスタルティックポンプを用いて、0.5ml/min とし、3ml ずつ分取した後、各分画について、塩 (Na⁺, Cl⁻, NH₄⁺) と NR 物質とを定量した。

まず、Cl⁻ の有無を硝酸銀法により調べ、次に電量滴定法により、Na⁺ と Cl⁻ とを定量した。Na⁺ は、Coming Medical Co. (England) 製の Coming flame photometer Model 480、Cl⁻ は、同社製の Coming chloride analyzer model 925 を用いた。アンモニアの定量は、アンモニアテストワコー 【和光純薬(株)製】によった。

3. NR 物質の安定性に及ぼす pH の影響:

Sephadex G-10 により脱塩した NR 物質を含む分画 2ml を用いて、pH の違いによる安定性を調べた。

精製 NR 物質溶液 0.6ml ずつを、3 本の試験管に入れ、それぞれの試験管に、1) 蒸留水 30 μ l (pH 2.0)、2) 0.5N 水酸化ナトリウム 30 μ l (pH 7.0)、3) 3 N 水酸化ナトリウム 10 μ l + 蒸留水 20 μ l (pH 10.0) を加え、室温で30分間放置後、さらに上記の 1) 2) 3) それぞれに、蒸留水 10 μ l、1.5N 塩酸 10 μ l、3 N 塩酸 10 μ l を加えて、再び全試料を pH 2.0 とした。

1) 2) 3) それぞれ 200 μ l を用いて、アミノ酸分析計で、NR 物質を定量し比較した。

4. NR 物質と他物質の比較:

1) NR 物質と D-グルコサミンおよび D-ガラクトサミンとの比較

a) アミノ酸分析計による比較: 精製 NR 物質溶液の20倍希釈液 100 μ l、100 μ moles の D-グルコサミン (MW、179) および D-ガラクトサミン (MW、179) の単独溶液それぞれ 100 μ l、および上記の NR 物質の希釈溶液と D-グルコサミンまたは D-ガラクトサミン溶液との等量混合液を、それぞれ 200 μ l ずつ注入し、その保持時間とピークの形とを比較した。

b) 高速液体クロマトグラフによる比較: 精製 NR 物質溶液の20倍希釈液 100 μ l、25 μ M D-グルコサミン溶液 20 μ l、および、精製 NR 物質溶液と D-グルコサミン溶液の等量混合液 20 μ l を用い、その保持時間を比較した。

2) NR 物質還元体と D-グルコサミン還元体の比較

NR 物質、D-グルコサミンを水素化ほう素ナトリウム (NaBH₄) で還元²⁹⁾し、両物質の還元体を、アミノ酸分析計によって比較した。

精製 NR 物質溶液の20倍希釈液 10ml, 100 μ M D-グルコサミン溶液 10ml, およびこれらの溶液を 5ml ずつ混合して 10ml とした溶液の3種類の溶液について、pH が2であることを確認し、2.0より高い場合は、塩酸で pH 2.0 に調整した。これらの各溶液に、還元剤として、水素化ほう素ナトリウム (NaBH₄) 18mg を加え、室温で約1時間放置後、酢酸 0.1ml を加えて、過剰の水素化ほう素ナトリウムを分解し、さらに 3 N 塩酸で pH 2.0 にした。各試料それぞれ 200 μ l を、アミノ酸分析計で測定し比較した。

3) NR 物質還元体とグルカミン (1-アミノ-1-デオキシ-D-グルコース) の比較

精製 NR 物質を還元し (還元法は、NR 物質と、D-グルコサミンとの還元物質の比較の項参照)、その還元物質 100 μ l と 100 μ moles の合成したグルカミン²⁹⁾ 100 μ l をアミノ酸分析計で測定後、さらにイオンスプレー LC/MS で分析し、分析データを比較することにより、同一物質であるかどうかを調べた。

5. NR 物質の定量:

NR 物質の定量は、アミノ酸分析計を用い、ピーク面積から、D-グルコサミンのニンヒドリン反応率をもとにして算出した。

6. 使用した機器:

1) アミノ酸分析計 (ニンヒドリン反応法) : 医理化(株)製 A-3300 型アミノ酸分析計を用いた。

2) 高速液体クロマトグラフィー [OPA 法 (0-フタルアルデヒド法)] : 日本分光(株)の高速液体クロマトグラフィー JLC-200A 型を用いた。

3) 高速原子衝撃イオン化質量分析装置 (Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry: FAB-MS 法) : 日本電子(株)製 FAB-MS model DX-303 により、NR 物質溶液 (NR 物質 2.46 μ moles/100 μ l 0.01N 塩酸) の分析を行った。この MS は、標的に塗布されたグリセリン (分子量92) に、さらに試料を重ねて塗布し、高速中性粒子ビームをこれに直接衝突させる方式であり、試料を気化する必要がないので、測定操作は比較的簡単である。対照試料として、適当濃度の D-グルコースおよび D-グルコサミン溶液も使用した。

4) 四重極三連質量分析装置 (イオンスプレー LC/MS 法) : イオンスプレー LC/MS 法による質量分析計 API III (Perkin Elmer Sciex; Toronto, Ontario, Canada) で分析を行った。このイオンスプレー法は、ピコモルあるいはそれ以下の微量のサンプルも分析できるうえ、サンプルを加熱する操作が入らないので、極性で、しかも熱に不安定な化合物の分析もできるという利点がある。

5) 核磁気共鳴装置 (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) : 日本電子製 NMR GX-400 型による NR 物質の分析を行った。NR 物質の溶液 (54.8 μ moles/2ml 0.01N 塩酸) を、浴槽温度 37°C でロータリーエバポレーターで濃縮し、D₂O 2ml に溶解するという操作を3回繰り返した

菅 田 恵 子

後、ロータリーエバポレーターで濃縮したところ、50mg の NR 物質濃縮液を得た。それ以上の濃縮は困難であった。そこで、そのうち 41.61mg (D-グルコサミンとして 45.60 μ moles に相当) を NMR 測定用とした。

結 果

1. NR 物質のアミノ酸分析計による測定

1) 試料の作成

0.5M グルコースと 0.5M 第二リン酸アンモニウムの混合溶液をマイクロアシライザーで脱塩した後、モリブデン酸アンモニウム法で残存リン酸量を測定したところ、10mM~100mM であった。従って、リン酸は、マイクロアシライザーでは完全には除去されないことがわかった。

2) NR 物質の検出

この試料を、アミノ酸分析計で測定したところ、バリンの位置にピークが出現した。対照として用いたグルコースと第二リン酸アンモニウムの単独溶液からは、そのようなピークは出現しなかった。しかし、グルコースと第二リン酸アンモニウムとが反応して、バリンを生成するとは考えられないうえ、その後、何回も類似の実験を繰り返しているうち、NR 物質のピークの位置が、バリンの位置からずれ、バリンに遅れてピークを作るようになったので、NR 物質はバリンではないと結論された。そこで、一つの可能性として、アミノ糖を考えた。

3) NR 物質とアミノ糖との比較

D-グルコサミンと D-ガラクトサミンとは、それぞれ D-グルコースと D-ガラクトースの 2 の炭素にアミノ基の結合したアミノ糖であるが、NR 物質が、それらのアミノ糖であるという可能性を考え、NR 物質とそれらのアミノ糖との、アミノ酸分析計におけるピークの位置について比較した。その結果、D-ガラクトサミンの保持時間と波形は、共に NR 物質のものと異なるので、両者は同一物質ではないと結論された。

しかし、NR 物質と D-グルコサミンとは、同じ位置にピークを作り、しかも、ピークの形態もほぼ同様であったので、さらに高速液体クロマトグラフを用いて比較した。その結果、NR 物質のピークと D-グルコサミンのピークは、ほぼ同位置に出現した。そこで、水素化ほう素ナトリウムを用いて、両物質をそれぞれ還元した後、アミノ酸分析計で測定したところ、両物質の保持時間は、共に変化したが、その変化の程度が異なり、両ピークの位置が異なっていた (Fig. 1)。従って、NR 物質は、D-グルコサミンでも D-ガラクトサミンでもない結論された。

2. NR 物質の精製

1) 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

NR 物質は、グルコース分子にアミノ基の結合したものと考えられた。そこで、酸性溶液中で+に荷電し、そのため樹脂に結合する NR 物質と、荷電していないため、樹脂に結合できないグルコースは、陽イオン交換樹脂を使用することにより、NR 物質とグルコースとを分別可

グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応

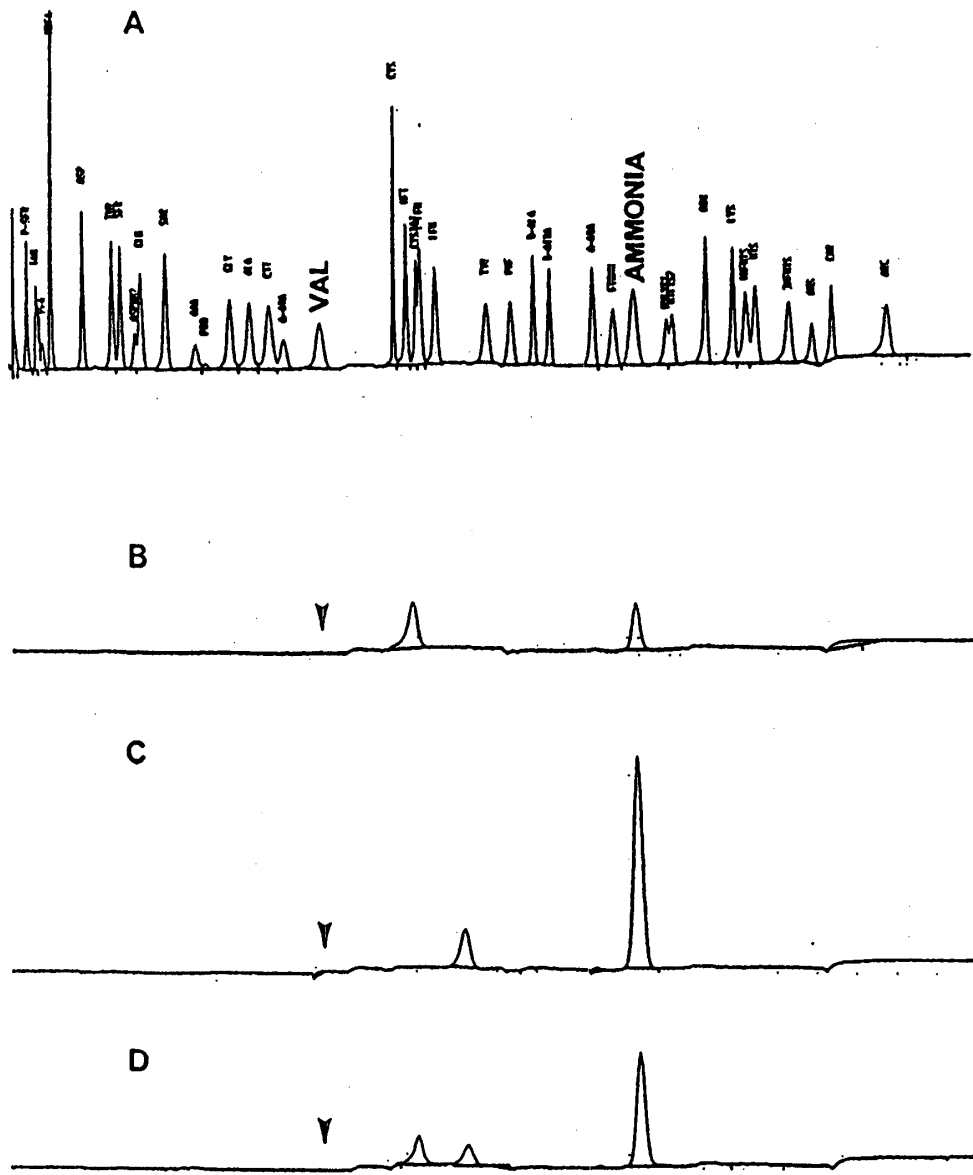


Fig. 1. Elution Patterns of Reduced NR Compound and/or Reduced D-Glucosamine, Eluted from Amino Acid Analyzer

Desalted NR compound and/or 0.1 mM D-glucosamine solutions were added with a reducing agent, sodium borohydride. The reduction was stopped by addition of acetic acid. Then, 200 μ l each of single solutions or 100 μ l mixed solution was applied on amino acid analyzer.

Arrows (▼) indicate the elution site of non-reduced NR compound. (A) Standard amino acid; (B) reduced D-glucosamine; (C) reduced NR compound; (D) reduced NR compound + reduced D-glucosamine.

能であると考えられた。そこで、Dowex 50W-X8 のカラムを用いた。

まず予備実験によって、少量の試料（脱塩後の反応液）を、カラムに添加し、0.01N 塩酸溶液でグルコースを溶出し、次いで、一定量の蒸留水で洗浄後、3 N 塩酸溶液を流し、樹脂に結合したと考えられる NR 物質を脱着した。リン酸塩は、マイクロアシライザーによって完全に除去できなかったが、残存したリン酸塩は、グルコースと共に溶出すると考えられた。溶出液はフラクションコレクターで分画し、各分画について、アミノ酸分析計によって、NR 物質

菅 田 恵 子

とアンモニアを定量し、同時に、ムタロターゼ・GOD 法によって、グルコースを定量した。

その結果、予期したとおり、グルコースは樹脂に吸着せずに流出し、NR 物質は樹脂に吸着し、蒸留水から 3 N 塩酸に変換後、直ちに脱離して溶出した。従って、NR 物質とグルコースとを完全に分別することができた。NR 物質の回収率は100%であった。また、NR 物質のピークに相当してグルコースの反応が出たが、これは、可逆的反応により、NR 物質の一部が、グルコースとアンモニアに再分離したためではないかと考えられる。

予備実験によって、グルコースと NR 物質との分別条件がわかったので、より大容量の試料を用いて、同様の操作を繰り返し、グルコースの混入しない NR 物質を得た。この場合の、回収率は、グルコース83%、アンモニア220%、NR 物質106%となった。アンモニアの回収率は、実験の度に変動した (220%, 150%, 49%)。アンモニアはアミノ酸分析計による分析時にも混入するようであるが、原因ははっきりしない。

そこで、NR 物質の溶出した分画 (Fr. No. 4~7) を一つの溶液にまとめ、ロータリーエバポレーターで濃縮・乾固したところ、結晶が析出した。この結晶は、樹脂に結合していたリン酸アンモニウムのアンモニウムイオンが、脱離し、塩化アンモニウムとなって析出したと考えられた。そこで、この塩化アンモニウムと考えられる物質を除くために、Sephadex G-10 を用いた。

2) Sephadex G-10 カラムによる脱塩

NR 物質 (推定分子量、179) と塩化アンモニウム (分子量、53.50) とは、分子量が大きく異なるので、Sephadex G-10 を用いることにより、両物質が分離することが期待された。そこで、Dowex 50W-X8 カラムで溶出した NR 物質分画を、Sephadex G-10 に通し、溶出液をフラクションコレクターで分画した。各分画 (3ml) について、電量滴定法で Na^+ , Cl^- , K^+ の定量を行ない、塩の存在位置を確認後、全分画を 8 群 (a~h) にまとめ、それぞれロータリーエバポレーターで濃縮し、0.01N 塩酸溶液で 2ml とした。各検体について、NR 物質と、グルコースとを定量した。その結果、塩のほとんど混入しない NR 物質 $49.2\mu\text{l}/2\text{ml}$ (0.01N HCl) を得ることができた (Fig. 2)。NR 物質のピークに一致して、グルコースの反応が出たが、これは、NR 物質とグルコース (NR 物質の分解産物) の分子量が、類似しているためと考えられる。 Na^+ が検出されたのは、Dowex 50W-X8 の前処理に使用した水酸化ナトリウム由来の Na^+ が完全に H^+ に変換されずに残存し、試料添加後、0.01N 塩酸から 3 N 塩酸に変えた時点で、溶出したためと思われる。

3. NR 物質の構造解析

1) FAB-MS 法による分子量の推定

NR 物質 (D) と共に、標準試料として D-グルコース (MW 180) (B) および塩酸グルコサミン (MW 179+36.5) (C) につき、FAB/MS を使用して分析したところ、Fig. 3 のようなマススペクトルを得た。図の横軸は質量数 [m/z -イオン質量/そのイオンの電荷数 (通常 1)] であり、縦軸はイオン量であって、イオン量の最も多いピークを100とし (これを基準ピークと呼

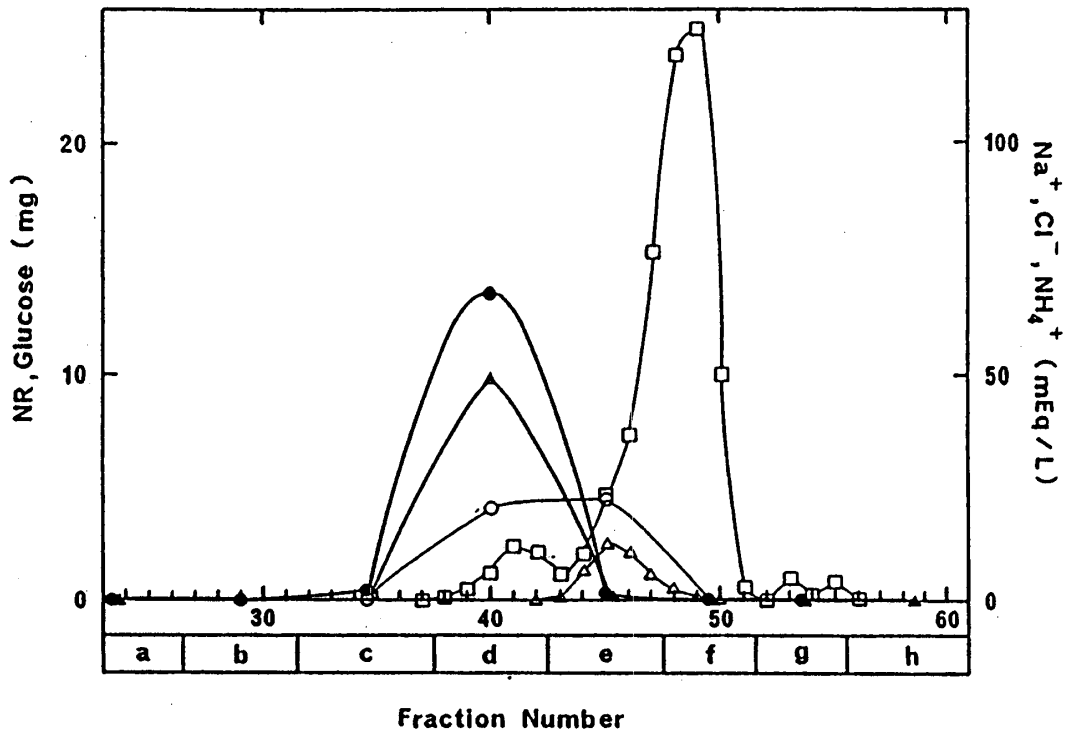


Fig. 2. Elution Patterns of Glucose, NR Compound and Inorganic Ions Eluted from Sephadex G10 Column

NR fraction shown in Fig. 7 was dried up at 37 °C in rotary evaporator, and the solid material was dissolved in 2.0 ml of 0.01N HCl. The solution was applied on Sephadex G10 column, and eluted with 180 ml of 0.01N HCl. The eluate was fractionated into 3 ml portions. Fractions from No. 30 to 60 were subjected to quantitative determination of Na⁺ (△) and Cl⁻ (□) ions. Then, the fractions from No. 1 to 60 were pooled into 8 fractions (a-h), which were concentrated into 2.0 ml (the volume was adjusted with 0.01N HCl) in rotary evaporator and subjected to quantitative determination of glucose (●), NR compound (▲) and NH₄⁺ (○).

ぶ)、他のイオンを、それに対する相対的強度で表わしたものである。

FAB-MS 法では、ウェットマトリックスとして、グリセロール (MW 92.1) を使用するの
で、グリセロール由来のピークも出現する。図の (A) ~ (D) で、質量数93は、グリセロール
の分子イオンピーク (H⁺が加わっている) であり、45・57・75はグリセロールのフラグメント
イオンピークである。

NR 物質の分子イオンピークは、D-グルコサミンと同様180であると推定された。陽イオン
モードで測定したため、上記の値は H⁺の加わった値となり、実際の分子量は179であると考
えられる。しかし、グリセロールの重合したものも出現するので、分子量に関しても、確定的な
ことは言えず、これ以上の構造解析はできなかった。

2) イオンスプレー LC/MS 法による解析

FAB/MS の結果より、NR 物質の分子量は179と推定されたが、より確定的なデータを得る
ため、さらにイオンスプレー LC/MS 法により解析した。このマス分析もイオンモードで行
なった。この方法は、低いエネルギー条件下で分子イオンピークを測定することができるため、

菅田 恵子

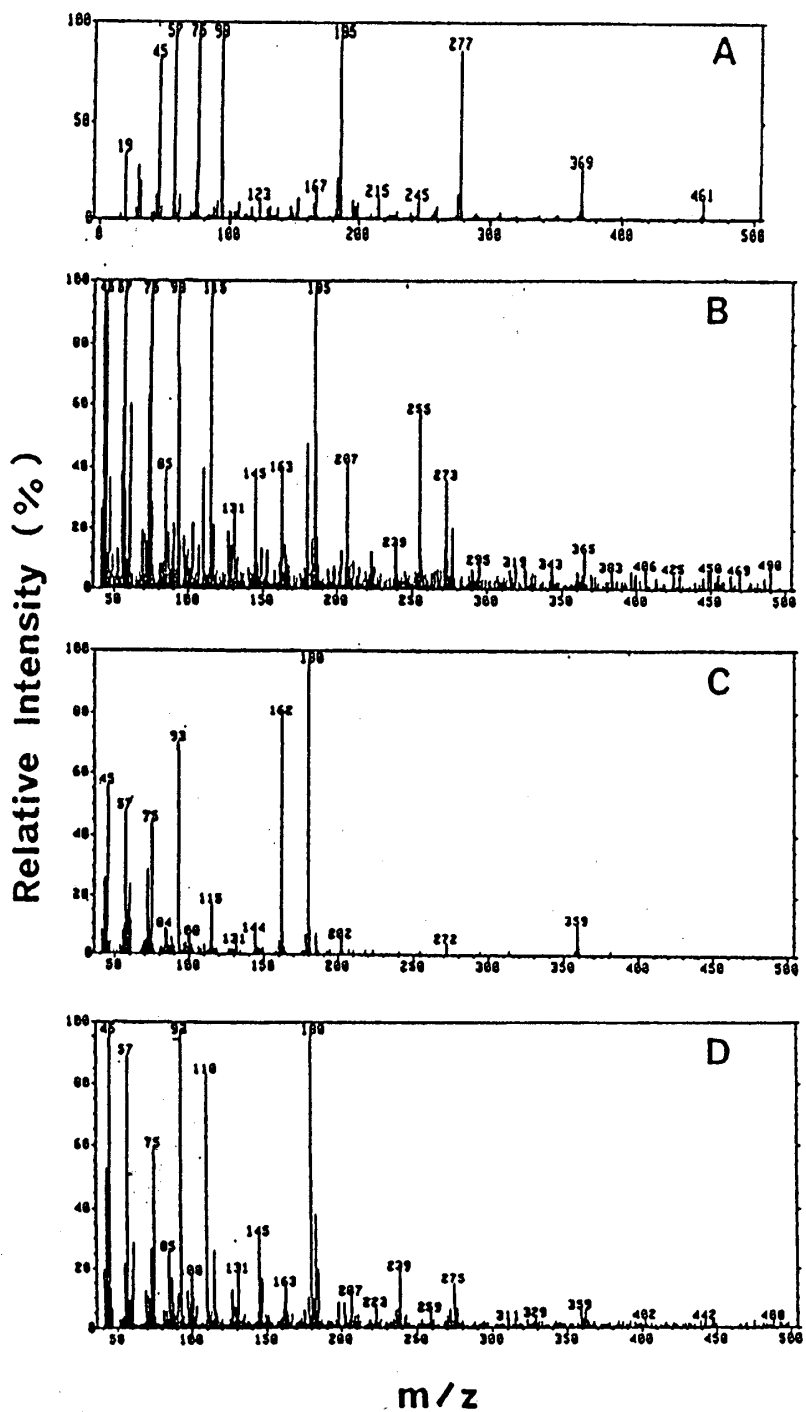


Fig. 3. FAB Mass Spectra of D-Glucose, D-Glucosamine and NR Compound in Positive Ion Mode

Glycerol was used as wet matrix, so that ion peaks of m/z 45, 57, 75 and 93 which derived from glycerol molecule appeared in all mass spectra.

(A) Glycerol (M. W. =92); (B) D-glucose (M. W. =180); (C) D-glucosamine (M. W. =179); (D) NR Compound.

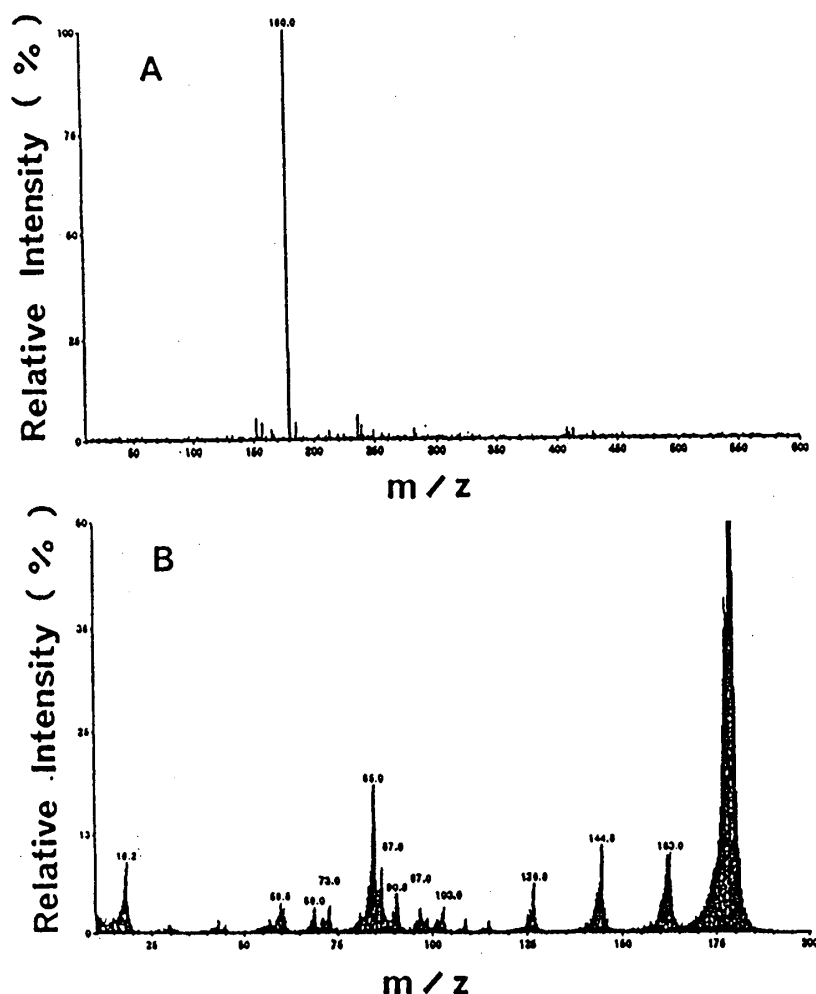


Fig. 4. Ion Spray LC Mass Spectra of NR Compound in Positive Ion Mode

(A) Molecular ion peak; (B) Fragment ion peaks

分子が分断されず、分子量決定には最適と考えられた。

分析の結果は、Fig. 4A のように、NR 物質の分子量は179 (180-1) であることを明白に示していた。

さらに衝突エネルギー 200V をかけ、NR 物質をフラグメント化し、その構造に関する情報を求めた (Fig. 4B) が、フラグメントからの構造解析は困難であった。

3) NMR による解析

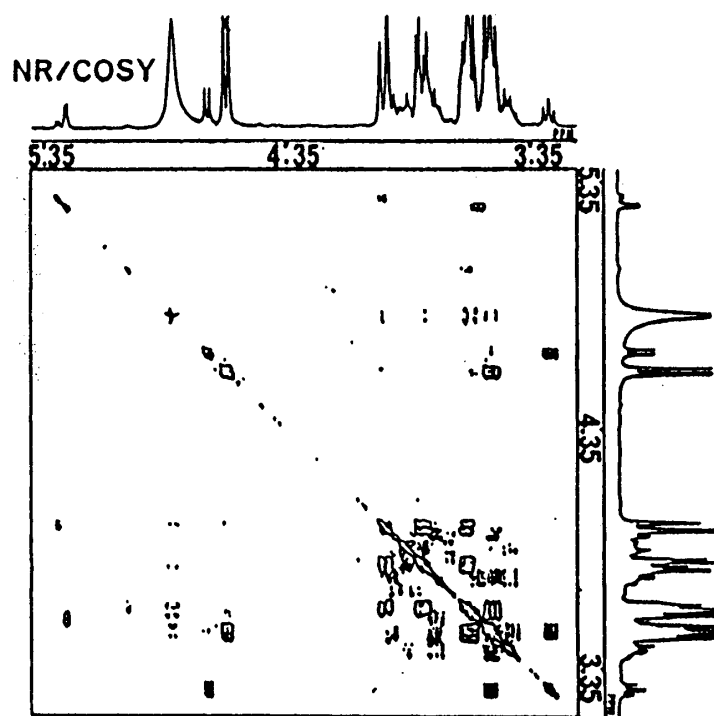
そこで、NMR により、その構造解析を行なった。

Fig. 5 は、2D-プロトン・プロトン相関 NMR、Fig. 6 は、2D-カーボン・プロトン相関 NMR、Fig. 7 は、CMR カーボン・プロトンの結合定数 J_{CH} 、Fig. 8 は、NMR のデータによる NR 物質の推定構造、Table 1 は、 1H 、 ^{13}C の化学シフトと C-H のカップリング定数を示す。

これらの図と表から、次の解析データが得られた。

a. PMR, CMR 共 minor と思われる成分 (グルコース類似体=グルコース and/or シッフ塩基?) が混入している。

菅田 恵子



Enlarged Figure

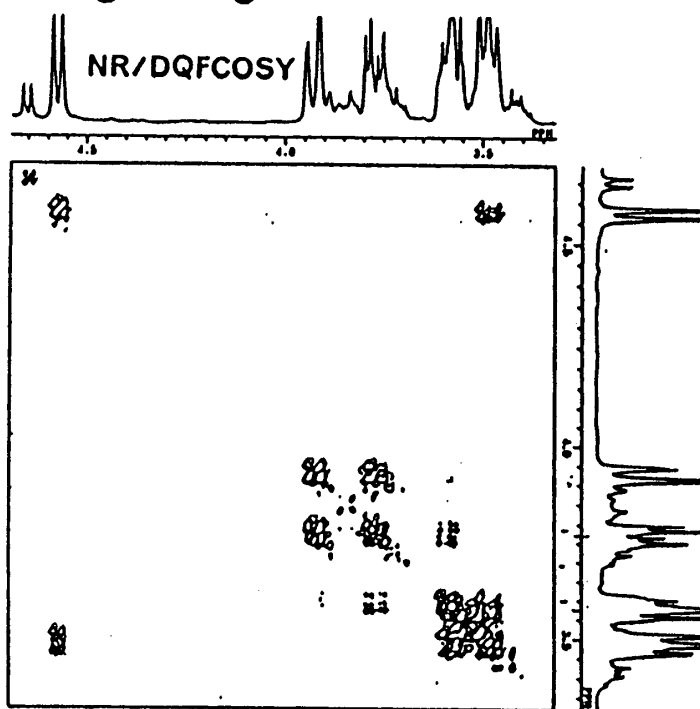


Fig. 5. Correlative 2D-NMR of ¹H-¹H

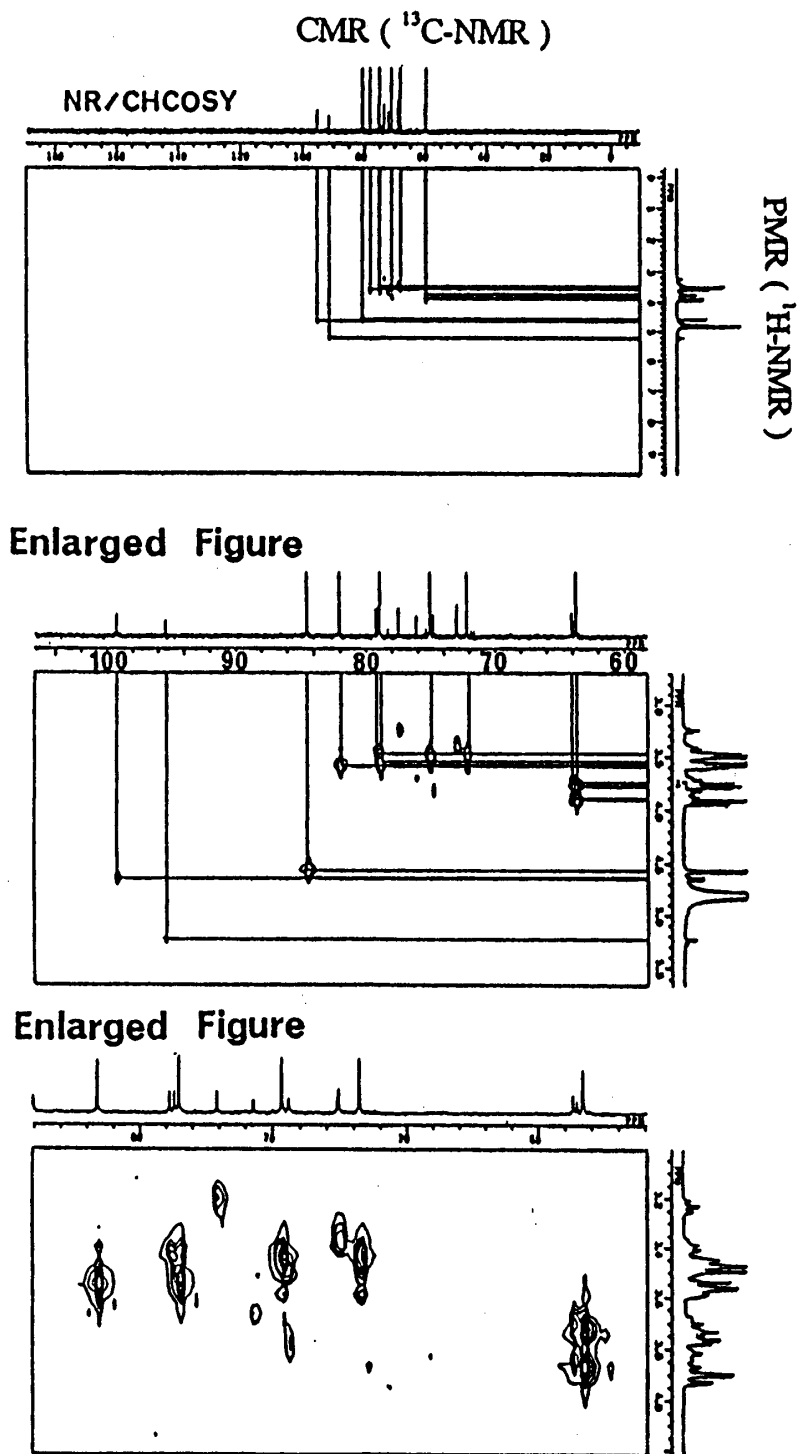


Fig. 6. Correlative 2D-NMR of $^{13}\text{C-}^1\text{H}$

b. PMR では、一位プロトン以外ケミカルシフトが接近しているため、明確には解析できない。

c. CMR で major 成分と思われるシグナルは 6 本と判断—炭素 6 個

d. グルコースの一位に相当するカーボンは、文献値で $\delta 96.8, 92.8$ 、一位に相当するプロトンは実測値で、 $\delta 5.263$ ($J=3.7$), 4.676 ($J=8.1$) にそれぞれ観測される。

e. NR 物質の CMR, PMR の結果から、一位に相当すると思われる炭素は、 $\delta 84.07$ 、プロト

Table 1 ^1H and ^{13}C NMR Chemical Shifts and ^{13}C - ^1H NMR Coupling Constants of NR Compound

	δ^{H}			$\delta^{13}\text{C}$	$^1J_{\text{CH}}$ (Hz)
1-H	4.557	d	$J = 9.0$	1-C	84.07
2-H	≈ 3.46			2-C	74.64
3-H	≈ 3.56			3-C	78.51
4-H	≈ 3.46			4-C	71.77
5-H	≈ 3.56			5-C	81.60
6-H	3.910	bd	$J = 12.3$	6-C	63.32
	3.754	dd	$J = 12.3$ 5.5		

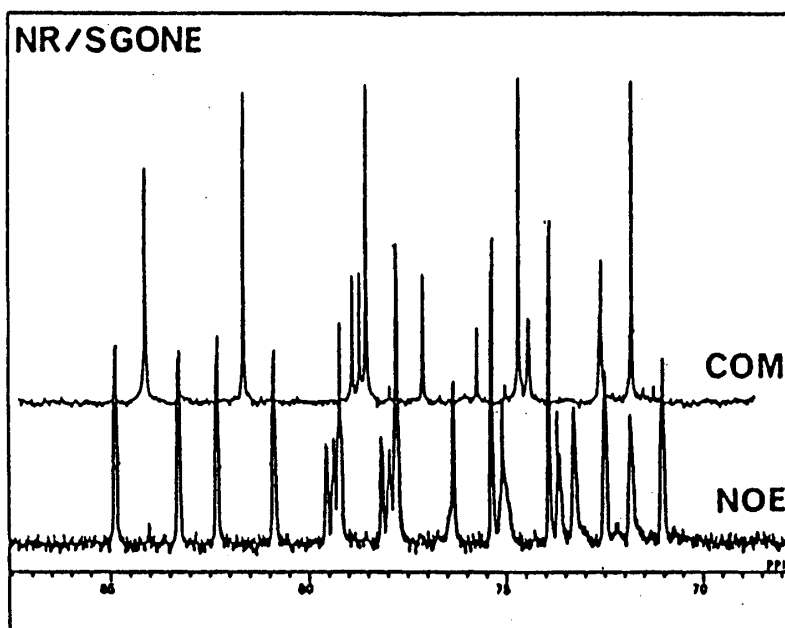
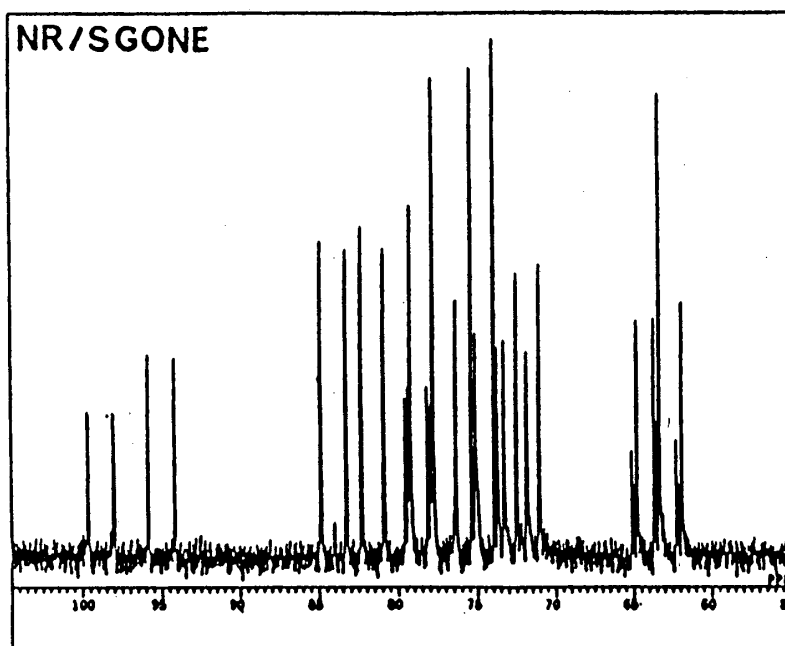


Fig. 7. Coupling Constants of ^{13}C - ^1H by CMR

ンは $\delta 4.557$ ($J=9.0$) に観測された。

f. 一位に相当するカーボン、プロトンのケミカルシフトから、一位には酸素が隣接してなくて、窒素が隣接していると考えられる。

4) グルカミンと NR 物質還元体の比較

NR 物質が、Maillard 反応のアマドリ生成物であれば、還元することにより、グルカミン (MW=181) になるはずであるので、NR 物質を還元し、標準グルカミンと比較した。NR 物質の還元体とグルカミンとをアミノ酸分析計で比較した結果、その保持時間が一致したため、

同一物質の可能性が、高くなった (Fig. 9)。グルカミンに出現した小ピークは、グルカミンの合成時に 70°C の加熱処理を行なっているため、グルコースと酢酸アンモニウムから生成された、後期段階の褐変物質である可能性が高い。

そこで、イオンスプレー LC/MS により分析したところ、両物質の分子イオンピーク (Fig. 10) 及びフラグメントイオンピーク (Fig. 11) のパターンは、同一であった。したがって、両物質は同一物質であると考えられた。フラグメントイオンピークでの、 $W/Z=164, 146, 128, 110$ のピークは、各々、両物質の分子から、水が 1、2、3、4 個はずれたものである。

4. pH に対する安定性

精製 NR 物質 ($1.34\mu\text{ moles}/2\text{ml}$ の 0.01N HCl 溶液) に、実験方法の項に記載されているように、水酸化ナトリウムを加え、pH を 7 と 10 とに調整し、室温で 30 分間放置後、塩酸 $10\mu\text{l}$ ($\times 1.07$ 希釈) を加え、pH を 2 にした。これらの試料をアミノ酸分析計で測定した結果、pH を 7 と 10 にした場合は、共に、回収率が 98% であった。

しかし、マイクロアシライザーによる脱塩の途中で、試料を一晩 4°C に保存し (pH 7~8.5 の状態)、翌日再脱塩を続け、脱塩終了後 pH 2 に調整した場合、NR 物質の量は、 $1/2\sim 2/3$ に減少した。また、マウスを使った毒性実験でも、注射用試料を調整するために、精製した NR 物質に、水酸化ナトリウムを加えて pH 2 を pH 7 にして、さらに、生理的食塩水 (0.85% 食塩) で希釈すると、酸性状態で希釈した場合に比べて、NR 物質は $1/3$ に減少した。

以上のことから、NR 物質は、希釈することによって不安定となり、pH に対しては酸性に比べて中性やアルカリ性の方が不安定である。グルコースとフルクトースは、アルカリ性 (pH 8.5)²⁹⁾ では糖自体が分解するため、時間の経過と共に、NR 物質もその量が減少した可能性が高い。

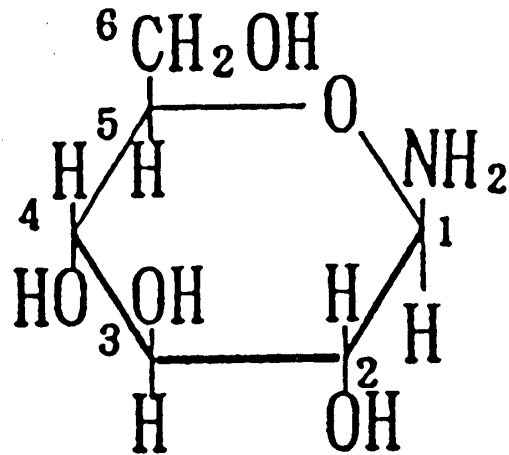


Fig. 8. Structural Formula of NR Compound Presumed by NMR Analysis

考 察

この研究は、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液から、アミノ酸分析計で、

菅田 恵子

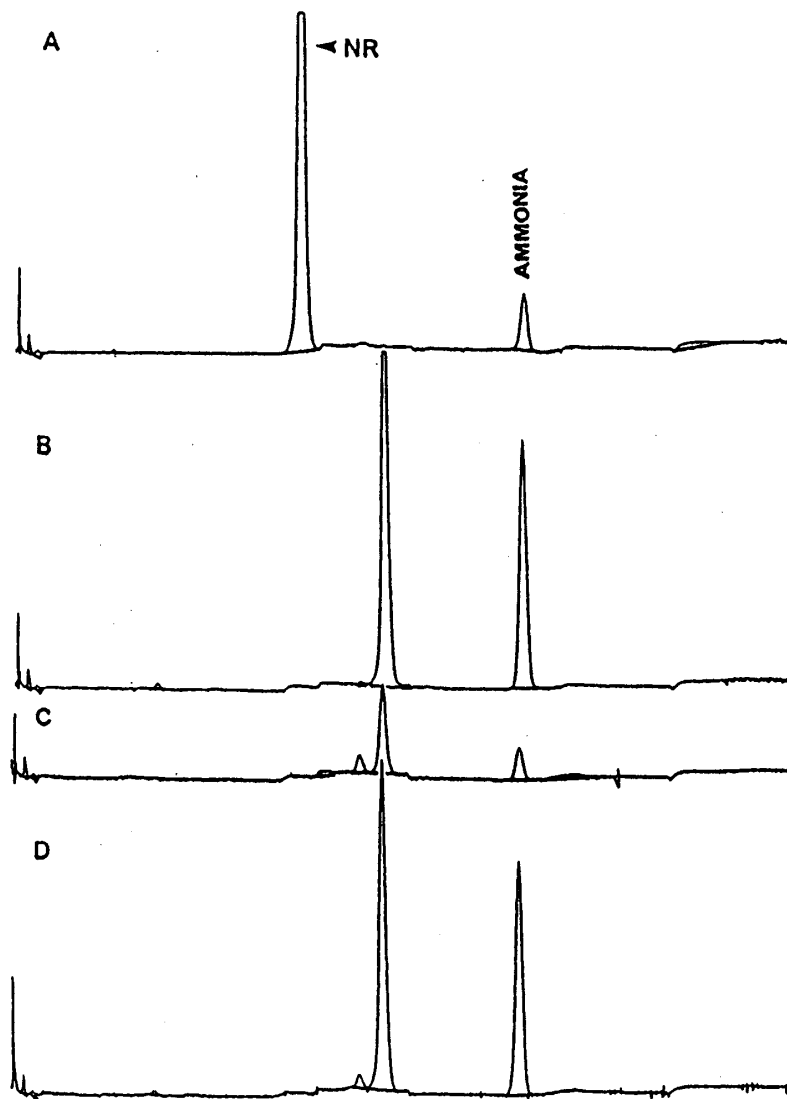


Fig. 9. Elution Patterns of Glucamine and/or Reduced NR Compound, Eluted from Amino Acid Analyzer

(A) NR compound ; (B) reduced NR compound ;
 (C) glucamine ; (D) reduced NR compound + glucamine

バリンの位置に、ニンヒドリン反応陽性物質（NR 物質）のピークが出現するという発見に始まる。しかし、グルコースと第二リン酸アンモニウムとから、常温で非酵素的にバリンが形成されるとは考えられない。何回も実験を繰り返すうち、ピークの位置がバリンの位置からずれたので、問題の物質はバリンではないと考えられた。ピークの位置がずれたのは、アミノ酸分析計に使用されている緩衝液の pH が、微妙にずれたためか、あるいは、試料中の塩濃度の変化によるのかもしれない。そこで、グルコースにアンモニアの結合したアミノ糖である可能性を考え、まず、NR 物質と、グルコサミンおよびガラクトサミンとを、水素化ほう素ナトリウムで還元した場合と還元しない場合とについて、アミノ酸分析計での挙動を比較した。その

グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応

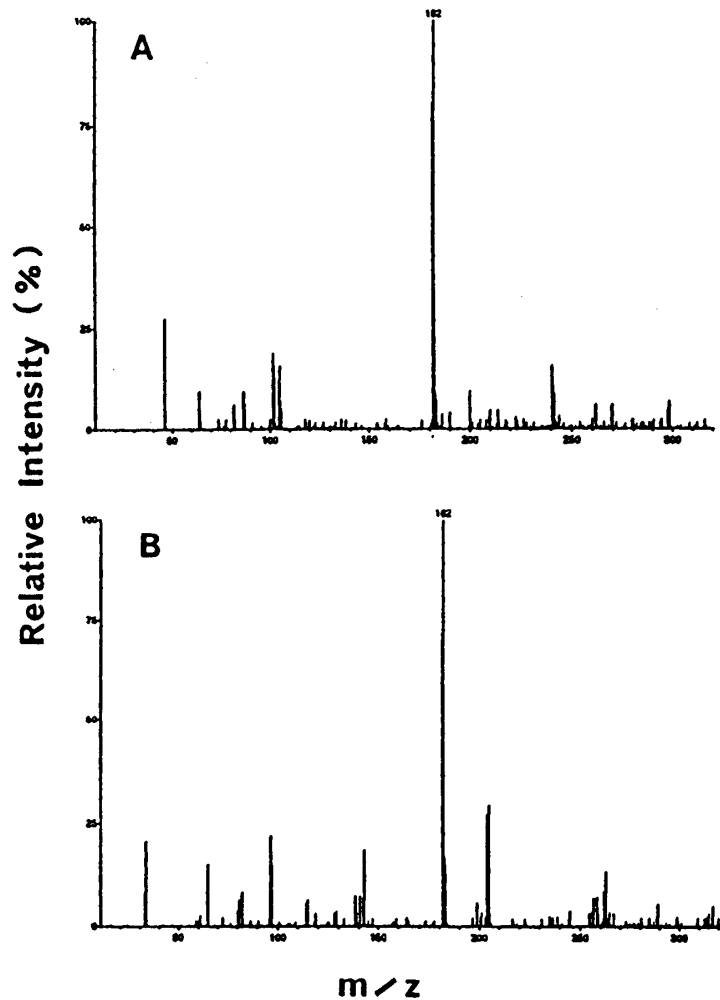


Fig. 10. Ion Spray LC Mass Spectra of Glucamine and Reduced NR Compound, in Positive Ion Mode

(A) Glucamine; (B) reduced NR compound

結果、NR 物質は、グルコサミンでもガラクトサミンでもないことがわかった。

そもそも非酵素的におこるこの反応は、メイラード反応の初期段階 (Fig. 12) を想起させるものである。メイラード反応は、グルコースのような還元糖が、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、アミノ糖、アミンなどと速やかに反応して、まずシッフ塩基 (アルドイミン化合物) を形成し、それがゆっくりとアマドリ転位をおこしてアマドリ転位生成物 (ケトアミン) を形成するというものである。このうち、シッフ塩基は不安定であって、容易にグルコースともとのアミノ化合物に戻る。今回のグルコースとリン酸アンモニウムとの反応の場合も、シッフ塩基を形成し、それが、グルコースとアンモニアにもどるだけではなく、ゆっくりとではあっても、安定なアマドリ転位生成物に変化するので、シッフ塩基に対するアマドリ転位生成物の割合は、時間の経過とともに増加すると考えられる。従って、NR 物質溶液中には、常にシッフ塩基とアマドリ転位生成物とが共存していると考えなくてはならない。

事実、次のような実験結果は、すべてそのことを示している。

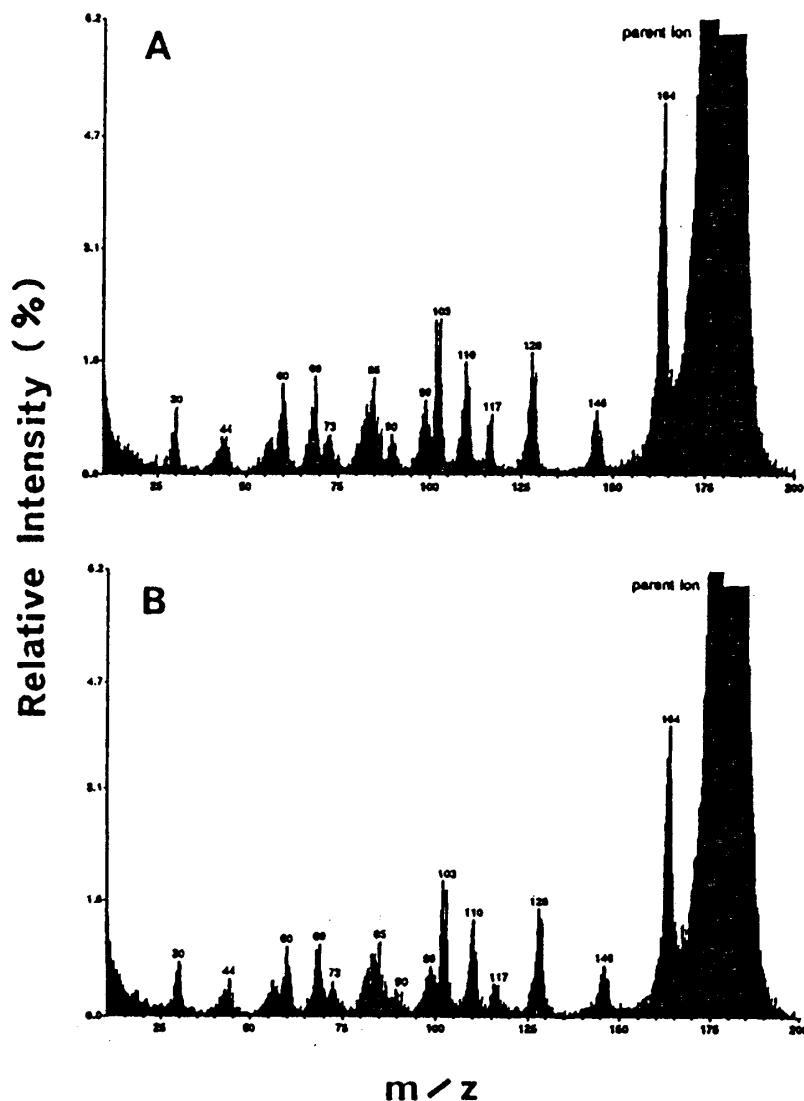


Fig. 11. Ion Spray LC Mass Mass Daughter Ion Spectra of Glucamine and Reduced NR Compound, in Positive Ion Mode

(A) Glucamine; (B) reduced NR compound

第一に、保存時間の問題である。グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液を作成し、マイクロアシライザーで脱塩した後、pH 2, 4°Cで保存すると、溶液中の NR 物質は、10日間で65%に減少した。しかし、精製した NR 物質の溶液は、ほぼ同じ濃度であるにもかかわらず、同じ条件で保存した場合、61日間で40%に減少しただけであった。これは、NR 物質の精製過程に2週間を要したので、その間に、アマドリ転位生成物が増加し、そのため、みかけの安定性が増加したと考えられる。

第二に、還元操作の結果である。水素化ほう素ナトリウムによって還元された、溶液中の NR 物質は、アミノ酸分析計によって、還元前よりも遅く溶出されるが、その量は、ピークの面積で計算するかぎり、もとの NR 物質の量よりも、遥かに減少していた。遅い位置に移ったピークは、多くのシッフ塩基（還元され得ない）と共存している。少量のアマドリ転位生成物

グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応

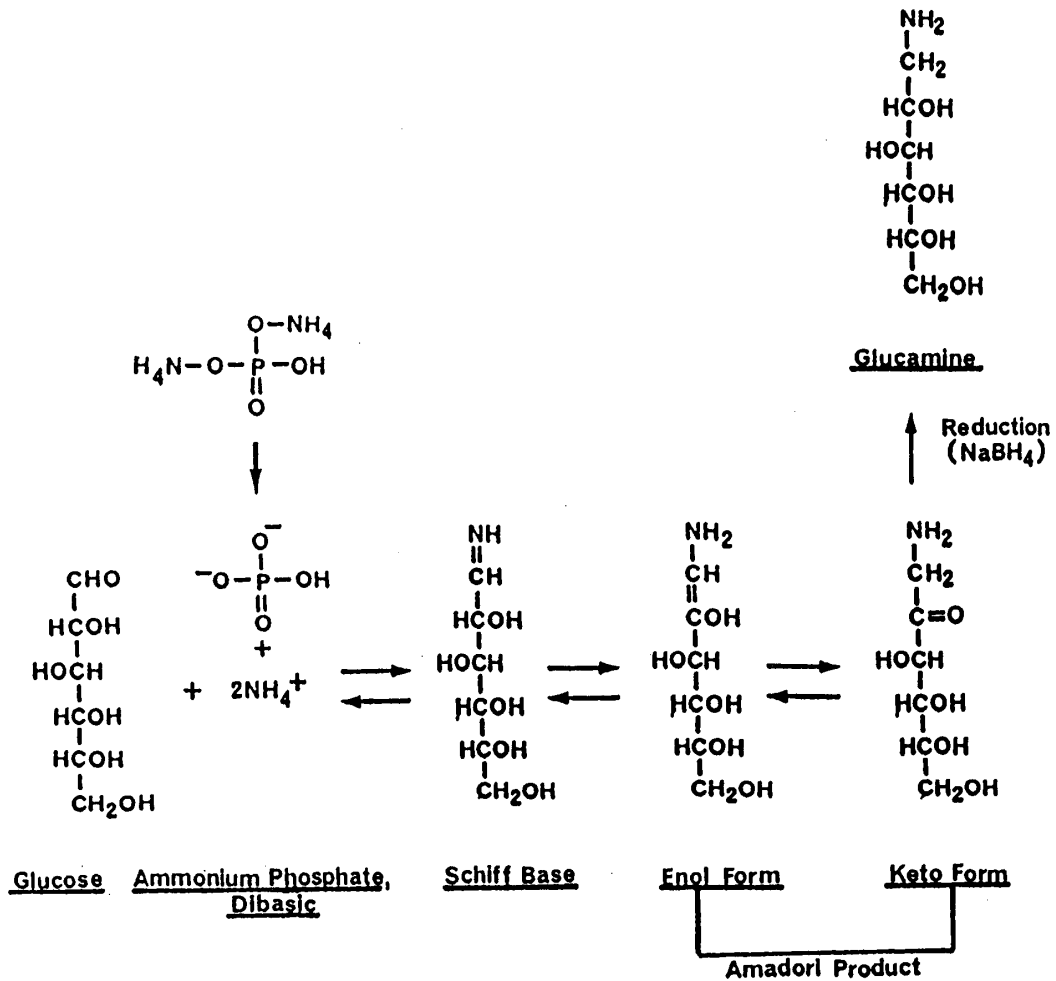


Fig. 12. Sequence of Nonenzymatic Reaction between Glucose and Dibasic Ammonium Phosphate

が還元されたためと考えられる。

第三に、試料中の NR 物質の濃度の影響である。Fig. 1 に示したとおり、高濃度の精製 NR 物質溶液中では、pH 2, 4°C の条件で、70 日間保存しても、8% しか分解されなかったが、低濃度溶液中では、61 日間に 60% も分解されている。このことは、 Schiff 塩基の不安定性を示している。

第四に、グルコース定量の結果である。Dowex 50W-X8 からの、溶出液各画分について、ムタロターゼ・GOD 法によって、グルコースを定量したところ、NR 物質のピークに重なって、グルコースが検出された。一位の炭素がアルデヒドでない場合、反応試薬中のムタロターゼの作用を受けないはずである。従って、このグルコースは、グルコース反応の際、NR 物質溶液が、発色試薬によって 150 倍も希釈され、さらにその試薬の pH が中性であるので、 Schiff 塩基からの逆反応によりグルコースが形成され、それが反応したものと考えられる。また、生体内で、pre HbA_{1c} (Schiff 塩基結合物) が、HbA_{1c} (アマドリ生成物) と約 1 : 9 の比率で^{13,24)} 共存しているという事実も、この可能性を支持している。

NR 物質の精製は、以下のようにして行なった。まず、グルコースと第二リン酸アンモニウ

菅 田 恵 子

ムとの混合溶液から、マイクロアシライザーによって脱塩し、Dowex 50W-X8 を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行なうことによってグルコースを除き、溶出した NR 物質を集め Sephadex G10 で再度脱塩することにより、NR 物質の精製試料を得た。この試料につき、アミノ酸分析計、FAB/MS、イオンスプレー LC/MS、および NMR を用い、構造解析を行なった結果、分子量179の物質であって、一位の炭素にアミノ基が、二、三、四位の炭素に水酸基が結合し、Fig. 8 のような構造式をもった化合物であろうと推定された。しかし、NMR の解析からは、この主成分以外に副成分の混在も認められた。MS のフラグメントイオンピークからの解析が困難であったのは、この2成分が混在していたためではないかと考えられた。アマドリ生成物は、エノール型（二位の炭素が、C-OH 基）とケト型（二位の炭素がC=O）の間をpH及び温度変化により可逆的に移動するが、今回の実験条件では、大部分がエノール型で、微量のケト型を含むと考えられる。NMR による主成分とは、アマドリ生成物のエノール型で、副成分とは、グルコース and/or シッフ塩基である可能性がある。ケト型アマドリ生成物は、還元することによりグルカミンになるはずである。そこで、NR 物質を水素化ほう素ナトリウムで還元し、この還元物質とグルカミンとをアミノ酸分析計で、その保持時間を比較したところ、両者の保持時間が一致した。また、イオンスプレー LC/MS の結果も、両物質が同一物質であることを示していた。したがって、NR 物質は、その大部分が、エノール型アマドリ生成物で、通常、環状構造をとっていると結論される。また、エノール型及びケト型アマドリ生成物は、相互に移行し平衡関係を保っているため、還元により、NR 物質は、エノール型からケト型を経て、グルカミンへ変化すると考えられる。

以上の事実から、グルコースと第二リン酸アンモニウムとから、常温で、非酵素的に、しかも速やかに、Maillard 反応が進行し、アマドリ生成物が形成されることがわかったわけである。グルコース以外の種々の糖と、第二リン酸アンモニウムの組み合わせについて、ニンヒドリン反応陽性物質が形成されるかどうかを、アミノ酸分析計で測定したところ、ほとんどの場合、ニンヒドリン反応陽性物質が形成されたが、使用した糖のなかでは、グルコースが一番反応性が高かった。グルコースと種々のアンモニウム塩との組み合わせで見ると、どのアンモニウム塩を用いても、その溶出位置が同じであった。従って、質的には同じニンヒドリン反応陽性物質が形成されたと考えられる。しかし、量的には、第二リン酸アンモニウムを用いた場合が、他のアンモニウム塩とは比較にならない程、多量の NR 物質を形成した。これは、第二リン酸アンモニウムだけがアルカリ性塩であって、その溶液の pH が、マイクロアシライザーによって中性になったり、塩酸を用いて酸性にしたりすることによって、アンモニアが遊離し、それがグルコースと反応しやすいためであろう。

また、一般にアミノ基と還元糖の非酵素的結合で始まるグリケーションの反応速度は、その還元糖の炭素数や化学構造上、開環して存在する割合に影響され^{25,26}、その反応性を低い方から順に示すと、グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、リボースの順で、グルコース-6-リン酸のようにリン酸化した糖は、より反応性が高いと言われている。

る。しかし、この研究によると、グルコースの反応性が最も高かった。したがって、これは、第二リン酸アンモニウムに特異的な現象であるかもしれない。

グルコース・アンモニア反応は、食用着色料カラメルの製造に広く応用されるほか、合成培地のオートクレーブ時の褐変、食品製造時の褐変にも一部関与している反応であり、これまで、その反応生成物として多くの含窒素化合物が、分離、同定されてきた²⁰。しかし、この反応は、常に加熱処理を条件とし、また pH についても、反応速度が、酸性側とくに pH 5 以下では遅く、中性、アルカリ性で速いことから、一般に、中性、アルカリ性で行なわれている。本研究に類似のデータ²⁰も存在するが、その場合、生成物は、pH 6.0、37°C、2 週間放置により形成される。この報告では、初発 pH 8.5 の反応液を30分放置後に、6 時間30分の脱塩操作を行なった後、直ちに塩酸で pH 2.0 とする。一晩、4°Cで保存し、その後の精製過程は、37°Cで濃縮する以外は、4°Cで行なった。

NR 物質の生体への影響については、肝硬変で肝性脳症を起こし、血中アンモニア濃度が、正常の 2 倍を示す患者から、アミノ酸分析計で、NR 物質と考えられるピークを検出したので、このピークについては、さらに解析し物質の同定を行い検討したいと考えている。

要 約

グルコースと第二リン酸アンモニウムとの混合溶液を作成すると、ニンヒドリン反応陽性物質が形成されたので、その物質を NR 物質と名付け、同物質の精製・同定を目的として実験を行なった。

1. グルコースと各種アンモニウム塩の組み合わせと、各種の糖と第二リン酸アンモニウムの組み合わせで、混合溶液を作成し、生成したニンヒドリン反応陽性物質をアミノ酸分析計で測定すると、使用したアンモニウム塩のうち、第二リン酸アンモニウムのみが、非常に高い反応性を示し、それ以外のアンモニウム塩の反応性は、極めて低かった。また、使用した糖のうち、グルコースが最も反応性が高かった。従って、以後、すべての実験は、グルコースと第二リン酸アンモニウムとの組み合わせで行なった。

2. グルコースと第二リン酸アンモニウムの混合溶液を MicroAcilyzer を用いて脱塩し、Dowex 50W-X8 を用い、0.01N 塩酸でグルコースを除き、3 N 塩酸で溶離した NR 物質溶液について、Sephadex G10 を用いて再脱塩することにより、精製 NR 物質を得た。

3. NR 物質は、FAB/MS および LC/MS の分析によると、分子量179であった。

4. NMR の分析によると、主成分と副成分とがあり、主成分は、1 の炭素にアミノ酸が、2-6 の炭素にヒドロキシル基が結合し、1 の炭素と 2 の炭素とは s-trans の関係にあることが分かった。

5. 還元 NR 物質のアミノ酸分析計での保持時間や LC/MSMS によるマススペクトルは、グルカミン (分子量181) のそれと一致した。

従って、NR 物質形成過程は、室温で非酵素的に進行するメイラード反応の初期段階であっ

菅 田 恵 子

て、グルコースのアルデヒド基と第二リン酸アンモニウムのアンモニアイオンが、非酵素的に結合して、シッフ塩基結合物（不安定性 preNR 物質）を形成し、次いで、アマドリ転位をおこなない、アマドリ生成物（安定型 NR 物質）、すなわち、1-アミノフルクトースを形成したものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導を賜った金沢医科大学学生化学第一教室岡田利彦教授に深謝致します。

引 用 文 献

1. Maillard, L. C.: Reaction generale des acides amines sur les sucres. Ses consequences biologiques. Compt. Rend. Soc. Biol., 72, 599-601, 1912.
2. Ellis, G. P.: The Maillard reaction. Adv. Carbohydr. Chem., 14, 63-134, 1959.
3. Danehy, J. P. and Pigman, W. W.: Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. Adv. Food Res., 3, 241-290, 1951.
4. Hodge, J. E.: Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. J. Agric. Food Chem., 1, 928-943, 1953.
5. Reynolds, T. M.: Chemistry of nonenzymic browning I. The reaction between aldoses and amines. Adv. Food Res., 12, 1-52, 1963.
6. Reynolds, T. M.: Chemistry of nonenzymic browning II. Adv. Food Res., 14, 167-283, 1965.
7. Lea, C. H.: The advantages of browning reactions in food processing and storage. Food Manuf., 40, 51-55, 1965.
8. Mohammad, A., Fraenkel-Conrat, H. and Olcott, H. S.: The browning reaction of proteins with glucose. Arch. Biochem., 24, 157-178, 1949.
9. Lea, C. H. and Hannan, R. S.: Studies of the reaction between proteins and reducing sugars in the dry state. II, Further observations on the formation of the casein-glucose complex. Biochem. Biophys. Acta, 4, 518-531, 1950.
10. Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta, 22, 296-298, 1968.
11. Koenig, R. J., Blobstein, S. H. and Cerami, A.: Structure of carbohydrate of hemoglobin A_{1c}. J. Biol. Chem., 252, 2992-2997, 1977.
12. Stevens, V. J., Vlassara, H., Abati, A. and Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J. Biol. Chem., 252, 2998-3002, 1977.
13. Bunn, H. F.: Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. Diabetes, 30, 613-617, 1981.
14. Higgins, P. J. and Bunn, H. F.: Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J. Biol. Chem., 256, 5204-5208, 1981.
15. Okada, T., Sugata, K., Tanihara, K. and Jisaki, F.: Escherichia coli K12 strain W4627 growth overnight in nutrient both releases more valine than cells growing logarithmically, after nutritional shift-down. J. Kanazawa Med. Univ., 15, 180-189, 1990.
16. Smith, I.: Chromatographic and Electrophoretic Techniques. Vol. 1-Chromatography, 810-814, 1969.

グルコースとアンモニアとの室温における非酵素的反応

17. クロマトグラフィーの実際. Vol. II-3 イオン交換クロマトグラフィ (アミノ酸) pp523.
18. Boas, N. F.: Method for the determination of hexosamines in tissues. *J. Biol. Chem.*, 204, 553-563, 1953.
19. Pharmacia Fine Chemicals AB: Sephadex-gel filtration in theory and practice, 1-63, 1978.
20. Porath, J., Flodin, P.: Gel filtration. A method for desalting and group separation. *Nature*, 183, 1657-1659, 1959.
21. Perry, M. B. and Webb, A. C.: Analysis of 2-amino-2-deoxyhexoses by gas-liquid partition chromatography. *Can. J. Biochem.*, 46, 1163-1165, 1968.
22. Kondo, A., Suzuki, J., Kuraya, N., Hase, S., Kato, I. and Ikenaka, T.: Improved method for fluorescence labeling of sugar chains with sialic acid residues. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2169-2170, 1990.
23. 土田広信, 河本正彦, 加藤博通, 藤巻正生: アルカリ性および弱酸性条件下グルコース, アンモニア反応によって生成する Pyrazine 誘導体の異同について. *農化*, 50, 187-189, 1976.
24. Goldstein, D. E., Peth, S. B., England, J. D. Hess, R. L. and Costa J. D.: Effects of acute changes in blood glucose on HbA_{1c}. *Diabetes*, 29, 623-628, 1980.
25. Overend, W. G., Peacocke, A. R. and Smith, J. B.: Reductions at position 1 of carbohydrates Part I. The polarographic reduction of carbohydrates. *J. Chem. Soc.* 3487-3497, 1961.
26. 川岸舜朗, 奥村丞司, 並木満夫: アミノカルボニル反応におよぼす放射線照射の影響. *農化*, 46, 459-465, 1972.
27. Kort, M. J.: Reactions of free sugars with aqueous ammonia. *Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem.*, 25, 311-349, 1970.
28. Bunn, H. F. and Higgins, P. J.: Reaction of monosaccharides with proteins. Possible evolutionary significance. *Science*, 213, 222-224, 1981.