

# 植物における AGEs 生成抑制化合物の探索 -モウセンゴケ属植物の AGEs 生成抑制効果-

## Searching for compound of inhibitory effect of AGEs from plants -Inhibitory effect of *Drosera* extracts on the formation of AGEs-

白河 潤一<sup>1</sup>, 大野 礼一<sup>2</sup>, 木下 奨<sup>3</sup>, 須川 日加里<sup>3</sup>, 市丸 健太<sup>3</sup>, 星 良和<sup>4</sup>, 永井 竜児<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>東海大学農学部バイオサイエンス学科, <sup>2</sup>東海大学大学院生物科学研究科生物科学専攻,

<sup>3</sup>東海大学大学院農学研究科農学専攻, <sup>4</sup>東海大学農学部応用植物学科

Jun-ichi Shirakawa<sup>1</sup>, Rei-ichi Ohno<sup>2</sup>, Sho Kinoshita<sup>3</sup>, Hikari Sugawa<sup>3</sup>, Kenta Ichimaru<sup>3</sup>, Yoshikazu Hoshi<sup>4</sup>, Ryoji Nagai<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University <sup>2</sup>Graduate School of Bioscience, Tokai University <sup>3</sup>Graduate School of Agriculture, Tokai University <sup>4</sup>Department of Plant science, School of Agriculture, Tokai University

### [要旨]

メイラード反応によって生成される Advanced Glycation End-products (AGEs) は様々な生活習慣病や老化関連疾患との関与が明らかとなっており、それら疾患を予防する目的で AGEs 生成抑制化合物の探索がさかんに行われている。本項では様々な植物抽出物の中から日本に自生するモウセンゴケ属の3種に着目し、抗 AGEs 抗体を用いた Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による AGEs 生成抑制効果を検討したので報告する。

### [Abstract]

Recent studies demonstrate that accumulation of Advanced Glycation End-products (AGEs) in our bodies increases in accordance with aging, and is enhanced by the pathogenesis of lifestyle-related diseases. Therefore, the intake of compounds that inhibit the formation of AGEs may represent a potential strategy for preventing age-related diseases. In the present study, the inhibitory effect of plants extraction on the formation of AGEs was determined by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) with antibodies specific for AGEs. The extract from three species of *Drosera* effectively inhibited AGEs formation during the incubation of gelatin with ribose.

### [Key Words]

AGEs, *Drosera*, Aging, Lifestyle-related diseases

### 1. はじめに

遊離アミノ酸や蛋白のアミノ基と還元糖は非酵素的に縮合反応を起こす。本反応は食品の加熱調理や保存に伴う褐変反応として見いだされ、発見者の名前に由来してメイラード反応と呼ばれている。本反応は蛋白に糖が結合することから糖化 (Glycation) とも言われ、後期反応では Advanced Glycation End-products (AGEs) が生成する。AGEs は生体蛋白にも生成し、酵素の活性や構造変化に影響を及ぼし、様々な病態に関与していると考えられている。さらに、生体には AGEs を認識する Receptor for AGEs

(RAGE) と呼ばれる受容体も存在し、RAGE と結合することによって炎症反応を惹起することも報告されている。したがって、生体における AGEs の生成を抑制することは、AGEs が関与する疾患の予防や進展の抑制において有効であると考えられる。実際、近年大きな社会問題となっている生活習慣病や老化関連疾患に AGEs が関連していることが多くの報告によって明らかとなりつつあることから、AGEs 生成抑制化合物の探索も活発に行われるようになってきている。しかし、AGEs は多くの構造体の総称であり、様々な構造が多数の経路より生成されるこ

とから、どのような病態にどの AGEs 構造が関与しているかを明らかにし、抑制対象とする構造を明確にして研究を進めていくことが重要である。

また、生活習慣病では診断されてから開始される薬物治療だけでなく、普段の生活の中で予防していくことが重要となるため、日常的に摂取することが可能な AGEs 生成抑制化合物が罹病患者数の減少に有効であると考えられる。近年、生活習慣病の予防や改善を謳ったサプリメントや健康食品として多くの天然物由来成分を含有する食品が注目を集めているが、科学的根拠に基づいた AGEs 生成抑制効果を有する食品成分は少ない。しかし、天然物由来の AGEs 生成抑制化合物の探索が行われるようになり、多くの植物分類群に含まれるフラボノイドであるクリシンやルテオリン、ケルセチン、ケンペロールなどにおいて AGEs 生成抑制効果が報告されている[1], [2]。現在報告されている AGEs 生成抑制成分は *in vitro* 試験による評価のみであることが多いため、動物実験やヒト介入試験を行い、生体に対する効果の科学的なエビデンスを明らかにしていくことが実用化のために必要となる。さらに、植物抽出物を由来とする化合物をターゲットとする場合、植物の生育条件や塩基配列、ゲノムサイズの変化を伴う系統間や種間の差異等が、二次代謝産物に影響を与え、食品やサプリメントに利用した際の効果に変化を及ぼす可能性が高いと考えられる。そのため、AGEs 生成抑制素材の探索においては、1) 抑制対象とする AGEs 構造を明らかにすること、2) 生体中での効果を検証すること、3) 由来の明確な材料を用いること等が重要となる。

## 2. 結果の概要

### 1)モウセンゴケ属における利用背景

今回は AGEs 生成抑制試験の実例として、モウセンゴケ属の *in vitro* 条件下における Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法による結果を報告する。食虫植物として知られるモウセンゴケ属 (*Drosera*) は、モウセンゴケ科 (Deoserraceae) に属し、全世界に約 150 種が分布しているが[3]、モウセンゴケ (*Drosera rotundifolia* L.)、ナガエモウセンゴケ (*D. intermedia* Hayne) およびナガバノモウセンゴケ (*D. anglica* Hads.) などの数種は、伝統的に気管支感染症の治療において利用されてきた背景をもつ。

主に、モウセンゴケから調製される *Drosera Herba* は 17 世紀から百日咳などの治療に使用されており、抗炎症効果が報告されていることから[4]、本研究では AGEs 生成抑制化合物探索のための候補に加え、実験を行った。

### 2)ELISA 法による AGEs 生成抑制試験

多くのモウセンゴケ属の植物のうち本研究では、日本に広く分布するモウセンゴケ (*Drosera rotundifolia* L.) とコモウセンゴケ (*D. spatulata* Labill.) および両種の複二倍体雑種を起源とする日本固有種であるトウカイコモウセンゴケ (*D. tokaiensis* (Komiya & C. Shibata) T. Nakamura & Ueda) の 3 種を用いた。3 種は単一の系統を組織培養にて増殖させ、エタノールで抽出後に乾固し、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して実験に使用した。組織培養体を用いることで系統や季節変動による影響を除外して試験を行うことが可能となっている。標的とした AGEs 構造は N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML) および N<sup>ω</sup>-carboxymethylarginine (CMA) であり、それぞれの構造に特異的なモノクローナル抗体を用いて検出を行った。CML は酸化反応由来から生成される代表的な AGE 構造であり、糖尿病やその合併症である腎症[5]、神経障害[6]等の病態において高値を示すことが報告されている。また、CMA はコラーゲン特異的に生成することが報告されており[7]、コラーゲンを豊富に含む組織である血管や皮膚の老化に関与する可能性が高い。本実験ではリボースとゼラチンを混合した溶液中に生成する 2 種の AGEs 構造に対するモウセンゴケ属植物抽出物の抑制効果を ELISA 法にて評価した。具体的な手法としては、最終濃度でリボース (30 mM) とゼラチン (2 mg/ml) を混合し、7 日間 37 °C でインキュベートしたものをコントロールとし、同条件にて各植物抽出物を 10 μg/ml 添加した際の AGEs 生成量の増減を比較した。

### 3)AGEs 生成抑制試験の結果

3 種の抽出物は CML および CMA の生成を抑制することが明らかとなった (図 1)。特にコモウセンゴケに高い抑制効果が認められた。今回用いた個体と同一系統の個体におけるエタノール抽出物中フラボノイドの測定結果では、コモウセンゴケはその他の 2 種と比較してエラグ酸やイソケルセチンを多く含有していることが報告されている[8]。これらの成分

は AGEs の生成抑制効果が *in vitro* 試験において報告されていることから [9], [10]、モウセンゴケ属の AGEs 生成抑制効果に影響している可能性がある。今後、有効成分の単離や動物における投与実験を行っていくことで、生体でも有効な AGEs 生成抑制化合物を明らかにできると考えられる。

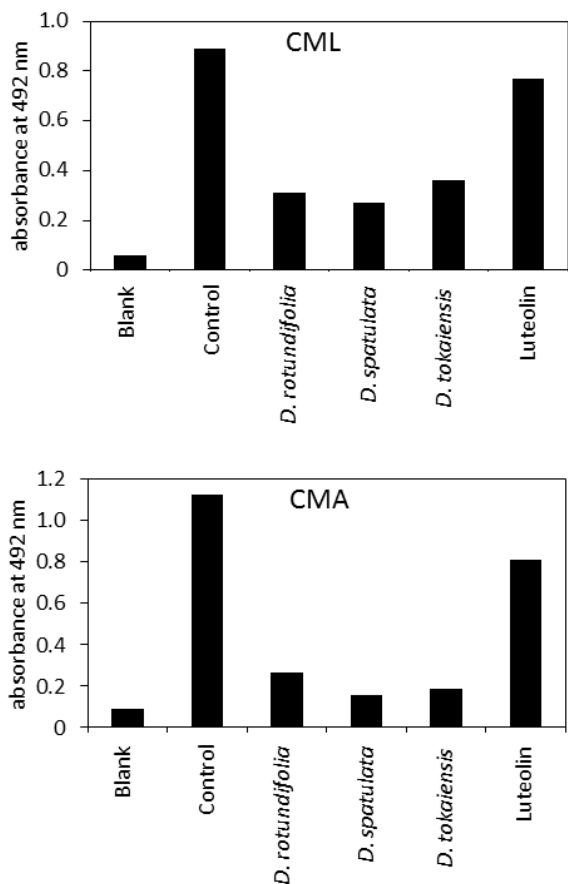


図 1 ELISA 法によるモウセンゴケ (*D. rotundifolia*)、コモウセンゴケ (*D. spatulata*) およびトウカイコモウセンゴケ (*D. tokaiensis*) の CML および CMA 生成抑制能の評価。リボースとゼラチンの混合液を Blank、混合液を 37 で 7 日間インキュベートしたものを Control とした。各抽出物は 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した。ルテオリン (10  $\mu\text{g/ml}$ ) は AGEs 生成抑制化合物のコントロールとして使用した。

### 3. 展望

本項ではモウセンゴケ属における結果を報告したが、現在様々な分類群の植物種において AGEs を中心とした修飾アミノ酸の生成抑制化合物の探索を行っている。その中で、一部の植物抽出物では動物実験において AGEs 生成抑制を示し、糖尿病の改善効果を有することを報告している [11]。今後も AGEs

が生体に与える影響の解明と、生体中において効果の明らかな AGEs 生成抑制化合物の探索を行っていく予定である。

### 4. 引用文献

- [1] H. Shimoda *et al.*, *Phytother Res.*, **25**, 1328 (2011)
- [2] H. M. El-Bassossy *et al.*, *Phytother Res.*, **27**, 1678 (2013)
- [3] F. Rivadavia *et al.*, *Am J Bot.*, **90**, 123 (2003)
- [4] D.H. Paper, *et al.*, *Phytother Res.*, **19**, 323 (2005)
- [5] N. Tanji *et al.*, *J Am. Soc. Nephrol.*, **11**, 1656 (2000)
- [6] H. Stracke *et al.*, *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes*, **109**, 330 (2001)
- [7] S. Simasaki *et al.*, *Anti-Aging Medicine* **8**, 82 (2011)
- [8] K. Fukushima *et al.*, *J Ethnopharmacol.*, **125**, 90 (2009)
- [9] P. Muthenna *et al.*, *Biochem J.*, **442**, 221 (2012)
- [10] H. Sugawa *et al.*, *Food Funct.*, **7**, 2566 (2016)
- [11] J. Shirakawa *et al.* *Food Funct.*, **7**, 2508 (2016)

### 5. 業績

#### 【論文発表】

本研究に関連のあるもののみをリストした。

- 1) J. Shirakawa, S. Arakawa, T. Tagawa, K. Gotoh, N. Oikawa, R. Ohno, M. Shinagawa, K. Hatano, H. Sugawa, K. Ichimaru, S. Kinoshita, C. Furusawa, M. Yamanaka, M. Kobayashi, S. Masuda, M. Nagai, R. Nagai. *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. *Food Funct.*, **7**(6), 2508-2515 (2016)
- 2) H. Sugawa, R. Ohno, J. Shirakawa, A. Nakajima, A. Kanagawa, T. Hirata, T. Ikeda, N. Moroishi, M. Nagai, R. Nagai. *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products. *Food Funct.*, **7**(6), 2566-2573 (2016)
- 3) R. Nagai, J. Shirakawa, R. Ohno, K. Hatano, H. Sugawa, S. Arakawa, K. Ichimaru, S. Kinoshita, N. Sakata, M. Nagai. Antibody-based detection of advanced glycation end-products: promises vs. limitations. *Glycoconj J.*, **33**(4), 545-552 (2016)
- 4) R. Nagai, J. Shirakawa, Y. Fujiwara, R. Ohno, N. Moroishi, N. Sakata, M. Nagai. Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein

- denaturation. *J Clin Biochem Nutr.*, **55**(1), 1-6 (2014)
- 5) R. Nagai, J. Shirakawa, R. Ohno, N. Moroishi, M. Nagai. Inhibition of AGEs formation by natural products. *Amino Acids.*, **46**(2), 261-266. (2014)
- 6) J. Shirakawa, K. Nagano, Y. Hoshi. Polyploid Genome Structure of *Drosera spatulata* Complex (Droseraceae). *Cytologia*, **77**(1), 97-106 (2012)
- 7) J. Shirakawa, Y. Hoshi, K. Kondo. Chromosome differentiation and genome organization in carnivorous plant family Droseraceae. *Chromosome Botany*, **6**, 111-119 (2011)
- 8) Y. Hoshi, J. Shirakawa, M. Hasebe, K. Fukushima, K. Kondo. Tandem repeat rDNA sequences derived from maternal and paternal parents were stably maintained in hexaploids of *Drosera spatulata* complex (Droseraceae). *Cytologia*, **73**, 313-325 (2008)
- 効果。第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2016.8 熊本
- 6) 須川日加里、松田志織、白河潤一、木下奨、荒川翔太郎、椛田聖孝、永井竜児：スイゼンジノリ摂食による 1 型糖尿病マウスの水晶体中 CML 蓄積抑制効果について。第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2016.8 熊本
- 7) 木下奨、古澤知里、白河潤一、永井竜児：ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) による CMA 及び CML 生成抑制効果の検討。第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、2016.8 熊本
- 8) 木下奨、古澤知里、大野礼一、須川日加里、白河潤一、永井竜児：AGEs 生成抑制効果を有する天然物のスクリーニング。第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2015.5 兵庫

#### 【学会等発表】

本研究に関連のある今年度発表の演題のみをリストした。

- 1) 木下奨、古澤知里、白河潤一、須川日加里、小山沙紀、藤森龍、永井竜児：ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) 粗抽出物による CMA 及び CML 生成抑制効果の検討。第 14 回日本機能性食品医学会総会、2016.12 東京
- 2) 須川日加里、松田志織、白河潤一、木下奨、古澤知里、荒川翔太郎、椛田聖孝、永井竜児：スイゼンジノリ摂食は 1 型糖尿病マウスの水晶体 CML 生成を抑制する。第 26 回日本メイラード学会年会、2016.11 茨城
- 3) 木下奨、古澤知里、白河潤一、須川日加里、小山沙紀、藤森龍、永井竜児：ゲンノショウコ (*Geranium thunbergii*) 抽出物の CMA、CML 生成抑制効果。第 26 回日本メイラード学会年会、2016.11 茨城
- 4) 白河潤一、荒川翔太郎、田川智也、後藤憲太郎、及川成永、小林正和、永井竜児：STZ 誘発糖尿病ラットに対するサラシア抽出物の糖尿病改善効果の評価。第 31 回日本糖尿病合併症学会、2016.10 宮城
- 5) 白河潤一、荒川翔太郎、田川智也、後藤憲太郎、及川成永、小林正和、永井竜児：STZ 誘発糖尿病ラットにおけるサラシア抽出物の糖尿病改善