

タンパク質糖化を抑制する生物資源の探索

萩貴之、松本亜里奈、北川由紀子*¹、丸山進*¹

タンパク質の糖化は、グルコース等のカルボニル化合物により非酵素的に進行し、加齢性疾患の進行に関連している。我々は、タンパク質糖化を抑制する機能性素材の探索を目的として、当センターが保有する生物試料の935種類の熱水抽出液および1315種類の50%エタノール抽出液を対象に、各抽出液の20倍希釈液について、グルコースによる血清アルブミンの糖化を抑制する生物素材のスクリーニングを行ったところ、20種類の熱水抽出物および297種類の50%エタノール抽出物が50%以上の阻害率を示した。その中でも、モモタマナの熱水抽出物 (IC₅₀: 0.22 mg/mL)、オニヤブソテツ葉 (IC₅₀: 0.17 mg/mL)、カンキチク茎葉部 (IC₅₀: 0.21 mg/mL)、アデク葉 (IC₅₀: 0.23 mg/mL)、フクギ葉 (IC₅₀: 0.23 mg/mL) の50%エタノール抽出物が高い活性を示した。また、アルブミン糖化阻害率の高い生物素材を対象にコラーゲンの糖化に伴うカルボキシメチルアルギニンの生成阻害活性を評価したところ、フクギ葉、イタドリ地上部の50%エタノール抽出物が阻害活性を有することが明らかとなった。

1 はじめに

アミノ酸と還元糖の混合溶液を加熱または長期間放置すると非酵素的な反応により褐色の高分子色素メラノイジンが生じる。この反応は、100年以上前にフランスの科学者 Louis Camille Maillard によって、グリシンとグルコースを加熱すると褐変が生じることが報告されており¹⁾、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。メイラード反応は、飲食料品の加熱・熟成²⁾に関与しているだけでなく、生体分子の反応³⁾、土壌・海底堆積物における有機物腐敗の主要な経路としても重要であることが明らかとなってきている^{4) 5)}。

加工食品においては、コーヒー豆、ビールなど食品の色や複雑な香りを形成する重要な役割を持つことが知られ⁶⁾、最終生成物であるメラノイジンは、抗酸化活性、抗菌作用、変異原性抑制作用などを有する反面、好ましくない変色(褐変)や異臭の原因となる。

生体においては、糖質が普遍的な貯蔵栄養物質であるため、血中のグルコースがタンパク質などの生体分子と非酵素的反応を起こす⁷⁾。タンパク質とグルコースの反応は、シッフ塩基の形成を経てアマドリ転移物となる可逆的な前期反応、アマドリ転移物から3-デオキシグルコソン、メチルグリオキサールなどの反応中間体を経て終末糖化産物 (AGEs: advanced glycation end products) の生成に至る不可逆的な中期・後期反応が知られている⁸⁾。特に半減期10~15年の皮膚コラーゲンや半減期72~117年の軟骨コラーゲンなど代謝が遅い生体内タンパク質は、長期間に渡って徐々に反応が進むため、これらの糖化タンパク質が後期反応へと進み、生体内で酸化等の修飾をされることでAGEsが生成される^{9) 10) 11)}。コ

ラーゲンは、繊維形成過程においてアミノ酸残基を介して架橋を形成し強固な繊維が形成されているが、AGEsのうちリジン残基が修飾されるCML (カルボキシメチルリジン)、アルギニン残基が修飾されるCMA (カルボキシメチルアルギニン) は、コラーゲンの正常な架橋形成を阻害し繊維の安定性に影響を及ぼすと考えられている^{11) 12)}。また、CMLはアルブミンやコラーゲンなどに由来する様々な糖化タンパク質から検出されているが、CMAはコラーゲンなどの結合組織タンパク質に由来する糖化タンパク質に特異的に含まれることが知られている^{13) 14)}。このため、CMAはコラーゲンの糖化マーカーとして有用であると考えられている^{14) 15)}。

近年、タンパク質糖化を抑制する生物資源由来物質 (ファイトケミカル) を探索する研究がされており、山口ら (2004)¹⁶⁾ は岩手県内の農林水産物約250種類のエタノール抽出物および熱水抽出物、八木ら (2017)¹⁷⁾ は536種類の植物由来熱水抽出物についてタンパク質糖化阻害活性を検討している。しかしながら、沖縄県に特徴のある生物資源を対象にした研究は少ない。そこで本研究では、当センターが保有する生物試料の50%エタノール抽出液 (1315種類) および熱水抽出液 (935種類) のタンパク質糖化阻害活性を評価し、活性の高い素材についてコラーゲンの糖化によるCMAの生成阻害活性を評価した。

2 実験材料および実験方法

2-1 実験材料

熱水抽出は、当センターがマイナス30℃で保管している生物試料 (生物素材ライブラリ) の乾燥粉末を高速度

*¹ 元沖縄県工業技術センター

媒抽出装置 (Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor, Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, US) を使用して、以下の方法で行った。生物試料の乾燥粉末0.5 gをセライト2.5 gと混合し、11 mLステンレスセルに充填した。抽出温度80°C、圧力1500 psi、抽出時間10分間の条件で抽出操作を2回繰り返し、得られた抽出液を25 mLに定容し、使用時までマイナス30°Cで保存した。50%エタノール抽出液は、既報¹⁸⁾ のとおり高速溶媒抽出装置 (Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extractor) または浸とう抽出法で得られたものを使用した。また、熱水および50%エタノール抽出液1 mLを遠心濃縮装置 (Savant SpeedVac SC210A, Thermo Fisher Scientific, Inc.) で減圧乾燥し、固形分を測定した。

2-2 アルブミン糖化阻害試験

アルブミン糖化阻害試験は、アルブミンとグルコースを用いる方法¹⁹⁾ を改変して行った。10.5 mg/mLウシ血清アルブミン (Fraction V, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, US) および1.05 Mグルコース (ナカライテスク株式会社、京都) を含むPBS (-) 溶液380 μLに生物試料の抽出液 20 μL (n=3) を加え、密閉して60°Cで3日間反応させた。生成したAGEsの蛍光強度を、マルチモードプレートリーダー (Synergy HTX, BioTek, VT, US) を用いて、励起波長355 nm、蛍光波長450 nmで測定した。陽性対照として1.0 mMアミノグアニジン (富士フィルム和光純薬株式会社、大阪) を使用した。アルブミン糖化阻害率は、以下の方法で算出した。

$$\text{阻害率(\%)} = [1 - (F_{\text{sample}} - F_{\text{blank}}) / (F_{\text{control}} - F_{\text{blank}})] \times 100$$

F_{sample} : 試料溶液を添加した反応混合物の蛍光強度

F_{control} : 試料溶液と同一の溶媒(水または50%エタノール)を添加した反応混合物の蛍光強度

F_{blank} : 試料溶液と同一の溶媒(水または50%エタノール)を添加し、反応させずに凍結保存した混合物の蛍光強度

糖化を50%阻害する濃度 (IC₅₀, mg/mL) は、以下の方法で算出した。段階的に希釈した生物素材抽出液を用いてアルブミン糖化阻害試験を行い、糖化を50%阻害する濃度 (mg/mL) を求め、これに各抽出液の固形分濃度 (mg/mL) を乗じた。

2-3 CMA生成阻害活性の評価

CMA生成阻害活性の評価は、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、品番AAS-AGE-K03、コスモ・バイオ株式会社、東京) を用い、製造元のプロトコールに従って以下の方法で行った。コラーゲンコートされた96 well plate の各ウェルに試料

溶液50 μL、グリオキサール溶液50 μLを添加し37°Cで7日間反応を行った。反応後は、各ウェルを洗浄用バッファ200 μLで3回洗浄しブロッキングバッファ200 μLを添加して1時間静置、洗浄用バッファ200 μLで3回洗浄し一次抗体100 μLを加えて1時間静置、洗浄用バッファ200 μLで3回洗浄しHRP標識二次抗体100 μLを加えて1時間静置、洗浄用バッファ200 μLで3回洗浄し発色液100 μLを加えて30分間静置、反応停止液100 μLを加えて発色を停止させた。各ウェルの吸光度 (450 nm) はマルチモードプレートリーダー (Synergy HTX) で測定し、陰性対照に対する吸光度を百分率で表した。試料溶液として生物試料の抽出液を終濃度 0.25~1.0 mg/mL (n=3) となるように希釈したもの、陽性対照として1.0 mMアミノグアニジン (n=3)、陰性対照として各抽出液と同一の溶媒 (n=3) を使用した。群間比較は Student's t-testを用い、危険率5%未満を有意水準とした。

3 実験結果および考察

3-1 アルブミン糖化阻害活性

アルブミン糖化を50%以上阻害した熱水抽出物および50%エタノール抽出物を表1および表2に示した。熱水抽出物では、935種類のうち20種類が50%以上の阻害活性を示し、中でもモモタマナがIC₅₀: 0.22 mg/mLと高い活性を示した。また、50%エタノール抽出物では、1315種類のうち297種類が50%以上の阻害活性を示し、オニヤブソテツ葉 (IC₅₀: 0.17 mg/mL)、カンキチク茎葉部 (IC₅₀: 0.21 mg/mL)、アデク葉 (IC₅₀: 0.23 mg/mL)、フクギ葉 (IC₅₀: 0.23 mg/mL) が高い活性を示した。

3-2 CMA生成阻害活性

アルブミン糖化阻害活性の比較的高い生物素材8種類について、CMA生成阻害作用を評価したところ、イタドリ地上部、アデク葉、フクギ葉、テリハノイバラ枝葉の50%エタノール抽出物がCMAの生成を抑えた (図1)。そのうちフクギ葉の50%エタノール抽出物 (1.0 mg/mL) は、1.0 mM アミノグアニジン (0.074 mg/mL) と同程度の阻害活性を示し、濃度を比較するとフクギ葉の50%エタノール抽出物は、アミノグアニジンの1/13程度のCMA生成阻害活性を有することが示唆された。一方でゲットウ花の50%エタノール抽出物 (0.5および1.0 mg/mL)、フクギ葉の50%エタノール抽出物 (0.5 mg/mL) は陰性対照よりもCMA生成量が高い値を示した。これらの抽出物はCMAの生成を促進する、若しくは固定化コラーゲンに抽出物が吸着することで高い吸光度を示した可能性があると考えられる。今後、LC/MS法によるCMAの定量を行い確認をする必要がある。

表1 熱水抽出物のアルブミン糖化阻害活性

和名(部位)	学名	濃度 (mg/mL)	阻害率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
ベニデマリ(葉)	<i>Ixora coccinea</i>	0.45	69	0.32
ビヨウヤナギ(葉)	<i>Hypericum chinense</i> var. <i>salicifolia</i>	0.38	67	0.28
モモタマナ(不明)	<i>Terminalia catappa</i>	0.27	63	0.22
ペパーミント(地上部)	<i>Mentha piperita</i>	0.35	62	0.27
ボチヨウジ(葉)	<i>Psychotria rubra</i>	0.34	57	n.d.
フウキマメ(茎葉)	<i>Mucuna pruriens</i>	0.29	54	n.d.
キレツチトリモチ(全草)	<i>Balanophora tobiracola</i>	0.63	53	n.d.
台湾モクゲンジ(葉)	<i>Koelreuteria elegans</i> var. <i>formosana</i>	0.31	53	n.d.
ハマホラシノブ(葉)	<i>Sphenomeris biflora</i>	0.37	53	n.d.
ゴレンシ(葉、枝、花)	<i>Averrhoa carambola</i>	0.33	52	n.d.
リュウガン(葉)	<i>Euphoria longan</i>	0.18	52	n.d.
リュウキュウツチトリモチ(全体)	<i>Balanophora fungosa</i>	0.61	52	n.d.
リュウキュウツチトリモチ(地上部)	<i>Balanophora fungosa</i>	0.70	52	n.d.
ギムネマ(不明)	<i>Gymnema sylvesta</i>	0.46	51	n.d.
ヒノキバヤドリギ(葉)	<i>Korthalsella japonica</i>	0.37	51	n.d.
ホウオウボク(葉)	<i>Delonix regia</i>	0.37	51	0.36
シマサルスベリ(葉、枝、実、花)	<i>Lagerstroemia subcostata</i>	0.25	50	n.d.
トックリヤシモドキ(種子)	<i>Mascarena verschaffeltii</i>	0.35	50	n.d.
ヒメムカシヨモギ(全草)	<i>Erigeron canadensis</i>	0.40	50	n.d.
フトモモ(葉)	<i>Syzygium jambos</i>	0.27	50	n.d.

n.d.: no data

表2 50%エタノール抽出物のアルブミン糖化阻害活性^a

和名	学名	濃度 (mg/mL)	阻害率 (%)	IC ₅₀ (mg/mL)
イタドリ(地上部)	<i>Polygonum cuspidatum</i>	1.80	87	0.39
フクギ(葉)	<i>Garcinia subelliptica</i>	1.02	87	0.24
カンキチク(茎葉)	<i>Muehlenbeckia platyclada</i>	1.02	86	0.21
モモタマナ(不明)	<i>Terminalia catappa</i>	0.90	84	0.27
ボチヨウジ(葉)	<i>Psychotria rubra</i>	1.33	83	1.22
ホウオウボク(葉)	<i>Delonix regia</i>	1.12	83	0.38
ユウゲシヨウ(全草)	<i>Oenothera rosea</i>	0.95	81	0.28
カニステル(葉)	<i>Lucuma nervosa</i>	0.98	80	0.33
マンゴー(葉)	<i>Mangifera indica</i>	0.94	80	0.35
バンジロウ(葉) ^a	<i>Psidium guajava</i>	1.53	79	0.67
台湾モクゲンジ(葉)	<i>Koelreuteria elegans</i> var. <i>formosana</i>	0.98	79	0.29
ベニデマリ(葉)	<i>Ixora coccinea</i>	0.95	79	0.27
イジュ(葉)	<i>Schima wallichii</i>	0.85	79	0.24
ゲットウ(花)	<i>Alpinia speciosa</i>	1.24	77	0.40
サボジラ(葉)	<i>Manilkara zapota</i>	0.74	77	0.28
ゲンノショウコ(葉)	<i>Geranium nepalense</i> var. <i>thunbergii</i>	1.18	76	0.93
ヤマモモ(樹皮)	<i>Myrica rubra</i>	0.56	76	0.24

キンミズヒキ (全草)	<i>Agrimonia Pilosa</i>	0.74	76	0.29
オキナワサルトリイバラ (葉)	<i>Smilax china</i> var. <i>kuru</i>	0.93	76	0.26
イジュ (葉)	<i>Schima wallichii</i>	0.83	76	0.30
ソウシジュ (葉)	<i>Acacia confusa</i>	0.91	76	0.58
インスリーナ (茎)	<i>Cissus sicyoides</i>	3.29	75	1.57
フトモモ (葉)	<i>Syzygium jambos</i>	0.90	75	0.26
リュウキュウツチトリモチ (葉)	<i>Balanophora fungosa</i>	1.44	75	0.62
オジギソウ (全草)	<i>Mimosa pudica</i>	0.85	75	0.45
オオゴチヨウ (葉)	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	0.96	75	0.45
ハッカ (地上部)	<i>Mentha arvensis</i> var. <i>piperascens</i>	1.35	74	0.72
ウスジロイソマツ (茎)	<i>Limonium wightii</i>	0.81	74	0.35
アカメガシワ (葉)	<i>Mallotus japonicus</i>	1.29	73	0.95
オオゴチヨウ (花)	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	1.51	73	0.63
ゴクラクチョウカ (花)	<i>Strelitzia reginae</i>	1.58	73	0.75
クサギ (茎葉)	<i>Clerodendrum trichotomum</i>	0.69	73	0.25
シラタマカズラ (実)	<i>Psychotria serpens</i>	0.87	73	0.32
キンミズヒキ (葉)	<i>Agrimonia pilosa</i>	0.83	73	0.33
リュウキュウナガエヒサカキ (葉)	<i>Adinandra ryukyuensis</i>	1.02	73	0.45
テリハノイバラ (枝、葉)	<i>Rosa wichuraiana</i>	0.53	73	0.24
ヤブツバキ (葉)	<i>Camellia japonica</i> var. <i>japonica</i>	0.72	72	0.36
ウコンイソマツ (茎根)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	1.80	72	0.51
タカサゴギク (不明)	<i>Blumea balsamifera</i>	0.80	72	0.27
オオフトモモ (葉)	<i>Syzygium samarangense</i>	0.77	72	0.31
シロバナノボタン (葉)	<i>Melastoma candidum</i>	0.75	72	0.32
リュウガン (葉)	<i>Euphoria longan</i>	0.70	72	0.30
レモンユーカリ (葉)	<i>Eucalyptus citriodora</i>	1.02	72	0.35
ヤエヤマヒルギ (葉)	<i>Rhizophora stylosa</i>	0.81	72	0.32
オオゴチヨウ (葉)	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	0.76	72	0.39
ヤマモモ (葉)	<i>Myrica rubra</i>	0.90	71	0.39
ウコンイソマツ (茎根)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	2.15	71	0.67
ナンテン (葉)	<i>Nandina domestica</i>	1.06	71	0.35
クマツヅラ (全草)	<i>Verbena officinalis</i>	1.20	70	0.76
ハマゴウ (葉)	<i>Vitex rotundifolia</i>	0.97	70	0.66
ベニバナ (花)	<i>Carthamus tinctorius</i>	1.76	70	0.67
ハマホラシノブ (葉)	<i>Sphenomeris biflora</i>	1.21	70	0.51
アデク (葉)	<i>Syzygium buxifolium</i>	0.63	70	0.23
オキナワサルトリイバラ (地上部)	<i>Smilax china</i> var. <i>kuru</i>	0.83	70	0.63
モクセンナ (花)	<i>Cassia surattensis</i>	1.35	69	0.63
シイクワシャー (果肉)	<i>Citrus depressa</i>	2.05	69	0.97
ウコンイソマツ (根茎)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	0.90	69	0.41
ヒメクマヤナギ (地上部)	<i>Berchemia lineata</i>	0.62	69	0.29
オヒルギ (花)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	1.11	69	0.58
シバニッケイ (葉)	<i>Cinamomum doederleinii</i>	0.48	69	0.32
ヒカンザクラ (葉)	<i>Prunus campanulate</i>	0.84	69	0.53
メヒルギ (葉)	<i>Kandelia candel</i>	1.00	69	0.39
ナンテン (葉)	<i>Nandina domestica</i>	1.36	68	0.75

モクマオウ (葉)	<i>Casuarina equisetifolia</i>	0.86	68	0.43
ギイマ (葉)	<i>Vaccinium wrightii</i>	1.27	68	0.40
カンキチク (葉)	<i>Muehlenbeckia platyclada</i>	0.81	68	0.41
タイワンフウ (葉)	<i>Liquidambar formosana</i>	0.91	68	0.57
マヤブシキ (葉)	<i>Sonneratia alba</i>	1.45	68	0.72
ハカマカズラ (地上部)	<i>Bauhinia</i> sp.	0.69	68	0.45
コバセンナ (花)	<i>Cassia coluteoides</i>	1.21	68	0.59
トウアズキ (葉)	<i>Abrus precatorius</i>	0.88	67	0.45
ロブスターユーカリ (葉)	<i>Eucalyptus robusta</i>	0.85	67	0.35
ゴクラクチョウカ (茎)	<i>Strelitzia reginae</i>	0.85	67	0.58
ハマイ (不明)	<i>Juncus haenkei</i>	0.92	67	0.71
ミツバハマゴウ (葉)	<i>Vitex trifolia</i>	0.80	67	0.46
ホルトノキ (葉)	<i>Elaeocarpus sylvestris</i>	0.85	67	0.53
ヒサカキ (葉)	<i>Eurya japonica</i>	0.66	67	0.37
ハマボツス (全草)	<i>Lysimachia mauritiana</i>	0.81	67	0.64
イカリソウ (不明)	<i>Epimedium brevicornum</i>	0.63	66	0.46
ウラジロガシ (葉)	<i>Quercus salicina</i>	0.63	66	0.42
オニヤブソテツ (葉)	<i>Cyrtomium falcatum</i>	0.54	66	0.17
ベニデマリ (花)	<i>Ixora coccinea</i>	1.54	66	0.68
ヒメムカシヨモギ (全草)	<i>Erigeron canadensis</i>	0.91	66	0.57
ギンギシ (全草)	<i>Rumex japonicus</i>	0.97	66	0.51
スズメノエンドウ (全草)	<i>Vicia hirsuta</i>	0.81	66	0.33
オキナワウラジロガシ (葉、枝)	<i>Quercus miyagii</i>	0.67	66	0.36
ヤブツバキ (実)	<i>Camellia japonica</i> var. <i>japonica</i>	0.63	66	0.37
リュウキュウガキ (実)	<i>Diospyros maritima</i>	0.90	66	0.42
タイワンカワラケツメイ (全草)	<i>Cassia mimosoides</i> subsp. <i>Leschenaultiana</i>	0.76	65	0.59
ベニヒモノキ (枝・葉・花)	<i>Acalypha hispida</i>	1.16	65	0.71
ハマザクロ (実)	<i>Sonneratia alba</i>	1.41	65	0.93
アレカヤシ (実)	<i>Chrysalidocarpus lutescens</i>	0.38	65	0.30
ゴレンシ (葉、枝、花)	<i>Averrhoa carambola</i>	1.03	65	0.48
シマサルスベリ (葉、枝、実、花)	<i>Lagerstroemia subcostata</i>	0.75	65	0.37
ウスジロイソマツ (茎)	<i>Limonium wightii</i>	0.75	65	0.36
スナズル (全草)	<i>Cassytha filiformis</i>	0.92	65	0.47
ウコンイソマツ (若葉と花)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	1.45	64	0.77
ゲットウ (葉)	<i>Alpinia speciose</i>	0.69	64	0.54
トックリヤシモドキ (花)	<i>Mascarena verschaffeltii</i>	1.86	64	1.57
サンシキアカリファ (葉)	<i>Acalypha wikesiana</i>	1.33	64	0.78
イボタクサギ (葉)	<i>Clerodendrum inerme</i>	0.94	64	0.66
シロバナノボタン (実)	<i>Melastoma candidum</i>	0.59	64	0.29
ペパーミント (地上部)	<i>Mentha piperita</i>	0.81	64	0.54
ヒルギモドキ (葉)	<i>Lumnitzera racemosa</i>	1.10	64	0.62
イスノキ (葉)	<i>Distylium racemosum</i>	0.76	64	0.36
フウキマメ (茎葉)	<i>Mucuna pruriens</i>	0.90	64	0.53
キダチアロエ (葉)	<i>Aloe arborescens</i>	0.92	63	0.79
サキシマスオウノキ (葉)	<i>Heritiera littoralis</i>	0.73	63	n.d.
ウコンイソマツ (若葉と花)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	1.37	63	0.67

エビスグサ (葉)	<i>Cassia obtusifolia</i>	0.81	63	0.35
ドクダミ (全草)	<i>Houttuynia cordata</i>	0.82	63	0.55
パイナップル (果実芯)	<i>Ananas comosus</i>	8.25	63	n.d.
イヌバンレイシ (葉)	<i>Annona glabra</i>	1.01	63	0.61
アカリファ (葉)	<i>Acalypha</i> sp.	1.11	63	0.79
ハリツルマサキ (全草)	<i>Maytenus deversifolia</i>	0.58	63	0.44
ホウロクイチゴ (茎葉)	<i>Rubus sieboldii</i>	0.72	63	0.53
クダモノケイソウ (葉)	<i>Passiflora edulis</i>	0.94	63	0.49
リュウキュウコクタン (葉)	<i>Diospyros egbert-walkerii</i>	0.70	63	0.49
ナンバンサイカチ (葉)	<i>Cassia fistula</i>	0.63	63	0.44
オトコヨモギ (全草)	<i>Artemisia japonica</i>	1.77	62	0.83
ヒオウギ (根)	<i>Belamcanda chinensis</i>	1.76	62	1.34
ハイゴシヨウ (地上部)	<i>Piper sarmentosum</i>	0.86	62	0.63
ハマザクロ (葉)	<i>Sonneratia alba</i>	1.07	62	0.80
クササンダンカ (茎葉)	<i>Pentas lanceolata</i>	0.58	62	0.35
ハマサルトリイバラ (地上部)	<i>Smilax sebeana</i>	0.76	62	0.51
ヘゴ (葉)	<i>Cyathea spinulosa</i>	1.44	61	1.05
シラタマカズラ (地上部)	<i>Psychotria serpens</i>	0.88	61	0.76
キンレイジュ (枝・葉)	<i>Tecoma stans</i>	0.99	61	0.78
パセリ (全草)	<i>Petroselinium crispum</i>	0.98	61	0.75
ムラサキカタバミ (全草)	<i>Oxalis corymbosa</i>	0.88	61	0.70
ハナチョウジ (葉、花、茎)	<i>Russeria juncea</i>	0.76	61	0.51
ナンバンサイカチ (葉)	<i>Cassia fistula</i>	0.61	61	0.44
アカメガシワ (茎)	<i>Mallotus japonicus</i>	0.54	60	0.50
ガマ (葉)	<i>Typha latifolia</i>	0.53	60	0.28
モクセンナ (葉)	<i>Cassia surattensis</i>	1.21	60	0.72
カタバミ (全草)	<i>Oxalis corniculata</i>	0.81	59	n.d.
ツルソバ (全草)	<i>Polygonum chinense</i>	0.81	59	0.65
ウスジロイソマツ (地上部)	<i>Limonium wightii</i>	0.45	59	0.37
アマチャヅル (葉)	<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	3.37	59	n.d.
ジュズダマ (葉)	<i>Coix lachryma-jobi</i>	1.94	59	1.00
イタリアンパセリ (地上部)	<i>Petroselinium crispum</i>	1.10	59	0.71
フカノキ (葉)	<i>Schefflera heptaphylla</i>	0.54	59	0.46
クフェア (全草)	<i>Cuphea hyssopifolia</i>	3.10	59	2.20
アカバナヒルギ(オヒルギ) (葉)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	0.78	59	0.52
ジュンケイボク (葉)	<i>Peltophorum pterocarpum</i>	0.97	59	0.74
ボロジノニシキソウ (地上部)	<i>Euphorbia sparmannii</i>	1.02	59	0.80
アカメガシワ (葉、枝)	<i>Mallotus japonicus</i>	1.10	59	0.87
コバセンナ(コバノセンナ) (葉)	<i>Cassia coluteoides</i>	0.69	59	0.41
イタドリ (根茎)	<i>Polygonum cuspidatum</i>	0.54	58	0.44
クチナシ (葉)	<i>Gardenia jasminoides</i>	0.90	58	n.d.
コノテガシワ (枝・葉)	<i>Platyclusus orientalis</i>	1.06	58	n.d.
センダン (葉)	<i>Melia azedarach</i>	1.19	58	n.d.
ゴクラクチョウカ (茎)	<i>Strelitzia reginae</i>	1.27	58	1.18
オオイタビ (葉)	<i>Ficus pumila</i>	0.61	58	0.50
インゲンマメ (種皮)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.60	58	0.55

オオカナメモチ (葉)	<i>Photinia serratifolia</i>	1.72	58	1.64
クチナシ (実)	<i>Gardenia jasminoides</i>	1.48	58	1.30
アカテツ (葉)	<i>Planchonella obovata</i>	0.72	58	0.58
ケナフ (葉)	<i>Hibiscus cannabinus</i>	0.97	58	0.90
マルバハッカ (地上部)	<i>Mentha suaveolens</i>	0.67	58	0.49
イワダイゲキ (地上部)	<i>Euphorbia jolkinii</i>	1.16	58	n.d.
シダレヤナギ (葉)	<i>Salix babylonica</i>	1.58	58	1.33
キク(輪ギク) (花)	<i>Dendranthema grandiflorum</i>	0.72	58	0.68
オオアレチノギク (全草)	<i>Conyza sumatrensis</i>	0.97	58	0.92
アカメガシワ (葉)	<i>Mallotus japonicus</i>	1.03	58	0.78
シソ (葉)	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>	0.79	57	0.62
サンショウ (枝葉(実含))	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	0.79	57	n.d.
オトコヨモギ (全草)	<i>Artemisia japonica</i>	1.79	57	1.26
インゲンマメ (種皮)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.59	57	0.47
シイクワシャー (果肉)	<i>Citrus depressa</i>	1.24	57	1.09
シソ (葉)	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i>	0.72	57	0.50
ナンゴクスサスギカズラ (地上部)	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	1.16	57	1.02
リュウキュウハギ (茎葉)	<i>Lespedeza liukiensis</i>	0.68	57	0.59
ハマゴウ (葉)	<i>Vitex rotundifolia</i>	1.24	57	1.23
ハタガヤ (茎・茎頂)	<i>Bulbostylis barbata</i>	0.45	57	0.39
ジンジャーミント (地上部)	<i>Mentha gentilis</i>	0.91	57	0.83
センチピードグラス (全草)	<i>Eremochloa ophiuroides</i>	0.63	57	0.57
ムラサキウマゴヤシ (全草)	<i>Medicago sativa</i>	0.89	57	0.76
ハハコグサ (全草)	<i>Gnaphalium affine</i>	0.69	57	0.67
コウキヤガラ (全草)	<i>Scirpus maritimus</i>	0.87	57	0.50
クサトケイソウ (地上部)	<i>Passiflora foetida</i> var. <i>hispida</i>	0.95	57	0.79
ナンゴクネジバナ (地上部)	<i>Spiranthes sinensis</i>	1.41	57	1.16
ネコノヒゲ (地上部)	<i>Orthosiphon aristatus</i>	1.18	56	n.d.
リュウキュウイトバショウ (葉)	<i>Musa balbisana</i>	0.89	56	n.d.
リュウキュウアイ (地上部)	<i>Baphicacanthus cusia</i>	1.06	56	0.84
ギムネマ (不明)	<i>Gymnema sylvesta</i>	0.88	56	n.d.
ハトムギ (葉)	<i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i>	0.76	56	n.d.
ウスジロイソマツ (地上部)	<i>Limonium wightii</i>	0.43	56	0.37
アカメガシワ (茎)	<i>Mallotus japonicus</i>	0.61	56	n.d.
ハマノエノコロ (地上部)	<i>Setaria virides</i> var. <i>pachystachys</i>	0.49	56	0.43
シロガラシ (全草)	<i>Brassica hjeta</i>	0.88	56	0.82
ハマセンナ (葉)	<i>Ormocarpum cochinchinense</i>	0.69	56	0.54
ヒノキバヤドリギ (葉)	<i>Korthalsella japonica</i>	0.92	56	0.54
アカメガシワ (実)	<i>Mallotus japonicus</i>	0.82	56	0.67
ギンネム (葉)	<i>Leucaena leucocephala</i>	0.91	56	n.d.
モクセンナ (葉)	<i>Cassia surattensis</i>	0.93	55	0.52
カワラヨモギ (全草)	<i>Artemisia capillaris</i>	1.34	55	1.14
シチヘンゲ (茎葉)	<i>Lantana camara</i>	0.80	55	0.69
ガジュマル (気根)	<i>Ficus microarpa</i>	0.53	55	0.43
ハマササゲ (葉)	<i>Vigna marina</i>	1.02	55	n.d.
ナンキョウ (根茎)	<i>Alpinia galangal</i>	1.02	55	0.39

バルバドスチエリー (葉)	<i>Malpighia glabra</i>	0.89	55	0.76
イタジイ (葉)	<i>Costanoposis sieboldii</i>	0.62	55	n.d.
ガマ (穂)	<i>Typha latifolia</i>	0.38	55	0.30
アワユキセンダングサ (全草)	<i>Bidens pilosa</i> var. <i>radiata</i>	1.17	55	1.08
コバセンナ (葉、花、枝)	<i>Cassia coluteoides</i>	0.90	55	0.81
ツルグミ (葉)	<i>Elaeagnus glabra</i>	0.88	54	0.81
ビワ (葉)	<i>Eriobotrya japonica</i>	0.95	54	n.d.
ウコンイソマツ (葉)	<i>Limonium wightii</i> var. <i>luteum</i>	1.30	54	1.20
ボックセージ (地上部)	<i>Salvia uliginosa</i>	0.59	54	0.55
エンペラーズミント (地上部)	<i>Micromeria</i> sp.	0.73	54	n.d.
ダンドボロギク (全草)	<i>Erechtites hieracifolia</i>	0.88	54	n.d.
ヤグガサウラボウシ (葉)	<i>Dipteris conjugata</i>	0.84	54	0.70
シチヘンゲ (葉)	<i>Lantana camara</i>	1.13	53	1.08
ヘチマ (葉)	<i>Luffa cylindrica</i>	0.76	53	0.72
オオバコ (不明)	<i>Plantago asiatica</i>	0.75	53	n.d.
ホソバワダン (葉)	<i>Crepidiastrum lanceolatum</i>	5.58	53	3.93
オキナワハイネズ (葉)	<i>Juniperus taxifolia</i> var. <i>lutchuensis</i>	0.70	53	n.d.
ビロウ (実)	<i>Livistona chinensis</i> var. <i>Subglobosa</i>	0.52	53	0.41
オヒルギ (葉)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	0.96	53	n.d.
タイミンタチバナ (葉)	<i>Myrsine seguinii</i>	0.66	53	0.63
アキノノゲシ (全草)	<i>Lactuca indica</i>	0.79	53	n.d.
アカミズキ (葉)	<i>Wendlandia formosana</i>	0.68	53	0.62
マンリョウ (葉)	<i>Ardisia chinensis</i>	1.03	53	0.99
クロバイ (葉)	<i>Symplocos prunifolia</i>	0.74	53	0.69
メドハギ (茎葉)	<i>Lespedeza cuneate</i>	0.61	53	n.d.
ネズミモチ (葉)	<i>Ligustrum japonicum</i>	0.46	52	n.d.
セイロンベンケイ (全草)	<i>Kalanchoe pinnata</i>	0.57	52	n.d.
モンパノキ (葉)	<i>Messerschmidia argentea</i>	0.65	52	0.62
オオイタビ (葉)	<i>Ficus pumila</i>	0.55	52	n.d.
イワダレソウ (地上部)	<i>Phyla nodiflora</i>	0.70	52	0.67
ベニデマリ (実)	<i>Ixora coccinea</i>	0.67	52	n.d.
ミズガンピ (地上部)	<i>Pemphis acidula</i>	0.41	52	n.d.
キク (花)	<i>Dendranthema grandiflorum</i>	1.21	52	n.d.
ウラジロエノキ (葉)	<i>Trema orientalis</i>	0.59	52	0.24
ナンキンハゼ (葉、枝)	<i>Sapium sebierum</i>	0.87	52	0.84
ミツバハマゴウ (葉、枝、実、花)	<i>Vitex trifolia</i>	0.86	52	0.80
ハマナス (不明)	<i>Rosa rugosa</i>	0.70	51	n.d.
ガジュマル (葉)	<i>Ficus microcarpa</i>	0.85	51	0.57
パイナップル (冠芽)	<i>Ananas comosus</i>	0.64	51	n.d.
ザボン (葉)	<i>Citrus grandis</i>	0.80	51	n.d.
シャリンバイ (葉)	<i>Rhaphiolepis indica</i>	0.89	51	0.85
アメリカフウロ (全草)	<i>Geranium carolinianum</i>	0.98	51	n.d.
ベニバナボロギク (全草)	<i>Crassocephalum crepidioides</i>	0.74	51	n.d.
カユブテ (葉、枝)	<i>Melaleuca leucadendra</i>	0.73	51	0.66
シマニシキソウ (全草)	<i>Euphorbia hirta</i>	0.81	51	n.d.
シロバナミヤコグサ (全草)	<i>Loutus australis</i>	0.87	51	n.d.

ナガバハリフタムグラ (地上部)	<i>Borreria laevis</i>	0.59	51	n.d.
タイワンイチビ (地上部)	<i>Abutilon asiaticum</i>	0.51	50	n.d.
シダレヤナギ (枝・葉)	<i>Salix babylonica</i>	0.51	50	n.d.
ヒレザンショウ (葉)	<i>Zanthoxylum beecheyanum</i>	0.85	50	n.d.
キランソウ (不明)	<i>Ajuga decumbens</i>	0.32	50	n.d.
チシャノキ (葉)	<i>Ehretia acuminata</i> var. <i>obovata</i>	0.57	50	n.d.
タイム (地上部)	<i>Thymus vulgaris</i>	0.52	50	n.d.
エゾヨモギギク (地上部)	<i>Tanacetum vulgare</i>	0.72	50	n.d.
ストレッチア (葉)	<i>Strelitzia reginae</i>	0.49	50	n.d.
コパセンナ (茎葉)	<i>Cassia coluteoides</i>	0.93	50	n.d.
ヤエヤマアオキ (根)	<i>Morinda citrifolia</i>	0.73	50	0.68
フトボナガボソウ (葉、茎、蕾、花)	<i>Stachytarpheta jamaicensis</i>	0.86	50	n.d.

^a 栽培時期、栽培条件が異なる 39 種類のサンプルの平均値を示した

n.d.: no data

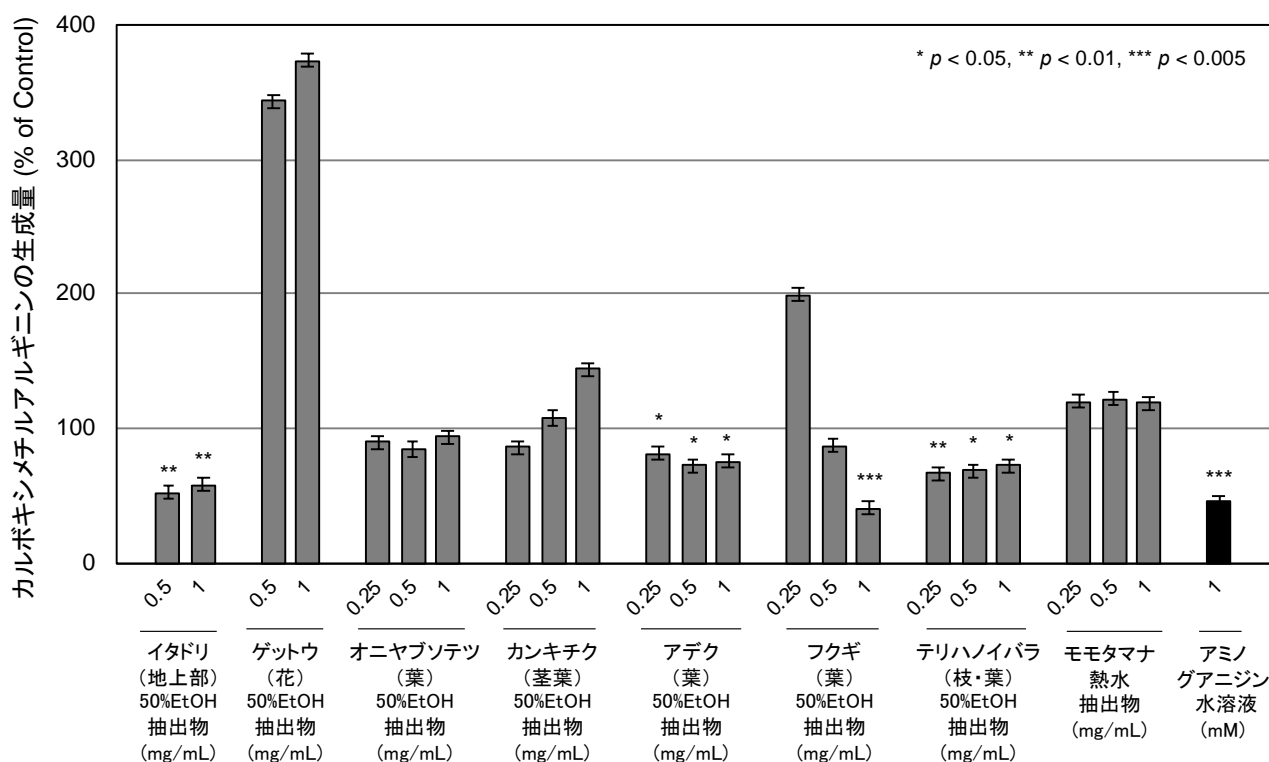


図 1 カルボキシメチルアルギニン (CMA) 生成阻害活性

4 まとめ

生物資源ライブラリに収録されている935種類の熱水抽出液および1315種類の50%エタノール抽出液を対象に、グルコースによるアルブミンの糖化阻害活性を調べたところ、モモタマナの熱水抽出物およびオニヤブソテツ葉、カンキチク茎葉部、アデク葉およびフクギ葉の50%エタノール抽出物が高い活性を示した。また、イタドリ地上部、アデク葉、フクギ葉、テリハノイバラ枝・葉の50%エタノール抽出物が、グリオキサールによるコラーゲン

の糖化に伴うCMAの生成を抑えることが明らかとなった。

フクギは、街路樹や公園等の植栽として栽培されている樹木であり、産業的に利用し易い生物資源であると考えられる。実際にフクギと同属のガルシニア属植物 (*G. mangostana*, *G. hanburyi* および *G. gardneriana*) は、炎症性疾患の伝統的治療薬として世界の各地で用いられており、フクギの抽出物もマウスマクロファージにおいて抗炎症作用を示すことが明らかとなっている²⁰⁾。また、フクギの葉には抗酸化能を有するキサントン類²¹⁾ やフク

ゲチン²²⁾、などを含むことが報告されている。今後はこれらの化合物がコラーゲン糖化によるCMAの生成を抑制するか検討を行う必要がある。

本研究は「QOL維持・向上寄与物質の探索（2015技002）」の一環として行ったものである。

参考文献

- 1) Maillard, L.C., Action of Amino Acids on Sugars. Formation of Melanoidins in a Methodical Way, *C. R. Acad. Sci.* **1912**, 154, 66–68.
- 2) Hodge, J.E., Chemistry of Browning Reaction in Model Systems, *J. Agric. Food Chem.*, **1953**, 1 (15), 928–943.
- 3) Hormel, S.E.; Eyre, D.R., Collagen in the Ageing Human Intervertebral Disc: An Increase in Covalently Bound Fluorophores and Chromophores, *Biochem. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, **1991**, 1018 (2), 243–250. doi: 10.1016/0167-4838(91)90565-H
- 4) Yamamoto, S.; Ishiwatari, R., A Study of the Formation Mechanism of Sedimentary Humic Substances. III. Evidence for the Protein-Based Melanoidin Model, *Science of The Total Environment*, **1992**, 117–118, 279–291. doi: 10.1016/0048-9697(92)90095-A
- 5) 早瀬文孝, メイラード反応による活性酸素の生成と消去, *日本油化学会誌*, **1997**, 46 (10), 1137–1145. doi: 10.5650/jos1996.46.1137
- 6) Langner, E.; Rzeski, W., Biological Properties of Melanoidins: A Review, *Int. J. of Food Properties*, **2014**, 17 (2), 344–353. doi: 10.1080/10942912.2011.631253
- 7) 岡田瑞恵; 岡田悦政, 終末糖化産物(AGEs)と AGEs 受容体(RAGE), *愛知県立大学看護学部紀要*, **2016**, 22, 9–16.
- 8) 山本靖彦; 棟居聖一; 糖化制御と生活習慣病の予防, *日本食生活誌*, **2015**, 25 (4), 237–240. doi: 10.2740/jisdh.25.237
- 9) Verzijl, N.; DeGroot, J.; Thorpe, S.R.; Bank, R.A.; Shaw, J.N.; Lyons, T.J.; Bijlsma, J.W.; Lafeber, F.P.; Baynes, J.W.; TeKoppele, J.M., Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (50) 39027–39031.
- 10) Sivan, S.S.; Wachtel, E.; Tsitron, E.; Sakke, N.; van der Ham, F.; Degroot, J.; Roberts, S.; Maroudas, A., Collagen Turnover in Normal and Degenerate Human Intervertebral Discs as Determined by the Racemization of Aspartic Acid, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283 (14), 8796–8801.
- 11) Hudson, D.M.; Archer, M.; King, K.B.; Eyre, D.R., Glycation of Type I Collagen Selectively Targets the Same Helical Domain Lysine Sites as Lysyl Oxidase-mediated Cross-linking, *J. Biol. Chem.* **2018**, 293 (40), 15620–15627. doi: 10.1074/jbc.RA118.004829
- 12) Bansode, S.; Bashtanova, U.; Li, R.; Clark, J.; Müller, K.H.; Puszkarska, A.; Goldberga, I.; Chetwood, H.H.; Reid, D.G.; Colwell, L.J.; Skepper, J.N.; Shanahan, C.M.; Schitter, G.; Mesquida, P.; Duer, M.J., Glycation Changes Molecular Organization and Charge Distribution in Type I Collagen Fibrils, *Sci. Rep.s*, **2020**, 10 (1), 3397. doi: 10.1038/s41598-020-60250-9
- 13) Shimasaki, S.; Kubota, M.; Yoshitomi, M.; Takagi, K.; Suda, K.; Mera, K.; Fujiwara, Y.; Nagai, R., N^ω-(carboxymethyl)arginine Accumulates in Glycated Collagen and Klotho-deficient Mouse Skin. *Anti-Aging Medicine*, **2011**, 8 (6), 82–87. doi: 10.3793/jaam.8.82
- 14) Kinoshita, S.; Mera, K.; Ichikawa H.; Shimasaki, S.; Nagai, M.; Taga, Y.; Iijima, K.; Hattori, S.; Fujiwara, Y.; Shirakawa, J.I.; Nagai, R., N^ω-(Carboxymethyl) Arginine is One of the Dominant Advanced Glycation End Products in Glycated Collagens and Mouse Tissues, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**. 9073451. doi: 10.1155/2019/9073451
- 15) Iijima, K.; Murata, M.; Takahara, H.; Irie, S.; Fujimoto, D. Identification of N^ω(omega)-carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen, *Biochem. J.* **2000**, 347 (1) 23–27. doi: 10.1042/bj3470023
- 16) Yamaguchi, Y.; Kishi, A.; Kohama, K., Relative Estimation of Food Functionality of Agricultural Products Harvested in Iwate Prefecture : Application of Novel Assay for Glycosylation Process Inhibit Activity, *Research bulletin of the IwateIndustrial Research Institute*, **2004**, 15–18.
- 17) Yagi, M.; Takabe, W.; Matsumi, S.; Shimode, A.; Maruyama, T.; Yonei, Y., Screening and Selection of Anti-Glycative Material: Kuromoji (*Lindera umbellata*), *Glycative Stress Research*, **2017**, 4, 317–328.
- 18) 豊川哲也, 鎌田靖弘, 与座江利子, 県産資源を活用した機能性食品素材の開発, *沖縄県工業技術センター研究報告*, **2000**, 35–57.
- 19) Matsuura, N.; Aradate, T.; Sasaki, C.; Kojima, H.; Ohara, M.; Hasegawa, J.; Ubukata, M. Screening System for the Maillard Reaction Inhibitor from Natural Product Extracts, *Journal of Health Science*, **2002**, 48 (6), 520–526, doi: 10.1248/jhs.48.520
- 20) Cho, Y.-C.; Cho, S., c-Jun N-terminal Kinase-mediated

Anti-inflammatory Effect of *Garcinia subelliptica* in macrophages, *Molecular Medicine Reports*, **2016**, *13* (3), 2293–2300.

- 21) Minami, H.; Takahashi, E.; Fukuyama, Y.; Kodama, M.; Yoshizawa, T.; Nakagawa, K., Novel Xanthonones with Superoxide Scavenging Activity from *Garcinia subelliptica*, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43* (2), 347–349
- 22) Kobayashi, H.; Yamauchi, R.; Minami, I.; Kajiya, A.; Nagafuji, S.; Ishikawa, H., Antioxidant and Antibacterial Capacities of Fukugetin and Xanthonones from Fukugi (*Garcinia subelliptica*), *Food Preserv. Sci.*, **2018**, *44* (1), 3–8.

Screening of Okinawan Bioresources to Suppress Protein Glycation

Takayuki OGI, Arina MATSUMOTO, Yukiko KITAGAWA*¹, Susumu MARUYAMA*¹

Okinawa Industrial Technology Center

*¹Former affiliation : Okinawa Industrial Technology Center

Protein glycation is non-enzymatically promoted by carbonyl compounds, such as glucose, and is associated with the progression of age-related diseases. For the purpose of searching for functional materials that suppress protein glycation, we targeted 935 types of hot water extracts and 1315 types of 50% ethanol extracts included in the biological resource library owned by the Center. When a 20-fold diluted solution of each extract was screened for a biological material that suppresses the glycation of serum albumin by glucose, 20 types of hot water extracts and 297 types of 50% ethanol extracts demonstrated greater than 50% inhibition. Among them, the hot water extract of *Terminalia catappa* (IC₅₀: 0.22 mg / mL) and 50% ethanol extract of *Cyrtomium falcatum* leaf (IC₅₀: 0.17 mg / mL), *Muehlenbeckia platyclada* stem and leaf (IC₅₀: 0.21 mg / mL), *Syzygium buxifolium* leaf (IC₅₀: 0.23 mg / mL), and *Garcinia subelliptica* leaf (IC₅₀: 0.23 mg / mL) exhibited high activity. In addition, the 50% ethanol extract of *Garcinia subelyptica* leaf and *Persicaria genus* ground part had inhibitory effects on the production of carboxymethyl arginine associated with collagen glycation.