

Original article

Anti-glycative stress effect of yogurt whey

Fuka Okuda, Masayuki Yagi, Wakako Takabe, Kaori Ishizaki, Chieko Sakiyama,
Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2019; 6 (4): 230-240
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

ヨーグルトホエイの糖化ストレス抑制作用

奥田風花、八木雅之、高部稚子、石崎 香、崎山智恵子、米井嘉一

同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター・
糖化ストレス研究センター

抄録

【目的】糖化反応は、還元糖が生体内の蛋白質のアミノ基と非酵素的に結合し、糖化最終生成物 (advanced glycation end products : AGEs) の生成に至る反応である。AGEs は加齢とともに身体の様々な組織・臓器に蓄積して炎症や着色、生理的機能低下を引き起こし、生活習慣病の発症や進展に関与する。本研究は、ヨーグルトホエイの糖化ストレス抑制作用を検証した。

【方法】実験には市販のプレーンヨーグルトから遠心分離によってホエイを回収して使用した。糖化反応抑制作用は、ホエイをヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) -Glucose 糖化反応モデルに添加後、加熱反応させ、蛍光性 AGEs、ペントシジン、*N*^ε-Carboxymethyllysine (CML)、糖化反応中間体生成抑制作用を測定した。カルボニル化蛋白生成抑制作用は、HSA-Acrolein 反応モデルにホエイを添加後、加熱反応させて検証した。抗酸化作用は DPPH 法により測定した。AGEs 架橋形成阻害作用は、Lysozyme-Fructose 糖化架橋モデルにホエイを添加後、加熱反応させ、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により評価した。皮膚の糖化反応抑制作用は、ブタ皮糖化モデルにホエイを添加後、蛋白抽出し、AGEs 生成抑制作用、黄ばみ抑制作用を検証した。

連絡先：教授 八木雅之
同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／
糖化ストレス研究センター
〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3
TEL & FAX : 0774-65-6394
E-mail : myagi@mail.doshisha.ac.jp
共著者：奥田風花 ctuc2017@mail4.doshisha.ac.jp ;
高部稚子 wtakabe@mail.doshisha.ac.jp ; 石崎 香 ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp ;
崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp ; 米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2019; 6 (4): 230-240
本論文を引用する際はこちらを引用してください。
(c) Society for Glycative Stress Research

【結果】 ホエイは蛍光性 AGEs、ペントシジン、CML の生成を強く抑制し（抑制率平均値：50.0%, 82.3%, 64.9%）、糖化反応中間体である glyoxal と methylglyoxal の生成も抑制した（抑制率平均値：48.6%, 56.8%）。また、ホエイは弱い DPPH ラジカル消去活性を有し、皮膚蛋白の AGEs 生成および黄ばみ（黄色化）を抑制した。さらに、ホエイはフルクトースによる lysozyme の AGEs 化重合を抑制した。

【結論】 ホエイは糖化反応抑制作用、AGEs 架橋形成阻害作用および抗酸化作用を有し、糖化ストレス抑制作用を有する食品であることが示唆された。

KEY WORDS: ヨーグルト、ホエイ、糖化、糖化最終生成物（advanced glycation end products: AGEs）

はじめに

グルコースやフルクトースなどの還元糖は、生命活動において必要不可欠な栄養素である。しかし、これらの還元糖は、生体内の蛋白質のアミノ基と非酵素的に結合する。この反応は糖化反応と呼ばれ、糖化反応中間体産生を経て糖化最終生成物（advanced glycation end products: AGEs）の生成に至る¹⁾。AGEs は加齢とともに身体の様々な組織・臓器に蓄積して炎症や着色、生理的機能低下を引き起こし、糖尿病合併症や眼疾患²⁾、皮膚老化³⁾、骨粗鬆症⁴⁾、アルツハイマー型認知症⁵⁾、動脈硬化症⁶⁾などの生活習慣病の発症や進展に関与する。糖化反応による老化や疾患リスクの一連の概念は糖化ストレスと呼ばれている。近年、糖化ストレスは老化を促進する危険因子の一つであるとされている。

ヨーグルトは牛乳などのミルクに乳酸菌や酵母などを添加して発酵させた食品である。乳酸菌を使った発酵食品には、腸内環境改善作用、発癌リスク低減作用、免疫調節作用、血圧降下作用などの機能が既に報告されている⁷⁾。

糖化ストレスの抑制には、高血糖の抑制、糖化反応の抑制、糖化反応生成物の分解・排泄などが挙げられる⁸⁾。我々は既にヨーグルトの上清（ホエイ）に糖化反応抑制作用があることを報告した⁹⁾。本研究ではヨーグルトホエイの糖化ストレス抑制作用に着目し、糖化反応抑制作用、カルボニル化蛋白生成抑制作用、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカル消去活性、 α -グルコシダーゼ阻害作用、ブタ皮糖化モデルにおける AGEs 生成抑制作用および黄ばみ抑制作用、蛋白架橋形成阻害作用を検証した。

方法

(1) 試薬

糖化反応のモデル蛋白は、ヒト血清アルブミン (human serum albumins: HSA, lyophilized powder, $\geq 96\%$, agarose gel electrophoresis) を Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, USA) から購入して使用した。その他の試薬は特級または HPLC グレードのものを富士フィルム和

光純薬株式会社（大阪府大阪市）またはナカライテスク株式会社（京都府京都市）から購入して使用した。

(2) 試料の調製

プレーンヨーグルトは京都府内のスーパーマーケットで 19 種類を購入した (Table 1)。ヨーグルトを製品の容器中で十分に攪拌した後、50 mL チューブに移した。その後、20°C、3,000rpm、15 分間遠心分離し、ホエイ (上清部) を実験に用いた。ホエイの固形分濃度 [mg/mL] は、3 mL のホエイをアルミトレイにのせ、120°C、120 分間の乾燥前後で重量測定し算出した。実験には固形分濃度が 50 mg/mL になるように精製水で調製して使用した。乳酸は精製水で 10 mg/mL に調製した。aminoguanidine (AG) は精製水で 1 mg/mL に調製した。acarbose は精製水で 3.3 mg/mL に調製した。

(3) 糖化反応抑制作用の検証

糖化反応抑制作用の検証にはヒト血清アルブミン-グルコース (HSA-Glucose) 糖化反応モデルを使用した¹⁰⁾。糖化反応液は、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4)、2.0 mol/L glucose、40 mg/mL HSA を調製した後、それぞれ終濃度 0.05 mol/L、0.2 mol/L、8 mg/mL、試料を 1/10 濃度になるよう添加した。その後、糖化反応液を 60°C で 40 時間反応させた後、マイクロプレートリーダーで AGEs 由来蛍光 (励起波長 370 nm/ 検出波長 440 nm) を測定した。対照 (reference: ref) は、ホエイの代わりに等量の精製水を加え、同条件で反応させた。蛍光性 AGEs 生成抑制作用の陽性対照には AGEs 生成阻害剤として知られている AG 1 mg/mL を試料と同量加えたものを使用した。蛍光値は 5 μ g/mL quinine sulfate の蛍光値を 1,000 としたときの相対値として算出した。蛍光性 AGEs 生成抑制率は以下の式に基づいて算出した。

蛍光性 AGEs 生成抑制率 (%)

$$= 100 - \{(\text{sample Glucose}(+) - \text{sample Glucose}(-)) / (\text{ref Glucose}(+) - \text{ref Glucose}(-)) \times 100\}$$

ペントシジンは、糖化反応終了後、反応液を塩酸加水分解し、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した^{11,12)}。

Table 1. Yogurt profile.

| No | Product name | Manufacturer / Seller | Characteristics |
|----|--------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Bulgaria yogurt | Meiji (Tokyo, Japan) | LB81 (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2038, <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131) |
| 2 | Bifidus plain yogurt | Morinaga Milk Industry (Tokyo, Japan) | <i>Bifidobacterium longum</i> BB536 |
| 3 | Bifidus plain yogurt fat zero | Morinaga Milk Industry (Tokyo, Japan) | <i>Bifidobacterium longum</i> BB536 |
| 4 | Caspian sea yogurt | Fujicco (Kobe, Japan) | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> FC |
| 5 | Koiwai namanyu 100% yogurt | Koiwai Dairy Products (Tokyo, Japan) | <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 |
| 6 | Nature megumi plain yogurt | Megmilk Snow Brand (Tokyo, Japan) | <i>Lactobacillus gasseri</i> SP, <i>Bifidobacteria</i> SP |
| 7 | Nature megumi fat zero plain yogurt | Megmilk Snow Brand (Tokyo, Japan) | <i>Lactobacillus gasseri</i> SP, <i>Bifidobacteria</i> SP |
| 8 | BifiX yogurt | Ezaki Glico (Osaka, Japan) | <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> GCL2505 |
| 9 | Rakunou yogurt low fat plain | Nippon Dairy (Osaka, Japan) | <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 |
| 10 | TOPVALU probiotics plain yogurt | AEON | <i>Bifidobacteria</i> , <i>Casei bacteria</i> , <i>Acidophilus</i> |
| 11 | Meiji probio yogurt LG21 sugar zero | Meiji (Tokyo, Japan) | <i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716 |
| 12 | Meiji probio yogurt R-1 sugar zero | Meiji (Tokyo, Japan) | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1 |
| 13 | TOPVALU greek yogurt plain | AEON | <i>Thermophilus</i> , <i>Bulgaricus</i> |
| 14 | TOPVALU plain yogurt | AEON | <i>Thermophilus</i> , <i>Bulgaricus</i> |
| 15 | TOPVALU low fat probiotics plain yogurt | AEON | <i>Bifidobacteria</i> , <i>Casei bacteria</i> , <i>Acidophilus</i> |
| 16 | TOPVALU raw milk 100% plain yogurt | AEON | <i>Bifidobacteria</i> , <i>Acidophilus</i> , <i>Thermophilus</i> , <i>Bulgaricus</i> |
| 17 | Rakuren plain yogurt | Shikoku Nyugyo (Ehime, Japan) | <i>Thermophilus</i> , <i>Bulgaricus</i> |
| 18 | Bulgaria yogurt luxury creamy raw milk 100 plain | Meiji (Tokyo, Japan) | LB81 (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2038, <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131) |
| 19 | Bulgaria yogurt fat zero | Meiji (Tokyo, Japan) | LB81 (<i>Lactobacillus bulgaricus</i> 2038, <i>Streptococcus thermophilus</i> 1131) |

CML は、HSA-Glucose 糖化反応モデルにホエイを終濃度 0.5 mg/mL とするよう添加し、糖化反応終了後、反応液中に生成された CML を測定キット (CircuLex CML/Ne-(carboxymethyl) lysine、MBL、名古屋) を使用して、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で測定した。

糖化反応中間体は、糖化反応終了後、反応液中に生成された 3-deoxyglucosone (3DG)、glyoxal (GO)、methylglyoxal (MGO) を 2,3-diaminonaphthalen (DAN) プレラベル化逆相 HPLC により定量した¹³⁾。

(4) カルボニル化蛋白生成抑制作用の検証

0.1 mol/L リン酸緩衝液、0.1 mol/L アクロレイン (acrolein)、40 mg/mL HSA を調製した。これらを終濃度 0.05 mol/L リン酸緩衝液、0.01 mol/L acrolein、8 mg/mL

HSA となるよう HSA-Acrolein 反応モデルを作製し、ホエイを終濃度 25 mg/mL とするよう添加した。また、陽性対照として AG を終濃度 0.5 mg/mL とするよう添加した。HSA-Acrolein 反応モデルを 37°C で 2 時間反応させた後、DNPH Alkaline 法^{14,15)}により反応液中に生成されたカルボニル化蛋白量を 450 nm の吸光度によって測定した。DNPH Alkaline 法は、DNPH を蛋白のカルボニル基に結合させ、蛋白ヒドラゾンを形成させた後に、NaOH を添加しアルカリ性にする事で、ヒドラゾン化蛋白の極大吸収波長を 450 nm にシフトさせ、測定する方法である。

(5) DPPH ラジカル消去活性の検証

DPPH ラジカル消去活性は、Trolox を標準物質としてその相当量を算出する方法で測定した^{16,17)}。96 穴プレート

に Trolox 0 ~ 16 nmol/assay と試料 25 ~ 100 μ L/assay を分注し、200 mmol/L MES 緩衝液、800 μ mol/L DPPH 溶液を添加し室温で 20 分間反応後、プレートリーダーで 520 nm の吸光度を測定した。DPPH ラジカル消去活性は Trolox で作成した回帰直線の傾きを用いて、試料の添加量に相当する Trolox 量として求めた。

(6) α -グルコシダーゼ阻害作用の検証

α -グルコシダーゼ阻害作用は、ラット小腸由来の α -グルコシダーゼと p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG) を使用して測定した¹⁸⁾。50 mmol/L リン酸緩衝液 (100 mmol/L NaCl を含む、pH 7.0)、7 mmol/L p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG)、0.5 mol/L Tris を調製した。 α -グルコシダーゼは、ラット小腸アセトンパウダー (佐々木化学薬品、京都) を 50 mmol/L リン酸緩衝液 (100 mmol/L NaCl を含む、pH 7.0) 中でホモジナイズし、遠心分離 (13,000 x g、20 分間、4°C) で得られた上清とした。陽性対照として 3.3 mg/mL acarbose を使用した。チューブに試料および α -グルコシダーゼ溶液を分注し 37°C で 5 分間、前反応させた。そこに 0.7 mmol/L p-NPG 溶液を加え 30 分間反応させた。その後、0.5 mol/L Tris を加えて反応を停止させた。反応液の一部を 96 穴プレートに分注し、400 nm の吸光度を測定し、 α -グルコシダーゼ阻害作用を算出した。

(7) ブタ皮糖化モデルにおける AGEs 生成抑制作用および黄ばみ抑制作用の検証

ブタ皮糖化モデルは以下の方法で作成した¹⁹⁾。乾燥ブタ皮は市販のペット用品 (ポークガム骨型 S、コーナン商事株式会社、大阪府堺市) を使用した。乾燥ブタ皮は、精製水に一晩浸けた後、糖化反応液 (0.1 mol/L リン酸緩衝液、2 mol/L glucose) と試料 (ホエイまたは精製水) を混合した溶液に浸漬し、60°C で 8 日間反応させた。

反応後のブタ皮は、裁断した 1 cm 四方を 800 μ L の 0.1 mol/L リン酸緩衝液中でホモジナイズした。ホモジナイズした溶液 50 μ L に 5 N NaOH を 250 μ L 加え、超音波処理 (15 分間) 後、遠心分離 (10,000 x g、10 分間) した上清を回収し、ブタ皮抽出液とした。ブタ皮抽出液の蛋白量は DC protein assay で測定した。ブタ皮抽出液は着色度を 400 nm の吸光度測定、AGEs 量を蛍光測定 (Ex 370 nm/Em 440 nm) することで評価した。黄色度および蛍光性 AGEs 量は蛋白量 1 mg あたりの値を算出した。

(8) 蛋白架橋形成阻害作用の検証

蛋白架橋形成は Lysozyme-Glucose/Fructose 糖化反応モデルを使用した^{20,21)}。0.2 mol/L リン酸緩衝液、3 mol/L glucose/fructose、5 mol/L glucose/fructose、50 mg/mL lysozyme を調製した。これらを終濃度 0.1 mol/L リン酸緩衝液、0.3 または 0.5 mol/L glucose (または fructose)、

5 mg/mL lysozyme となるよう Lysozyme-Glucose/Fructose 糖化反応モデルを作製し、試料を 1/10 濃度になるよう添加した。その後、糖化反応モデルを 60°C で 40 時間反応させ、SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) (分離ゲル濃度:15%) で分離後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色し蛋白バンドを検出した。バンド強度は ImageJ^{22,23)} (NIH, Maryland, USA) により画像解析を行い、数値化した。

(9) 解析方法

測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。測定回数は 2 回 (n = 2) または 3 回 (n = 3) とした。

結果

AGEs および糖化反応中間体生成抑制作用

ホエイおよび AG の AGEs および糖化反応中間体生成抑制作用を Fig. 1 に示した。19 種すべてのホエイは蛍光性 AGEs、ペントシジンの生成を抑制した。蛍光性 AGEs 生成抑制率が最も高いものはヨーグルト No.3 (60.5 \pm 3.4%)、ペントシジン生成抑制率が最も高いものは、No.1 (89.8 \pm 14.8%) であった (Fig. 1-a, b)。CML については、No.15 以外で抑制作用がみられた。CML 生成抑制率が最も高いものは、No.6 (99.1 \pm 0.1%) であった (Fig. 1-c)。乳酸は蛍光性 AGEs 生成を 29.5 \pm 1.1%、ペントシジン生成を 49.0 \pm 4.4% 抑制した。

糖化反応中間体について、19 種すべてのホエイが 3DG 以外の GO および MGO の生成を抑制した。3DG、GO、MGO の生成抑制率の平均値はそれぞれ、-18.3 \pm 9.1%、48.6 \pm 15.9%、56.8 \pm 11.0% であった (Fig. 1-d)。乳酸は MGO 生成のみを 25.3 \pm 3.3% 抑制した。

カルボニル化蛋白生成抑制作用

ホエイおよび AG のカルボニル化蛋白生成抑制作用を Fig. 2 に示した。ホエイのカルボニル化蛋白生成抑制率の 19 種平均値は 4.3 \pm 15.3% であった。

DPPH ラジカル消去活性

ホエイの DPPH ラジカル消去活性を Fig. 3 に示した。ホエイの DPPH ラジカル消去活性の 19 種平均値は 52.3 \pm 19.3 μ mol-Trolox 相当量 / L であった。

α -グルコシダーゼ阻害作用

ヨーグルトホエイおよび陽性対照 acarbose (終濃度: 0.099 mg/mL) の α -グルコシダーゼ阻害作用を Fig. 4 に示した。最も高い作用をもつホエイは No.4 であり、 α -グルコシダーゼ阻害率は 19.6% であった。残りの 18 種のホエイの α -グルコシダーゼ阻害率は 10% 以下であった。

ヨーグルトホエイの糖化ストレス抑制作用

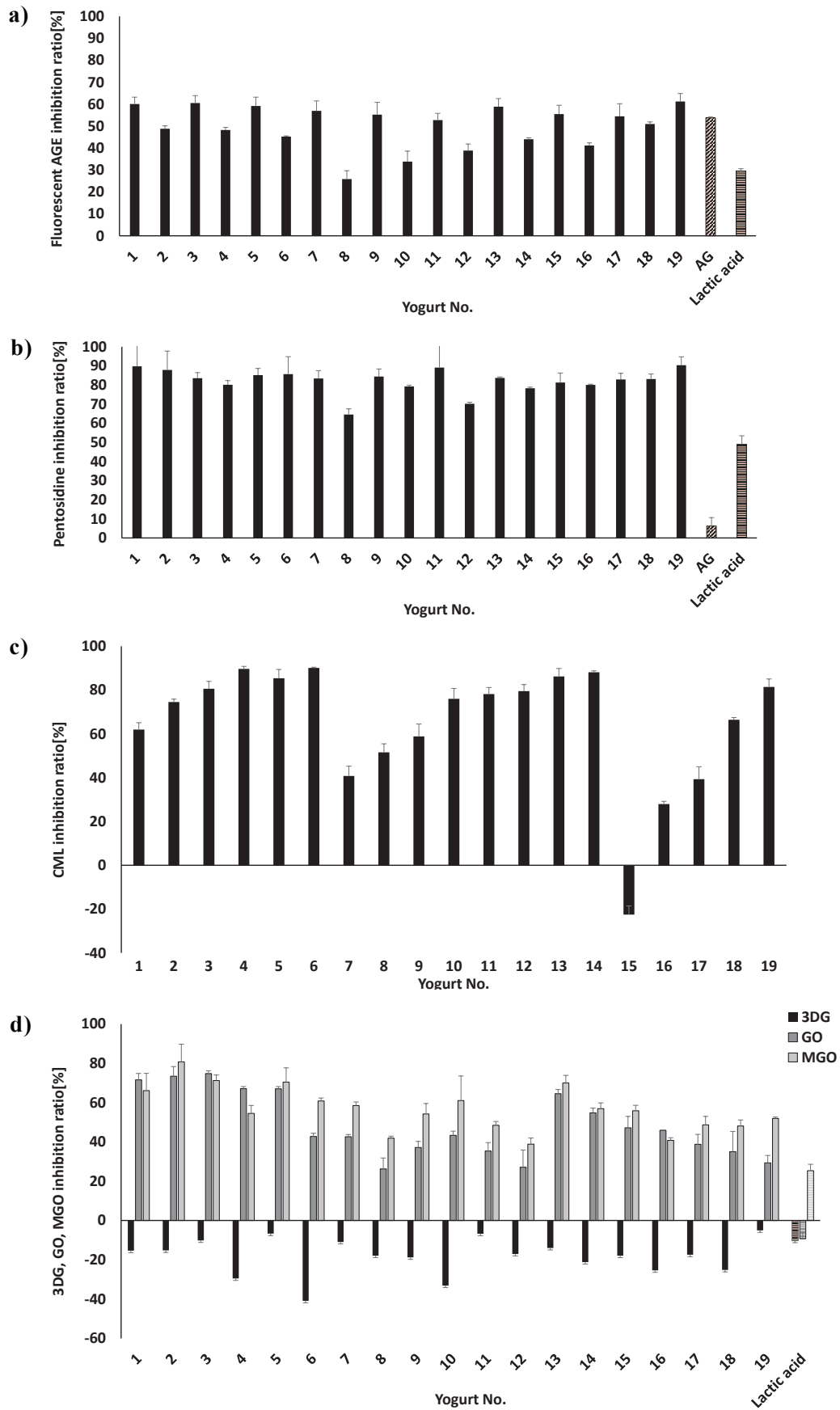


Fig. 1. Inhibitory effect of yogurt whey on AGEs and intermediate formation in the HSA-Glucose reaction model.

Results are expressed as mean \pm SD. Yogurt whey were introduced into glycation models containing 8 mg/mL HSA and 0.2 mol/L glucose (n = 3). After 40-hour incubation at 60°C, (a) fluorescent AGEs were measured by Ex 370 nm / Em 440 nm, (b) pentosidine were measured by HPLC, (c) CML were measured by ELISA, (d) 3DG, GO, MGO were measured by HPLC. Final concentration of whey was 5 mg/mL (except for (c): 0.5 mg/mL). Final concentration of AG was 0.1 mg/mL. Final concentration of Lactic acid was 1 mg/mL. AGEs, advanced glycation end products; HSA, human serum albumin; HPLC, high performance liquid chromatography; CML, N^ε-carboxymethyllysine; 3DG, 3-deoxyglucosone; GO, glyoxal; MGO, methylglyoxal; AG, aminoguanidine; SD, standard deviation.

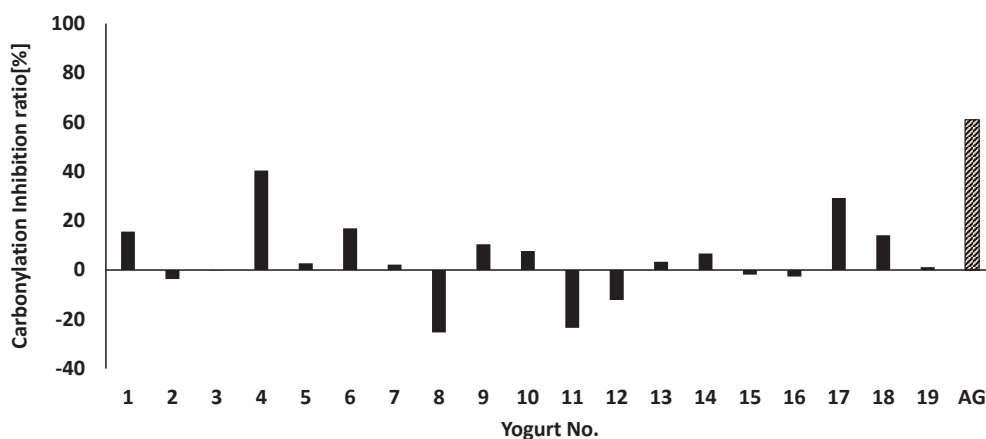


Fig. 2. Inhibitory effect of yogurt whey on carbonylation in the HSA-Acrolein reaction models.

Yogurt whey were introduced into carbonylation models containing 8 mg/mL HSA and 0.01 mol/L acrolein (n = 2). After 2-hour incubation at 37°C, measured by absorbance at 450 nm (final concentration of whey: 25 mg/mL, AG: 0.5 mg/mL). HSA, human serum albumin; AG, aminoguanidine.

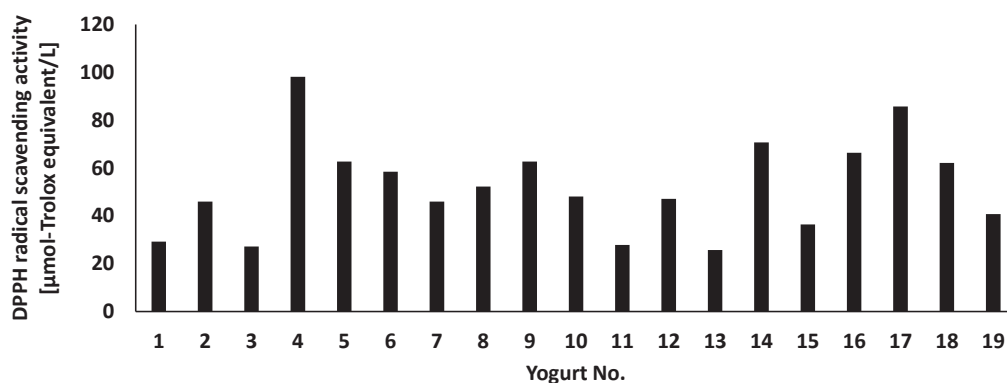


Fig. 3. Anti-oxidative activity of yogurt whey.

DPPH radical scavending activity of whey was measured by a method of calculating the equivalent amount of Trolox using it as a standard substance (n = 2). DPPH, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl.

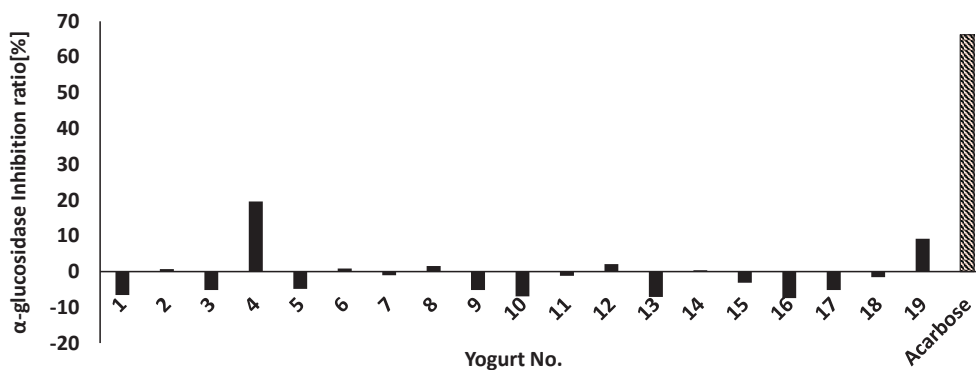


Fig. 4. α-glucosidase inhibitory action of yogurt whey.

After adding whey to 0.9 U/mL α-glucosidase solution, 0.7 mol/L p-nitrophenyl-α- D-glucopyranoside (p-NPG) was added and reacted (n = 2). After 30 min incubation at 37°C, measured by absorbance at 400 nm (final concentration of whey: 1.5 mg/mL, acarbose: 0.099 mg/mL).

ブタ皮糖化モデルにおけるAGEs生成抑制作用
および黄ばみ抑制作用

ブタ皮糖化モデルの反応開始後5日目の写真を Fig. 5-a に示した。また、ブタ皮抽出液の蛍光性 AGEs 量経時変化を Fig. 5-b に、黄色度の経時変化を Fig. 5-c に示した。Glucose(+)ブタ皮抽出液は経時的に蛍光性 AGEs

量および黄色度が増加した。反応開始後8日目における Glucose(+)-精製水ブタ皮抽出液は Glucose(+)-ホエイブタ皮抽出液と比較して、蛍光性 AGEs 量は2.0倍、黄色度は1.6倍高かった。また、Glucose(+)-精製水に浸けたブタ皮は、Glucose(+)-ホエイブタ皮と比較して、硬くなっていた。

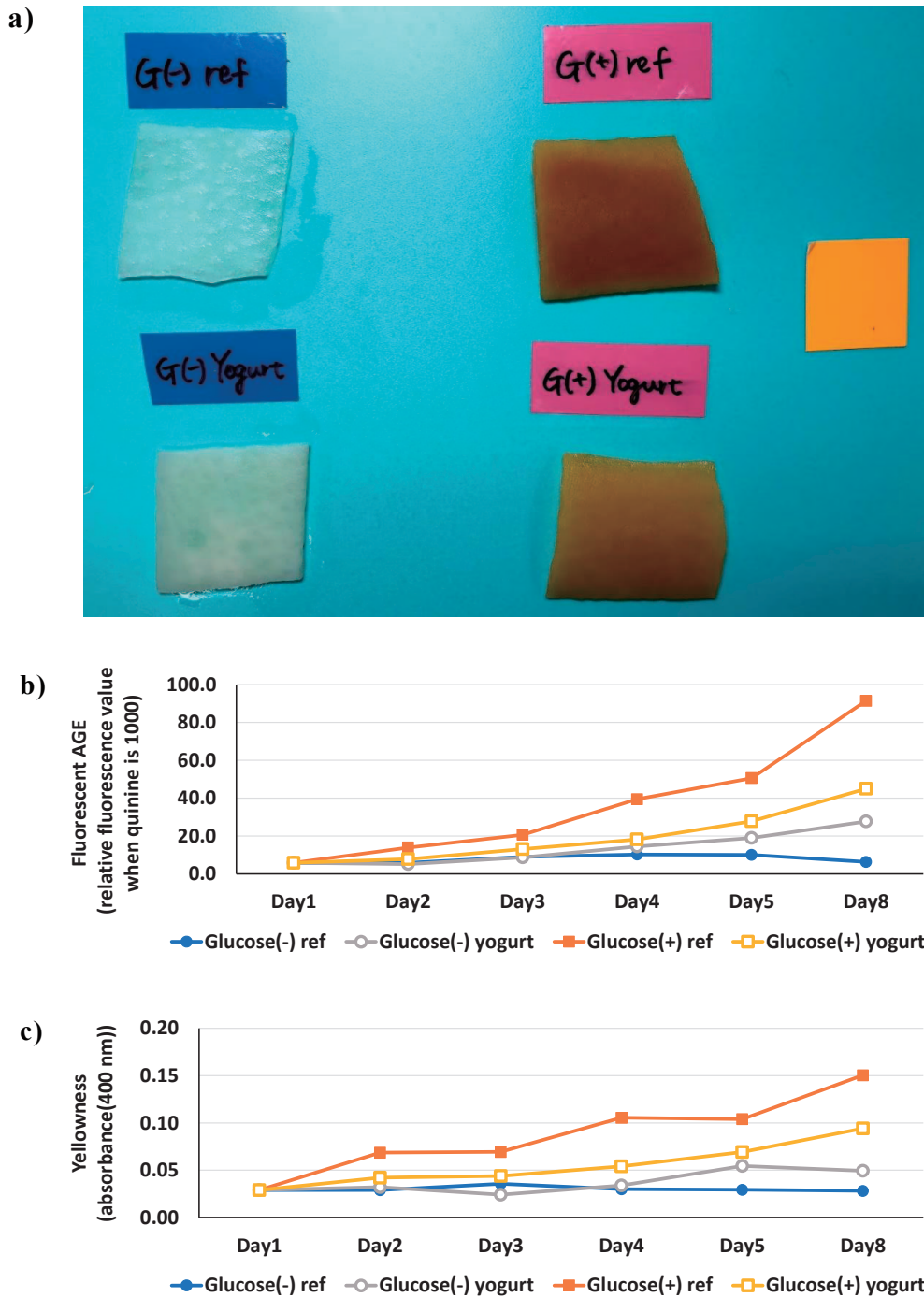


Fig. 5. Glycative models of pig skin.

The pig skin was immersed in 2 mol/L glucose solution and reacted at 60°C for 8 days. (a) Representative images fifth day. (b, c) Inhibitory effect of Yogurt whey (No.1) on AGEs and yellowness in the glycative pig skin model. Whole protein was extracted from pig skin, fluorescent AGEs were measured by 370 / 440 nm and yellowness were measured by absorbance at 400 nm (n = 2). AGEs, advanced glycation end products.

蛋白架橋形成阻害作用

Lysozyme-Glucose/Fructose 糖化反応モデルのSDS-PAGEの結果をFig. 6-aに示し、0 mol/L Glucose/Fructoseのバンド強度を1としたときのそれぞれのバンド相対強度をTable 2-aに示した。Lysozyme (分子量; 14,307) の単量体は11 kDa付近にみられた。糖化反応により Lysozyme が架橋形成して重合した結果、二量体は25 kDa付近にみられ、三量体は35 kDaより少し上方にみられた。Lane 2,3とLane 4,5を比較すると、Lane 4,5 (Fructose) のバンド強度が強かった (Table 2-a)。また、Lane 4とLane 5を

比較すると、Lane 5 (0.5 mol/L Fructose) のバンド強度が三量体は1.5倍、二量体は1.2倍強かった (Table 2-a)。

ホエイを添加した Lysozyme-Fructose 糖化反応モデルのSDS-PAGEの結果をFig. 6-bに示し、Lysozyme-0.5 mol/L Fructose 糖化反応モデルのバンド強度を100としたときのホエイ添加糖化反応モデルのバンド相対強度をTable 2-bに示した。ホエイは蛋白架橋を三量体: $93.1 \pm 3.4\%$ 、二量体: $68.5 \pm 4.5\%$ 抑制した (Table 2-b)。このことよりホエイは蛋白の架橋形成による重合を阻害したといえる。

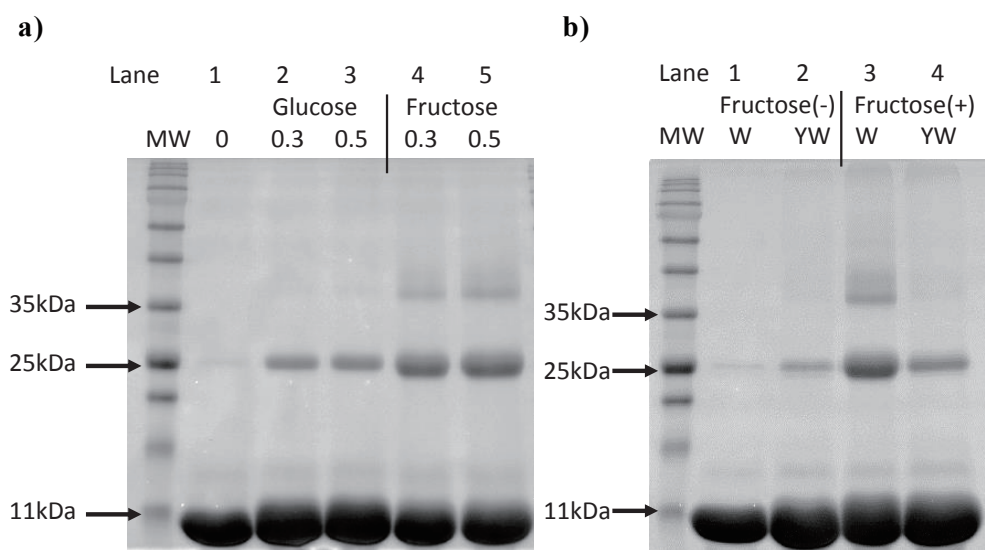


Fig. 6. (a) Effect of glucose and fructose on cross-linking of proteins. (b) Inhibitory effect of yogurt whey on cross-linking of lysozyme.

5 mg/mL lysozyme were incubated at 60°C for 40 hours (a) with glucose or fructose at concentrations of 0, 0.3 and 0.5 mol/L and (b) with or without 0.5 mol/L fructose in the presence or absence of whey (No.1). SDS-PAGE was conducted using 15% acrylamide gels. MW, molecular weight markers; W, incubation without whey (with water); YW, incubation with whey (No.1).

Table 2-a. Band relative strength (Lane 1 = 1).

| Lane | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------|---|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Glucose / Fructose | 0 | 0.3 Glc | 0.5 Glc | 0.3 Fru | 0.5 Fru |
| Trimer | 1 | 3.9 ± 2.3 | 5.5 ± 4.5 | 30.0 ± 17.7 | 46.3 ± 27.6 |
| Dimer | 1 | 16.5 ± 5.5 | 18.8 ± 5.6 | 37.6 ± 11.6 | 44.7 ± 17.3 |

Band intensity was analyzed by ImageJ. Glu, glucose; Fru, fructose; 0.3, 0.3 mol/L; 0.5, 0.5 mol/L.

Table 2-b. Cross-linking formation ratio (W=100).

| Lane | W | YW |
|--------|-----|----------------|
| Trimer | 100 | 6.9 ± 3.4 |
| Dimer | 100 | 31.5 ± 4.5 |

Band intensity was analyzed by ImageJ. Method of calculation: cross-linking ratio = $(\text{Fru}(+)YW - \text{Fru}(-)YW) / (\text{Fru}(+)W - \text{Fru}(-)W) \times 100$. W, incubation without whey (with water); YW, incubation with whey (No.1).

考察

ヨーグルトホエイの糖化反応抑制作用

AGEs生成抑制作用は19種すべてのホエイでみられた。特に、ペントシジン生成抑制作用は全体的に強く、抑制率は $82.3 \pm 6.2\%$ であった。一方、糖化反応中間体生成抑制作用に関して、19種すべてのホエイにGO、MGO生成抑制作用がみられたが3DG生成は抑制しなかった。また、カルボニル化蛋白生成抑制作用も全体的に低く、抑制率は $4.3 \pm 15.3\%$ であった。

これまでに我々は、500種以上の植物由来の素材を用いて抗糖化作用を評価してきた^{13,24-27}。また、既に、乳製品が蛍光性AGEs生成抑制作用を有することも報告している⁹。今回、ホエイは蛍光性AGEsだけでなく、糖化反応中間体、ペントシジンの生成を抑制することが示された。ホエイの糖化反応抑制作用は植物由来の素材と比較していくつかの点で異なっていた。植物由来の素材は3DG生成抑制作用およびDPPHラジカル消去活性が強い傾向がある²⁸⁻³⁰。これは植物には抗酸化作用を有するポリフェノールが含まれており、ポリフェノールはラジカルトラッピング作用およびカルボニルトラッピング作用を有するためと考えられる^{31,32}。ヨーグルトホエイはポリフェノールを含有していないため、植物由来の素材と比較して3DG生成を抑制せず、DPPHラジカル消去活性が弱かった可能性がある。

今回、我々はヨーグルトホエイの糖化反応抑制作用成分の探索を行った。50 mg/mL ホエイ中の乳酸量は、ラクテート・プロ2（アークレイ株式会社、京都）を用いて定量したところ、 10.9 ± 4.6 mg/mLであった（結果掲載なし）。HSA-Glucose糖化反応モデルに用いた終濃度5 mg/mLのホエイ中に含まれる乳酸相当量である終濃度1 mg/mL乳酸を用いて、糖化反応抑制作用に対するホエイ中の乳酸の寄与について検証した。乳酸は蛍光性AGEsを $29.5 \pm 1.1\%$ 、ペントシジンを $49.0 \pm 4.4\%$ 、MGOを $25.3\% \pm 3.3\%$ 生成抑制したことから、糖化反応抑制作用成分の一つは乳酸であることが考えられた。しかし、ホエイの蛍光性AGEs、ペントシジン、MGO生成抑制率（19種ホエイの平均値）に対する乳酸の寄与率は、それぞれ59.0%、59.6%、44.6%であった。これらの所見は、ホエイの糖化反応抑制作用は乳酸以外の成分関与の可能性を示唆している。

皮膚老化予防の観点からのホエイの糖化反応抑制作用

ヨーグルトホエイは、美白効果や保湿効果、肌荒れ防止効果などをもつとされ、民間療法として肌に塗布して用いられてきた。今回我々は、皮膚老化予防の観点からホエイの抗糖化作用を検証した。その結果、ヨーグルトホエイは皮膚モデルの黄色化を抑制した（Fig.5）。老化による肌の黄色化については、真皮の蛋白質のカルボニル化に起

因することが報告されている³³。しかし、本研究結果ではホエイはカルボニル化蛋白生成抑制作用が全体的に弱く、抑制率の平均値は $4.3 \pm 15.3\%$ であった（Fig.2）。一方で、ホエイは皮膚モデルの蛋白質のAGE化を抑制した（Fig.5）。これらの所見より、皮膚の黄色化の原因は蛋白質のカルボニル化以外にも存在し、ホエイは皮膚の糖化による黄色化を防ぐ作用があることが示唆された。

皮膚モデルを用いた実験では、ホエイは糖化による皮膚硬化を抑制した。皮膚硬化の原因については、糖化により蛋白が架橋され、架橋された蛋白が皮膚の弾力低下に影響することが知られている^{34,35}。Lysozyme-Fructose糖化反応モデルの結果より、ホエイには蛋白架橋を阻害する作用が存在した（Fig.6）。この結果から、ホエイの蛋白架橋形成阻害作用が皮膚モデルの弾力低下抑制に作用している可能性が示唆された。

ヨーグルトホエイの糖化ストレス抑制作用

ホエイによる糖化ストレス抑制作用と各評価結果の相関性について検証した。蛍光性AGEsとペントシジン（ $r = 0.79$, $y = 0.5092x + 56.789$ ）、蛍光性AGEsとCML（ $r = 0.92$, $y = 0.305x - 4.6222$ ）、GOとMGO（ $r = 0.82$, $y = 0.5681x + 29.168$ ）の生成抑制作用に強い正の相関性がみられた。蛍光性AGEsには、ペントシジン、クロスリン、ピロピリジンなどが挙げられる^{36,37}。これらの物質とCMLの生成はヨーグルトホエイ中の同一成分によって抑制されていると考えられた。また、GOとMGOの生成抑制も同一成分に起因することが考えられた。

次にヨーグルト発酵菌と糖化ストレス抑制作用の関係を検証した。19種ヨーグルトの発酵菌には様々な菌属・菌種・菌株のものが存在した（Table1）。しかし、AGEs生成抑制作用と発酵菌の菌属・菌種・菌株に関係性はみられなかった。乳酸菌とビフィズス菌での差異もみられなかった。このことから、ヨーグルトホエイのAGEs生成抑制作用の差異には、原材料や発酵時間などの製造方法が関与している可能性があった。

糖化ストレスを抑制するには、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、糖化反応生成物の分解・排泄などが挙げられる⁸。ヨーグルトを米飯の前に摂取すると食後高血糖が抑制されることが報告されている³⁸。本研究では、ヨーグルトホエイの α -グルコシダーゼ阻害作用は弱かったことから、ヨーグルトによる食後高血糖の抑制にホエイの α -グルコシダーゼ阻害作用の影響は小さいと考えられた。本研究でヨーグルトはAGEsの生成を抑制することが示唆された。つまり、ヨーグルトは*in vitro*および*semi-in vivo*で糖化ストレスを抑制することが明らかになった。ヨーグルトのAGEs分解作用については、今後検証する必要がある。

ヨーグルトは経口摂取によって体内の糖化反応を抑制し、肌の健康維持と増進に貢献する重要な食品である。今後、マウスなどを用いた動物実験、およびヒトでの摂取試験による検証が必要である。

結語

ヨーグルトホエイは、糖化反応抑制作用、AGEs架橋形成阻害作用および抗酸化作用を有し、糖化ストレス抑制作用を有する食品であることが示唆された。

利益相反申告

本研究の遂行にあたり、株式会社エズエス（東京都港区）より研究支援を受けた。

謝辞

本研究の概略は第17回糖化ストレス研究会（2019年8月31日、京都）にて発表した。

参考文献

- 1) Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 3071-3109.
- 2) Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. Significance of advanced glycation end products in aging-related disease. *Anti-Aging Med*. 2010; 7: 112-119.
- 3) Reiser KM. Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998; 218: 23-37.
- 4) Saito M, Fujii K, Soshi S, et al. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 986-995.
- 5) Reddy VP, Obrenovich ME, Atwood CS, et al. Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox Res*. 2002; 4: 191-209.
- 6) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*. 1986; 232(4758): 1629-1632.
- 7) 辨野義巳. プロバイオティクスとして用いられる乳酸菌の分類と効能. *モダンメディア*. 2011; 57: 277-287.
- 8) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo aging in skin. *Anti-Aging Med*. 2011; 8: 23-29.
- 9) Tanaka Y, Yagi M, Takabe W, et al. Anti-glycative effect of yogurt: Prevention of advanced glycation end product formation. *Glycative Stress Res*. 2017; 4: 25-31.
- 10) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 125-134.
- 11) Yagi M, Isshiki K, Takabe W, et al. Measurement of pentosidine in human plasma by the high performance liquid chromatography. *Glycative Stress Res*. 2018; 5: 119-128.
- 12) Scheijen JL, van de Waarenburg MP, Stehouwer CD, et al. Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009; 877: 610-614.
- 13) Hori M, Yagi M, Nomoto K, et al. Inhibition of advanced glycation end product formation by herbal teas and its relation to anti-skin aging. *Anti-Aging Med*. 2012; 9: 135-148.
- 14) Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016; 1019: 178-190.
- 15) Mesquita CS, Oliveria R, Bento F, et al. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Anal Biochem*. 2014; 458: 69-71.
- 16) Oki T, Osame M, Masuda M, et al. Simple and rapid spectrophotometric method for selecting purple-fleshed sweet potato cultivars with a high radical-scavenging activity. *Breed Sci*. 2003; 53: 101-107.
- 17) 沖 智之, 増田真美, 古田 収. 紫サツマイモを原材料としたチップスのラジカル消去活性. *日本食品科学工学会誌*. 2001; 48: 926-932.
- 18) Oki T, Matsui T, Matsumoto K. Evaluation of alpha-glucosidase inhibition by using an immobilized assay system. *Biol Pharm Bull*. 2000; 23: 1084-1087.
- 19) 一條 遼, 八木雅之, 千速夕季, 他. 牛皮を用いた糖化反応のモデル作製. *同志社大学理工学研究報告*. 2012; 53: 67-70
- 20) Perera HK, Ranasinghe H. A simple method to detect plant based inhibitors of glycation induced protein cross-linking. *Asian Journal of Medical Science*. 2015; 6: 28-33.
- 21) Muthenna P, Akileshwari C, Reddy GB. Ellagic acid, a new antiglycating agent: Its inhibition of N^ε-(carboxymethyl)lysine. *Biochem J*. 2012; 442: 221-230.
- 22) Rasband W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
- 23) Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 671-675.
- 24) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Med*. 2013; 10: 70-76.

- 25) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Antiglycation effect of various vegetables: Inhibition of advanced glycation end product formation in glucose and human serum albumin reaction system. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 22-34.
- 26) Moniruzzaman M, Parengkuan L, Yagi M, et al. Effect of proteins, sugars and extraction methods on the antiglycation activity of spices. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 129-139.
- 27) Otake K, Yagi M, Takabe W, et al. Effect of tea (*Camellia sinensis*) and herbs on advanced glycation endproduct formation and the influence of post-fermentation. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 156-162.
- 28) Yagi M, Takabe W, Matsumi S, et al. Biochemistry of Kuromoji (*Lindera umbellata*) extract: Anti-oxydative and anti-glycative actions. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 329-340.
- 29) Takeshita S, Yagi M, Uemura T, et al. Peel extract of water chestnut (*Trapa bispinosa* Roxb.) inhibits glycation, degrades α -dicarbonyl compound, and breaks advanced glycation end product crosslinks. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 72-79.
- 30) Yagi M, Naito J, Hamada U, et al. Effect of rice bran extract on *in vitro* advanced glycation end product formation. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 35-40.
- 31) Ishioka Y, Yagi M, Ogura M, et al. Polyphenol content of various vegetables: Relationship to antiglycation activity. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 41-51.
- 32) Yeh WJ, Hsia SM, Lee WH, et al. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings. *J Food Drug Anal.* 2017; 25: 84-92.
- 33) Ogura Y, Kuwahara T, Akiyama M, et al. Dermal carbonyl modification is related to the yellowish color change of photo-aged Japanese facial skin. *J Dermatol Sci.* 2011; 64: 45-52.
- 34) Goto S, Takahashi R, Kumiyama A, et al. Implication of protein degradation in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 928: 54-64.
- 35) Schnider SL, Kohn RR. Effect of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest.* 1981; 67: 1630-1635.
- 36) Cerami A, Vlassara H, Broenlee M. Glucose and aging. *Sci Am.* 1987; 256: 90-96.
- 37) Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, et al. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 226: 37-41.
- 38) Yagi M, Kishimura Y, Okuda F, et al. Effect of yogurt and rice on postprandial blood glucose levels. *Glycative Stress Res.* 2018; 5: 68-74.