

Original article

Investigation of herbal extracts that have both OPH activity enhancing action and AGE crosslink cleaving activity

Hiroshige Kawai¹⁾, Naoki Matsuo¹⁾, Eiji Yuasa¹⁾, Kaori Ishizaki²⁾, Masayuki Yagi²⁾

1) Karada Lab, Inc. (Arkray Group), Kyoto, Japan

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

Glycative Stress Research 2021; 8 (1): 39-44

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

OPH活性増強とAGEs架橋切断の作用を併せ持つハーブエキスの探索

河合博成¹⁾、松尾直紀¹⁾、湯浅英司¹⁾、石崎香²⁾、八木雅之²⁾

1) 有限会社からだサポート研究所（アークレイグループ）

2) 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】糖化ストレスによる糖化最終生成物 (AGEs) の蓄積は、加齢に関係する疾患の進行を促進する。既に蓄積したAGEsを減少させる方法として、生体内の酸化蛋白分解酵素 (OPH) を増強し、AGEs化蛋白の分解を促進させること、そして直接AGEsの架橋に作用して切断させることが考えられる。そこで本研究では、OPH活性増強作用およびAGEs架橋切断作用を併せ持つハーブについて検討した。

【方法】試料は6種類のハーブの80℃熱水抽出液を用いた。

1) OPH活性は、基質として *N*-acetyl-L-alanine *p*-nitroanilide (AAPA) を使用した。ハーブエキス、OPH溶液、AAPA溶液および Tris-HCl 緩衝液を 1 : 1 : 2 : 21 の割合に混合し、37℃で24時間反応させ、酵素分解によって生じる *p*-nitroaniline を 405 nm の吸光度で測定した。

2) AGEs 架橋切断モデルは、基質に α ジケトン構造を有する 1-Phenyl-1,2-propanedione (PPD) を使用した。ハーブエキス、PPD溶液、およびリン酸緩衝液を 5 : 1 : 4 の割合で混合し、37℃で8時間反応後、塩酸を添加して、遠心分離した上清を用い、PPDがハーブエキスによって分解されることにより生じる安息香酸を HPLC で測定した。

【結果】OPH活性増強作用は、フェヌグリーク (*Trigonella foenum-graecum*) 種子 (106.9%)、フェネル (*Foeniculum vulgare*) 種子 (81.8%)、ハイビスカス (*Hibiscus sabdariffa*) 萼および苞 (63.0%) の順に強

連絡先：河合博成

有限会社からだサポート研究所（アークレイグループ）

〒602-0008 京都市上京区岩瀬院町59 擁翠園内

TEL: 050-5830-1040 FAX: 075-431-1253 e-mail: kawaih@arkray.co.jp

共著者：松尾直紀 matsuo.hv@arkray.co.jp; 湯浅英司 yuasa.al@arkray.co.jp;

石崎香 ko-sei12@mail.doshisha.ac.jp; 八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2021; 8 (1): 39-44
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

かった。また、AGEs架橋切断作用は、フェネル種子 (39.0%)、レモンバーム (*Melissa officinalis*) 葉 (29.6%)、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) 葉および茎 (26.6%) の順に強かった。組み合わせでは、OPHの活性を減弱させるものが1つでも入ると、OPH活性は減弱側となった。

【結論】 フェネル、フェヌグreekおよびハイビスカスはOPH活性増強とAGEs架橋切断の作用を併せ持つことが認められた。また、これらのハーブの組み合わせやその比率によって、両作用を最適化できる可能性も示された。

KEY WORDS: 酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase: OPH)、糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs)、架橋切断、ハーブ

はじめに

糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) は老化や老化に伴う疾患、具体的には皮膚老化、アルツハイマー病、高血圧、動脈硬化症、骨粗鬆症などに関与する¹⁾。既に体内に蓄積したAGEsを減少させる方法としては、1) 体の新陳代謝を活発にする、すなわち生体内の酸化蛋白分解酵素 (oxidized protein hydrolase: OPH) を増強し、AGEs化蛋白の分解を促進させること、2) 生体内で直接AGEsの架橋を切断させること、が考えられる²⁾。

今回、我々は6種類のハーブに関してOPH活性増強作用およびAGEs架橋切断作用を検証したので報告する。

方法

試薬

OPHとして、acylamino-acid releasing enzyme (AARE; タカラバイオ、滋賀県草津市) を使用した。OPHの酵素基質として、*N*-acetyl-L-alanine p-nitroanilide (AAPA; Bachem AG社、Bubendorf, Switzerland) を使用した。AGEs架橋切断モデル基質として1-Phenyl-1,2-propanedione (PPD; Sigma-Aldrich Japan、東京都目黒区) を使用した。AGEs架橋切断のポジティブコントロールには*N*-phenacyl thiazolium bromide (PTB; 富士フイルム和光純薬工業、

大阪府大阪市) を用いた。その他の試薬は特級グレードのものを用いた (富士フイルム和光純薬工業、大阪府大阪市または、ナカライテスク、京都府京都市)。

ハーブ抽出液の調製

乾燥ハーブとして、タイム (*Thymus vulgaris*) 葉および茎、ローズマリー (*Rosmarinus officinalis*) 葉および茎、レモンバーム (*Melissa officinalis*) 葉、フェネル (*Foeniculum vulgare*) 種子、ハイビスカス (*Hibiscus sabdariffa*) 萼および苞およびフェヌグreek (*Trigonella foenum-graecum*) の6種類を用いた (**Table 1**)。乾燥ハーブそれぞれ2gを80°Cの蒸留水40 mLで1時間抽出し、常温まで冷却後、濾過を行い、得られた濾液をハーブ抽出液として測定に用いた。さらに単体のハーブ抽出液に加えて、複数のハーブ抽出液を等量混合したものを同様に検討した。

固形分濃度の測定

それぞれのハーブ抽出液の固形分濃度は、ハーブ抽出液5 mLをアルミトレイに入れ、110°Cに設定したインキュベーター内で4時間乾燥させた後の残重量を測定して算出した。

OPH活性増強作用の測定

OPH溶液は、AAREキットに付属のリン酸ナトリウム緩衝液で0.5 U/mLに調製した。AAPA溶液は、50% ethanol水溶液を用いて0.05 mol/Lに調製した。

Table 1. Herbs.

General name	Japanese name	Family	Site of use	Scientific name
Thyme	Tachijakousou	Lamiaceae	Leaves, stems	<i>Thymus vulgaris</i>
Rosemary	Mannenrou	Lamiaceae	Leaves, stems	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Lemon balm	Kousuihakka	Lamiaceae	Leaves	<i>Melissa officinalis</i>
Fennel	Uikyou	Apiaceae	Seeds	<i>Foeniculum vulgare</i>
Hibiscus	Hibiscus	Malvaceae	Calyx, bract	<i>Hibiscus sabdariffa</i>
Fenugreek	Koroha	Fabaceae	Seeds	<i>Trigonella foenum-graecum</i>

ハーブ抽出液 10 μ L、OPH溶液 10 μ L、AAPA溶液 20 μ L および 0.2 mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 210 μ L を 96 ウェルマイクロプレート (PerkinElmer, MA, USA) にて混和した。なお、それぞれのブランクでは、OPH 溶液の代わりに 0.2 mol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加えて総量を 250 μ L とした。従って、測定においてハーブ抽出液は 25 倍に希釈された。

その後、マイクロプレートをマイクロプレートリーダー (SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices, CA, USA) へセットし、37°C で 48 時間反応させて酵素分解によって生じる *p*-nitroaniline を波長 405 nm における吸光度で連続的に測定した (Fig. 1)。OPH 活性は 24 時間反応後の結果で評価し、次式のとおり、試料ブランク (ハーブ抽出液の代わりに蒸留水を用いた) の OPH 活性を 100% とした時に増減した割合を活性化率とした。測定は 3 回行ない、結果は平均 \pm 標準偏差として示した。

$$\text{OPHの活性化率 (\%)} = (A - B) / (C - D) \times 100 - 100$$

A: ハーブ抽出液 + OPH + AAPA, B: ハーブ抽出液 + AAPA, C: OPH + AAPA, D: AAPA

AGEs 架橋切断作用の測定

Vasan らの方法³⁾を一部改変して評価した⁴⁾。要約すると、50% アセトニトリルに溶解した PPD を α ジケトン構造を有する AGEs 架橋モデルの反応性基質として使用し

た。AGEs に由来する架橋の切断活性を測定するために、10 倍希釈したハーブ抽出液 500 μ L を 10 mmol/L PPD 100 μ L および 0.2 mol/L リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) 400 μ L と混合し、37°C で 8 時間インキュベートした。その後、2 mol/L 塩酸 (HCl) 200 μ L を加えて反応を停止させ、10,000 rpm (9,170 g) で 2 分間遠心分離した。上清中の安息香酸量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。HPLC は LC-10A (島津製作所、京都府京都市) を使用し、分析条件は次のとおりとした。

カラム: Cadenza CD-C18 75 x 4.6 mmID (インタクト、京都府京都市)

溶離液: 2 mmol/L エチレンジアミン N,N',N''-四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA-2Na) 二水和物を含む 0.2% 酢酸 / アセトニトリル (70/30)

流量: 1.0 mL/min

カラム温度: 40°C

検出波長: UV 270 nm

注入量: 50 μ L

1 mol の PPD が分解すると、1 mol の安息香酸が生成されることから (Fig. 2)、AGEs 架橋切断活性の計算は、次の計算式により算出した。測定は 3 回行ない、結果は平均 \pm 標準偏差として示した。

$$\text{AGEs 架橋切断率 (\%)} = ((A - B) / C) \times 100$$

A: 反応後の安息香酸量, B: ハーブ抽出液中の安息香酸量, C: 加えた PPD 量 (mol)

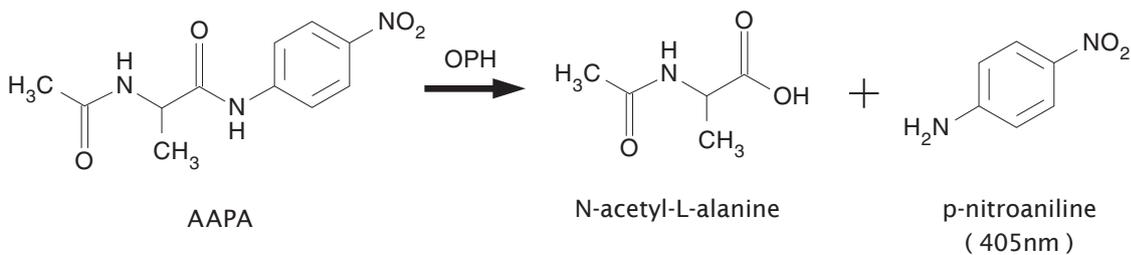


Fig. 1. Measurement principle of OPH activity.

OPH, oxidized protein hydrolase; AAPA, *N*-acetyl-L-alanine p-nitroanilide.

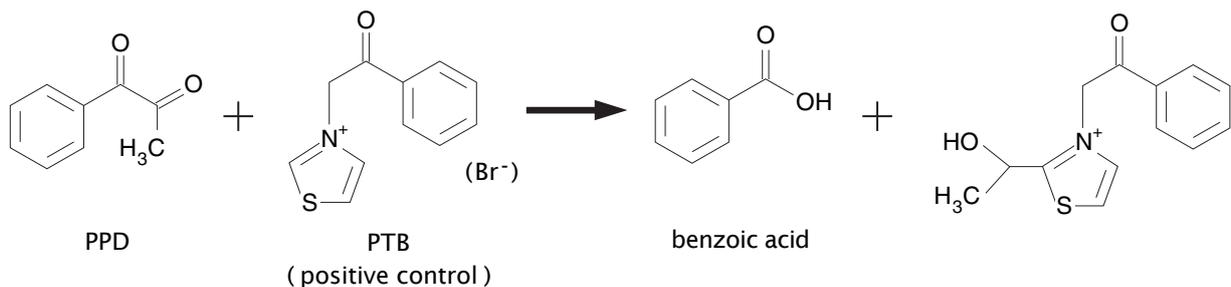


Fig. 2. Measurement principle of AGE crosslink cleaving activity.

AGE, advanced glycation end product; PPD, 1-Phenyl-1,2-propanedione; PTB, *N*-phenacyl thiazolium bromide.

統計解析

測定値は平均値 ± 標準偏差で示した。統計解析はIBM SPSS Statistics V23 (日本IBM、東京都中央区)を用いて実施した。検定はTukeyの多重比較検定で行なった。有意水準はいずれも両側検定で危険率5%未満とした。

結果

固形分濃度

各ハーブ抽出液の固形分濃度は、**Table 2**のとおりとなった。

ハイビスカス (22.1 mg/mL) が最も高く、他の5つのハーブ抽出液 (11.0 ~ 14.5 mg/mL) と比較して1.5 ~ 2.0倍であった。

OPH 活性増強作用

各ハーブ抽出液のOPH活性増強作用は、**Fig. 3**、**Table 3**のとおりとなった。

Table 2. Solid concentration of herbal extracts.

	Solid content (mg/mL)
Thyme	14.5
Rosemary	11.1
Lemon balm	13.2
Fennel	11.5
Hibiscus	22.1
Fenugreek	11.0

ハーブ抽出液の代わりに蒸留水を用いた試料ブランクの活性 (100%) を0%とした場合の数値であることから、フェヌグreek、フェネル、ハイビスカスはこの順でOPHの活性を増強し、ローズマリー、タイム、レモンバームはこの順でOPH活性を減弱させた。

複数のハーブ抽出液を等量混合したものは**Table 4**のとおりとなった。各ハーブ抽出液の単独での測定値を平均

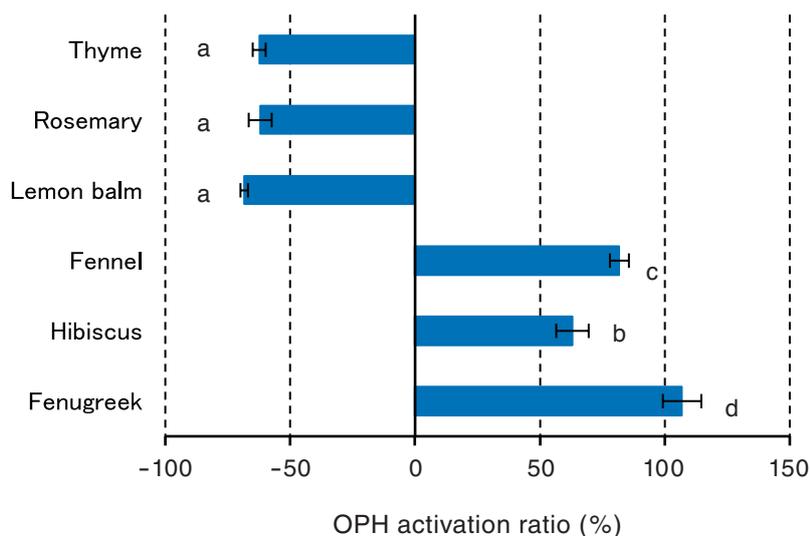


Fig. 3. OPH activation ratio.

Results are expressed as mean ± SD; n = 3; Tukey's multiple comparison test. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. OPH activation ratio, Activation ratio of OPH to reference; OPH, oxidized protein hydrolase; SD, standard deviation.

Table 3. OPH activation ratio.

	Concentration (mg/mL)	Activation ratio ¹⁾ (%)
Thyme	0.58	-62.4 ± 2.6
Rosemary	0.44	-62.0 ± 4.6
Lemon balm	0.53	-68.4 ± 1.5
Fennel	0.46	81.8 ± 3.8
Hibiscus	0.88	63.0 ± 6.5
Fenugreek	0.44	106.9 ± 7.7

1) Activation ratio: mean ± SD, n = 3. OPH, OPH, oxidized protein hydrolase; SD, standard deviation.

した理論値との比較では、減弱させるもの3種の混合は、理論値-64.3%に対して実測値-47.7%、増強させるもの3種の混合は、理論値83.9%に対して実測値78.8%と比較的近い値となったが、減弱させるものと増強させるものを組み合わせると理論値-2.7~22.3%に対して実測値-67.0~-45.2%と大きく減弱側にシフトした。

AGEs架橋切断作用

各ハーブ抽出液のAGEs架橋切断作用は、**Fig.4, Table 5**のとおりとなった。

AGEs架橋切断率の平均値は、フェネルが最も高く、次いでレモンバーム、ローズマリー、タイム、フェヌグreek、ハイビスカスの順であった。

Table 4. OPH activation ratio in combination of herbal extracts

	Concentration (mg/mL)	Activation ratio ¹⁾ (%)	Theoretical value ²⁾ (%)
Mixing the same amount of thyme, rosemary and lemon balm extract	0.52	-47.7 ± 1.8	-64.3
Mixing the same amount of fennel, hibiscus and fenugreek extract	0.59	78.8 ± 12.2	83.9
Mixing the same amount of all 6 extracts	0.56	-67.0 ± 5.8	9.8
Mixing the same amount of lemon balm and hibiscus extract	0.71	-60.7 ± 2.4	-2.7
Mixing the same amount of thyme and fenugreek extract	0.51	-45.2 ± 4.1	22.3

1) Activation ratio, mean ± SD, n = 3. OPH, oxidized protein hydrolase; SD, standard deviation.

2) The theoretical values are a mean of the measured values of each individual herbal extract.

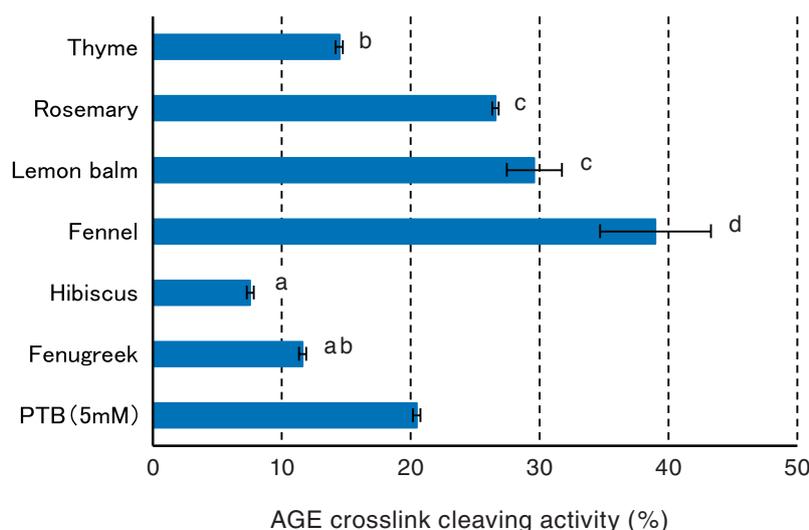


Fig.4. AGE crosslink cleaving activity.

Results are expressed as mean ± SD; n = 3; Tukey's multiple comparison test. Values with different letters are significantly different at p < 0.05. AGE, advanced glycation end product; SD, standard deviation.

Table 5. AGE crosslink cleaving activity

	Concentration (mg/mL)	Cleaving activity ¹⁾ (%)
Thyme	1.45	14.5 ± 0.3
Rosemary	1.11	26.6 ± 0.3
Lemon balm	1.32	29.6 ± 2.1
Fennel	1.15	39.0 ± 4.3
Hibiscus	2.21	7.6 ± 0.3
Fenugreek	1.10	11.6 ± 0.3
PTB (5 mmol/L)	-	20.5 ± 0.3

1) Cleaving ratio, mean ± SD, n = 3. AGE, advanced glycation end product; PTB, N-phenacyl thiazolium bromide; SD, standard deviation.

考察

ロスマリン酸^{5,6)}およびカルノシン酸⁶⁾のAGEs架橋切断作用が報告されている。ローズマリーにはロスマリン酸とカルノシン酸、レモンバームおよびタイムにはロスマリン酸が含まれるため、この作用に寄与したものと考えられた。

一般に高いAGEs架橋切断作用を有する化合物は反応性が高いことから、逆に酵素に対しては阻害する傾向があると考えられる。一例では、緑茶(チャノキ、*Camellia sinensis*)に含まれるエピガロカテキンガレートやエピガロカテキンなどのカテキン類は、他の代表的な植物成分と比較して高いAGEs架橋切断作用が確認されている⁶⁾。一方、OPH活性に関しては緑茶6種類全てに抑制作用が報告されている⁷⁾。

今回は、OPH活性増強とAGEs架橋切断の作用を併せ持つハーブエキスの探索を試みた。これらの2つの作用が生体内において同時に働くことで、より高いAGEs分解効果が期待されたからである。

結果は、フェネル、フェヌグリークおよびハイビスカスに両方の作用が認められた。フェネルにはアネトール、アニスアルデヒドなど⁸⁾、フェヌグリークにはトリゴネリン、ジオスゲニンなど⁹⁾、ハイビスカスにはクエン酸、アントシアニン類など¹⁰⁾が含まれているが、両作用がどの成分によるものか、現在のところ不明である。メラトニンについてはAGEs架橋切断作用が報告されており⁶⁾、フェネルおよびフェヌグリークにも含まれるが、含有量がそれぞれ

28 ng/g, 43 ng/gと低い¹¹⁾。実験条件の比較ではメラトニン濃度が1万倍以上異なるため、寄与度は低いもの推察された。

さらにハーブの組み合わせによるOPH活性増強作用を検討したところ、今回の組み合わせ方法の範囲では、一つでもOPHの活性を減弱させるハーブが入ると、その種類や数にかかわらず組み合わせの活性も減弱側となった。これは前述の反応性が高い化合物が入ることで酵素が阻害されるためとの推測と整合した。

今回の活性を増強させた組み合わせはフェヌグリーク、フェネルおよびハイビスカスの等量混合のみであったが、混合比率を変えることによって、さらに高い活性が得られる可能性も考えられた。

結語

フェネル、フェヌグリークおよびハイビスカスはOPH活性増強とAGEs架橋切断の作用を併せ持つことが認められた。また、これらのハーブの組み合わせやその比率によって、両作用を最適化できる可能性も示された。

利益相反申告

本研究はアークレイ株式会社が研究費を出資した。

参考文献

- 1) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 152-155.
- 2) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 14. Regulation of Glycative stress. 2. Inhibition of the AGE production and accumulation. *Glycative Stress Res.* 2019; 6: 212-218.
- 3) Ishizaki K, Yagi M, Sakiyama C, *et al.* Influence on the oxidized protein hydrolase (OPH) activity of herbal tea extract. *Glycative Stress Res.* 2020; 7: 22-28.
- 4) Vasan S, Zhang X, Zhang X, *et al.* An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature.* 1996; 382: 275-278.
- 5) Yagi M, Mitsuhashi R, Watanabe A, *et al.* Cleaving effect of pomegranate (*Punica granatum*) extract on crosslink derived from advanced glycation endproducts. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 58-66.
- 6) Jean D, Pouligon M, Dalle C. Evaluation *in vitro* of AGE-crosslinks breaking ability of rosmarinic acid. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 204-207.
- 7) Takabe W, Mitsuhashi R, Parengkuan L, *et al.* Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 38-43.
- 8) “Foeniculum vulgare”. KNApSAcK Core data base. http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/result.php?sname=organism&word=Foeniculum%20vulgare, (Accessed on 2021-01-19)
- 9) “Trigonella foenum-graecum”. KNApSAcK Core data base. http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/result.php?sname=organism&word=Trigonella%20foenum-graecum, (Accessed on 2021-01-19)
- 10) “Hibiscus sabdariffa”. KNApSAcK Core data base. http://www.knapsackfamily.com/knapsack_core/result.php?sname=organism&word=Hibiscus%20sabdarriffa, (Accessed on 2021-01-19)
- 11) Shi H, Love J, Hu W. Melatonin in plants. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 1666.